

海洋性珪藻におけるリン酸獲得機構の解明

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 福地 庸平

【研究目的】リンは核酸、生体膜および生体内リン酸エステルなどの構成要素で、生体内の多くの代謝制御に関わり、地球上のあらゆる生命にとって必要不可欠な元素の一つである。しかし、リンは不揮発性であるため、海洋へ流れ込んだ溶存リンは、自発的には陸上に戻ることができない。そのため、リンは植物プランクトンに取り込まれることによって、食物連鎖に入り、海鳥の排泄や遡河性回遊魚などの遡上により、反重力方向へ回帰する。主要な一次生産者である海洋性珪藻類は、海洋中のリンを取り込み、生物の反重力方向へのリン循環の起点として非常に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、珪藻におけるリン酸獲得機構は明らかになっていない。本研究では、海洋のリン循環の始発点である海洋性珪藻 *Thalassiosira pseudonana* におけるリン酸獲得機構を解析し、海洋のリン循環の初段階を探ることを目的とする。

【実験方法】野生型 *T. pseudonana* の無機リン酸 (Pi) 輸送機構を生理学的に解析するため、野生型細胞を高 Pi 環境 (200 μ M) 及び Pi 飢餓環境 (0 μ M) で培養し、Pi 取り込み活性の測定を行った。Pi 取り込み活性は、100 μ M の Pi を含む培地に細胞を懸濁し、培地中の Pi の減少量をマラカイトグリーン法で測定することで評価した。Pi 飢餓環境への順化過程において、リン酸獲得因子の一つである細胞外アルカリホスファターゼ (alkalinephosphatase) の活性の測定も行った。次に、*T. pseudonana* の Pi 輸送体候補遺伝子をデータベースから探索し、高 Pi 環境および Pi 飢餓環境における各候補遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR で解析した。また、Pi 輸送体候補タンパク質の細胞内局在を調べるために、候補遺伝子の *TpSLC34-2* に enhanced green fluorescence protein gene (*egfp*) を連結させた遺伝子を野生型細胞に導入し、共焦点顕微鏡で GFP 蛍光を観察した。

【実験結果と考察】高 Pi 環境から Pi 飢餓環境に移したあと、2 週間間にわたり Pi 取り込み活性の変化を確認した。その結果、Pi 飢餓順化 2 日目からリン酸取り込み活性が急激に上昇し、9 日目には頭打ちになることがわかった。合わせて、Pi 飢餓 2 日目には、細胞外 AP 活性が検出され、9 日目には最大活性を示した。この結果から、*T. pseudonana* は、他の微細藻類と同様に、高親和性リン酸輸送体と、有機リン酸エステルから Pi を切り出す AP を誘導することで Pi 飢餓環境に順化することが確認できた。また、Pi 飢餓順化 9 日目の細胞を用いて、リン酸に対する親和性解析を行った。高 Pi 環境ではほとんど Pi 取り込みが見られなかったのに対して、Pi 飢餓環境に順化した細胞の Pi に対する $K_{0.5}$ 値は $13.1 \pm 11.6 \mu$ M となり、 V_{max} は $1.13 \pm 0.19 \mu$ mol mg⁻¹ Chlmin⁻¹ となった。さらに Pi 飢餓環境における Pi 取り込みには、カウンターイオンとして Na⁺ を必要とすることが分かった。Na⁺ 濃度依存性を調べた結果、60 mM 以上の NaCl で取り込み活性が飽和した。海水中の Na⁺量は約 470 mM であるため、Na⁺ 依存的 Pi 取り込み機構は、海水中でも実際に機能していると考えられる。さらに、*T. pseudonana* のゲノム上には、哺乳類のリン酸輸送体 solute carrier (SLC) 20 および SLC34 と相同性を示す遺伝子がそれぞれ 2 つ (*TpSLC20-1* および *20-2*) および 3 つ (*TpSLC34-1*, *34-2* および *34-3*) 存在することを見出した。定量的 PCR による発現量

解析の結果、*TpSLC34-2* の転写物の蓄積量が最も高く、さらに Pi 飢餓環境誘導型であることがわかった。*TpSLC34-2* の GFP 融合タンパク質の局在解析を試みたところ、*TpSLC34-2* が細胞膜に局在することがわかった。哺乳類における研究から SLC34 は Na⁺-Pi 共輸送を行うことが報告されているため、*T. seudonana* が Pi 飢餓環境で誘導する Na⁺ 依存的 Pi 取り込み活性の分子実体は、*TpSLC34-2* であることが強く示唆された。