

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16156

研究課題名(和文)海産藻類が持つ独自の代謝経路の解明と、代謝変化によるオイル生産能の増強

研究課題名(英文)Characterization and engineering of unique metabolic pathway in the chloroplast of marine microalgae

研究代表者

辻 敬典(Tsuj, 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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：海洋で繁栄しているハプト藻や珪藻などは、紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻類であり、シアノバクテリア由来の葉緑体を持つ緑藻や紅藻とは代謝的に異なる特徴を有する。本研究では、海洋の主要生産者である珪藻を用い、オイル合成に関与すると推定される葉緑体内代謝系の解析を行った。その結果、これまで緑藻や紅藻の葉緑体内には存在しないと考えられていた解糖系を構成する酵素の一部が、珪藻の葉緑体に存在することを明らかにした。さらに、それらの酵素を過剰発現させた株を取得することにも成功した。この過剰発現体を用いた解析を進めることで、珪藻が持つ独自のオイル合成系の解明が進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：Major marine primary producers such as diatoms and haptophytes have red-algal-derived-chloroplast acquired through secondary endosymbiotic events. Due to different evolutionary origin, these marine secondary algae have distinct features in carbon metabolism compared with the well-studied green lineage. Here I characterized putative metabolic enzymes involved in the oil accumulation in a marine diatom. As a result, I revealed that some glycolytic enzymes which are usually absent in the chloroplast were located in the chloroplast of a diatom. The chloroplastic glycolytic pathway is expected to supply precursors for oil biosynthesis. I tried to generate overexpression and suppression mutant of the chloroplastic glycolytic enzymes. I could successfully obtain overexpression mutant while no RNAi mutants have been obtained yet. The overexpression mutant will be useful to reveal the entire pathway of oil synthesis and accumulation in marine diatom.

研究分野：植物代謝生理学

キーワード：海洋性珪藻 二次共生 炭素代謝 オイル合成 代謝工学

1. 研究開始当初の背景

海洋で繁栄している珪藻や円石藻は、4枚の葉緑体包膜を持ち、デンプンは作らずに水溶性の多糖(β-グルカン)を葉緑体の外に蓄積するなど、緑色植物(緑藻や陸上植物)とは異なる特徴を持つ(図1)。また、珪藻や円石藻などの海産藻類は、高いオイル蓄積能力を持つことが知られている。海産珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* は貯蔵脂質としてトリアシルグリセロール(TAG)を蓄積し、円石藻 *Emiliana huxleyi* はアルケノンと呼ばれる長鎖不飽和ケトン蓄積する。両種の脂質蓄積量は乾燥重量の約20-30%にも達する。近年の研究代表者の研究(Tsuji et al. 2009, Plant Cell Physiol; Tsuji et al. 2012, Plant Cell Physiol.)や、珪藻や円石藻のゲノム解析(Bowler et al. 2008, Nature; Besty et al. 2013, Nature)から、これらの海産藻類が緑色植物とは異なる独自の代謝経路を持つことが示されている。しかし、今までの炭素代謝の研究は緑色植物を中心に進められてきたため、珪藻や円石藻の炭素代謝については不明な点が多く、海産藻類がなぜ高いオイル蓄積能を持つかも不明のままであった。

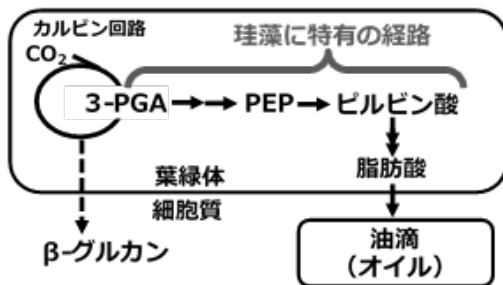


図1. 珪藻のオイル代謝モデル

2. 研究の目的

研究代表者は、円石藻などの海産藻類では、緑色植物が持たない酵素が葉緑体内で機能していることを示し、さらに脂肪酸合成の前駆体であるピルビン酸を、カルビン回路から直接供給していることを示唆した(Tsuji et al. 2009, Plant Cell Physiol.; Tsuji et al. 2012, Plant Cell Physiol.)。一方、これまで研究されてきた緑藻や陸上植物では、脂肪酸合成の材料は、輸送体を介して細胞質から葉緑体へと取り込まれる。以上のように研究代表者の研究から、脂肪酸合成の材料が、緑藻では葉緑体の外から供給されるが、珪藻や円石藻では葉緑体内でカルビン回路から供給されるという違いが明らかになりつつある(図1)。

研究代表者は、脂肪酸の供給経路の違いが、海産藻類と緑藻のオイル蓄積量の違いに関連していると推測している。本研究では、海産藻類に特有の「カルビン回路から葉緑体内で直接ピルビン酸を合成する経路」に参与する酵素を同定し、その代謝経路とオイル生産

能が関連しているかを検証することを目的とした。同時に、光合成CO₂固定能増強によりオイル生産力を強化するために、珪藻がいかんして海水中の無機炭素(CO₂やHCO₃⁻)を細胞内に取り込んでいるのかを明らかにすることも目指した。これらの知見を基に、オイル合成系や光合成CO₂固定能の増強によりオイル蓄積量を増強した珪藻の作出を目指し、CO₂固定からオイル合成に至るまでの経路の総合的な解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 海洋性珪藻におけるCO₂取り込み様式の比較解析

海洋性珪藻 *P. tricornutum* では Solute carrier 4 輸送体を使い、海水中のHCO₃⁻を直接細胞内に取り込んで光合成に利用している(Nakajima et al. 2013, PNAS)。そこで、SLC4によるHCO₃⁻の取り込みが、海洋性珪藻に普遍的であるかを検証するために、複数種の珪藻に対してSLC4の阻害剤である4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) 処理を行い、光合成活性に対する影響を調べた。本実験では、2種の中心目海洋性珪藻(*Thalassiosira pseudonana* および *Chaetoceros muelleri*) と二種の羽状目海洋性珪藻 (*P. tricornutum* および *Cylindrotheca fusiformis*) を用いた。

(2) 葉緑体内でのピルビン酸合成経路の特定

海洋性珪藻の葉緑体におけるピルビン酸合成供給経路を明らかにするために、ピルビン酸の合成に関与すると推測される酵素に緑色蛍光タンパク質(GFP)を付加した融合タンパク質を発現させ、細胞内局在を調べた。

(3) カルビン回路からのピルビン酸の供給と、オイル蓄積能の関連解明

海洋性珪藻 *P. tricornutum* において、カルビン回路からピルビン酸を供給する経路を増強した株およびRNAiによりノックダウンした株を作成した。そして、それらの変異体におけるオイル蓄積量の比較を行い、カルビン回路からのピルビン酸供給がオイル蓄積とどのように関連しているかを解明することを目指した。

4. 研究成果

(1) 海洋性珪藻におけるCO₂取り込み様式の比較解析

4種の海洋性珪藻に対し、SLC4の阻害剤であるDIDSを処理した結果、羽状目珪藻 *P. tricornutum* および中心目珪藻 *C. muelleri* では、無機炭素に対する親和性の低下が確認された。一方で、中心目珪藻 *T. pseudonana* および *C. fusiformis* ではDIDS処理を行っても無機炭素に対する親和性は変化しなかった。これらの結果から、*T. pseudonana* および *C. fusiformis* では、SLC4を使わずに無機炭素を取り込んでいることが示唆された。

SLC4 以外に無機炭素取り込みに関与する因子としては、細胞外ペリプラズム空間に存在する炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase, CA) が挙げられる。一部の緑藻やシアノバクテリアでは、細胞外 CA (external CA, eCA) は、細胞表面において HCO_3^- を速やかに CO_2 へと変換し、膜透過性の高い CO_2 の拡散による取り込みを促進すると考えられている。そこで、SLC4 非依存種において、eCA が無機炭素の取り込みに寄与しているかを調べるために、膜不透過性の CA 阻害である Acetazolamide (AZA) を用いた実験を行った。その結果、SLC4 非依存種であった *T. pseudonana* および *C. fusiformis* では、AZA 処理により無機炭素に対する親和性が低下した。そのため、これら 2 種の珪藻では、SLC4 は使わずに、eCA によって HCO_3^- を CO_2 に変換してから細胞内に取り込んでいると考えられる。これらの結果から、海洋性珪藻には、SLC4 依存型および eCA 依存型の 2 パターンの無機炭素取り込み様式が存在することが明らかになった (Tsuiji et al. 2017, *J. Exp. Bot.*)。

細胞内に取り込まれた無機炭素は HCO_3^- の形で蓄積するが、細胞内に蓄積した HCO_3^- は最終的に CO_2 へと変換され、 CO_2 固定酵素である ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) に供給される。本研究では、珪藻のピレノイド貫通チラコイド内に局在する新規の型 CA を同定し、この型 CA がチラコイドルーメン内で HCO_3^- を CO_2 に変換し、RubisCO へと供給していることを示唆した (Kikutani et al. 2016, *PNAS*)。

以上のように水圏光合成において重要な役割を果たす因子を複数同定し、海洋性珪藻の無機炭素取り込みのモデルを構築した (Tsuiji et al., in press; 図 2)。将来的には、これらの因子の改変により、光合成 CO_2 固定能を強化した珪藻の作出を目指す。

(2) 葉緑体内でのピルビン酸合成経路の特定

緑色植物の葉緑体内では、カルビン回路の中間体から脂肪酸の材料となるピルビン酸を合成することはできない。しかし、珪藻では、カルビン回路からピルビン酸までをつなぐ代謝酵素群が葉緑体に存在し、カルビン回路から直接ピルビン酸を供給することが示されている。そこで、カルビン回路からのピルビン酸供給に必要であるホスホピルビン酸ヒドラターゼ (PPH) に GFP を連結した融合タンパク質を珪藻 *P. tricornutum* で発現させ、その局在を調べた。複数のクローンで GFP 蛍光を確認したが、クローンにより GFP の局在が異なるなど、安定した結果を得ることができなかった。要因の一つとして、多くのクローンで GFP 融合タンパク質の発現量が低く、そのため葉緑体のクロロフィル自家蛍光が GFP 観察用チャンネルで検出されてしまったと考えられる。

そこで、再度多数の形質転換体を作成し、

GFP 融合タンパク質の蓄積量が多い株をスクリーニングした。その結果、1 クローンではあるが、安定的に GFP 融合タンパク質を発現する株が得られ、PPH が葉緑体に局在することが示された。現在、GFP よりもシグナルの強い (モル吸光係数および蛍光の量子収率の大きい) 蛍光タンパク質である Clover を融合したコンストラクトを作成しており、再度局在を検討する予定である。

(3) カルビン回路からのピルビン酸の供給と、オイル蓄積能の関連解明

PPH がカルビン回路からのオイル材料 (ピルビン酸) 供給に寄与しているのであれば、PPH の過剰発現体ではオイル蓄積量が増加し、ノックダウンによりオイル蓄積は低下すると考えられる。そこで、PPH の過剰発現体および RNAi によるノックダウン体を作成し、抗体を用いてスクリーニングを行った。その結果、PPH 量が野生型より増加した過剰発現体を得ることができた (図 2)。

WT #1 #2 #3 #4 #5



図 2. ウェスタンブロットによる過剰発現体のスクリーニングの結果。クローン #1 および #5 では、野生型 (WT) と比較して顕著に蓄積量が増加していた。

同様に RNAi 体に関してもスクリーニングを行ったが、現在までに発現量が顕著に低下したクローンは得られていない。そこで、現在は引き続き RNAi 体のスクリーニングを進めると共に、Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) によるノックアウトに着手した。

以上のように、ノックダウン体は得られなかったが、過剰発現体を複数得たので、現在はこれらの過剰発現体を用いてオイル蓄積量の解析を進めている。

今後は、PPH 過剰発現体のオイル蓄積量の解析を進めると共に、SLC4 や eCA などの無機炭素取り込みに関与する遺伝子の過剰発現などを組み合わせた複合的な代謝改変を行うことで、より高いオイル蓄積量を持つ珪藻の作出を目指す。

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 7 件)

1) Tsuiji, Y., Nakajima, K., Matsuda, Y. (2017) Molecular aspects of the biophysical CO_2 -concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms. *J. Exp. Bot.* (in press) (査読有り)

2) Matsuda, Y., Hopkinson, B.M., Nakajima, K., Dupont, C.L., 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) (査読あり)

3) Tsuji, Y., Anggara, M., Matsuda Y. (2017) Evolutionarily distinct strategies for acquisition of inorganic carbon from seawater in marine diatoms. *J. Exp. Bot.* (in press) (査読あり)

4) 辻敬典 .(2017) 海洋植物プランクトンの光合成 - 特異な脂質を貯める円石藻 - . *生物工学会誌* . 95: 21 (査読なし)

5) 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. (査読あり)

6) Tsuji, Y., Shiraiwa, Y. (2016) Distinctive features of photosynthetic carbon metabolism in secondary endosymbiotic algae. *Perspectives in Phycology* 3: 3-9 (査読あり)

7) Tsuji, Y., Yamazaki, Y., Suzuki, I., Shiraiwa, Y. (2015) Quantitative analysis of carbon flow into photosynthetic products functioning as carbon storage in the marine coccolithophore, *Emiliana huxleyi*. *Marine Biotechnology* 17: 428-440 (査読あり)

[学会発表](計5件)

1) Tsuji, Y., Mahardika, A., Matsuda, Y. Distribution of solute carrier (SLC) transporter-dependent bicarbonate uptake in pennate and centric marine diatoms. The IXth International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (CCM9). Aug 15-18, 2016, Cambridge (UK).

2) 大久保亮佑、菊谷早絵、辻敬典、松田祐介 . *in vivo* 感光架橋技術を用いた海洋性珪藻の新規ピレノイド因子の探索 . 第7回日本光合成学会年会 . 2016年5月27-28日 . 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都, 葛飾区) .

3) Tsuji, Y., Mahardika, A., Matsuda, Y. Comparative study on modes of inorganic

carbon uptake in marine diatom. 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月18-20日 . 岩手大学(岩手県, 盛岡市) .

4) Tsuji, Y., Mahardika, A., Matsuda, Y. Two distinct modes of inorganic carbon uptake in marine diatoms. 第2回分子珪藻研究会 . 2015年11月28-29日 . 関西学院大学大阪梅田キャンパス(大阪府, 大阪市) .

5) 辻敬典、松田祐介、白岩善博 . 藻類におけるC₄有機酸代謝の多様な機能 . 第6回日本光合成学会年会 . 2015年5月22-23日 . 岡山国際交流センター(岡山県, 岡山市) .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

辻敬典 (Tsuji, Yoshinori)

関西学院大学・理工学部・任期制助教

研究者番号 : 40728268