

氏名(本籍)	つじ 辻	よし 敬	のり 典(福岡県)
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4991号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Study on the Pathway of Photosynthetic Carbon Assimilation in the Coccolithophorid <i>Emiliana huxleyi</i> (Haptophyta)</b> (円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> (ハプト植物門) の光合成炭素固定経路に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	白岩善博
副査	筑波大学教授	理学博士	濱健夫
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	石田健一郎
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	鈴木石根

### 論文の内容の要旨

円石藻は海洋に生息する単細胞藻類であり、細胞表面に“円石”と呼ばれる石灰質の殻を保持する。円石藻の代表種である *Emiliana huxleyi* は、世界中の海洋に広く分布し、大規模増殖を引き起こす。光合成と石灰化により炭素を固定し、かつバイオマスが大きいことから、*E. huxleyi* は地球規模の炭素循環に影響を与える重要な生物である。また、円石藻は、紅藻の二次共生により生じたハプト植物門に属し、系統的には一次共生により生じた緑色植物とは全く異なり、緑色植物とは異なる細胞構造や代謝産物を持つ。現在まで、光合成炭酸固定に関する研究は、主に緑色植物を中心に進められてきた。そのため、円石藻も含めた二次植物の炭酸固定に関する知見は少なく、代謝レベルでどのような特徴を持つかは不明である。近年になり、二次植物である珪藻のゲノムが解読され、二次植物の炭素代謝が一次植物のそれとは異なる特徴を有することが推測されている。本研究は、二次植物における光合成炭素代謝の多様性の一端を解明するため、二次植物であるハプト植物門に属し、その中でも炭酸カルシウム結晶形成能や地球規模のバイオマス生産能を有する *E. huxleyi* について、その光合成炭酸固定経路を明らかにすることを目的としたものである。

申請者は、光合成初期産物としてどのような化合物が生じるかを明らかにするために、 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  を基質としたトレーサー実験を行った。その結果、初期代謝において、リン酸化合物が初期に多くラベルされたこととパルス・チェイス実験の結果、リン酸化合物に取り込まれた  $^{14}\text{C}$  が、時間と共に他のアミノ酸や脂質に移行することを見出した。これらの結果から、*E. huxleyi* では、 $\text{C}_3$  回路が最初の炭酸固定経路として機能していることを明らかにした。光合成初期産物として  $\text{C}_4$  化合物 (Asp) もラベルされたが、これは  $\text{C}_4$  光合成によるものではなく、 $\text{C}_3$  回路で、生じた  $\text{C}_3$  化合物に  $\text{CO}_2$  ( $\text{HCO}_3^-$ ) が付加されて、 $\text{C}_4$  化合物に変換されていると考えられる。このように、 $\text{C}_3$  化合物を  $\text{C}_4$  化合物に変化する反応は、 $\beta$ -カルボキシレーションと呼ばれている。*E. huxleyi* では、他の藻類と比較すると、 $\text{C}_4$  化合物生成の割合が多いことから、 $\beta$ -カルボキシレーションの寄与が大きいと考えられる。

$\beta$ -カルボキシレーションを触媒する酵素としては、ピンビン酸カルボキシラーゼ (PVC), ホスホエノー

ルピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC), ホスホエノールピルビン酸カルボキナーゼ (PEPCK) の3種が知られている。そこで、これらの酵素のうち、どの酵素が光合成時の  $C_4$  化合物生成に関与するかを明らかにするために、明・暗での発現解析を行うことにした。*E. huxleyi* の expressed sequence tag (EST, 発現している遺伝子のライブラリ) を検索し、PYC, PEPC, PEPCK の各酵素と高い相同性を示す cDNA 配列を得てプローブを作製し、ノーザン解析により、明・暗での転写産物量の比較を行った。その結果、PYC および PEPC 転写産物は光照射により増加したが、PEPCK 転写産物量は顕著に減少した。このパターンは、PYC と PEPC は光合成に積極的に関与し、PEPCK の関与は低いことを示唆する。続いて、円石藻の細胞破碎液中の各酵素の酵素活性を測定した。酵素活性は、明条件で培養した細胞と、24 時間暗順化させた細胞で測定した。その結果、明条件下で、の PEPC 活性は、暗条件下の約 5 倍だった。PEPCK 活性は、明条件下と暗条件下で同程度だった。これらは、PEPC が明暗により酵素レベルでも強く調節を受けているが、PEPCK は酵素レベルでの調節は弱く、24 時間程度では変化しないことを示している。PYC 活性は検出することができなかったため、特異的抗体を用いたウエスタンブロットティングにより、タンパク質が発現していることを確認した。

光照射により転写産物が増加した PYC と PEPC の全長 cDNA 配列を決定し、予測されるアミノ酸配列を解析したところ、PYC の N 末端に、小胞体移行シグナルであるシグナルペプチド (SP) と、葉緑体移行シグナルであるトランジットペプチド様配列 (TP) が連続した、二重構造の移行シグナルが予測された。この、SP と TP から成る移行シグナルはハプト植物では葉緑体移行シグナルとして機能する。そのため、PYC 時葉緑体に局在すると考えられる。一方、PEPC は、ミトコンドリア移行シグナルであるプレ配列が予測されたため、ミトコンドリアに局在すると考えられる。

本研究により、円石藻 *E. huxleyi* の主要な炭酸固定経路は  $C_3$  回路であるが、 $C_3$  回路と平行して  $\beta$ -カルボキシレーションが機能し、 $C_4$  化合物が生成されることが明らかとなった。また、PYC と PEPC が積極的に光合成に関与することが示めされた。

## 審査の結果の要旨

本研究は、初めて PYC が光合成時の  $CO_2$  固定に関与することを発見した意義深い研究である。PYC 遺伝子はラン藻や陸上植物のゲノムには存在せず、そのため植物・藻類は PYC を持たないと一般的に考えられてきたが、本研究はそれを覆す優れた研究である。ハプト植物 *E. huxleyi* では、PYC と PEPC が、それぞれ葉緑体とミトコンドリアに局在すると予測されたが、これは既知の生物における局在とは異なる新規な知見である。これらの特徴が、他の二次共生藻類でどの程度普遍的に見られるのか、それとも円石藻に特有なのか非常に興味深い。本研究は、ゲノム解析と、生化学的実験を組み合わせることで、今まで見逃されてきた藻類の代謝の多様性を明らかにする研究の先駆けとなったことは高く評価できる。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。