

解説

細胞工学による海洋性珪藻無機炭素獲得系およびCO<sub>2</sub>感知系の研究<sup>‡</sup>

関西学院大学 理工学部生命科学科  
 菊谷 早絵、中島 健介、松田 祐介\*

1. はじめに

近年のリモートセンシング技術革新は地球環境科学分野において海洋光合成量の再評価をもたらした。その結果、海洋一次生産量は地球全体の50%に至り、このうちの40%程度、すなわち地球全体の20%は珪藻類によることが推定されている<sup>1,2)</sup>。これは1995年以降の知見であり、その後の海洋性珪藻類

の2種類、*Thalassiosira pseudonana* (中心目) および *Phaeodactylum tricornutum* (羽状目) における全ゲノム配列解読<sup>3,4)</sup>のきっかけとなった。珪藻ゲノムに基づいて現在得られている知見の多くは生物情報学的予測にとどまっているが、遺伝子導入技術の確立やRNA干渉の成功などによって分子レベルでの研究が進みつつある。これは興味深く巨大な二次共生型真核生物

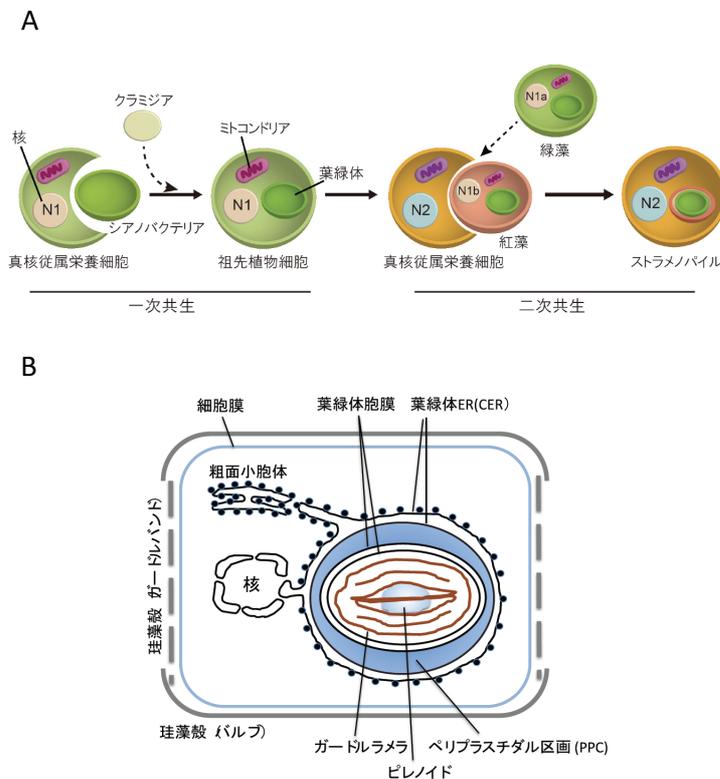


図1 一次共生及び二次共生の過程と珪藻葉緑体構造

A, 共生による葉緑体獲得のスキーム。シアノバクテリアとの共生による真核藻類の成立に続き、別の真核細胞と紅藻との共生によりクロミスタ属二次共生藻が成立した。珪藻のゲノムから、一次共生時にクラミジアゲノムの取り込み、紅藻との二次共生以前における緑藻の一時的取り込みがあったことが強く示唆されている (破線矢印)。B, 現在の珪藻類の葉緑体構造。葉緑体は葉緑体ERと葉緑体包膜の4重膜系で包まれており、葉緑体内にはグラナを形成しない三重チラコイドとなっている。ピレノイドの中心部分を貫通するチラコイドが存在する。

群であるchromalveolataの謎に包まれた基礎生理解明の端緒としても重要な動向と位置付けられるだろう。

珪藻ゲノムの詳細な分析から、珪藻葉緑体で働くタンパク質のうち、核コードのもの75%以上が緑藻型である一方、葉緑体コードのものは紅藻型であることが指摘されている<sup>5)</sup>。このことから、珪藻の二次共生は緑藻の取り込みと葉緑体化に引き続き、紅藻が取り込まれ緑藻型葉緑体にとって代わったことが示唆されている(図1A)<sup>5)</sup>。この複雑な成立過程を経て珪藻類の核ゲノムは、恐らく繊毛虫類と考えられる祖先真核宿主ゲノム<sup>6)</sup>、緑藻および紅藻型の遺伝子とともに、クラミジアやプロテオバクテリア型遺伝子の水平伝播も受けてモザイク化している<sup>5)</sup>。その結果、珪藻類の炭素代謝系は上述した様々な系統の代謝系がオルガネラ間で重複した経路を成し、これらが基質やタンパク質の輸送経路を通じて互いに連携し、既知の真核型代謝には見られないネットワークを構成している可能性が示唆されている<sup>7)</sup>。

本稿では特に、海洋性珪藻類における無機炭素の獲得から固定に至るメカニズ

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成と藻類バイオテクノロジー」

\* 連絡先 E-mail: yusuke@kwansei.ac.jp

ム、およびこれらが二酸化炭素濃度に応答するメカニズムについて、海洋性珪藻の遺伝子導入技術を使った実験的検証に基づいた知見を珪藻類の細胞構造との関連性とともにとめたいと思う。

## 2. 珪藻の進化と葉緑体構造

珪藻類は2億5千万年前、中生代に現れた比較的新しい真核生物と考えられている<sup>8)</sup>。当初中心目だけであったが、白亜紀後期に羽状目が分かれ、漸新世に入ると爆発的に多様化して現在約10万種からなる多様性に富んだグループを形成している<sup>9)</sup>。二次共生の成立時、最終宿主の食胞が葉緑体を囲む液胞になったと考えられる。珪藻が属するクロミスタ属の場合、この液胞は核膜と融合しており、獲得した葉緑体を小胞体内にとどめると同時に、核葉緑体連合を形成している(図1B)<sup>6)</sup>。

さらに図1Bに示すように、この核膜とつながった小胞体表面には電子顕微鏡像から多くのリボゾームが付着しており粗面小胞体となっている。これが珪藻葉緑体の最外膜でありchloroplast ER (CER) と呼ばれる。CER膜とその内側の膜の間の空間はCER lumenと呼び、これはER lumenと連絡していると考えられる。またこの2番目とさらに内側の膜(3番目)との間の空間をperiplastidal compartment (PPC) といい、恐らく葉緑体起源藻の細胞質が引き継がれているものと考えられている。最も内側の2膜(3, 4番目)は紅藻由来の葉緑体包膜である。葉緑体膜のすぐ内側には3層のチラコイド膜が存在し葉緑体全体を覆っている。これをgirdle lamellaという。またその内側のチラコイド膜も3層で存在し、グラナは形成されていない。葉緑体の中心部には巨大なタンパク質凝集体様構造であるピレノイドがあり、その中心部を2層のチラコイド膜が貫通している。近年蛍光タンパク質標識と高性能な蛍光顕微鏡を用いた観察から、しばしば蛍光タンパク質がCER或いはPPCに小胞状の塊のように存在する像が観察されている。この部位はblob-like structure (BLS) と呼ばれており(図には示していない)、葉緑体包膜系マトリクスの一部と考えられているが、この構造的詳細は不明である。

二次共生藻に見られる二次葉緑体の多重包膜系では、核コード葉緑体タンパク質の葉緑体への移行に特殊な移行システムを必要とする。移行プレタンパク質に必要とされるペプチド上のシグナルはN末端に二部

構成となっている。まず15~20残基程度のER移行シグナルとこの切断部位に保存されているASAFAPモチーフが葉緑体トランジットとして働いている<sup>10)</sup>。さらに、細胞質で翻訳されたプレタンパク質を葉緑体内へ輸送する経路は様々な起源からの“寄せ集め”的セットで成立している。すなわち、CER膜の通過にはER Sec系<sup>11)</sup>、次の膜にはERAD-L (ER-associated degradation of luminal proteins)<sup>12)</sup>、葉緑体包膜の外膜の通過には、バクテリアOmp85および葉緑体TOC75複合体が<sup>13)</sup>、関わっていることが示されている。しかし最内膜の通過に関わる分子については不明である。

## 3. 珪藻のCO<sub>2</sub>獲得機構とCO<sub>2</sub>固定

水中の光合成では、CO<sub>2</sub>存在比と拡散速度の小ささから、無機炭素を細胞に取り込む系が極めて重要である。特に海洋のような高塩、アルカリ環境下ではその重要度はさらに高くなる。珪藻類は、シアノバクテリアや緑藻で知られているような、CO<sub>2</sub>に対する高親和性光合成をおこなう<sup>14)</sup>。これまでの生理学的解析から、珪藻類がCO<sub>2</sub>とHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の両方を取り込み光合成の基質としていることが分かっている<sup>15)</sup>。このため、珪藻類もCO<sub>2</sub>濃縮機構(CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism: CCM)を有するものと考えられる。一方、海洋性中心目珪藻 *Thalassiosira weissflogii* をもちいた<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>パルスチェース実験で、3-PGA増加に先立ってC<sub>4</sub>化合物レベルの一過的上昇がみられることから、珪藻類がC<sub>4</sub>型のCCMを有している可能性も示唆されている<sup>16)</sup>。しかしゲノム株を含めた様々な海洋性珪藻ではC<sub>3</sub>型光合成を示すパルスチェース実験結果が報告されており<sup>17)</sup>、C<sub>4</sub>型CCMの珪藻における一般的存在には疑問がもたれている。

C<sub>4</sub>化合物を介さず無機炭素をそのまま濃縮するタイプのCCM(しばしばbiophysical CCMとしてC<sub>4</sub>型biochemical CCMと区別される)は緑藻やシアノバクテリアの先例から無機炭素輸送体と溜め込んだ無機炭素のflux制御およびその後の効率的な固定の仕組みによって成り立っていると考えられる。分子機構が最も良く調べられているβ型シアノバクテリアにおいては、3種の細胞膜型HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体およびチラコイド膜上のCO<sub>2</sub> → HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>変換体など、細胞外の無機炭素濃縮にかかわる分子機構、およびCCMの収斂点となる

カルボキシゾームの機能が明らかになっている<sup>18)</sup>。一方、緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*においても細胞膜無機炭素輸送体タンパク質LCI1が同定され、さらにピレノイド局在タンパク質 (LCIB/C) の機能、およびチラコイドルーメン局在 CA (CAH3) のCCMにおける機能が示されている<sup>19,20)</sup>。しかしながら、真核藻類CCMの分子メカニズムは不明な点が多い。

海洋性珪藻の CCM は *P. tricornutum* で最もよく研究されている。珪藻類は葉緑体内にピレノイドを有し、CCMの基本的機構は他の微細藻類と共通している点が多いものと考えられる。しかしながらシアノバクテリアや *C. reinhardtii* で機能同定されたタンパク質は、ゲノム情報を見る限り珪藻で保存されているものが少なく、詳細な分子機構は全く分かっていない。わずかに知られている共通因子として現在 *C. reinhardtii* のピレノイド周辺部に局在して大気レベルCO<sub>2</sub>環境下においてピレノイド内のCO<sub>2</sub>濃度を維持すると考えられているLCIB/Cホモログが珪藻ゲノムにも存在していることが知られている<sup>20)</sup>。

Biophysical CCMに必須な特徴として、RubisCO近傍にCAが局在することが提唱されており<sup>21)</sup>、シアノバクテリアや緑藻はこれに当てはまることが示されている。珪藻ゲノムには *P. tricornutum* および *T. pseudonana* でそれぞれ10および13種類のCA候補タンパク質をコードした遺伝子が存在する。このうち *P. tricornutum* のCA候補タンパク質の局在はほぼ網羅さ

れている<sup>22)</sup> (表1)。興味深いことに、 $\alpha$ 型は葉緑体包膜系、 $\beta$ 型はピレノイド、 $\gamma$ 型はミトコンドリアと、CAのサブタイプごとにその局在部位が異なっており、これら遺伝子が珪藻の細胞共生進化の過程でそれぞれの起源細胞から移ってきたものであることを強く示唆している。

ピレノイドには2つの $\beta$ -CAが存在し (PtCA1, PtCA2)、すでにCA活性も確認されている<sup>23)</sup>。これら2つのCAはそのN末端プレ配列にERシグナルおよびASAFAPモチーフをもち、またC末端側の両親媒性ヘリックス構造がピレノイドへの局在に重要な役割を果たしていることが分かっている<sup>24)</sup>。珪藻ピレノイドの構成因子は他の藻類と同様網羅されていない。しかしこれまでに、*P. tricornutum*において、上記2つのPtCAの他にRubisCO、および2つのfructose-1,6-bisphosphate aldolases (FBAC1, FBAC5) がピレノイドに局在していることが報告されている<sup>25,26)</sup>。PtCAsの局在はピレノイドの一部に偏っており、ピレノイド構造が均一ではないことが強く示唆されている<sup>22)</sup>。高等植物の葉緑体FBAはカルビン回路律速要因の一つであり、またCAはRubisCOカルボキシレーション反応活性化や基質供給に重要な役割を負うと考えられる。これら酵素の局在は珪藻のピレノイドがCO<sub>2</sub>固定化反応およびその周辺の炭素代謝の制御に中心的な役割を果たしている場であることを強く示唆しており、一次生産性の鍵となる分子機構の一つとして、今後ピレノイド構成因子の網羅と機能解析が望まれる。

高等植物や緑藻の葉緑体内代謝系は酸化還元状態によって強い制御を受けている。この調節の多くはフェレドキシン(Fd) - チオレドキシン(Trx)系を介しており、その標的はカルビン回路をはじめ、窒素同化、脂肪酸合成、デンプン合成、および翻訳など多岐にわたる。Trxには *f, h, m, o, x, y, z* のサブタイプが知られているが、この中で *f, m, x, y, z* が葉緑体型である。葉緑体Trxの標的タンパク質は、直接的な結合解析の結果、多くの機能未知タンパクを含めて300を超えることが分かっており、極めて広範な葉緑体代謝制御に働いていることが窺える<sup>27)</sup>。一方珪藻では対照的に、*f, m, y* 型 Trx が FTR (Fd-Trx reductase) とともに葉緑体に局在しているが、カルビン回路の主な調節経路である phosphoribulokinase や glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase は酸化還元調節されておらず、

表1 *Phaeodactylum tricornutum* の CA 候補タンパク質とその局在

Name	Class	Localization
CA-I	$\alpha$	PPC
CA-II	$\alpha$	PPC
CA-III	$\alpha$	CER
CA-IV (PtCA1)	$\beta$	ピレノイド
CA-V (PtCA2)	$\beta$	ピレノイド
CA-VI	$\alpha$	CER
CA-VII	$\alpha$	CER
CA-VIII	$\gamma$	ミトコンドリア
CA-IX	$\gamma$	N.D.
CA-X	$\zeta$	N.D.

PPC: periplastidal compartment, CER: chloroplastic endoplasmic reticulum, N.D.: not detected

sedoheptulose-1,7-bisphosphatase、およびRubisCO activaseはゲノム上に存在していない<sup>28)</sup>。例外としてfructose-1,6-bisphosphataseおよびphosphoglycerate kinaseは酸化還元制御を受けていることが示唆されているが、珪藻カルビン回路における酸化還元制御の役割は緑色植物と比べて小さいものと考えられている。

一方、我々の最近の研究で、珪藻葉緑体型TrxmおよびPtCA1およびPtCA2を標的として、分子内ジスルフィドの還元によって活性化していることが示された(図2A, B)<sup>29)</sup>。PtCA活性を基準に測定した酸化還元電位はどちらのCAもおよそ-370 mVであり、CAの電子供与体としては専らFdが機能していることが強く示唆されている。これは海洋性珪藻においてピレノイド内の代謝がFd/Trx系による酸化還元制御を受けていることを示している(図2C)。またこれらCAは大気レベル以上の酸素分圧下で効果的に不活性化されることが示され<sup>29)</sup>、PtCAsは光化学系IIで生じる酸素により酸化され、光化学系Iから電子を受け取ったFdにより還元されるというように、その活性が光化学系I, IIのエネルギー状態に応じて調節されていることを示している(図2C)。珪藻RubisCOは紅藻型のタイプIであり、緑色型のRubisCO活性化酵素はゲノム上に存在しない。PtCAの機能はCCMの最終段階でRubisCOにCO<sub>2</sub>を供給するものと予想されるが、この機能とともに珪藻ピレノイドにおけるRubisCO活性化機構との機能連携に興味を持たれるところである。

海洋性珪藻が細胞外からCO<sub>2</sub>およびHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を取り込み葉緑体に効果的に送り届ける分子メカニズムは不明であるが、恐らくこのヒントとなる知見として、5つのα型CA候補タンパク質がすべて葉緑体包膜系に局在していることがあげられる。珪藻類の4重包膜は無機炭素通過の際に大きな障壁となるものと考えられ、恐らくチャンネルや輸送体が個々の膜に配置していると考えられるが、CAによる膜間マトリックスにおけるCO<sub>2</sub>とHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の迅速な変換は無機炭素流路の調節に極めて重要な役割を負うと考えられる。一方膜輸送体の候補タンパク質をコードした遺伝子も数多く見つかっており、その多くが動物などで報告例が多い、SLC (solute carrier protein) 型のものである。特にヒトSLC4および26は、ナトリウム依存型HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体であることが知られているが、これらのホモログ

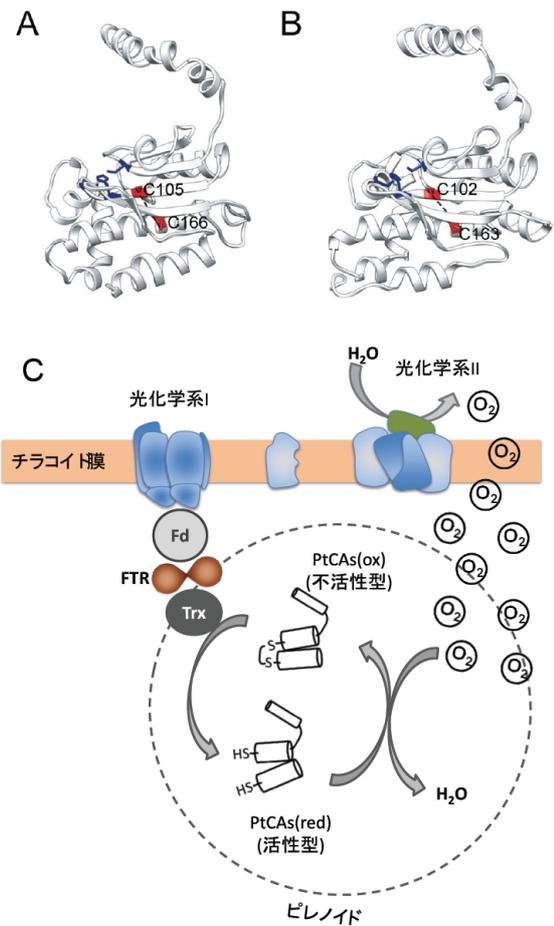


図2 PtCA1及びPtCA2の構造と酸化還元調節モデル

A, B, 海洋性珪藻 *P. tricornutum* ピレノイド型 CA、PtCA1 および PtCA2 の構造モデルと、分子内ジスルフィド形成による酵素不活性化に働くシステイン残基(赤色)。参考文献29より抜粋。C, 葉緑体内で予想されるPtCA1,2酸化還元制御モデル。Fd: フェレドキシン、FTR: フェレドキシン-チオレドキシン レダクターゼ、Trx: チオレドキシン

が多数珪藻ゲノム上に見つかっている。このうちSLC4型の一つ(PtSLC4-2)が *P. tricornutum* の細胞膜に局在するナトリウム依存型HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体であることが我々の最近の研究から分かっている。

これまで述べた珪藻のCAおよびSLC型HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体のうち、ピレノイド型の2つのPtCAsおよびPtSLC4-2および他2つのPtSLC4が低CO<sub>2</sub>濃度環境下で特異的に発現が高くなるCO<sub>2</sub>応答性タンパク質であり、CO<sub>2</sub>欠乏環境下で無機炭素取り込みとRubisCOへの供給能力を高めることが強く示唆されている。一方で、葉緑体包膜に局在するα型CAはCO<sub>2</sub>濃度にかかわらず発現していることが分かっている。

#### 4. CO<sub>2</sub>センシングと転写応答

ここまで述べた珪藻のCCMにかかわると考えられる因子の多くが転写レベルでCO<sub>2</sub>濃度の変動に応答しており、一次生産の駆動力となる仕組みがCO<sub>2</sub>濃度変動に応答する分子機構として、および環境微生物のCO<sub>2</sub>変動への応答分子機構を表すものとして興味深い現象である。我々のグループではこれまでに、ピレノイド型のPtCA1およびPtCA2の転写応答系をモデルとして、この問題に取り組んできた。

PtCA1遺伝子である*ptca1*は5%CO<sub>2</sub>を混入した高CO<sub>2</sub>大気条件ではほとんど転写されず、通常の大気レベルCO<sub>2</sub>濃度に移すと、50倍程度までその転写量が増加する<sup>30)</sup>。なお、転写抑制にかかわるCO<sub>2</sub>濃度は特に5%である必要はなく、恐らく大気レベルの数倍で十分な抑制効果があるものと考えられるが、細胞が比較的高濃度である培養系では、珪藻細胞が活発に無機炭素を使うため、必要十分な“微高濃度”CO<sub>2</sub>環境を維持するのはかなり難しい。このため我々は通常の順化実験に5%CO<sub>2</sub>を用いている。これまでに珪藻の高親和性光合成のレベルの変動を培養液中の無機炭素濃度を精密に調節して調べた結果、培養液中のCO<sub>2</sub>濃度がCCMレベルの主要決定因子であることが*P. tricornutum*で強く示唆されている<sup>14)</sup>。興味深いことに低CO<sub>2</sub>順化時の*ptca1*の転写（あくまでmRNA蓄積量として推定した値）は、光が存在しない場合50%程度に低下し、またcAMPアナログ

であるジブチリルcAMP (dbcAMP) (0.5 mM程度) 処理が低CO<sub>2</sub>環境下で効果的に高CO<sub>2</sub>状態を模倣し、*ptca1*転写を抑制することが示されている<sup>30,31)</sup>。これらの事実から、*ptca1*やその他のCCM因子の転写制御には光とCO<sub>2</sub>のクロストークおよび二次メッセンジャーとしてcAMPがかかわっていることが強く示唆される。前者はシアノバクテリアや緑藻などでも観察されるCCM制御に一般的な特徴と言えるが、一方、cAMPのCCM制御への関与はシアノバクテリア、緑藻で認

められておらず、動物細胞に近い最終宿主と共生して成立したと考えられるクロミスタ属など、二次共生藻に特有の現象である可能性が強い。

我々は*ptca1*遺伝子のプロモーター領域 (P*ptca1*) を約1.3 kbpまで単離し、これに大腸菌βグルクロニダーゼ (GUS) をコードする*uidA*遺伝子を連結したレポーター遺伝子を作製、*P. tricornutum* 細胞に導入することにより、プロモーター機能の解析を行った。当初、プロモーター配列には哺乳類や線虫で報告されているcAMP応答性配列やP300結合配列およびSKN-1結合配列など、cAMP関連配列が複数見つかりその機能が注目された。しかし5'トランケーション、リンカーキャン、および一塩基置換による一連のシスエレメント絞り込み実験を行った結果、*ptca1*転写開始点から-90~-38の領域にTGACGT/Cのコンセンサス配列が3つ互いに逆方向に配置した領域がCO<sub>2</sub>とcAMPに応答するための必須配列であることが示され、CO<sub>2</sub>/cAMP responsive element (CCRE) 1~3 と名付けた(図3A)<sup>32)</sup>。このうち中心にあるCCRE2が唯一他の2つに対して逆向きに配置するエレメントであるが、この配列を削除するだけで高CO<sub>2</sub>での転写抑制が消失するのに対して、CCRE1および3はそれぞれが削除されてもCO<sub>2</sub>応答性に影響しないことが分かった。さらにCCRE2もCCRE1或いは3が無い場合はCO<sub>2</sub>応答性を失うことから、これらのエレメントはCCRE2を中心として、

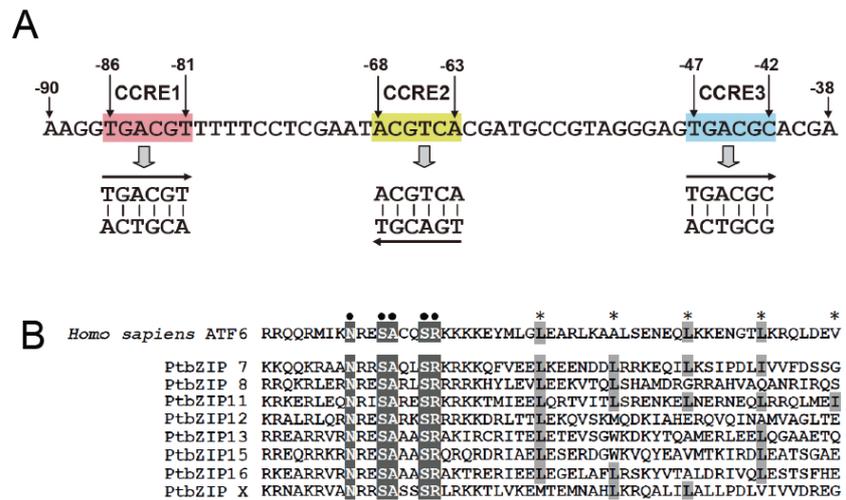


図3 *ptca1* プロモーターコア領域の構造と PtbZIPs

A, *ptca1*転写開始点より、上流90 bpまでのコア調節領域の配列。CCRE2は他の2つのCCRE配列に対して逆方向に配置している。B, CCRE配列を標的とすることが考えられるヒトATF6型の珪藻bZIP転写因子候補配列。bZIP領域部のみをアライメントしている。●はCCRE結合部位。\*はロイシンジッパー領域を示す。ただし、ロイシン残基が不十分なものも含めている。参考文献32より抜粋。

CCRE1/2或いはCCRE2/3の組み合わせで機能することが強く示唆されている。これらの組み合わせはともに配列が相補的であり(図3A)、転写制御の際にステムループ構造などの立体構造を形成して機能する可能性が考えられる<sup>32)</sup>。

CCREは哺乳類で良く知られているcAMP応答型のbZIP転写因子であるATF6 (Activating Transcription Factor6)の典型的な標的配列であることからATF6型のDNA結合領域を有するbZIP遺伝子候補を*P. tricornutum*ゲノムから探したところ、現在までに8つの遺伝子を見出している(PtbZIP7,8,11,12,13,15,16,x) (図3B)。これらの遺伝子を大腸菌で強制発現させ、*in vitro*でCCRE配列との結合を観察した結果、あくまで現時点での結論としてPtbZIP11だけがCCREの特異的結合因子であることが分かっている<sup>32)</sup>。

PtbZIP11よりさらに上流のシグナル伝達系、およびCO<sub>2</sub>センシング系はcAMPの関与という事実以外にわかっていることはほとんどない。ただし、シアノバクテリアから哺乳類まで保存されている可溶性アデニル酸シクラーゼ (sAC) が進化の過程で保存されたCO<sub>2</sub>センサーであることが報告されている<sup>33)</sup>。珪藻の2種のゲノムにおいても、sAC候補遺伝子は存在し、これまでCO<sub>2</sub>或いはHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>をエフェクターとする場合に保存されているアミノ酸を有していることが分かっている<sup>34)</sup>。興味深いことに、珪藻の膜貫通型AC (tmAC) 候補の中にも、無機炭素をエフェクターとして活性調節される可能性のある一次構造を有するものがある。また動物などで良く知られたcAMPシグナリング系を参考にすると、これら因子の下流シグナル伝達を構成する可能性のあるタンパク質をコードした遺伝子候補も一部を除いて珪藻ゲノムに発見されている(図3C)。これらのCO<sub>2</sub>応答における機能解析が待たれるところである。

## 5. おわりに

今回我々は珪藻の細胞の成り立ちと珪藻の海水中のCO<sub>2</sub>固定に大きな障壁となる無機炭素獲得系について、現在得られている分子知見を概観した。細胞膜HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送体、無機炭素流路調整を行うと考えられるCAの局在、およびピレノイド機能の一端が分子レベルで明らかになりつつある。しかし、細胞外からCO<sub>2</sub>を取り込むシステム、複雑に重層した葉緑体包膜系の無機炭素輸送システム、ピレノイド因子の詳細と機

能、C<sub>4</sub>代謝系の関与、およびこれらを制御するCO<sub>2</sub>応答機構など、CCMだけを例にとっても今後明らかにすべき問題は多い。

近年珪藻には、その高い油脂やテルペンの生産能力から、バイオ燃料源として工業利用する方向性へも注目が集まっている。一方珪藻類では、いくつかのプロモーター、選抜マーカー系の利用やRNA干渉などが現在可能になったものの、圧倒的な高発現系、性周期の制御、相同組換えなど、重要な遺伝子・細胞工学実験技術は未熟であり、これら技術を利用した分子研究は基礎研究の緒についたばかりの感がある。CO<sub>2</sub>固定についても、カルビン回路や光化学系の制御機構など、一次生産の中心となる代謝系は、ゲノム情報から珪藻類に特有の仕組みが多くあることが少なからず予測されているが、その詳細はまだ確認されていない。実験技術と基礎知見蓄積の今後の加速的な発展が望まれる。

## 謝辞

ピレノイド型β-CA (PtCA1, PtCA2) の酸化還元制御機構の解明については東京工業大学の久堀徹教授およびコンスタンツ大学の Peter G. Kroth 教授のご協力を頂きました。また、PtCA1のピレノイド局在についてはパリ高等師範学校の Chris Bowler 教授のご協力を頂きました。心より感謝を申し上げます。またこれまで研究室に在籍された院生、学生、研究員、研究補助員の方々に感謝申し上げます。また、無機炭素輸送体の研究内容については現在論文を投稿中であるため、詳細を書けなかったことをお詫び申し上げます。最後に本執筆の機会を頂きました皆川純教授に感謝申し上げます。

Received October 30, 2012, Accepted November 15, 2012,  
Published December 31, 2012

## 参考文献

1. Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. and Falkowski, P (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components, *Science* 281, 237-240.
2. Falkowski, P., Scholes, R. J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Hogbeg, P., Linder, S., Mackenzie, F. T., Moore III, B., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V.

- and Steffen, W. (2000) The global carbon cycle: a test of our knowledge of Earth as a system, *Science* 290, 291-296.
3. Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M.Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B.D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kröger, N., Lau, W. W., Lane, T. W., Larimer, F. W., Lippmeier, J. C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M. S., Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P. M., Rynearson, T. A., Saito, M. A., Schwartz, D. C., Thammatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F. P. and Rokhsar, D. S. (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism, *Science* 306, 79–86.
  4. Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otiillar, R. P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J. A., Brownlee, C., Cadoret, J. P., Chiovitti, A., Choi, C. J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J. C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman, M. J., Jenkins, B. D., Jiroutova, K., Jorgensen, R. E., Joubert, Y., Kaplan, A., Kröger, N., Kroth, P. G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin-Jezequel, V., Lopez, P. J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L. K., Montsant, A., Oudot-Le Secq, M. P., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M. S., Petit, J. L., Porcel, B. M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Rynearson, T. A., Schmutz, J., Shapiro, H., Siaut, M., Stanley, M., Sussman, M. R., Taylor, A. R., Vardi, A., von Dassow, P., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L. S., Rokhsar, D. S., Weissenbach, J., Armbrust, E. V., Green, B. R., Van de Peer, Y. and Grigoriev, I. V. (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes, *Nature* 456, 239-244.
  5. Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U.G., Bowler, C., Valentin, K. and Bhattacharya, D. (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms, *Science* 324, 1724-1726.
  6. Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution, *Trends Plant Sci.* 5, 174-182.
  7. Prihoda, J., Tanaka, A., de Paula, W. B. M., Allen, J. F., Tirichine, L. and Bowler, C. (2012) Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms, *J. Exp. Bot.* 63, 1543-1557.
  8. Sorhannus, U. (2007) A nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA timescale for diatom evolution, *Mar. Micropaleontol.* 65, 1–12.
  9. Sims, P. A., Mann, D. G. and Medlin, L. K. (2006) Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data, *Phycologia* 4, 361–402.
  10. Kilian, O. and Kroth, P. G. (2004) Presequence acquisition during secondary endocytobiosis and the possible role of introns, *J. Mol. Evol.* 58, 712–721.
  11. Lang, M., Apt, K. E. and Kroth, P. G. (1998) Protein transport into “complex” diatom plastids utilizes two different targeting signals, *J. Biol. Chem.* 273, 30973-30978.
  12. Sommer, M. S., Gould, S. B., Lehmann, P., Gruber, A., Przyborski, J. M. and Maier, U. G. (2007) Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol. Biol. Evol.* 24, 918-928.
  13. Bullmann, L., Haarmann, R., Mirus, O., Bredemeler, R., Hempel, F., Maier, U. G. and Schleiff, E. (2010) Filling the gap, evolutionarily conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. *J. Biol. Chem.* 285, 6848-6856.
  14. Matsuda, Y., Hara, T. and Colman, B. (2001) Regulation of the induction of bicarbonate uptake by dissolved CO<sub>2</sub> in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant Cell Environ.* 24, 611-620.
  15. Burkhardt, S., Amoroso, G., Riebesell, U. and Sültemeyer, D. (2001) CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in marine diatoms acclimated to different CO<sub>2</sub> concentrations, *Limnol. Oceanogr.* 46, 1378-1391.
  16. Reinfelder, J.R., Kraepiel, A.M.L. and Morel, F.M.M. (2000) Unicellular C<sub>4</sub> photosynthesis in a marine diatom, *Nature* 407, 996-999.
  17. Roberts, K., Granum, E., Leegood, R.C. and Raven, J. A. (2007) C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic, not environmental, control, *Plant Physiol.* 145, 230-235.
  18. Price, G. D., Badger, M. R., Woodger, F. J., Long, B. M. (2008) Advances in understanding the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants, *J. Exp. Bot.* 59, 1441-1461.
  19. Spalding, M. H., Spreitzer, R. J. and Ogren, W. L. (1983) Carbonic anhydrase-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* requires elevated carbon-dioxide concentration for photoautotrophic growth, *Plant Physiol.* 73, 268-272.
  20. Yamano, T., Tsujikawa, T., Hatano, K., Ozawa, S. I., 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.
  21. Pronina, N. A. and Semenenko, V. E. (1984) Localization of membrane bound and soluble forms of carbonic anhydrase in the *Chlorella* cell, *Fiziol. Rast. (Moscow)* 31, 241–251.
  22. Tachibana, M., Allen, A. E., Kikutani, S., Endo, Y., Bowler, C. and Matsuda, Y. (2011) Localization of putative carbonic anhydrases in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricorutum* and *Thalassiosira pseudonana*. *Photosynth. Res.* 109, 205-221.
  23. Satoh, D., Hiraoka, Y., Colman, B. and Matsuda, Y. (2001) Physiological and molecular biological characterization of intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant Physiol.* 126, 1459-1470.
  24. Kitao, Y. and Matsuda, Y. (2009) Formation of macromolecular complexes of carbonic anhydrases in the chloroplast of a marine diatom by the action of the C-terminal helix, *Biochem. J.* 419, 681-688.

25. Jenks, A. and Gibbs, S. P. (2000) Immunolocalization and distribution of form II Rubisco in the pyrenoid and chloroplast stroma of *Amphidinium carterae* and form I Rubisco in the symbiont-derived plastids of *Perinidium foliaceum* (Dinophyceae), *J. Phycol.* 36, 127-138.
26. Allen, A. E., Moustafa, A., Montsant, A., Eckert, A., Kroth, P. G. and Bowler, C. (2012) Evolution and functional diversification of fructose biphosphate aldolase genes in photosynthetic marine diatoms, *Mol. Biol. Evol.* 29, 367-379.
27. Lemaire, S. D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V. and Issakidis-Bourguet, E. (2007) Thioredoxins in chloroplasts, *Curr. Genet.* 51, 343-365.
28. Weber, T., Gruber, A. and Kroth, P. G. (2009) The presence and localization of thioredoxins in diatoms, unicellular algae of secondary endosymbiotic origin, *Mol. Plant* 2, 468-477.
29. Kikutani, S., Tanaka, R., Yamazaki, Y., Hara, S., Hisabori, T., Kroth, P. G. and Matsuda, Y. (2012) Redox regulation of carbonic anhydrases via thioredoxin in the chloroplast of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *J. Biol. Chem.* 287, 20689-20700.
30. Harada, H., Nakatsuma, D., Ishida, M. and Matsuda, Y. (2005) Regulation of the expression of intracellular  $\beta$ -carbonic anhydrase in response to CO<sub>2</sub> and light in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant Physiol.* 139, 1041-1050.
31. Harada, H., Nakajima, K., Sakaue, K. and Matsuda, Y. (2006) CO<sub>2</sub> sensing at ocean surface mediated by cAMP in a marine diatom, *Plant Physiol.* 142, 1318-1328.
32. Ohno, N., Inoue, T., Yamashiki, R., Nakajima, K., Kitahara, Y., Ishibashi, M. and Matsuda, Y. (2012) CO<sub>2</sub>-cAMP-responsive cis-elements targeted by a transcription factor with CREB/ATF-like basic zipper domain in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant Physiol.* 158, 499-513.
33. Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R. and Buck, J. (2000) Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor, *Science* 289, 625-628.
34. Matsuda, Y., Nakajima, K. and Tachibana, M. (2011) Recent progresses on the genetic basis of the regulation of CO<sub>2</sub> acquisition systems in response to CO<sub>2</sub> concentration, *Photosynth. Res.* 109, 191-203.

## Studies on CO<sub>2</sub> Acquisition and CO<sub>2</sub> Sensing Mechanisms in Marine Diatoms using Cell Engineering Approaches

Sae Kikutani, Kensuke Nakajima, Yusuke Matsuda\*

Department of Bioscience, Research Center for Environmental Bioscience, School of Science and Technology,  
Kwansei Gakuin University