

微細藻類のリン酸輸送体を利用したリン、ヒ素回収の可能性

環境応答植物学研究室

室田知里

目次

< 序論 >	1
< 第 1 章 > シアノバクテリアおよび藻類を利用した排水中リン回収の可能性	4
1-1 緒言	4
1-2 実験操作	5
1-3 結果	9
1-4 考察	11
< 第 2 章 > 緑藻 <i>Chlamydomonas</i> のリン酸輸送体遺伝子の解析とその利用	20
2-1 緒言	20
2-2 実験操作	22
2-3 結果	31
2-4 考察	33
< 第 3 章 > <i>Synechocystis</i> のヒ素耐性能とリン酸輸送体の関係	42
3-1 緒言	42
3-2 実験操作	43
3-3 結果	48
3-4 考察	52
< 参考文献 >	67
< 謝辞 >	76

< 序論 >

ヒ素は地殻中に広く分布する元素であり、火山活動や造山活動により、水脈等を通じて自然発生的に流出する(Mandal et al., 2002)。自然溶出以外にも、鉱山の過剰採掘や化石燃料の燃焼といった人為的行為によるヒ素の流出も増加している。

世界保健機関(WHO)では、飲料水中のヒ素の基準値を $10 \mu\text{g/L}$ と定めているが(WHO, 2011)、バングラデシュ等一部の地域では $100 \mu\text{g/L}$ 以上ものヒ素が検出されたという報告がある(Jiang et al., 2013)。バングラデシュ以外でも、アルゼンチン、チリ、中国、インド(西ベンガル地方)、メキシコ、アメリカなどが特にヒ素汚染が深刻な地域として挙げられており、土壌や地下水のヒ素汚染は今や世界的な問題となっている。

一方で、リンは生物にとって必須の元素であり、ATP、核酸、リン脂質など様々な生体物質の原料となる、タンパク質のリン酸化に使われ酵素の活性化状態やシグナル伝達経路の制御に関わるなど、種々の生体反応に関与している。また、化学肥料としての利用を筆頭に、我々の生活においても必要不可欠な元素となっている。

リンは、自然界から産出したリン鉱石から精製されているが、近年の人口増加や経済発展に伴い、リンの使用量は増加しつつある。1988年から2012年のデータをもとにした統計解析によると、リン資源の利用可能年数はあと84~396年とも推測されている(Ekardt et al., 2015)。化学肥料として利用されているリンの約90%がリン鉱石より精製されていることから(Ekardt et al., 2015)、リン資源の枯渇が世界規模の食糧危機をもたらすことが予想される。その解決のためにも、今後、安定したリン資源の確保が重要な課題と考えられる。

しかしながら、リン酸の過多により引き起こされる問題もある。河川や湖沼、海域の富栄養化である。リンが多く含まれる生活排水や産業排水が環境水中に流入することで、植物プランクトンが大量発生し、湖沼や海面を覆う。それにより深水域の植物の光合成阻害、溶存酸素濃度の低下などが引き起こされ、水圏の生態系に悪影響を及ぼす。また、「アオコ」として知られるシアノバクテリアの一種、ミクロキスティス属やオシラトリア属の大量繁殖により、それらの代謝産物であるミクロキスティンの毒性影響も大きな問題となっている(国立環境研究所, 2003)。過去には、このミクロキスティンにより、ブラジルの自家水道の利用者50人以上が死亡する事故も発生している(国立環境研究所, 2003)。

以上のような環境問題への対応策として、すでに様々な取り組みが行われてきている。しかし、汚染土壌の浄化には土壌そのものの入れ替えや薬剤が必要であったり、リンの回収にはやはり薬剤を用いて共沈させたりと、コスト等の問題もあり全面的な解決には至っていない。

そこで、そのような化学的、物理的手法に加え、生物を利用した環境浄化、**bioremediation** が注目されている。一般的に、他の手法と比べ、コストや化学薬品を使用しないことによる安全性が利点といわれている。特に、植物を利用した **phytoremediation** 技術については、2011年に発生した福島第一原発事故後に、放射性セシウムの吸収を目的としてヒマワリを放射能汚染地域に植える試みもされており、実用化への関心の高さが伺える。

本研究は、この **phytoremediation** 技術が、上述のヒ素汚染の浄化やリンの回収に非常に有益ではないかと考え取り組んできた。植物の細胞は、外界からリン資源を確保する際に、細胞膜上に発現したリン酸輸送体を経由してリン酸を取り込んでいる。しかし、リン酸と化学的性質や構造が類似しているヒ酸が共存すると、ヒ酸もリン酸と同様にリン酸輸送体を経由して細胞内へ取り込まれる。この性質を利用して、ヒ素もしくはリンを特異的に取り込む輸送体が得られれば、ヒ素汚染地域の浄化やリン資源の回収が可能なのではないかと考えた。

実験には、単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (以下、*Chlamydomonas*) および、高等植物の葉緑体の祖先といわれている、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803(以下、*Synechocystis*)を使用した。どちらの種も、ゲノム解読が完了しており(Merchant et al., 2007, Kaneko et al., 1996)、モデル生物としてよく利用されている。

リン酸輸送体については、これまでに *E. coli* や *Saccharomyces cerevisiae* を筆頭に研究が進められてきた。*E. coli* は、high-affinity ABC transporter である Pst および、low-affinity でプロトン駆動力により Pi を輸送する Pit の二種類のリン酸輸送体をもつ(Harris et al., 2001)。*S. cerevisiae* では、high-affinity のリン酸輸送体として H⁺/Pi symporter Pho84 と Na⁺/Pi symporter Pho89 が、low-affinity H⁺/Pi symporter として Pho87 と Pho90 が、細胞外からのリン酸取込みを担っている(Harris and Shinha, 2014)。*E. coli* の Pst system、Pit system、*S. cerevisiae* の Pho84、Pho89 などの輸送体との相同性から、バクテリアや藻類、rice や *Arabidopsis* など高等植物において、今日までに次々とリン酸輸送体が同定されてきた。

C. reinhardtii については、これまでに十数個のリン酸輸送体の存在が示唆されている。*S. cerevisiae* の Pho84 と相同性が高い PTA type と、Pho89 と相同性が高い PTB type に分けられる(Moseley et al., 2005)。PTA type では PTA1~4 の、PTB type では PTB1~12 のアミノ酸配列が示された(Moseley et al., 2005, Kobayashi et al., 2005)が、機能や局在性、立体構造などは未だ解明されていない。

Synechocystis sp. PCC6803 のリン酸輸送体については、Pst1、Pst2 の二つが存在することが明らかとなっている。これらの輸送体は、外界のリン酸を ATP のエネ

ルギーを利用して取り込む ABC-transporter である。ABC-transporter は、ATP 結合タンパクである PstB、2 つの膜貫通タンパクの PstA、PstC、リン酸結合タンパクの PstS をもつ(Chan and Torriani, 1996, Pitt et al., 2010)。Pst1、Pst2 も、それらのタンパクをコードする遺伝子がオペロン構造をなしている(Pitt et al., 2010)。

本研究では、この Pst1、Pst2 の変異株、 Δ Pst1、 Δ Pst2 (Burut-Archanai et al., 2011)や、そのリン酸結合タンパク変異株(Pitt et al., 2010)を使用した。

<第1章>シアノバクテリアおよび藻類を利用した排水中リン回収の可能性

1-1 緒言

序論で述べたように、リン過多による富栄養化や、それに伴う水環境の悪化、アオコの大量発生、毒素の問題が後を絶たない。環境中に流出するリンは生活排水および産業排水に起因するものが大半であり、我が国の閉鎖性水域のリンも74%がそれら排水が発生源とみられる(Fig. 1)。現在のところ、これら排水の処理方法として主に用いられているのが、好気性微生物を利用した活性汚泥法や、嫌気性微生物を利用した嫌気性廃水処理法である。いずれの方法も、微生物に排水中の有機物を分解させ、排水中からリンやその他有機物を除去する技術である。処理後には、微生物や微生物が含まれる汚泥からリンを遊離させ、カルシウムイオン、ヒドロキシイオンやアンモニウムイオン、マグネシウムイオンと反応させることでリン酸カルシウム(ヒドロキシアパタイト; HAP)やリン酸アンモニウムマグネシウム(ストラバイト; MAP)の形で回収が可能であり、すでに実用化されている(Tanaka and Shimamura, 2005)。しかしながら、余剰汚泥中へのリンの残留などもあることから、実際の処理においては流入したリン量の30%程度が回収の限界ではないかという見解もある(Tanaka and Shimamura, 2005)。

本章では、さらに効率的な排水中からのリンの除去、および回収にシアノバクテリアや藻類が使用できないか試みた。実験には、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 および、*Chlamydomonas reinhardtii* の野生株 CC125 と、PTB1 の欠損株 AR3 を使用した。AR3 は、先の研究で CC125 よりもリン酸取込み活性が高いことが明らかとなっており(Kobayashi et al., 2003; Murota et al., 2012)、より多くの排水中リンの回収を期待し、使用した。

1-2 実験操作

1-2-1 前培養

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (以下、*Chlamydomonas*)CC125 株、AR3 株、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803(以下、*Synechocystis*)とともに、リン酸十分条件下にて OD₇₃₀=0.5~1 まで振とう培養した細胞を使用した。なお、*Chlamydomonas* の培養には 1×TAP 培地(Harris et al., 2009)、PCC6803 の培養には BG-11 培地(Allen, 1968)を使用した。培地組成は以下の通りである。

<1×TAP 培地>

100×TAP	10	mL
1M K・Pi	1	mL
dH ₂ O	up to 1	L

上記を調製後、オートクレーブ滅菌した。

100×TAP

Hutner's trace element	10	mL
NH ₄ Cl	4.0	g
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.5	g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.0	g
Tris	24.2	g
acetate	10	mL
dH ₂ O	up to 100	mL

Hutner's trace element

Na ₂ EDTA	50.0	g
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	22.0	g
H ₃ BO ₃	11.4	g
MnCl ₂ ・4H ₂ O	5.06	g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	4.11	g
CoCl ₂ ・6H ₂ O	1.61	g
CuSO ₄ ・5H ₂ O	1.57	g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ・4H ₂ O	1.10	g
KOH	10~16	g
dH ₂ O	up to 1	L

1M K · Pi (pH7.0)

K ₂ HPO ₄	10.62	g
KH ₂ PO ₄	5.31	g
dH ₂ O	up to 100	mL

上記を調製後、オートクレーブ滅菌した。

< BG-11 培地 >

Stock I	2	mL
Stock II	50	mL
Stock III	2	mL
Stock IV	1	mL
A6	1	mL
1M TES-KOH	20	mL
dH ₂ O	up to 1	L

上記を調製後、オートクレーブ滅菌した。

※Stock Iのみオートクレーブ後に加えた。

Stock I

citric acid	0.3	g
ammonium Iron (III) citrate brown	0.3	g
0.5M Na ₂ EDTA	300	μL
dH ₂ O	up to 100	mL

以上を調製後、オートクレーブ滅菌した。

Stock II

Na ₂ NO ₃	30	g
K ₂ HPO ₄	0.78	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5	g
dH ₂ O	up to 1	L

Stock III

CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.9	g
dH ₂ O	up to 100	mL

Stock IV

NaCO₃ 2 g
dH₂O up to 100 mL

以上を調製後、オートクレーブ滅菌した。

1M TES-KOH (pH 8.2)

TES 229.2 g

KOH

dH₂O up to 1 L

以上を調製後、オートクレーブ滅菌した。

1-2-2 工場排水中における *Chlamydomonas* と *Synechocystis* の生育

工場排水は、ある会社より匿名で提供いただいた。細胞培養プレート (IWAKI, 12 ウェル) の各ウェルに、排水口からの採取水、特定排水、焼却炉排水、超純水、液体培地を入れた。1-2-1 で培養した *C. reinhardtii* CC125、AR3、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の細胞懸濁液を、25°C、3500 rpm、15 分間遠心し、上澄みを捨て、それぞれリンを含まない 1×TAP 培地 [1×TAP(-P)]、BG-11 培地 [BG-11(-P)] を添加し細胞を懸濁した。この操作を 3 回行い、細胞外に付着したリンを取り除いた後、各 100 μL をウェルに添加した。弱光照射下、27°C の人口気象器内で 1 週間振とう培養し、生育を観察し、リン酸濃度を測定した。また、念のため各排水をオートクレーブ処理したものについても、同様に実験した。

1-2-3 培養液中のリン酸濃度の測定

リン酸濃度の測定にはマラカイトグリーン呈色法 (Shimogawara et al., 1995) を用いた。マラカイトグリーン試薬は下記のとおり作製した。

1-2-2 の各ウェルから細胞懸濁液 1 mL を、シリコンオイル 100 μL、1/100 tween20 5 μL を入れた遠心チューブに採取し、25°C、15000 rpm で 1 分間遠心した。上澄み 700 μL を新しい遠心チューブにとり、そのうち 70 μL を別の遠心チューブに移し、超純水 630 μL を加えることで 10 倍希釈した。10 倍希釈したサンプルにマラカイトグリーン 300 μL を添加して室温で 30 分間置き、発色させたのち、OD₆₃₉ の吸光度を測定した。別途、リン酸濃度 0, 2, 4, 6, 8, 10 μM に調製した溶液をそれぞれ 700 μL 用意し、サンプル同様にマラカイトグリーン 300 μL を加え吸光度を測定したものから検量線を作製した。検量線からサンプルのリン酸濃度を求めた。

マラカイトグリーン試薬の調製

1. ammonium molybdate (Wako、特級) 2.86 g を 6M HCl (関東化学、特級、濃度 35~37 % のものを超純水で 2 倍希釈した。操作はドラフト内で実施した。) に溶解し、50 mL にメスアップした。
2. polyvinyl alcohol (1n=1500~1800、Wako、特級) 1.16 g に超純水約 40 mL を加え、50 mL の遠心チューブに移した。遠心チューブを湯浴で温め、時折チューブを転倒させながら完全に溶媒を溶解させた。溶媒が溶け切ったら、超純水で 50 mL にメスアップした。
3. Brilliant Green (Wako、特級) 0.61 g を超純水に溶解し、50 mL にメスアップした。完成後の溶液は暗所で保管した。
4. 1.~3.の溶液を 5 : 5 : 2 (v/v) の割合で混合し、室温、暗所で 12 時間置いた。

1-2-4 リン酸過多条件下における *Chlamydomonas* と *Synechocystis* の生育

細胞培養プレート (IWAKI, 12 ウェル) の各ウェルに、リン酸濃度 0~200 mM になるよう 1×TAP(-P) 培地、BG-11(-P) 培地で調製した。1-2-1 で培養した *C. reinhardtii* CC125、AR3、*Synechocystis* の細胞懸濁液を各 20 μ L ずつ添加した。弱光照射下、27°C の人工気象器内で 1 週間振とう培養し、生育を観察した。

1-3 結果

1-3-1 排水中における *Clamydomonas*、*Synechocystis* の生育

各排水中での生育を調べたところ (Fig. 2)、排水口からの採取水では、*Clamydomonas* CC125、AR3、*Synechocystis* すべてにおいて生育が確認された。*Synechocystis* については、培養開始 3 日目～4 日目で対数増殖期を過ぎ、1 週間後にはすでに死滅期に入っていた。

特定排水水については、採取水をそのまま使用した場合には *Synechocystis* のみ生育した。超純水にて 2 倍希釈した場合には、*Clamydomonas* においても生育がみられた。

焼却炉排水では、採取水の原水、2 倍希釈水どちらにおいても *Synechocystis* のみ生育した。

超純水中でもやや生育がみられたことから、細胞内に貯蓄されていたポリリン酸の利用や、洗いで落ちなかった細胞表面に付着したリンの持ち込みがあったと思われる。

1-3-2 排水中のリン酸取込み量

1-3-1 の細胞懸濁液内のリン酸量をマラカイトグリーンで調べ、実験前の排水内リン酸量と比較し、*Clamydomonas* や *Synechocystis* による細胞内リン酸取込みを調べた (Fig. 3)。排水中のリン酸量は、排水口採取水が最も少なく、約 10 mg/L、特定排水水が約 15 mg/L、焼却炉排水が約 20 mg/L であった。*Synechocystis* は、すべての排水において細胞外濃度が約 1 mg/L になるまで、リン酸の取込みがみられた。一方、*Clamydomonas* においては生育が確認されなかった特定排水水の原水、および焼却炉排水で、リン酸の取込みがあまりみられなかった。特定排水水の 2 倍希釈水中では細胞外濃度約 1～2.5 mg/L になるまで取込みが確認された。排水口からの採取水中では、*Synechocystis* と同程度、細胞外濃度約 1 mg/L まで取込みがみられた。

1-3-1 および 1-3-2 の結果から、*Clamydomonas*、*Synechocystis* の両種において、細胞が増殖した条件でのみ、排水からのリン酸の吸収が認められた。つまり、微細藻類が排水中(リン含量：約 3.1～6.3 mg/L)のリンを吸収、利用し、生育できることが明らかとなった。

1-3-3 リン酸過多条件下での生育

すべての排水中にてリン酸を取込み、生育が可能であった *Synechocystis* について、高濃度リン酸存在下ではどの程度生育が可能なのか調べた (Fig. 4)。0～300 mM

(0～9300 mg/L)リン酸存在下で振とう培養したところ、150 mM (4650 mg/L)以上のリン酸存在下では生育が阻害されていたが、100 mM (3100 mg/L)まで生育が確認された。

1-4 考察

排水の浄化を生物学的に行うことは、先述の通り好気性または嫌気性微生物を使用した技術としてすでに実用化され広く利用されている。また、排水の浄化かつそこから有用、または有害物質の回収メカニズムについても多く報告されている。近年ではバイオ燃料の回収を目的とした緑藻 *C. reinhardtii* の研究や(Toyoshima and Sato, 2015)、シアノバクテリアの一種である *Aulosira fertilissima* を用いた、生分解性プラスチックとして有益な利用が見込めるポリヒドロキシ酪酸(poly- β -hydroxybutyrate; PHB)の回収(Samantaray et al., 2011)、*Chlorella* を使った繊維加工廃水からの染料除去(Pathak et al., 2014)など、微細藻類を利用した排水の浄化かつ物質の回収技術が特に注目されているように思われる。

今回、実試料として排水口、特定排水、焼却炉排水の3種類の排水を提供いただいた。採取後は半透明のポリ容器に入れ(写真1)、冷蔵状態にて郵送してもらい、冷暗所にて保管した。

匿名で提供いただいたため、試料採取場所や状況の詳細は未知であるが、特定排水、焼却炉排水については一般の下水処理施設で処理ができない特殊排水にあたるものであり、排水口からの採取水は一般的な処理が可能である、いわゆる生活排水と同様のものではないかと推測される。特定排水は、水質汚濁防止法施行規則第一条の中で次のように定義されている。

「排水のうち、特定事業場において事業活動その他の人の活動に使用された水であつて、専ら冷却用、減圧用その他の用途でその用途に供することにより汚濁負荷量が増加しないものに供された水以外のものをいう。」

このような汚濁のリスクが高い特定排水を排出する特定施設は、水質汚濁防止法施行令にて70以上が規定されている。その種類は畜産、鉱業、食品、印刷、化学等あらゆる分野に及ぶため、その特定排水中の含有物も業種により様々である。環境負荷が高く、かつ組成が異なる排水が生産工程ごとに発生するメッキ工場などでは、重金属の種類にあわせてキレート試薬や凝集剤を変えるなど、施設外への排出までに複雑な処理工程を経ている(和田洋六, 2014)。また、畜産系、食品系の工場では、排水に弱酸性次亜塩素酸を加え滅菌処理を施すなど(Ono, 2012)、排水中の汚濁物質にあわせ、各施設で適正な処理を施してから施設外へ排出している。

焼却炉排水も、用途により汚濁の状況は異なる。焼却炉から発生する排水として、炉材を保護するための冷却水、有害ガスの除去装置や、その他設備を洗浄した後の洗浄水、廃棄物等を貯めておくピットから発生するピット排水などがある(三好康彦, 2004)。焼却炉排水の中で特に問題となる汚濁物質として、懸濁物質(suspended substance(SS); 粒径2 mm以下の不溶解性物質)、ダイオキシン類、鉛、カドミウ

ム、六価クロム、ヒ素などの重金属、半金属があげられるが、重金属、半金属の場合には pH 調整やキレート試薬との反応、SS、ダイオキシン類の場合には凝集沈殿法や膜を使った方法を適応するなどして、これらの物質を除去している(三好康彦, 2004)。

以上のように、特定排水については各施設において、水質汚濁防止法や各自治体が定める基準値を超えないよう適正に処理したのち、施設外へ排出されている。今回使用した排水は、いずれも pH が 7 付近であったことから(Table 1)、少なくとも pH 調整後に採水したものではないかと思われる。

今回測定を行ったリン量であるが、水質汚濁防止法が定める排水基準では、1日あたりの許容限度が(リン含有量として)16 mg/L(日間平均 8 mg/L)とされている(※本基準は1日あたりの平均的な排出量が 50m³以上である工場または事業場に係る排水について適用される。また、リンが湖沼植物プランクトンの著しい増殖をもたらすおそれがある湖沼として環境大臣が定める湖沼、海洋植物プランクトンの著しい増殖をもたらすおそれがある海域として環境大臣が定める海域及びこれらに流入する公共用水域に排出される排水に限って適用される)。実際に実験に用いた排水のリン(P)含量は、実験で得られたリン酸含量から換算すると約 3.1~6.3 mg/Lであった(Fig. 3)。しかし、オートクレーブ処理したものについては、有機化合物などの形で存在していたリン酸が高温、高圧処理により遊離したことで、無機リン酸量にして数 mg/L 上昇したと考えられる(Fig. 3)。オートクレーブ処理したことによって、排水中のリン酸量はやや上昇したものの、*Chlamydomonas*、*Synechocystis* の生育についてはオートクレーブ未処理のものと比較して変化がなかった。このことから、今回使用したものと同程度まで処理された排水であれば、オートクレーブによる滅菌処理なしで、微細藻類の生育に利用できることがわかった。

しかし、*Chlamydomonas* に関しては、特定排水(希釈なしのもの)、焼却炉排水(1/2 希釈、希釈なし両方)において生育しなかった(Fig. 2)。2 倍希釈した特定排水では生育したことから、おそらく特定排水および焼却炉排水中に、生育の妨げとなる物質が一定量以上存在していたと考えられる。

本実験の結果から、緑藻 *Chlamydomonas* および *Synechocystis* がリン含量 3~6 mg/L 程度の排水中のリンを吸収、利用し、生育ができることが示された。特に、*Synechocystis* については特定排水においても高い生育能力、リン取込み能力を示し、排水処理においてより有用となる可能性が示唆された。これまでも、微細藻類による排水からのリン酸取込みに関する報告はされている。例えば、先に述べた *Aulosira fertilissima* を用いた排水中からの PHB の回収実験の際には、リン酸については 12 日間で実験前の 3.9 mg/L から 0.10 mg/L まで排水中濃度が低下し、約 3.8 mg/L のリン酸の吸収が認められている(Samantaray et al., 2011)。Pathak ら

(2014)の *Chlorella* の報告においても、排水中の 0.44 mg/L のリン酸について、15 日間でその 62 %程度の細胞内吸収が確認された。

また、海洋性藻類 *Nannochloropsis oculata* では、約 2.3 mg/L のリン酸を含む排水中から 14 日間で約 90%のリン酸吸収が報告されている (Sema and Mika, 2015)。Miguel らの 2016 年の報告によると、淡水性緑藻であるイカダモの生育によって、排水中の 13.23 mg/L のリン酸濃度が 15 日間で 0.02 mg/L 以下にまで低下した。この他にも、酸性高温域に生息する紅藻 *Galdieria sulphuraria* や、緑藻 *Halochlorella rubescens* など、種々の微細藻類で排水からのリン酸取込みの報告がある (Selvaratnam et al., 2014, Shi et al., 2016)。

上記の報告から、排水の種類にもよるが、生物種によってもリン酸取込み能力は様々であることがわかる。しかしながら、今回 *Synechocystis* で得られた結果は 7 日間でリン酸濃度にして約 19 mg/L、約 95 %の吸収であったことから、これまでの報告の中でもリン酸取込み能力が高く、大いに実用化に向け検討の価値がある種の一つと考える。

なお、リンの回収については生物学的手法は勿論、化学的、物理的手法も研究が進められている。すでに実用化されている方法の一つに、炭素繊維と鉄材を組み合わせることで、リン酸鉄を生成させて水中のリン酸濃度を低下させる方法がある (小島, 2012)。この技術については、炭素繊維に微生物を繁殖させることで、リン酸やその他の有機物を微生物に利用させ、日本国内のみならず中国など海外の汚染された河川の浄化に効果を示している。この技術と同様、炭素を利用した手法で昨今報告されたのが、黒鉛化炭素の表層にナノ構造の水酸化マグネシウムを添加することで、そこに多量のリン酸を結合させる手法である (Yan et al., 2016)。Yan ら (2016) の報告によると、1 日あたり、炭素 1 g あたり 588.4 mg/g のリン酸回収が可能であり、従来の方法よりも炭素 1 g あたり 1 桁以上高い回収効率であるという。このように、今後は、生物学的手法に加え化学的、物理的手法も交えたより効率のよい回収技術についても検討していく必要があると考える。

また、*Synechocystis* は 100 mM (3.1 g/L) リン酸存在下でも生育が可能であった。上述のように、近年はリン資源の回収につながる生物やメカニズムの報告が多い。また、リン酸欠乏条件と比較して、リン酸過多が生育に与える影響に関する報告は少ないものの、2011 に Naddy らが淡水性緑藻の一種である *Pseudokirchneriella subcapitata* や、*Ceriodaphnia dubia* (ニセネコミジンコ)、淡水魚の一種である *Pimephales promelas* を使用してリン酸を過剰に添加した際の報告がある。彼らの報告によると、*P. subcapitata* においてはリン酸濃度が 3.4 mg/L で 25 %の生育阻害がみられ、生育の限界濃度が 4.8 mg/L であった。この報告と比較すると、*Synechocystis* は高濃度リン酸に対しても高い耐性能をもつと思われる。なお、本

研究室において独立栄養条件下及び従属栄養条件下における高濃度リン酸添加時の *Synechocystis* の生育を比較した報告によると、本章と同様、BG-11 培地を用いた独立栄養条件下では、リン酸濃度 0.2 mM の培養条件と比べ増殖が 1/2 程度に抑制されたものの、300 mM リン酸存在下でも生育が確認された(杉浦 達也、修士論文、2014)。実験開始時の細胞の状態や初期濃度の違いが影響していると思われるが、培養条件次第では、*Synechocystis* は 100 mM 以上のリン酸存在下でも生育が可能と考えられる。

今後、100 mM リン酸存在下における、細胞内へのリン酸取込み速度や蓄積されたリン量、細胞内のポリリン酸量の変化、細胞表面に吸着したリン酸量などを測定することで、実際にどの程度のリン酸が細胞内へ取り込まれたか確かめたい。*Synechocystis* が高度にリンを蓄積していた場合、リンの高度蓄積のメカニズムが解明できれば、それを利用したさらなるリン源の大量回収の可能性が期待される。

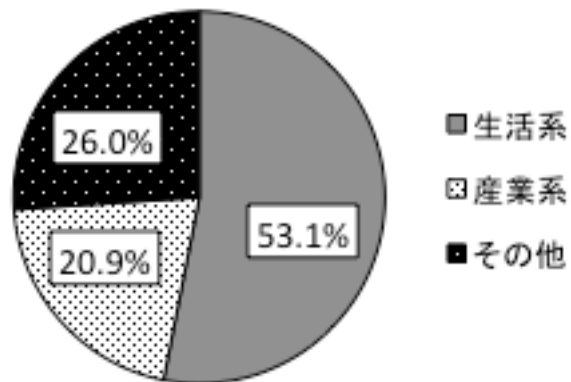



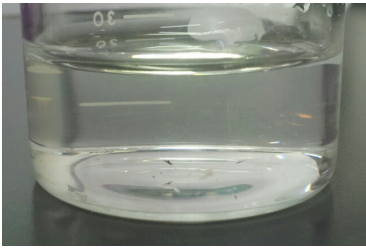
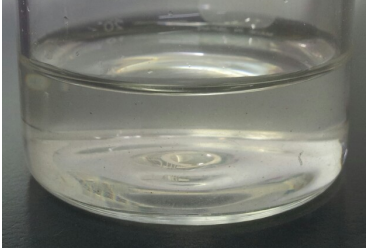
Fig. 1 日本の閉鎖系水域(東京湾、伊勢湾、大阪湾、瀬戸内海)におけるリンの発生源別汚濁負荷量の割合

環境省 報道発表資料 第 8 次水質総量削減の在り方について(答申)
 (<http://www.env.go.jp/press/files/jp/28864.pdf>) をもとに作成した。平成 21 年度調査結果に基づく。



写真 1 実験に使用した排水

Table 1 実験に使用した排水の特徴

排水口からの採取水	特定排水水	焼却炉排水
		
pH 7.47	pH 7.77	pH 7.51
色など： ・無色、ほぼ透明。 ・半透明の浮遊物がやや混ざる。	色など： ・無色、排水口採取水と比較すると若干の濁り。 ・半透明の浮遊物、黒色の小さな固体が混ざる。	色など： ・やや黄色がかっており、濁りがある。 ・半透明の浮遊物、黒色の小さな固体が混ざる。
におい： ・有機溶媒のようなにおいが若干する。	におい： ・有機溶媒のようなにおいが若干する。	におい： ・有機溶媒のようなにおいがする。

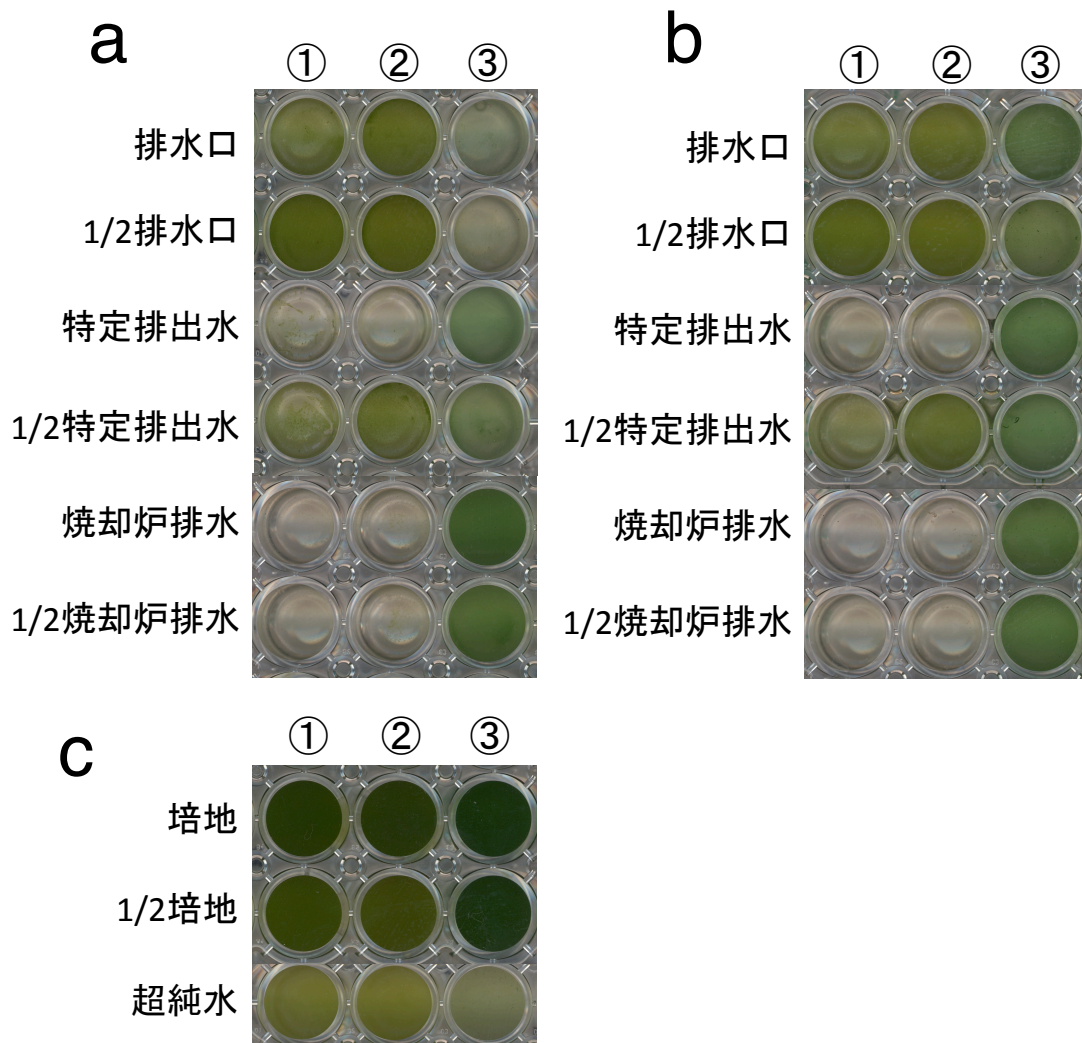


Fig. 2 排水中における *Chlamydomonas*、*Synechocystis* の生育

OD₇₃₀=0.5~1 まで培養した細胞をリン酸を含まない培地で 3 回洗った後、各排水や培地、超純水 2.9 mL 中に 0.1 mL 添加し 1 週間振とう培養した。「1/2」は、排水や培地を超純水で 2 倍希釈したことを示す。a は採取した排水をそのまま使用した結果、b は排水をオートクレーブ後に使用した結果、c は培地(①、②は 1×TAP 培地、③は BG-11 培地)および超純水で実施した結果である。

- ① : *C. reinhardtii* CC125、② : *C. reinhardtii* AR3、
 ③ : *Synechocystis* sp. PCC 6803

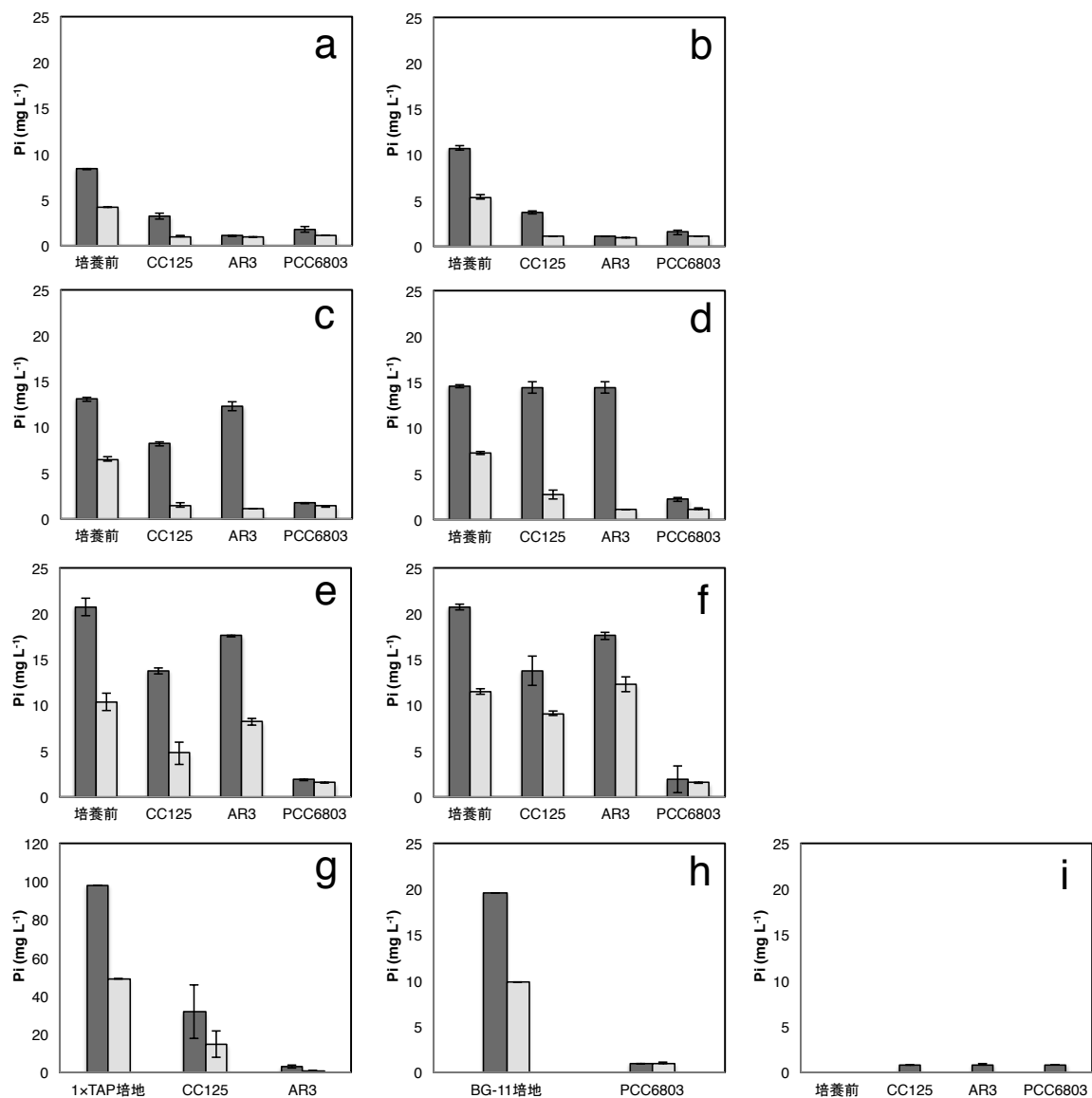


Fig. 3 排水中のリン酸取込み量の比較

Fig. 2 で使用した排水および、培養実験後の細胞懸濁液中のリン酸濃度をマラカイトグリーン呈色法により調べた。グレーのバーは未希釈の溶液、ライトグレーのバーは 2 倍希釈後の溶液の結果であり、a,c,e は未処理の溶液、b,d,f はオートクレーブ後の溶液の結果を示す。

a,b : 排水口からの採取水、c,d : 特定排水、e,f : 焼却炉排水、
g : 1×TAP 培地、h : BG-11 培地、i : 超純水

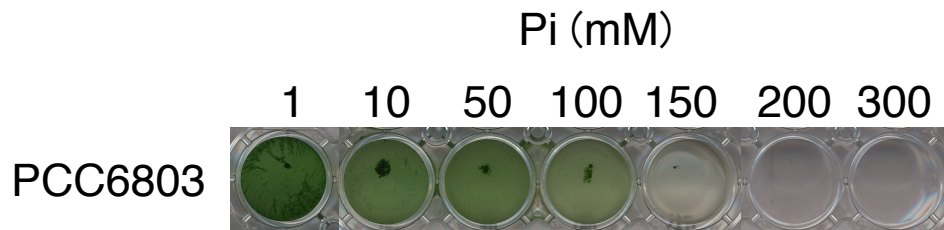


Fig. 4 リン酸過多条件が生育に及ぼす影響

シアノバクテリア *Synechocystis* について、リン酸濃度 1~300 mM に調製した培地中での生育を調べた。OD₇₃₀=0.5~1 まで培養した細胞を、BG-11(-P)培地で 3 回洗ったのち、リン酸濃度を調製した培地 2.98 mL を含む各ウェルに 20 μ L ずつ添加し、1 週間振とう培養した。

< 第 2 章 > 緑藻 *Chlamydomonas* のリン酸輸送体遺伝子の解析とその利用

2-1 緒言

第 1 章より、シアノバクテリアや緑藻による排水中リンの取込みが示され、それらによるリン回収の可能性が示唆された。そこで、より効率的にリンを取込むことができないかを考慮し、リンの細胞内取込みを担うリン酸輸送体に着目した。

本章では、緑藻 *Chlamydomonas* のリン酸輸送体について調べた結果を報告する。*Chlamydomonas* のリン酸輸送体については、先述の通り PTA1~4 および PTB1~PTB12 の存在が示唆されているが(Moseley et al., 2005; Kobayashi et al., 2005)、それらの局在性や機能については未解明である。

複数のリン酸輸送体をもつ場合、例えば、*E. coli* における Pst と Pit(Harris et al., 2001)、*S. cerevisiae* における Pho84、Pho89 と Pho87、Pho90(Harris and Shinha, 2014)のように、high-affinity と low-affinity 両方の輸送体が存在することが多い。親和性や性質が異なる輸送体を複数持つことで、外界の pH やリン酸濃度の変化に応じてそれらの輸送体を使い分けるためである。*Chlamydomonas* においても、存在が示唆されている 16 個の輸送体の中には、リン酸選択性が高い輸送体や、低い輸送体が混在すると推測される。

小林ら(2005)によって、*PTB1* の欠損株 AR3 が、野生株 CC125 と比較して高いヒ酸耐性能を持つことが明らかとなった。AR3 についてリン酸十分条件下における細胞内リン量を調べると、野生株の 2 倍以上であった(Kobayashi et al., 2005)。また、細胞内へのヒ酸取り込みについて調べると、野生株を 0.2 mM ヒ酸存在下で培養した際に 60 nmol·mg⁻¹ Chl のヒ素を細胞内に含有していたのに対し、AR3 は 4 mM ヒ酸存在下で培養しても細胞内ヒ素含量は 25 nmol·mg⁻¹ Chl にとどまっていた(Kobayashi et al., 2005)。以上の結果から、リン酸輸送体の欠損がヒ酸取込み及びヒ酸耐性に関して何らかの影響を及ぼしていると思われた。

なお、*Arabidopsis thaliana* や rice では複数あるリン酸輸送体のうち、ヒ酸を多く取り込む性質の輸送体も存在することがわかっている。*Arabidopsis thaliana* の場合、Phosphate transporter 1 (PHT1) family 輸送体に属する、*S. cerevisiae* Pho84 と相同性の高い H⁺/Pi symporter をもっているが、このうちの *Pht1;1* 変異株及び *Pht1;4* 変異株においてヒ酸存在下における側根の伸張率が野生株の 1.65 倍となったことから、他の輸送体と比較して *Pht1;1* 及び *Pht1;4* のヒ酸輸送性が高いと推測されている(Shin et al., 2004; González et al., 2005)。rice についても、PHT1 family である OsPT1 をもつが、この OsPT1 をノックダウンしたところ shoot での As 蓄積が野生株と比較して 60 %程度に抑えられた(Kamiya et al., 2013)。このことから、OsPT1 が root から shoot へのヒ酸の translocation や取り込みに深く関与す

ることが示唆された。また、OsPT1 と同じく PHT1 family の輸送体遺伝子である *OsPT8* の欠損株では、ヒ酸の取込みが 33~57 %ダウンし、ヒ酸存在下における根の伸長が野生株の 100 倍となったことから、OsPT8 もヒ酸輸送性が高いと考えられている(Wang et al., 2016)。

このような例から、*Chlamydomonas* おいても、リン酸に対し高親和性の輸送体だけでなく、ヒ酸輸送性が高い輸送体も存在する可能性がある。*Chlamydomonas* においてリン酸もしくはヒ酸に対する選択性が高いと思われる輸送体を確認できれば、それをリン酸、ヒ酸ともに耐性能力が高いシアノバクテリアにて発現させることで、より高いリン酸又はヒ酸取り込み能力をもつ細胞を作製できないかと考えた。

2-2 実験操作

2-2-1 *Chlamydomonas* におけるリン酸輸送体遺伝子の発現解析

TAP プレートに保存している細胞を白金耳で取り、TAP 液体培地に植えた。細胞が増殖してきたら新たな TAP 培地に植え継ぎ、前培養を行った。前培養が log phase に達したら、新しい TAP 培地に植え継ぎ、log phase ($OD_{730}=0.3$) に達したものを実験に用いた。 $OD_{730}=0.3$ に達した細胞 250mL を遠心し (3,000rpm, 25°C, 10min)、上清を捨て、新しい TAP 培地 250mL を入れ 2 時間振とう培養した。2 時間後、各々の濃度のヒ酸を培養液に添加し、再び振とう培養し 0、2、4、6 時間後の細胞を回収した。

2-2-1-2 RNA 大量調製法

＜試薬の調製＞

1M クエン酸三ナトリウム

クエン酸三ナトリウム二水和物 58.82 g を dH_2O に溶かし、121 °C、20 分間オートクレーブ滅菌した。

1M Tris-HCl (pH7.5)

Tris 6.057 g を dH_2O に溶かし、HCl で pH7.5 に合わせた後、50 mL にメスアップして 121°C、20 分間オートクレーブ滅菌した。

0.5M EDTA (pH7.5)

EDTA 9.306 g を dH_2O に溶かし、NaOH で pH7.5 に合わせた後、50mL にメスアップして 121°C、20 分間オートクレーブ滅菌した。

solutionD

guanidine thiocyanate (GTC) 47.264 g に、1 M クエン酸三ナトリウム二水和物 2.5 mL (終濃度 25 mM)、20 % ドデカノイルサルコシン酸ナリウム 2.5 mL (終濃度 0.5%) を加えて、100 mL にメスアップし、121 °C、20 分間オートクレーブ滅菌後 4°C で保存した。使用直前に 0.1 M になるよう β -メルカプトエタノールを加えた。

3M 酢酸ナトリウム (pH5.2)

酢酸ナトリウム三水和物 48.72 g を dH_2O に溶かし、pH5.2 に合わせた後、100 mL にメスアップし 121 °C、20 分間オートクレーブ滅菌した。

RNA solution

1 M Tris-HCl (pH7.5) 0.5 mL (終濃度 10 mM)、10 % SDS 5 mL (終濃度 1 %)、0.5 MEDTA (pH7.5) 0.5 mL (終濃度 5 mM)、5 %中性フェノール 2.5 mLを加え、dH₂O で 50 mL にメスアップした。

CsCl/EDTA 溶液

CsCl 191.9304 g、0.5M EDTA(pH7.5) 4 mL (終濃度 0.01 M)を加え、dH₂O で 200 mL にメスアップ後、121 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌した。

<RNA 抽出操作>

乾熱滅菌した乳鉢に液体窒素を注ぎ、そこに回収した細胞と 2 mL の solution D を入れて細胞をすりつぶした。細胞が粉末状になってきたら 4 mL の solution D を加え液状になるまですり潰した。細胞液をホモジナイザーで 3 回ホモジナイズし、完全に液状になっていることを確認した後、13,000 g, 4 °C, 10 min 遠心した。遠心中に、Beckman 50 ultra-clear centrifuge tube の側面を solution D で 2 回洗い、キムタオル上に逆さまにして乾かしておいた。遠心後、上清を 23G のシリンジに 2~3 回通して DNA を断片化した。乾かしておいた遠心チューブに CsCl/EDTA 溶液 4 mL を入れ、その上に RNA 粗抽出液を重層した。

サンプルの入った遠心チューブをスイングローター SW40 で超遠心(Beckman, L-60)にかけた(33,000rpm, 20°C, 14h)。超遠心後、アスピレーターにつないだパスツールピペットで上層の GTC 層を取り除き、solution D をチューブ口から伝わらせて入れ、壁面に残った粗抽出液を洗い落とす。DNA 層まで取り除き、再び solution D で壁面を洗った後、遠心チューブの下から 3 cm くらいのところまで上清を取り除いた。クリーンベンチ内でよく熱したカッターを用い、液面から 1~2 cm のところを切断した。上清を 1.5 mL の微量遠心チューブにとり、沈殿が入った超遠心チューブに 1 mL のエタノールを入れ沈殿をリンスした後、エタノールを取り除いた。上清が入った微量遠心チューブを 15,000 g, 4 °C, 10 min 遠心し、沈殿を残して上清を完全に取り除いた。超遠心チューブの方に 450 μL の RNA solution を加え軽くピペッティングし、沈殿を完全に溶かした。RNA 溶液を全量微量遠心チューブに移し、ピペッティングして微量遠心チューブ内の沈殿も全て溶かしたら、ボルテックスを用いてよく懸濁した。RNA 溶液に 45 μL の 3M CH₃COONa(pH5.2)、1 mL エタノールを加え、-30°C のフリーザーで 30min 以上置いた。エタノール沈殿後、13,000 g, 4 °C, 20 min 遠心した後、上清を捨てて 70 %エタノール 800 μL でペレットを洗った。遠心し、上清を完全に取り

除いた後、アスピレーターで 5 min 乾燥させた。沈殿が乾いたら 450 μ L の RNA solution、45 μ L の 3 M CH₃COONa(pH5.2)を加え懸濁した後遠心した。遠心後、フェノールクロロホルムで処理し、エタノールで沈殿させた。30 分以上置いたら、遠心し、70 %エタノールで沈殿を洗った後アスピレーターで乾かした。沈殿が乾いたら diethyl pyrocarbonate (DEPC)水に懸濁し、これを RNA 溶液とした。

2-2-1-2 RT-PCR

抽出した RNA を、以下のように DNase 処理した後、cDNA を合成し、それを用いて PCR を行いリン酸トランスポーター遺伝子の発現量を調べた。

<DNase 処理>

下記のように調製した RNA 溶液を、37 °C で 30min 処理した後、DEPC dH₂O を 300 μ L 加え、フェノールクロロホルム処理、クロロホルム処理をした。3 M CH₃COONa 45 μ L、1 mL エタノールを加え-30 °C のフリーザーで 30 分以上置き沈殿させた。エタノール沈殿後遠心し、上澄を取り除いて DEPC dH₂O に懸濁した。

total RNA	171	μ L (10~50 μ g)
10×DNase I buffer	20	μ L
RNase inhibition(40U/ μ L)	1	μ L
DNase I	8	μ L
total	200	μ L

<1st strand cDNA 合成>

DNase 処理後のサンプルに下記のものに加え、70 °C、10min 処理した後、4 °C に 5 分以上置いた。13.5 μ L の 2×RT を加えた後、50 °C 60min→99 °C 5min →4 °C に 5 分以上置き、TE を 80 μ L 加えて加え-30°C のフリーザーで保存した。

total RNA	5	μ g
primer (oligo (dT))	0.5	μ L (2.5pmol)
DEPC dH ₂ O		
total	6.5	μ L

2×RT (6.5 本分)

5×RT buffer	26	μ L
-------------	----	---------

2.5mM dNTPs	52 μ L
Rever Tra Ace (100U)	6.5 μ L
RNase inhibition (20U)	3.25 μ L

< PCR >

cDNA を template として、PCR で増幅を行った。

[95°C 4min30sec、(95°C 30sec、60°C 30sec、72°C 30sec)22~50cycles、72°C 7min、4°C ∞]

(6 本分)

10×KOD plus buffer (TOYOBO)	13.0 μ L
2 mM dNTPs	13.0 μ L
25 mM MgSO ₄	10.4 μ L
template	2.0 μ L
primer (F)	3.2 μ L
primer (R)	3.2 μ L
KOD plus DNA pol. (TOYOBO)	2.6 μ L
dH ₂ O	71.6 μ L

使用したプライマー

PTB1 : (Kobayashi et al., 2005)

5'-CTGATGATGGCGTTCTGGTCTCTG-3'、

5'-CCGCGAGTGACGTAGTATGC-3'

PTB2 : (Moseley et al., 2005)

5'-TGTGCTCGTGCATTCTCTTC-3'、

5'-CCCTTGGTGAACACGAAGTAA-3'

PTB3 : (Moseley et al., 2005)

5'-GCGAGAACTCCTACGTCCTG-3'、

5'-AGTCCAGTCGCTGTTGGAAG-3'

PTB4 : (Moseley et al., 2005)

5'-CCAACCTGGCAATCTACATG-3'、

5'-GCCTTGTTGAGTCCCAGT-3'

PTB5 : (Moseley et al., 2005)

5'-CTCAACCCAGTTGGCAATTTACTTT-3'、

5'-GCCTTGTTTCGAGTCCCAGT-3'

PTB6 : (Moseley et al., 2005)

5'-TTCTTCCTGAACCGCATCTT-3'、

5'-GCTCTTCGCTCCCTTGTAGA-3'

PTA1 : (Moseley et al., 2005)

5'-TGCCGTCCATGCCCTTAACAC-3'、

5'-GTGGACAACCGCACCAAGTTCT-3'

PTA2 : (Moseley et al., 2005)

5'-CATGGGCTTCGCATGGATGTTTGTT-3'、

5'-ATTGGTGACGGGAATGATAGCGT-3'

PTA3 : (Moseley et al., 2005)

5'-CATGGGCTTCGCATGGATGTTTGTT-3'、

5'-TGCCGTGGGCTGCTGCTTGT-3'

PTA4 : (Moseley et al., 2005)

5'-CATGGGATTCGCATGGATGTTTGTT-3'、

5'-CGGCCCTCTCTGAACCCTACTTCT-3'

PTB type :

5'-TACCTCTGGCTGGTGGTGGT-3'、

5'-GCGGACAATCAGGAAGAGAA-3'

Cblp :

5'-GAGTCCAACACTACGGCTACGC-3'、

5'-ATGCTCTTGCTCTCCAGGTC-3'

2-2-2 *Synechococcus* への *PTB2* の遺伝子導入

Nakajima らが 2001 年に報告したベクターを用いた。構造を Fig. 5 に示す。

2-2-3 組み替え株の確認

以下の手順で *Synechococcus* 野生株および、*PTB2* 導入株の DNA を抽出した。

1. 光独立栄養条件下で液体振盪培養を行った $OD_{730}=1.0$ の細胞 10 mL を使用した。10 mL の遠心チューブに分注し、4°C、3500 rpm、10 分間遠心し、デカンテーションで上清を除いた。
2. 1×TE を 1 mL 加え細胞を懸濁し、1.5 mL の遠心チューブに移した。その後、4°C、15000 rpm、5 分間遠心し、上清を捨てた。
3. 上清に 1×TE を 500 μ L 加え細胞を懸濁した後、中性フェノールを 200 μ L 加えた。細胞を懸濁し、4°C、15000 rpm、5 分間遠心した。
4. 上清を新しい遠心チューブに移し、上清に中性フェノール、クロロホルムを 100 μ L ずつ加え、懸濁し、4°C、15000 rpm、5 分間遠心した。
5. 上清を新しい遠心チューブに移し、クロロホルムを 200 μ L 加え懸濁し、4°C、15000 rpm、5 分間遠心した。
6. 上清を新しい遠心チューブに移し、Solution III を 200 μ L、100%エタノールを 1 mL 加え-80°C で 5 分間冷凍した。
7. 6. の懸濁液を室温で溶かし、グリコーゲン 1 μ L 加え、4°C、15000 rpm、5 分間遠心した。
8. 沈殿に 70%エタノールを 200 μ L 加え懸濁し、4°C、15000 rpm、5 分間遠心した。
9. 沈殿を 20 μ L の 1×TE に溶かし、20°C で保存した。

1×TE

1 M Tris-HCl	5	mL
0.5 M EDTA	1	mL
dH ₂ O	up to	500 mL

Solution III

CH ₃ COOK	60	mL (Stock conc. 5M)
CH ₃ COOH	11.5	mL (Stock conc. 18N)
dH ₂ O	up to	100 mL

DNA 抽出後、*PTB2* プライマーを用いて以下の条件で PCR を行い、反応後のサンプルを電気泳動し、バンドを確認した。

PCR

[95°C 4min30sec、(95°C 30sec、60°C 30sec、72°C 30sec)35 cycles、72°C 7min、

4°C ∞]

(6 本分)

10×KOD plus buffer (TOYOBO)	13.0	μ L
2 mM dNTPs	13.0	μ L
25 mM MgSO ₄	10.4	μ L
template	2.0	μ L
primer (F)	3.2	μ L
primer (R)	3.2	μ L
KOD plus DNA pol. (TOYOBO)	2.6	μ L
dH ₂ O	71.6	μ L

PTB2 プライマー : (Moseley et al., 2005)

5'-TGTGCTCGTGCATTCTCTTC-3'、

5'-CCCTTGGTGAACACGAAGTAA-3'

2-2-4 *Synechococcus* 野生株および PTB2 導入株の生育とクロロフィル量の測定

Synechococcus 野生株および PTB2 導入株は、弱光下、通気培養で OD₇₃₀=0.3 まで培養したのち、実験に用いた。生育については、OD₇₃₀=0.3 まで培養した細胞を 50 mL 遠心チューブに移し、25°C、3500 rpm、15 分間遠心した後、新しい BG-11(+P) 培地に移しその後の濁度(OD₇₃₀)を測定した。クロロフィル量については次のように測定した。採取した細胞懸濁液 1 mL に、100 倍希釈したポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノラウレート(tween20) 5 μ L を加えよく混ぜ、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清を 50 μ L 残し、それ以外の上清は完全に捨てた。残された上清 50 μ L に、沈殿した細胞を懸濁した後、950 μ L のメタノールを加えてよく攪拌した。上記と同様に 5 分間遠心した後、上清の吸光度(730 nm、665 nm)を分光光度計で測定し、以下の式によりクロロフィル量を求めた。

$$\text{クロロフィル a 量(mg/L)} = (A_{665} - A_{730}) \times 13.42$$

2-2-5 ヒ酸耐性能の比較

細胞培養プレート(IWAKI, 24 ウェル)の各ウェルに、ヒ酸濃度 0~200 μ M になるよう BG-11(+P)培地で調製した。ヒ酸は下記のようにして作製したものを使用した。OD₇₃₀=0.3 まで培養した細胞 20 μ L を各ウェルに添加し、弱光照射下、27°C の人工気象器内で 1 週間振とう培養し、生育を観察した。

ヒ酸の調製

$\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬特級)を dH_2O 、または、実験によっては BG-11(+P,-P) 培地、1×TAP(+P,-P)培地で 1 M に調製し、 $0.2 \mu\text{M}$ フィルターを用い濾過滅菌し室温で保存した。なお、リン酸欠乏条件下の実験においては、Sodium arsenate dibasic heptahydrate (SIGMA-ALDRICH, 純度 99.998 %)を使用した。

2-2-6 細胞内リン、ヒ素蓄積量の測定

対数増殖期($\text{OD}_{730}=0.3$)まで培養した細胞を、 25°C 、3500 rpm、15 分間遠心した。遠心後の細胞を新しい BG-11(+P)培地に移し、1 時間通気培養して細胞を慣らした。1 時間後の細胞をヒ酸添加前(0 時間)のサンプルとして回収した。終濃度 150 mM になるようヒ酸を添加し、ヒ酸添加後 15 分、30 分、1 時間、8 時間、24 時間、36 時間の細胞を回収した。細胞回収時は次のように操作した。1/100 tween20 を $5 \mu\text{L}$ 入れた遠心チューブに culture 1mL を採取した。採取した culture はすぐに 4°C 、15000 rpm で 1 分遠心した。上清を取り除いたら、BG-11(-P)培地 1 mL を入れて細胞を懸濁し、1/100 tween20 を $5 \mu\text{L}$ 入れて再度 1 分遠心した。この操作を 2 回繰り返した後、上清を完全に取り除いた。

採取した細胞を湿式灰化した。採取した細胞に硝酸(Nitric Acid 1.42, Ultrapur, Cat. No. 28163-5B, 関東化学, 500mL)を $500 \mu\text{L}$ 加え、細胞を可溶化した後、ヒートブロックにて 80°C で 10 分間、 110°C で 30 分間反応させた。反応後のサンプルを室温までもどし、過酸化水素(Hydrogen Peroxide, Ultrapur, Cat. No. 8084-2B, 250mL, 関東化学)2mL を加えてゆっくり混合してから、 110°C で 30 分間反応させた。サンプルに 100 ppb に調製した Te 溶液を 1 mL 加え内標準とした後、超純水により 10 mL に定容し、ICP-MS 測定用サンプルとした。

作製したサンプルを、同心円状のネブライザーとサイクロンスプレーチャンバー(Glass Expansion, West Melbourne, Australia)と接続した ICP-MS(ELAN DRC-e; PerkinElmer SCIEX, Concord, Canada)にて測定した。なお、塩化アルゴンによる干渉を防ぐため、酸素を流入し酸化ヒ素として測定を行った(a dynamic reaction cell(DRC)法)。ICP-MS 分析の条件を Table 2 に示す。

Table 2 ICP-MS 測定条件

プラズマ出力	1550 W
プラズマガス流量	Ar 17.8 L min^{-1}
補助ガス流量	Ar 1.28 L min^{-1}

ネブライザーガス流量	Ar 1.04 L min ⁻¹
リアクションガス	O ₂ (純度 : 99.999%)
セルガス流量	He 0.8 mL min ⁻¹
RPq	0.5
軸方向電界電圧	325-350 V

2-2-7 細胞内リン酸、ヒ酸取込み速度の測定

対数増殖期(OD₇₃₀=0.3)まで培養した細胞を、50 mL polypropylene conical tube(FALCON)に採取、H-30R (KOKUSAN)にて 25 °C、3500 rpm、15 min 遠心し、上澄みを捨てた。沈殿した細胞をリン酸を含まない BG-11 培地に懸濁し、再度 25 °C、3500 rpm、15 min 遠心し、上澄みを捨てた。この操作を 2 回繰り返し、計 3 回リン酸欠乏培地で wash した細胞を BG-11(-P)培地に懸濁し、通気しながら 24 時間培養を行った。培養 24 時間後の細胞を As(V)添加前のサンプルとして回収し、実験を開始した。

リン酸欠乏条件にて培養した細胞をプラスチックカップにとり、終濃度 10 μM になるよう Pi もしくは As(V)を添加した。一定時間経過後の細胞 1 mL を採取し、1-2-3 と同様にマラカイトグリーン呈色法により細胞外リン酸およびヒ酸量を測定した。

同様の実験を 3 回繰り返し、クロロフィル量あたりの取込み速度を求めた。

2-3 結果

2-3-1 *Chlamydomonas* 野生株及びヒ酸耐性株のリン酸輸送体遺伝子の発現

*Chlamydomonas*においては、光合成系の変異株においてヒ酸耐性能が報告されてきた(Hudock et al., 1979; Spreitzer and Mets, 1981, 1982)。こういった株では、光合成系の損傷により、光リン酸化が低下し細胞内のリン酸プールが保たれることにより、ADP-Asの生成が抑制されるためヒ酸耐性能をもつのではないかと考えられていた。

そこで、野生株及びphosphoribrokinaaseを欠損した光合成系損傷株であるCC981を含めたヒ酸耐性株について、リン酸十分条件下におけるリン酸輸送体遺伝子の発現を調べた。結果、野生株と変異株の間で、発現レベルが異なる遺伝子が存在することが明らかとなった(Fig. 6)。CC981ではPTA2、PTA4、AR3ではPTA2、PTB2のmRNAレベルが野生株よりも高かった。逆に、CC981ではPTB3、PTB5、AR3ではPTB5のmRNAレベルが野生株よりも低かった。このことから、*Chlamydomonas*のリン酸輸送体のうち、PTA2、PTA4、PTB2はヒ酸よりもリン酸に対して選択制が高く、PTB5は他の輸送体と比較してヒ酸の選択制が高い可能性が考えられた。なお、野生株及びCC981におけるPTB1、野生株、CC981、AR3におけるPTB7~PTB12については、mRNAレベルが非常に小さく、検出することができなかった。

2-3-2 *Chlamydomonas PTB2* 遺伝子の *Synechococcus* への導入

2-3-1の結果から、ヒ酸耐性株 AR3 における mRNA レベルが高かった遺伝子の一つ、PTB2について、Fig. 5a で示したベクターを用い *Synechococcus* 野生株ゲノムのニュートラルサイトに相同組み換えにより挿入した。形質転換後の変異株は、スペクチノマイシン存在下で生育が可能であることを確認した。

また、得られた株より DNA を抽出し、PTB2 遺伝子のプライマーを用いて PCR を行うことにより、PTB2 遺伝子が導入されていることを確認した(Fig. 7)。

2-3-3 *Synechococcus* 野生株及び PTB2 導入株の生育

Synechococcus 野生株と、PTB2 導入株の生育を比較した。対数増殖期まで培養した細胞を新しい BG-11(+P)培地に移し、その後の生育を調べたところ、生育 24 時間後まで野生株及び導入株にほとんど差がみられなかった(Fig. 8)。生育 48 時間まで培養すると各株で生育にややばらつきがみられたが、野生株と PTB2 導入株の間で有意な差は認められなかった。クロロフィル量も、生育とほぼ同様の傾向を示した。

2-3-4 *Synechococcus* 野生株及び *PTB2* 導入株のヒ酸耐性

リン酸十分条件下で対数増殖期まで培養した細胞 20 μ L を、2.98 mL の BG-11(+P)培地、もしくは種々の濃度のヒ酸溶液に添加しその後の生育を調べたところ、野生株、*PTB2* 導入株ともにヒ酸 170 mM 存在下まではっきりと生育が確認された(Fig. 9)。

2-3-5 *Synechococcus* 野生株及び *PTB2* 導入株のリン酸十分条件下における細胞内リン、ヒ素蓄積量

リン酸十分条件下にて対数増殖期まで培養した細胞にヒ酸を終濃度 150 mM になるよう添加し、その後の細胞内蓄積量を調べたところ、リン、ヒ素ともに野生株と変異株であまり大きな差はみられなかった(Fig. 10)。

2-3-6 *Synechococcus* 野生株及び *PTB2* 導入株のリン酸欠乏条件下においた細胞内リン酸、ヒ酸取込み速度

リン酸十分条件にて対数増殖期($OD_{730}=0.3$)まで培養した細胞で、リン酸及びヒ酸の取込み初速度を上清中の成分の減少から求めようと試みたが、リン酸十分細胞では、取込み活性が低く、測定することができなかった(data not shown)。そこで、リン酸、ヒ酸取込み活性を調べる際には、リン酸欠乏条件下においた細胞を用いた。リン酸欠乏条件下にて培養した細胞に、終濃度 10 μ M になるようリン酸、またはヒ酸を添加し、細胞内取込み速度を調べた(Fig. 11)。一定時間経過後の培地中のリン酸またはヒ酸濃度をマラカイトグリーンにて測定し、クロロフィル量あたりの取込み速度を求めた。リン酸取込み速度については、野生株と *PTB2* 導入株に差はみられなかった(Fig. 11 a)。また、ヒ酸取込み速度については、*PTB2* 導入株において取込み速度が低い傾向で、ヒ酸に対するリン酸取込み速度の値が大きいようにみえたが(Fig. 11 b, c)、t 検定を実施したところ野生株の結果との間に有意差は認められなかった。

しかしながら、*Synechococcus* 野生株が、リン酸取込み速度約 4 μ mol \cdot mg $^{-1}$ Chl \cdot min $^{-1}$ に対し、ヒ酸取込み速度が約 0.14 μ mol \cdot mg $^{-1}$ Chl \cdot min $^{-1}$ と、約 28 倍もの差があることがわかった。

2-4 考察

野生株、CC981、AR3の細胞内リン酸、ヒ酸取り込みを調べたところ、ヒ酸耐性を示すCC981及びAR3は、野生株と比較してヒ酸取り込み量は低く、リン酸取り込み量は高かった(Murota et al., 2012)。リン酸十分条件下におけるリン酸輸送体遺伝子発現を調べたところ、AR3株ではPTB2のmRNAレベルが野生株よりも高かった点(Fig. 6)、また、AR3のリン酸取り込み能が他株よりも優れていた点から(Kobayashi et al., 2005, Murota et al., 2012)、*Chlamydomonas*のリン酸輸送体のうち、PTB2がリン酸選択性が高い輸送体の一つである可能性が推測された。

なお、CC981については、前述の通り光合成系の損傷による光リン酸化の低下がヒ素耐性の原因と考えられていたが、本実験結果から細胞内へのヒ素取込みの抑制がヒ素耐性につながるということが明らかとなった。

なお、野生株と比較してCC981またはAR3にてmRNAレベルが高かったPTA2、PTA4、PTB2のうち、PTA4とPTB2については、リン酸欠乏条件下にて他の遺伝子よりも顕著に転写レベルが上昇することがわかっており(Moseley et al., 2006)、高親和性リン酸輸送体であることが推測されている。

そこで、PTB2をシアノバクテリアにて発現させることで、よりリン酸取込み活性が高い細胞を得られないかと考えた。実験には、*Synechocystis*と同様、形質転換が可能でゲノム解読が完了していて(Holtman et al., 2005)、遺伝子解析が容易なシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942(以下、*Synechococcus*)を使用した。PTB2を組み込んだベクター(Fig. 5a)を用いて *Synechococcus*の形質転換を行った。

*Synechococcus*のリン酸輸送体については、明条件下でNa⁺依存的に取り込みを行う low-affinity の Pit system と、ABC-transporter である high-affinity の Pst system の存在が明らかとなっている(Ritchie et al., 1997)。後者の Pst system については、1つのリン酸分子の輸送に1ATPを消費することが予測されている(Ritchie et al., 1997)。また、そのリン酸輸送の活性は、ペリプラズムに存在するリン酸結合タンパク SphXによって制御されていることが分かっている(Falkner et al., 1998; Archanai et al., 2011)。

野生株と導入株について比較したところ、ヒ酸耐性能やリン酸、ヒ酸の取込みに有意差は認められなかった(Fig. 8, 9, 10, 11)。ヒ酸耐性に関して、ヒ酸濃度200mMにおいて生育の速さにやや違いがみられたが(Fig. 9)、実験開始時の細胞内リン量や、細胞に吸着したリンの持ち込みが影響する可能性もある。ヒ酸耐性能に関しては、*Chlamydomonas* AR3株がヒ酸耐性を示すのも、野生株CC125と比較して細胞内に約2倍のリンを蓄積していることが要因の一つと考えられている他(Kobayashi et al., 2005)、*Microcystis eruginosa*においても、培地中のリン酸濃度を高くすることで(0-175 μ M)、ヒ酸(1-10 μ M)耐性能が高くなったという報告もある(P. Guo et

al., 2011)。以上のことから、本研究においても実験開始時の野生株と導入株の細胞内リン量や細胞外に吸着したリン量に違いがあった場合、ヒ酸存在下における生育速度に影響した可能性がある。また、ヒ素蓄積量については、やや高い値が得られた株もあったが(Fig. 10)、細胞回収時の洗い操作なども影響している可能性が考えられる。

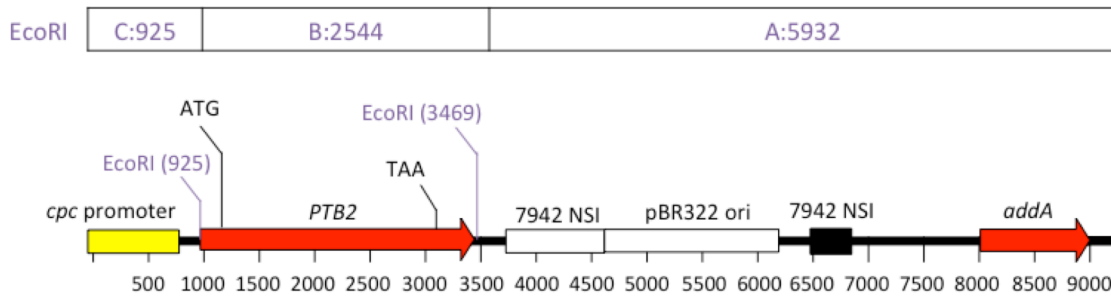
PTB2 を含めた *Chlamydomonas* のリン酸輸送体については、先述の通り実験的に局在性が証明されてはいないが、遺伝子配列に基づき Target P v.1.01 を用いた局在性の予測は行われている(Moseley et al., 2006)。クロロプラスト、ミトコンドリア、分泌経路、その他における局在性について予測し、信頼度をスコア別に比較したところ、*PTB2* を含む *PTB type* の輸送体は分泌経路に局在している可能性が高いことが示された。Moseley らは、細胞外リン酸濃度低下時に、*PTB type* の輸送体遺伝子の発現が上昇することからも、*PTB type* の輸送体が分泌系、特に細胞膜又は液胞膜上に発現している可能性が高いと予測している。以上のことから *Chlamydomonas* においては、*PTB2* は細胞外からのリン酸取込みに関与している可能性が高いと思われる。

本章では、*Chlamydomonas* の *PTB2* を導入しても *Synechococcus* のリン酸、ヒ酸取込みについて明確な差は認められなかった。過去にも、本研究室において *Chlamydomonas PTB2* を *Saccharomyces cerevisiae* において発現させようと試みたが、G、C 含有率が多い *Chlamydomonas* の codon usage と合わなかったためか、うまく発現されなかった(小林 功、博士論文、2003)。今後、*Synechococcus* の細胞膜にターゲティングするシグナル配列を用い、細胞膜上での発現を確認したのち、リン酸やヒ酸の取込みについて調べる必要があると考える。

PTB2 の機能に関しては、*E. coli* により大量発現させる、もしくは *Xenopus oocyte* 上で発現させるといった方法も有効と考える。

また、本章において、*Synechococcus* についてはヒ酸 170 mM 存在下でも生育が可能であり、高いヒ酸耐性能が明らかとなった。また、リン酸欠乏条下において、リン酸取込み速度が約 $4.0\sim 5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$ であったのに対し、ヒ酸取込み速度が約 $0.05\sim 0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$ と、リン酸とヒ酸の取込み速度に 28～90 倍程の差があることから、リンの選択的回収に非常に有用である可能性が示唆された。

a



b

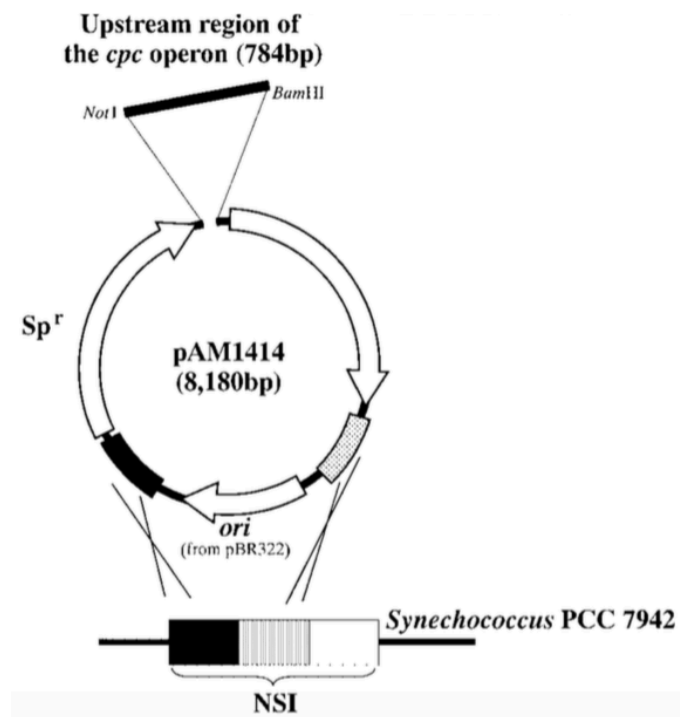


Fig. 5 *Synechococcus* ゲノムへの相同組み換えによる *PTB2* 導入に用いたベクターの構造

b を a のように改変して使用した。b は、Nakajima らの 2001 年の報告から引用した。

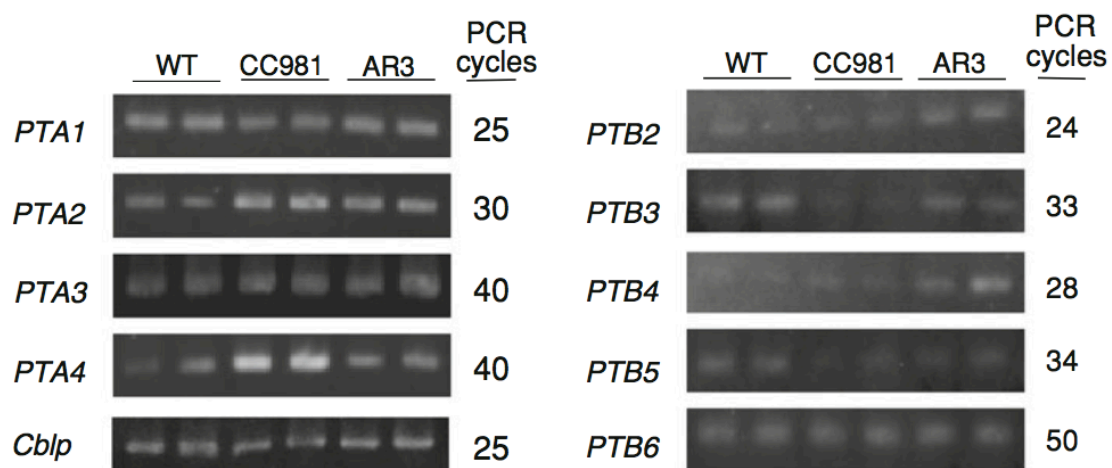


Fig. 6 *Chlamydomonas* 野生株およびヒ酸耐性株のリン酸輸送体遺伝子発現
 リン酸十分条件下における *Chlamydomonas* のリン酸輸送体遺伝子の発現を
 比較した(Murota et al., 2012)。

WT : 野生株 CC125、CC981 : 光合成系損傷株、AR3 : *PTB1* 欠損株

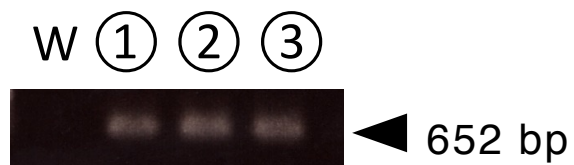


Fig. 7 *PTB2* 組み替え DNA の確認

Synechococcus 野生株および *PTB2* 導入株の DNA を抽出し、*PTB2* プライマーを用いて PCR したものを電気泳動し、*PTB2* の発現を確認した。

W : 野生株、①、②、③ : *PTB2* 導入株

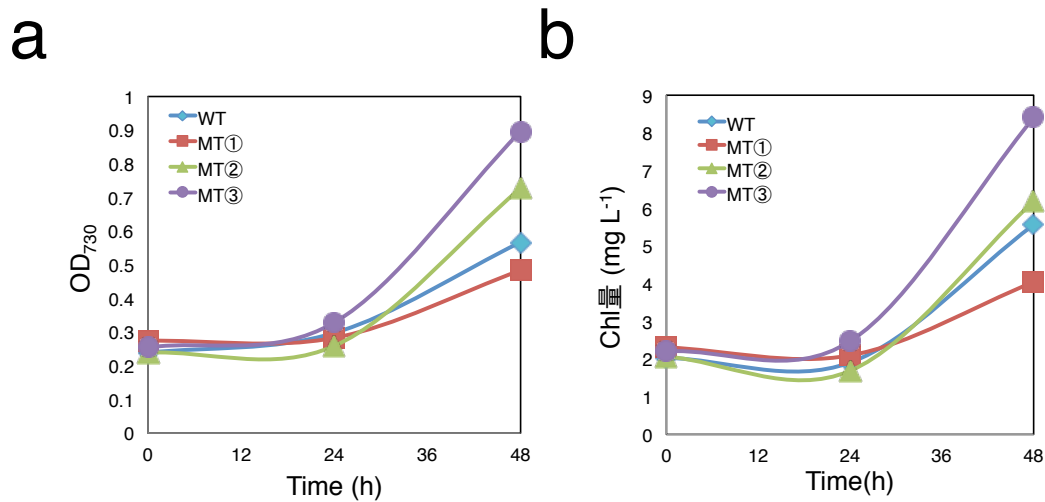


Fig. 8 *Synechococcus* 野生株および *PTB2* 導入株の生育とクロロフィル量の変化

対数増殖期 ($OD_{730}=0.3$) まで培養した細胞を新しい BG-11(+P) 培地 (リン酸濃度 0.2mM) に移し、通気培養した際の生育と、クロロフィル量の変化を調べた。

a : 生育の変化、b : クロロフィル量の変化

W : 野生株、MT①、MT②、MT③ : *PTB2* 導入株

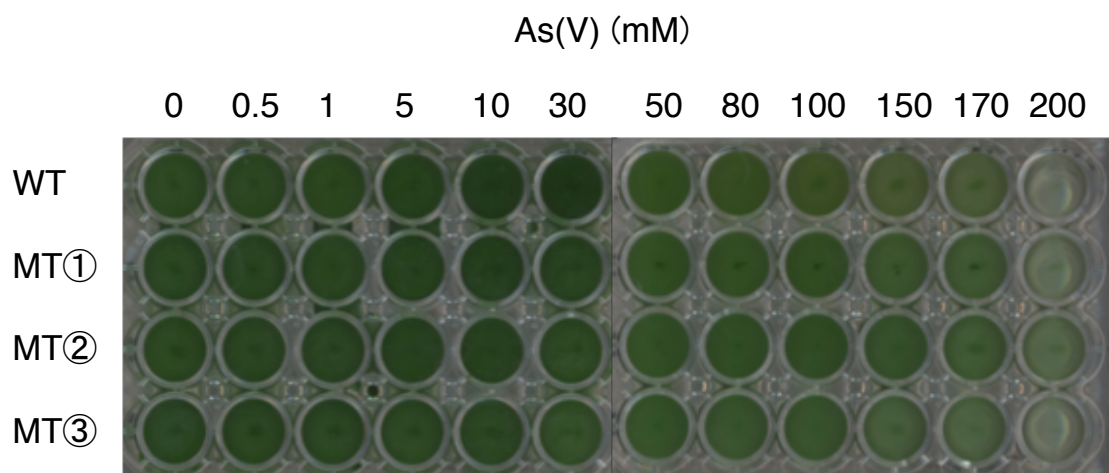


Fig. 9 *Synechococcus* 野生株および *PTB2* 導入株のヒ酸耐性

BG-11(+P)培地(リン酸濃度 0.2mM)で対数増殖期まで前培養した細胞を、種々の濃度のヒ酸を添加した 1.98 mL の BG-11(+P)培地中に 20 μ L ずつ添加し、1 週間振とう培養した。

WT : 野生株、MT①、②、③ : *PTB2* 導入株

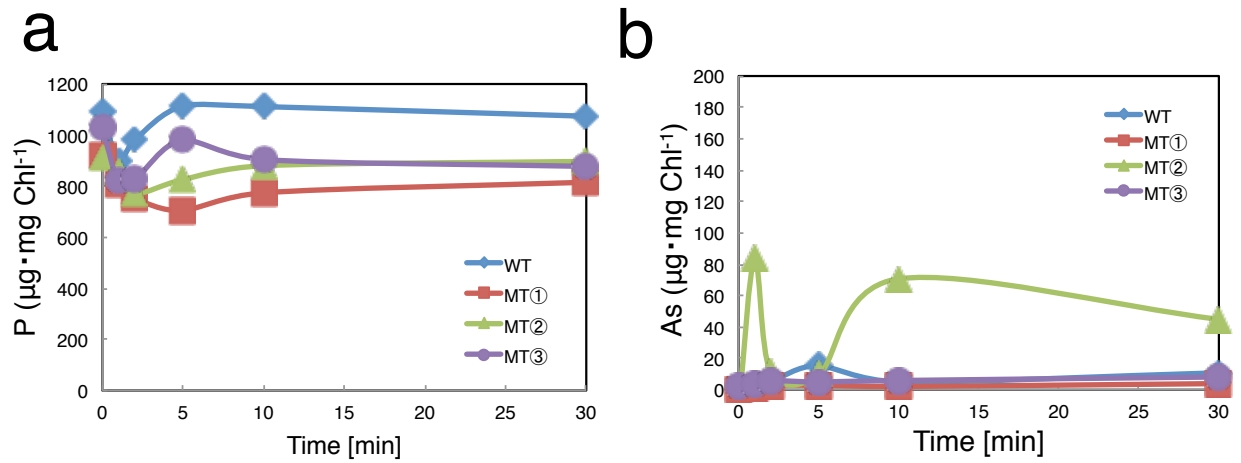


Fig. 10 *Synechococcus* 野生株および *PTB2* 導入株の、細胞内リン、ヒ素蓄積量
 対数増殖期 ($OD_{730}=0.3$) まで培養した細胞を新しい BG-11(+P) 培地 (リン酸濃度 0.2mM) に移し、ヒ酸を終濃度 150mM になるよう添加し、一定時間後の細胞内 P、As 蓄積量を調べた。

a : 細胞内リン蓄積量、b : 細胞内ヒ素蓄積量

WT : 野生株、MT①、MT②、MT③ : *PTB2* 導入株

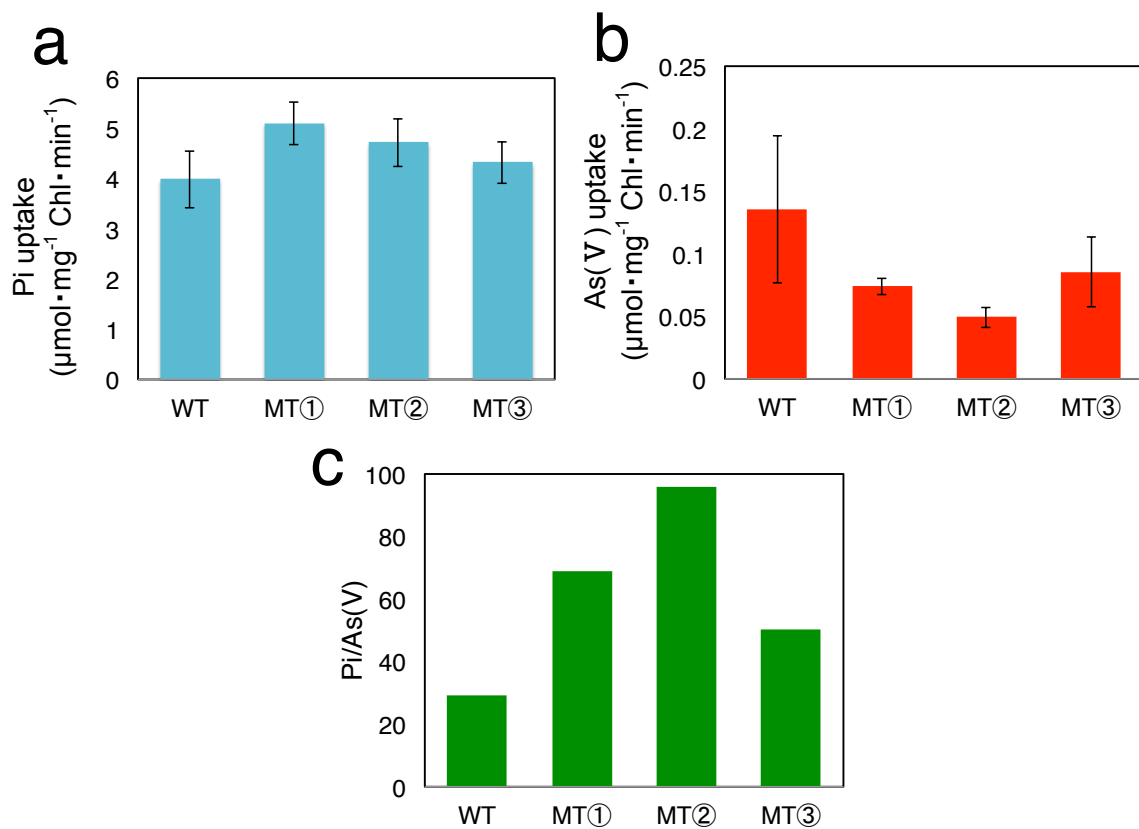


Fig. 11 *Synechococcus* 野生株および *PTB2* 導入株の細胞内リン酸、ヒ酸取込み速度

対数増殖期 ($\text{OD}_{730}=0.3$)まで培養した細胞をリン酸欠乏培地で洗浄、BG-11(-P)培地にて 24 時間培養した後に、リン酸またはヒ酸を終濃度 $10\mu\text{M}$ になるよう添加し、細胞内への取込み速度を調べた。

a : 細胞内へのリン酸取込み速度、b : 細胞内へのヒ酸の取込み速度、

c : ヒ酸取込み速度に対するリン酸取込み速度の割合

WT : 野生株、MT①、MT②、MT③ : *PTB2* 導入株

< 第 3 章 > *Synechocystis* のヒ素耐性能とリン酸輸送体の関係

3-1 緒言

第 2 章において、*Synechococcus* の野生株及び *C. reinhardtii* PTB2 導入株において、細胞内へヒ素よりもリン酸が選択的に取り込まれることが確認された。

そこで本章では、*Synechocystis* においてもそのような選択性があるのか、また、選択性があるならそのメカニズムはどのようなものか、調べることにした。第 2 章でも示されたとおり、シアノバクテリアの特徴の一つとして、非常に高いヒ素耐性能をもつということが挙げられる。緑藻 *Chlamydomonas* や *Chlorella* が、通常培養条件下にて約 1mM~2.5mM ヒ素存在下での生育が限界であるのに対し、シアノバクテリアは 150mM ヒ素存在下でも生育が可能である (Table 3)。この高いヒ素耐性能へのリン酸輸送体の関与から調べることにした。

Synechocystis sp. PCC6803 のリン酸輸送体については、先述の通り、ABC-transporter である Pst1 と Pst2 の存在が明らかとなっている。Burut-Archanai ら (2011) により、リン酸欠乏時には Pst2、Pst1 両方の取込み活性が上昇するが、とりわけ Pst1 の活性が高くなり、リン酸取込みの主体となることが示唆された。

Table 3 緑藻 *Chlamydomonas*、*Chlorella*、高等植物等のヒ素耐性の比較

分類	種	生育限界ヒ素濃度
淡水性緑藻	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	~ 1 mM (Murota et al., 2012)
淡水性緑藻	<i>Chlorella vulgaris</i>	~ 2.66 mM (Jiang et al., 2011)
海水性緑藻	<i>Tetraselmis chuii</i>	~ 0.67 mM (Irgolic, 1977)
海水性緑藻	<i>Ostreococcus tauri</i>	~ 0.1 mM (Zhang et al., 2013)
高等植物	<i>Arabidopsis</i> *	~ 1 mM (Lee et al., 2003)
高等植物	Rice *	~ 30 μ M (Chen et al., 2011)

* 水耕栽培の場合

3-2 実験操作

3-2-1 *Synechocystis* 野生株、 $\Delta pst1$ 、 $\Delta pst2$ のヒ酸耐性の比較

リン酸十分条件下におけるヒ酸耐性の比較については、2-2-4 同様に操作した。リン酸欠乏条件下の実験については、対数増殖期($OD_{730}=0.3$)まで培養した細胞を2-2-6 同様に処理し、リン酸欠乏状態にした細胞を使用した。また、リン酸欠乏条件下での *viability* については、ヒ酸添加後 2 時間～36 時間に定期的に細胞 10 μ L を回収し、BG-11 で作製したプレート上に 2 μ L ずつスポットした。プレートは弱光下に置き、コロニー形成率を調べた。

3-2-2 ヒ酸(150 mM)存在下における生育の比較

対数増殖期($OD_{730}=0.3$)まで培養した細胞に、終濃度 150 mM になるようヒ酸を添加し、0、8、24、36 時間後の濁度(OD_{730})を測定した。

3-2-3 光合成活性の測定

対数増殖期($OD_{730}=0.3$)まで培養した細胞に、終濃度 150 mM になるようヒ酸を添加し、0、15、120、240 分後の光合成活性を測定した。光合成活性の測定は下記のように行った。酸素電極は Rank Brothers Model 300 を使用した。

<光合成活性の測定>

1. インキュベータ(LAUDA RE104)の温度を 30°C に設定した。チャートレコーダー(Rika Denki R-62)の電源を入れ、10～20 分程度待ち、レコーダーを安定させた。
2. 酸素電極内の純水を入れ換え、こまごめピペットで 10 回バブリングし、インキュベータ内の酸素濃度を飽和状態とした。気泡が入らないようフタをして、酸素飽和点を記録した。
3. 電極内にジチオナイト($Na_2S_2O_4$)を少量添加し、酸素濃度ゼロの点を記録した。その後電極内を純水でよく洗い、レコーダーが安定するのを待ち、電極内に細胞懸濁液 2 mL、0.5 M $NaHCO_3$ 溶液 40 μ L 加えた(細胞懸濁液中濃度 20 mM)。
4. 電極に暗幕をかけ呼吸活性を 1～2 分確認した後、暗幕を外し 20 W/m^2 の光を照射して光合成活性を測定した。

3-2-4 細胞内リン、ヒ素蓄積量の測定

対数増殖期($OD_{730}=0.3$)まで培養した細胞を使用し、2-2-5 同様に測定した。

3-2-5 細胞内リン酸、ヒ酸取込み速度の測定

対数増殖期(OD₇₃₀=0.3)まで培養した細胞を使用し、2-2-6 同様に測定した。同様の実験を7回繰り返し、リン酸およびヒ酸に対する取込み速度を求めた。

3-2-6 リン欠応答遺伝子の発現解析

リン酸十分、もしくはリン酸欠乏条件下にて対数増殖期(OD₇₃₀=0.3)まで培養した細胞に終濃度 150 mM になるようヒ酸を添加し、通気培養しながら一定時間後の細胞を回収した。回収した細胞懸濁液 25 mL に、細胞固定液(エタノール：中性フェノール=95：5 溶液)を 25 mL(細胞懸濁液：細胞固定液=1：1 になるように)混合し、遺伝子発現や代謝等の生化学反応を止めた。その後細胞を遠心(4℃、3,500rpm、10 分間)し、上澄を除いた後、沈殿を resuspension buffer 1 mL に溶解し、-80℃ で凍保存後、RNA 抽出に用いた。RNA 抽出は下記の手順で行った。

Resuspension buffer

0.3 M sucrose, 10 mM 酢酸ナトリウム, 20 mM EDTA

<RNA 抽出>

1. 冷凍保存した培養細胞を 65℃ の水浴中で解凍し、同じく 65℃ の水浴中で温めておいた Lysis buffer 400 μL を加え、かるく混合し、細胞壁を溶解した。これに 65℃ で温めた中性フェノール 400 μL を加え、再び 65℃ で 5 分間加温した。この際 1 分ごとにボルテックスで攪拌した。
2. 65℃ の水浴で温めておいた酸性フェノールを 2 mL 加え、65℃ で 5 分間インキュベートした。この際、1 分間ごとに攪拌した。その後、氷上で 5 分間静置し、遠心 (4℃、3,500 rpm、10 分間) した。遠心後、上澄みを新しいチューブに移した。
3. 2. の操作を 2 回繰り返した。
4. 上清に 65℃ の酸性フェノール 1 mL、クロロホルム 1 mL、を加えてよく攪拌し、65℃ で 5 分間インキュベートした。この際、1 分間ごとに攪拌した。その後、遠心 (4℃、3,500 rpm、10 分間) し、上清を新しいチューブへ移した。
5. 上清に 2 mL クロロホルムを加え、1 時間ゆっくりと振盪した。振盪後、遠心 (4℃、3,500 rpm、10 分間) し、上清を 1.5 mL エッペンに 600 μL ずつ移した(上清が 600 μL よりも少ない場合には、取れる量だけ移した)。
6. 5. で採取した上清にプロパノール沈殿を行った。採取した上清の 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム(上清を 600 μL 採取した場合 60 μL)と、採取した上清と同量の 2-プロパノール(上清を 600 μL 採取した場合 600 μL)、グリコーゲ

- ン 1 μL を加え、ボルテックスにてよく混合した。混合後、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 10 分間もしくは $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で over night でインキュベートした。その後、 $15,000\text{rpm}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 分間遠心し、上澄みを完全に捨てた。
7. 70 %エタノールを 1 mL 入れ、エッペンを何回か転倒させて沈殿を洗った。その後、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3,500\text{rpm}$ 、10 分間遠心した。
 8. 上清を完全に除き、沈殿を減圧下で 5 分間乾燥させた。
 9. 沈殿を DEPC 水 30 μL で溶解し、試料溶液とした。

Lysis buffer

2% SDS、10 mM 酢酸ナトリウム

< 試料溶液の核酸濃度の算出 >

RNA 試料溶液を 2 μL をとり、この溶液の OD_{260} 、 OD_{280} を測定した。測定には SHIMADZU BIOTECH BioSpec-nano を用いた。

< DNase 処理 >

1. 得られた RNA 試料溶液から RNA 10~50 μg の試料を取り出し、DEPC 水で 43 μL にメスアップした。
2. $10\times\text{DNase buffer}$ 5 μL 、Rnase inhibitor 0.5 μL 、DNase I 1 μL を各サンプルに加え、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした。
3. 各サンプルにフェノールクロロホルム(1:1)を 50 μL 加え、10 分間ボルテックスし、遠心 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15,000\text{ rpm}$ 、10 分間) した。
4. 上清を別エッペンに移し、プロパノール沈殿を行った。(2-プロパノール 50 μL 、3M 酢酸ナトリウム 5 μL 、グリコーゲン 1 μL を加えよく混合し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 10 分間または $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で over night 後、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15,000\text{ rpm}$ 、10 分間遠心し、上澄みを捨てた。70 %エタノールを 1 mL 入れ、エッペンを数回転倒し混合後、再度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15,000\text{ rpm}$ 、10 分間遠心、上澄みを完全に取り除いた。)
5. 減圧下で 5 分間乾燥させた後、DEPC 水で 30 μL に溶解し、試料溶液とした。
6. RNA 濃度を調べた。

< 1 st cDNA 作製 >

1. 試料溶液を 1~20 μg /30 μL に DEPC 水で調整した。(5 μg /30 μL)
2. PCR チューブに 1 で調整した試料溶液 30 μL 、Random primer 10 μL 、を加え、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 分間インキュベートした。終了後、氷中に 1 分間以上置いた。
3. 2. の各 PCR チューブに

5×RT buffer 16 μL

2.5mM dNTPs 16 μL

DEPC 水 3.5 μL

Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL

を加え、25 °C で 5 分間反応させた。

4. Rever Tra Ace 4 μL を加え、以下の温度、時間で逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

25°C 10 分間

42°C 50 分間

70°C 15 分間

4°C ∞

< 定量 PCR >

試薬は Rotor-Gene SYBR Green (QIAGEN) を使用し、下記の割合で混合した。
PCR は Rotor-Gene Q(QIAGEN) を使用した。

(サンプル 1 本あたり)

2×Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix	12.5	μ L
Primer (F)	2.5	μ L
Primer (R)	2.5	μ L
Template	2	μ L
RNase-free water	5.5	μ L

Cycling condition

[95°C 5min、(95°C 5sec、60°C 10sec)40cycles、4°C ∞]

使用したプライマー

pstS1 : (Pitt et al., 2010)

5'-GCCATGGACGACGAAGAGA-3'、

5'-GCGGTCATGGGAAGCATT-3'

pstC1 : (Pitt et al., 2010)

5'-CCGGTGGGAAACCATTTTTC-3'、

5'-ATAATCCCCCGACAATGC-3'

pstS2 : (Pitt et al., 2010)
5'-AGCGGCAACGGTTAAGCA-3',
5'-GTTACGGCGGGCAAAGGT-3'

pstC2 : (Pitt et al., 2010)
5'-CTGGTGGCGGGATTGGT-3',
5'-ATGTCCCGGCTGATGGAA-3'

phoA : (Pitt et al., 2010)
5'-GAATTTGATGTCCGAATCCAAAA-3',
5'-GGCCCAGTGGAATCAATAACA-3'

rnpB : (Pitt et al., 2010)
5'-GCGCACCAGCAGTATCGA-3',
5'-CCTCCGACCTTGCTTCCAA -3'

sphX : (Pitt et al., 2010)
5'-TCGAAGAGCTAAAGCGCATTT-3',
5'-TGGTTCAGCGGGTCAAG-3'

3-3 結果

3-3-1 *Synechocystis* 野生株とリン酸輸送体システム欠損株 $\Delta pst1$ 、 $\Delta pst2$ の比較

3-3-1-1 ヒ酸耐性能

ヒ酸濃度 0~200 mM に調整した BG-11(+P)培地に細胞懸濁液を添加し、その後約 1 週間後の growth を調べたところ、野生株と $\Delta pst2$ 株は 150 mM ヒ酸存在下で生育がみられた(Fig. 12 a)。一方、 $\Delta pst1$ はヒ酸濃度 100 mM まで生育が確認されたが、それ以上の濃度ではほとんど生育しなかった。

そこで、ヒ酸耐性に差がみられた 150 mM ヒ酸存在下における生育を経時的に調べた(Fig. 13)。通常培養条件にて、対数増殖期($OD_{730}=0.3$)まで培養した細胞に終濃度 150 mM になるようヒ酸を添加した。添加後から 24 時間までは、 $\Delta pst2$ の growth が他の 2 株よりもやや早い傾向にもみえるが、添加後 36 時間までは 3 株の growth にあまり大きな差はみられなかった。

また、150 mM ヒ酸存在下において、光合成への影響はあるのか調べるため、通常培養条件下にて培養した細胞に 150 mM のヒ酸を添加後、光合成活性を経時的に測定した(Fig. 14)。ヒ酸添加 30 分で、3 株ともに光合成活性が添加前の 50%程度まで低下したが、添加 2 時間後には添加前とほぼ同程度まで活性が回復し、その後も活性の低下はみられなかった。

リン酸欠乏条件下でリン酸/ヒ酸取り込みを誘導した場合についても、ヒ酸耐性の比較を検討した。リン酸欠乏条件下に 24 時間おいた細胞を、ヒ酸を含む BG-11(-P)培地に加え同様に growth を調べたところ、ヒ酸を全く含まないコントロールでも生育がみられなかった(Fig. 12 b)。そこで、これらの細胞のバイアビリティを検討した。リン酸欠乏条件で培養した細胞に、終濃度 200 mM になるようヒ酸を添加して振とう培養し、一定時間経過後の細胞のリン酸存在下でのバイアビリティを寒天培地上で調べたところ、野生株と $\Delta pst2$ 株はヒ酸添加後 6 時間までコロニー形成が確認された(Fig. 12 c)。 $\Delta pst1$ 株においては、ヒ酸添加 24 時間後まで生存が確認でき、他の 2 株よりも高いバイアビリティが示された。

3-3-1-2 リン酸十分条件下、ヒ酸添加後の細胞内リン、ヒ素含量の推移

長期の growth に影響がみられた 150 mM のヒ酸を添加した際、細胞内にはどの程度のヒ素が蓄積されるのか、また、同時にリンの蓄積はどのようになっているか、ICP-MS により調べた(Fig. 15)。対数増殖期($OD_{730}=0.3$)まで培養した細胞に、終濃度 150mM になるようヒ酸を添加し、一定時間経過後の細胞を回収し、細胞内リン、ヒ素量を調べた。細胞内リン含量は、ヒ酸添加前から添加 1 時間後にかけて、3 株

にあまり大きな差はみられなかった。一方、ヒ素については、添加 1 時間後に野生株、 $\Delta pst2$ 株が細胞あたり $3\sim 4\times 10^{-9}\mu\text{g}$ 程度の蓄積量であったのに対し、 $\Delta pst1$ 株は約 $1\times 10^{-8}\mu\text{g}$ のヒ素を蓄積していた。

3-3-1-3 リン酸欠乏条件においた細胞のリン酸、ヒ酸取込み速度

第 2 章同様、リン酸十分条件においては取り込み活性が低く、測定することができなかったため(data not shown)、リン酸欠乏条件下にて実験を行った。細胞をリン酸欠乏条件に 24 時間おいた細胞に、終濃度 $10\mu\text{M}$ になるようリン酸またはヒ酸を添加して、一定時間経過後の培地中のリン酸またはヒ酸濃度を調べた(Fig. 16)。濃度の測定には、マラカイトグリーンによる呈色法を使用した。

リン酸の取込みに関しては、野生株と $\Delta pst2$ 株においてリン酸添加直後から急速な取込みがみられた。添加 2 分後には培地中濃度約 $3\mu\text{M}$ になるまで取込みが起り、添加 3 分後には取込みをほぼ終えていた。一方、 $\Delta pst1$ 株は添加直後から急速な取込みはみられず、培地中濃度 $5\mu\text{M}$ になるまで添加後 15 分かけてゆっくりと取り込んだ。

ヒ酸の取込みについては、野生株と $\Delta pst2$ 株においてヒ酸添加直後～約 2 分後まで最も急速な取込みがみられ、15 分後の培地中ヒ酸濃度はそれぞれ、 $6.6\mu\text{M}$ 、 $8.8\mu\text{M}$ となった。 $\Delta pst1$ 株は、他の 2 株と比較すると添加直後から 15 分後までややゆっくりとした取込みがみられた。添加 15 分後の培地中ヒ酸濃度は $10.6\mu\text{M}$ であった。

同様にして、細胞の濃度を 1/2、2 倍と変えて正確な傾き(初速度)を求めた(Fig. 17)。その結果、リン酸の取込みについては、野生株と $\Delta pst2$ 株では $3.5\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$ 以上であったのに対し、 $\Delta pst1$ 株では $0.3\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$ 程度であり、11 倍以上の速度の差が示された。また、ヒ酸の取込みについては、野生株と $\Delta pst2$ 株では $0.4\sim 0.5\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$ であったのに対し、 $\Delta pst1$ 株では約 $0.2\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$ であり、他の 2 株の 1/2 程度であることがわかった。

また、ヒ酸取込み速度に対するリン酸取込み速度の比率に着目すると、野生株と $\Delta pst2$ 株はリン酸に対してはヒ酸の約 7 倍～10 倍もの取込み速度を示したのに対し、 $\Delta pst1$ 株は 1.5 倍程度にとどまった。

3-3-1-4 リン酸十分条件下、ヒ酸添加時のリン欠応答遺伝子の発現

ヒ酸 150mM 添加時に、リン酸およびヒ酸取込みに関わるリン酸輸送体遺伝子や、その他のリン欠応答遺伝子の発現に影響があるのか、定量 PCR にて発現量を調べた(Fig. 18)。

ヒ酸添加前においては、野生株と $\Delta pst2$ では、調べた 6 つのリン欠応答遺伝子

(*pstS1*, *pstS2*, *pstC1*, *pstC2*, *sphX*, *phoA*)全てにおいてほとんど発現がみられなかった。 $\Delta pst1$ については、Pst2の関連遺伝子 *pstS2*, *pstC2* と、*phoA* の発現が確認できた。

ヒ酸添加後には、野生株と $\Delta pst2$ においては、それぞれ添加 6 時間後、24 時間後で Pst1 のリン酸結合タンパク、*pstS1* と *sphX* の発現量が上昇した。また、同じく Pst1 のリン酸輸送体膜貫通タンパクをコードする *pstC1* についても、*pstS1*、*sphX* ほどではないが、ヒ酸添加後に添加前よりも発現量が上昇する傾向がみられた。

$\Delta pst1$ でも、ヒ酸添加により *pstS2* および *pstC2* の発現量が大幅に上昇した。特に *pstS2* については、ヒ酸添加前と比べ最大で 5×10^{10} 倍以上の上昇がみられた。なお、これら Pst2 関連遺伝子の発現は野生株ではほとんどみられていない。また、 $\Delta pst1$ では、*phoA* の発現量についてもヒ酸添加後、大幅な上昇がみられた。

3-3-2 *Synechocystis* 野生株と、リン酸結合タンパク欠損株 $\Delta pstS1$ の比較

3-3-2-1 リン酸十分条件下でのヒ酸耐性

リン酸結合タンパク遺伝子について、ヒ酸添加時に大幅に発現が上昇していたことから、ヒ酸添加後のリン酸やヒ酸の取込みに影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、リン酸結合タンパクの一つ、*pstS1* の変異株 $\Delta pstS1$ (Pitt et al., 2010) について、ヒ酸耐性及び取込みに違いがみられるか調べた。 $\Delta pstS1$ は、Warwick 大学の Pitt 氏に供与していただいた。

3-3-1-1 の実験と同様の方法でリン酸十分条件下でのヒ酸耐性能について調べたところ、野生株、 $\Delta pstS1$ 株ともにヒ酸濃度 150 mM まで生育が確認された (Fig. 19)。150 mM ヒ酸存在下における短時間の影響を継時的に調べたところ (Fig. 20)、野生株は添加後 24~36 時間の間に生育の阻害がみられたが、 $\Delta pstS1$ 株は大きな生育の阻害はみられなかった。このことから、短時間では $\Delta pstS1$ 株よりも野生株においてヒ酸によるダメージがあることがわかった。

3-3-2-2 リン酸十分条件下、ヒ酸添加後の細胞内リン、ヒ素含量の推移

$\Delta pstS1$ 株について 150 mM ヒ酸添加時の細胞内リン、ヒ素蓄積量を調べた (Fig. 21)。リン含量については、culture あたりの含量を調べるとヒ酸添加前から添加 36 時間後まで、あまり変わらないことが分かった (Fig. 21 e,f)。しかし、ヒ酸添加 1 時間後までの野生株、 $\Delta pst1$ 株の細胞あたりのリン含量が $60 \mu\text{mol P} (10^{10} \text{ cells})^{-1}$ 前後であったのに対し、 $\Delta pstS1$ 株は $100 \mu\text{mol P} (10^{10} \text{ cells})^{-1}$ 前後の含量を保っており、野生株やリン酸輸送体欠損株よりもリン含量が高いことがわかった (Fig.

21 a)。

ヒ素の蓄積量については、ヒ酸添加後 1 時間の時点で $\Delta pst1$ と $\Delta pstS1$ に差がみられた。 $\Delta pst1$ 株がヒ酸添加 1 時間後で約 $1.4 \mu\text{mol As } (10^{10} \text{ cells})^{-1}$ (culture あたり $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) まで蓄積量が上昇したのに対し、 $\Delta pstS1$ は添加 1 時間後でも約 $0.2 \mu\text{mol As } (10^{10} \text{ cells})^{-1}$ (culture あたり $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) の蓄積にとどまった (Fig. 21 c, g)。そして、添加 36 時間経過後も、野生株、 $\Delta pst1$ 株は約 $2.5 \sim 3.5 \mu\text{mol As } (10^{10} \text{ cells})^{-1}$ (culture あたり $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) と、同程度のヒ素蓄積量であったのに対し、 $\Delta pstS1$ 株は $0.5 \sim 1 \mu\text{mol As } (10^{10} \text{ cells})^{-1}$ (culture あたり $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) と、低い蓄積量を維持していた (Fig. 21 d, h)。

3-3-2-3 リン酸欠乏条件下での細胞内リン酸、ヒ酸取込み速度

3-3-1-4 と同様の実験を行い、リン酸結合タンパク質がリン酸、ヒ酸取込み速度に及ぼす影響を調べた (Fig. 22)。野生株と比較すると、 $\Delta pstS1$ 株のリン酸の取込み速度は野生株の約 1/7 程度であることがわかった (Fig. 22)。

3-4 考察

$\Delta pst1$ 、 $\Delta pst2$ 株は、独立栄養条件下(リン酸十分条件下)において野生株と同様の生育を示すこと、及びリン酸欠乏条件で 48 時間経過しても、野生株と $\Delta pst1$ 、 $\Delta pst2$ の細胞内リン量にあまり差がないことがわかっている(Burut-Archanai et al., 2011)。

本研究では、リン酸輸送体欠損株を使って野生株とヒ酸耐性を比較したところ、リン酸(0.2 mM)存在下では、野生株、 $\Delta pst2$ と比較して $\Delta pst1$ のヒ酸感受性が高かった(Fig. 12 a)。しかし、リン酸欠乏条件下、ヒ酸濃度 200 mM では、viability でみた場合、 $\Delta pst1$ が他の 2 株よりも高いヒ酸耐性能を示した(Fig. 12 c)。リン酸欠乏時については、Pst1 が高い取込み活性を示すメインのリン酸輸送体であり(Frances et al., 2010, Burut-Archanai et al., 2011)、Fig. 12 c のリン酸欠乏条件下において、野生株、 $\Delta pst2$ では Pst1 が活発な取込みを行っていると考えられる。 $\Delta pst1$ は、リン酸欠乏条件下では活発な取込みを行う Pst1 をもたないため、ヒ酸の取込み量も他株と比較して小さく(Fig. 17)、それによりヒ酸耐性を示したと推測される。

リン酸存在下、ヒ酸(150 mM)添加時の細胞内リン、ヒ素含量を調べると、添加後 1 時間の時点では $\Delta pst1$ はヒ素蓄積量が他株よりも多かった(Fig. 15)。ヒ酸添加直後に $\Delta pst1$ のヒ素蓄積量が他株よりも高いことが、リン酸十分存在下において $\Delta pst1$ のヒ酸耐性能が低下する要因の一つと考えられる(Fig. 12 a)。

また、リン酸十分条件下では、高濃度(150 mM)ヒ酸を添加しても、添加後 2 時間で添加前と同程度に光合成活性が回復していた(Fig. 14)。Chlamydomonas の野生株では、1 mM のヒ酸を添加後 4 時間経過しても、光合成活性は低下したまま回復しない(Kobayashi et al., 2003)。このことから、PCC6803 の非常に高いリカバリー能力が確かめられた。

$\Delta pstS1$ 株においては、リン酸十分条件下でのヒ素含量はヒ酸添加から 36 時間経過しても、野生株および $\Delta pst1$ の 1/5~1/2 程度に抑えられていた(Fig. 21 c,d,g,h)。

リン酸結合タンパクの欠損株においてヒ酸およびリン酸取込み速度が低下し(Fig. 22)、ヒ素蓄積量が低下したことから(Fig. 21 c,d,g,h)、 $\Delta pst1$ のヒ酸取込みには、リン酸結合タンパク PstS1 が関与していることが明らかとなった。

なお、リン酸十分条件下で野生株や $\Delta pst1$ 株よりも $\Delta pstS1$ 株のリン含量が多かったが(Fig. 21 a,e)、細胞の大きさなどに違いがある可能性がある。また、ヒ素耐性につながるファクターとして、ヒ素の取込みの他に代謝や排出速度も挙げられることから(Miyashita et al., 2014)、細胞の大きさに加え、 $\Delta pst1$ 、 $\Delta pst2$ 、 $\Delta pstS1$ 株のヒ素代謝、排出についても今後確認する必要がある。

ヒ酸添加時のリン欠応答遺伝子の発現量を調べると、 $\Delta pst1$ においては Pst2 関連遺伝子(*pstS2*、*pstC2*、*phoA*)の発現量がリン十分条件下でも高くなっていた(Fig. 18)。Archanai ら(2009)は、リン欠乏時に発現誘導される alkaline phosphatase が、 $\Delta pst1$ においてはリン十分条件下でも発現していたことから、Pst1 がリン欠応答遺伝子のリン酸十分条件下での発現抑制にも関与することを示唆している。このことから、 $\Delta pst1$ において *pstS2*、*pstC2*、*phoA* の発現量が増加するのも、Pst1 による発現抑制がないことによると推測される。

ヒ酸添加後の発現量をみると、野生株、 $\Delta pst2$ については *pstS1*、*pstC1*、*sphX* の発現量が、 $\Delta pst1$ については *pstS2*、*pstC2*、*phoA* の発現量が増加していた(Fig. 18)。このことから、リン十分条件であっても、ヒ酸の影響によりリン欠応答遺伝子の発現誘導がおこることが本実験により明らかとなった。

なお、 $\Delta pst1$ と $\Delta pstS1$ において取込み速度、蓄積量ともに傾向が異なっていた。*pst1* オペロン全体の発現が抑制されている株と、リン酸結合タンパクのみの発現が抑制されている株を比較すると、細胞内蓄積量についてはリン酸結合タンパクのみの発現抑制株の方が、ヒ酸蓄積量が抑制されていた(Fig. 21 c,d,g,h)。ヒ酸の取込み速度については、 $\Delta pstS1$ 株と野生株の間であまり大きな差がなかったのに対し(Fig. 22)、 $\Delta pst1$ 株は野生株の 1/2 程度となっていた(Fig. 17)。この結果から、リン酸結合タンパクだけでなく、輸送体の膜貫通タンパクである PstC1 や PstA1 の働きが関与していることが推測される。 $\Delta pstS1$ 株において発現している PstC1 及び PstA1 が、取込み速度はあまり高くないもののリン酸選択性が高い輸送性を持つ場合に、本結果のような傾向を示す一つの要因となると思われる。

リン酸結合タンパクによるヒ酸結合性は、これまでも報告されている。Elias らは、2012年に、*E. coli*、グラム陰性桿菌 *Pseudomonas fluorescens*、グラム陰性真正細菌 *Klebsiella variicola*、同じくグラム陰性真正細菌である *Halomonas* GFJA-1 において、リン酸結合タンパクのリン酸、ヒ酸選択性について調べた。いずれも、ヒ酸と比較して 500~850 倍のリン酸選択性をもち、特に *Halomonas* GFJA-1 のリン酸結合タンパクは 4500 倍もの高い選択性を示した(Elias et al., 2012)。この選択性の違いの原因を調べるためリン酸結合タンパクの構造をモデリングした結果、リン酸結合部位において、リン酸の結合構造($P-O_2-H=108.7^\circ$; $O_2-H...O_{62}=179.1^\circ$; $Cc_\gamma-O_\delta_2...H=122^\circ$)と、ヒ酸の結合構造($As-O_2-H=95.4^\circ$; $O_2-H...O_{62}=162^\circ$; $Cc_\gamma-O_\delta_2...H=127^\circ$)のわずかな違いを認識していることが明らかとなっている。この PBP においては、Asp⁶²のカルボキシル基から、陰イオンのもつ O_2 までの 2.5 Åほどの短い相互作用距離が特異性の鍵となっている。

この他、グラム陽性、嫌気性桿菌である *Clostridium perfringens* の ABC-transporter phosphate binding protein; (PBP)-1 について結晶構造を決定し、

in vitro でリン酸とヒ酸の選択性について調べた報告や(Gonzalez et al., 2014)、グラム陰性好気性桿菌 *Stenotrophomonas maltophilia* において、先述の *Pseudomonas fluorescens* のリン酸結合タンパクのリン酸結合部位(DING (*Pflu*DING))と相同性が高い構造が存在することを示し、*Stenotrophomonas maltophilia* についてもその部位でリン酸及びヒ酸の選択的結合がされていることを示唆した報告がある(Hatti et al., 2016)。このように、リン酸結合タンパクによるヒ酸結合性に関しては、現在のところ細菌類における報告が多い。

シアノバクテリアのリン酸結合タンパクとヒ酸の関連については、*Anacystis nidulans* に関する報告がある。*Anacystis nidulans* リン酸結合タンパクを proteoliposome に発現させ、³²P およびヒ酸の取込みを調べたところ、5 μ M リン酸(³²P)存在下において 5 mM のヒ酸添加時にリン酸取込みが阻害された(Wagner, et al., 1994)。

Wagner ら(1994)以外に、現在のところシアノバクテリアにおいて実験的にリン酸結合タンパクとヒ酸の関連を示した報告はなく、*Synechocystis* sp. PCC6803 におけるリン酸結合タンパクによるヒ酸結合性の報告は本章がはじめてである。

なお、リン酸輸送体によるリンへの結合については、リン酸結合タンパクをもつ ABC-transporter だけではなく、プロトン共役型の輸送体についても研究が進められている。

最も研究が進められているものの一つ、*Saccharomyces cerevisiae* Pho84 については、2003 年に決定された *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate permease (GlpT)の結晶構造をもとに(Lemieux et al., 2003)、比較構造モデリングプログラム(MODELLER)によって 2004 年に立体構造モデルが作成された(Lagerstedt et al., 2004)。そのモデルより、Pho84 においては、膜貫通タンパクが細胞膜の内側に開いたようなコンフォメーションであることが示された。その後、Pho84 と同じく、細胞膜の内側に開いた構造であることが示されている *Piriformospora indica* transporter (PiPT)や、GlpT と比較することで、リン酸結合部位で保存されているアミノ酸残基やリン酸およびプロトンの結合に関与するアミノ酸残基が明らかとなった(Pedersen et al., 2013, Samyn et al., 2012)。Samyn らの 2012 年の報告では、Arg¹⁶⁸ 残基がリン酸との最初の相互作用に重要であること、Asp⁵⁵⁸、Lys⁴⁹² 残基がリン酸の認識および輸送に直接的に関与すること、Asp³⁵⁸ からのプロトンの離脱、Asp¹⁷⁸ のプロトン化によりリン酸イオンと相互作用することが推測されている。中でも、Asp⁵⁵⁸、Lys⁴⁹² 残基がリン酸結合部位であり、Lys⁴⁹² により認識されたリン酸イオンが Asp⁵⁵⁸ と水素結合を形成すると示している。

また、もう一つの高親和性輸送体である Pho89 については、Pho89 が分類されている inorganic phosphate transporter (Pit) family において高度に保存されている

アミノ酸残基が明らかとなっている。Pho89 の Glu⁵⁵、Glu⁴⁹¹ がそれにあたり、いずれも膜貫通領域に存在しておりリン酸取込み活性に必要不可欠と考えられている (Sengottaiyan et al., 2013)。

本実験で使用した *Chlamydomonas* を含め、微細藻類の Na⁺や H⁺共役型輸送体についても、リン酸及びヒ酸選択性を議論する上で、今後、結合部位の構造についても解析する必要がある。

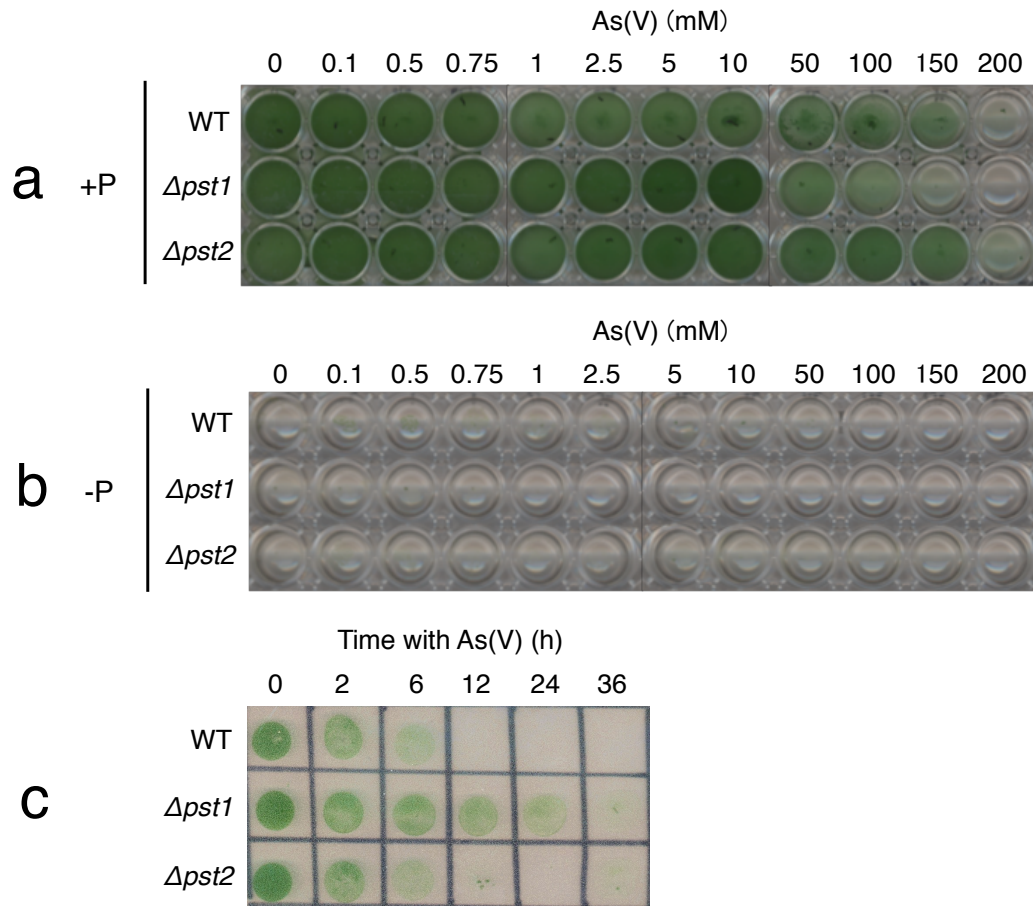


Fig. 12 *Synechocystis* 野生株及び $\Delta pst1$ 、 $\Delta pst2$ のヒ酸耐性

a: リン酸十分条件下で培養した細胞を、種々のヒ酸濃度の BG-11(+P)培地に添加し、その後の生育を調べた。b: リン酸欠乏条件下にて培養した細胞を、種々のヒ酸濃度の BG-11(-P)培地に添加し、その後の生育を調べた。c: リン酸欠乏条件下で培養した細胞懸濁液に、終濃度 200 mM になるようヒ酸を添加し、その後のバイアビリティを調べた。

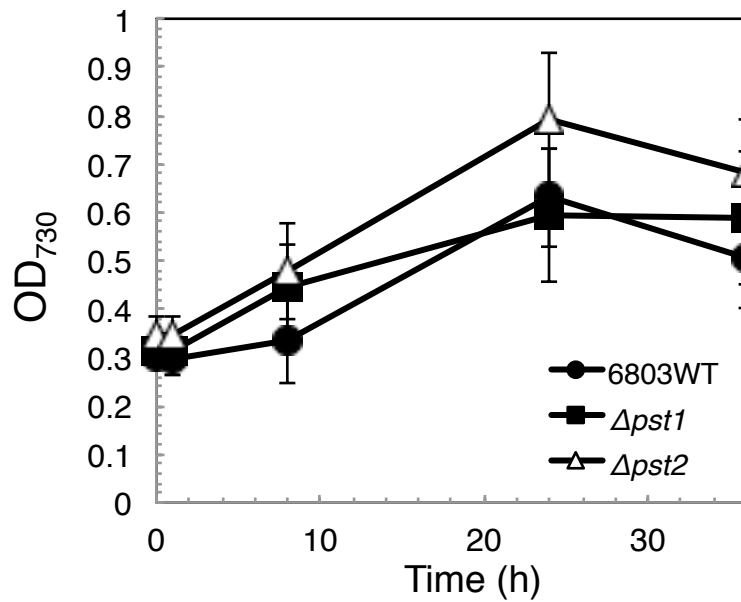


Fig. 13 リン酸十分条件下におけるヒ酸(150 mM)添加時の生育

リン酸十分条件下で培養した細胞に終濃度 150 mM になるようヒ酸を添加し、その後の生育を調べた。

● : *Synechocystis* 野生株、■ : $\Delta pst1$ 、△ : $\Delta pst2$

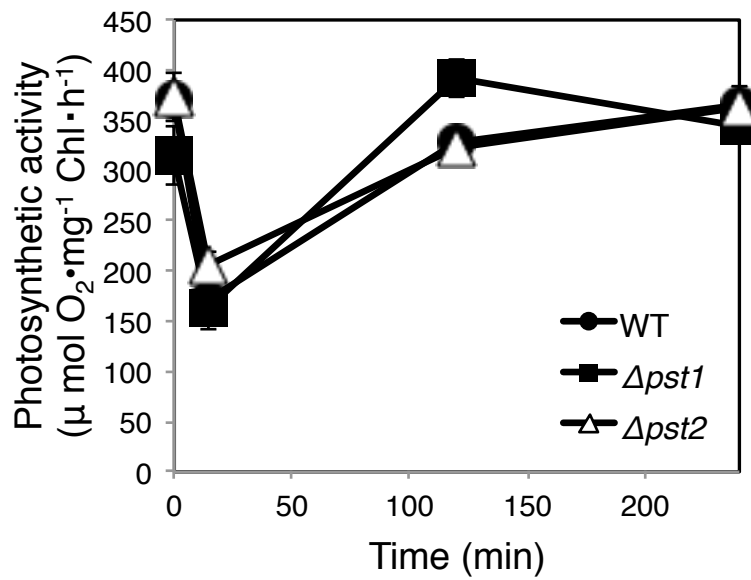


Fig. 14 リン酸十分条件下においてヒ酸(150 mM)が光合成活性に与える影響

リン酸十分条件下で培養した細胞に終濃度 150 mM になるようヒ酸を添加し、その後の光合成活性を調べた。

● : *Synechocystis* 野生株、■ : $\Delta pst1$ 、△ : $\Delta pst2$

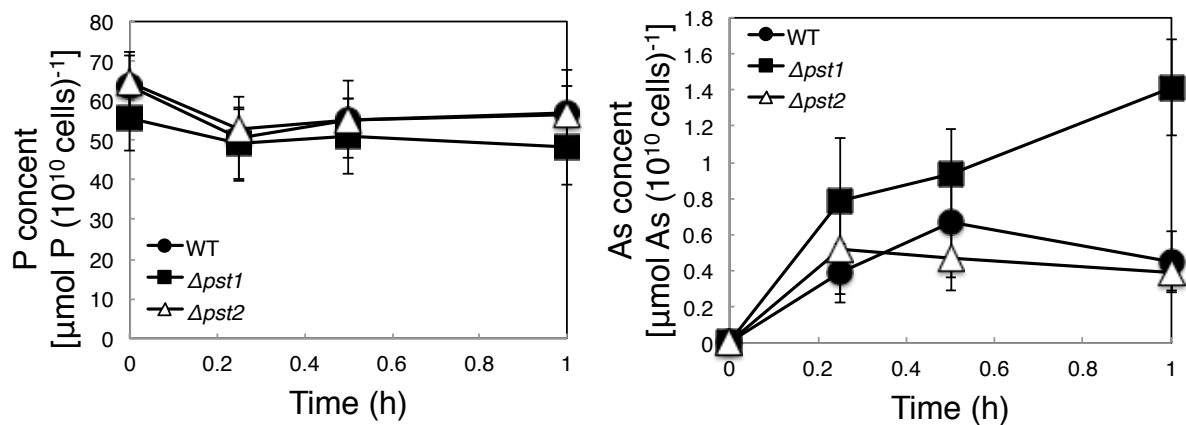


Fig. 15 リン酸十分条件下、ヒ酸添加後の細胞内のリン及びヒ素含量

リン酸十分条件下で対数増殖期まで培養した細胞に、終濃度 150 mM のヒ酸を添加した際の細胞内リン、ヒ素含量を調べた。

● : *Synechocystis* 野生株、■ : $\Delta pst1$ 、△ : $\Delta pst2$

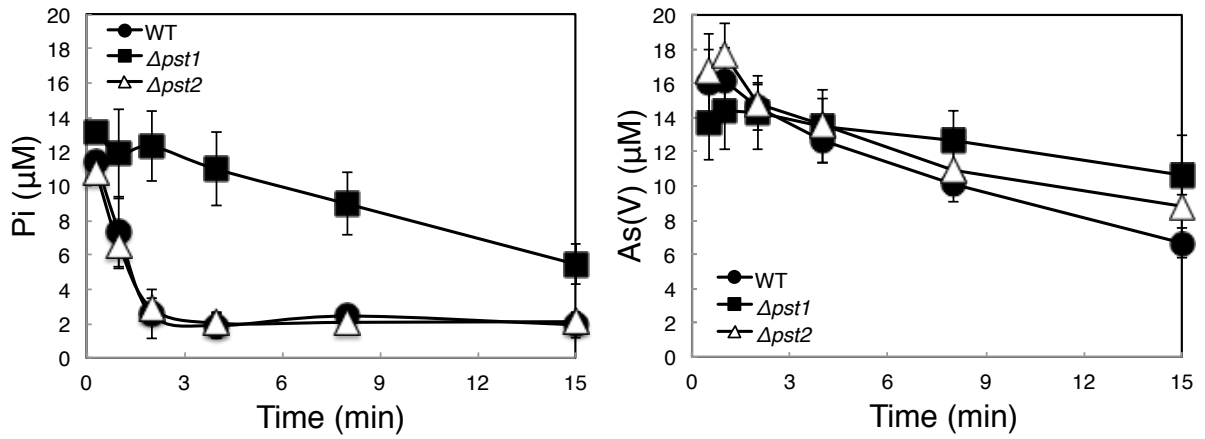


Fig. 16 リン酸欠乏条件においた細胞によるリン酸及びヒ酸の取込み

終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるようリン酸またはヒ酸を添加し、培地中のリン酸またはヒ酸量をマラカイトグリーン発色法により調べた。細胞はリン酸欠乏条件にした OD_{730} =約 0.3 のものを実験に使用した。実験開始時に、 1mM のリン酸またはヒ酸を、 9.9mL の細胞懸濁液に 0.1mL 添加した。

● : *Synechocystis* 野生株、■ : $\Delta pst1$ 、△ : $\Delta pst2$

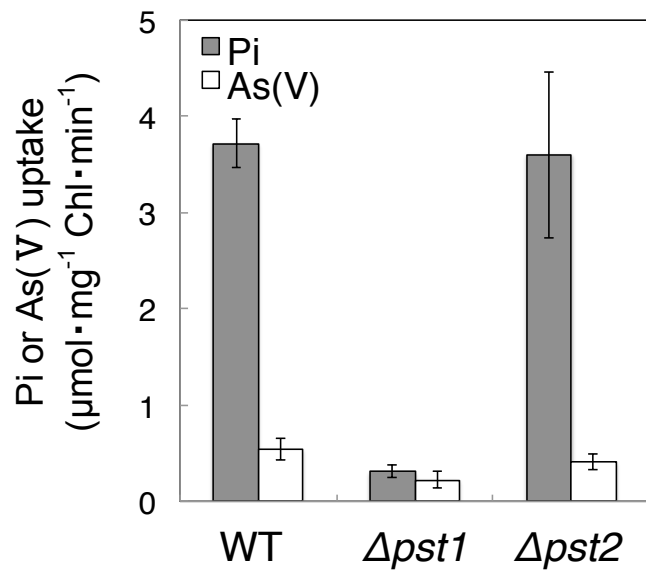


Fig. 17 リン酸欠乏条件においた細胞のリン酸およびヒ酸の取込み速度の比較

Fig. 16 と同様の実験を細胞濃度を変えて行い、正確なリン酸およびヒ酸の取込み速度を求めた。

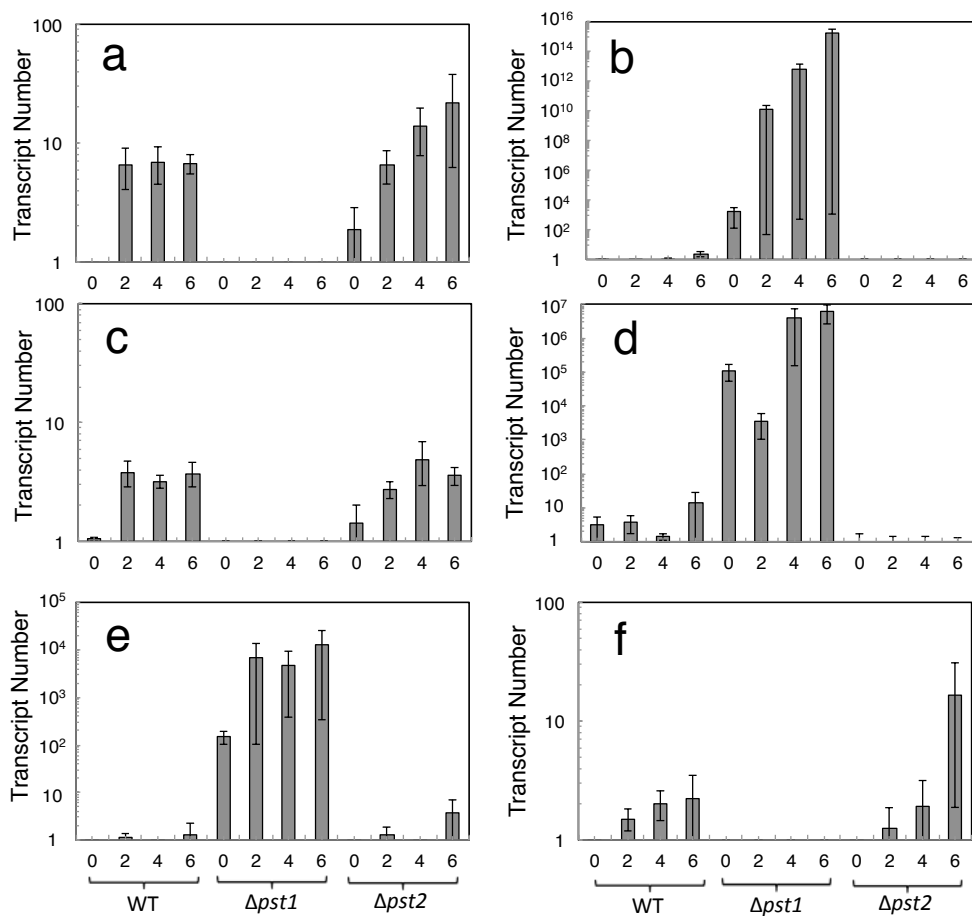


Fig. 18 リン酸十分条件下、ヒ酸(150 mM)添加時のリン欠応答遺伝子の発現

リン酸十分条件下で対数増殖期まで培養した細胞を新しい BG-11(+P)培地に移し、1時間順応させたのち、終濃度 150 mM になるようヒ酸を添加して 0、2、4、6 時間後の遺伝子発現を調べた。

a: *pstS1*, b: *pstS2*, c: *pstC1*, d: *pstC2*, e: *phoA*, f: *sphX*

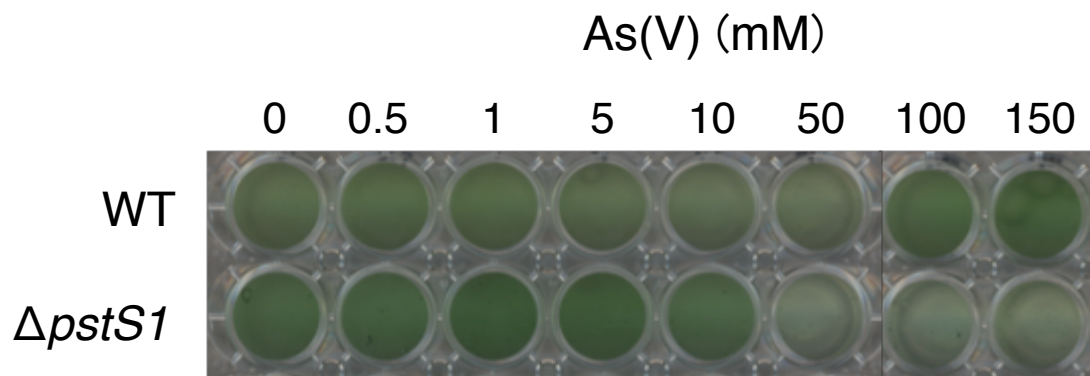


Fig. 19 *Synechocystis* 野生株及び $\Delta pstS1$ のリン酸十分条件下でのヒ酸耐性
 リン酸十分条件下で培養した細胞を、種々のヒ酸濃度の BG-11(+P)培地に添加し、その後の生育を調べた。

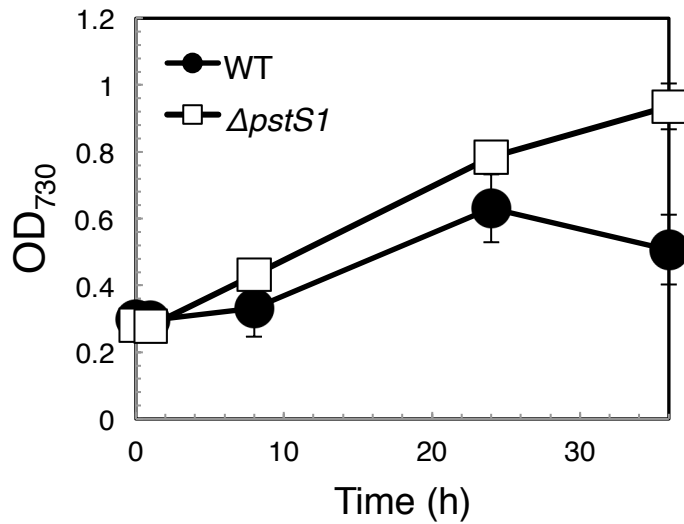


Fig. 20 リン酸十分条件下、ヒ酸(150 mM)添加時の野生株、 $\Delta pstS1$ の生育
 リン酸十分条件下で培養した細胞に終濃度 150 mMになるようヒ酸を添加し、
 その後の生育を調べた。

● : *Synechocystis* 野生株、□ : $\Delta pstS1$

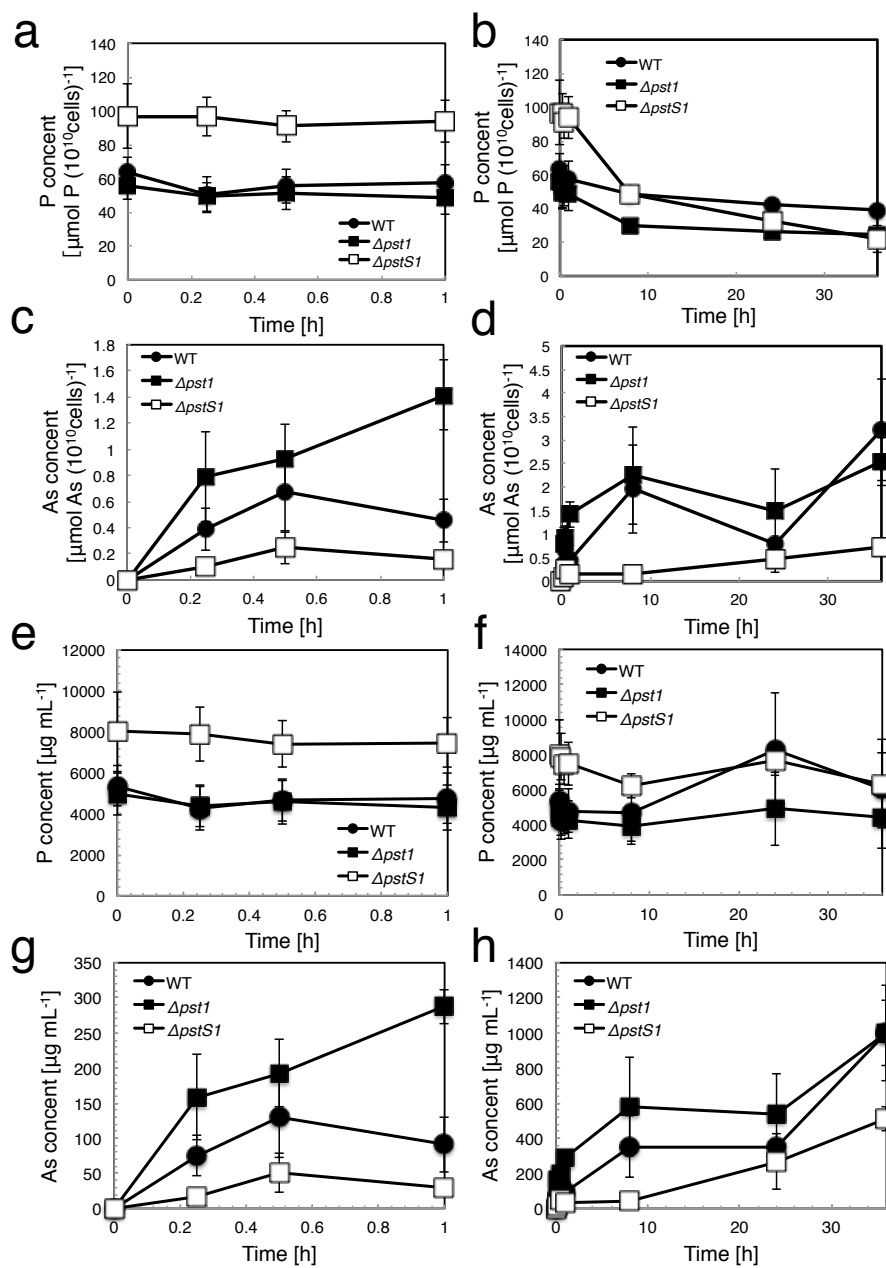


Fig. 21 リン酸十分条件下、ヒ酸添加後の $\Delta pstS1$ の細胞内リン、ヒ素含量の比較

リン酸十分条件下で対数増殖期まで培養した細胞に、終濃度 150 mM のヒ酸を添加した際の細胞内リン、ヒ素蓄積量を調べた。a, b : ヒ酸添加 1 時間後および 36 時間後までのリン蓄積量の変化、c, d : ヒ酸添加 1 時間後および 36 時間後までのヒ素蓄積量の変化、e, f, g, h : それぞれ、a, b, c, d を culture あたりの蓄積量で表した

● : *Synechocystis* 野生株、■ : $\Delta pst1$ 、□ : $\Delta pstS1$

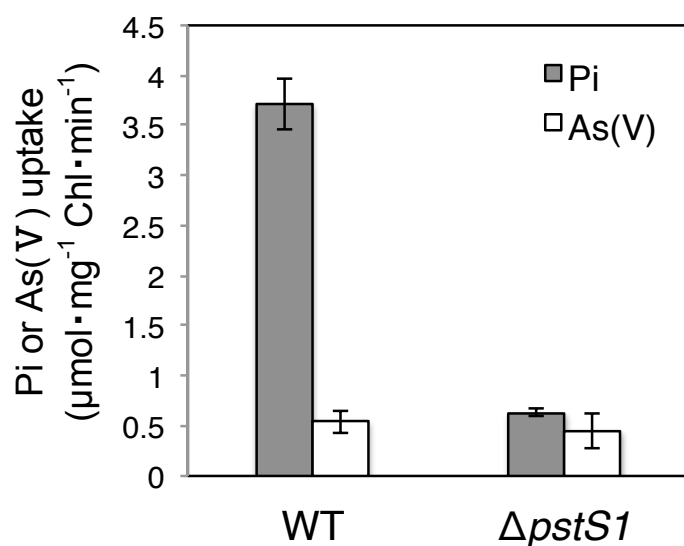


Fig. 22 リン酸欠乏条件においた野生株、 $\Delta pstS1$ によるリン酸およびヒ酸取込み速度の比較

リン酸欠乏条件下においた細胞に対し、Fig. 16 同様に終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるようリン酸またはヒ酸を添加し、培地中のリン酸またはヒ酸量をマラカイトグリーン発色法により調べた。その平均値および標準誤差から、細胞内へのリン酸およびヒ酸の取込みについて求めた。

< 参考文献 >

Allen, M. M. (1968)

Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae.

Journal of Phycology, vol. 4, 1-3

Archanai, S. B., Incharoensakdi, A., and Eaton-Rye, J. J. (2009)

The extended N-terminal region of SphS is required for detection of external phosphate levels in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Biochemical and biophysical research communications, vol. 378, 383-388

Archanai, S. B., Eaton-Rye, J. J., and Incharoensakdi, A. (2011)

Na⁺-stimulated phosphate uptake system in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with Pst1 as a main transporter.

BMC Microbiology, vol. 11, 225

Chan, F. Y. and Torriani, A. (1996)

PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase.

Journal of Bacteriology, vol. 178, 3974-3977

Chen, J., Liu, Y., Ni, J., Wang, Y., Bai, Y., Shi, J., Gan, J., Wu, Z., and Wu, P. (2011)

OsPHF1 regulates the plasma membrane localization of low- and high-affinity inorganic phosphate transporters and determines inorganic phosphate uptake and translocation in rice.

Plant Physiology, vol. 157, 269-278

Ekardt, F., Garske, B., Stubenrauch, and J., Wieding, J. (2015)

Legal instruments for phosphorus supply security.

Journal for European Environmental & Planning Law, vol. 12, 343-361

Elias, M., Wellner, A., Goldin-Azulay, K., Chabriere, E., Vorholt, J. A., Erb, T. J., and Tawfik, D. S. (2012)

The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments.

Nature, vol. 7422, 134-137

- Falkner, R., Wagner, F., Aiba, H., and Falkner, G. (1998)
Phosphate-uptake behaviour of a mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7942 lacking one protein of the high-affinity phosphate-uptake system.
Planta, vol. 206, 461-465
- Gonzalez, D., Richez, M., Bergonzi, C., Chabriere, E., and Elias, M. (2014).
Crystal structure of the phosphate-binding protein (PBP-1) of an ABC-type phosphate transporter from *Clostridium perfringens*.
Scientific reports, vol. 4, 6636
- González, E., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2005)
Phosphate transporter traffic facilitator 1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*.
The Plant Cell, vol. 17, 3500-3512.
- Guo, P., Gong, Y., Wang, C., Liu, X., and Liu, J. (2011)
Arsenic speciation and effect of arsenate inhibition in a *Microcystis Aeruginosa* culture medium under deficient phosphate regimes.
Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 30, 1754-1759
- Harris (2009)
The *Chlamydomonas* Sourcebook, 2nd edition
- Harris, R. M., Webb, D. C., Howitt, S. M., and Cox, G. B. (2001)
Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology, vol. 183, 5008-5014
- Hatti, K., Gulati, A., Srinivasan, N., and Murthy, M. R. (2016)
Determination of crystal structures of proteins of unknown identity using a marathon molecular replacement procedure: structure of *Stenotrophomonas maltophilia* phosphate-binding protein.
Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology, vol. 7, 1081-1089

- Holtman, C. K., Chen, Y., Sandoval, P., Gonzales, A., Nalty, M. S., Thomas, T. L., Youderian, P., and Golden, S. S. (2005)
High-throughput functional analysis of the *Synechococcus elongatus* PCC 7942 genome.
DNA research, vol. 12, 103-115
- Howe, C. J., Barbrook, A. C., and Packer, J. C. L. (1996)
Protein targeting and translocation in cyanobacterial membrane biogenesis.
Biochemical Society Transactions, vol. 24 , 750-753
- Hudock, M. O. , Togasaki, R. K., Lien, S., Hosek, M., and San Pietro, A. (1979)
A uniparentally inherited mutation affecting photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 87, 66-71.
- Jiang, J. Q., Ashekuzzaman, S. M., Jiang, A. Sharifuzzaman, S. M., and Chowdhury, S. R. (2013)
Arsenic contaminated groundwater and its treatment options in Bangladesh.
International Journal of Environmental Research and Public Health, vol. 10, 18-46
- Kamiya, T., Rafiqul Islam, Md., Duan, G., Uraguchi, S., and Fujiwara, T. (2013)
Phosphate deficiency signaling pathway is a target of arsenate and phosphate transporter *OsPT1* is involved in As accumulation in shoots of rice.
Plant nutrition, vol. 59, 580-590
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S. (1996)
Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions.
DNA Reserch, vol. 3, 109-139

Kobayashi, I., Fujiwara, S., Shimogawara, K., Kaise, T., Usuda, H., and Tsuzuki, M. (2003)

Insertional mutagenesis in a homologue of a Pi transporter gene confers arsenate resistance on *Chlamydomonas*.

Plant and Cell Physiology, vol. 44, 597-606

Kobayashi, I., Fujiwara, S., Shimogawara, K., Sakuma, C., Shida, Y., Kaise, T., Usuda, H., and Tsuzuki, M. (2005)

High intracellular phosphorus contents exhibit a correlation with arsenate resistance in *chlamydomonas* mutants.

Plant and Cell Physiology, vol. 46, 489-496

Kuroda, A., Takiguchi, N. Kato, J., and Ohtake, H. (2005)

Development of technologies to save phosphorus resources in response to phosphate crisis.

Journal of Environmental Biotechnology, vol. 4, 87-94

Lagerstedt, J. O., Voss, J. C., Wieslander, A., and Persson, B.L. (2004)

Structural modeling of dual-affinity purified Pho84 phosphate transporter.

FEBS letters, vol. 578, 262-268

Lemieux, M. J., Song, J., Kim, M. J., Huang, Y., Villa, A., Auer, M., Li, X. D., and Wang, D.N. (2003)

Three-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily.

Protein Science, vol. 12, 2748-2756

Mandal, B. K., and Suzuki, K. T. (2002)

Arsenic round the world: a review.

Talanta, vol. 58, 201-235

Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M.H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S. M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C. L., Cognat, V., Croft, M. T., Dent, R., Dutcher, S.,

Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P. A., Lemaire, S. D., Lobanov, A. V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J. V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A. M., Niyogi, K., Novoselov, S. V., Paulsen, I. T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riaño-Pachón, D. M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S. L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C. J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M. R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M. D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A. M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C. L., Gladyshev, V. N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R. T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y. W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W. C., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S., and Grossman, A. R. (2007)

The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions.
Science, vol. 5848, 245-250

Miguel, B. S., Luisa, H. R., David, P. O., Asly, V. B., and Karen, P. (2016)
Using *Scenedesmus* sp. for the phycoremediation of tannery wastewater.
TECCIENCIA, vol. 12, 69-75

Miyashita, S., Murota, C., Kondo, K, Fujiwara, S., and Tsuzuki, M. (2014)
Arsenic metabolism in cyanobacteria.
Environmental Chemistry, vol. 13, 577-589

Moseley, J. L., Chang, C. W., and Grossman, A. R. (2006)
Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSRI control in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Eukaryotic Cell, vol. 5, 26-44

Murota, C., Matsumoto H., Fujiwara S., Hiruta Y., Miyashita S., Shimoya M., Kobayashi I., Hudock, M. O., Togasaki, R. K., Sato N., and Tsuzuki M. (2012)
Arsenic tolerance in a *Chlamydomonas* photosynthetic mutant is due to reduced arsenic uptake even in light condition.
Planta, vol. 236, 1395-1403

- Naddy, R. B. Tapp, K., Rehner, A. B., Pillard, D. A., and Schrage, L. (2011)
Identifying the cause of toxicity in an algal whole effluent toxicity study – an unanticipated toxicant.
Chemosphere, vol. 85, 1026-1032
- Nakajima, Y., Fujiwara, S., Sawai, H., Imashimizu, M. and Tsuzuki, M. (2001)
A phycocyanin-deficient mutant of *Synechocystis* PCC 6714 with a single-base substitution upstream of the *cpc* operon.
Plant and Cell Physiology, vol. 42, No.9, 992-998
- Ono, T. (2012)
Bactericidal effects of weak acid hypochlorous solution against various spores and application in food processing plants.
Journal of the Brewing Society of Japan, vol. 107, 100-109
- Pathak, V. V., Singh, D. P., Kothari, R., and Chopra, A. K. (2014)
Phycoremediation of textile wastewater by unicellular microalga *Chlorella pyrenoidosa*.
Cellular and molecular biology, vol. 60, 35-40
- Pedersen, B. P., Kumar, H., Waight, A. B., Risenmay, A. J., Roe-Zurz, Z., Chau, B. H., Schlessinger, A., Bonomi, M., Harries, W., Sali, A., Johri, A. K., and Stroud, R. M. (2013)
Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter.
Nature, vol. 496, 533–536
- Pitt, F. D., Mazard, S., Humphreys, L., and Scanlan, D. J. (2010)
Functional characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 *pst1* and *pst2* gene clusters reveals a novel strategy for phosphate uptake in a freshwater cyanobacterium.
Journal of Bacteriology, vol. 192, 3512-3523
- Ritchie, R. J., Trautman, D. A., and Larkum, A.W.D. (1997)
Phosphate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* R-2 PCC 7942.
Plant and Cell Physiology, vol. 38, 1232-1241

- Samantaray, S., Nayak, J. K., and Mallick, N. (2011)
Wastewater utilization for poly- β -hydroxybutyrate production by the cyanobacterium *Aulosira fertilissima* in a recirculatory aquaculture system.
Applied and Environmental microbiology, vol. 77, 8735-8743
- Samyn, D. R., Ruiz-Pávon, L., Andersson, M. R., Popova, Y., Thevelein, J. M., and Persson, B. L. (2012)
Mutational analysis of putative phosphate- and proton-binding sites in the *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 phosphate:H(+) transceptor and its effect on signalling to the PKA and PHO pathways.
The Biochemical Journal, vol. 445, 413-422
- Samyn, D. R., Van der Veken, J., Van Zeebroeck, G., Persson, B. L., and Karlsson, B. C. (2016)
Key residues and phosphate release routes in the *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 transceptor – the role of Tyr¹⁷⁹ in functional regulation.
The Journal of Biological Chemistry, in Press.
- Selvaratnam, T., Pegallapati, A. K., Montelya, F., Rodriguez, G. I., Nirmalakhandan, N., Van, V. W., and Lammers, P. J. (2014)
Evaluation of a thermo-tolerant acidophilic alga, *Galdieria sulphuraria*, for nutrient removal from urban wastewaters.
Bioresource Technology, vol. 156, 395-399
- Sema S., and Mika, S. (2015)
Cultivating and harvesting of marine alga *Nannochloropsis oculata* in local municipal wastewater for biodiesel.
Bioresource Technology, vol. 191, 79–87
- Sengottaiyan, P., Petrlova, J., Lagerstedt, J. O., Ruiz-Pavon, L., Budamagunta, M. S., Voss, J. C., and Persson, B. L. (2013)
Characterization of the biochemical and biophysical properties of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphate transporter Pho89.
Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 436, 551-556

- Shin, H., Shin, H. S., Dewbre, G. R., and Harrison, M. J. (2004)
Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments.
The Plant journal, vol. 39, 629-642
- Spreitzer, R. J. and Mets, L. (1981)
Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotypes.
Plant Physiology, vol. 67, 565-569
- Spreitzer, R. J. and Mets, L. (1982)
An assessment of arsenate selection as a method for obtaining nonphotosynthetic mutants of *Chlamydomonas*.
Genetics, vol. 100, 417-425.
- Tanaka, T. and Shimamura, K. (2005)
Biological wastewater treatment process with chemical-phosphorus recover reactor.
Journal of Environmental Biotechnology, vol. 4, No. 2, 101-108
- Tomar, P. and Shinha, H. (2014)
Conservation of PHO pathway in ascomycetes and the role of Pho84.
Journal of Biosciences, vol. 39, No.3, 525-536
- Toyoshima, M. and Sato, N. (2015)
High-level accumulation of triacylglycerol and starch in photoautotrophically grown *Chlamydomonas debaryana* NIES-2212.
Plant and Cell Physiology, vol. 56, 2447-2456
- Wagner, F., Gimona, M., Ahorn, H., Peschek, G. A., and Falkner, G. (1994)
Isolation and functional reconstitution of a phosphate binding protein of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* induced during phosphate-limited growth.
The Journal of Biological Chemistry, vol. 269, 5509-5511.
- Wang, P., Zhang, W., Mao, C., Xu, G., and Zhao, F. J. (2016)
The role of *OsPT8* in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice.

Journal of Experimental Botany, vol. 67, 6051-6059

World Health Organization (2010)

Preventing disease through healthy environments exposure to arsenic : a major public health concern.

World Health Organization (2011)

Arsenic in Drinking-water.

Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality

Zhang, Y., Guo, X., Wu, F., Yao, Y., Yuan, Y., Bi, X., Luo, X., Shahbazian-Yassar, R., Zhang, C., and Amine, K.

Mesocarbon microbead carbon-supported magnesium hydroxide nanoparticles: turning spent Li-ion battery anode into a highly efficient phosphate adsorbent for wastewater treatment.

ACS applied materials & interfaces, vol. 33, 21315-213125

Zhang, S. Y., Sun, G. X., Yin, X. X., Rensing, C., Zhu, Y. G. (2013)

Biomethylation and volatilization of arsenic by the marine microalgae *Ostreococcus tauri*
Chemosphere, vol. 93, 47-53

環境省 報道発表資料 第8次水質送料削減の在り方について(答申)

(<http://www.env.go.jp/press/files/jp/28864.pdf>)

国立環境研究所(2003) 地球儀, No.7, 5

小島 昭 (2012)

炭素繊維と鉄を用いた水質浄化・リン除去の事業化
産学官連携ジャーナル, 1月号

三好康彦(2004)、「小型焼却炉」、72-73

和田洋六(2014)

めっきプラント(工場)からの排水処理とリサイクル
表面技術、vol. 65, 504-509

< 謝辞 >

$\Delta pst1$ 、 $\Delta pst2$ 株を供与してくださった Burut-Archanai 博士、 $\Delta pstS1$ 株を供与してくださった Pitt 博士に感謝申し上げます。

そして、9 年間にわたりご指導いただきました都筑幹夫先生、藤原祥子先生に心より御礼申し上げます。就職をし途中にブランクがありましたが、変わらず常にご丁寧にご指導いただきましたことを感謝申し上げます。

また、日頃より実験のことをご相談させていただいたり、アドバイスをくださったりして、ご指導いただきました佐藤典裕先生、岡田克彦先生、大変お世話になり、ありがとうございました。

そして、実験に協力してくださった辻下真貴さん、浦邊佳苗さん、本当にありがとうございました。

また、就学にご理解いただきました一般社団法人日本環境測定分析協会の皆様、あたたかい応援のお言葉をくださった関係会社の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、あたたかく見守ってくれた両親と弟に心より感謝しています。

2016 年 12 月

室田知里