

2014年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 菊谷 早絵 (理工学研究科松田研究室)

研究課題 海洋性珪藻ピレノイドの生化学的構造と機能

研究期間 2014年4月1日～2015年3月31日

研究成果概要 (日本文 (全角) の場合は2,500字程度、英文 (半角) の場合は90字×65行程度)

珪藻類をはじめとする多くの微細藻類は、海水中で効率よく無機炭素を取り込むためにCO₂濃縮機構 (CO₂-concentrating mechanism: CCM)を有している。ピレノイドは、葉緑体内に存在するribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)を多量に含むタンパク質顆粒であり、CCMにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、これまでに珪藻類のピレノイドが単離されたことはなく、RubisCO、2つのβ型carbonic anhydrase (PtCA1 及びPtCA2) 及びfructose-1,6-bisphosphate aldolaseがピレノイドに局在することがわかっているのみで、ピレノイドの生化学的構造及び機能についてはほとんどわかっていなかった。そこで、本研究では海洋性珪藻*Phaeodactylum tricornutum*のピレノイドの機能解明を目的とし、新規ピレノイドタンパク質の探索及び機能同定を目的として研究を行った。

【新規ピレノイド貫通型チラコイド局在タンパク質の機能解析】

緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*のピレノイド近傍に局在するタンパク質の1つにLCIBがあり、CCMにおいて重要な役割を担っていることがわかっている。そのホモログが珪藻にも存在することがわかっていた。そこで、*P. tricornutum*の4つのLCIBホモログの機能解析を行った。これまでに、LCIBホモログのうちの一つPtLCIB2はピレノイド貫通型チラコイドに局在し、*P. tricornutum*における高親和性光合成に関与することが示唆されていたものの、そのタンパク質の機能は未解明であった。これまでに得られたデータを踏まえ、*P. tricornutum*は低CO₂環境下において、ピレノイド貫通チラコイドの酸性環境を利用してHCO₃⁻からCO₂への変換を行い、ピレノイドに局在するRubisCOへとCO₂を供給しており、PtLCIB2はHCO₃⁻からCO₂への変換を触媒するCAとして機能しているのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するため、大腸菌による組換えタンパク質の発現及び精製を行い、CA活性の測定を行った。その結果、PtLCIB2はCA活性が見られた。また、CAにはエステルの加水分解活性 (エステラーゼ活性) もあることが知られており、エステラーゼ活性の測定を行った結果、活性が確認できた。これらの結果よりPtLCIB2は新規のCAである可能性が強く示唆された。

【新規葉緑体機能未知タンパク質の機能解析】

既知のピレノイド局在タンパク質と相互作用するタンパク質を、光クロスリンクを行った後にプルダウンアッセイを行うことにより探索を試みている。これまでにPtCA1 及びPtCA2 とのクロスリンクにより同定されたタンパク質として、β-CA linking protein (bCAL) がある。PtCALは4回膜貫通領域を持ち、チラコイド膜タンパク質であることが示めされている。bCALのホモログは、シアノバクテリアから高等植物まで多くの光合成生物において保存されていることから、光合成において重要な役割を果たしていることも考えるが、機能の解明はされていない。

った。そこで、機能欠損体の作製が比較的容易である、シアノバクテリア及びシロイヌナズナを用いた機能解明を試みている。シロイヌナズナにおいては、2つのbCALホモログ存在し、それぞれのT-DNA挿入変異体の取得を試みた。1 つについてはホモ個体の取得ができたが、もう一方についてはホモ個体の取得には至っていない。ホモ変異体を得られたものについて、光化学系への影響を調べたが、影響は見られなかった。2 つのホモログが機能相補し合っていることが予想され、今後二重変異体を作製してその表現型を調べる必要があると考えている。シアノバクテリアにおいては、1つのbCALホモログが存在する。その変異体を作製したところ、高CO₂要求性となり、低CO₂環境下では生育できなかつた。このことから、bCALホモログはシアノバクテリアにおいて低CO₂環境下での生育に必須であることが示めされた。今後、この変異体にPtbCAL及びそのホモログであるbCAL-like protein (bCALL) を導入して機能復帰が可能かどうか検証する予定である。

博士研究員在職期間中の研究業績

学会発表 (○印が発表者)

○菊谷早絵、長里千香子、松田祐介「海洋性珪藻における新規ピレノイド貫通チラコイド局在タンパク質」第5回日本光合成学会 (奈良) 2014年5月 (ポスター発表)

○石田沙有里、千代亜希、長里千香子、菊谷早絵、松田祐介「海洋性珪藻RubisCO活性化酵素-2つのCbbX」日本植物学会第78回大会 (神奈川) 2014年9月(口頭発表)

○Iqna Kamila Abfa, Elizabeth Freeman, Mikiko Morishita, Luke Mackinder, Martin Jonikas, Sae Kikutani, Yusuke Matsuda “Development of an Intracellular inorganic carbon nanosensor based upon Förster resonance energy transfer (FRET)” 第56回日本植物生理学会年会 (東京) 2015年3月 (ポスター発表)

□

□