

# 微細藻類における光合成の無機炭素固定と石灰化 —環境応答植物学研究室における最近 10 年間の研究報告—

都筑 幹夫、藤原 祥子、佐藤 典裕、岡田 克彦 <sup>\*1</sup>

## 1. はじめに

地球上のほとんどすべての生物は、光合成によって支えられている。それは、光合成を行う植物が動物の糧となっているからであるが、さらに、大気中の酸素も、光合成原核生物であるシアノバクテリアの祖先が何億年にもわたって放出し続けた結果だからである。

光合成を行う生物は、陸上の植物のほか、原核生物や真核の原生生物まで含む極めて幅広い生物群に広がっている。真核光合成生物の葉緑体はシアノバクテリアに由来し、灰色藻、紅藻や緑藻を経て高等植物へ進化したと考えられている。単細胞性の紅藻や緑藻はまた、別の細胞によって捕食され、細胞内共生（二次共生）として新たな生物群が成立した。珪藻、褐藻、クリプト藻、ハプト藻、及びユーグレナなどであり、遺伝子解析から確証されている。非光合成生物である原生動物の中にも、マラリア原虫のように、微細藻類が寄生生活をして光合成能力を失ったとみられる生物群も存在する。

環境応答植物学研究室（旧環境応答生物学研究室）では、これらの微細藻類やシアノバクテリアにおける光合成機構について、特に無機炭素<sup>1)</sup>の固定とその結果得られる“最終産物”の生理的な意義の解明を中心に幅広く研究してきた（図1）。2005年に研究室創設以来10年間の研究成果を報告した(1)。本稿ではその後の10年間の成果をまとめて報告する。

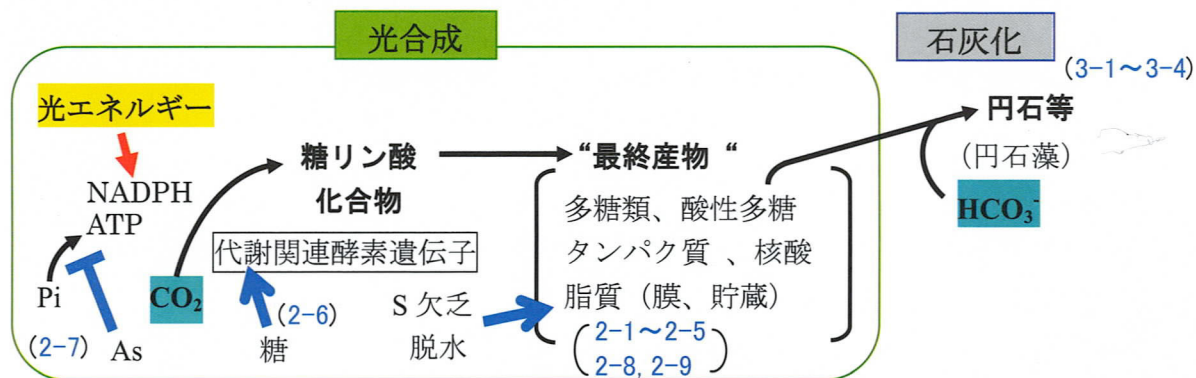


図1 微細藻類における光合成と石灰化の無機炭素 (CO<sub>2</sub> や HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 固定経路。また、硫黄 (S) やヒ素 (As)、糖などによる生理的影響も示す (促進 →、抑制 ←)。図中の 2-1 などの数字 (青字) は本文のそれぞれの項目に該当する。

\*1 東京薬科大学 生命科学部 環境応答植物学研究室

1) 一般に CO<sub>2</sub> は水に溶解すると、H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> や HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> の形態をとる。これらの分子形態をまとめて無機炭素 (Ci) と称する。なお、後述の rubisco は CO<sub>2</sub> を基質とする。また、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> と CO<sub>2</sub> の間の反応は遅く、炭酸脱水酵素 (CA) が促進する。これは、光合成や石灰化、赤血球での Ci 保持、胃酸分泌など、動植物のさまざまな部位で働いている。

## 2. 光合成無機炭素固定の調節・制御システム

光合成の無機炭素固定は、通常、葉緑体の中で CO<sub>2</sub> の固定酵素 rubisco により三炭糖リン酸が合成され、ATP 等を利用して Calvin=Benson 回路を経、多糖（一般にはデンプン）が合成される。一方、葉緑体から細胞質へ出た糖リン酸はショ糖に合成される。光合成 CO<sub>2</sub> 固定経路が明らかになって以来、多くの研究が行われ、C<sub>4</sub> 回路や無機炭素濃縮機構などの知見が得られてきた。しかし、単細胞生物が増殖し続けている時には、光合成の産物としてタンパク質や脂質、核酸などが作られ、細胞分裂へと進む。同時に、デンプンなどの貯蔵多糖も作られる。本研究室では、光合成の結果つくられるこれらの“最終産物”を中心に研究を行い、以下の点を明らかにしてきた。

### 2-1. “最終産物”としての貯蔵多糖は、単細胞性紅藻のグループ内でさまざま

シアノバクテリアは一般にグリコーゲンを、緑藻や緑色植物はデンプン（アミロペクチンとアミロースで構成）を蓄積することが知られている。秋田県立大の中村氏らとの共同で、シアノバクテリアの中にセミアミロペクチンを蓄積する株があること(2)、単細胞性の原始紅藻とよばれる群では *Cyanidium* 等がグリコーゲン、*Porphyridium* がセミアミロペクチンとアミロース、さらに *Cyanidioschyzon* がセミアミロペクチンを蓄積することを見出した(3-5)。すなわち、進化における葉緑体成立前後の種で最終産物合成系が極めて多様化していることが明らかになった。この知見から、葉緑体の細胞内共生が成立してしばらくの間は宿主と葉緑体の間で“最終産物”をめぐる闘いがあったのかもしれない。

### 2-2. 緑藻の葉緑体中には糊化温度の異なる 2 形態のデンプンが存在する

一般に藻類の葉緑体には、光学顕微鏡で確認できる大きさのピレノイドが存在する。これまで、ピレノイドのまわりにデンプンの鞘があり、低 CO<sub>2</sub> 濃度条件で発達することが知られていた。その条件を使い、ピレノイドデンプンと葉緑体ストロマのデンプンとを分けることに成功した。その分析の結果、鎖長は似ていたが、糊化温度が異なることが判明した(6)。また、*Chlamydomonas* の顆粒結合性デンプン合成酵素欠損変異株では、ピレノイドデンプンがあまり発達しないことも明らかになった(7)。

### 2-3. デンプン合成に関する酵素類の遺伝子解析

デンプン合成は六炭糖リン酸から（緑色植物の場合は）ADP-グルコースを経て、 $\alpha$ -1,4-結合でグルコース鎖が伸長する（アミロース）。その時、とりわけアミロペクチンでは  $\alpha$ -1,6-結合の枝が作られ、最終的に一部の枝が切り落とされて水分子をはじき出したアミロースとアミロペクチンからなるデンプン粒子が出来上がる。*Chlorella* と *Porphyridium* のデンプン合成にかかわる顆粒結合性デンプン合成酵素、*Chlorella* の枝作り酵素の遺伝子が明らかになった(8, 9)。

### 2-4. 栄養不足等のストレス条件では貯蔵脂質を合成する

細胞が何らかのストレスを受け、さらに、その時に光を受け続けると、色素分子は励起されるがエネルギー移動ができないため、多量の活性酸素が生じる。その時、“最終産物”にどのような影響が表れるのか。緑藻 *Chlorella* や *Chlamydomonas* では、硫黄(S)や窒素が欠乏すると、トリアシルグリセロール(TG)が合成されるようになることが明らかになった(10, 11)。脱水乾燥処理でも TG が蓄積する(12)。*Chlamydomonas* の場合、タンパク質合成が抑制されるだけで TG 合成が増加すること、硫黄欠乏下では硫黄応答で知られている *SAC1* と *SNRK2.2* の両制御遺伝子が働き、TG 合成系遺伝子が高発現することにより、TG 合成の促進が見出された(11)。光を受け続けると、多糖よりさらに還元された脂質を生成することによって、余剰なエネルギーがより貯蔵に回され、それにより活性酸素の発生を少しでも多く抑制しているのであろうと解釈できる。

## 2-5. 硫黄 (S) 脂質はS不足時のS供給源

上述のストレスの一つ、S が不足の状態になったら、細胞はどのようにその不足を補おうとするのであろうか。この答えに対して、S 含有の膜脂質スルフォキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)を、急場の S 源として用いることが明らかになった。その S は、S 欠乏で誘導される (アシルスルファターゼなどの) タンパク質合成に用いられる。即ち、膜脂質の SQDG は、緊急用の貯蔵脂質としても機能していることが明らかになったのである(13-15)。この SQDG の分解にも *SAC1* と *SNRK2.2* の制御遺伝子が働く(15)。SQDG は硫黄欠乏下でも膜脂質として少量ながら維持されており、それが光化学系 I 複合体の安定化、即ち光合成系の維持に役立っているのであろう(1, 15)。シアノバクテリアの場合、通常の生育下では、SQDG はまた、DNA 合成にも関与している(16)。

## 2-6. 糖リン酸代謝関連遺伝子の遺伝子発現誘導は光合成と解糖で異なるシグナル伝達

光合成の ATP 生産の場であるチラコイド膜は中性の糖脂質が多く、酸性の SQDG とリン脂質 PG が 10~20%程度存在する。細胞内が S 不足状態になると、PG 合成が高まる(1)。その時、リンが必要となる。光合成や解糖で代謝される糖リン酸の量にも影響すると思われる。

糖リン酸の代謝は、光合成は葉緑体で、呼吸における解糖反応は細胞質で行われる逆向きの代謝である。シアノバクテリアの場合、原核細胞のため両者共に細胞質が反応の場であり、そのうえ各反応で共通の酵素が用いられると考えられている。そこで、グルコース添加による遺伝子発現を解析したところ、グルコースによる増殖が認められる *Synechocystis* PCC6803 では、FBP アルドラーゼの遺伝子 *fbaA* の発現が、*Hik8* と命名されている調節遺伝子で発現誘導が制御されていること、その下流に *sll1330* も誘導に関与していること、*fbaA* の発現誘導に微量の光照射が必要であること等を見出した(17, 18)。また、解糖系の他の酵素遺伝子も発現誘導をされること、さらに、*sll1330* を介さない *Hik8* 誘導系の存在することも明らかになった(19)。*Hik8* の発現誘導シグナルは、河川のデルタ状に、カスケードを形成しているのである(20)。もうひとつ明らかになったのは、*sll1330* の欠損株では、光合成時に *fbaA* は発現することである。*fbaA* には、グルコースによる転写誘導と、光合成条件下での転写誘導とが存在すること、即ち光合成と呼吸との一見相反する二つの転写誘導システムが働いているのである。

## 2-7. ヒ酸の細胞内への取り込みは光合成時に促進される

ヒ酸は、リン酸とイオン半径が似ており、ヒトを含めた多くの生物にとって有毒である。また、光合成研究の歴史の中で、*Chlamydomonas* のヒ酸耐性株から光合成の変異株が多く得られたが、その理由は不明であった。ヒ酸の影響を調べている中で、野生株では光合成時にヒ酸の細胞内取り込みが増加することを見出した(21)。すなわち、リン酸とヒ酸の特異性の低いリン酸輸送体が光合成時に活性化される。その結果、培養液中にヒ酸が存在するとそれが取り込まれ、生育阻害が生じると考えられる。光合成の変異株では光合成条件下でのリン酸輸送体の活性化が不十分なため、ヒ酸があまり細胞内に取り込まれないのである。なお、細胞内のリン酸濃度が高いと、ヒ酸の阻害影響は低く抑えられる(1)。

## 2-8. 原核細胞でもアルセノ糖が作られる

細胞内に取り込まれたヒ酸は代謝される。モノメチルアルシン酸やジメチルアルシン酸などが作られるが、*Chlamydomonas* やシアノバクテリアでは、さらに代謝されてアルセノ糖が蓄積することを見出した(22, 23)。原核生物としては最初の報告である。

## 2.9 円石藻の貯蔵多糖は $\beta$ 結合のポリグルカン

光合成によって作られる多糖類の多様性が、もうひとつ、一部の二次共生生物で知られている。円石藻 *Pleurochrysis* の貯蔵多糖を解析した結果、 $\beta$ -1,3-結合と  $\beta$ -1,6-結合を含む  $\beta$ -グルカンであることが判明した(24)。

## 3. 光合成と連動した石灰化機構

### 3.1 *Pleurochrysis* の円石には 3 つの酸性多糖が存在する

石灰化も光合成と同様、無機炭素を固定する反応である。円石藻の円石は、極めて巧妙に作られていて、種特有の形態を持つ。*Pleurochrysis* では、石灰化と光合成が並行して進む。その円石に 3 種の酸性多糖が含まれていることが明らかになった(25)。そのうち、Ph-PS2 と名付けたものは、電気泳動では多数のはしご状に現れる。円石を徐々に溶解させてその存在を調べた結果、Ph-PS2 は円石の内部にまで分布しており、他の 2 つの酸性多糖は円石表面に分布していた(26)。まだ学会発表のみではあるが、円石の基礎部分に当たるベースプレートの存在下で *in vitro* の石灰化をさせたところ、酸性多糖のうち Ph-PS2 だけが存在すると思われる条件の時、ベースプレート上の淵に沿うように石灰化が行われた(27)。その位置は円石が形成場所と一致する。

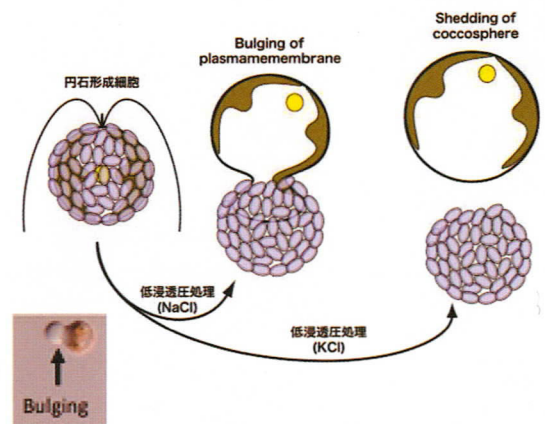


図 2 *Pleurochrysis* における低浸透圧処理の影響 (概念図と写真)。細胞表面の楕円形鱗状に見えるものが円石である。

### 3.2 浸透圧を下げるとべん毛の付け根あたりから、細胞の中身が飛び出してくる

当研究室で用いている *Pleurochrysis* は沖縄の沿岸域から単離された株である。沿岸域は河口や大雨の後など、淡水で希釈される場合が多い。そこで、本株を希釈海水にさらしたところ、べん毛あるいはハプトネマの付け根あたりから細胞の中身がこぶのように飛び出してくる現象を見出した。NaCl を KCl に置き換えても見出され、それが進むとついには円石の殻から抜け出すような感じでプロトプラストが得られることも明らかになった (図 2)。そのプロトプラストを培養すると、円石が再生され、細胞増殖も認められた(28)。プロトプラスト作製の技術としての利用法として注目されている。

### 3.3 円石ができなくなると細胞分裂もできなくなる

また、 $\text{Ca}^{2+}$  は円石の構成成分であるため、培養に比較的高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  が必要である。そこで、 $\text{Ca}^{2+}$  の濃度を下げて培養すると、円石形成が抑えられ、細胞分裂も停止した(29)。円石形成と細胞分裂とが共役している可能性が示された。

### 3.4 *Pleurochrysis* は 6 つの炭酸脱水酵素の遺伝子をもつ

未知の点の多い円石形成の研究には、網羅的な解析も不可欠である。さまざまな条件下に置いた細胞や円石形成能を失った細胞から mRNA を単離し、トランスクリプトーム解析を行い、マクロアレイを製作した(30)。その結果、炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase)類似遺伝子が 6 つ見つかった。このうち、円石形成に関与している遺伝子を解析中である。

## 4. 光合成の工業利用をめざした基礎研究

### 4.1 固相表面のバイオフィーム型培養システムを構築

地球温暖化の一因と考えられている大気中 CO<sub>2</sub> 濃度の上昇を抑制したり、エネルギー資源を確保したりするために、微細藻類の光合成が有効ではないかと社会から期待されている。しかし、微細藻類は現在、健康食品として利用されており（年間約 2 千トン）、期待される燃料（石油の輸入量、年間約 2 億トン）に比べて、生産量が少なすぎる。せめて 1 万倍に高めなければ役に立たないであろう。そこで、実用化には生産技術の開発が不可欠と考え、クロレラを用いたバイオフィーム型の固相表面培養システムの構築を目指してきた(31)。

その結果、内径 3 cm のアクリル管を用いた場合には、管の断面積、すなわち培養装置の設置面積 1 m<sup>2</sup> あたり 1 日に 250 g（乾燥重量）以上の藻体生産が可能である(31, 32)。また、本培養システムは工場等の建造物北側面に隣接する形で縦型に設置することが可能のため、加温と補助光照射が容易であることから、冬期を含めた通年培養も可能であることを意味する（33, 34）。大型化や生産のさらなる高効率化がさらに必要であるが、エネルギー供給が可能なところであれば、日本国内のどの地域でも少ない土地面積で培養が可能になったことを意味する。

### 4.2 バイオフィーム型培養によるクロレラのセシウム吸収・吸着

本システムは、また、微細藻類による金属等の吸収・吸着に利用することもできそうである。Cs と Sr の吸着が認められたことから(35)、藻株の工夫も含めて新たな技術開発も期待できよう(36)。

## 5. おわりに

光合成の機構は、すでに多くのことが明らかになっているが、これまでは貯蔵のために合成されると考えられてきた“最終産物”が、さまざまな生理機能に関与している可能性が浮かび上がってきたのがこの 10 年の研究成果であろう。チラコイド膜を構成する膜脂質も重要な生理機能を持ち(1, 13-15)、多糖も種特有で、不溶性のデンプンと水溶性のグリコーゲン、あるいはピレノイドデンプンによる葉緑体内の区画形成など、それぞれが特有の生理機能に関与していることが示唆された。その生理機能の解明はさらに進める必要がある。

一方、社会が期待する微細藻類の利用、即ち社会からの光合成の利用の期待は、工業的な利用ということである。上述のように、今や日本での生活に使われるエネルギーは膨大である。日本人 1 人 1 日あたりの食事の消費熱量は 2,800 kcal であるが(36)、1.3 億人が年間に摂食する熱量は、 $5.6 \times 10^{17}$  J となる。生活面では、日本の最終エネルギー消費が  $1.6 \times 10^{19}$  J と報告されている(37)。また、東京の日射量は年間を平均して 1 m<sup>2</sup> あたり 13 MJ である（38）。年間、日本国内には、 $1.8 \times 10^{21}$  J が到達していることになる。このことから日本での生活は、生活に使われるエネルギーは、食として消費されるエネルギー量に比べて 30 倍大きく、地表に到達する太陽エネルギーの 1% 相当量に達しているということである。この 1% という値が十分小さいと言えるかどうかは生態学的な検討が必要であろう。

自然エネルギーに対する考え方を変化させ、日本各地が持つ小規模分散型エネルギーを多数利用することにより、つまり多数の小規模分散型での微細藻類のバイオマス生産を行うシステムを構築することこそ、将来の日本の姿ではないかという夢を筆者（M.T）は描いている。そのためには、光合成とそれを行う生物の性質をさらに調べ、その情報を積み上げつなげていくことが重要と思われる。

**謝辞** これまで共同研究をして下さった方々を始め、当研究室での研究を支え、暖かく見守ってきて下さった皆様方、また、実験結果を出して研究を支えて下さった学生、卒業生の皆様に深く感謝申し上げます。本稿は当研究室での研究成果報告ですが、報告できなかつた研究成果もあります。たとえば生命分析化学（旧環境衛生化学）研究室の方々との研究など、たいへん興味深い共同研究成果ですが、ここで本稿で紹介できなかつたことを申し添えます。

## 文献

1. 都筑幹夫：東京薬科大学研究紀要 8: 1-8 (2005)
2. Nakamura, Y., S. Fujiwara, M. Tsuzuki 他 10 名: *Plant Cell Physiol.* 46: 539-545 (2005).
3. Shimonaga, T., S. Fujiwara, Y. Nakamura, M. Tsuzuki 他 6 名: *Marine Biotechnol.* 9: 192-202 (2007).
4. Shimonaga, T., M. Konishi, S. Fujiwara, M. Tsuzuki 他 10 名: *Plant Cell Physiol.* 49: 102-116 (2008).
5. Hirabaru, C., S. Fujiwara, Y. Nakamura, T. Kuroiwa, M. Tsuzuki 他 9 名: *Plant Cell Physiol.* 51: 682-93 (2010).
6. Izumo, A., S. Fujiwara, Y. Oyama, Y. Nakamura, M. Tsuzuki 他 2 名: *Plant Science* 172: 1138-1147 (2007).
7. Izumo, A., S. Fujiwara, S.G. Ball, Y. Nakamura, M. Tsuzuki 他 6 名: *Plant Science* 180: 238-245 (2011).
8. Sawada, T., P.B. Francisco, Jr., M. Tsuzuki, Y. Nakamura 他 4 名: *Plant Cell Physiol.* 50: 1062-1074 (2009).
9. Oyama, Y., A. Izumo, S. Fujiwara, T. Shimonaga, Y. Nakamura, M. Tsuzuki: *Planta* 224: 646-654 (2006).
10. Mizuno, Y., A. Sato, N. Sato, M. Tsuzuki, S. Kawano 他 5 名: *Bioresource Technology* 129: 150-155 (2013).
11. Sato, A., R. Matsumura, N. Hoshino, M. Tsuzuki, N. Sato: *Frontier in Plant Science* 5: 444 (2014).
12. Shiratake, T., A. Sato, A. Minoda, M. Tsuzuki, and N. Sato: *Plos ONE.* 8 (11) e79630 (2013).
13. Sugimoto, K., N. Sato, M. Tsuzuki: *FEBS Lett.* 581: 4519-4522 (2007).
14. Sugimoto, K., T. Midorikawa, M. Tsuzuki, N. Sato: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 369: 660-665 (2008).
15. Sugimoto, K., M. Tsuzuki, N. Sato: *New Phytol.* 185: 676-686 (2010).
16. Aoki, M., M. Tsuzuki, and N. Sato: *BMC Res. Notes* 5: 98 (2012).
17. Tabei, Y., K. Okada, M. Tsuzuki: *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 355: 1045-1050 (2007).
18. Tabei, Y., K. Okada, N. Makita, M. Tsuzuki: *FEBS J.* 276: 187-196 (2009).
19. Tabei, Y., K. Okada, E. Horii, S. Fujiwara, M. Tsuzuki 他 5 名: *Plant Cell Physiol.* 53: 1720-1729 (2012).
20. Okada, K., E. Horii, S. Fujiwara, M. Tsuzuki 他 4 名: *Planta*, in press (2015).
21. Murota, C., H. Matsumoto, S. Fujiwara, M. O. Hudock, R.K. Togasaki, N. Sato, M. Tsuzuki 他 4 名: *Planta* 236: 1395-1403 (2012).
22. Miyashita, S., S. Fujiwara, M. Tsuzuki, T. Kaise: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75: 522-530 (2011).
23. Miyashita, S., S. Fujiwara, M. Tsuzuki, T. Kaise: *Environ. Chem.* 9: 474-484 (2013).
24. Hirokawa, Y. S. Fujiwara, M. Tsuzuki 他 4 名: *Planta* 227: 589-599 (2008).
25. Hirokawa, Y., S. Fujiwara, M. Tsuzuki: *Marine Biotechnol.* 7: 634-644 (2005).
26. Y. Hirokawa, T. Uchida, S. Fujiwara, M. Tsuzuki 他 4 名: *Open J. Marine Science* 3: 48-54 (2013).
27. 櫻田舜人、藤原祥子他 6 名: 第 9 回バイオミネラルリゼーションワークショップ, 2014/12, 柏。
28. Takayanagi, T., Y. Hirokawa, S. Fujiwara, M. Tsuzuki 他 2 名: *Marine Biotechnol.* 9: 56-65 (2007).

29. Katagiri, F. Y. Takatsuka, S. Fujiwara, M. Tsuzuki: *Marine Biotechnol.* 12: 42-51 (2010).
30. Fujiwara, S., Y. Hirokawa, D. Shibata, S. Tabata, M. Tsuzuki 他 4 名: *Marine Biotechnol.* 9: 550-560 (2007).
31. 都筑幹夫、白武拓磨、朝山宗彦、宮坂裕司、小西淳 他 3 名: *東京薬科大学研究紀要* 15: 9-16 (2012).
32. 白武拓磨、有賀理沙、岡田克彦、小西淳、都筑幹夫 他 4 名: 日本植物学会第 77 回大会, 2013/9, 札幌.
33. 佐藤諒、白武拓磨、朝山宗彦、都筑幹夫 他 3 名: *ユーグレナ研究会第 29 回研究集会*, 2013/11, 筑波.
34. 佐藤諒、白武拓磨、今村信和、都筑幹夫 他 3 名: *マリンバイオテクノロジー学会*, 2014/5, 津.
35. 松井雄一郎、青木元秀、藤原棋多夫、都筑幹夫: *東京薬科大学研究紀要* 16: 1-8 (2013).
36. Minoda, A., T. Yamamoto, M. Tsuzuki 他 4 名: *Appl. Microbiol. Biotech.* DOI 10.1007/s00253-014-6070-3 (2014)
37. *通商白書*(2008)、第 3 節、第 3-3-2 図、経済産業省。  
[http://www.meti.go.jp/report/tshaku2008/2008honbun\\_p/2008\\_14.pdf](http://www.meti.go.jp/report/tshaku2008/2008honbun_p/2008_14.pdf) (2015.1 現在)
38. *エネルギー白書*、第 211-1-1、資源エネルギー庁。  
<http://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/2013html/2-1-1.html> (2015.1 現在)
39. *過去の気象データ*、気象庁 <http://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/index.php#> (2015.1)から計算.