

解説

緑藻クラミドモナスにおける無機炭素濃縮機構と脂質代謝<sup>‡</sup>

京都大学 大学院生命科学研究科  
 福澤 秀哉<sup>\*</sup>、山野 隆志、梶川 昌孝

1. はじめに

近年、バイオエネルギーや低炭素社会に関連する研究が話題にのぼり、光合成への関心が高まっている。実際に、光合成の改良、生産性の増強、低炭素社会の実現、エネルギーならびに環境問題の解決といった大目標の実現には、光合成機能をミクロからマクロまで、遺伝子レベルから地球規模の生態系レベルまで幅広く理解することが重要であろう。また、光合成の各ステップに関する詳細な知識も重要である。炭素代謝のエンジニアリング (図1) を考える上で、カルビン回路の改良や、細胞分裂速度の制御などのポイントもあるが、光合成産物の利用の観点から、(1)光合成の律速となっているCO<sub>2</sub>の供給経路、(2)光合成産物の中でも有用とされる脂質合成経路の2点については特に近年理解が進んできている。また、微細藻類で頻繁に話題にのぼる(3)炭化水素の合成経路や、(4)デンプンやショ糖の合成とそれ以外の代謝系へのエネルギーの分配機構については、比較的未

解明な部分が多い。ここでは、(1)CO<sub>2</sub>の供給段階と(2)脂質代謝に関して、微細藻類の中でもモデル生物のクラミドモナス<sup>1,2)</sup> について現状を解説し、バイオテクノロジーへの技術的展望をまとめる。

2. 光合成の維持に必要な無機炭素濃縮機構 (CCM)

水中でのCO<sub>2</sub>の拡散速度は空気中に比べて10,000分の1と低いことから、水圏に生息する生物へのCO<sub>2</sub>の供給は、陸上植物の場合と比べて困難である。またCO<sub>2</sub>は水と反応して重炭酸イオンならびに炭酸イオンに変換されるので、水中では3種の分子 (CO<sub>2</sub>・HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>・CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>をまとめて無機炭素Ciと呼ぶ) の平衡状態がpHに依存して成立する。CO<sub>2</sub>固定酵素ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は、Ciの中でもCO<sub>2</sub>のみを基質として利用する酵素であるが、主に水圏で光合成を行う微細藻類のRubiscoは、陸上植物の酵素と比べて、CO<sub>2</sub>に対する親和性が低い (つまりKm値が高い)。多くの微細藻類は、光合成を維持するために進化の過程で、Ciを細胞外から能動的に取り込み、Rubisco周囲にCO<sub>2</sub>として供給するシステムを獲得したとされる。また、土壌中や土壌表面では細菌の醗酵により、CO<sub>2</sub>濃度が数%まで上昇する時もあり、微細藻の生存環境ではCO<sub>2</sub>濃度が大きく変動する。5% CO<sub>2</sub>を含む高CO<sub>2</sub> (High-CO<sub>2</sub>; HC) 環境で培養した緑藻は、C<sub>3</sub>植物型の光合成特性を示すが、大気レベルの低CO<sub>2</sub> (0.04%, Low-CO<sub>2</sub>; LC) 環境で培養した細胞は、CO<sub>2</sub>濃縮能をもつトウモロコシなどのC<sub>4</sub>植物と類似した光合成特性を示す (図2)。さらに、LC環境に順化した細胞では光呼吸活性が低減することから、無機炭素濃縮機構 (Carbon-Concentrating Mechanism; CCM) の存在が示唆されてきた。微細藻類のCCMは、単細胞であってもRubisco近傍のCO<sub>2</sub>濃

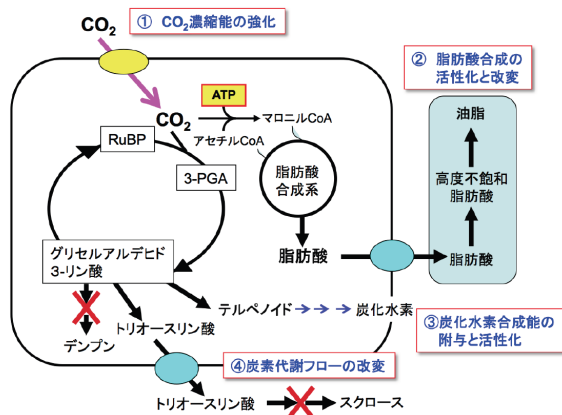


図1 光合成真核生物における炭素代謝エンジニアリングのターゲット

赤色×印で示したデンプンや貯蔵糖に移行する代謝経路を制限することで、脂肪酸や炭化水素への炭素の流れを強化できる可能性が考えられている。

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成と藻類バイオテクノロジー」

<sup>\*</sup> 連絡先 E-mail: fukuzawa@lif.kyoto-u.ac.jp, URL: www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/molecule/

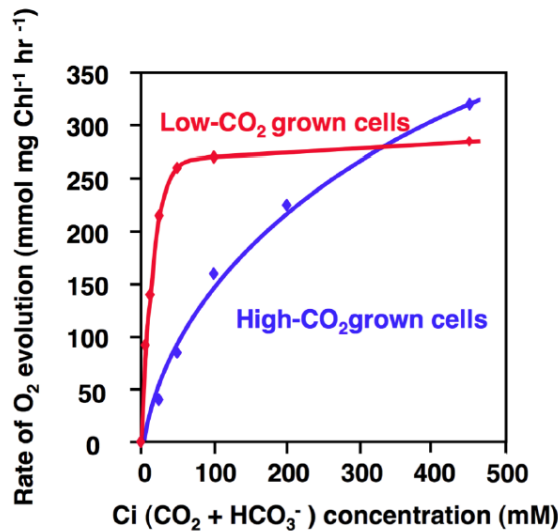


図2 培養環境に依存した緑藻の光合成特性 (文献3に記載の図を改変)

度を維持できる点に特色がある。

### 3. クラミドモナスにおけるCCM関連遺伝子の探索と機能解析

緑藻クラミドモナスの細胞内に光依存的な C<sub>i</sub> プールが CCM によって形成されることが1980年に発見された<sup>3)</sup>。クラミドモナスにおける Rubisco の K<sub>m</sub> (CO<sub>2</sub>) 値は約20 μM であるのに対して、LC 条件で培養した細胞の CO<sub>2</sub> に対する K<sub>1/2</sub> (CO<sub>2</sub>) 値は 2-3 μM である。ここでの K<sub>1/2</sub> (CO<sub>2</sub>) 値は、細胞懸濁液を酵素懸濁液とみなして光合成活性を測定した時の、細胞の CO<sub>2</sub> に対する見かけ上の親和性を示す値である。この親和性の増加 (K<sub>1/2</sub> 値の低下) が CCM によると考えられている。その後、細胞の生育に HC 環境が必要な変異株 (CO<sub>2</sub> 要求性株) が、シアノバクテリアや緑藻クラミドモナスから単離された。変異の原因遺伝子が同定され、光呼吸関連遺伝子や CCM の構成

因子である C<sub>i</sub> 輸送体と炭酸脱水酵素、ならびにその制御因子が明らかになってきた。特に、光合成による炭酸固定に炭酸脱水酵素が必須であることは、シアノバクテリアの遺伝子破壊実験で示されている<sup>4)</sup>。

また、cDNA アレイを用いた LC 誘導性遺伝子の同定と、野生型株と HC 要求性変異株における発現遺伝子の比較により、CCM 関連遺伝子が推定されている<sup>5)</sup>。CCM は CO<sub>2</sub> 濃度のみならず光強度の変化によっても制御を受ける。1.2% CO<sub>2</sub> 濃度でも強光条件下 (1,000 μmol photons · m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) では CCM が誘導されることから、この時に発現誘導される遺伝子が CCM 関連遺伝子として更に絞り込まれた<sup>6)</sup> (図3、表1)。その中には、炭酸脱水酵素や膜輸送体、シグナル伝達因子が含まれている。

LC 誘導性遺伝子の中には、C<sub>i</sub> 輸送に関わると予測されるタンパク質の遺伝子が含まれていた。LCI1 は、4回膜貫通領域をもち、細胞膜に局在する LC 誘導性のタンパク質である<sup>7,8)</sup>。他の輸送体が誘導されて

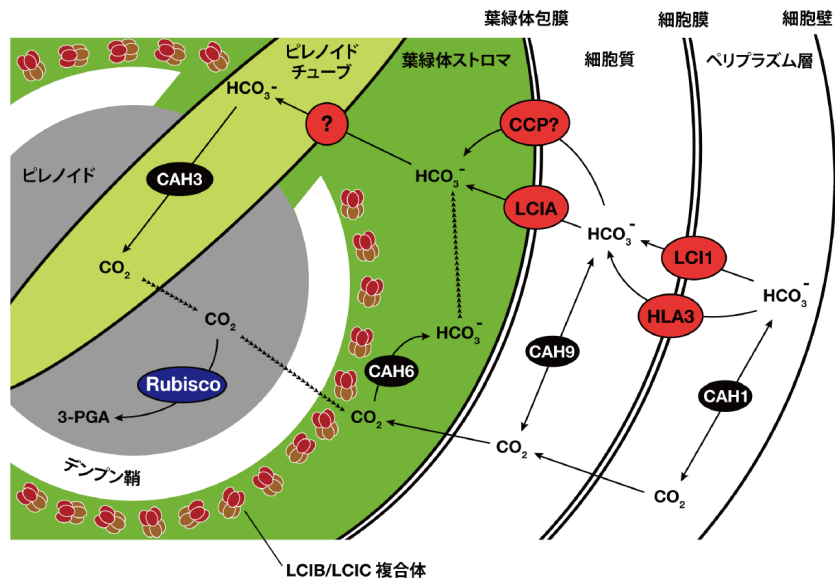


図3 クラミドモナスにおける無機炭素の流れ

細胞膜に局在する LCI1、HLA3、葉緑体包膜に局在する LCIA を介して CO<sub>2</sub> は HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> の形で葉緑体ストロマに能動的に輸送される。葉緑体包膜に局在する CCP1/2 は、実際に C<sub>i</sub> 輸送に関与するかは不明である。次いで、チラコイド膜に局在すると考えられている未同定の C<sub>i</sub> 輸送体により、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> はチラコイド膜ルーメンへと輸送され、炭酸脱水酵素 CAH3 によって CO<sub>2</sub> へと変換される。ピレノイドに貫入しているチラコイド膜をピレノイドチューブと呼び、ここでは実際よりも大きく描いてある。CO<sub>2</sub> は拡散によりチラコイド膜を通り、ピレノイド内部の Rubisco によって固定される。Rubisco によって固定されなかった CO<sub>2</sub> はピレノイドから漏れ出す、ピレノイド周囲に局在する CAH6 の働きにより HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> へと変換され、再びチラコイド膜ルーメンへと輸送される CO<sub>2</sub> リサイクル機構があると考えられている<sup>20,59)</sup>。ピレノイドを覆うようにして局在する LCIB/LCIC 複合体の直接の機能は不明であるが、この CO<sub>2</sub> のリサイクルに関わると考えられている<sup>15,16)</sup>。CAH1、CAH3、CAH6、CAH9 は炭酸脱水酵素のアイソザイムを示す。

表1 クラミドモナスのCCM関連遺伝子群

遺伝子名	局在	クラミドモナス以外の 生物種での保存性			タンパク質の機能	文献
		<i>Volvox carteri</i>	<i>Chlorella</i> sp. NC64A	<i>Ostreococcus</i> RCC809		
<b>調節因子</b>						
<i>CCM1/ CIA5</i>	核	+	+	-	CCMを調節するマスター制御因子。CO <sub>2</sub> 濃度条件に関わらず構成的に発現している。	5, 21, 22, 23, 24, 25, 56
<i>LCR1</i>	N.D.	-	-	-	LC誘導性のMYB転写因子。CCM1の下流でLCI1とLCI6の発現誘導を調節する。	26
<i>LCI14</i>	N.D.	+	+	+	CobWドメインを持つ機能未知タンパク質。	6
<i>LCI15</i>	N.D.	+	-	-	TB2/DPI, HVA22ファミリーに属する調節因子。	6
<b>炭酸脱水酵素</b>						
<i>CAH3</i>	チラコイド ルーメン	+	+	-	欠損株はLC条件で致死となる。チラコイドルーメンに輸送されたHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> をCO <sub>2</sub> に変換することで、チラコイド膜を介してピレノイドに拡散したCO <sub>2</sub> がRubiscoによって固定されると推定されている。	16, 19
<i>CAH6</i>	葉緑体 ストロマ	+	-	+	葉緑体ストロマのピレノイド周辺に局在する。ピレノイドから漏れだしたCO <sub>2</sub> をHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> に変換することで、CO <sub>2</sub> のリサイクルにを担うと推定されている。	20
<i>CAH1</i>	ペリプラズ ム層	+	+	+	LC条件で多量に誘導される。LCR1/CCM1により発現誘導が調節される。欠損株は野生型株と同様に生育することからCCMへの寄与は少ないと考えられている。	17, 18
<b>無機炭素の輸送・リサイクル</b>						
<i>LCI1</i>	細胞膜	-	-	-	細胞膜に局在する膜タンパク質。LCR1/CCM1により発現誘導が調節される。高CO <sub>2</sub> 条件における強制発現により光合成活性、Ci取り込み活性が上昇したことから、細胞膜におけるCi輸送に関わると考えられている。	7, 8, 26
<i>LCIA</i>	葉緑体 包膜 (予測)	+	+	+	原核生物の亜硝酸/ギ酸輸送体ファミリーに属する膜タンパク質。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させるとHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> の取り込み活性が認められたことから、葉緑体へのCi輸送に関わると推定されている。	5, 9, 11
<i>HLA3</i>	細胞膜 (予測)	+	+	+	強光ならびにLC条件により誘導されるABC型トランスポーター。LCIAとの共発現抑制により、Ci取り込み活性が低下したことから、Ci輸送に関わると推定されている。	5, 10, 11
<i>LCIB</i>	ピレノイド 周囲	+	-	+	LCIBの欠損株はCO <sub>2</sub> 要求性となる。CAH3の下流で働くことから、ピレノイドから漏れだしたCO <sub>2</sub> のリサイクルに関わると推測されている。LCICタンパク質と相互作用し、複合体を形成する。	5, 6, 14, 15, 16
<i>LCIC</i>	ピレノイド 周囲	+	-	+	LCIBタンパク質と相互作用し、複合体を形成する機能未知タンパク質。	5, 6, 15
<i>CCP1</i>	葉緑体 包膜	+	+	+	ミトコンドリア局在性のキャリアタンパク質ファミリーに属する。発現抑制により生育が遅延する。	12, 13
<i>CCP2</i>	葉緑体 包膜	+	+	+	ミトコンドリア局在性のキャリアタンパク質ファミリーに属する。発現抑制により生育が遅延する。	12, 13
<b>デンプン合成</b>						
<i>STA2</i>	N.D.	+	+	+	デンプン合成酵素。LC条件で発達するピレノイドデンプン鞘の合成に関わると推定されている。	5, 6, 57
<i>LCI8</i>	N.D.	+	+	-	デンプン結合ドメインを持つ。LC条件で発達するピレノイドデンプン鞘の合成に関わると推定されている。	6
<b>機能未知</b>						
<i>LCI5</i>	N.D.	+	-	-	LC条件下でリン酸化を受ける機能未知タンパク質。	7, 58
<i>LCI6</i>	N.D.	-	-	-	LCR1/CCM1により発現誘導が調節される。機能は未知。	5, 6, 26

N.D.: 未定

いないHC条件でLCI1を強制発現すると、CO<sub>2</sub>に対する親和性が上昇する事から、Ci輸送体の一つであると考えられている<sup>8)</sup>。同様にLC誘導性で亜硝酸輸送体やギ酸輸送体と相同性をもつLCIAは、6回膜貫通領域を持つ。アフリカツメガエル卵母細胞でLCIAタンパク質を発現すると、亜硝酸に加えて重炭酸イオンの取込が促進されることから、基質特異性の低いア

ニオン輸送体であると推定されている<sup>9)</sup>。また、強光条件で誘導される膜タンパク質をコードする遺伝子として見出されていたHLA3は、細胞膜局在型のABC (ATP-binding cassette) タイプの輸送体をコードする<sup>10)</sup>。LCIA遺伝子とHLA3遺伝子を同時にノックダウンすると細胞の重炭酸イオンの取込能力が低下するので、両者がCi輸送に重要な因子であると推定されてい

る<sup>11)</sup>。また、6回膜貫通領域をもつ葉緑体包膜タンパク質CCP1とCCP2は、動物ミトコンドリアの輸送タンパク質と相同性を持ち、早くからLC誘導性タンパク質として見出されていた<sup>12)</sup>。CCP1とCCP2のタンパク質配列は互いに高い相同性を示し、両者をノックダウンすると長期の細胞増殖は損なわれたが、光合成における細胞のCO<sub>2</sub>に対する親和性は変化しないことから、Ciの輸送濃縮に直接は関わっていないと推定されている<sup>13)</sup>。

以前から単離されていたCO<sub>2</sub>要求性の*pmp1*変異株で変異していた遺伝子は、我々の命名したLC誘導性可溶性タンパク質をコードする遺伝子*LCIB*であった<sup>14)</sup>。この*pmp1*変異株では、*LCIB*の35番目のチロシンコドンTACが翻訳終止コドンTAAに変異しており、*LCIB*が産生されない。*pmp1*変異株はLC条件で細胞内へのCiの蓄積が減少し、生育速度が低下した。*LCIB*遺伝子をRNAi法でノックダウンすると、大気レベルのCO<sub>2</sub>濃度(0.04%)での生育速度は低下するが、50 ppmのCO<sub>2</sub>を含む空気を通気する培養条件では、野生株と同様に増殖することから、複数のCi輸送体が異なるCO<sub>2</sub>環境に応じて発現制御を受けると示唆される<sup>15)</sup>。この*LCIB*は葉緑体移行シグナルを前駆体タンパク質にもち、蛍光抗体法により葉緑体内のピレノイドと呼ばれるRubiscoが凝集した構造体の周囲に局在することが明らかになった<sup>15)</sup>。ただし、この局在は、LC濃度で照射条件に限られており、光存在下であっても高CO<sub>2</sub>条件では、葉緑体内に分散する。さらに、暗条件にするとLC条件にもかかわらず*LCIB*は集合することなく葉緑体内に分散する。*LCIB*遺伝子と相同性を示す遺伝子が3種見つかっており、*LCIC*、*LCID*、*LCIE*と命名されている。*LCIB*は単独で機能するのではなく、*LCIC*と高分子複合体を作りピレノイド周囲に局在する。ピレノイドマトリックス内から漏れ出してしまうCO<sub>2</sub>を、*LCIB/LCIC*複合体が炭酸脱水酵素CAH6と共同してリサイクルするモデルが提唱されている<sup>15,16)</sup>。

緑藻クラミドモナスで炭酸脱水酵素は、8種類のイソ酵素が知られているが、LC条件で多量に誘導蓄積されるCAH1<sup>17)</sup>は、CCMにあまり寄与しないとされている<sup>18)</sup>。チラコイド膜のルーメン側に存在するCAH3がシアノバクテリアのカルボキシゾームに局在するIcfA (=Cca1)と同様にLC条件における増殖に必須であることが示されている<sup>19)</sup>。また、CAH6は葉緑体ピレノイドの周囲に局在するが<sup>20)</sup>、CCMに必須な

のかどうかについては未解明である。

#### 4. 二酸化炭素のセンシングとCCMの制御

クラミドモナスのCCMは、培養中のCO<sub>2</sub>濃度によって制御を受けるが、この制御にはCCM1(=CIA5)が必須である<sup>21,22)</sup>。CCM1はアミノ末端領域に2つの亜鉛結合部位を持ち、CO<sub>2</sub>濃度条件に関わらず恒常的に発現している<sup>21,22,23)</sup>。CCM1は核に局在し<sup>23)</sup>、細胞内で約280-500 kDaの高分子複合体を形成することから<sup>24)</sup>、転写因子複合体に作用すると考えられている。またCCM1の亜鉛結合部位には、実際に各1個(合計2分子)の亜鉛が結合しており、CCMの制御とタンパク質複合体の安定化に必須である<sup>24)</sup>。恒常的に発現しているCCM1がどのようにしてCO<sub>2</sub>濃度変化を感知して下流の遺伝子にシグナルを伝達しているのかについてはまだ明らかでないが、CCM1のリン酸化状態の変化や相互作用因子の変化による制御が可能性として考えられる。CCM1の変異株と野生株の発現プロファイルの比較により、CCM1はLC条件移行1時間以内に誘導される遺伝子群のほぼ全ての発現誘導に必要であることが明らかになった<sup>5,6)</sup>。そこでCCM1がCO<sub>2</sub>のシグナル伝達経路において最も上位に位置することが示唆されるが、CCM1がCO<sub>2</sub>あるいはHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>と結合して、実際にセンサーとして機能しているのかどうかは、今後解決すべき問題である。CCM1のオルソログはCCMを持つボルボックスやクロレラにも保存されている<sup>25)</sup>。CCM1の下流のシグナル伝達因子については、DNAタグ挿入変異株*lcr1*(low-CO<sub>2</sub> stress response 1)株の解析よりMYB転写因子LCR1が同定されている<sup>26)</sup>。LCR1は少なくとも細胞表層に局在する炭酸脱水酵素遺伝子*CAH1*、Ci輸送体遺伝子*LCII*、機能未知遺伝子*LCI6*の3つの遺伝子の転写誘導に関与する。また*LCR1*自身もCCM1に依存してLC条件下で発現が誘導され、*CAH1*の上流域に結合することから、LCR1はCCM1からのCO<sub>2</sub>シグナルを増幅し、下流の遺伝子に伝える役割を果たすと考えられている。

#### 5. CCMの利用改変による光合成の操作の可能性

クラミドモナスは環境中のCO<sub>2</sub>濃度が低下すると、多くのCi輸送体の発現が誘導されCCMが機能する。そこで、この無機炭素輸送体遺伝子のエンジニアリングによる光合成能を強化が期待されている。これまでにcDNAアレイやRNA-seq法を用いた解析から、CCM

にともなって誘導される多くの遺伝子群が同定されている<sup>5,6,27,28)</sup>。その1つである*LCIB*遺伝子は、LC条件における生育に必須な因子であることが報告されている<sup>14,15)</sup>。また*lcib*変異株のサプレッサー変異株を同定することで、*LCIB*がCO<sub>2</sub>濃縮に必須なチラコイドルーメン局在型の炭酸脱水酵素CAH3の下流で働くことが示され、*LCIB*が炭酸固定におけるCO<sub>2</sub>のリサイクルに関与する説が提唱されている<sup>15,16)</sup>。また、*LCIA*遺伝子については、細胞膜局在型ABC輸送体をコードする*HLA3*遺伝子との共抑制変異株を作成すると無機炭素の取り込みが減少することから、*LCIA*と*HLA3*が無機炭素輸送に関与することが報告されている<sup>11)</sup>。まだ論文に報告されていないが、この*LCIA*と*LCIB*を同時に強制発現することで、クラミドモナスのCO<sub>2</sub>固定によるバイオマスが50-80%増加するとの報告がある（The 6th Annual Algae Biomass Summit 2012での米国のSpalding 博士による発表。演題は「Increased CO<sub>2</sub> Fixation Biomass and Lipid in Transgenic *Chlamydomonas* without Nitrogen Starvation」）。今後、この視点に立った光合成改変への挑戦が続けられ、ブレイクスルーが期待されている。

## 6. 微細藻クラミドモナスの脂質蓄積時の代謝変化

緑藻から珪藻まで含む幅広い種類の微細藻が、栄養欠乏や強光などのストレスにตอบสนองして、細胞乾燥重量の20-50%までトリアシルグリセロール (TAG) を蓄積することが知られている<sup>29)</sup>。これは成長や増殖などが阻害されることへの微細藻の示す一般的なストレス応答反応と考えられ、この能力のために微細藻の脂質は再生可能な燃料源として注目されている。微細藻における脂質の生合成経路および生理的な意義についての知見はまだ限られているが、最近、モデル緑藻クラミドモナスを用いた、研究が精力的に進められている<sup>30)</sup>。そこで本項目以降で、最近明らかになってきたクラミドモナスのTAG蓄積とその制御の分子機構についての知見を紹介する。

酵母、植物および動物における従来知られたTAG生合成経路はER特異的なアシル転移酵素により行われ、細胞質内の油体に大部分が貯蔵される。一方、クラミドモナスのTAG生成は、主に葉緑体から供給されるジアシルグリセロール (DAG) を用いる特徴的な経路によることが明らかになった<sup>31)</sup>。この特徴的

なTAG生合成経路は大部分が新規合成された脂肪酸に依存しており、生成されたTAGは葉緑体および細胞質内の油体に貯蔵される。この知見は、微細藻がTAG生合成と貯蔵に関して、他の生物とは異なる特有の機構を有することを示唆しており、脂質代謝への理解を進めるために意義深いものである。

TAG蓄積時の各代謝系の変化については、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法による網羅的な遺伝子発現解析によって推定されている<sup>32)</sup>。窒素欠乏条件と通常培養条件における遺伝子発現を比較したところ、窒素欠乏条件では接合子形成に関連する一群の制御遺伝子の発現が上昇し、逆にタンパク質合成に関する遺伝子発現は抑制された。光合成関連遺伝子の発現も抑制されたが、その中で*PSBS*遺伝子は例外的に抑制されなかった。また窒素欠乏は、顕著な代謝系の再構成を引き起こしていた。培地に添加した酢酸は、グリオキシル酸回路と糖新生が止まるので細胞の構築のために使われなくなり、代わりに脂肪酸生合成に利用される。また、リパーゼ様遺伝子の発現が上昇することから、TAGを構成する脂肪酸は新規合成に加えて膜脂質の再構成によっても生成すると考えられる。

ストレス環境下ではTAGと同様、デンブンも細胞に蓄積される。最近、クラミドモナスにおいて窒素欠乏時に蓄積する脂質量とデンブン合成の関係性について、細胞に供給される炭素量を変化させて詳細を調べた報告がなされた<sup>33)</sup>。この報告からクラミドモナスにおいては、脂質よりもデンブンが広範な培養条件において還元された炭素の主要な貯蔵物質であることが明らかになった。窒素欠乏下での脂質蓄積はデンブン蓄積よりも遅れて起こり、急激な脂質生合成はデンブン生合成能を超過する炭素源が供給された場合にのみ見られた。また、デンブン合成酵素欠損変異体では、デンブン合成ができなくなるので脂質が著しく蓄積する。クラミドモナスではストレス環境下で利用可能な炭素が、デンブンと脂質合成の間で振り分けられ、デンブンは脂質蓄積量を制御する鍵となる代謝因子であると考えられる。

## 7. TAG蓄積に関わる分子機構の解明に向けた試み

ストレス環境下で誘導されるTAG生成の、生物学的なトリガー因子を明らかにするために、RNA-seq法を

用いてクラミドモナスのTAG生成に関与する遺伝子およびその制御因子が調べられている<sup>34)</sup>。クラミドモナスのTAG合成経路について図4に示す。3つのアシル転移酵素をコードする遺伝子 *diacylglycerol acyltransferase* 遺伝子 *DGAT1* と *DGTT1*、ならびに phospholipid diacylglycerol acyltransferase 遺伝子 *PDAT1* は窒素欠乏により誘導され、それぞれの発現パターンからTAG蓄積に一定の役割を担うと考えられた。*DGAT1* および *DGTT1* 遺伝子は、他のTAG蓄積条件（硫黄欠乏、リン欠乏、亜鉛欠乏および鉄欠乏）においても発現上昇する。2つの *PDAT1* 遺伝子挿入変異体 *pdat1-1* および *pdat1-2* では、親株に比べてTAG量が25%以上減少することから、TAG蓄積にはアシル基転移経路が関与することが示された。*DGTT1* および *PDAT1* 遺伝子の生化学的機能は、アシル転移活性を欠損した酵母変異体を用いて同定された。また、*SQUAMOSA* プロモーター結合ドメインをもつクラミドモナスの転写因子 *NRR1* が、*DGAT1* のような脂質合成遺伝子に先行して発現上昇する窒素欠乏反応の制御因子の候補として見出された。この遺伝子の挿入変異体 *nrr1-1* では、窒素欠乏時のTAG量が親株の50%まで減少するが、他の栄養欠乏ストレスではTAG量に変化が見られないことから、窒素欠乏条件に特異的な制御因子であると考えられる。

*PDAT* はリン脂質および糖脂質からアシル基をジアシルグリセロールDAGへ転移する活性と、DAG間でアシル基転移する2つの活性により、TAGの生合成を触媒する酵素として知られている。クラミドモナスの *PDAT* はそれらに加えて、TAG、リン脂質、糖脂質およびコレステロールエステルを基質としてアシル基加水分解活性を示す<sup>35)</sup>。amiRNAを用いた *PDAT1* 遺伝子の発現抑制により、クラミドモナスの膜脂質組成は変化し、最大比増殖率が低下した。*PDAT* による膜脂質の代謝回転とTAGの合成は、最適培養条件での細胞増殖にも、ストレス環境下でのTAG生成における膜脂質分解にも必須であると考えられる。*PDAT* が広範囲な基質に対して強いリパーゼ活性を持つことから、この酵素はバイオ燃料生産に向けての脂質の加水分解や変換において、生体触媒として利用できる可能性が提起されている。

クラミドモナスの *DGTT1* 遺伝子とそのホモログ *DGTT2* および *DGTT3* 遺伝子については、過剰発現体を用いて *in vivo* で機能が解析されている<sup>36)</sup>。各遺伝子

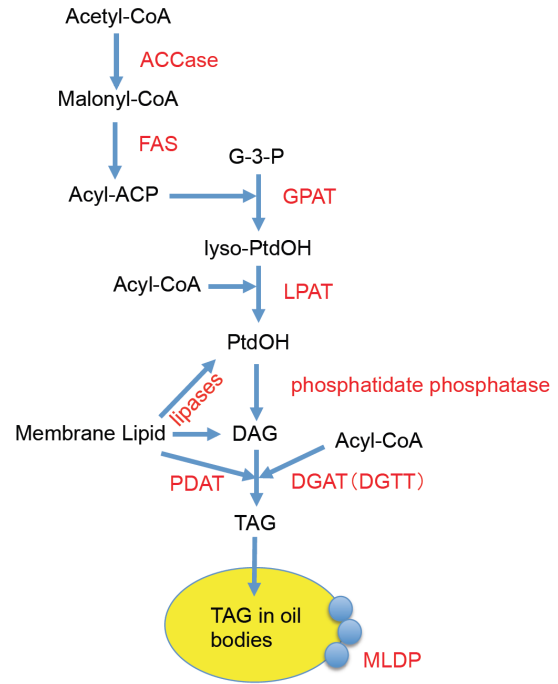


図4 クラミドモナスのTAG代謝経路（文献30を改変）

アセチルCoAを初発物質として、アセチル-CoAカルボキシラーゼ (ACCase) が脂肪酸合成の基質 (マロニル-CoA) を供給する。続いて、脂肪酸合成 (FAS) 複合体によりアシルCoAが生成する。グリセロール-3-リン酸とアシルCoAから2段階のアシル転移酵素 (GPATおよびLPAT) と脱リン酸化酵素 (フォスファチジン酸脱リン酸化酵素) によりDAGが生成する。クラミドモナスではストレス下のTAG蓄積時には主に葉緑体において、脂肪酸新生からDAGの生成までが起る<sup>33)</sup>。DAGからは複数のDGATタンパク質によるアシルCoAからのアシル転移により、TAGが生合成される。*PDAT* による膜脂質からのアシル転移によってもTAGは生成する。またリパーゼによる膜脂質の分解もこれに寄与する。生成したTAGは細胞質中の油体に運ばれ蓄積する。油体の形成にはMLDPタンパク質が関与する。GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase, LPAT: lysophosphatidyl acyltransferase, DGAT: diacylglycerol acyltransferase, PDAT: phospholipid diacylglycerol acyltransferase, MLDP: Major Lipid Droplet Protein.

の過剰発現株では、mRNAレベルが野生型の1.7から29.1倍にまで上昇していた。全脂質組成、中性脂質、脂肪酸組成が調べられたが、通常培養条件および窒素・硫黄欠乏条件のいずれの場合でも、細胞内のTAG蓄積量の増加はなかった。微細藻の細胞内TAG量を増加させるためには、脂質生合成経路に関する律速段階を明らかにし、複雑な生合成ネットワークに関する知見を更に蓄積する必要がある。

栄養欠乏時に蓄積するTAGの供給源の一つとして、膜脂質の分解が起こると考えられるが<sup>32)</sup>、その反応

を担うクラミドモナスのリパーゼ遺伝子はまだ見出されていない。逆に窒素を再添加した際のTAG分解に関与するリパーゼCrLIP1が同定された<sup>37)</sup>。クラミドモナスを窒素欠乏下で培養し、続いて通常条件に戻すと、CrLIP1遺伝子の発現量とTAG蓄積量は負の相関性を示した。大腸菌で発現精製したCrLIP1タンパク質は、DAGおよび極性脂質に対して分解活性を示した。amiRNAによるCrLIP1遺伝子の発現抑制により、窒素源の再供給時にTAG分解が遅れた。以上の知見から、CrLIP1はTAG加水分解から生成させるDAGを分解することにより、クラミドモナスのTAG代謝回転を促進していることが示唆されている。

その他のTAG生合成および蓄積に関連する一連の代謝酵素遺伝子については、他の生物種での既知遺伝子配列を元にしたクラミドモナスゲノム情報に対する相同性解析によりリスト化されている<sup>30,38)</sup>。詳細な経路図についてはクラミドモナスSourcebookに詳しいので参照されたい<sup>39)</sup>。

## 8. クラミドモナスにおける葉緑体型の脂肪酸合成酵素遺伝子の同定

クラミドモナスの葉緑体脂質の一種モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) には、ヘキサデカ-4,7,10,13-テトラエノール酸 (16:4) がグリセロール骨格のsn-2位に存在する。アシル鎖に二重結合を導入するために必要な、クラミドモナスの不飽和化酵素遺伝子のほとんどは既に同定されているが、16:4脂肪酸を生合成する $\Delta 4$ -不飽和化酵素は未知のままであった。最近、系統比較を元に、この $\Delta 4$ -不飽和化酵素をコードする遺伝子Cr $\Delta 4$ FADが同定された<sup>40)</sup>。この遺伝子はN末端に、葉緑体移行シグナル配列に加えてシトクロムb5ドメインを有していた。シトクロムb5ドメインはER型脂肪酸不飽和化酵素の一次電子供与体であり、これらにおいてはC末端側の不飽和化酵素ドメインと融合している。Cr $\Delta 4$ FADの組換え型シトクロムb5ドメインの差吸収スペクトルから、このドメインが *in vitro* で機能することが示された。Cr $\Delta 4$ FADとGFPとの融合タンパク質は葉緑体包膜に局在した。興味深いことに、Cr $\Delta 4$ FADの過剰発現株では、16:4アシル鎖量が増加しただけでなく、MGDGの全量が特異的に増加した。逆にCr $\Delta 4$ FADの発現抑制株ではMGDG量が減少した。この知見により、クラミドモナスの脂質アシル鎖を合成する全不飽和化酵

素についての遺伝子情報が出揃った。

## 9. TAG蓄積の場である油体の役割について

油体は微細藻を含む多くの生物種において、エネルギーと炭素蓄積の場となっている。微細藻の脂質蓄積機能の解明に向けて、窒素欠乏下で培養した細胞から単離精製した油体のプロテオーム解析が行われた<sup>41)</sup>。LC-MS/MSにより同定したジペプチド以上のサイズをもつタンパク質248個のうち、33個は脂質（主にアシル脂質およびステロール）代謝に関連するタンパク質だった。その中にはグリセロール3リン酸アシル転移酵素 (GPAT)、リゾフォスファチジン酸アシル転移酵素 (LPAT) およびPDATなど、TAG生合成の重要な段階を担う酵素が含まれていた。さらに、アシル鎖の付加/解離、ステロール合成、脂質シグナル経路および脂質輸送に関すると考えられるタンパク質も同定された。これらのタンパク質も油体画分と結合していると考えられる。この報告から、クラミドモナスにおいて油体が貯蔵構造体としてだけではなく、オイル合成、分解、脂質の恒常性に関する動的な構造であることが示唆される。

またこの報告とは別に、油体に含まれるタンパク質のMS分析から、油体の主要タンパク質MLDP (Major Lipid Droplet Protein) が見出された<sup>42)</sup>。RNAiによるMLDPの発現抑制株では油体サイズが大きくなったが、TAG蓄積量やその代謝には変化はみられなかった。この知見から、クラミドモナスのMLDPタンパク質は、高等植物の油体の主要構成タンパク質であるオレオシンに相当する機能を担っていることが示唆される。

## 10. クラミドモナスにおける外来遺伝子の発現と問題点

クラミドモナスに外来遺伝子を導入して代謝工学を進めるためには、DNAによる形質転換が必須である。クラミドモナスでは、エレクトロポレーション法、ガラスビーズ法、パーティクルガン法を用いて、核・ミトコンドリア・葉緑体の全てのゲノムの形質転換が可能であり、核、葉緑体でそれぞれ機能するレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ他) や形質転換株の選抜に使用可能な薬剤耐性マーカー遺伝子 (ゼオシン、パロマイシン、ハイグロマイシン、スペクチノマイシンなど) が整備されている。

核ゲノムへの遺伝子導入の場合、導入したDNA断片の全領域が染色体ゲノムに挿入されるとは限らない。実際には、導入されたDNA断片が細胞内のヌクレアーゼによって切断を受け、生じたDNA断片の一部が染色体に複数回挿入される場合や、広範囲なゲノム領域が欠失を起こす場合も知られている。そのため、形質転換株が薬剤耐性を示すにもかかわらず、目的の遺伝子配列が不完全な形で、一部のみ導入されることが頻繁に生じる。またクラミドモナスの遺伝子配列のGC含量は約68%と高いため、外来遺伝子を発現させる場合には使用コドンを変更する必要がある。また、導入した遺伝子が発現しなくなる（サイレンシングを受ける）問題も報告されている<sup>43,44</sup>。最近になって、野生型と比べてサイレンシングが起これにくく、効率的に外来遺伝子を発現させることができる変異株UVM4が報告された<sup>45</sup>。このUVM4株を用いて効率的な組換えタンパク質の生産と分泌系を確立した例が報告されている<sup>46</sup>。しかしUVM4株は細胞壁がないため細胞が壊れやすく、また鞭毛がなく泳がないため、掛け合わせが困難であるという問題点があり、さらに有用な宿主株の構築が待たれる。

## 11. クラミドモナスにおける遺伝子操作技術

人工ヌクレアーゼを用いたZFN (Zing-Finger Nuclease) やTALEN (TAL Effector Nucleases) によるゲノム編集技術が開発され<sup>47, 48</sup>、ゼブラフィッシュ<sup>49,50</sup>、線虫<sup>51</sup>、ラット<sup>52</sup>、シロイヌナズナ<sup>53</sup>など、多様な生物に適用した成功例が報告されている。クラミドモナスにおいてTALENの成功例はまだ報告されていないが、最近になってZFNを用いた方法により、光駆動型チャンネルロドプシンをコードするCOP3の遺伝子ターゲティングの成功例が報告された<sup>54</sup>。しかし、これらの遺伝子破壊技術はまだクラミドモナスでは汎用的ではない。そのため、遺伝子タグライブラリーから目的とする遺伝子の挿入変異株を得る方法がある<sup>55</sup>。この方法では、まず*Streptomyces rimosus*由来のaminoglycoside 3'-phosphotransferase type VIII をコードするAphVIII遺伝子をクラミドモナスに形質転換する。AphVIIIがゲノムDNAにランダムに挿入されたクラミドモナスは、パロマイシンに対して耐性を獲得しコロニーを形成する。この形質転換株を約100,000株取得し、96個ずつにまとめたプールを作成する。プールからゲノムDNAを抽出してPCRの鑄

型とし、ターゲット遺伝子内部に作成したプライマーとAphVIII内部に作成したプライマーとでPCRを行う。これにより目的の遺伝子に挿入をもつ変異株をスクリーニングすることが可能である。実際にこの方法を用いて、52種類の遺伝子の挿入変異株が作出されている<sup>55</sup>。この手法で単離できる変異株は、遺伝子破壊が起こっても従属栄養条件で生育が大きく影響を受けない株に限られることから、生育に必須の遺伝子の破壊株を得ることは困難であると考えられる。そこで、条件依存的に（誘導系で）遺伝子を破壊する系を開発することが求められている。

## 12. 微細藻でのバイオ燃料生産の実現に向けて

以上のように近年、クラミドモナスの遺伝子操作系、炭酸固定を左右するCCMに加えて、TAG生合成および蓄積機構に関する分子機構についての報告が相次いでいる。高等植物や動物、菌類での既知の知見とは異なる、藻類に特有の制御因子、酵素および構成タンパク質も明らかになってきた。今後は、形質転換可能なモデル藻類としての強みを生かして、クラミドモナスで更に詳細な解析が進み、微細藻を原料としたバイオ燃料生産の早期実用化に結びつく新技術が開発されることが期待される。特に脂質蓄積に関する変異体を用いた解析からは、新規な分子機構へのアプローチが可能になることが期待される。また、CCM機構の解明により、低炭素環境下での炭素固定能の増強に関わる因子が同定されれば、交配育種が可能なクラミドモナスの特性を生かして、炭素固定能と脂質蓄積能が共に高い「栽培品種」の確立が期待される。クラミドモナスにより得られた知見は、他のバイオ燃料源として有望な微細藻の育種改良に繋がる嚆矢となると期待される。

## 謝辞

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科で、共に考え実験を遂行してくれた大学院学生・博士研究員の皆さんの協力で進められたものです。記して感謝申し上げます。また、編集・審査いただいた先生に深く感謝致します。

Received November 15, 2012, Accepted November 21, 2012, Published December 31, 2012



## 参考文献

1. Harris, E. H. (2009) The *Chlamydomonas* Sourcebook. Second Edition. Academic Press.
2. 福澤 秀哉・久保 雄昭「クラミドモナス・核ゲノム」(2008) 光合成研究法 67, 587-590. (<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/LTS/index.html>)
3. Badger, M. R., Kaplan, A. and Berry J. A. (1980) Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*: Evidence for a carbon dioxide-concentrating mechanism, *Plant Physiol.* 66, 407-413.
4. Fukuzawa, H., Suzuki, E., Komukai, K. and Miyachi, S. (1992) A gene homologues to chloroplast carbonic anhydrase (IcfA) is essential to photosynthetic carbon fixation by *Synechococcus* PCC7942, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4432-4441.
5. Miura, K., Yamano, T., Yoshioka, S., Kohinata, T., Inoue, Y., Taniguchi, F., Asamizu, E., Nakamura, Y., Tabata, S., Yamato, K.T., Ohyama, K. and Fukuzawa, H. (2004) Expression profiling-based identification of CO<sub>2</sub>-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 135, 1595-1607.
6. Yamano, T., Miura, K. and Fukuzawa, H. (2008) Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 147, 340-354.
7. Burow, M.D., Chen, Z.Y., Mouton, T.M. and Moroney, J.V. (1996) Isolation of cDNA clones of genes induced upon transfer of *Chlamydomonas reinhardtii* cells to low CO<sub>2</sub>, *Plant Mol. Biol.* 31, 443-448.
8. Ohnishi, N., Mukherjee, B., Tsujikawa, T., Yanase, M., Nakano, H., Moroney, J.V. and Fukuzawa, H. (2010) Expression of a low CO<sub>2</sub>-inducible protein, LC11, increases inorganic carbon uptake in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell* 22, 3105-3117.
9. Mariscal, V., Moulin, P., Orsel, M., Miller, A.J., Fernández, E. and Galván, A. (2006) Differential regulation of the *Chlamydomonas* *Nar1* gene family by carbon and nitrogen, *Protist* 157, 421-433.
10. Im, C.S. and Grossman, A.R. (2002) Identification and regulation of high light-induced genes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant J.* 30, 301-313.
11. Duanmu, D., Miller, A. R., Horken, K. M., Weeks, D. P. and Spalding, M. H. (2009) Knockdown of limiting-CO<sub>2</sub>-induced gene *HLA3* decreases HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport and photosynthetic Ci affinity in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5990-5995.
12. Chen, Z. Y., Lavigne, L. L., Mason, C. B., Moroney, J. V. (1997) Cloning and overexpression of two cDNAs encoding the low-CO<sub>2</sub>-inducible chloroplast envelope protein LIP-36 from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 114, 265-273.
13. Pollock, S.V., Prout, D.L., Godfrey, A.C., Lemaire, S.D. and Moroney, J.V. (2004) The *Chlamydomonas reinhardtii* proteins Ccp1 and Ccp2 are required for long-term growth, but are not necessary for efficient photosynthesis, in a low-CO<sub>2</sub> environment, *Plant Mol. Biol.* 56, 125-132.
14. Wang, Y. and Spalding, M.H. (2006) An inorganic carbon transport system responsible for acclimation specific to air levels of CO<sub>2</sub> in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10110-10115.
15. Yamano, T., Tsujikawa, T., Hatano, K., Ozawa, S., Takahashi, Y. and Fukuzawa, H. (2010) Light and low-CO<sub>2</sub>-dependent LCIB-LCIC complex localization in the chloroplast supports the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol.* 51, 1453-1468.
16. Duanmu, D., Wang, Y. and Spalding, M. H. (2009) Thylakoid lumen carbonic anhydrase (CAH3) mutation suppresses air-Dier phenotype of LCIB mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 149, 929-937.
17. Fukuzawa, H., Fujiwara, S., Yamamoto, Y., Dionisio-Sese, M. and Miyachi S. (1990) cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: Regulation by environmental CO<sub>2</sub> concentration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4383-4387.
18. Van, K and Spalding, M. H. (1999) Periplasmic carbonic anhydrase structural gene (*Cah1*) mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 120, 757-764.
19. Karlsson, J., Clarke, A. K., Chen, Z. Y., Huggins, S. Y., Park, Y. I., Husic, H. D., Moroney, J. V. and Samuelsson, G. (1998) A novel alpha-type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO<sub>2</sub>, *EMBO J.* 17, 1208-1216.
20. Mitra, M., Lato, S. M., Ynalvez, R. A., Xiao, Y. and Moroney, J. V. (2004) Identification of a new chloroplast carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 135, 173-182.
21. Fukuzawa, H., Miura, K., Ishizaki, K., Kucho, K., Saito, T., Kohinata, T. and Ohyama, K. (2001) *Ccm1*, a regulatory gene controlling the induction of a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* by sensing CO<sub>2</sub> availability, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5347-5352.
22. Xiang, Y., Zhang, J. and Weeks, D. P. (2001) The *Cia5* gene controls formation of the carbon concentrating mechanisms in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5341-5346.
23. Wang, Y., Sun, Z., Horken, K. M., Im, C. S., Xiang, Y., Grossman, A. R. and Weeks, D. P. (2005) Analysis of CIA5, the master regulator of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*, and its control of gene expression, *Can. J. Bot.* 83, 765-779.
24. Kohinata, T., Nishino, H. and Fukuzawa, H. (2008)

- Significance of zinc in a regulatory protein, CCM1, which regulates the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol.* **49**, 273-283.
25. Yamano, T., Fujita, A. and Fukuzawa, H. (2011) Photosynthetic characteristics of a multicellular green alga *Volvox carteri* in response to external CO<sub>2</sub> levels possibly regulated by CCM1/CIA5 ortholog, *Photosynth. Res.* **109**, 151-159.
  26. Yoshioka, S., Taniguchi, F., Miura, K., Inoue, T., Yamano, T. and Fukuzawa, H. (2004) The novel Myb transcription factor LCR1 regulates the CO<sub>2</sub>-responsive gene *Cah1*, encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell* **16**, 1466-1477.
  27. Fang, W., Si, Y., Douglass, S., Casero, D., Merchant, S.S., Pellegrini, M., Ladunga, I., Liu, P. and Spalding, M.H. (2012) Transcriptome-wide changes in *Chlamydomonas reinhardtii* gene expression regulated by carbon dioxide and the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism regulator CIA5/CCM1, *Plant Cell* **24**, 1876-1893.
  28. Brueggeman, A. J., Gangadharaiyah, D. S., Cserhati, M. F., Casero, D., Weeks, D. P. and Ladunga, I. (2012) Activation of the carbon concentrating mechanism by CO<sub>2</sub> deprivation coincides with massive transcriptional restructuring in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell* **24**, 1860-1875.
  29. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae on World Wide Web URL: [www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf](http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf).
  30. Merchant, S. S., Kropat, J., Liu, B., Shaw, J. and Warakanont, J. (2012) TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation, *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 352-363.
  31. Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J. and Xu, C. (2012) Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol.* **53**, 1380-1390.
  32. Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Moellering, E. R., Zäuner, S., Cornish, A. J., Liu, B., Bullard, B., Sears, B. B., Kuo, M. H., Hegg, E. L., Shachar-Hill, Y., Shiu, S. H. and Benning, C. (2010) Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism, *Plant Physiol.* **154**, 1737-1752.
  33. Fan, J., Andre, C. and Xu, C. (2011) A chloroplast pathway for the *de novo* biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.* **585**, 1985-1991.
  34. Boyle, N. R., Page, M. D., Liu, B., Blaby, I. K., Casero, D., Kropat, J., Cokus, S. J., Hong-Hermesdorf, A., Shaw, J., Karpowicz, S. J., Gallaher, S. D., Johnson, S., Benning, C., Pellegrini, M., Grossman, A. and Merchant, S. S. (2012) Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*, *J Biol. Chem.* **287**, 15811-15825.
  35. Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., and Hu, Q. (2012) Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell* **24**, 3708-3724.
  36. Russa, M. L., Bogen, C., Uhmeyer, A., Doebbe, A., Filippone, E., Kruse, O. and Mussgnug, J. H. (2012) Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biotechnol.* **162**, 13-20.
  37. Li, X., Benning, C. and Kuo, M. H. (2012) Rapid triacylglycerol turnover in *Chlamydomonas reinhardtii* requires a lipase with broad substrate specificity, *Eukaryot. Cell* in press.
  38. Misra, N., Panda, P. K., Parida, B. K. and Mishra, B. K. (2012) Phylogenomic study of lipid genes involved in microalgal biofuel production-candidate gene mining and metabolic pathway analyses, *Evol. Bioinform. Online* **8**, 545-564.
  39. Riekhof, W. R. and Benning, C. (2009) Glycerolipid biosynthesis. In *The Chlamydomonas Sourcebook* vol 2. *Organellar and Metabolic Processes*, Edited by Stern D. Elsevier, 41-68.
  40. Zäuner, S., Jochum, W., Bigorowski, T., and Benning, C. (2012) A cytochrome b5-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot. Cell* **11**, 856-863.
  41. Nguyen, H. M., Baudet, M., Cuiné, S., Adriano, J. M., Barthe, D., Billon, E., Bruley, C., Beisson, F., Peltier, G., Ferro, M. and Li-Beisson, Y. (2011) Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism, *Proteomics* **11**, 4266-4273.
  42. Moellering, E. R., and Benning, C. (2010) RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot. Cell* **9**, 97-106.
  43. Yamasaki, T., Miyasaka, H. and Ohama, T. (2008) Unstable RNAi effects through epigenetic silencing of an inverted repeat transgene in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics* **180**, 1927-1944.
  44. Yamasaki, T. and Ohama, T. (2011) Involvement of Elongin C in the spread of repressive histone modifications, *Plant J.* **65**, 51-61.
  45. Neupert, J., Karcher, D. and Bock, R. (2009) Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes, *Plant J.* **57**, 1140-1150.
  46. Lauersen, K. J., Berger, H., Mussgnug, J. H. and Kruse,

- O. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biotechnol.* in press
47. Porteus, M. H. and Carroll, D. (2005) Gene targeting using zinc finger nucleases, *Nat. Biotechnol.* 23, 967-973.
48. Cermak T, Doyle E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, *Nucleic Acids Res.* 39, e82.
49. Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S. and Zhang, B. (2011) Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs, *Nat. Biotechnol.* 29, 699-700.
50. Sander, J. D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R. T., Joung, J. K. and Yeh, J. R. (2011) Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs, *Nat. Biotechnol.* 29, 697-698.
51. Wood, A. J., Lo, T. W., Zeitler, B., Pickle, C. S., Ralston, E. J., Lee, A. H., Amora, R., Miller, J. C., Leung, E., Meng, X., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D. and Meyer, B. J. (2011) Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs, *Science* 333, 307.
52. Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B.J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A.I., Meng, X., Zhang, L., Gregory, P.D., Anegón, I. and Cost, G.J. (2011) Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs, *Nat. Biotechnol.* 29, 695-696.
53. Osakabe, K., Osakabe, Y. and Toki, S. (2010) Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12034-12039.
54. Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S. and Hegemann, P. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases, *Plant J.* in press
55. Gonzalez-Ballester, D., Pootakham, W., Mus, F., Yang, W., Catalanotti, C., Magneschi, L., de Montaigu, A., Higuera, J. J., Prior, M., Galván, A., Fernandez, E. and Grossman, A. R. (2011) Reverse genetics in *Chlamydomonas*: a platform for isolating insertional mutants, *Plant Methods* 7, 24.
56. Miura, K., Kohinata, T., Yoshioka, S., Ohyama, K. and Fukuzawa, H. (2002) Regulation of a carbon concentrating mechanism through CCM1 in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Funct. Plant Biol.* 29, 211-219.
57. Oyama, Y., Izumo, A., Fujiwara, S., Shimonaga, T., Nakamura, Y., Tsuzuki, M. (2006) Granule-bound starch synthase cDNA in *Chlorella kessleri* 11 h: cloning and regulation of expression by CO<sub>2</sub> concentration, *Planta*. 224, 646-654.
58. Turkina, M. V., Blanco-Rivero, A., Vainonen, J. P., Vener, A. V. and Villarejo, A. (2006) CO<sub>2</sub> limitation induces specific redox-dependent protein phosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proteomics* 6, 2693-2704.
59. Moroney, J. V. and Ynalvez, R. A. (2007) Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot. Cell* 6, 1251-1259.

### Carbon-Concentrating Mechanisms and Lipid Metabolism in a Green Alga, *Chlamydomonas reinhardtii*

Hideya Fukuzawa\*, Takashi Yamano, Masataka Kajikawa  
Graduate School of Biostudies, Kyoto University