

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における

CO₂ 及び光応答性プロモーターの比較解析

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 松田研究室 田中敦士

【研究目的】海洋性珪藻は細胞内に溶存無機炭素を濃縮する機構(CO₂-concentrating mechanism : CCM)を有している。当研究室の先行研究で CCM 関連因子である CO₂ 応答性発現を示すピレノイド局在型カーボニックアンヒドラーゼ(CA)遺伝子 *ptca1* のプロモーター(*Pptca1*)の解析を行った結果、転写開始点から-90~-40 bp に等間隔に互いに逆方向に配置する3つの *Cis* エlement CO₂/cAMP responsive element (CCRE)1~3 が CO₂ 応答に必須であることが明らかとなった。このうち CCRE2 が CO₂/光応答のコア配列であると同定され、CCRE1, 3 と協調して働き、機能を果たすことが示されている。また、類似した発現特性を示すピレノイド局在型 CA 遺伝子である *ptca2* のプロモーター(*Pptca2*)において、転写開始点から-367~-333 bp が CO₂/光応答に関係していることが明らかとなったが、詳細な解析は行われていない。本研究では、海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の *Pptca1* 及び *Pptca2* の CO₂/光応答配列の探索及び光シグナル伝達についての解析を行い、CO₂/光応答性プロモーターの活性制御機構を理解することを目的とする。

【実験方法】① *Pptca2* における CO₂ 光応答シスエレメントの探索 *Pptca2* (-1312~+48 bp)の直下に *uidA* を連結し、上流-367~-323 bp の領域内を、制限酵素サイト NotI 認識配列を4塩基ずつずらして置換した形質転換株及び特異的部位を制限酵素サイト NotI 認識配列で置換した形質転換株を用い、GUS レポーター解析を行った。② 光質の違いによる応答性の確認 455, 520, 595 及び 635 nm の波長の LED 光源を用いて光質を変化させ、GUS レポーター解析により *Pptca1* 及び *Pptca2* の光応答性を確認した。③ 光化学系阻害剤の光合成活性及び生育への影響 濃度の異なる阻害剤を添加し、酸素電極を用いた光合成活性及び生育速度を測定することで細胞生育に毒性を示すが致死的ではない薬量を決定した。④ *ptca1* 及び *ptca2* の発現量解析 光化学系阻害剤もしくは脱共役剤で処理し、Air 環境下で培養した細胞から全 RNA を抽出し、定量的 PCR により *ptca1* 及び *ptca2* の発現量を測定した。

【実験結果と考察】① *Pptca2* 転写開始点上流-367~-333 bp 間を NotI 置換によるリンカースキャン解析を行った結果、CO₂ 及び光応答の消失は見られなかった。しかし、2箇所が存在する CCRE2 の両方を置換した場合に完全な CO₂ 及び光応答の消失が確認された。このことから *Pptca2* における CO₂/光応答には一つの CCRE2 が必須であることが考えられた。また、CCRE1 を置換した場合に暗環境下における抑制が不安定になっていることが確認できた。CCRE1 単独では CO₂/光応答できないことから CCRE1 と CCRE2 が協調して光応答に関与している可能性が考えられた。② *Pptca1* と *Pptca2* は主に青色光に反応することが明らかになった。このことから、*Pptca1* と *Pptca2* の発現は青色光受容体からのシグナルと CO₂ 応答とのクロストークで制御されることが考えられる。③④ 光合成活性及び生育に影響の出る濃度の光化学系阻害剤を添加して定量的 PCR を行った結果、*Pptca1* の転写活性はプラストキノンプールへの電子伝達を阻害する DCMU 及び DCBQ において低下した。一方、*Pptca2* の転写活性は脱共役剤による ATP 合成阻害において低下した。このことから、*Pptca1* はプラストキノンプールサイズ、*Pptca2* は細胞内 ATP 量に反応して転写調節されることが考えられる。