

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20595

研究課題名(和文)海洋性ケイ藻の環境変化に適応したCO<sub>2</sub>輸送メカニズムの解明研究課題名(英文)CO<sub>2</sub> transport adapted to environmental change in marine diatoms

研究代表者

松井 啓晃(MATSUI, Hiroaki)

関西学院大学・理工学研究科・博士研究員

研究者番号：60904109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海洋に広く繁栄するケイ藻の新奇CO<sub>2</sub>輸送体を探索し、環境変化にどのように応答するかを調べることで地球の物質循環のしくみを紐解くことを目的とした。ゲノム情報から輸送体候補を探索し、細胞内のどこで機能するかを調べ、細胞膜であることを示した。また、どのような環境で機能するかを遺伝子発現の変化から予測した結果、CO<sub>2</sub>、重炭酸イオン、リン酸、またはアンモニアを輸送する可能性が高かった。そこで、実際に遺伝子組換えケイ藻を用いることで、重炭酸イオンまたはリン酸を輸送するタンパク質を明らかとした。これら新奇輸送体の発見は環境変化をケイ藻がつぶさに感じ取り適切に対応していることを強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境CO<sub>2</sub>の増加を受けて、海洋に広く生息する珪藻の光合成能を理解し、制御することで、ブルーカーボンを増加させることが求められている。今後、更なる海洋酸性化により海水中のCO<sub>2</sub>濃度は変化することが予測されている。しかし、現在のところ海洋におけるCO<sub>2</sub>輸送の仕組みは完全に分かっておらず、どの程度の吸収量になるかは不明である。本研究では、珪藻がナトリウム塩を多く含む条件でCO<sub>2</sub>のままではなく重炭酸イオンとして取り込むこと、また同様の環境でリン酸を積極的に取り込むことを示した。これらの結果は、海水の塩濃度によって無機栄養の取り込み経路に違いがあることを示唆しており、今後社会実装の際に有益な知見となる。

研究成果の概要(英文)：This study aim was the investigation of CO<sub>2</sub> uptake system in marine diatom adapted with environmental change in the ocean. Because of marine diatom living all over the world, the assimilation of nutrient will affect the environmental change. The candidates of transporter were disclosed from the genome database, which proteins were localized at cell-membrane. These genes were induced at CO<sub>2</sub>, phosphate, or nitrate condition changed. Two candidate proteins, SLC4-1 or SLC4-4 overexpression increased HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake. The other protein, SLC34 knockout mutants showed phosphate uptake decreased obviously. These annual transporters suggested marine diatom can response to the environmental change precisely.

研究分野：海洋分子生物学

キーワード：無機栄養輸送 海洋環境応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

海洋における炭素固定量の約 20%が海洋性ケイ藻によって担われている。これほどの高効率の光合成を可能としている原因の一つに、低濃度 CO<sub>2</sub>の海水環境においても CO<sub>2</sub>を濃縮して炭素固定を可能とするメカニズム (CO<sub>2</sub>濃縮機構)が存在していることがある。この CO<sub>2</sub>濃縮機構の初発経路として、細胞膜に存在する重炭酸イオン輸送体が能動的に細胞内に重炭酸イオンを輸送することが明らかとなっている。しかし、それ以外の輸送機構についてはほとんど分かっていない。先行研究において、重炭酸イオン輸送体の阻害剤を用いることでモデルケイ藻である *Phaeodactylum tricornutum* (Pt) を含む遠洋性のケイ藻において光合成が阻害されることが報告された。一方で、他種ケイ藻 *Thalassiosira pseudonana* (Tp) を含む沿岸種では阻害剤を添加しても無機炭素の取り込みは影響されなかったことから、未同定の CO<sub>2</sub>輸送経路が存在する可能性が示唆された。報告者はこれまでの研究において、CO<sub>2</sub>およびアンモニアガス透過に關与するチャンネルタンパク質、アクアポリンを海洋性ケイ藻において発見した。しかし、ケイ藻アクアポリンが CO<sub>2</sub>濃縮機構に關与している確証は未だ得ることが出来ていない。以上から、未発見のケイ藻 CO<sub>2</sub>輸送機構が存在している可能性が高いと推測される。

### 2. 研究の目的

(1) これまで海洋性ケイ藻において発見されている輸送体のほかに、新奇 CO<sub>2</sub>輸送体があるという仮説を証明する。

(2) 環境変化によって、無機炭素の輸送経路が変化することを示すことで、珪藻が環境にตอบสนองして適切な対応を行う仕組みの一端を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 珪藻ゲノムデータベース JGI (<https://phycocosm.jgi.doe.gov/phycocosm/home>) もしくは DiatOmicBase (<https://www.diatomicsbase.bio.ens.psl.eu/>) より、輸送体候補遺伝子の配列を取得し、発現解析および局在解析を行うためのプライマーを設計した。

(2) 発現解析のため、定量的 PCR によって環境 CO<sub>2</sub>濃度、窒素源濃度、またはリン酸濃度を变化させた際の転写産物蓄積量を調べた。

(3) 局在解析として、PCR による全長配列を取得し、蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子を連結して珪藻細胞に発現する組換え体を作製した。

(4) 得られた GFP 融合タンパク質発現株を用いて、輸送基質の同定を行い、生育や光合成活性を調べた。

(5) CRISPR/Cas9 を用いてゲノム編集を行うことで標的遺伝子の機能欠損体を作成し、生理解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) ゲノムデータベースを用いた候補遺伝子の探索より、ヒトやバクテリアにおいて CO<sub>2</sub>輸送に關与する solute carrier protein (SLC) および rhesus factor (Rh) の相同遺伝子が珪藻ゲノムに保存されていることが分かった。これらの候補輸送体タンパク質の構造予測を行ったところ、SLC4 は 12 回膜貫通ドメイン、SLC34 は 8 回膜貫通ドメイン、Rh は 11 回膜貫通ドメインがそれぞれ予測されたことから、膜タンパク質である可能性が高いことがわかった。これらの候補タンパク質は CO<sub>2</sub>以外にも重炭酸イオン、アンモニア、またはリン酸など複数の輸送基質を有する可能性があることから、どの物質を輸送するかを同定する必要が考えられた。

(2) 輸送体の基質特異性は、輸送体をコードする遺伝子の環境応答性に依存すると推測された。そこで、野生型珪藻を高 CO<sub>2</sub>、低 CO<sub>2</sub>、アンモニア添加、硝酸欠乏、またはリン酸欠乏で培養し、輸送体候補遺伝子の発現量解析を行った。定量的 PCR を用いた解析の結果、SLC4 遺伝子が低 CO<sub>2</sub>環境で発現誘導し、SLC34 遺伝子がリン酸欠乏時に高発現、さらに Rh 遺伝子が窒素飢餓において発現した(図 1)。

(3) 細胞内局在を調べるため、GFP と融合した輸送体候補タンパク質をケイ藻に発現させ、蛍光顕微鏡を用いた蛍光観察を行った。その結果、SLC4 および SLC34 候補タンパク質が細胞の周辺に緑色の蛍光を観察できたことから、これらの候補タンパク質は細胞膜型の輸送体である可能性が示唆された。一方、Rh 候補タンパク質については蛍光が観察できなかった。

(4)環境 CO<sub>2</sub>濃度に依存しない恒常プロモーターで GFP 融合 SLC4 を発現させたことで、高 CO<sub>2</sub> 条件においても安定して SLC4 を発現させることに成功した。そこで、この SLC4 発現株を用いて輸送基質の同定を行った結果、野生型ケイ藻では高 CO<sub>2</sub> 環境時に重炭酸イオンの輸送はほとんど見られなかったのに対し、SLC4 相同タンパク質を過剰発現したケイ藻細胞では重炭酸イオンの輸送活性が顕著に上昇した。

(5) 先行研究において SLC が共輸送するイオンが複数明らかとされていた。そこで、今回見つかったケイ藻 SLC4 の同定を行った結果、SLC4-1 は Na、SLC4-4 は Na, K, および Li 添加培地において重炭酸イオンの輸送が見られた。このことから、海洋性珪藻は海洋中の金属イオンに応じて炭素源の取り込み経路を変更していることが考えられた。本研究結果は査読付き論文として *Journal of Experimental Botany* に投稿した(引用文献)。

(6) 発現解析の結果から SLC34 がリン酸輸送を行うと予測されたため、SLC34 を恒常的に発現した際のリン酸輸送を調べたが、野生型細胞と比較して変化は見られなかった。一方で、リン欠乏培地におけるリン酸輸送は Na イオンを添加した際のみ見られたことから、ケイ藻はリン酸と Na を共輸送することで細胞内に取り込まれていると考えられた。

(7) ゲノム編集による SLC34 の機能欠損株を作製した結果、リン酸欠乏環境におけるリン酸輸送が顕著に減少したことから、ケイ藻における主要なリン酸輸送は SLC34 によって行われていることが明らかとなった。しかし、SLC34 を機能欠損した株を用いてリン酸欠乏環境での生育に与える影響を調べたところ、野生型細胞と比較しても差がなかった。これは、ケイ藻が細胞内にリン酸を蓄積することで、環境変化によるリン酸欠乏に陥っても生存に支障をきたさない仕組みが存在していることを示唆している。実際に、ケイ藻はリン酸をポリリン酸の形で液胞に蓄積することが先行研究で明らかとされており、リン酸欠乏環境においてポリリン酸分解酵素の遺伝子が上昇することも報告されている。したがって、今回のように SLC34 を 1 つ機能欠損してもケイ藻細胞の恒常機構を維持することができたと予想される。実際の環境においてどのようなシグナル伝達機構でリン酸欠乏を認識しているかはわかっておらず、今後の課題である。

(8) GFP で標識したケイ藻 Rh 候補タンパク質が細胞内に発現しなかった理由として、遺伝子配列の不足が考えられた。そこで、RACE 法を用いた全長配列の取得を試みた。データベース上で明らかとなっている配列を基にプライマーを作製し、mRNA を逆転写することで得た cDNA を鋳型とし、5' 末を PCR により増幅した結果、新たなタンパク質コード領域を発見した。膜タンパク質の N 末端領域には細胞内局在に重要な配列が含まれていることから、今回見つかった領域がケイ藻 Rh の細胞内局在に必須である可能性が高い。今後、全長配列を用いて局在解析および機能解析を行うことにより輸送体かどうかの評価を行う必要がある。

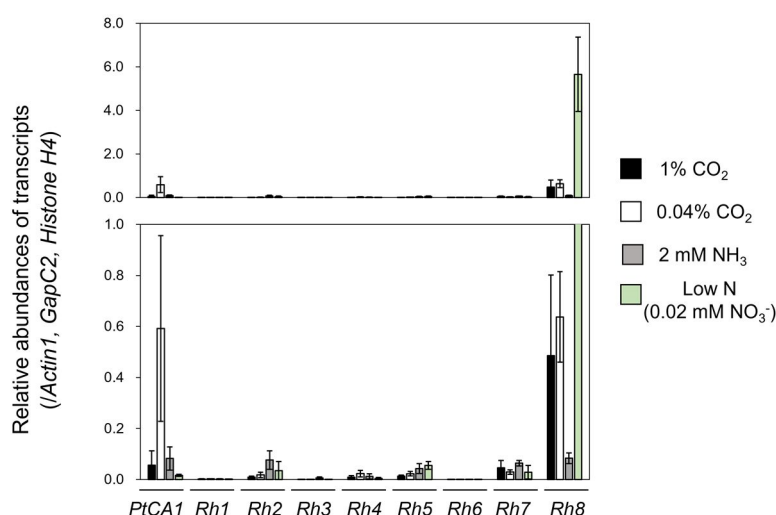


図 1. CO<sub>2</sub>輸送体候補 Rh タンパク質相同遺伝子の発現解析

高 CO<sub>2</sub>(1%, 黒カラム)、低 CO<sub>2</sub>(0.04%, 白カラム)、アンモニア添加 (2 mM, グレーカラム)、または硝酸飢餓 (0.02 mM, 緑カラム) 培養における候補遺伝子の mRNA 蓄積量。既知の CO<sub>2</sub> 応答遺伝子である炭酸脱水酵素 PtCA1 をコントロールとした。標準遺伝子として、Actin1, GapC2, Histone H4 を使用した。

#### < 引用文献 >

Nawaly, H., Matsui, H., Tsuji, Y., Iwayama, K., Ohashi, H., Nakajima, K., and Matsuda, Y. (2023). Multiple plasma membrane SLC4s contribute to external HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> acquisition during CO<sub>2</sub> starvation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*, 74(1), 296-307.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nawaly Hermanus, Matsui Hiroaki, Tsuji Yoshinori, Iwayama Kazufumi, Ohashi Hiroki, Nakajima Kensuke, Matsuda Yusuke	4. 巻 74
2. 論文標題 Multiple plasma membrane SLC4s contribute to external HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> acquisition during CO <sub>2</sub> starvation in the marine diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 296 ~ 307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erac380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井 啓晃、松田 祐介	4. 巻 35
2. 論文標題 海洋性珪藻のピレノイド構造とその機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Morphology	6. 最初と最後の頁 29-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------