

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870750

研究課題名(和文) 高効率な有用物質生産能を複合的に有する海洋性珪藻細胞の開発

研究課題名(英文) Development of marine diatom cells which complexly have the ability for high-efficiently producing useful substances

研究代表者

中島 健介(Nakajima, Kensuke)

関西学院大学・理工学研究科・博士研究員

研究者番号：50709318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性珪藻類は、地球上のCO₂固定および地球規模のリン循環に大きな影響を及ぼし、海水中より獲得した無機炭素およびリンは、有用物質生産にも利用される。本研究では、海洋性珪藻類の無機炭素およびリン酸獲得機構に関する因子を同定し、これらを共発現させることにより、2つの異なる有用物質生産能に優れた新規珪藻株の作出を試みた。候補因子の詳細な機能解析から、葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体PtSLC4-7および細胞膜局在型リン酸輸送体PtSLC34-2の同定に成功した。さらに、ポリリン酸合成・分解酵素の候補因子を見出し、リン酸応答性を確認した。また、遺伝子共発現用珪藻形質転換ベクターを新たに構築した。

研究成果の概要(英文)：Marine diatoms are responsible for global primary productivity and play a key role in global cycle of phosphate. Dissolved inorganic carbon and phosphate acquired from seawater are used for producing useful substances like oils and fats, and polyphosphates. In this study, we attempted to identify the specific transporters involved in mechanisms of inorganic carbon and phosphate acquisitions, and develop marine diatom cells which have the ability for high-efficiently producing useful substances by co-overexpressing inorganic carbon and phosphate transporters. As a result, we succeed to characterize the chloroplastic membrane-type inorganic carbon transporter, PtSLC4-7, and the plasma membrane-type phosphate transporter, PtSLC34-2. Then, some polyphosphate synthase and degrading enzyme candidates were found on the genome of marine diatoms, and new transformation vector for marine diatom cells was constructed for co-overexpressing two genes driven by conditional promoters.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：海洋性珪藻 無機炭素獲得 リン酸獲得 輸送体 有用物質生産

1. 研究開始当初の背景

近年の大規模な海洋調査などから海洋性珪藻類が担う地球上の CO₂ 固定量は、約 20% にも昇り、リンなどの地球規模の物質循環にも海洋性珪藻類が大きな影響を及ぼしていることがわかっている^{[1][2]}。また、海水から吸収した CO₂ やリンは、油脂やポリリン酸などの工業的付加価値の高い有用物質に変換され、細胞内に貯蔵される。

海洋性珪藻類の無機炭素獲得は、この生物が有する高い一次生産量と油脂生産の原動力であり、海水中の溶存無機炭素 (dissolved inorganic carbon : DIC) の有効利用は生態学的にも有利であることが指摘されている^[3]。研究代表者は、これまでに海水から直接的に DIC を獲得する際に機能する細胞膜局在型 HCO₃⁻ 輸送体 solute carrier protein (SLC)4-2 in *Phaeodactylum tricornutum* (PtSLC4-2) を海洋の主要な一次生産者において世界に先駆け初めて機能同定した^[4]。しかしながら、二次共生生物である珪藻の葉緑体は、高等植物とは異なり 4 重膜で包まれており、この包膜を無機炭素が効率良く透過するための輸送体は不明であった。

一方、無機イオン類の中でもリンは、石油よりも早く枯渇することが指摘されている緊急性の高い保全対象物質である。海水中の溶存リンの多くは、珪藻に取り込まれ、その死骸と共に迅速に海底に沈み海洋表層からリンを除去する。そこで、海水の溶存リンを効率良く回収するための技術開発に、無機イオン吸収能に優れた海洋性珪藻類を利用することを考えた。しかしながら、海洋性珪藻類のリン酸獲得・蓄積機構の鍵となる因子は謎であった。

2. 研究の目的

以下に示す 4 項目を研究期間中の達成目標として研究を遂行した。**(1) 葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体の機能同定、(2) リン酸輸送体の同定と機能解析、(3) ポリリン酸合成・分解酵素の同定と機能解析、(4) 機能強化した機構を複合的に有する珪藻細胞の開発**、である。(1 - 3) の実験から、無機炭素およびリン酸獲得・蓄積に重要な役割を担う輸送体ならびに酵素を同定後、それら因子を標的とした遺伝子改変を珪藻細胞に施し、(4) 無機炭素獲得機構およびリン酸獲得・蓄積機構を同時に強化した新規珪藻株を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体の機能同定：目的候補遺伝子を珪藻 cDNA よりクローニング後、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子 *egfp* と連結し、珪藻形質転換用ベクターに組み込んだ。このベクターを分子銃に

よって珪藻細胞に導入し、抗生物質による一次選抜を行い、形質転換体を得た。得られた形質転換体を蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡および超解像顕微鏡により、GFP 蛍光を指標とした目的候補タンパク質の細胞内局在を決定した。さらに、これらの株を目的候補タンパク質の過剰発現株として無機炭素輸送活性等の生理学的解析に供した。また、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行い、目的候補タンパク質のノックアウト株の作出も試みた。

(2) リン酸輸送体の同定と機能解析：リン富化およびリン欠乏環境下で生育させた珪藻野生株におけるリン酸吸収速度ならびに細胞外アルカリフォスファターゼ活性の測定を行った。リン酸吸収速度の解析は、既定量の無機リン酸と珪藻細胞を混合させ、時間経過ごとに即座に遠心分離後、測定培地中に残存する無機リン酸とマラカイトグリーン試薬を反応させ、波長 620nm における吸光度測定を行うことで定量的に行った。一方、細胞外アルカリフォスファターゼ活性は、珪藻細胞による *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) の分解量を吸光度 405nm で追うことにより定量した。これら生理学的解析と並行して、珪藻のゲノムデータベースを利用したリン酸輸送体候補遺伝子の網羅的探索を行った。その後、目的候補遺伝子の環境リン酸濃度応答性を定量的 PCR (qPCR) によって解析した。qPCR の結果を基に、リン欠乏環境下で発現誘導される遺伝子を優先的に、実験 (1) と同様の手法を用いて、細胞内局在を決定した。さらに、短鎖ペプチドの FLAG タグを付加させた目的候補タンパク質を発現する珪藻細胞を過剰発現株として、また、RNA 干渉法によって作出した目的候補遺伝子のノックダウン候補株をリン酸吸収速度の測定に供し、目的候補タンパク質の機能解析を行った。本実験は、3 人の研究協力者の協力を得た。

(3) ポリリン酸合成・分解酵素の同定と機能解析：酵母において同定されているポリリン酸合成・分解酵素の塩基配列情報を基に、珪藻のゲノムデータベースより候補遺伝子を探索し、リン富化およびリン欠乏環境下における発現量を qPCR によって解析した。

(4) 機能強化した機構を複合的に有する珪藻細胞の開発：目的遺伝子を共発現させるための新たな珪藻形質転換用ベクターを構築した。このベクターが実際に珪藻細胞内で機能することを確認するため、PtSLC4-2 と葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体候補因子を共発現させ、細胞内 GFP 蛍光を観察した。

4. 研究成果

(1) 葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体の機能同定：珪藻のゲノム上には、哺乳類の無機炭素輸送体として知られている SLC 4 および 26 のファミリー遺伝子が少なくとも 10 種存在する^[4]。これら因子の N 末端領域を詳細に解析した結果、二次共生生物に特異的な葉緑

体移行シグナルを有する2つの因子PtSLC4-6およびPtSLC4-7が、葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体候補として浮上した。これらの珪藻細胞内における局在をGFP蛍光により解析したところ、両因子とも葉緑体4重包膜の最外膜に存在することがわかった(図1)。

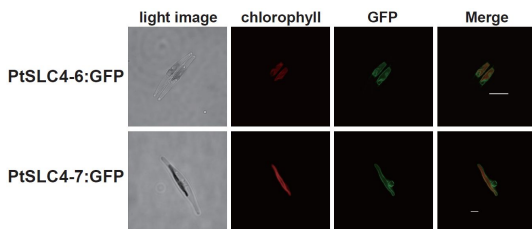


図1. PtSLC4-6:GFPとPtSLC4-7:GFPの細胞内局在 赤:葉緑体の自家蛍光、緑:GFP蛍光、スケールバー:5μm

そこで、これらの株を候補因子の過剰発現株として、生理学的解析を行ったが、野生株と有意な差は見られなかった。この原因として、細胞膜上の無機炭素透過量が律速状態にあることが考えられたため、以前に同定した細胞膜局在型HCO₃⁻輸送体PtSLC4-2を共過剰発現させた新たな形質転換体を作成し、生理学的解析に供した。まず、PtSLC4-2およびPtSLC4-7の珪藻細胞内発現をGFP蛍光によって確認した結果、細胞膜および葉緑体4重包膜の最外膜に局在していることを確認した(図2)。一方で、PtSLC4-2とPtSLC4-6の共



図2. PtSLC4-2:GFPとPtSLC4-7:GFPの細胞内共発現 赤:葉緑体の自家蛍光、緑:GFP蛍光

過剰発現株の取得には至らなかった。したがって、PtSLC4-2とPtSLC4-7共過剰発現株(SLC4-2G/SLC4-7G)の解析を進めた結果、SLC4-2G/SLC4-7G株における無機炭素輸送活性は、野生株ならびにPtSLC4-2単独過剰発現株(SLC4-2G)と比較して、有意に高くな

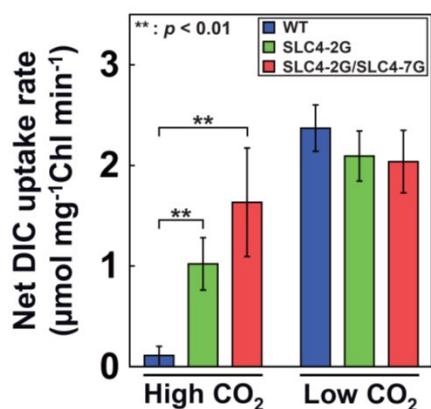


図3. PtSLC4-7の無機炭素輸送活性 青:野生株(WT)、緑:PtSLC4-2:GFP単独過剰発現株(SLC4-2G)、赤:PtSLC4-2:GFPとPtSLC4-7:GFPの共過剰発現株(SLC4-2G/SLC4-7G)

っていることがわかった(図3)。さらに、CRISPR/Cas9を利用したゲノム編集により、PtSLC4-7ノックアウト株の取得に成功し、現在、詳細な解析を進めている。以上の結果から、PtSLC4-7(おそらくはPtSLC4-6も同様)は、葉緑体4重包膜の最外膜において、無機炭素輸送体として機能している可能性が非常に高いことが示された。

(2)リン酸輸送体の同定と機能解析:リン富化およびリン欠乏環境下で生育させた羽状目珪藻*P. tricornutum*および中心目珪藻*Thalassiosira pseudonana*の各野生株におけるリン酸吸収速度の解析を行った。その結果、リン富化環境下で生育させた*P. tricornutum*細胞においては、ほとんどリン酸吸収が起っていないのに対して、リン欠乏環境下で5日間生育させた細胞は、測定開始から6分後には、測定培地中の約60%のリン酸を吸収しており、リン酸の吸収速度は、リン富化生育細胞と比較して、約10倍に上昇していた(図4A&B)。同様の傾向は、*T. pseudonana*においても確認できた。また、各細胞のリン欠乏環境下への順化速度を確認した結果、順化1日目からリン酸吸収速度が上昇しはじめ、順化5日目には、最大のリン酸吸収速度に達した(図4C)。リン酸吸収速度がリン欠乏環境下への順化1日目から上昇しはじめたのに対して、細胞外アルカリフォスファターゼ活性は、リン欠乏環境下順化3日目から上昇しはじめ、測定終了時の順化7日目においても最大活性を示すことはなかったが、その活性は、順化3日目と比較して約8倍に達した(図4D)。次に、リン酸に対する親和性解析を行った。

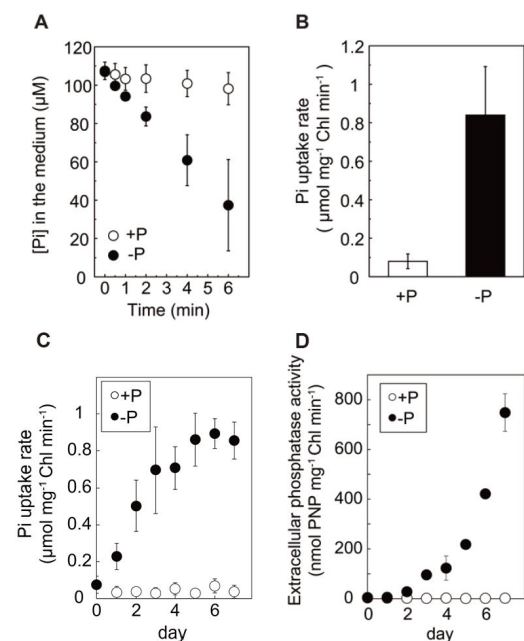


図4. リン欠乏環境下生育野生株における生理学的解析

A: 時間経過ごとにおける測定培地中の残存リン酸濃度の変動、B: リン酸吸収速度の比較、C: リン欠乏環境下への順化速度、D: 細胞外アルカリフォスファターゼ活性 白:リン富化環境下生育細胞(+P)、黒:リン欠乏環境下生育細胞(-P) Pi: inorganic phosphate

その結果、リン欠乏環境下生育細胞の方が、リン酸に対する親和性がリン富化環境下生育細胞よりも約 10 倍高くなっていった (図 5A)。さらに、リン酸吸収時に必要なエフェクター分子の同定を行ったところ、Na⁺特異的にリン酸吸収速度の上昇が確認できた (図 5B)。この Na⁺特異的リン酸吸収速度は、Na⁺濃度依存的であり、約 100 mM の Na⁺添加で最大のリン酸吸収速度に達した (図 5C)。Na⁺依存性リン酸吸収は、*T. pseudonana* においても確認できた。以上の生理学的解析から、両珪藻細胞は Na⁺依存型リン酸輸送体を介して、海水中から細胞内にリン酸を取り込んでいることがわかった。

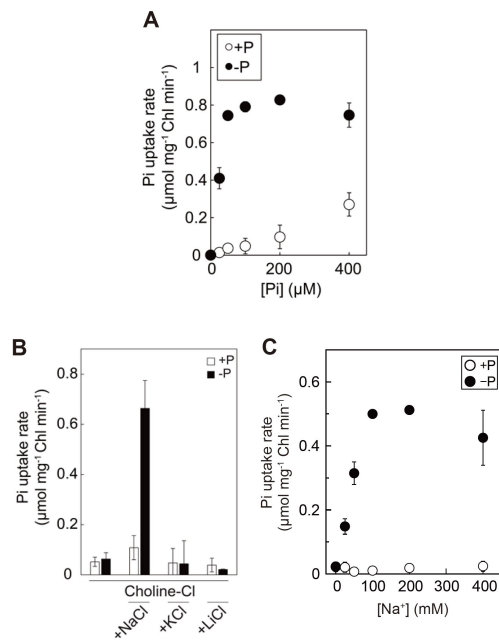


図 5. リン欠乏環境下生育珪藻野生株における生理学的解析 A: リン酸に対する親和性解析、B: リン酸吸収に必要なエフェクター分子の同定、C: リン酸吸収速度の Na⁺濃度依存性 黒: リン富化環境下生育細胞 (+P)、白: リン欠乏環境下生育細胞 (-P)

生理学的解析の結果を受けて、珪藻細胞において機能するリン酸輸送体の同定を試みた。哺乳類および酵母のリン酸輸送体として知られている SLC20、SLC34、Phosphate (Pho) 84 ファミリーのホモログ因子を珪藻ゲノムデータベース上で網羅的に探索した結果、珪藻細胞内で発現していると思われるリン酸輸送体候補因子が少なくとも 10 因子存在することがわかった (図 6)。輸送体候補遺伝子のリン富化およびリン欠乏環境下における発現量を qPCR によって比較解析した結果、*ptSLC20*、*ptSLC34-2*、*ptSLC34-4*、*ptSLC34-5* がリン欠乏環境下で誘導されることがわかった (図 6)。そこで、4 遺伝子のうち、発現量が比較的高い *ptSLC34-2* および *ptSLC34-5* の機能解析を優先的に行った。PtSLC34-2 および PtSLC34-5 の細胞内局在を解析した結果、GFP 蛍光は細胞の形に沿うように観察できたことから、PtSLC34-2、PtSLC34-5 ともに細胞膜に局在することを確認した (図 7)。次に、

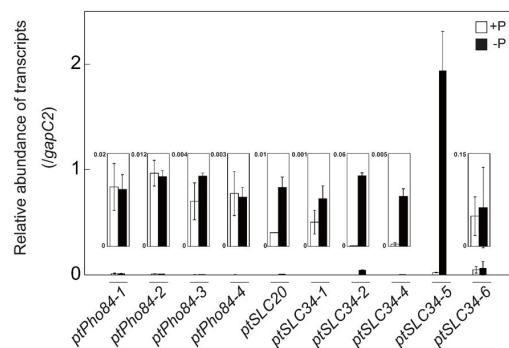


図 6. リン酸輸送体候補遺伝子の発現量解析 挿図: 発現量が低い遺伝子の拡大図、*gapC2*: 発現量が一定のコントロール、白: リン富化環境下生育細胞、黒: リン欠乏環境下生育細胞

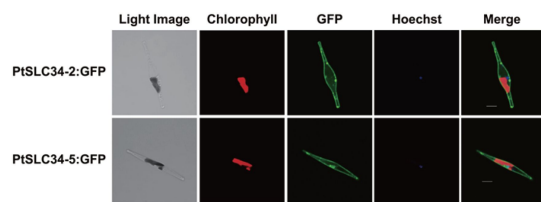


図 7. PtSLC34-2:GFP および PtSLC34-5:GFP の細胞内局在 赤: 葉緑体の自家蛍光、緑: GFP 蛍光、青: 核染色、スケールバー: 5 μm

PtSLC34-2 および PtSLC34-5 の過剰発現株および RNA 干渉法によるノックダウン候補株を作成し、生理学的解析を行った (図 8)。その結果、リン欠乏環境下において、PtSLC34-2 過剰発現株のリン酸吸収速度は、野生株と比較して約 2 倍高くなっていった (図 8 の左図)。また、PtSLC34-2 ノックダウン候補株のリン酸吸収速度は、野生株よりも約 50%低下していた (図 8 の右図)。一方で、PtSLC34-5 の過剰発現株およびノックダウン候補株におけるリン酸吸収速度は、野生株と同程度であった (図 8)。以上のことから、PtSLC34-2 は、珪藻細胞においてリン酸輸送体として機能していることがわかったが、PtSLC34-5 に関しては、さらに詳細な解析が必要である。

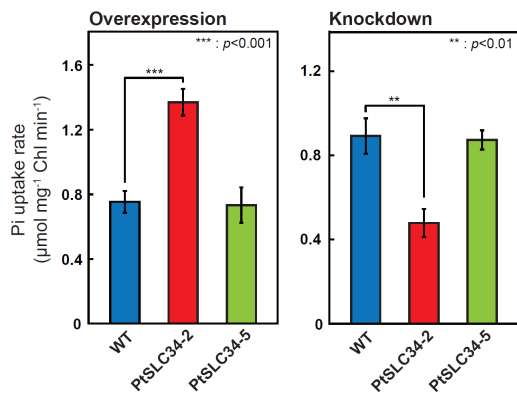


図 8. 生理学的解析による PtSLC34-2 および PtSLC34-5 の機能解析 左図: FLAG タグを付加させた PtSLC34-2 および PtSLC34-5 過剰発現株を用いたリン酸吸収速度、右図: RNA 干渉法による PtSLC34-2 および PtSLC34-5 ノックダウン候補株を用いたリン酸吸収速度

(3) ポリリン酸合成・分解酵素の同定と機能解析

酵母のポリリン酸合成・分解酵素の配列情報を基に、珪藻のゲノムデータベースを利用して、候補遺伝子の網羅的探索を行ったところ、4つのポリリン酸合成酵素候補因子 (Pt15281、Pt19586、Pt48538、Pt50019) と1つのポリリン酸分解酵素候補因子 (Pt35580) を見出した (図9)。これら候補遺伝子の発現量を qPCR によって、リン富化環境下およびリン欠乏環境下で比較解析した結果、ポリリン酸合成酵素候補因子のうち1遺伝子 (*pt48538*) がリン富化環境下で、2遺伝子 (*pt19586*、*pt50019*) がリン欠乏環境下で誘導されていることがわかった (図9)。一方で、ポリリン酸分解酵素候補遺伝子は、環境リン酸濃度に関係なく、定常的な発現を示した (図9)。また、リン酸濃度応答性を示したポリリン酸合成酵素候補遺伝子のうち、リン富化環境下誘導遺伝子の発現量に比べて、リン欠乏環境下誘導遺伝子の発現量の方が相対的に高かった (図9)。これらのことから、珪藻細胞は、リン欠乏環境下で積極的にポリリン酸合成を行い、細胞内に蓄積している可能性が高いことが示唆された。今後は、各因子の細胞内局在解析および酵素活性測定を行っていく必要があると考えられる。

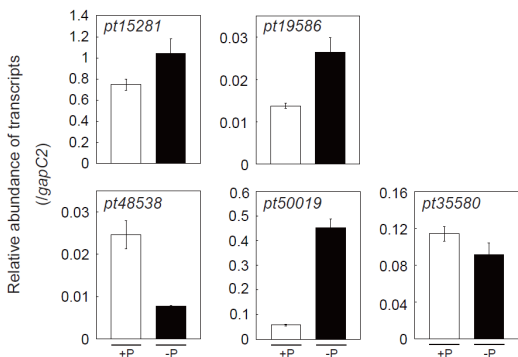


図9. ポリリン酸合成・分解酵素候補遺伝子の発現量解析 *gapC2*: 発現量が一定のコントロール、白: リン富化環境下生育細胞、黒: リン欠乏環境下生育細胞

(4) 強化した機構を複合的に有する珪藻細胞の開発

(1-3)の研究によって得られた各機構を担う重要因子を共発現させるための珪藻形質転換用ベクターを新たに構築した (図10)。このベクターは、遺伝子の高発現が期待できる Nitrate Reductase (*NR*) プロモーターおよび fucoxanthin chlorophyll *a/c* binding protein A (*fcpA*) プロモーターが組み込まれている。さらに、両プロモーターは、珪藻細胞の生育環境条件を変えることにより、遺伝子発現を切り替えることができる。今回は、実験(1)において、実際に本ベクターを用いて、細胞膜局在型 HCO_3^- 輸送体 PtSLC4-2 および葉緑体包膜局在型無機炭素輸送体 PtSLC4-7 を共発現させることに成功した (図2)。しかしながら、本研究の最終目標であるリン酸輸送体との共発現化はできず、有用物質生産能を複合的に強化した新規

珪藻細胞の開発には至らなかった。

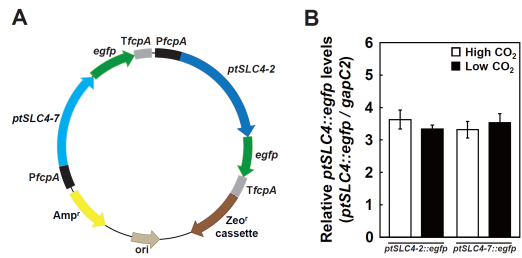


図10. 新規に構築した遺伝子共発現用珪藻形質転換ベクターの概略図 A: ベクター概略図 (便宜上 *ptSLC4-2::egfp* と *ptSLC4-7::egfp* を導入した図) B: Aのベクターを導入した形質転換体における各融合遺伝子の発現量解析

<引用文献>

- Falkowski *et al.* (2000) *Science* 290: 291-296
 Tréguer *et al.* (1995) *Science* 268: 375-379
 Matsuda *et al.* (2011) *Photosynth Res* 109: 191-203
 Nakajima *et al.* (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 1767-1772

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

「*」は、equal contributionを示す。

- Tsuji Y, Nakajima K, Matsuda Y. (2017) Molecular aspects of biophysical CO₂ concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms. *J Exp Bot* in press (査読有)
 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 (査読有)
 Shimakawa G, Matsuda Y, Nakajima K, Tamoi M, Shigeoka S, Miyake C. (2017) Diverse strategies of O₂ usage for preventing photo-oxidative damage under CO₂ limitation during algal photosynthesis. *Sci Rep* 7: 41022 (査読有) DOI: 10.1038/srep41022
 Kikutani S*, Nakajima K*, Nagasato C, Tsuji Y, Miyatake A, Matsuda Y. (2016) Thylakoid luminal -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 9828-9833 (査読有) DOI: 10.1073/pnas.1603112113
 Tanaka A*, Ohno N*, Nakajima K*, Matsuda Y. (2016) Light and CO₂/cAMP

signal cross talk on the promoter elements of chloroplastic -carbonic anhydrase genes in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 170: 1105-1116 (査読有) DOI: 10.1104/pp.15.01738
Meksiarun P, Spiegazzini N, Matsui H, Nakajima K, Matsuda Y, Sato H. (2015) In vivo study of lipid accumulation in the microalgae marine diatom *Thalassiosira pseudonana* using raman spectroscopy. *Appl Spectrosc* 69: 45-51 (査読有) DOI: 10.1366/14-07598

〔学会発表〕(計 25 件)

福地庸平、杉山俊樹、木村奈々恵、中島健介、松田祐介 海洋性珪藻におけるリン酸獲得機構 日本植物学会第 80 回大会 2016 年 9 月 16 日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県、宜野湾市)
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 9th International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms 2016 年 8 月 16 日 Cambridge (UK)
木村奈々恵、杉山俊樹、中島健介、松田祐介 海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における無機リン酸輸送体の同定 第 7 回日本光合成学会 2016 年 5 月 27 日 東京理科大学(東京都、葛飾区)
福地庸平、杉山俊樹、木村奈々恵、中島健介、松田祐介 海洋性珪藻リン酸輸送体候補タンパク質 第 57 回日本植物生理学会 2016 年 3 月 18 日 岩手大学(岩手県、盛岡市)
福地庸平、杉山俊樹、木村奈々恵、中島健介、松田祐介 海洋性珪藻リン酸輸送体候補タンパク質 第二回分子珪藻研究会 2015 年 11 月 28 日 関西学院大学(大阪府、大阪市)
Matsui H, Nakajima K, Matsuda Y. Aquaporins in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* as a channel for CO₂ and NH₃. Molecular life of diatoms 2015 2015 年 7 月 7 日 Seattle (USA)
杉山俊樹、中島健介、松田祐介 海洋性珪藻リン酸輸送体候補タンパク質 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 18 日 東京農業大学(東京都、世田谷区)
中島健介、田中厚子、岩山和史、大橋弘章、松田祐介 SLC4 型無機炭素輸送体候

補因子の機能解析 第 1 回分子珪藻研究会 2014 年 12 月 25 日 関西学院大学(大阪府、大阪市)
中島健介、岩山和史、大橋弘章、松田祐介 海洋性珪藻における SLC4 型 HCO₃⁻輸送体候補因子の機能解析 第 5 回日本光合成学会 2014 年 5 月 30 日 近畿大学(奈良県・奈良市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 健介 (NAKAJIMA Kensuke)
関西学院大学大学院・理工学研究科・博士
研究員
研究者番号: 50709318

(4) 研究協力者

杉山 俊樹 (SUGIYAMA Toshiki)

(4) 研究協力者

福地 庸平 (FUKUCHI Youhei)

(4) 研究協力者

木村 奈々恵 (KIMURA Nanae)