

関西学院大学 研究成果報告

2022年 3月 15日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科
職名：博士研究員
氏名：松井 啓晃

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	光合成オルガネラ間コミュニケーションの動的分子基盤 海洋ケイ藻の光合成機能解析
研究実施場所	生命環境学部 生物科学科 松田研究室
研究期間	2021年 4月 1日 ～ 2022年 3月 31日 (12ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

ケイ藻葉緑体内に存在するピレノイドは、炭素固定を行う酵素タンパク質であるルビスコが密に存在していることから炭素固定の反応場として重要と考えられている。しかしながら、ピレノイドの構造が不安定なため単離できず、機能は不明瞭である。本研究では新奇ケイ藻ピレノイド局在因子およびチラコイド局在型イオン輸送体候補の機能解明を行うことで、ケイ藻ピレノイドの機能を解明することを目的とした。

まず、当研究室の先行研究において海洋性ケイ藻 *Phaeodactylum tricorutum* または *Thalassiosira pseudonana* にて発見された新奇ピレノイド局在因子の遺伝子をゲノム編集することで機能欠損体の作製を試みた。標的ゲノム領域にニックおよびインデルを導入するため Cas9 nickase およびガイドRNAを珪藻に発現するコンストラクトを作製し、野生型ケイ藻へと導入、その後抗生物質による選抜を行った。その結果、ゲノム編集された株と野生型が混在して獲得できた。そこで、得られた混在株を希釈し、プレート播種を繰り返すことで単一クローン化に成功した。得られたゲノム編集株は野生株と比べて低CO₂環境において生育が遅かったことから、生理機能に重要な役割があることが示唆された。また、標的遺伝子と配列相同性を示す複数のサブタイプがゲノム上に存在していることが確認されたことから、それぞれの転写量を定量的PCRによる解析を行った結果、サブタイプ1および2のmRNA蓄積量が他と比べて多かった。しかし、環境CO₂濃度の違いによる転写量の有意な変化はなかった。これらの結果は、新奇ケイ藻ピレノイド因子が転

写レベルでは環境CO₂濃度に依存せず恒常的にケイ藻内に発現していること、かつサブタイプ1および2が主に機能している可能性を示した。

ケイ藻陰イオン輸送体様タンパク質については、各相同遺伝子の発現量解析、GFP標識を用いた細胞内局在観察のためのコンストラクト作製、および過剰発現株の単離を行った。環境CO₂濃度が異なるときの遺伝子もしくはタンパク質発現量を解析した結果、転写レベルでは顕著なCO₂応答を示さなかったが、翻訳レベルでCO₂応答していることが明らかとなった。このことは、陰イオン輸送体が転写後調節によるCO₂応答によって制御されている可能性を示している。GFPタグを用いた細胞内局在解析結果からは、候補タンパク質が葉緑体内に局在している可能性が高いことが分かった。さらにCO₂濃縮機構との関連を調べるために、過剰発現もしくは欠損体の生理解析を行う必要があると考える。

NEDOバイオジェット燃料生産技術開発事業として、油脂蓄積珪藻の光合成機能解析を行った。油脂蓄積藻はバイオ燃料の代替原料となりうることから注目を浴びているが、その藻類の多くが温・熱帯付近で活発に生育を行う。したがって高緯度地域で年間を通した油脂生産を可能にするには寒冷地でも安定して藻類を生育させる技術開発が必要である。そのための知見を得るために、2種の油脂蓄積ケイ藻、ソラリス株およびルナリス株において、さまざまな培養条件、温度、光、および環境CO₂濃度を変更して、光合成パラメーターの測定を行った。その結果、温度条件に依存した光合成活性の変化や、光強度の変化によるクロロフィル蛍光、および強光ストレス応答の指標である非光化学的消光の変動を測定することができた。また、他種のケイ藻で存在が確認されている低CO₂環境で活発に光合成を行う仕組み、CO₂濃縮機構についても、酸素電極を用いた実験で明らかにすることができた。さらに海水の栄養条件を変化することで環境変化が光合成に与える影響を理解し、ケイ藻を用いた油脂生産の効率化への糸口を得られると考える。

自発的な研究活動として、大型褐藻類へのゲノム編集技術の確立を目指し、ブルーカーボン応用技術の開発に取り組んだ。これまでに、褐藻のゲノム編集例は少なく、より産業的な応用が可能な種に利用できることが望まれている。しかしながら、大型褐藻の生活環が複雑であることや、ゲノムサイズが大きいことから、分子生物学的実験は非常に困難とされている。本研究では単細胞藻類ですでに確立している電気穿孔法を利用して、大型褐藻のゲノム編集を試みた。今年度の目標として、研究室における褐藻類の生育維持とゲノム編集株の作製および選抜法の確立に取り組んだ。1倍体である配偶体を、鉄を除去した人工海水で培養し、雌雄配偶体を混ぜて鉄添加培地を添加することで受精を誘発させ、2倍体の胞子体を発芽させた。そして作製した胞子体を用いて、電気穿孔法の条件をさまざま変更することで死滅しない条件を検討した。現在、ゲノム編集株の選抜にむけて選抜方法の確立を試みている最中である。

また別の自発的な研究活動として、科研費研究スタート支援を利用し、海洋性ケイ藻の環境変化におけるCO₂輸送メカニズムの解析に取り組んだ。珪藻の炭素固定に必要な無機炭素の輸送経路として、細胞外CAと連動してCO₂を細胞内に輸送する経路の存在が明らかとなっている。しかしながら、他の陸上植物と類似した輸送体は見つかっていない。そこで、本研究では、新奇炭素源獲得経路の探索および機能解析を行った。公開されているゲノム情報からヒトやマウスなど哺乳類で報告されている無機炭素輸送体の配列情報を取得し、ケイ藻における遺伝子発現量を定量的PCRによって測定した。その結果、輸送体候補のサブタイプが複数遺伝子発現していることが分かった。それらの全配列をクローニングすることで完全長を配列決定することに成功した。これらの新奇輸送体候補を過剰発現もしくは欠損させることでケイ藻における生理機能を解明できると推測する。

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に

報告用紙②

支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。