

2017年度 個人特別研究費 研究成果報告書

所属・職・氏名：理工学部・助教・辻敬典

研究課題：海洋性珪藻のCO₂固定能増強によるオイル高蓄積株の作出

研究期間：2017年4月1日～2018年3月31日

研究成果概要 (2,000字程度)

海洋性珪藻は地球上の純一次生産の約20%を担う主要光合成生物である。珪藻は、海水中の無機炭素を細胞内に能動的に濃縮し、CO₂固定酵素である Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase の周辺のCO₂濃度を局所的に高める「CO₂濃縮機構 (CO₂-concentrating mechanism, CCM)」を有し、CCMによりCO₂が不足する海水中においても高いCO₂固定活性を維持している。本研究では、CCMにおける無機炭素取り込みプロセスを解明し、それを増強することで珪藻のオイル生産能力を高めることを目指した。

これまで、海洋性珪藻のモデル種である羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* において、Solute Carrier (SLC) 4 輸送体が HCO₃⁻ の能動的取り込みに関与することが示された。本研究では、複数種の珪藻への SLC4 阻害剤 (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid, DIDS) の影響を調べた結果、一部の珪藻種は SLC4 非依存的に無機炭素を取り込むことが明らかになった。膜不透過性の炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase, CA) の阻害剤であるアセタゾルアミドを用いた実験により、SLC4 非依存種では細胞外 CA により HCO₃⁻ を CO₂ へと変換することで CO₂ を拡散によって取り込むことが示唆された。また今回実験に用いた4種の珪藻では、SLC4 の阻害剤と、細胞外 CA の阻害剤の両方に感受性を示す種は無かったことから、珪藻は SLC4 を利用して HCO₃⁻ を直接取り込む種と、細胞外 CA により間接的に HCO₃⁻ を利用する種の2グループに大別できることが示唆された。また、SLC4 利用種と細胞外 CA 利用種は、系統分類とは関係なく分布しており、種分化によって二つのグループに分かれたのではなく、生息環境に合わせて最適な取り込み機構を独立に発達させたと考えられる。

中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* では、ゲノム上に SLC4 輸送体の遺伝子を保持しているにもかかわらず、無機炭素の取り込みには SLC4 が関与しないことが示された。そこで、*T. pseudonana* における SLC4 の役割を明らかにするために、*T. pseudonana* が持つ *SLC4* 遺伝子について、発現解析および局在解析を行った。その結果、*T. pseudonana* は3つの *SLC4* 遺伝子を持ち (それぞれ *TpSLC4-1*, *TpSLC4-2*, *TpSLC4-3* と命名)、いずれの遺伝子も転写レベルで CO₂ 応答性は見られず、これらの輸送体が無機炭素獲得に寄与していることは明確には示されなかった。また、GFP 融合タンパク質の発現による局在解析の結果、*TpSLC4-1* は細胞膜に局在し、*TpSLC4-2* と *TpSLC4-3* は葉緑体包膜系に局在することが明らかになった。系統解析により、*TpSLC4-1* は他生物種のホウ酸輸送体に近縁であることが示唆された。これらの結果から、*T. pseudonana* では、細胞膜型の *TpSLC4-1* の輸送基質は HCO₃⁻ ではなく、ホウ酸であると考えられる。SLC4 の阻害剤として用いた DIDS は、膜透過性が低く、細胞膜に局在する SLC4 のみを阻害し、葉緑体包膜系の SLC4 は阻害しない。*T. pseudonana* で DIDS によって無機炭素取り込みが阻害されなかった結果からも、細胞膜局在 *TpSLC4-1* の輸送基質は HCO₃⁻ ではないことが支持される。*T. pseudonana* における SLC4 の機能については現時点では不明だが、輸送基質の特定も

含め、さらなる解析が必要である。

羽状目珪藻 *P. tricornutum* では、先行研究において、SLC4 を介して細胞外の Na^+ と HCO_3^- を共輸送により取り込むことが示唆されている。細胞外の Na^+ が HCO_3^- 細胞内に流入してきた場合、継続的に流入してくる Na^+ を排出することで細胞内外の Na^+ 勾配を維持する仕組みが必要であると考えられる。そこで、珪藻において Na^+ 排出に寄与する Na^+ ポンプの同定を試みた。珪藻と近縁であるラフィド藻では、P 型 ATPase に属する Na^+/K^+ ポンプが Na^+ の排出に関与していることが報告されている。また、マラリア原虫や酵母などでも、P 型 ATPase に属する Na^+ ポンプが細胞内の Na^+ の排出に寄与していることが報告されている。そこで、*P. tricornutum* において、P 型 ATPase の阻害剤であるバナジン酸の光合成への影響を調べた。その結果、バナジン酸の添加により、無機炭素への親和性が低下した。*P. tricornutum* においても、他の藻類やプロティストと同様に、P 型 ATPase に属する Na^+ ポンプが Na^+ 排出を担っている可能性がある。残念ながら、本研究において Na^+ ポンプの分子実体の同定には至っていないが、 Na^+ 排出を担う P 型 ATPase を同定し、過剰発現させることで HCO_3^- 取り込みが促進され、貯蔵物質であるオイルの蓄積も増強されると期待される。

謝辞

本研究は松田祐介教授および松田研究室の皆様のご協力を得て進めることができました。この場を借りて御礼申し上げます。

業績

Tsuji, Y*. and Yoshida, M. (2017) Biology of Haptophytes: Complicated Cellular Processes Driving the Global Carbon Cycle. Hirakawa, Y. Eds., *Advances in Botanical Research* "Secondary Endosymbioses", Chapter 7, pp. 219-261, Academic Press

*Corresponding author

本報告書は、データで gakunai@kwansei.ac.jp まで提出してください。