光合成研究

第22巻　第 3号（通巻65号）2012年12月

NEWS LETTER Vol. 22 NO. 3 December 2012
THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

光合成学会会長を終えるにあたって
池内　昌彦（東大）　155

研究紹介　単細胞紅藻チノリモ*(Porphyridium purpureum)*の葉緑体ゲノム解析
田島　直幸（東大、JST）、佐藤　修正（東医歯大）、丸山　史人（東工大）、
黒川　顕（東工大、JST）、太田　啓之（東工大、JST）、
田畑　哲之（かずさDNA研）、関根　康介（東大）、森山　崇（東大、JST）、
佐藤　直樹（東大、JST）　156

研究紹介　シアノバクテリアにおいてチオレドキシンの転写を制御するレドックス応答性転写因子*RexT*
得平　茂樹（中央大、さきがけ）　160

解説特集「光合成と藻類バイオテクノロジー」　165

序文
皆川　純（基生研）　166

解説　単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における窒素同化系とその制御
田中　寛、今村　壮輔（東工大）　167

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
福澤　秀哉、山野　隆志、梶川　昌孝（京大）　174

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_2感知系の研究
菊谷　早絵、中島　健介、松田　祐介（関学大）　185

報告記事　若手の会活動報告
～第七回セミナー開催、サイエンスアゴラ2012出展～
成川　礼（東大）　193

報告記事　日本光合成学会若手の会第7回セミナーに参加して
平出　優人（名大）　194

報告記事　サイエンスアゴラ2012
「世界を支える光合成　～植物のチカラを感じてみよう～」 出展報告
浅井　智広（名大）、川上　恵典（大阪市大）、辻　敬典（筑波大）、
大西　紀和（基生研）、岡島　公司（大阪府大）、成川　礼（東大）　196

事務局からのお知らせ　200

日本光合成学会会員入会申込書　201

日本光合成学会会則　202

幹事会名簿　204

編集後記　205

記事募集　206

賛助法人会員広告

光合成学会会長を終えるにあたって

日本光合成学会会長
池内　昌彦（東京大学 大学院 総合文化研究科）

この12月で、会長の任期満了をなんとか迎えることになりました。伊藤会長から引き継いで4年間、たいしたこともできませんでしたが、学会も光合成の研究分野も、またこれらを取り巻く社会情勢も大きく変化しました。とくに伊藤会長が提案された学会への移行が2009年6月に実現しました。エネルギー・食糧問題と地球温暖化問題は、生物や化学分野における光合成研究の応用にますます大きな期待をもたらすようになってきました。さらに昨年の3.11の東北大地震の影響もあり、原子力エネルギーに変わりうる光合成生産によるバイオエネルギーのできるだけ早い実用化が要請されています。そのため、光合成の原理や改良、応用に関連した大型の研究費や研究支援なども、化学と生物学分野の両方で拡がっています。

思い返すと、当学会の前身は日本光合成研究会（宮地会長）として1979年に設立されました。1991年、西村会長が会報「光合成研究」を発刊され、以後、会員間の情報交換やシンポジウムの開催などをよりどころに発展してきました。さらに村田会長（2001~2004）のとき、組織や活動方針を見直し、伊藤会長（2005~2008）は学会への移行を提案されました。これを受けた「日本光合成学会」への移行は、誠に時宜を得たものと考えています。会長としては、光合成の物理・化学分野と生物学分野が両輪で牽引し、研究の推進と社会への貢献を果たしていくことを希望しています。

学会活動としては、学会への移行を契機に、より会員の研究発表の場になるように、年会を見直してきました。以前は、植物生理学会や植物学会、生化学会などで十分多くの光合成研究者が集まっていましたが、研究分野が広くなり、集中して議論することが難しくなってきました。当然ですが日本光合成学会がもっとも分野を集約できる場です。そのため、それまではどちらかというとシンポジウム主体であった年会を、徐々に会員の研究発表と議論の場に十分な時間が取れるように変えていきました。

学会活動としては、2010年3月の「光合成研究法」の発刊を契機に、若い会員の増加を実現しました。その後は、鹿内事務局長の主導で、会員資格の見直しを行い、学会員を把握できるようになりました。

会報については、増田編集長を初めとする編集陣の多大なバックアップで非常に充実した記事を届けられたと思います。シンポジウムを受けた特集記事やポスター賞の受賞者による解説など、幅広い分野から興味深い解説論文を、多数寄稿していただき、カラーできれいな図版とともに楽しんでいただけたと思います。しかし、このため増田編集長には過大な編集作業をお願いすることになり、最後の最後までご迷惑をおかけしたことは非常に申し訳なく思っています。

また、成川さんらによる若手の会が2009年に発足し、独自の発表会を開き、若手間の交流を促進するともに、この2年間はサイエンスアゴラにも若手主体で出展し光合成分野の多大な広報活動をしてくださいました。

一方、村田会長以来続いてきたワークショップのような活動は、ニーズがあるにもかかわらずほとんど対応できませんでした。今後はどのような活動が可能か、次期の田中会長にご検討をお願いし、この分野と学会が、会員の皆様とともにますます発展していくことを祈願しています。

研究紹介

単細胞紅藻チノリモ(*Porphyridium purpureum*)の葉緑体ゲノム解析§

[1]東京大学 大学院 総合文化研究科
[2]JST CREST
[3]かずさDNA研究所
[4]東京医科歯科大学 大学院 医歯学総合研究科
[5]東京工業大学 大学院 生命理工学研究科
[6]東京工業大学 バイオ研究支援総合センター
田島 直幸[1,2,*]、佐藤 修正[3]、丸山 史人[4]、黒川 顕[2,5]、太田 啓之[2,6]、
田畑 哲之[3]、関根 康介[1]、森山 崇[1,2]、佐藤 直樹[1,2]

1. はじめに

一次共生植物は緑色植物、紅藻、灰色藻の3種類に分けられる。紅藻はイデユココメ亜門と紅藻植物亜門の2つに分けられる。さらに、イデユココメ亜門にはイデユココメ綱があり、紅藻植物亜門は真正紅藻綱、ウシケノリ綱、ロデラ綱、チノリモ綱、ベニミドロ綱、オオイシソウ綱の6綱に分けられる[1)]。しかし、既に葉緑体ゲノムが解読された紅藻は、真正紅藻綱、ウシケノリ綱、イデユココメ綱の3綱に属する5種のみであり、紅藻類相互の系統関係も未解明のままである。

チノリモ(*Porphyridium purpureum*)は、葉緑体ゲノムが未解読であるチノリモ綱に属する海洋性単細胞紅藻である。私達は454 GS FLXシーケンサーを用いて、国立環境研究所に保存されている*P. purpureum* NIES 2140株の葉緑体ゲノムを解読した。また、必要に応じてSanger法も利用した。本稿ではチノリモの葉緑体ゲノムの全体構成、タンパク質遺伝子、特徴的なrRNAオペロン構造について紹介する。

表1　紅藻の葉緑体ゲノムの比較

種名	タンパク質遺伝子数	総塩基対数 (bp)	GC含量 (%)
Porphyridium purpureum (チノリモ綱)	224	217,694	30.3
Gracilaria tenuistipitata var. liui (真正紅藻綱)	204	183,883	29.2
Porphyra purpurea (ウシケノリ綱)	209	191,028	33.0
Porphyra yezoensis (ウシケノリ綱)	209	191,952	33.1
Cyanidioschyzon merolae (イデユココメ綱)	207	149,987	37.6
Cyanidium caldarium (イデユココメ綱)	199	164,921	32.7

2. チノリモの葉緑体ゲノムの全体構成

チノリモの葉緑体ゲノムは、全長 217,694 bp、GC含量は30.3%の環状DNAであった(表1)。他の紅藻の葉緑

表2　チノリモ葉緑体ゲノムにおけるtRNA遺伝子の同定
チノリモ葉緑体ゲノムのtRNA遺伝子を、対応するアミノ酸とコドンをもとに、コドン表上に示した。fMetは開始メチオニンtRNA遺伝子を示す。

第1塩基	第2塩基 U	第2塩基 C	第2塩基 A	第2塩基 G	第3塩基
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Leu				C
	Leu			Trp	A
					G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
			Gln		C
					A
				Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
		Thr	Lys	Arg	C
	Met,fMet,Ile				A
					G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
			Glu	Gly	C
					A
					G

§ 第3回日本光合成学会シンポジウム　ポスター発表賞受賞論文

* 連絡先　E-mail: naoT507@bio.c.u-tokyo.ac.jp

表3　チノリモ葉緑体ゲノムにコードされたタンパク質遺伝子

分類	数
転写と複製	
ヘリカーゼ	1
リボヌクレアーゼ	2
RNAポリメラーゼ	5
転写因子	3
シャペロン	5
逆転写酵素	5
翻訳	
翻訳	4
リボソームタンパク質	48
光合成	
フィコビリソーム	11
シトクロム複合体	11
炭酸固定	3
酸化還元系	4
クロロフィル生合成	3
ATP合成酵素	8
光化学系	
光化学系I	13
光化学系II	19
代謝	
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ	2
脂質	2
ヌクレオチド	1
アミノ酸合成	5
補因子	4
アミノアシルtRNA合成酵素	3
フィコビリソーム分解タンパク質	1
輸送	
輸送	6
タンパク質輸送体	4
その他	
細胞分裂	1
不明	
保存されたORF	13
特有のORF	37
	224

体よりもゲノムサイズが大きいが、今まで解読された紅藻の葉緑体ゲノムにはなかったイントロンが、合計で30,433 bp存在するためだと考えられる。

チノリモの葉緑体ゲノムは、1個のリボヌクレアーゼP遺伝子(*rnpB*)、6個のrRNA遺伝子、29個のtRNA遺伝子と224個のタンパク質遺伝子を持つことが分かった。また、5種の緑色植物[2]および5種の紅藻の葉緑体のtRNA遺伝子配列をもとに、開始メチオニンtRNA遺伝子や、CAUアンチコドンを持つイソロイシンtRNA遺伝子を推定した(表2)。

3. タンパク質遺伝子

チノリモの葉緑体ゲノムでは、29個のタンパク質遺伝子内に合計で43個のイントロンが存在していることが推定された。推定には、他の葉緑体タンパク質遺伝子との相同性、近縁種のESTデータ[3]およびイントロン推定プログラムRNAweasel[4]を用いた。構造を調べた結果、*rpl28*のイントロンはグループIイントロンで、それ以外のイントロンはグループIIイントロンであると推定された。*dnaK*、*infC*、*gltB*、*rpoC2*のイントロン内には、逆転写酵素のタンパク質遺伝子がコードされていた。

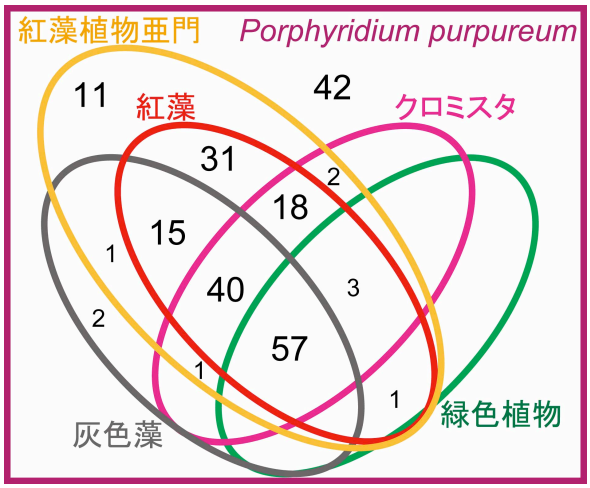


図1　チノリモ葉緑体ゲノムにコードされたタンパク質遺伝子の相同クラスタリング解析
5種の紅藻、1種の灰色藻、8種のクロミスタ(不等毛植物+クリプト藻+ハプト藻)、41種の緑色植物、チノリモ、の葉緑体ゲノムにコードされた全てのタンパク質遺伝子と41種のシアノバクテリアの全てのタンパク質遺伝子のアミノ酸配列に対して双方向のblastをかけ、相同クラスタリング解析を行った。

また、チノリモ葉緑体ゲノムの全てのタンパク質遺伝子の機能別分類表を表3に示した。これらについて、相同クラスタリング解析によりさまざまな光合成生物におけるホモログの有無を調べた(図1)。42個のタンパク質遺伝子のホモログは、検出されなかった。それらと*ycf12*、*ycf80*以外の遺伝子には、シアノバクテリアに共通してホモログが存在していた。57個のタンパク質遺伝子(光化学系I、II、シトクロム複合体、リボソームタンパク質、ATP合成酵素とRNAポリメラーゼ)は、全ての光合成生物に共通してホモログが存在していた。フィコビリソーム関連遺伝子を含む15個のタンパク質遺伝子は、紅藻と灰色藻に保存されていた。また、フィコエリスリン、アミノアシルtRNA合成酵素、リボヌクレアーゼなどのタンパク質をコードする11個の遺伝子は、紅藻植物亜門に共通して、ホモログが存在していた。また、2個のマンガンABCトランスポーターはチノリモと灰色藻にのみ存在していた。

4. 特徴的なrRNAオペロン構造

119種の植物や藻類の葉緑体ゲノムについてrRNAオペロンの構造を調べ、チノリモのものと比較した(図2)。多くの種で、葉緑体のrRNAオペロンは2コピーあり、それらは互いに左右対称の逆向き反復配列であった。チノリモ以外の紅藻は、ウシケノリ綱の2種が直

図2　葉緑体のrRNAオペロン構造
逆向き反復配列の2つのrRNAオペロンの内側はSSC (small single copy)を示す。

列反復配列で、真正紅藻綱と2種のイデユコゴメ綱は単一のrRNAオペロンを持っていた。チノリモのrRNAオペロンは、逆向き反復配列様の構造をとっていたが、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間には、片方は*trnA*、もう片方は*trnI*という異なるtRNA遺伝子が存在することが分かった。既に解読された他の種の葉緑体ゲノムではこのような構造はみられず、チノリモの葉緑体ゲノムに特徴的なものであることが分かった。

5. おわりに

紅藻の葉緑体ゲノムは、綱ごとにそれぞれ異なるrRNAオペロン構造をとっていることが分かった。このことから、紅藻の葉緑体ゲノムは、進化の過程で何度かrRNAオペロン構造に大きな変化が起こったことが考えられる。紅藻由来の葉緑体を持つ二次共生藻類であるクロミスタ[5)]の葉緑体ゲノムは、左右対称の逆向き反復配列のrRNAオペロン構造をとっていた(図2)。しかし、今のところ紅藻の葉緑体ゲノムでは、左右対称の逆向き反復配列のrRNAオペロン構造は報告されていない。今後、さらに別の紅藻葉緑体ゲノムを解読するにあたって、アミノ酸配列や塩基配列の系統

解析だけでなく、ゲノム構造を把握することが、二次共生藻類との関係を含めた紅藻の系統関係を理解する上で重要となると考えられる。

謝辞

本研究は、グローバルCOEプログラム「地球から地球たちへ」および JST CREST の支援を受けて行われた。

Received November 15, 2012, Accepted November 20, 2012, Published December 31, 2012

参考文献

1. Yoon, H. S., Müller, K. M., Sheath, R. G., Ott, F. D., and Bhattacharya, D. (2006) Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta), *J. Phycol. 42,* 482-492.
2. Alkatib, S., Fleischmann, T. T., Scharff, L. B., and Bock, R. (2012) Evolutionary constraints on the plastid tRNA set decoding methionine and isoleucine, *Nucleic Acids Res. 40,* 6713-6724.
3. Chan, C. X., Yang, E. C., Banerjee, T., Yoon, H. S., Martone, P. T., Estevez, J. M., and Bhattacharya, D. (2011) Red and green algal monophyly and extensive gene sharing found in a rich repertoire of red algal genes, *Curr. Biol. 21,* 328-333.
4. Lang, B. F., Laforest, M-J., and Burger, G. (2007) Mitochondrial introns: a critical view, *Trends Genet. 23,* 119-125.
5. Cavalier-Smith, T. (1986) The kingdom Chromista: Origin and systematics, *Prog. Phycol. Res. 4,* 310-347.

Analysis of the Complete Chloroplast Genome of the Unicellular Red Alga *Porphyridium purpureum*

Naoyuki Tajima[1,2,*], Shusei Sato[3], Fumito Maruyama[4], Ken Kurokawa[2,5], Hiroyuki Ohta[2,6], Satoshi Tabata[3], Kohsuke Sekine[1], Takashi Moriyama[1,2], Naoki Sato[1,2]

[1]Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo
[2]JST-CREST
[3]Kazusa DNA Research Institute
[4]Graduate School of Medical and Dental Science, Tokyo Medical and Dental University
[5]Department of Biological Information, Tokyo Institute of Technology
[6]Center for Biological Resources and Informatics, Tokyo Institute of Technology

研究紹介

シアノバクテリアにおいてチオレドキシンの転写を制御するレドックス応答性転写因子RexT§

[1]中央大学 理工学部 生命科学科、[2]科学技術振興機構 さきがけ
得平　茂樹[1,2,*]

1. はじめに

チオレドキシン（Trx）は低分子量の酸化還元タンパク質である。Trxは他のタンパク質のジスルフィド結合を還元、切断することができ、様々な酵素の活性制御や酸化ストレス応答に関わる重要なタンパク質である。葉緑体においては、カルビンサイクルの複数の酵素の活性がTrxにより制御されていることが知られている[1,2]。また、シアノバクテリアにおいても様々な生理機能を持つ50を超すタンパク質がTrxと相互作用することが示されている[3-5]。このようにTrxは生理的に非常に重要な役割を持っているにも関わらず、シアノバクテリアにおいてはその発現制御機構はほとんど分かっていない。

Anabaena sp. PCC 7120（以下、*Anabaena*）は、数百に及ぶ細胞が一列につながった糸状性のシアノバクテリアである。*Anabaena*はヘテロシストと呼ばれる分化細胞を形成し、窒素固定を行う[6,7]。ヘテロシストは窒素固定に特殊化した細胞であり、光合成活性を失っている。そのため、ヘテロシストでは隣接した栄養細胞から糖を受け取り、その異化により窒素固定に必要な還元力（NADPH）を獲得している[8]。ヘテロシストにおいては、糖は主に酸化的ペントースリン酸経路で代謝され、その際NADPHが生産される。酸化的ペントースリン酸経路の入口の酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼは、窒素固定に必須の酵素である[9]。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼはTrxにより活性制御を受け、還元状態では活性を失い、酸化状態で活性化される[10,11]。しかし、ヘテロシストにおいてTrxが実際にどのような役割を果たしているのかは、まだ明らかにされていない。

本研究では、*Anabaena*における*trx*遺伝子の転写制御機構に関して解析を行い、*trxA2*遺伝子の発現を制御するレドックス応答性の転写因子RexTを同定し、その活性制御機構を明らかにした[12]。

2. *Anabaena*における*trx*遺伝子の酸化ストレス応答

*Anabaena*のゲノム中には、Trxをコードする7個の遺伝子（alr0052（*trxA*）, all1866（*trxA2*）, all2367（*trxA3*）, all2341（*trxB*）, alr3955（*trxC*）, all1893（*trxQ*）, alr2205（*trxO*））がある[13,14]。植物のTrxを含めた系統解析では、TrxA, TrxA2そしてTrxA3は*m*型、TrxBとTrxQはそれぞれ*x*型、*y*型に分類される[13]。酸化ストレスによる*trx*遺伝子の発現変化を調べたところ、*trxA2*のみがH_2O_2に対して応答を示した（図1）。*trxA2*の転写産物量は、

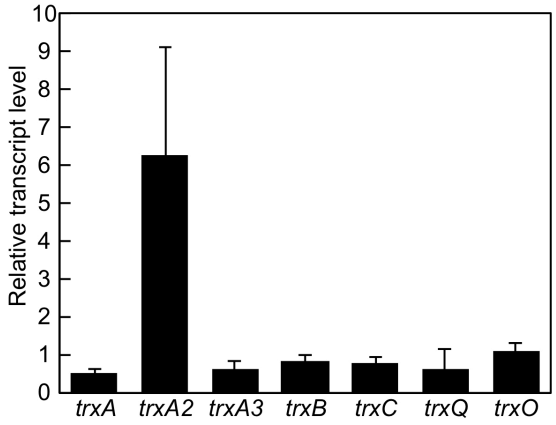


図1　H_2O_2による*trx*遺伝子の発現変化
3 mM H_2O_2添加後10分における各*trx*遺伝子の転写産物レベルを定量RT-PCR法で決定した。各*trx*遺伝子のH_2O_2添加前の転写産物レベルを1としたときの、相対値を示す。

§ 第3回日本光合成学会シンポジウム　ポスター発表賞受賞論文

* 連絡先　E-mail: ehira@kc.chuo-u.ac.jp

3 mM H_2O_2 処理後 10 分でおよそ6 倍に増加した。*trxA2*以外の*trx*遺伝子は、3 mM H_2O_2 に応答を示さなかった。また、1 mM H_2O_2では、*trxA2*の誘導も見られなかった。

*trxA2*遺伝子の上流逆向きには、ArsRファミリーの転写因子をコードする遺伝子alr1867がある。この遺伝子の配置は*Anabaena*以外にも、*Anabaena variabilis* ATCC29413、*Nostoc punctiforme* PCC 73102、*Cyanothece* sp. PCC 7425、そして*Acaryochloris marina* MBIC11017で保存されている。このことは、Alr1867タンパク質が*trxA2*遺伝子の転写因子として働くことを示唆している。実際に、alr1867遺伝子破壊株における*trxA2*遺伝子の発現量を解析したところ、通常培養条件下で*trxA2*転写産物量は野生株の100倍以上（122.1 ± 10.9）に増加していた。一方、*trxA2*以外の*trx*遺伝子の発現は、alr1867遺伝子の破壊の影響を受けなかった。以上の結果からAlr1867タンパク質が*trxA2*の発現抑制に働くことが示唆され、alr1867を*rexT*（redox-sensing transcriptional regulator of thioredoxin A2）と名付けた。

3. RexTによる*trxA2*遺伝子の転写制御機構

RexTによる*trxA2*の発現制御機構を明らかにするため、RexT組換えタンパク質を作製し、*trxA2* プロモーターとの相互作用解析を行った。RexTは*trxA2*のプロモーター領域を含むDNA断片に結合するが、*trxA2*および*rexT*遺伝子のコード領域内のDNA断片には結合しなかった（図2）。さらに、プロモーター領域の一部を欠失させたDNA断片を用いて、RexTが*trxA2*の転写開始点（開始コドンの 40 nt 上流）のすぐ下流に結合することを明らかにした。また、RexTのDNA結合活性が、レドックスによる可逆的な制御を受けていることが示された。RexTの*trxA2*プロモーターへの結合はH_2O_2の添加により阻害され、逆にH_2O_2により不活性化されたRexTは還元剤（DTT）により再活性化された（図3）。以上の結果から、RexTは*trxA2*遺伝子のリプレッサーであり、そのDNA結合活性がレドックスにより制御されていることが明らかとなった。

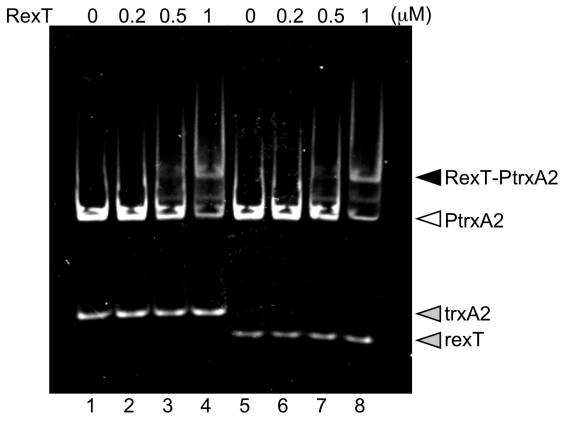


図2　RexT組換えタンパク質と*trxA2*遺伝子プロモーター領域を用いたゲルモビリティシフトアッセイ
RexTタンパク質の濃度が増加するにつれ、*trxA2*遺伝子のプロモーター領域を含むDNA断片（PtrxA2）との複合体（RexT-PtrxA2）の量が増加した。競合DNAとして、*trxA2*遺伝子（trxA2）と*rexT*遺伝子（rexT）のコード領域内のDNA断片を加えたが、RexTとの相互作用は見られなかった。

4. レドックスによるRexT活性制御機構

RexTタンパク質には3個のCys残基（Cys-40、Cys-41、Cys-105）がある。Cys残基は分子間あるいは分子内でジスルフィド結合を形成し、タンパク質のレドックスによる活性制御に関与することが知られている。まず、H_2O_2で酸化したRexTタンパク質を非還元条件でのSDS-PAGEに供したが、分子間でのジスルフィド結合の形成は観察されなかった。次に、還元状態のCys残基を特異的に修飾する化学修飾試薬である4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS)を用いてCys残基の状態を調べたところ、酸化型のRexTでは1個のCys残基のみがAMSにより修飾された（図4A）。すなわち、3個のCys残基の内2個が酸化されており、分子内でジスルフィド結合が形成されている可能性が示された。ジスルフィド結合の形成に

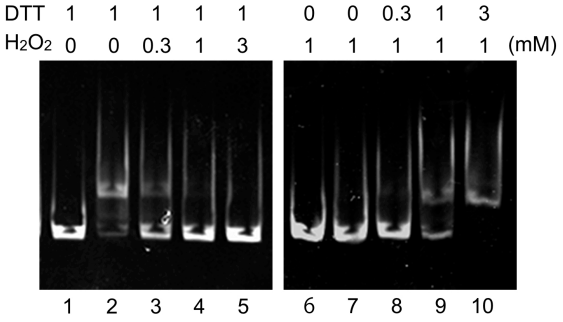


図3　RexTのDNA結合活性のレドックス制御
RexTは 1 mM DTT 存在下で、DNA結合活性を示す（レーン2）。還元状態のRexTにH_2O_2を加えると、その濃度が増加するにつれDNA結合活性が失われる（レーン3-5）。反対に、H_2O_2により活性を失ったRexTにDTTを加えると活性が回復する（レーン7-10）。レーン1と6にはRexTタンパク質は加えられていない。

関わるCys残基を同定するため、それぞれのCys残基を Ser に置き換えた 2-Cys RexT 変異タンパク質（C40S、C41S、C105S）を作製した。しかし、どの2-Cys RexT も H_2O_2 処理後は AMS による修飾を受けなくなり、分子内でジスルフィド結合を形成していることが示唆された（図4A）。また、レドックス応答性も保持していた（図4B）。一方、1個しかCys残基を持たない 1-Cys RexT 変異タンパクは、酸化処理後もAMSによる修飾を受け、かつ活性化状態のままだった（図4C）。さらに、MALDI-TOF MSを用いて酸化型RexTタンパク質の質量分析を行い、Cys残基を含む

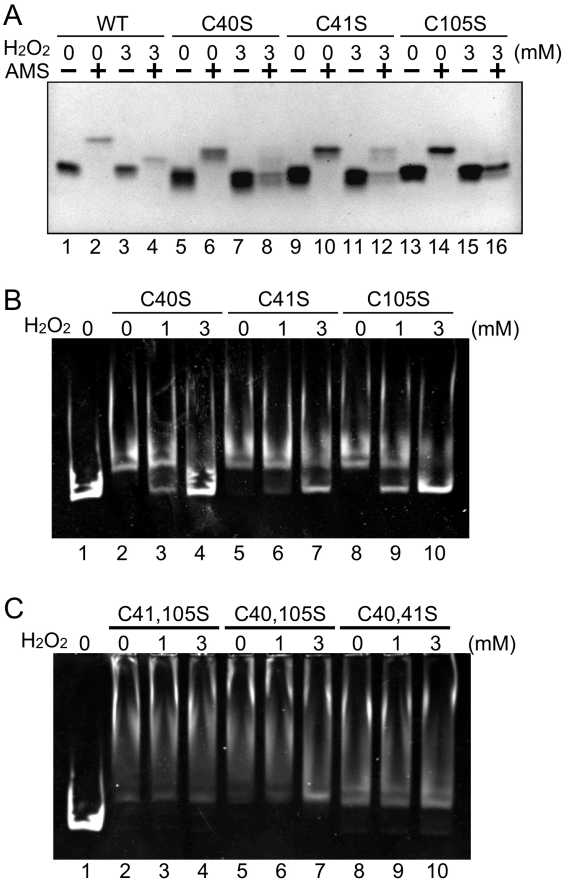


図4　RexTのレドックス応答に対するCys残基置換の影響
（A）H_2O_2処理によるCys残基の酸化状態の変化。還元状態のCys残基はAMSにより修飾されるため、電気泳動の移動度が低下する。3 個のCys残基を持つ野生型のRexTタンパク質は、H_2O_2処理後も1個のCys残基がAMSによる修飾を受けている（レーン4）。一方、1個のCys残基をSerに置換した変異タンパク質（2-Cys RexT）では、H_2O_2処理によりAMSによる修飾を受けなくなる（レーン8、12、16）。（B、C）Cys置換 RexTタンパク質のレドックス応答。どの2-Cys RexTタンパク質もH_2O_2により、DNA結合活性を失う（B）。一方、Cys残基を1個しか持たない 1-Cys RexT タンパク質は、H_2O_2処理後もDNA結合活性を保持している。レーン1にはRexTタンパク質は加えられていない。

表1　酸化型RexTタンパク質の質量分析

Peptide	Sequence	M_r (Cal)[a]	M_r (Exp)[b]	Intensity
(37-50)	GEQCCAEFDFAIAK	1531.66	1529.63	143313
(37-50+ 98-112)	GEQCCAEFDFAIAK +SAQPLLTCQQSAIVK	3117.50	3115.48	7974

[a] ペプチド配列から推定される分子量
[b] 質量分析により決められた分子量

ペプチドを検出した。検出されたペプチドは、推定分子量よりも分子量が水素2個分小さくなっていた（表1）。Cys-40とCys-41間と、Cys-105とCys-40あるいはCys-41間でのジスルフィド結合の両方がH_2O_2処理により形成されることが示された。したがって、3個のCys残基の内、どの2個の組合せでもジスルフィド結合が形成され、そして分子内でのジスルフィド結合の形成がRexTのレドックス応答には必須であることが明らかとなった。

Trxはタンパク質のジスルフィド結合を切断することで、その活性を制御することが知られている。TrxA2組換えタンパク質を作製し、TrxA2がRexTの活性制御に関与しているのかを調べた。1 mM H_2O_2で不活性化したRexTは、0.5 mM DTTでは再活性化されなかった（図5）。しかし、そこにTrxA2を加えることで、その濃度に応じてRexTの再活性化が見られた（図5）。したがって、TrxA2はRexTの分子内ジスルフィド結合を還元することができることが示された。

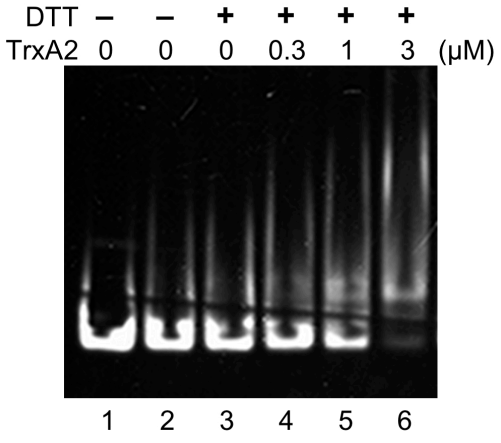


図5　TrxA2によるRexT活性の制御
1 mM H_2O_2処理により活性を失ったRexTは、0.5 mM DTTの添加では活性を回復しない（レーン2、3）。しかし、そこにTrxA2を加えるとその濃度に応じて、DNA結合活性が回復する（レーン4-6）。レーン1にはRexTタンパク質は加えられていない。

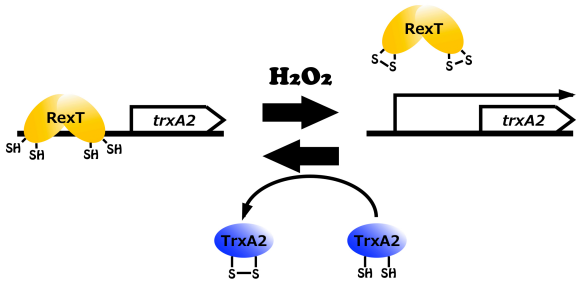


図6　RexTとTrxA2からなるレドックス応答システム
レドックス応答性の転写因子RexTはTrxA2による活性制御を受け、*trxA2*遺伝子の発現を制御している。詳細は本文を参照のこと。

7. おわりに

本研究では、レドックス応答性転写因子ＲｅｘＴが*trxA2*遺伝子のリプレッサーとして働くことを示した（図6）。RexTは、還元状態では*trxA2*のプロモーター領域に結合することでその転写を抑制する。一方、H_2O_2などによる酸化ストレス条件下では分子内ジスルフィド結合が形成され、ＤＮＡ結合活性を失う。その結果として、*ｔｒｘＡ２*の発現誘導が起こる。また、TrxA2タンパク質はRexTのジスルフィド結合を還元することができ、そのＤＮＡ結合活性を制御していることも明らかとなった。細胞内のレドックス環境に応じて、TrxA2がRexTの活性を制御し、*trxA2*自身の発現を調節している。RexTとTrxA2からなるレドックス応答システムは、シアノバクテリアの酸化ストレス応答において重要な役割を果たしていると考えられる。

これまでシアノバクテリアでは、*Synechocystis* PCC 6803を用いた研究から*trx*遺伝子は酸化ストレスに応答しないと考えられていた[15,16]。また、バクテリアで*trx*遺伝子の発現を制御するOxyRやSpxなどのレドックス応答性転写因子もゲノム解析から同定されていなかった[17]。しかし、本研究により*Anabaena*において、RexTが*trxA2*遺伝子の酸化ストレス応答を制御していることが示された。RexTは*Anabaena*以外にもいくつかのシアノバクテリアで保存されている転写因子である。*Synechocystis* PCC 6803には*m*型Trxは1個しかないが、RexTを持つシアノバクテリアには*m*型Trxが複数個あり、そのゲノム上での配置から*m*型Ｔｒｘの一つはRexTにより制御されていると推測される。これらのシアノバクテリアでは、新たな*m*型Trxが獲得され、それを酸化ストレス応答に利用していると考えられる。

今後はTrxA2の標的タンパク質の同定を進め、酸化ストレス応答におけるＴｒｘの役割を明らかにしていきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くのご助言をいただいた中央大学理工学部大森正之先生に感謝いたします。

Received November 15, 2012, Accepted November 24, 2012, Published December 31, 2012

参考文献

1. Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W. H., Hurkman, W. J. and Buchanan, B. B. (2009) Thioredoxin targets in plants: The first 30 years, *J. Proteomics 72*, 452-474.
2. Buchanan, B. B., Holmgren, A., Jacquot, J.-P. and Scheibe, R. (2012) Fifty years in the thioredoxin field and a bountiful harvest, *Biochim. Biophys. Acta 1820*, 1822-1829.
3. Lindahl, M. and Florencio, F. J. (2003) Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100*, 16107-16112.
4. Perez-Perez, M. E., Florencio, F. J. and Lindahl, M. (2006) Selecting thioredoxins for disulphide proteomics: target proteomes of three thioredoxins from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803, *Proteomics 6 Suppl 1*, S186-195.
5. Pérez-Pérez, M. E., Martín-Figueroa, E. and Florencio, F. J. (2009) Photosynthetic regulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 thioredoxin system and functional analysis of TrxB (Trx x) and TrxQ (Trx y) thioredoxins, *Mol. Plant. 2*, 270-283.
6. Kumar, K., Mella-Herrera, R. A. and Golden, J. W. (2010) Cyanobacterial heterocysts, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2*, a000315.
7. Flores, E. and Herrero, A. (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria, *Nat. Rev. Microbiol. 8*, 39-50.
8. Wolk, C. P., Ernst, A. and Elhai, J. (1994) Heterocyst metabolism and development, in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D. A., Eds.) pp 769-823, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands,
9. Lechno-Yossef, S., Fan, Q., Wojciuch, E. and Wolk, C. P. (2011) Identification of ten *Anabaena* sp. genes that under aerobic conditions are required for growth on dinitrogen but not for growth on fixed nitrogen, *J. Bacteriol. 193*, 3482-3489.

10. Udvardy, J., Borbely, G., Juhasz, A. and Farkas, G. L. (1984) Thioredoxins and the redox modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 vegetative cells and heterocysts, *J. Bacteriol. 157*, 681-683.
11. Cossar, J. D., Rowell, P. and Stewart, W. D. P. (1984) Thioredoxin as a Modulator of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in a N_2-Fixing Cyanobacterium, *J. Gen. Microbiol. 130*, 991-998.
12. Ehira, S. and Ohmori, M. (2012) The redox-sensing transcriptional regulator RexT controls expression of thioredoxin A2 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *J. Biol. Chem. 287*, 40433-40440.
13. Hisabori, T., Motohashi, K., Hosoya-Matsuda, N., Ueoka-Nakanishi, H. and Romano, P. G. (2007) Towards a functional dissection of thioredoxin networks in plant cells, *Photochem. Photobiol. 83*, 145-151.
14. Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *DNA Res. 8*, 205-213; 227-253.
15. Kobayashi, M., Ishizuka, T., Katayama, M., Kanehisa, M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H. B. and Ikeuchi, M. (2004) Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol. 45*, 290-299.
16. Li, H., Singh, A. K., McIntyre, L. M. and Sherman, L. A. (2004) Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *J. Bacteriol. 186*, 3331-3345.
17. Latifi, A., Ruiz, M. and Zhang, C. C. (2009) Oxidative stress in cyanobacteria, *FEMS Microbiol. Rev. 33*, 258-278.

RexT, a redox-sensing transcriptional regulator, regulates expression of the *trx* gene in cyanobacteria

Shigeki Ehira[1, 2,*]

[1]Department of Biological Science, Faculty of Science and Engineering, Chuo University, [2]PRESTO, JST

解説特集

「光合成と藻類バイオテクノロジー」

Editor
皆川　純
(基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門)

序文

皆川　純
(基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門)

P. 166

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における窒素同化系とその制御

田中　寛、今村　壮輔
(東京工業大学 資源化学研究所)

P. 167 〜 173

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

福澤　秀哉、山野　隆志、梶川　昌孝
(京都大学 大学院生命科学研究科)

P. 174 〜 184

細胞工学による海洋性珪藻無機炭素獲得系およびCO_2感知系の研究

菊谷　早絵、中島　健介、松田　祐介
(関西学院大学 理工学部生命科学科)

P. 185 ~ 192

解説

序文‡

基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門
皆川　純*

「光合成」がキーワードとなっていると言われる。CREST、さきがけ、先端的低炭素化技術開発（ALCA）、NEDO次世代技術開発等々，バイオ燃料の開発を光合成能力増強に期待する大型プロジェクトが相次いだ。中でも藻類に寄せられた期待はことさら大きい。しかし、藻類にそうした視線を送る研究者と、もともと光合成の基礎研究に藻類を用いてきた研究者とにやや乖離した状況が生まれている。後者の中には、「この道はいつか来た道」とご覧になっている方々もいるようだ。そこで、光合成研究の最前線とそこで展開される技術をもとに藻類バイオテクノロジーを議論する機会として、今年6月に光合成学会シンポジウムを企画した。シンポジウムでは，藻類エンジニアリングの高い技術を持ち光合成エネルギー代謝やその周辺の研究を展開している方々に，「今、どの藻類を用いて何をどこまで研究できるのか」を紹介していただいた。本特集号には、その際の演者のうち3人の方が改めて解説記事を寄せた。

多くの藻類は窒素飢餓状態に置かれると脂質の生産を始める。持てる炭素を脂質の形で蓄え、来たる窒素獲得時に再びタンパク質生産を始めようという藻類独特の危機管理術である。これを利用し藻類を脂質生産工場にしようというアイデアはとりたてて新しいものではない。ただ、ここへ来て時代の要請とあいまったことで注目を浴びている。持続的な社会構築が意識され、脱化石燃料が叫ばれた。地球温暖化問題が顕在化したことで二酸化炭素排出抑制の機運が高まった。さらに、東日本大震災によって原子力利用に黄信号が灯ったことで、代替エネルギーの開発は喫緊の課題となった。今、藻類の光合成研究では何が可能で、その技術的な最先端はどこにあるのか。本特集では，まず東京工業大学の田中寛氏に、ゲノムが完全解明された原始紅藻　*Cyanidioschyzon merolae*（シゾン)を用いて研究が進む窒素飢餓のシグナル伝達について解説していただいた。続いて、京都大学の福澤秀哉氏には、バイオ燃料実用化へ向けたエンジニアリングのターゲットとなる能動的な炭素取り込み機構（CCM）と脂質代謝について、バイオ燃料開発の主要な系として知られる緑藻クラミドモナスにおける研究を解説していただいた。関西学院大学の松田祐介氏には、そのCCMがいかに制御されているのか、解明が進むその転写応答系を中心に、地球上の二酸化炭素固定量の実に5分の1を担うと言われている珪藻における研究を解説していただいた。

社会の要請を無視した研究などありえないことは言うまでもないが、豊穣な基礎研究に根ざさない応用研究は長続きせず、次代には受け継がれていかない。なんと言っても、今の社会に貢献している技術の多くは、「出口」のことなど念頭にない全くの基礎研究から生まれてきたのだ。光合成研究の将来を見通す手がかりとしていただければ幸いである。

‡ 解説特集「光合成と藻類バイオテクノロジー」

* 連絡先 E-mail: minagawa@nibb.ac.jp

解説

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における窒素同化系とその制御‡

東京工業大学 資源化学研究所
田中　寛*、今村　壮輔

1. はじめに

すべての生物はアミノ酸やヌクレオチド、糖質、脂質など、炭素、窒素、硫黄、リンなどの元素から構成された生体分子により構築されている。これら必須元素の中でも窒素はアミノ酸や核酸塩基の主要成分であり、生体の維持や成長には炭素に次ぐ量が必要とされる。植物や藻類のような独立栄養生物では、生体エネルギーは光合成の明反応系により、基本的には物質同化とは独立した形で供給されるので、これによりCO_2（あるいはHCO_3^-）を唯一の炭素源として増殖することが可能である。従って、これら生物における栄養素としての窒素の重要性は、他の従属栄養生物にも増して高いと言える。しかしながら、植物や真核藻類における窒素同化系やその制御についての知見は不十分なままであり、今後の研究に待つところが大きい。我々は真核光合成生物のモデル系として、真核細胞としても最も原始的で単純な単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*（シゾン）を用い、窒素同化系およびその制御系の解析を開始している。本稿では、シゾンにおけるアンモニア、硝酸の同化経路と、その転写レベルでの発現調節について述べ、今後の問題点を明らかにしたい。

シゾンはイタリアの硫酸酸性の温泉から単離された単細胞紅藻であり、細胞中に核・ミトコンドリア・葉緑体等のオルガネラを一個ずつしか含まない極めて単純な構造的特徴を示す[1]。さらに、他の藻類でしばしば観察されるようなM期での多重分裂をすることがなく、典型的な2分裂増殖を行なうことから、細胞やオルガネラの増殖周期の研究材料とするのに極めて都合が良い。我々を含む国内の研究チームにより、この藻類のミトコンドリアゲノム、葉緑体ゲノム、核ゲノムの完全塩基配列も決定され[2-5]、オルガネラの分裂装置の解明、細胞周期制御の解析などでは既に多くの成果が産み出されてきた[6-10]。構造的な利点以外にも、シゾン核ゲノムにおいては相同組換えを介した遺伝子破壊や遺伝子導入が可能であり、分子遺伝学的な解析手法を適用することができる[11-14]。

このようなシゾン細胞の特性は当初から細胞分裂の研究に利用されてきたが、窒素同化のような代謝系の研究にあたっても当然ながら有効である。我々はまず、シゾンのゲノム配列情報を元にして、窒素同化に関連すると考えられる遺伝子を抽出した。結果を表1に示す。シゾンが通常条件で利用する主要な窒素源はNH_4^+（アンモニウムイオン）とNO_3^-（硝酸イオン）である。以下、これらの同化経路について解説する。

2. NH_4^+同化経路

培地中に存在するNH_4^+は特異的トランスポーター

表1　シゾンゲノムに見いだされた窒素同化関連遺伝子
*を付したsulfite reductaseは、解析の結果nitrite reductaseとして機能することが示された。＊＊は調節遺伝子（候補を含む）を示す。

核ゲノム	
CMG018C	nitrate transporter
CMG019C	nitrate reductase
CMG021C	*sulfite reductase (SirB)
CMI233C	glutamine synthetase
CMJ117C	sulfite reductase (SirA)
CMJ282C	**nitrogen transcription factor MYB1
CML239C	**putative glutamine sensor (GlnD)
CMT526C	ammonium transporter (AMT)
葉緑体ゲノム	
CMV060C	glutamate synthase (gltB)
CMV095C	**ycf28

‡ 解説特集「光合成と藻類バイオテクノロジー」

* 連絡先 E-mail: kntanaka@res.titech.ac.jp

（AMT）により細胞内に取り込まれ、グルタミン合成酵素（GS）によりグルタミンに同化される。これまでに調べられている植物や真核藻類では、核に複数のGS遺伝子がコードされている。これら遺伝子がコードするGSのうち、細胞質に局在するものはGS1、色素体に局在するものはGS2と呼ばれ、それぞれ主に環境中から取り込んだNH_4^+の一次同化、および光呼吸により生じたNH_4^+の再同化に関与すると考えられている[15]。通常、GS2が単一の遺伝子にコードされるのに対して、GS1は複数の核遺伝子にアイソザイム群としてコードされている。一方、シゾンのゲノム配列には単一のGS遺伝子のみが見いだされたことから、植物の知見からシゾンのGS局在を予測することは難しい。そこで、このGSが細胞質、または葉緑体のどちらかにのみ局在するのか、あるいは細胞質と葉緑体に局在するのかを実験的に検証することにした。予測されるアミノ酸配列からは、N末端に葉緑体局在配列は見いだされず、細胞質への局在が予測される。実際、イネのGSタンパク質に対する抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡観察では細胞質への局在が示唆された（図1）。さらに、細胞を破壊した上で密度勾配遠心法によりオルガネラを分画して解析した結果でも、GSは細胞質のマーカーであるチューブリンと共局在していた（図1）。これらの結果から、シゾンのGSは細胞質に存在することを結論した（図2）[16]。シゾンは単細胞藻類であり、外界から取り込んだNH_4^+を同化して生育している。また、低CO_2条件では光呼吸関連遺伝子群の誘導が見られることから（兼崎ら、未発表データ）、シゾンにも光呼吸経路は存在し、従って、光呼吸により放出されるNH_4^+を再同化することも必要であろう。これらのGS機能が単一種のGSにより賄われていることは興味深い。

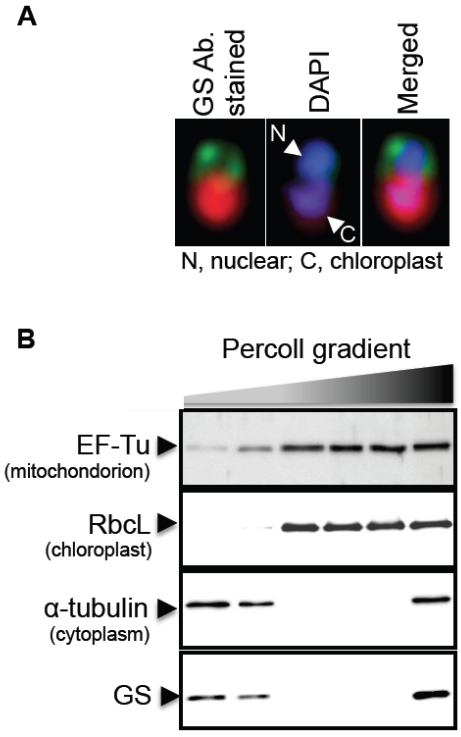


図1　GSの細胞内局在
(A)GS抗体を用いた免疫染色。(B)パーコール密度勾配遠心法によりオルガネラ分画したサンプルを用いたウェスタン解析。

NH_4^+は細胞質でグルタミンに同化された後、グルタミン酸合成酵素（GOGAT）によりγ-アミノ基が2-オキソグルタル酸（2-OG）に転移されることでグルタミン酸を生じる[17]。シゾンにおいてGOGATは葉緑体ゲノムにコードされるため、この酵素の局在は葉緑体内と考えられる。従って、GS-GOGATサイクルが機能するためには、グルタミンは細胞質から葉緑体内に輸送される必要がある。また、グルタミンと共にGOGATの基質となる2-OGはミトコンドリアのTCAサイクルで生成し、細胞質に出た後に葉緑体に輸送されていると考えられる（図2）。

3. NO_3^-同化経路

シゾンはNO_3^-を唯一の窒素源として生育することができる。ゲノム情報から予測されるNO_3^-同化系の遺伝子には、硝酸還元酵素（Nitrate Reductase: NR）とMFS（Major Facilitator Superfamily）型の硝酸トランスポーター（Nitrate Transporter: NRT）があり、これらは核ゲノム上に隣り合ってコードされている。一

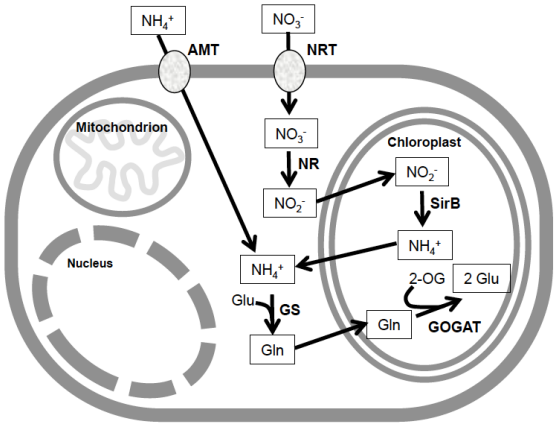


図2　シゾンにおける窒素同化経路のモデル図

般にNO_3^-は、まずNRにより二電子還元を受けNO_2^-（亜硝酸イオン）に還元され、さらに亜硝酸還元酵素（Nitrite Reductase: NiR）により六電子還元を受けてNH_4^+となった後に、GSによりグルタミンに同化される[17]。ところが驚いたことに、他の生物のNiR配列を用いた検索では、シゾンゲノムからNiRをコードする遺伝子を見いだすことができなかった。これは、シゾンがNO_3^-を唯一の窒素源として生育できるという事実からは不思議であり、何らかの遺伝子産物がNO_2^-の還元に関わっていることが推測された。さらに考察を進める中で、NiRと近縁な構造をもつ亜硫酸還元酵素（Sulfite Reductase: SiR）がシゾン核ゲノムに2種コードされており（SirAおよびSirB）、そのうちSirBがNR、NRTと近接する遺伝子にコードされることに気がついた（図3）。これらの遺伝子について、NH_4^+、NO_3^-をそれぞれ唯一の窒素源として培養した場合の発現を観察したところ、3遺伝子について同様にNO_3^-培養時のみでの発現が観察された。一方、別のゲノム領域にコードされるSirAでは窒素源によらず、恒常的な発現が観察される（図3）。これらの結果は、シゾンにおいてSirAが亜硫酸の還元に、SirBが亜硝酸の還元に関わる酵素であることを想像させる。この他、免疫蛍光顕微鏡法による観察により、SirA、SirBとも葉緑体内に局在するタンパク質であることも明らかになった[11]。アミノ酸配列に基づく局在予測により、硝酸の還元に関わるNRは細胞質への局在が想定される。従って、NRにより還元されたNO_2^-が葉緑体内に移行してNH_4^+に還元され、これが再び細胞質に戻ってグルタミンに同化されることが予測できる（図2）[11]。

SirB遺伝子産物がNiR活性をもつ可能性を更に検討するために、NiRを欠損したシアノバクテリア株を用いた遺伝的相補実験を行なうことにした。その結果、NiRをコードする*nirA*遺伝子を欠損したシアノバクテリア、*Leptolyngbya boryanum*株にシゾン*SirB*遺伝子を発現させると、NO_2^-を唯一の窒素源とする培地において有意に増殖の相補が観察された[11]。これは*SirB*遺伝子産物が実際にNiR活性を持つことを意味している。さらに、東京大学のグループが精製タンパク質を用い、SirBがNO_2^-に基質特異性をもつ還元酵素であることを生化学的に示しており[18]、シゾンのSirBが細胞内でもNiR機能をもつことは確実だと考えられる。アミノ酸配列上、SirAとSirBは極めて近縁な酵素であり、これらの特異性がどのように進化してきたのかは、構造学的な考察を含め極めて興味深い問題である。シゾンがNO_3^-を利用できるとはいえ、シゾン培養液中にNO_2^-を添加すると細胞の白化が誘起される。これは、細胞内に入った毒性の高いNO_2^-を速やかにNH_4^+に還元できないためと考えられるが、これもNiRが急造なため、不十分な活性しか得られないためと考えれば納得できそうである。

最近、シゾンと同様の環境に生育する単細胞紅藻*Galdieria sulphraria* のゲノム配列が決定され、興味深い観察がなされている。*G. sulphraria* はシゾン同様にNO_3^-を唯一の窒素源として生育することができるが、この藻類のゲノム配列には典型的なNRをコードする遺伝子が見当たらない。一方、核ゲノム上でNRT構造遺伝子の近傍にはシゾンと異なり典型的なNiR遺伝子がみつかり、さらに亜硫酸酸化酵素（Sulfite Oxidase: SO）に類似の酵素遺伝子が見いだされた。SOはモリブドプテリン結合ドメインをもつ酸化還元酵素であり、広い意味でNRとも同じファミリーに含まれていることから、*G. sulphraria*ではこのSO様酵素がNRとして機能することが考えられている（A. Weber博士、私信）。このような　*G.*

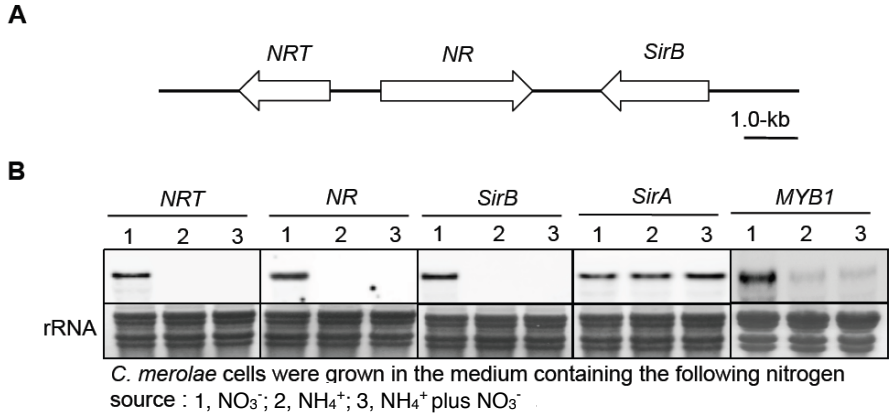


図3　硝酸同化遺伝子クラスターの構造と遺伝子産物量
(A)核ゲノム上における硝酸同化遺伝子クラスターの構造。(B)窒素源の変化による硝酸同化系遺伝子クラスター、*SirA*、*MYB1*の遺伝子産物量の変化。

sulphraria における観察は、シゾンにおける硝酸同化遺伝子の状況と比較すると二つの点で興味深い。まず、どちらの藻類も極めて重要な硝酸同化系酵素を欠き、これが二次的な進化により相補されているように見える点が挙げられる。これは硫酸酸性の温泉が極めて永続的であり、安定してNH_4^+が供給されていたために、これらの藻類は硝酸資化遺伝子（シゾンではNiR、*G. sulphraria* ではNR）を独立に失った。その後、NO_3^-を利用せざるを得ない状況に追い込まれ、シゾンではＳｉＲ遺伝子の重複と変異により、*G. sulphraria* では好熱菌からの遺伝子水平移動により硝酸資化性が回復したと考えると説明できるだろう。もう一つはNO_3^-同化に関する遺伝子が、両株の核染色体上でクラスターを形成している点である。このような硝酸同化遺伝子のクラスタリングは緑藻や菌類でも観察されており、何らかのクロマチンレベルの制御を意味している可能性がある[19,20]。

3. 核における窒素同化系遺伝子の転写調節

シゾンにおけるNO_3^-同化に関わる3遺伝子の転写は、利用する窒素源により同様の調節を受けているようにみえる。これは、これらの遺伝子が何らかの共通の転写調節系の制御下にあることによるものと考えられる。そこで、窒素同化系に関わる核転写調節因子の同定を試みることにした。真核細胞における窒素制御については、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）における先行研究があり、Gln3と呼ばれるGATA型の転写因子が直接の転写制御に関わることが知られている[21]。Gln3は窒素栄養の充足状態ではリン酸化されており、この状態を認識する結合タンパク質により細胞質に留められている。Gln3をリン酸化するのはTORキナーゼであるが、窒素欠乏によりTORが阻害されると、Gln3の脱リン酸化に伴いGln3が核内に移行し、制御下の遺伝子発現が活性化される図式が提唱されていた[22]。しかしながら、動物ではそもそも無機窒素の同化を行なわないので、同様の無機窒素同化制御の想定自体ができない。また、植物や他の藻類でも先行研究が少なく、基本的な制御機構の推定は難しい状況であった。

我々はまず、酵母と同様の分子機構がシゾンでも作動していることを想定し、核ゲノムにコードされる4種のGATA型転写因子が窒素制御に関わる可能性を検討した。しかし、これらの因子が窒素制御に直接関与する証拠は得られず、酵母系からの類推は難しいのではないかと考えられた。そこで、窒素飢餓条件に応答する転写因子をアレイ解析により抽出し、そこから転写因子を特定する戦略を取ることにした。そして、R2R3タイプのDNA

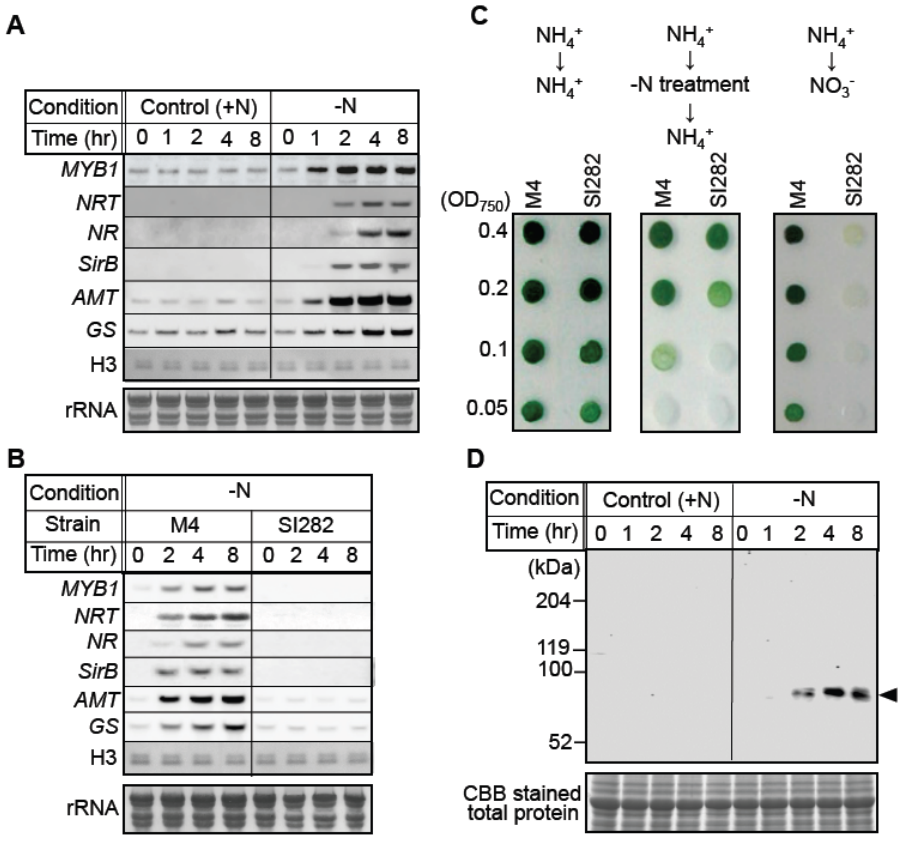


図4　窒素欠乏条件下におけるMYB1と窒素同化系遺伝子の発現(A)
窒素欠乏条件下におけるMYB1と窒素同化系遺伝子の転写産物量。H3は histone H3 遺伝子を示し、ローディングコントロールとして用いた。(B)SI282株（MYB1遺伝子破壊株）とM4株 (SI282の親株)における窒素同化系遺伝子の転写産物量。(C)M4株とSI282株の窒素源の変化による生存能力。(D)窒素欠乏条件下におけるMYB1タンパク質量。

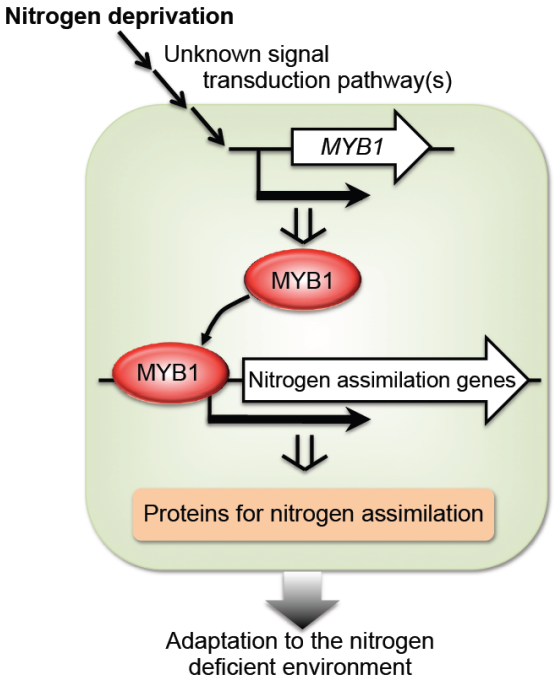


図5　MYB1を介した窒素欠乏応答機構のモデル図

結合ドメインをもつMYB型転写因子（CMJ282C: MYB1）がmRNAレベル、タンパク質レベルの両方で窒素飢餓条件、またはNO_3^-培養条件で増加することを見いだした（図3、図4）。さらに、MYB1遺伝子の破壊により窒素欠乏時のNR、NRT、SirB遺伝子等の転写活性化が見られなくなったことから、MYB1をこれら遺伝子の転写活性化に関わる因子と同定した（図4、図5）。MYB1欠損株で窒素欠乏時の生存率が低下することも、MYB1遺伝子の生理的意義を示唆している（図4）。また、クロマチン免疫沈降法（ChIP法）や電気泳動度シフト法（EMSA法）などにより、MYB1がこれら遺伝子プロモーター領域に結合することも*in vivo*、*in vitro*で証明した[23]。NH_4^+を唯一の窒素源とした培養ではMYB1の量は非常に少ない。また、NH_4^+とNO_3^-を共存させた培地でも、MYB1量はNH_4^+培地と同様に低く抑えられている(図3)[11,23]。これは、NH_4^+が利用可能であれば、他の窒素源は利用しない窒素カタボライトリプレッションの仕組みが働いているものと考えられる。また、窒素欠乏時とNO_3^-培養時での発現レベルに変化が見られないことから、NO_3^-が特に認識されている訳ではなく、窒素の同化フローの低下のようなシグナルが、MYB1を介した転写活性化を引き起こしていることが想定された[6,23]。

5. 窒素制御の全体像と今後の課題

シゾン細胞核ではMYB1が転写因子として機能し、低窒素状態に応答した転写活性化を行なっている。しかし、どのようなシグナルやシグナル伝達系が、このような転写活性化に繋がっているのかは明らかではない(図5)。前述のように酵母では、直接に転写活性化に関わる転写因子はGln3であり、TORキナーゼによるGln3リン酸化が活性調節に重要であることが解明されている。この際、TORキナーゼ活性の阻害がGln3活性化に繋がるものの、どのようにTORキナーゼの活性調節がなされているかについては酵母においても余り理解されていない。

そもそも細胞は、窒素欠乏の状況をどのように感知しているのだろうか。細胞にとって窒素源が存在するのは外界の培地中であるが、これまでの研究から、微生物細胞は窒素源の細胞外濃度を感知しているのではなく、細胞内に取り込まれた窒素源や同化産物、同化反応により変動する代謝産物を検出することが明らかにされてきた。例えば大腸菌では、初期窒素同化産物であるグルタミン、および窒素同化反応に炭素骨格を供給する2-OGがそれぞれGlnD、PIIタンパク質によりモニターされ、2成分制御系を介して低窒素応答を誘導する[17,24]。一方、シアノバクテリアでは2-OGがPII、およびCRP型の転写調節因子であるNtcAに認識されることで、遺伝子発現が調節される[25,26]。バクテリアではこのように、窒素条件により直接に変動する代謝産物から転写活性化までの道筋が、比較的明確にされている。これに対して真核生物、特に植物や藻類では殆どこのような知見が得られていない。本稿で見てきたように、シゾンにおける窒素同化は、細胞質と葉緑体の間を代謝産物が往復しながら進められる複雑な過程である。この過程のうち、どのコンパートメントにあるどの代謝産物がシグナルとして働いているのか、センサーやシグナル伝達系を含めて殆どが不明のままである。シゾンを含む紅藻葉緑体のゲノムには、シアノバクテリアのNtcAに類似した転写因子Ycf28がコードされており、このYcf28が葉緑体における窒素欠乏センサーとなっている可能性があるが、具体的な証明はなされていない。さらに、細胞全体としての窒素シグナル伝達の理解については今後の研究を待たねばならない。

葉緑体は植物や藻類に固有のオルガネラであり、シアノバクテリアの内部共生に由来すると考えられて

いる。この葉緑体が窒素代謝の主役を担う以上、酵母などにおける従来の知見がそのまま適用できないのも当然といえるだろう。植物や藻類のもつ光合成能力、バイオマス生産能力の利用は今後の持続的な人間活動に極めて重要であり、その代謝機能の理解はその活用に必須である。窒素代謝は炭素代謝と共に、光合成生物の同化機能の要にあり、シゾンのようなシンプルなモデル系を用いた原理解明、そして複雑な植物系へのフィードバックという研究戦略が今後さらに必要になってくるものと考え、研究を進めている。

謝辞

本研究の遂行にあたり、シアノバクテリア亜硝酸還元酵素の欠損株、プラスミドをご提供いただいた名古屋大学・藤田祐一先生、*Galdieria*株のゲノム情報に関する私信をいただいたDusseldorf大学・Andreas Weber先生に深く感謝致します。

Received October 31, 2012, Accepted November 13, 2012, Published December 31, 2012

参考文献

1. Kuroiwa, T (1998) The primitive red algae *Cyanidium caldarium* and *Cyanidioschyzon merolae* as model system for investigating the dividing apparatus of mitochondria and plastids, *Bioessays 20*, 344-354.
2. Ohta, N., Matsuzaki, M., et al. (2003) Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *DNA Res. 10*, 67-77.
3. Ohta, N., Sato, N. and Kuroiwa, T. (1998) Structure and organization of the mitochondrial genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* deduced from the complete nucleotide sequence, *Nucleic Acids Res. 26*, 5190-5298.
4. Matsuzaki, M., Misumi, O., et al. (2004) Genome sequence of the ultra small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Nature 428*, 653-657.
5. Nozaki, H., Takano, H., et al. (2007) A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *BMC Biol. 5*, 28.
6. Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Misumi, O., Yoshida, M., Ohnuma, M., Fujiwara, T., Yagisawa, F., Hirooka, S., Imoto, Y., Matsushita, K., Kawano, S. and Kuroiwa, T. (2010) Chloroplasts divide by contraction of a bundle of nanofilaments consisting of polyglucan, *Science 329*, 949-953.
7. Misumi, O., Yoshida, Y., Nishida, K., Fujiwara, T., Sakajiri, T., Hirooka, S., Nishimura, Y. and Kuroiwa, T. (2008) Genome analysis and its significance in four unicellular algae, *Cyanidioschyzon merolae*, *Ostreococcus tauri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Thalassiosira pseudonana*, *J. Plant Res. 121*, 3-17.
8. Nishida, K., Yagisawa, F., Kuroiwa, H., Yoshida, Y. and Kuroiwa, T. (2007) WD40 protein Mda1 is purified with Dnm1 and forms a dividing ring for mitochondria before Dnm1 in *Cyanidioschyzon merolae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104*, 4736-4741.
9. Kobayashi, Y., Kanesaki, Y., Tanaka, A., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. and Tanaka, K. (2009) Tetrapyrrole signal as a cell-cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106*, 803-807.
10. Kobayashi, Y., Imamura, S., Hanaoka, M. and Tanaka, K. (2011) A tetrapyrrole-regulated ubiquitin ligase controls algal nuclear DNA replication, *Nat. Cell Biol. 13*, 483-487.
11. Imamura, S., Terashita, M., Ohnuma, M., Maruyama, S., Minoda, A., Weber, A. P., Inouye, T., Sekine, Y., Fujita, Y., Omata, T. and Tanaka, K. (2010) Nitrate assimilatory genes and their transcriptional regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: Genetic evidence for nitrite reduction by a sulfite reductase-like enzyme, *Plant Cell Physiol. 51*, 707-717.
12. Ohnuma, M., Yokoyama, T., Inouye, T., Sekine, Y. and Tanaka, K. (2008) Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Plant Cell Physiol. 49*, 117-120.
13. Ohnuma, M., Misumi, O., Fujiwara, T., Watanabe, S., Tanaka, K. and Kuroiwa, T. (2009) Transient gene suppression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Protoplasma 236*, 107-112.
14. Watanabe, S., Ohnuma, M., Sato, J., Yoshikawa, H. and Tanaka, K. (2011) Utility of a GFP reporter system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae, J. Gen. Appl. Microbiol. 57*, 69-72.
15. Lam, H. M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R. and Coruzzi, G. M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47*, 569-593.
16. Terashita, M., Maruyama, S. and Tanaka, K. (2006) Cytoplasmic localization of the single glutamine synthetase in a unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Biosci. Biotechnol. Biochem. 70*, 2313-2315.
17. Merrick, M. J. and Edwards, R. A. (1995) Nitrogen control in bacteria, *Microbiol. Rev. 59*, 604-622.
18. Sekine, K., Sakakibara, Y., Hase, T. and Sato, N. (2009) A novel variant of ferredoxin-dependent sulfite reductase having preferred substrate specificity for

nitrite in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *Biochem. J. 423*, 91-98.
19. Quesada, A., Galvan, A., Schnell, R. A., Lefebvre, P. A. and Fernandez, E. (1993) Five nitrate assimilation-related loci are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mol. Gen. Genet. 240*, 387-394.
20. Slot, J. C. and Hibbett, D. S. (2007) Horizontal transfer of a nitrate assimilation gene cluster and ecological transitions in fungi: A phylogenetic study, *PLoS ONE 2*, e1097.
21. Cooper, T. G. (2002) Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots, *FEMS Microbiol. Rev. 26*, 223-238.
22. Beck, T. and Hall, M. N. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors, *Nature 402*, 689-692.
23. Imamura, S., Kanesaki, Y., Ohnuma, M., Inouye, T., Sekine, Y., Fujiwara, T., Kuroiwa, T. and Tanaka, K. (2009) R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106*, 12548-12553.
24. Arcondeguy, T. Jack, R. and Merrick, M. (2001) P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65*, 80-105.
25. Osanai, T. and Tanaka, K. (2007) Keeping in touch with PII: PII-interacting proteins in unicellular cyanobacteria, *Plant Cell Physiol. 48*, 908-914.
26. Ohashi, Y., Shi, W., Takatani, N., Aichi, M., Maeda, S., Watanabe, S., Yoshikawa, H. and Omata, T. (2012) Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria, *J. Exp. Bot. 62*, 1411-1424.

Nitrogen assimilatory pathway and the regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*

Kan Tanaka* and Sousuke Imamura
Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology

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‡

京都大学 大学院生命科学研究科
福澤　秀哉*、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_2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_2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[1,2]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。

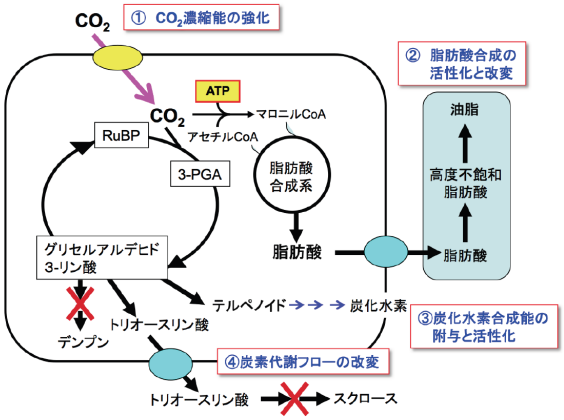


図1　光合成真核生物における炭素代謝エンジニアリングのターゲット
赤色×印で示したデンプンや貯蔵糖に移行する代謝経路を制限することで、脂肪酸や炭化水素への炭素の流れを強化できる可能性が考えられている。

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_2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_2の供給は、陸上植物の場合と比べて困難である。またCO_2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_2・HCO_3^-・CO_3^{2-}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_2固定酵素ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は、Ciの中でもCO_2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_2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_2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_2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_2濃度が大きく変動する。5% CO_2 を含む高 CO_2 (High-CO_2; HC) 環境で培養した緑藻は、C_3植物型の光合成特性を示すが、大気レベルの低 CO_2（0.04%, Low-CO_2; LC）環境で培養した細胞は、CO_2濃縮能をもつトウモロコシなどのC_4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_2濃

‡ 解説特集「光合成と藻類バイオテクノロジー」

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

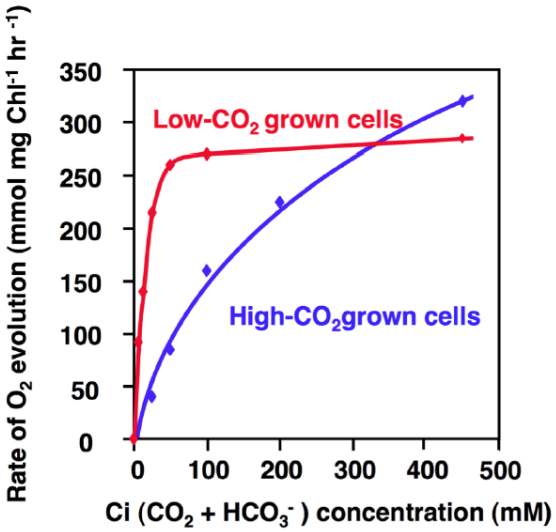


図2　培養環境に依存した緑藻の光合成特性（文献3に記載の図を改変）

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Ｃｉ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[3]。クラミドモナスにおけるRubiscoのKm (CO_2) 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_2に対する $K_{1/2}$ (CO_2) 値は 2-3 μM である。ここでの $K_{1/2}$ (CO_2) 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$_2$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（$K_{1/2}$ 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$_2$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Ｃi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[4]。

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[5]。CCMはCO_2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_2　濃度でも強光条件下（1,000 μmol photons · m^{-2} s^{-1}）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[6]（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、Ci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[7,8]。他の輸送体が誘導されて

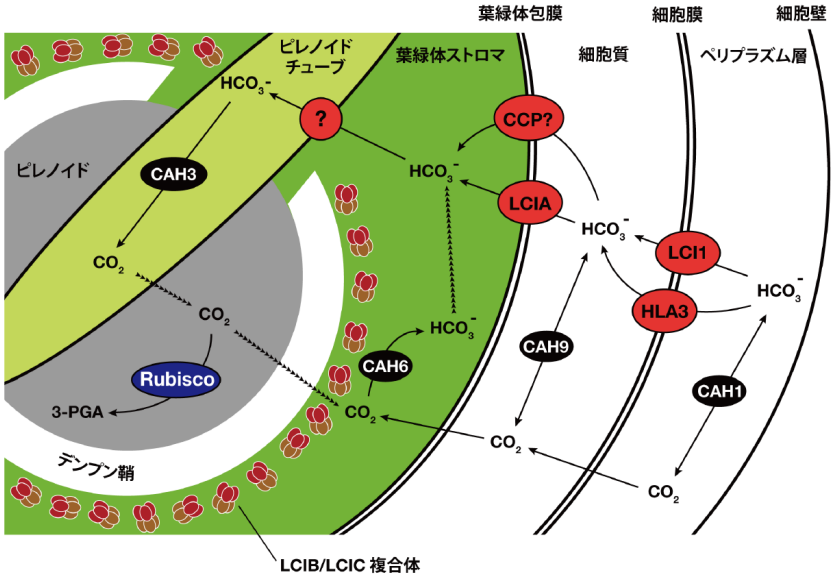


図3　クラミドモナスにおける無機炭素の流れ

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_2はHCO_3^-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Ci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Ci輸送体により、HCO_3^-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_2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_2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_2はピレノイドから漏れ出すが、ピレノイド周囲に局在するCAH6の働きによりHCO_3^-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_2リサイクル機構があると考えられている[20,59]。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_2のリサイクルに関わると考えられている[15,16]。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
		Volvox carteri	*Chlorella* sp. NC64A	*Ostreococcus* RCC809		
調節因子						
CCM1/CIA5	核	＋	＋	－	CCMを調節するマスター制御因子。CO_2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
LCR1	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
LCI14	N.D.	＋	＋	＋	CobWドメインを持つ機能未知タンパク質。	6
LCI15	N.D.	＋	－	－	TB2/DP1, HVA22ファミリーに属する調節因子。	6
炭酸脱水酵素						
CAH3	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_3^-をCO_2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_2がRubiscoによって固定されると推定されている。	16, 19
CAH6	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_2をHCO_3^-に変換することで、CO_2のリサイクルにを担うと推定されている。	20
CAH1	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
無機炭素の輸送・リサイクル						
LCI1	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_2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
LCIA	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_3^-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
HLA3	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
LCIB	ピレノイド周囲	＋	－	＋	LCIBの欠損株はCO_2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_2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
LCIC	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
CCP1	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
CCP2	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
デンプン合成						
STA2	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
LCI8	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
機能未知						
LCI5	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
LCI6	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_2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[8]。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[9]。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[10]。*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[11]。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もち、早くからLC誘導性タンパク質として見出されていた[12]。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_2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[13]。

以前から単離されていたCO_2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[14]。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_2濃度（0.04%）での生育速度は低下するが、50 ppmのCO_2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_2環境に応じて発現制御を受けると示唆される[15]。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[15]。ただし、この局在は、LC濃度で光照射条件に限られており、光存在下であっても高CO_2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てしまうCO_2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[15,16]。

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[17]は、CCMにあまり寄与しないとされている[18]。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[19]。また、CAH6は葉緑体ピレノイドの周囲に局在するが[20]、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_2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[21,22]。CCM1はアミノ末端領域に2つの亜鉛結合部位をもち、CO_2濃度条件に関わらず恒常的に発現している[21,22,23]。CCM1は核に局在し[23]、細胞内で約 280-500 kDaの高分子複合体を形成することから[24]，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[24]。恒常的に発現しているCCM1がどのようにしてCO_2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[5,6]。そこでCCM1がCO_2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_2あるいはHCO_3^-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[25]。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_2 stress response 1）株の解析よりMYB転写因子LCR1が同定されている[26]。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*LCI1*、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_2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_2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[5,6,27,28]。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[14,15]。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_2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_2のリサイクルに関与する説が提唱されている[15,16]。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[11]。まだ論文に報告されてないが、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_2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_2 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応答して、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[29]。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[30]。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[31]。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[32]。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、デンプ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プ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[33]。この報告からクラミドモナスにおいては、脂質よりもデンプ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プン蓄積よりも遅れて起こり、急激な脂質生合成はデンプ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、デンプン合成酵素欠損変異体では、デンプ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、デンプンと脂質合成の間で振り分けられ、デンプ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[34]。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*のような脂質生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[35]。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[36]。各遺伝子

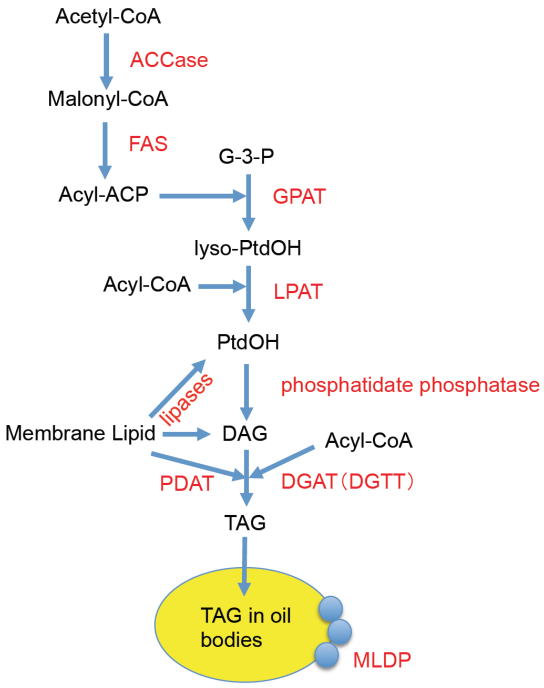


図4　クラミドモナスのTAG代謝経路（文献30を改変）

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の生成までが起こる33)。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[32]、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[37]。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[30,38]。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[39]。

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Δ4-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Δ4-不飽和化酵素をコードする遺伝子CrΔ4FADが同定された[40]。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。CrΔ4FAD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。CrΔ4FAD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、CrΔ4FAD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CrΔ4FAD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[41]。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[42]。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、パロモマイシン、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改変する必要がある。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[43,44]。最近になって、野生型と比べてサイレンシングが起こりにくく、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[45]。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[46]。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[47, 48]、ゼブラフィッシュ[49,50]、線虫[51]、ラット[52]、シロイヌナズナ[53]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[54]。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[55]。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、パロモ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の鋳型とし、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[55]。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_2-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_2, *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_2-inducible protein, LCI1, 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_2-induced gene *HLA3* decreases HCO_3^- 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_2-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_2 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_2 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_2-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_2 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., Hugghins, 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_2, *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 CO2 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_2 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_2-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_2-concentrating mechanism regulator CIA5/CCM1, *Plant Cell 24*, 1876-1893.
28. Brueggeman, A. J., Gangadharaiah, D. S., Cserhati, M. F., Casero, D., Weeks, D. P. and Ladunga, I. (2012) Activation of the carbon concentrating mechanism by CO_2 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.
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., Anegon, 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_2 concentration, *Planta. 224*, 646-654.
58. Turkina, M. V., Blanco-Rivero, A., Vainonen, J. P., Vener, A. V. and Villarejo, A. (2006) CO_2 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

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_2感知系の研究‡

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[1,2]。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[3,4]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。

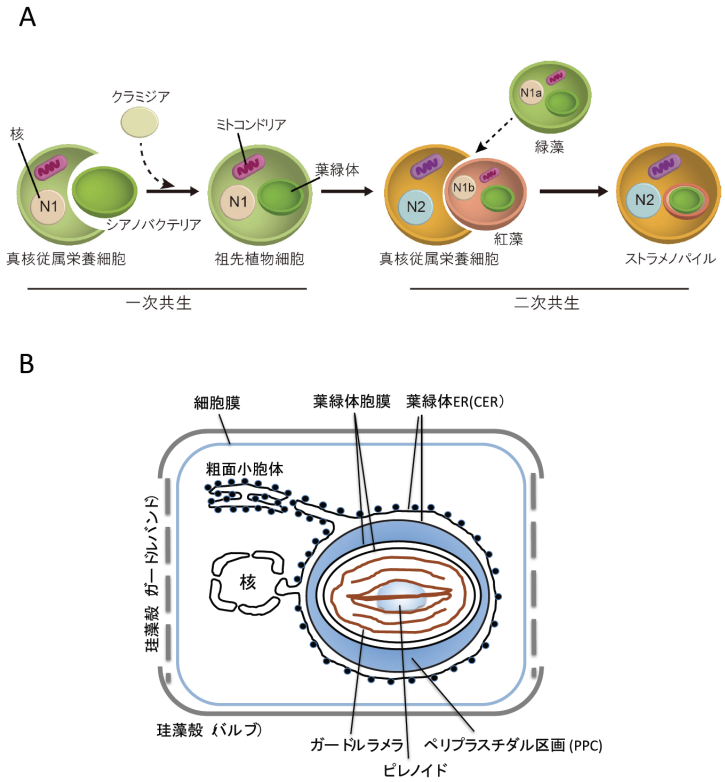


図1　一次共生及び二次共生の過程と珪藻葉緑体構造
A，　共生による葉緑体獲得のスキーム。シアノバクテリアとの共生による真核藻類の成立に続き、別の真核細胞と紅藻との共生によりクロミスタ属二次共生藻が成立した。珪藻のゲノムから、一次共生時にクラミジアゲノムの取り込み、紅藻との二次共生以前における緑藻の一時的取り込みがあったことが強く示唆されている　(破線矢印)。B，　現在の珪藻類の葉緑体構造。葉緑体は葉緑体ERと葉緑体包膜の4重膜系で包まれており、葉緑体内にはグラナを形成しない三重チラコイドとなっている。ピレノイドの中心部分を貫通するチラコイドが存在する。

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[5]。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取って代わったことが示唆されている(図1A)[5]。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[6]、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[5]。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[7]。

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

‡ 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まとめたいと思う。

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[8]。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[9]。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)[6]。

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10)。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11)、次の膜にはERAD-L（ER-associated degradation of luminal proteins）[12]、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[13]、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_2獲得機構とCO_2固定

水中の光合成では、CO_2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_2に対する高親和性光合成をおこなう[14]。これまでの生理学的解析から、珪藻類がCO_2とHCO_3^-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[15]。このため、珪藻類もCO_2濃縮機構（CO_2-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$^{14}CO_2$パルスチェース実験で、3-PGA増加に先立ってC_4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_4型のCCMを有している可能性も示唆されている[16]。しかしゲノム株を含めた様々な海洋性珪藻ではC_3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[17]、C_4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_4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_4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_3^- 輸送体およびチラコイド膜上の CO_2 → HCO_3^- 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[18]。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[19,20]。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_2 環境下においてピレノイド内の CO_2 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[20]。

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[21]、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[22]（表1）。興味深いことに、α型は葉緑体包膜系、β型はピレノイド、γ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。

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

Name	Class	Localization
CA-I	α	PPC
CA-II	α	PPC
CA-III	α	CER
CA-IV (PtCA1)	β	ピレノイド
CA-V (PtCA2)	β	ピレノイド
CA-VI	α	CER
CA-VII	α	CER
CA-VIII	γ	ミトコンドリア
CA-IX	γ	N.D.
CA-X	ζ	N.D.

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

ピレノイドには2つのβ-CAが存在し（PtCA1, PtCA2）、すでにCA活性も確認されている[23]。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[24]。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[25,26]。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[22]。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_2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[27]。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、

sedoheptulose-1,7-bisphosphatase、およびRubisCO activaseはゲノム上に存在していない[28]。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Trx*m*および*f*が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）[29]。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[29]、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_2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が持たれるところである。

海洋性珪藻が細胞外からCO_2およびHCO_3^-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_2とHCO_3^-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_3^-輸送体であることが知られているが、これらのホモログ

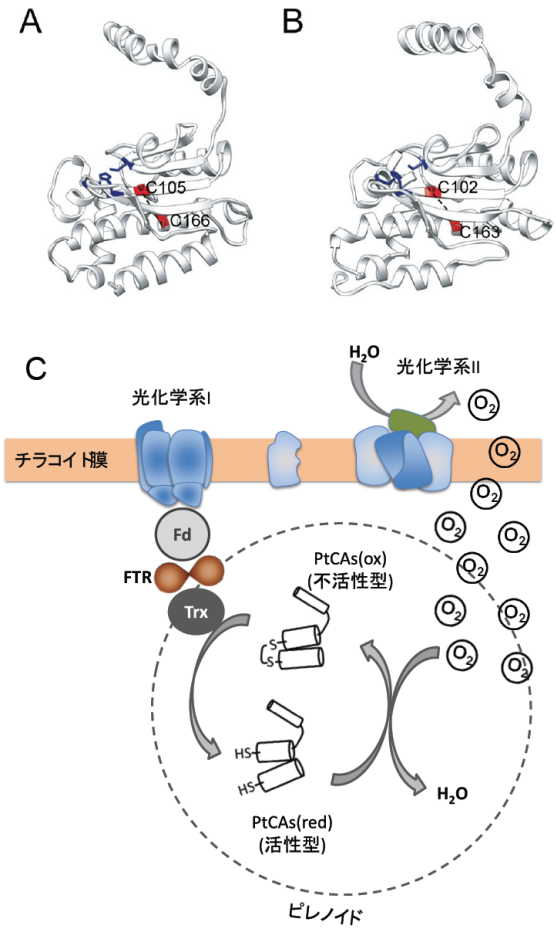


図2　PtCA1及びPtCA2の構造と酸化還元調節モデル
A，B，海洋性珪藻 *P. tricornutum* ピレノイド型 CA、PtCA1 および PtCA2 の構造モデルと、分子内ジスルフィド形成による酵素不活性化に働くシステイン残基（赤色）。参考文献29より抜粋。C，葉緑体内で予想されるPtCA1,2酸化還元制御モデル。Fd: フェレドキシン、FTR: フェレドキシン-チオレドキシン　レダクターゼ、Trx: チオレドキシン

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_3^-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_3^-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_2濃度環境下で特異的に発現が高くなるCO_2応答性タンパク質であり、CO_2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、葉緑体胞膜に局在するα型CAはCO_2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_2センシングと転写応答

ここまでに述べた珪藻の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_2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_2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_2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_2を混入した高CO_2大気条件ではほとんど転写されず、通常の大気レベルCO_2濃度に移すと、50倍程度までその転写量が増加する[30]。なお、転写抑制にかかわるCO_2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_2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_2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_2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[14]。興味深いことに低CO_2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_2環境下で効果的に高CO_2状態を模倣し、*ptca1*転写を抑制することが示されている[30,31]。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_2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、リンカースキャン、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_2とcAMPに応答するための必須配列であることが示され、CO_2/cAMP responsive element（CCRE）1～3 と名付けた(図3A)[32]。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_2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_2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_2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、

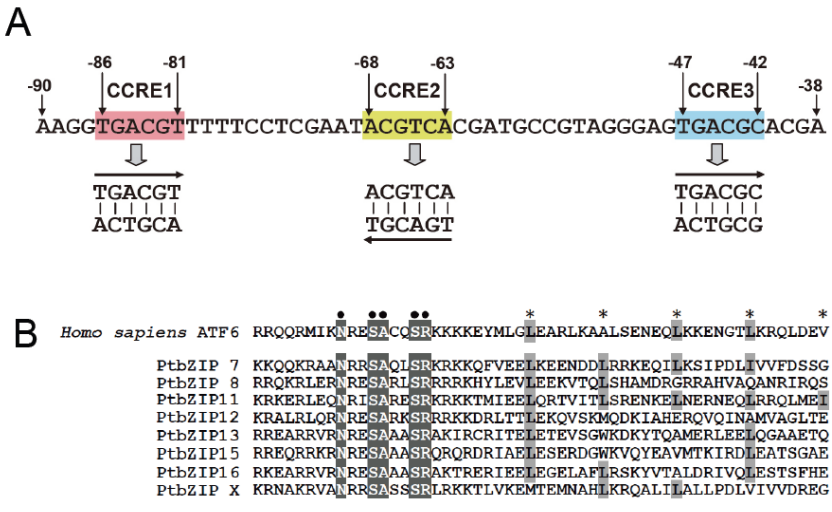


図3　*ptca1* プロモーターコア領域の構造と PtbZIPs

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[32]。

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[32]。

PtbZIP11よりさらに上流のシグナル伝達系、およびCO_2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型アデニル酸シクラーゼ（sAC）が進化の過程で保存されたCO_2センサーであることが報告されている[33]。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_2或いはHCO_3^-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[34]。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_2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でのCO_2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_3^-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_2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_4代謝系の関与、およびこれらを制御するCO_2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_2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., Thamatrakoln, 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., Otillar, 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 compartoment 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_2 in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Plant Cell Environ. 24*, 611-620.
15. Burkhardt, S., Amoroso, G., Riebesell, U. and Sültemeyer, D. (2001) CO_2 and HCO_3^- uptake in marine diatoms acclimated to different CO_2 concentrations, *Limnol. Oceanogr.* 46, 1378-1391.
16. Reinfelder, J.R., Kraepiel, A.M.L. and Morel, F.M.M. (2000) Unicellular C_4 photosynthesis in a marine diatom, *Nature 407*, 996-999.
17. Roberts, K., Granum, E., Leegood, R.C. and Raven, J. A. (2007) C_3 and C_4 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_2-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_2 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 tricornutum* 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 tricornutum*, *Plant Pysiol. 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 formI 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 bisphosphate 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 tricornutum*, *J. Biol. Chem. 287*, 20689-20700.
30. Harada, H., Nakatsuma, D., Ishida, M. and Matsuda, Y. (2005) Regulation of the expression of intracellular β-carbonic anhydrase in response to CO_2 and light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Plant Physiol. 139*, 1041-1050.
31. Harada, H., Nakajima, K., Sakaue, K. and Matsuda, Y. (2006) CO_2 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_2-cAMP-responsive cis-elements targeted by a transcription factor with CREB/ ATF-like basic zipper domain in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *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_2 acquisition systems in response to CO_2 concentration, *Photosynth. Res. 109*, 191-203.

Studies on CO_2 Acquisition and CO_2 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

報告記事

若手の会活動報告
～第七回セミナー開催、サイエンスアゴラ2012出展～

東京大学 大学院総合文化研究科
成川　礼

10月13–14日にかけて、若手の会第七回セミナーを長野県の中房温泉にて開催し、36名の参加がありました。初日は参加者全員の自己・研究紹介と懇親会を行いました。二日目の午前中には、二次植物の代謝、ロドプシン型光合成、野外からの光合成細菌の単離に焦点を当てたセミナーを行い、午後にはシアノバクテリアと光合成細菌で構成される微生物マットの観察を行いました。初日の参加者全員による自己・研究紹介では、日を跨いでしまうくらい議論が白熱しました。セミナーとフィールドワークの詳細は、平出優人さん（名古屋大学）にご執筆いただいた参加報告記事をご覧ください。今回のセミナー企画では、特に、首都大学の松浦克美先生と学生さん達に多大な協力を頂きました。また、中房温泉の旅館の皆様にも格安での待遇を頂きました。この場を借りて、感謝申し上げます。

昨年、アウトリーチ活動を介した一般社会との対話的交流の必要性を感じ、サイエンスアゴラ2011に若手の会として出展しましたが、今年もサイエンスアゴラ2012に参加しました。昨年は時間枠出展で交流時間が限られていたので、今回は2日間の常時出展で、より深い交流を目指しました。その報告記事も掲載されていますので、あわせてご覧下さい。

セミナーの集合写真

報告記事

日本光合成学会若手の会第7回セミナーに参加して

名古屋大学 大学院 生命農学研究科
平出　優人

平成24年10月13、14日と二日間の日程で光合成若手の会第7回セミナーが行われました。私にとって昨年度に引き続き今回が二回目の参加となります。これまでのセミナー内容に加え今回は開催地である中房温泉で見られる微生物マットの観察を行うフィールドワークも執り行って頂きました。三つの講演、各参加者の発表、フィールドワークという非常に有意義で魅力的なセミナーであったと思います。今回は主に講演の内容とフィールドワークに参加して感じたことについてご報告したいと思います。

一つ目の講演は辻敬典博士（筑波大学、生命環境科学研究科）による「二次共生藻の光合成炭素代謝の特徴」でした。植物のオルガネラである葉緑体の成立はかつてシアノバクテリアが宿主細胞と細胞内共生した結果であることはよく知られていますが、そのような真核藻類をさらに細胞内に共生させて光合成能力を獲得した生物たちが存在します。このように二次共生によって生まれた植物（二次植物）はハプト藻、珪藻、ユーグレナなど多様に分布し、また二度の共生過程を経ているため、炭素代謝経路や膜構造において様々な面白い特徴が見られるそうです。このような点やゲノム情報から推察される二次植物の進化過程について話され、非常に魅力的な講演でした。

二つ目の講演は吉澤晋博士（東京大学、大気海洋研究所）の「クロロフィルとロドプシン　光をめぐる奇妙な関係」でした。クロロフィル型の光合成とは異なり、ロドプシンによって行われる光合成は普段の研究生活では触れる機会がなく非常に興味深いものでした。ロドプシンを保持する細菌は単離培養することが非常に難しいこともあって、生理学的な解析が困難だそうです。吉澤博士はメタゲノム解析によって、海洋には予想以上にロドプシン型光合成を行う細菌が繁栄していること、また海洋の生態系に重要な役割を担っている可能性があるということを話されました。普段、光合成関連の研究に携わる研究者は私を含め陸上植物に代表されるクロロフィル型の光合成に注目が行きがちです。今回ロドプシン型光合成という異なる機構によって機能する光合成について知る機会を頂き、生物の光利用の新たな一面を知ることができました。

三つ目は花田智博士（産業技術総合研究所）の「*Roseiflexus castenholzii* の中房温泉からの分離」です。花田先生は開催地である中房温泉の微生物マットから *Roseiflexus castenholzii* という光合成細菌の分離培養に初めて成功された方です。中房温泉では、好熱性のシアノバクテリアや光合成細菌が形成する微生物マットを観察することができます。その中で赤色のバクテリア層を形成するのが *Roseiflexus castenholzii* だそうです。花田博士は *Roseiflexus castenholzii* を含め菌株の単離培養の難しさ、そしてそれ以上に、面白さをユーモアを交えながら熱く語っていただきました。特に細菌の擬人化という表現が面白く、光合成細菌への知見がより一層深まると共に、花田博士の研究者

中房温泉に見られる微生物マット
写真（左）：コンクリート壁から漏れ出す温水に沿ってシアノバクテリア、光合成細菌、化学合成細菌などが生息し、優占種の違いによって様々な色となる。
写真（右）：緑色の好熱性シアノバクテリアおよび赤色の光合成細菌 Roseiflexus castenholzii が見られる。写真（右）提供：浅井智宏（名古屋大学）

としての熱い姿勢や考え方がとても印象的でした。

今回の講演は光合成細菌から二次植物、更にはロドプシン型光合成に至まで、非常に多様である「光合成」のあり方について考えさせられました。また生命を支える光のエネルギー源としての重要性を再認識できたという点でも今回の講演は非常に有意義であったと思います。

上記の講演に加えて、二日目の午後には今回のセミナーのもう一つの重要な目的である微生物マットの観察に参加させて頂きました。中房温泉の水温は摂氏60-70度にもなります。そのような高熱環境に生息する好熱性のシアノバクテリアや光合成細菌を実際に目で見て、そして手で触れて実感する機会を頂きました。微生物マットはシアノバクテリアの深い緑に光合成細菌の赤が混じりとてもカラフルです。今回そのような自然環境で形成される微生物マットを観察して最も強く感じたことは、逆説的ですが、私たちが普段研究室で保持しているモデル生物たちは非常に特殊であると言うことです。私自身は実験のため、通常、恒常的な生育条件でシアノバクテリアを培養しています。その一方で、研究室での彼らはやはり自然界での姿とはいくらか異なります。自然界で彼らは他生物と相互作用し、常にその生育環境は変動するはずです。多くの研究が生物の発達させてきた様々なメカニズムを理解するために行われています。そして私自身もそのような研究を行う一人ですが、自然環境にこそ生物がもつメカニズムの本質が存在することを理解した上で、研究を進めなければならないと感じました。

また今回詳しくご紹介できませんが、一日目には参加者ひとり一人が自身の研究テーマについて発表を行い、それらも生物物理的な視点から生理学まで非常に幅広く、とても興味深く聴かせて頂きました。

総括して、このセミナーを通して、自身の研究分野から少し離れた様々な研究分野に触れられたことで、自身の視野を広げられたと思います。そして改めて「光合成」という一つのテーマに対し、まだまだ未知の領域があり、私たちがこれから解き明かしていくべき課題が無数に存在していることを感じました。そして私自身、その中のほんの一部でも明らかにし光合成分野の発展に貢献できるよう、これからも研究に従事していきたいと思います。

最後になりましたが、セミナーを主催して頂いた東京大学の成川礼先生にこの場をお借りして感謝申し上げます。

報告記事

サイエンスアゴラ2012
「世界を支える光合成　～植物のチカラを感じてみよう～」 出展報告

[1]名古屋大学 大学院 理学研究科
[2]大阪市立大学 複合先端研究機構
[3]筑波大学 大学院 生命環境科学研究科
[4]自然科学研究機構 基礎生物学研究所
[5]大阪府立大学 大学院 理学系研究科
[6]東京大学 大学院 総合文化研究科
[1]浅井　智広、[2]川上　恵典、[3]辻　敬典、[4]大西　紀和、[5]岡島　公司、[6]成川　礼

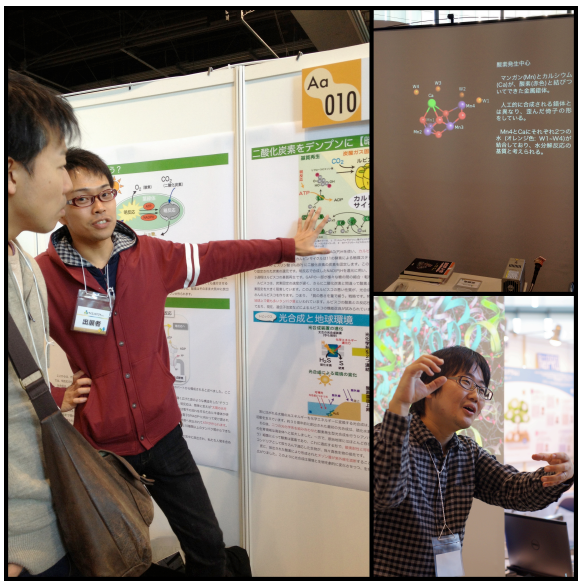
活動内容の報告

「サイエンスアゴラ」は、独立行政法人日本科学技術振興機構が主催する科学と社会のコミュニケーションを目的としたイベントである。原則として誰でも無料で自由に参加でき、小さな子供からお年寄り、さらには外国人の方など、様々な人が集う。出展企画は公募で決定され、サイエンスアゴラの趣旨に沿う企画であれば特別な条件は一切無く、誰でも応募することができる。今回で7回目を数え、今年は「見つけよう　　あなたと「科学」のおつきあい」をテーマに、2012年11月10~11日に東京都お台場にある日本科学未来館を中心とした国際研究交流大学村で開催された。光合成学会若手の会では、光合成研究のアウトリーチ活動の一環として、昨年から出展者側で参加している。

今回は「世界を支える光合成　～植物のチカラを感じてみよう～」と題した出展企画が採択され、常設ブースでの光合成研究の展示および解説、デモ実験などを行った。昨年の時間枠指定の展示では参加者とのコミュニケーションが不十分であったことを反省し、直感的で話題にしやすい内容を考え、参加者との相互のコミュニケーションに重きを置いた。会場内の見通しの良い区画をいただいたことや開催期間中の天候にも恵まれたことで、予想以上にたくさんの参加者がブースで足を止めてくださった。終わってみれば、用意していた200部以上の小冊子「光合成ってなんだろう？　～光と植物の不思議～」（若手の会の有志で作成した一般向けの解説書、光合成研究 2011, 21(3), pp.137-141を参照）をほぼ全て配布してしまう嬉しい結果となった。さらに嬉しいことに、本企画はサイエンスアゴラにふさわしい、科学に対する人々の興味関心を広げる優れた企画として、「サイエンスアゴラ賞」にも選ばれた。具体的な活動内容は以下の通りである。

1) 光合成を解説したパネル展示

小冊子「光合成ってなんだろう？　～光と植物の不思議～」の各ページをＡ０サイズのポスターで掲示



し、訪れた参加者に光合成の基礎や応用研究への展開を解説した。参加者のなかには普段から光合成に興味を持ち、自分なりの意見や疑問をもっている方も多かった。そのような方々、ひとりひとりの質問や要望にリアルタイムで応えていくことで、お互いの理解や今後の光合成研究の在り方を考える良い機会が得られた。

2) 光合成装置の結晶構造の映像

光化学系I、II、シトクロムb_6f複合体、F_oF_1-ATP合成酵素の結晶構造を解説した動画を作成し、大型のスクリーンに映し出すことで、訪れた参加者に光合成装置の精巧さや複雑さを解説した。また、最新のトピックである光化学系IIの結晶構造解析の成果をアピールし、光合成研究の面白さや難しさを伝えた。多くの参加者が構造の美しさとその解明までの長い道程に感動してくださった。また、今後の応用研究に期待される方も多かった。

3)光合成に関するデモ実験

光合成と色の密接な関係について、直感的に感じることができるデモ実験を行った。カラフルな色素や光源が目に止まり、多くの参加者が実験に参加してくださった。実験自体の面白さと詳しい解説で、多くの年代の参加者に光合成に自然に興味をもってもらうことができたと感じる。

1. 薄層クロマトグラフィーによる光合成色素の分離

ホウレンソウの葉緑体やスピルリナ、クロレラなど

を用意し、シリカゲルの薄層をつかったクロマトグラフィーを体験してもらった。わずか数分の間に様々な色素が分離していく様に、小さな子供だけでなく、年配の方もじっと見入るのが印象的だった。

2.　水草の二酸化炭素吸収による作用スペクトルの可視化

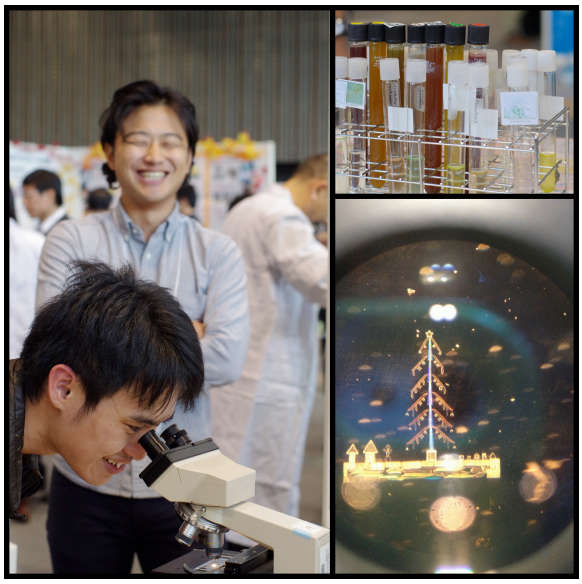
オオカナダモに単色LEDで光照射し、二酸化炭素の発生をpH指示薬によって可視化した。多色のLED光源を使い、赤色の光でもっとも光合成活性が高くなり、緑色のクロロフィル色素が光合成を駆動していることを感じてもらった。

3. 色素タンパク質の光照射実験

同じフィコビリン色素を結合しているフィコシアニンとシアノバクテリオクロムに赤色光を照射し、蛍光や光変換を見てもらうことで両者の構造や機能の違いを感じてもらった。シアノバクテリオクロムの色が一瞬の光照射で変わることに多くの参加者が驚き、集光装置の多様性や光受容の重要性を伝える良いきっかけになった。

4) 様々な光合成生物の観察

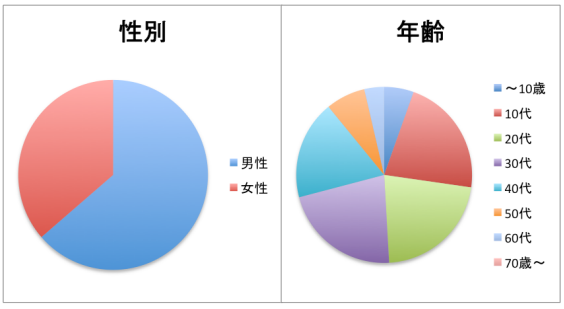
高等植物であるシロイヌナズナをはじめ、ほぼ全ての分類群を網羅した20種の藻類、様々な色の光合成細菌を展示した。微細藻については光学顕微鏡を用意し、スピルリナの螺旋やユーグレナのすじりもじり運動、珪藻の殻の幾何学模様などを観察してもらった。なかでも様々な珪藻の殻を並べて作ったミクロのクリスマスツリーに感動する参加者が多かった。緑色だけではない光合成生物のカラフルさや多様な形態を実感してもらうことで、色素の多様化や多段階の



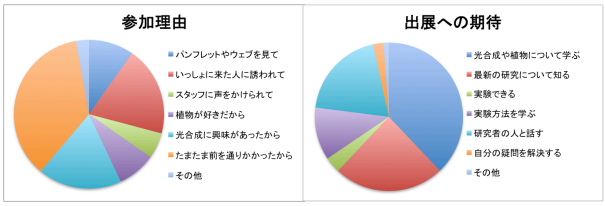
細胞内共生という複雑な光合成生物の進化の面白さを参加者に伝えることができた。

アンケートを基にした今回の出展の評価

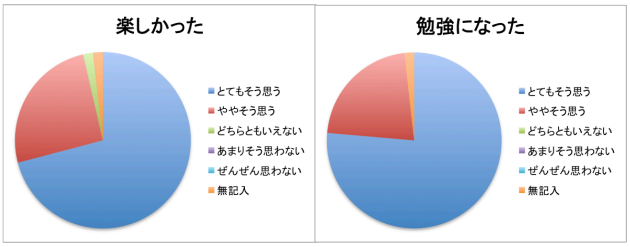
今回の出展では、来場者の方々にアンケートに答えてもらった。初日の午前中は来場者への対応で慌ただしく、アンケートを配布できなかったが、初日の午後からアンケートを配布し、55名の皆様に答えて頂いた。まず、男女比、年齢構成をみると、男女まんべんなく、幅広い年齢層の方々に参加いただけたことが分かる。



参加理由として、「たまたま前を通りかかったから」という理由が最も多かったことは好ましい。光合成に特に興味を持って来場したわけではない方々に光合成研究をアピールできたことは大きな収穫である。もちろん、光合成に興味があったという方々にも多く参加いただけた。また、出展への期待として、「光合成や植物について学べる」や「最新の研究について知る」が多かった。私たちと参加者、お互いの目的がよく合致していたといえる。

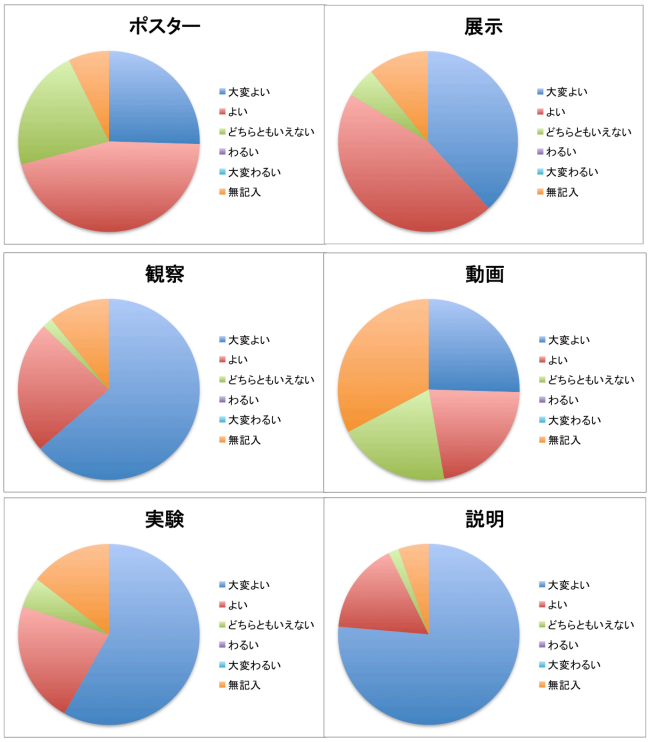


ほぼ全ての来場者の方々が本出展について、「楽しかった」、「勉強になった」と感じてくれたのは素直に嬉しいことである。



ポスター、展示、動画、実験、説明のそれぞれについて評価項目を設けたが、全ての項目において、良い評価をいただいた。特に、観察、実験、説明の項目の評価が高かった。来場者自らが参加し、相互に交流できる機会を設けることがアウトリーチ活動において重要であると実感した。

配布した冊子については、まだ読んでいない方も多かったが、図が大きく、重要部分を赤字でハイライトしてある点を特に評価していただいた。また、本出展について良かったところ、悪かったところを挙げ



てもらったところ、良かった点として、説明の丁寧さ、スタッフの熱心さ、実際に生物を観察し実験できる点などを評価いただいた。一方、悪かった点としては、時間が足りない、ちょっと狭い、実験が順番待ちになるなどの出展の制約上対応が難しいことが多かったが、「研究成果が具体的にどういった効果があるのか分かりやすくすると良い」や「系統立てて説明するともっと分かりやすい」といった今後にフィードバックできる貴重な意見もいただけた。また、自由記入欄では、「皆さんの熱い気持ちが伝わりました」、「なんだか、とっても好感を持ちました。活躍してね！」など、こちらの熱意に負けず劣らずの熱い声援をいただけた。総じて、光合成研究に対するポジティブな思いを、来場者の方々から受け取ることができた。

出展で見えてきたアウトリーチ活動の意義

研究者にとって、アウトリーチ活動は基本的にボランティアである。サイエンスアゴラの出展も若手の会の有志によるボランティアで運営しており、本会から材料費や出版費用の一部を援助いただいているものの、旅費などの必要経費のほとんどは基本的に自費である。そのような背景から、アウトリーチ活動で研究者側に得るものが少ないと考える者は少なくない。しかし、過去2回のサイエンスアゴラでの出展で私たち若手研究者が感じた取ったものは、このような不安を払拭するものであった。

第一に、一般社会で科学へ高い関心をもつ人が決して少なくないことである。今回のデモ実験では、子供が純粋な興味で実験を楽しんでいる一方で、その親御さんが「お母さんの方が面白いわ」と実験の解説に興味津々で聞き入るといったパターンが多かった。カラフルな光合成生物を見てアートにたとえて感動する方もおられた。参加者の多くが決して科学に明るいわけではないなかで、幅広い背景の方に光合成研究に対して興味を持って頂けたことは、研究の面白さや重要性を伝える努力が如何に大切であることを物語っている。また少し違う観点では、小学校に通う前の子供とその親御さんの興味を得られたことは、遠い将来の優秀な研究者の育成にも繋がるのではないだろうか。

第二に、基礎研究と応用研究の重要性を多くの参加者に理解してもらえたことである。研究者の中には、研究の方向性を社会に委ねると応用的な研究しかできなくなると考えている者もいる。今回の出展でも人工光合成や藻類による油産生といった最新のトピックに興味を持ってブースを訪れる参加者も少なくなかったが、解説や応答では「できることだけでなく、わからない、すぐにはできないことも暈かさず伝える」、「直接的な応用を目指していない基礎研究も重要であることを伝える」ことを心がけた。参加者に真摯に応対し、研究を長い目で見て欲しいということを素直に伝えたことで、現状を理解したうえで改めて光合成研究に期待して下さる方が多かった。

第三に、中等教育現場とのフィードバック関係を考えるきっかけになったことである。将来の光合成研究を考えた場合、新たな研究者の参入が不可欠であり、中学校や高等学校での光合成の教育は重要である。今回の出展では、中学生や高校生の他、教員の方やその卵の参加も目立った。最近の中等教育の現場では、光合成に興味をもつ学生が増えてきているものの、光合成は奥深くて独学も難しく、教育や実習、課題の与え方に困っている現状があるらしい。この問題を私たち若手の会だけで解決することはできないが、対話する機会ができたことを非常に喜ぶ教員の方が多く、光合成学会として参加する意義を感じた。

今後の活動

研究に必要になる資金は、多くの場合、科学研究費補助金などの公的な競争的資金で賄われている。従って、研究者にはパトロンである一般社会に成果を伝える義務がある。普段の研究生活では文部科学省や日本学術振興会、科学技術振興機構とのやりとりを中心に考えてしまいがちだが、今回サイエンスアゴラ2012での出展を通じて、一般社会との直接的なコミュニケーションの重要性を再認識できた。ボランティアで参加した若手の会有志全員にとって、各々の光合成研究の展開を考える良い機会となった。また、今企画がサイエンスアゴラ賞を受賞したことは、一般の方々、他の出展の方々、運営する方々も、光合成研究を重要と感じ、光合成研究者の今後のアウトリーチ活動にさらなる期待を抱いていることの証左であろう。今後はサイエンスアゴラに継続して参加する他、関東地区以外でもアウトリーチ活動を模索し、幅広い若手研究者に一般社会とのコミュニケーショ

ンの機会を設けたい。このような活動は地道ではあるが、将来的に本会の拡大、さらには光合成研究の発展に繋がると信じている。

謝辞
今回の出展にあたっては、若手の会幹事以外の多くの方にサポートして頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

国立環境研究所　志村遥平（展示用の株および珪藻アートプレパラートの提供）
筑波大学　野村真美（展示用の株の提供）、馬場将人（展示株紹介用ポスターの作成、当日の運営）
東京大学　溝上祐介（植物体の提供、当日の運営）、佐々木大地（植物体の提供）、渡辺麻衣、清田浩史、榎本元、前田海成（事前準備、当日の運営）
東京工業大学　岩井雅子（当日の運営）
首都大学東京　嶋田敬三、清水隆之（光合成細菌の提供）
化学同人　浅井（山田）歩（事前準備）
以上、敬称略

事務局からのお知らせ

★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：￥1,500、賛助法人会員年会費：￥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、０１９店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290　名前：ニホンコウゴウセイガッカイ）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

★会員名簿管理方法の変更と会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。昨年度、会費滞納者を名簿から削除するお願いをしました。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、会費未納が印字されています。ご都合のつくときに、会費を納入下さい。１年間会費を滞納された場合、次年度よりお名前が会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の分もあわせてお支払いいただきます。2011年1月に名簿の変更を行いましたので、複数年度の会費滞納者はおられなくなりました。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（shikanai@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

日本光合成学会会員入会申込書

平成　　年　　月　　日

日本光合成学会御中
　私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、平成　　年より会員として入会を申し込みます。

[　]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください
[　]　氏名（漢字）（必須）
　　氏名（ひらがな）
　　氏名（ローマ字）
[　] 所属

[　] 住所1
　〒

[　] 住所2（自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入）
　〒

[　] TEL1
[　] TEL2　(必要な方のみ記入）
[　] FAX
[　] E-mail

個人会員年会費　　1,500円　(会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む）
賛助法人会員年会費　　50,000円　(上記と会誌への広告料を含む）
（振込予定日：平成　　年　　月　　日）（会員資格は１月１日～１２月３１日を単位とします）
＊複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に（何年度～何年度分）とお書き下さい。

連絡先
〒153-8902　東京都目黒区駒場3-8-1
東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系
池内・成川研究室内　日本光合成学会
TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337
E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp
ホームページ: http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp
郵便振替口座　加入者名：日本光合成学会　口座番号：00140-3-730290
銀行振込の場合　ゆうちょ銀行、０１９店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290
　　名前：ニホンコウゴウセイガッカイ

日本光合成学会会則

第１条　名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

第２条　目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

第３条　事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

第４条　会員

１．定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

２．権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることができる。

３．会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

第５条　組織および運営

１．役員

本会の運営のため、役員として会長１名、事務局長１名、会計監査１名、常任幹事若干名をおく。役員の任期は２年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

２．幹事

幹事数名をおく。幹事の任期は４年とする。幹事の再任は妨げない。

３．常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

４．幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

５．事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

６．役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定され

る。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

第６条　総会

１．総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。

２．幹事会は総会において次の事項を報告する。

１）前回の総会以後に幹事会で議決した事項

２）前年度の事業経過

３）当年度および来年度の事業計画

３．幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。

１）会計に係わる事項

２）会則の変更

３）その他の重要事項

第７条　会計

本会の会計年度は１月１日から１２月３１日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

付則

第１　年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。

第２　本会則は、平成１４年６月１日から施行する。

第３　本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第５条に定める規定にかかわらず、平成１４年５月３１日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成１４年１２月３１日までとする。

第４　本会則の改正を平成２１年６月１日から施行する。

日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

1. 幹事会：

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。

2. 事務局：

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期（10年）を目途に再任されることが望ましい。

3. 次期会長：

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。

4. 常任幹事会：

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

幹事会名簿

秋本誠志*	神戸大学大学院理学研究科
浅田浩二	京都大学
池内昌彦	東京大学大学院総合文化研究科
池上　勇	帝京大学
泉井　桂	近畿大学生物理工学部生物工学科
伊藤　繁	名古屋大学
井上和仁	神奈川大学理学部
臼田秀明	帝京大学医学部
榎並　勲	東京理科大学
遠藤　剛*	京都大学大学院生命科学研究科
大岡宏造	大阪大学大学院理学研究科
大杉　立	東京大学大学院農学生命科学研究科
太田啓之	東京工業大学
	バイオ研究基盤支援総合センター
大友征宇*	茨城大学理学部
大政謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科
小川健一	岡山県農林水産総合センター
	生物科学研究所
小野高明	茨城大学工学部生体分子機能工学科
小俣達男	名古屋大学大学院生命農学研究科
垣谷俊昭	名古屋大学
菓子野康浩*	兵庫県立大学理工学部
金井龍二	埼玉大学
神谷信夫*	大阪市立大学大学院理学研究科
熊崎茂一*	京都大学大学院理学研究科
栗栖源嗣*	大阪大学蛋白質研究所
小池裕幸	中央大学理工学部
小林正美	筑波大学大学院数理物質科学研究科
坂本　亘	岡山大学資源生物科学研究所
櫻井英博	早稲田大学
佐藤和彦	兵庫県立大学
佐藤公行	岡山大学
佐藤直樹	東京大学大学院総合文化研究科
佐藤文彦	京都大学大学院生命科学研究科
鹿内利治	京都大学大学院理学研究科
重岡　成	近畿大学農学部
篠崎一雄*	理化学研究所植物科学研究センター
島崎研一郎	九州大学大学院理学研究院
嶋田敬三	首都大学東京
白岩義博*	筑波大学生物科学系
沈　建仁	岡山大学大学院自然科学研究科
杉浦昌弘	名古屋市立大学
	大学院システム自然科学研究科
杉田　護	名古屋大学遺伝子実験施設
杉山達夫	名古屋大学
鈴木祥弘	神奈川大学理学部
園池公毅	早稲田大学教育学部
高市真一	日本医科大学生物学教室
高橋裕一郎	岡山大学大学院自然科学研究科
田中　歩	北海道大学低温科学研究所
田中　寛*	東京工業大学資源化学研究所
民秋　均*	立命館大学総合理工学院
都筑幹夫	東京薬科大学生命科学部
出羽毅久*	名古屋工業大学大学院工学研究科
寺島一郎	東京大学大学院理学系研究科
徳富(宮尾)光恵	農業生物資源研究所
	光合成研究チーム
鞆　達也	東京理科大学理学部
仲本　準*	埼玉大学大学院理工学研究科
永島賢治*	首都大学東京大学院理工学研究科
南後　守	大阪市立大学大学院理学研究科
西田生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
西山佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
野口　巧	名古屋大学理学研究科
長谷俊治	大阪大学蛋白質研究所
林　秀則	愛媛大学
	無細胞生命科学工学研究センター
原登志彦	北海道大学低温科学研究所
彦坂幸毅	東北大学大学院生命科学研究科
久堀　徹	東京工業大学資源化学研究所
日原由香子*	埼玉大学大学院理工学研究科
檜山哲夫	埼玉大学
福澤秀哉	京都大学大学院生命科学研究科
藤田祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
前　忠彦	東北大学
牧野　周	東北大学大学院農学研究科
増田真二*	東京工業大学
	バイオ研究基盤支援総合センター
増田　建	東京大学大学院総合文化研究科
松浦克美	首都大学東京都市教養学部
松田祐介*	関西学院大学理工学部
真野純一*	山口大学農学部
皆川　純	基礎生物学研究所
宮下英明*	京都大学大学院地球環境学堂
宮地重遠	海洋バイオテクノロジー研究所
村田紀夫	基礎生物学研究所
山谷知行	東北大学大学院農学研究科
横田明穂	奈良先端科学技術大学院大学
	バイオサイエンス研究科
和田　元	東京大学大学院総合文化研究科

*平成23年より新幹事

編集後記

「光合成研究」の編集を終えるにあたって

東京大学 大学院 総合文化研究科
増田　建（日本光合成学会　常任幹事・会誌担当）

前任の野口巧先生より引き継ぎ、2009年の「光合成研究」19巻1号（通巻54号）から今号（通巻65号）に至る迄の4年間、合計12巻の編集を担当しました。今号をもって任期満了となり、後任の編集担当である東京大学の野口航先生にバトンタッチすることとなります。この4年間の間には、東日本大震災が発災するなど、いろいろな出来事がありました。正直な感想として、ようやく次の方にリレーすることが出来て、ほっとしています。

思い起こせば、4年半程前に池内先生が会長選挙で選出されたとの話を朝の通勤途中に成川さんから聞き、嫌な予感を覚えていたところ、丁度その日に池内先生が私の研究室に尋ねてこられて、会誌編集をお願いされたのが始まりで、それからの自転車操業の日々でありました。会誌編集を始める上で考えたことは、丁度、「日本光合成研究会」が「日本光合成学会」へと移行する時期に当たったため、「研究会誌」から「学会誌」にどのように脱皮し、成長していくべきかということでした。記憶を整理する意味で、この4年間に行なってきた学会誌への取り組みについてまとめておきたいと思います。全てが成功した訳でなく、失敗に終わったものや、まだまだ改革途上にあるものも残っています。

日本光合成学会に移行するに当たっての池内新会長の意向は、生物領域だけでなく化学や生物物理、生態などの広い領域からの光合成研究者の参加を募りたいというものでした。それまでの1人だけの編集体制では、とても広い領域をカバーすることは叶わないため、まず編集委員会を立ち上げることとしました。しかし、私の余裕の無さから、なかなか編集委員会で会誌の内容について有意義な検討を行なうことが出来ず、有効に機能したとは言えません。ただ私が編集に困った時には、編集委員の先生に泣きつき、随分助けて頂きました。お引き受け頂いた先生方に心から感謝致します。また投稿して頂いた記事原稿について、査読を行うことを始めました。これは特に若手研究者や学生が執筆した原稿について、第三者の評価・批評を得ることにより、論文執筆を訓練するとともに、研究業績としても活かしてもらおうというもので、これによって記事の内容も随分レベルアップしたのではないかと考えています。また頂いた原稿に、英語のタイトルを付けることも始めました。本当は英語のアブストラクトも掲載すべきと考えていますが、未だ日本語要約も付けていない段階ですので、これらについては今後の検討課題だと考えています。

また会誌を電子ファイルとして、ウェブサイト上で公開していたことに当たり、著作権の委譲について明確化しました。さらに会誌の国会図書館への寄贈とJSTの科学技術文献データベースJDreamIIへの収録、またISSN番号（1884-2852）を取得することで、国際的な学術雑誌としてデータベース上で検索できるようにしました。

会誌の内容については、学会誌として読んでいてもっと楽しく、学術的に価値あるものにしたいと考えていました。これまでの学会参加などの報告記事も良いのですが、日本語のまとまった解説を特集として掲載すれば、学会誌として多くの会員の方に手に取って頂けるのではないかと考えました。そこで、各号に解説特集を設けることにしました。この解説特集に当たっては、毎回 Guest Editor に編集をお願いすることで、より広い分野の先生に執筆をお願いするとともに、原稿収集および編集作業を分担することが出来ました。その後、解説特集については、毎年開催されるシンポジウムのオーガナイザーに Guest Editor をお願いし、シンポジウムのスピーカーを中心に解説記事を執筆して頂く形にしました。これにより、シンポジウムに参加できなかった学会員もシンポジウムの内容を知ることが出来、また原稿収集の作業も計画的に行なえるようになりました。またシンポジウムでのポスター発表や口頭発表の発表賞受賞者に、記事を執筆して頂く形も定着しました。会誌の編集に当たって、もっとも頭を悩ませるのが記事の執筆依頼ですが、以上の方式で編集作業を行うことにより、随分計画性を持っ

て会誌の内容を編集できるようになってきたと考えています。勿論、中には原稿を”飛ばす”不埒な輩も居られましたが、殆どの方は良心的に原稿の締め切りを守って頂きました。

会誌の体裁については、これまでのやり方を踏襲するようにしましたが、よりすっきりしたデザインになるように心がけました。表紙を含む外装のデザインは配送担当の和田先生が担当されました。また目立たないながら、背表紙を付けることで、本棚に置いておいても探しやすくなるようにしました。

以上、振り返ればそれなりにいろいろと試みてきたようにも思います。会員の方々から、直接フィードバックを頂く機会がなかなか無いため、果たして現在の会誌がどのように評価されているかは分かりませんが、学会年会費の安さを考えれば、本会誌の内容は日本の学会の中でも有数のお得感があるのではないかと自負しています。学会誌はその研究分野のアクティビティを示す鏡です。この4年間で、光合成研究を取り巻く環境も随分変わってきました。これから、さらに多くの若手学生や研究者を引き込めるような、魅力ある「光合成研究」にしていく必要があります。その意味では、ますます活性化している若手の会の活動には、今後も多いに期待していきたいと考えています。本会誌についても、多くの方々が”自発的”に、「光合成研究」に原稿を投稿したいと思えるような会誌に成長できるように祈念しております。

編集作業の分業化も今後の課題です。これまで全ての編集作業を手弁当で行なってきたため、安い年会費でも運営できましたが、個々人の負担の上に発行を続けていくには限界があります。研究時間を割かずに如何に効率的に編集を行なっていくかは、次期会長の体制の基で真剣に検討をお願い出来ればと存じます。

最後に、「光合成研究」の編集を終えるにあたり、この４年間に記事を執筆して下さった多くの執筆者の方々、編集委員の先生方、池内会長並びに常任幹事、幹事の方々にお礼を申し上げます。

記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

○トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
○解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
○研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方々からの投稿を期待しています。
○集会案内：研究会、セミナー等の案内。
○求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
○新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎いたします。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集担当、増田（ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp) まで御連絡下さい。

****
「光合成研究」編集委員会

編集担当　　増田　建（東京大学）
発行担当　　和田　元（東京大学）
編集委員　　栗栖源嗣（大阪大学）
編集委員　　野口　航（東京大学）
編集委員　　増田真二（東京工業大学）
****
日本光合成学会　2011-2012年役員

会長　　池内昌彦（東京大学）

事務局　　鹿内利治（京都大学）

常任幹事　　沈　建仁（岡山大学）　（日本光生物学協会）
常任幹事　　和田　元（東京大学）　（会誌担当）
常任幹事　　増田　建（東京大学）　（会誌担当）
常任幹事　　佐藤直樹（東京大学）　（ホームページ担当）
常任幹事　　寺島一郎（東京大学）　（企画担当）
常任幹事　　西田生郎（埼玉大学）　（企画担当）
常任幹事　　小林正美（筑波大学）　（企画担当）
常任幹事　　原登志彦（北海道大学）　（企画担当）
常任幹事　　牧野　周（東北大学）　（企画担当）
常任幹事　　伊藤　繁（名古屋大学 名誉教授）　（企画担当）
常任幹事　　太田啓之（東京工業大学）　（企画担当）
常任幹事　　皆川　純（基礎生物学研究所）　（企画担当）

会計監査　　田中　歩（北海道大学）
****

光合成研究　第22巻　第3号　（通巻65号）　2012年12月31日発行

日　本　光　合　成　学　会
〒153-8902　東京都目黒区駒場3-8-1
東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系
池内・成川研究室内　日本光合成学会
TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337
E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp
ホームページ: http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp
郵便振替口座　加入者名：日本光合成学会　口座番号：00140-3-730290
銀行振込の場合　ゆうちょ銀行、０１９店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290
　　名前：ニホンコウゴウセイガッカイ