

令和元年6月12日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15326

研究課題名(和文) 海洋物質循環を駆動する珪藻ナトリウムポンプの同定

研究課題名(英文) Identification of transporters driving nutrient uptake in marine diatoms

研究代表者

辻 敬典 (Tsuji, Yoshinori)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：40728268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻は海洋一次生産者の約4割を担う主要生産者であり、珪藻による栄養塩の吸収と同化は、海洋生態系の維持および物質循環の駆動力として重要である。珪藻では、細胞内外のNa⁺濃度勾配が栄養塩取り込みの駆動力であることが先行研究により報告されている。本研究では、栄養塩吸収に必要な細胞膜Na⁺排出ポンプの実体の解明を目標とした。阻害剤を用いた解析により、P型ATPaseがNa⁺排出に関与することを示唆した。また、膜不透過性のビオチン化試薬を用い、細胞表面タンパク質のビオチン標識に成功した。今後はビオチン化タンパク質を精製し質量分析装置で同定することで、Na⁺ポンプの同定につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

珪藻による栄養塩の吸収と同化は、地球規模の物質循環を駆動するエンジンとして機能している。本研究では、栄養塩吸収の駆動力を生み出すと推定されているナトリウムポンプの分子実体同定を目指した。その結果、哺乳類などでナトリウム排出に関与することが知られている輸送体(P型ATPase)が、珪藻の栄養塩吸収に関与することを示唆した。また、珪藻の細胞表面タンパク質を網羅的に同定するための基盤も確立した。これらの結果は、珪藻による栄養塩吸収機構と物質生産の理解に必要な不可欠なものである。

研究成果の概要(英文)：Marine diatoms operate active CO₂-concentrating mechanism, by which cells can actively incorporate and fix dissolved inorganic carbon (DIC). In the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*, solute carrier 4 (SLC4) type transporters are involved in the uptake of DIC across plasma membrane. While SLC4 is considered to mediate Na⁺-HCO₃⁻ co-transport, the mechanism to maintain Na⁺ gradient across plasma membrane have been unknown. In this study, I searched for candidates of plasma membrane transporters involved in the maintenance of Na⁺-gradient in diatoms. Affinity of cells for DIC was decreased by treating vanadate, an inhibitor of P-type ATPase, suggesting that P-type ATPase such as Na⁺/K⁺ pump is involved in the sodium-dependent DIC uptake. To identify major plasma membrane proteins, cell surface proteins were labeled by impermeable biotinylation reagent, and several proteins were successfully labeled by biotin.

研究分野：植物代謝生理学

キーワード：海洋性珪藻 光合成 CO₂固定 CO₂濃縮機構 海洋物質循環

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

珪藻は、海洋の主要植物プランクトンであり、地球上の光合成一次生産の約 20% を担っている。珪藻の光合成により、海水中の溶存無機炭素および無機栄養塩類が有機物へと変換され、高次消費者の栄養源として供給される。そのため、海洋性珪藻による無機栄養塩の取り込みと同化は、海洋物質循環を駆動する原動力となっている。

海水は弱アルカリ性のため、溶存無機炭素のほとんどは HCO_3^- として存在し (約 2 mM) 光合成の基質となる CO_2 は 15 μM 程度しか存在しない。海洋性珪藻は、光合成における CO_2 欠乏を回避するために、豊富な HCO_3^- を能動的に細胞内に取り込み、炭酸固定に利用する CO_2 濃縮機構を発達させた。海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* では、細胞膜局在型 Solute carrier 4 (SLC4) が HCO_3^- 取り込みを担うことが報告されている (Nakajima et al. 2013, PNAS)。SLC4 による HCO_3^- 輸送は、 Na^+ - HCO_3^- 共輸送あるいは Na^+ 駆動型 Cl^- - HCO_3^- 交換輸送のどちらかであることが示唆されている。すなわち、SLC4 による HCO_3^- の能動輸送は、 Na^+ 濃度勾配 (あるいはそれにより生み出される電気化学的勾配) を駆動力とする二次能動輸送であると考えられる。また *P. tricornutum* では、 HCO_3^- だけではなく、硝酸塩 (NO_3^-) や無機リン酸 (Pi) の取り込みも Na^+ 依存的であることが報告されており (Rees et al. 1980, BBA biomembranes)、これらの無機塩類の取り込みも、 Na^+ 勾配を駆動力とする二次能動輸送であると考えられる。これまで珪藻やその他の海洋プランクトンでは、個々の栄養塩 (無機炭素、硝酸塩、リン酸塩) の取込については解析がなされてきたものの、栄養塩の取り込みを駆動する力については十分に研究がなされておらず、栄養塩取り込みの分子機構は不明なままであった。

2. 研究の目的

海洋物質循環の基礎となる珪藻の栄養塩吸収機構を理解するには、取り込みの駆動力となる Na^+ 勾配を生み出すしくみの理解が必要不可欠である。細胞内外の Na^+ 濃度勾配を維持するには、栄養塩の取り込みに伴って細胞内に流入する Na^+ を細胞外へと排出する Na^+ 排出ポンプが必要である。そこで本研究では、海洋性珪藻 *P. tricornutum* において、栄養塩取り込みを駆動する ATP 依存性 Na^+ ポンプを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

栄養塩吸収に関与する輸送体のタイプを推定するために、既知の Na^+ ポンプに対する阻害剤を用い、光合成活性を測定した。細胞膜上の Na^+ 排出ポンプの阻害剤により、光合成に必要な HCO_3^- の取り込みが阻害され、珪藻細胞の無機炭素に対する親和性が低下すると考えられる。本実験では最大光合成活性だけでは阻害剤の影響が評価できないので、異なる無機炭素濃度下での光合成酸素発生速度を酸素電極で測定した。

さらに、SLC4 により Na^+ と HCO_3^- を取り込む *P. tricornutum* では、 HCO_3^- と共に流入する多量の Na^+ を排出する必要があるため、細胞膜上の Na^+ ポンプの蓄積量が多いことが期待される。そこで、細胞膜上のタンパク質を網羅的に同定するプロテオーム解析を行い、主要細胞膜タンパク質の中から Na^+ ポンプの候補を絞り込むことを試みた。

4. 研究成果

先行研究において非光合成珪藻 *Nitzschia alba* が Na^+/K^+ ATPase を有することや、*P. tricornutum* の HCO_3^- 取り込みに K^+ が必要であることが報告されていた。これらの先行研究を踏まえ、珪藻の Na^+ 排出ポンプの実体は P 型 ATPase の一種である Na^+/K^+ ATPase であると推定した。そこで、P 型 ATPase が Na^+ 濃度勾配を生み出し栄養塩の取り込みに寄与するかを調べるため、P 型 ATPase の阻害剤であるバナジン酸の光合成に対する影響を調べた。その結果、バナジン酸の添加により、細胞の無機炭素に対する親和性の低下が見られた (図 1)。本結果から、P 型 ATPase に属する Na^+ ポンプが珪藻細胞における細胞内外の Na^+ 勾配維持に寄与することが示唆された。

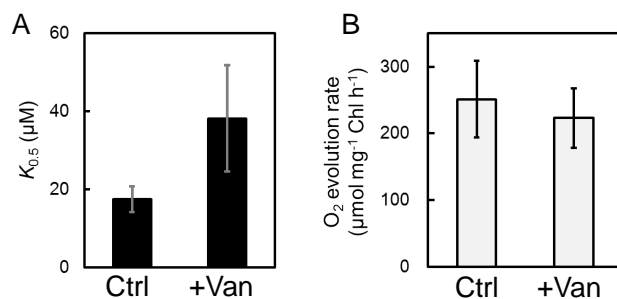


図 1 (左) 珪藻 *P. tricornutum* の光合成に対するバナジン酸の影響。

異なる無機炭素濃度下で光合成活性を測定し、親和性の指標となる $K_{0.5}$ (A: 最大光合成活性の半分の活性を与える無機炭素濃度) および最大光合成活性 P_{\max} (B) を算出した。Ctrl, バナジン酸未添加; +Van, バナジン酸 (200 μM) 添加条件。

細胞内の Na^+ と反応して緑色蛍光を発する Sodium green (膜透過性を有するアセトキシメチルエステル体) を用い、バナジン酸の添加が細胞内 Na^+ 濃度にどのような影響を与えるかを調べた。しかし、バナジン酸の添加・非添加に関わらず Sodium green による明瞭な蛍光が検出できず、細胞内 Na^+ 濃度の変化を追跡することはできなかった。Sodium green による細胞内 Na^+

の検出がうまく出来なかった原因は不明であるが、検出範囲や膜透過性の異なる複数の Na⁺イオンポンプを用いた実験を行い、改善を試みている。

P型ATPaseに属するNa⁺ポンプの代表的なものとして、哺乳類などで研究が進んでいるNa⁺/K⁺ATPaseが挙げられる。先行研究において、非光合成珪藻 *Nitzschia alba* では、細胞膜濃縮画分にNa⁺/K⁺ATPase活性が存在することが示されており、*P. tricornutum*ではHCO₃⁻の取り込みにK⁺が必要であることが報告されている。これらの先行研究と、バナジン酸による光合成阻害の結果から、哺乳類と同様にNa⁺/K⁺ATPaseが細胞内外のNa⁺勾配の維持に寄与することが示唆された。そこで、珪藻 *P. tricornutum* ゲノムデータベースから、Na⁺/K⁺ATPaseを探索したが、Na⁺/K⁺ATPaseに高い類似度を示すP型ATPaseの遺伝子は見つからなかった。そのため、P型ATPaseに属すものの、既知の動物型Na⁺/K⁺ATPaseとは異なるNa⁺ポンプが機能していると推測した。

珪藻の細胞膜で機能するNa⁺の候補をさらに絞り込むために、細胞膜タンパク質を網羅的に同定するプロテオーム解析を行うことにした。珪藻は、葉緑体が四枚の包膜に包まれており、その最外膜は核膜と融合した核-葉緑体連合を形成している。他のモデル真核生物と比較し、細胞内の膜系が複雑であるため、純度の高い細胞膜を精製することは難しいと判断した。そこで、細胞膜タンパク質を精製するにあたり、膜不透過性のビオチン標識試薬を用い、細胞外に露出したタンパク質を網羅的に標識し、ビオチン-アビジン相互作用により精製することにした。濃縮した *P. tricornutum* 細胞懸濁液をビオチン標識試薬 (Sulfo-NHS-biotin) と混合し、一定時間インキュベートすることで細胞膜タンパク質を含む細胞表面層タンパク質をビオチン化した。アビジンとビオチンの相互作用を利用してビオチン化タンパク質を精製した結果、精製画分において多数のビオチン化タンパク質が確認できた(図2)。ビオチン標識されたタンパク質の多くは、珪藻が元々保持している内在性のビオチン酵素(ピルビン酸カルボキシラーゼ等)とは異なるサイズであったことから、細胞表面層タンパク質がビオチン化されていることが示唆された。本実験手法は、細胞表面層タンパク質のカタログ化の基礎技術になるものであり、Na⁺ポンプの同定のみならず、その他の細胞膜輸送体の解析にも応用可能である。今後は、得られた精製画分を質量分析装置で同定し、Na⁺ポンプの分子実体の同定を目指す。

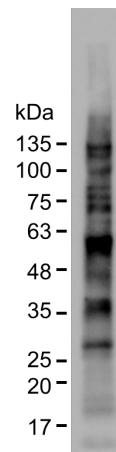


図2 ビオチン標識した細胞表面層タンパク質の検出。

膜不透過性ビオチン化試薬による標識後、アビジン磁性ビーズでビオチン化タンパク質を精製した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. **Yoshinori Tsuji**, Yusuke Matsuda “Uncovering the hidden world of the Molecular Life of Diatoms” Perspectives in Phycology (査読あり) 2019, in press
2. Jared T. Broddrick, Niu Du, Sarah R. Smith, **Yoshinori Tsuji**, Denis Jallet, Maxwell A. Ware, Graham Peers, Yusuke Matsuda, Chris L. Dupont, B. Greg Mitchell, Bernhard O. Palsson, Andrew E. Allen “Cross-compartment metabolic coupling enables flexible photoprotective mechanisms in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*” *New Phytologist* (査読あり) 2019, 222: 1364-1379
3. Yusuke Matsuda, Brian M. Hopkinson, Kensuke Nakajima, Christopher L. Dupont, **Yoshinori Tsuji** “Mechanisms of carbon dioxide acquisition and CO₂ sensing in marine diatoms - a gateway to carbon metabolism” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*(査読あり) 2017, 372: 20160403
4. **Yoshinori Tsuji**, Kensuke Nakajima, Yusuke Matsuda “Molecular aspects of the biophysical CO₂-concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms” *Journal of Experimental Botany* (査読あり) 2017, 68: 3763-3772

[学会発表](計18件)

1. 天野凌輔、**辻敬典**、松田祐介 “海洋性珪藻ピレノイドにおけるCCMと光化学系機能連携の解明” 第60回日本植物生理学会年会、2019年
2. Kanako Maeda, Nanae Kimura, Yohei Fukuchi, Toshiki Sugiyama, Kensuke Nakajima, **Yoshinori Tsuji**, Yusuke Matsuda “Characterization of phosphate uptake mechanism in marine diatoms” 第60回日本植物生理学会年会、2019年

3. 辻敬典、森島菜摘、大久保亮佑、菊谷早絵、松田祐介 “ プロテオーム解析による新規ピレノイド因子の探索 ” 第 5 回分子珪藻研究会、2018 年
4. Hermanus Nawaly, Yoshinori Tsuji, Atsuko Tanaka, Yusuke Matsuda “ The role of stromal localized γ -carbonic anhydrase on photosynthesis in marine diatom, *Thalassiosira pseudonana* ” International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis, 2018 年
5. Yoshinori Tsuji, Natsumi Morishima, Ryosuke Okubo, Sae Kikutani, Yusuke Matsuda “ Identification of new molecular components supporting active carbon fixation by marine diatoms ” International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis, 2018 年
6. Yoshinori Tsuji, Natsumi Morishima, Sae Kikutani, Yusuke Matsuda “ Structure of aquatic chloroplast enabling CO₂-concentrating mechanism ” Japan-Finland Seminar, 2018 年
7. 大西菜月、中島健介、辻敬典、松田 祐介 “ 珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発 ” 第 70 回日本生物工学会大会、2018 年
8. 屋代愛美、辻敬典、松田祐介 “ 海洋性珪藻における葉緑体四重包膜のイオン濃度勾配解析技術の開発 ” 日本植物学会第 82 回大会、2018 年
9. 清水由紀、中川真佑、斉藤建人、中島健介、辻敬典、松田祐介 “ 海洋性珪藻 *Thalassiosira pseudonana* における cAMP 依存的な CO₂ センシング機構の解明 ” 日本植物学会第 82 回大会、2018 年
10. 天野凌輔、山岸寛征、菊谷早絵、辻敬典、松田祐介 “ 海洋性珪藻ピレノイドにおける CCM と光化学系機能的連携の解明 ” 日本植物学会第 82 回大会、2018 年
11. 辻敬典、中島健介、松田祐介 “ 海洋性珪藻におけるゲノム編集技術の発展と利用 ” 第 20 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2018 年
12. 中島健介、辻敬典、松田祐介 “ 海洋性珪藻におけるゲノム編集技術ツールの現状と利用 ” 第 4 回分子珪藻研究会、2017 年
13. 中井悠太、中島 健介、辻敬典、松田 祐介 “ 海洋性中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* における無機炭素輸送体の探索 ” 日本植物学会第 81 回大会、2017 年
14. 山岸寛征、菊谷早絵、宮武愛、辻敬典、松田祐介 “ 海洋性珪藻ピレノイドにおける無機炭素流路制御機構の解明 ” 日本植物学会第 81 回大会、2017 年
15. Ryosuke Okubo, Natsumi Morishima, Sae Kikutani, Yoshinori Tsuji, Yusuke Matsuda “ Novel pyrenoidal components critical for photosynthesis in the marine diatoms ” The 73rd Fujihara Seminar, International Conference, Molecular Life of Diatoms, 2017 年
16. Kansei Yamagishi, Sae Kikutani, Ai Miyatake, Yoshinori Tsuji, Yusuke Matsuda “ Characterization of putative thylakoidal anion channels in the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum* ” The 73rd Fujihara Seminar, International Conference Molecular Life of Diatoms, 2017 年
17. Mayu Nakagawa, Kento Saito, Kensuke Nakajima, Yoshinori Tsuji, Yusuke Matsuda “ Potential role of adenyl cyclases as CO₂ sensor in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* ” The 73rd Fujihara Seminar, International Conference Molecular Life of Diatoms, 2017 年
18. Yoshinori Tsuji, Kensuke Nakajima, Sae Kikutani, Yusuke Matsuda “ Functional analysis of the luminal γ -carbonic anhydrase in *Phaeodactylum tricorutum* : its possible role in coordinating CO₂ fixation and photosynthetic electron transport ” The 73rd Fujihara Seminar, International Conference Molecular Life of Diatoms, 2017 年

〔図書〕(計1件)

1. **Tsuji Y.** and Yoshida M. (2017) Biology of haptophytes: complicated cellular processes driving the global carbon cycle *In* Advances in Botanical Research, Secondary Endosymbiosis Vol. 84, edited by Hirakawa Y. Chapter7, pp 219-261, Academic Press.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~matsuda/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松田 祐介

ローマ字氏名：Yusuke Matsuda

研究協力者氏名：中島 健介

ローマ字氏名：Kensuke Nakajima

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。