

## 2014年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 中島 健介 (理工学研究科松田研究室)

研究課題 特殊生物の自己組織化能を利用した新規機能基材の開発

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)

高塩・高アルカリ環境下である海水における溶存無機炭素種の形態は、直接的な光合成基質となるCO<sub>2</sub>よりも圧倒的に重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) が多い。このような極度のCO<sub>2</sub>欠乏環境下にもかかわらず、海洋性珪藻類の活発な光合成による地球全体の1次生産量は、約20%にも達することから、珪藻類は、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を積極的に獲得し、光合成に利用していることが考えられる。しかしながら、海洋性珪藻類のHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>獲得の詳細な機構は、未解明な部分が多い。これまでに、我々の研究成果から、海洋性羽状目珪藻*Phaeodactylum tricornutum*のゲノム上には、哺乳類のHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体として知られているsolute carrier protein (SLC) 4およびSLC26のホモログ因子が、少なくとも10因子存在し、そのうち、高CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>) 環境下と比較して、低CO<sub>2</sub> (0.039% CO<sub>2</sub>) 環境下で顕著に誘導される3遺伝子 (*ptSLC4-1*, *ptSLC4-2*, *ptSLC4-4*) がコードするタンパク質は、細胞膜上に局在し、主にNa<sup>+</sup>依存的にHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を輸送していることを明らかにしてきた。しかしながら、珪藻類は二次共生によって誕生した生物であり、葉緑体が高等植物には見られない4重膜によって包まれていることから、PtSLC4-1、PtSLC4-2、PtSLC4-4によって取り込まれ、細胞質内に蓄積したHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>が、光合成場である葉緑体に効率良く供給されるには、葉緑体4重包膜が大きな障壁になると考えられる。したがって、葉緑体包膜系に局在するHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体の存在が強く示唆されるが、これらを同定、機能解析した報告はない。そこで、本研究は、葉緑体包膜局在型HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体の同定および機能解析を目的とした。

前年度までに、SLC4型無機炭素輸送体候補因子であるPtSLC4-6およびPtSLC4-7が葉緑体4重包膜系に局在していることをenhanced green fluorescence protein (eGFP)との融合タンパク質による局在解析より明らかにした。さらに、PtSLC4-7のタンパク質の蓄積量は、高CO<sub>2</sub>環境下および低CO<sub>2</sub>環境下よりも超低CO<sub>2</sub> (0.002% CO<sub>2</sub>以下) 環境下において、上昇することが示唆されている。そこで、*ptSLC4-7*および*ptSLC4-6*の超低CO<sub>2</sub>環境下におけるmRNAの蓄積量を定量的RT-PCRによって解析した。その結果、*ptSLC4-7*のmRNAの蓄積量は、高CO<sub>2</sub>環境下と低CO<sub>2</sub>環境下では、ほぼ定常的な発現を示したが、超低CO<sub>2</sub>環境下への順化日数が進むにつれて、発現レベルが僅かに上昇する傾向が見られた。一方、*ptSLC4-6*のmRNAの蓄積量は、*ptSLC4-7*と同様に高CO<sub>2</sub>環境下と低CO<sub>2</sub>環境下で比較するとほぼ同程度であったのに対し、超低CO<sub>2</sub>環境下に順化するにつれて、その発現量は顕著に減少していた。このことから、PtSLC4-6およびPtSLC4-7は、高CO<sub>2</sub>環境下および低CO<sub>2</sub>環境下においては共に機能しているが、超低CO<sub>2</sub>環境下においては、PtSLC4-7が優先的に機能し葉緑体周辺区画に存在する無機炭素を積極的に葉緑体内に輸送していると考えられる。また、PtSLC4-6と比較してPtSLC4-7の方が無機炭素に対する親和性が高いことも示唆される。

次に、PtSLC4-6およびPtSLC4-7がHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体として機能しているのかを①珪藻細胞を用いた場合と②葉緑体起源生物シアノバクテリアを用いた場合の2通りの方法を用いて解析することを試みた。まず、①に関しては、高CO<sub>2</sub>環境下で生育させたPtSLC4-6およびPtSLC4-7の各単

独過剰発現体における光合成パラメーターの決定を酸素電極によって行ってきたが、野生型細胞と有意な差が見られなかった。これは、細胞膜における $\text{HCO}_3^-$ 輸送速度が律速状態にあると考えられたことから、薬剤処理による細胞膜の $\text{HCO}_3^-$ の透過性を上昇させる試みを行った。しかしながら、終濃度 0.05% SDSあるいは 0.1% Triton処理によるPtSLC4-6 およびPtSLC4-7 過剰発現体における光合成パラメーターに野生型細胞との有意差は見出せなかった。そこで、PtSLC4-6 およびPtSLC4-7 の各単独過剰発現体に対して、PtSLC4-2 を共発現させるためのコンストラクトを作成し、珪藻細胞を形質転換し現在、選抜を行っている。今後は、これら共発現細胞を用いた光合成パラメーターの決定および $\text{HCO}_3^-$ 輸送活性測定を行う必要があると考えられる。一方、②に関しては、PtSLC4-6 およびPtSLC4-7 のN末端の予測葉緑体移行シグナルをコードする塩基配列を順次削除した配列の 5'末端にシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* strain PCC7942 由来の亜硝酸イオン輸送体の細胞膜移行シグナルをコードする塩基配列を付加させ、さらに、3'末端に *egfp* 遺伝子を融合させたコンストラクト、あるいは *egfp* 遺伝子を細胞膜移行シグナルの直下に連結させたコンストラクトを計 18 種作成し、*S. elongatus* PCC7942 を形質転換後、得られた形質転換体の GFP 蛍光による細胞内局在解析を行った。しかしながら、18 種のコンストラクトを用いて得られた形質転換体すべてにおいて、GFP 蛍光が細胞質において観察されたことから、融合タンパク質が細胞膜に移行していないことがわかった。これは、目的タンパク質に GFP タンパク質を融合させたことにより細胞膜移行阻害が起こったと考えられた。そこで、GFP タンパク質を FLAG tag に置換したコンストラクトをさらに計 9 種作成後、*S. elongatus* PCC7942 を形質転換し、形質転換体を複数得ることに成功した。今後は、得られた形質転換体の免疫染色法による目的タンパク質の細胞内局在の決定と  $\text{HCO}_3^-$  輸送活性測定を行う必要がある。

#### <学会等発表>

1. 中島健介、岩山和史、大橋弘章、松田祐介  
海洋性珪藻における SLC4 型  $\text{HCO}_3^-$  輸送体候補因子の機能解析  
第 5 回日本光合成学会、2014 年 5 月 30 日（奈良）ポスター発表
2. 中島健介、田中厚子、岩山和史、大橋弘章、松田祐介  
海洋性珪藻における SLC4 型無機炭素輸送体候補因子の機能解析  
第 1 回分子珪藻研究会、2014 年 12 月 15 日（大阪）口頭発表