

2016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 2016年4月1日～2017年3月31日

研究成果概要

歯や骨に代表される生物の無機固体形成 (バイオミネラリゼーション) は、古くから知られた生命現象である。自然界全体に目を向けた場合、バイオミネラリゼーションを行う生物、原料および生成物は極めて多様性に富み、バイオミネラリゼーションを基盤とした応用技術の可能性や方向性は、極めて広範囲に及ぶと言える。珪藻類の被殻に見られる酸化ケイ素固体 (バイオシリカ) は、バイオミネラリゼーションの産物の1つであり、我々は、バイオシリカをインテリジェント材料として利用可能ではないかと注目している。珪藻の被殻形成は、自然水域で希釈されたケイ酸を効率良く取り込み、細胞内外において濃縮・固体化し、この過程でナノスケールの微細構造自己組織化を伴うものである。被殻形成反応は、常温・常圧・中性pH環境下で迅速に進行し、この反応過程において、有用タンパク質を珪藻被殻に包埋することにより、タンパク質の変性を伴わない新規の酵素固定法が確立できると考えられる。しかしながら、珪藻類の増殖能の低さが、新規酵素固定法の応用展開を念頭に入れた際のボトルネックとなる。

珪藻類の増殖能を制御する主因子として、無機炭素 (CO_2 および HCO_3^-) が挙げられる。本研究で利用する海洋性珪藻類が生息する海水中は、直接的な光合成基質となる溶存 CO_2 濃度は、 $15 \mu\text{M}$ 程度であり、 CO_2 との水和反応の結果生じる HCO_3^- 濃度は、約 2mM に達する。海洋性珪藻類が地球上の全炭素固定の約20%を担う重要な一次生産者であることも考慮すると、 HCO_3^- は、海洋性珪藻類の高い光合成能を支えるだけでなく、珪藻細胞の増殖能を制御する非常に重要な分子と言える。したがって、海洋性珪藻類の HCO_3^- 獲得機構の分子レベルにおける技術改変は、高増殖能を有する珪藻細胞を取得する上で有効な手段と言える。しかしながら、海洋性珪藻類の HCO_3^- 獲得の詳細な分子機構は、未解明な部分が多く、特に、海洋性珪藻類が有する特徴的な葉緑体包膜構造は、無機炭素の効率良い輸送の大きな障壁となっている。そこで、本研究では、葉緑体包膜局在型 HCO_3^- 輸送体の同定・機能解析を行い、海洋性珪藻類の HCO_3^- 獲得機構を総合的に理解し、増殖能に優れた珪藻細胞の作出に繋げることを目的とした。

我々は、海洋性羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* のゲノム上に存在する哺乳類の HCO_3^- 輸送体である solute carrier protein (SLC) 4 および SLC26 のホモログ因子のうち、葉緑体包膜局在型 HCO_3^- 輸送体候補因子として、PtSLC4-6 および PtSLC4-7 に着目した。各候補因子に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を連結させた融合タンパク質を珪藻細胞内で発現させたところ、葉緑体包膜上に GFP 蛍光が観察された。また、PtSLC4-7 と細胞膜局在型 HCO_3^- 輸送体 PtSLC4-2 との共過剰発現株 (PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株) においては、野生型細胞および PtSLC4-2 単独過剰発現株 (PtSLC4-2G株) と比較して、溶存無機炭素 (DIC) に対する親和性および無機炭素輸送活性の上昇が認められた。この実験結果の正確性を実証するため、PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株を新規に取得し、光合成パラメーターの決定および無機炭素輸送活性を測定した。その結果、新たに取得した PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株 2 クローンにおいても、DIC に対する親和性および無機炭素輸送活性は、野生型細胞および PtSLC4-2G株 に対して有意

な差が見られた。さらに、ゲノム編集技術を用いてPtSLC4-7 ノックアウト株の作出を行い、得られた抗生物質耐性株 180 クローンのうち 27 クローンにおいて、PtSLC4-7 のホモあるいはヘテロ変異体であることをT7 endonuclease I assayとシーケンス解析によって確認した。今後は、これら変異体の光合成特性などの生理学的解析が必要となる。しかしながら、PtSLC4-7 の細胞内局在解析およびPtSLC4-2G/PtSLC4-7G株の生理学的解析からも、PtSLC4-7 は葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体であることが十分に示唆され、PtSLC4-6 もPtSLC4-7 と同様の細胞内局在を示したことから、葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体として機能している可能性が高い。これまでの研究成果も踏まえた上で、*P. tricornutum*におけるHCO₃⁻輸送には、細胞外から細胞内へはPtSLC4-1/-2/-4 が、細胞質から葉緑体内へはPtSLC4-7 が必要であることが明らかとなった。本研究成果により、海洋性珪藻におけるHCO₃⁻獲得機構の一端の解明に成功したと考えられ、現在、論文投稿準備中である。

最後に、珪藻細胞が取り込んだHCO₃⁻は、細胞内無機炭素流路調節において重要な役割を担う炭酸脱水酵素 (CA) によって、HCO₃⁻からCO₂に効率良く変換され、葉緑体内の炭酸固定酵素を多量に含むタンパク質ボディ (ピレノイド) で固定される。ピレノイドには、一部のチラコイド膜が貫通しているが、その内腔に局在するタンパク質および生理機能は全く不明であった。そこで、緑藻のピレノイド局在タンパク質LCIB/C複合体のホモログ因子であるPt43233に着目し、細胞内局在を解析したところ、Pt43233 は、ピレノイド貫通チラコイドのみに局在していた。また、Pt43233 過剰発現株およびノックダウン株においては、野生型細胞と比較して、光合成特性および生育速度に影響があったことから、Pt43233 はCO₂固定に非常に重要な役割を担っていることがわかった。さらに、Pt43233 のリコンビナントタンパク質は、高いCA活性も有していたことから、既存タイプのCAとの系統解析を行った結果、それらとは異なるタイプのCAであることが判明し、我々は新規タイプのCAとしてθ型CAと命名した。本成果は、すでに米国科学アカデミー紀要に投稿した。

<論文発表> (* : equal contribution)

Kikutani S*, **Nakajima K***, Nagasato C, Tsuji Y, Miyatake A, Matsuda Y (2016) Thylakoid luminal θ-carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 9828-9833

Shimakawa G, Matsuda Y, **Nakajima K**, Tamoi M, Shigeoka S, Miyake C (2017) Diverse strategies of O₂ usage for preventing phot-oxidative damage under CO₂ limitation during algal photosynthesis. *Sci Rep* 7: 41022

Matsuda Y, Hopkinson BM, **Nakajima K**, Dupont CL, Tsuji Y (2017) Mechanisms of carbon dioxide acquisition and CO₂ sensing in marine diatoms -A gateway to carbon metabolism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* in press

<学会発表>

Nakajima K, Iwayama K, Ohashi H, Matsuda Y

Two CO₂-responsive proteins, PtSLC4-1 and PtSLC4-4, critical for HCO₃⁻ acquisition from seawater in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*.

The IXth International symposium on inorganic carbon utilization by aquatic photosynthetic organisms, August 15 - August 17, 2016, Cambridge, UK. (Poster)