

氏名（本籍）	室田 知里(埼玉県)
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第102号
学位授与の日付	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	(主査) 都筑 幹夫 教授 太田 敏博 教授 梅村 知也 教授 藤原 祥子 准教授

## 論文内容の要旨

### 【背景・目的】

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他、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っても環境中へ流出している。バングラデシュのように、世界保健機関(WHO)で定める基準値( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )を10倍以上上回るヒ素が検出されている地域もあり、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、リンは、生物にとって必須の元素であり、我々の生活にも不可欠な元素であるが、その枯渇が問題視されている。リンは自然界から産出したリン鉱石から精製される限りある資源であるが、近年の人口増加や経済発展に伴い使用量は増加しつつある。リン鉱石より精製したリンの大半が化学肥料として利用されていることから、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。しかし、一方では、リン酸の過多による河川や湖沼、海域の富栄養化といった問題も後を絶たない。

本研究では、上述のヒ素汚染の浄化やリンの回収に、**phytoremediation** 技術が有益ではないかと考えた。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む。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・改善して、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*)及び、高等植物の葉緑体の祖先と考えられているシアノバクテリアに属す *Synechocystis* sp. PCC6803(以下、*Synechocystis*)を使用した。*Chlamydomonas* のリン酸輸送体については、これまでに酵母

*Saccharomyces cerevisiae* の H<sup>+</sup>/Pi symporter Pho84 と相同性が高い PTA type (PTA1~4) と、Na<sup>+</sup>/Pi symporter Pho89 と相同性が高い PTB type (PTB1~12) の存在が示唆されているが (Moseley et al., 2005; Kobayashi et al., 2005)、機能や局在性、立体構造などは未だ解明されていない。*Synechocystis* のリン酸輸送体については、Pst1、Pst2 の 2 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。これらの ABC-transporter は、ATP 結合タンパクである PstB、2 つの膜貫通タンパク PstA、PstC、リン酸結合タンパク PstS からなり、これらのタンパクをコードする遺伝子はゲノム上でそれぞれオペロン構造を形成している (Pitt et al., 2010)。

## 【結果と考察】

### 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

実際に提供いただいた工場排水を利用して、*Synechocystis* および *Chlamydomonas* によるリンの回収が可能であるかを調べた。排水口からの採取水、特定排水、焼却炉排水の 3 種類の排水 2.9 mL に、OD<sub>730</sub>=0.5~1.0 まで培養した *Synechocystis* 及び *Chlamydomonas* の細胞懸濁液をリンを含まない培地で 3 回洗浄したもの 0.1 mL を添加し、1 週間後の生育及び排水中のリン酸量の変化を調べた。その結果、排水口からの採取水においては、*Synechocystis*、*Chlamydomonas* 両種とも生育がみられた。特定排水及び焼却炉排水においては、*Synechocystis* のみ生育が可能であった。また、リン酸濃度の変化については、使用した排水のリン酸含量が排水口採取水で約 10 mg·L<sup>-1</sup>、特定排水で約 15 mg·L<sup>-1</sup>、焼却炉排水で約 20 mg·L<sup>-1</sup> であったのに対し、実験後の *Synechocystis* の培養液上清中のリン酸濃度はすべての排水において約 1 mg·L<sup>-1</sup> となっており、排水中の 90 % 以上のリン酸を細胞内へ吸収(一部は細胞表面へ吸着)することがわかった。*Chlamydomonas* においても、生育が確認された排水口採取水では、75~90 % のリン酸の取込みがみられた。また、どちらの種も、オートクレーブによる滅菌処理の有無に関わらず同程度の生育を示した。以上の結果から、本実験で使用した排水と同程度の実試料であれば、滅菌処理をせずに微細藻類の生育に利用できること、及び、*Synechocystis* および *Chlamydomonas* が排水中のリン酸を利用し生育が可能であることが確かめられた。特に、一般の下水処理施設での処理が認められていない、特殊排水にあたる特定排水及び焼却炉排水中でも高いリン酸取込みと生育能力が示された *Synechocystis* については、実用化に向け検討の価値がある種の一つと期待できる。

また、高いリン酸取込み能力を持つ *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であるかを調べた。その結果、100 mM リン酸(リンとして 3.1 g·L<sup>-1</sup>)存在下まで生育が確認され、さらなるリン源の大量回収技術に利用できる可能性が示唆された。

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

微細藻類においては、リン酸取込み活性が異なる輸送体を複数あわせもつ場合が多い。*Chlamydomonas* において存在が示唆されている 16 個のリン酸輸送体の中で、特にリン酸の取込み活性が高い輸送体を明らかにすることを目的に、野生株及びヒ酸耐性株のリン酸輸送体遺伝子の発現を

比較した。ヒ酸耐性株として、*PTB1* の欠損株である AR3 及び光合成系損傷株 CC981 を使用した。リン十分条件下におけるリン酸輸送体遺伝子の発現を比較すると、AR3 は野生株と比較して *PTA2*、*PTB2* の mRNA レベルが高く、*PTB5* の mRNA レベルが低かった(Murota et al., 2012)。CC981 は、野生株と比較して *PTA2*、*PTA4* の mRNA レベルが高く、*PTB3*、*PTB5* の mRNA レベルが低かった。

また、野生株に比べ変異株の細胞内ヒ酸取込み量が低く、ヒ酸代謝速度にはあまり差がなかった。さらに、リン酸及びヒ酸 1mM 存在下における AR3 のリン酸取込み活性が、野生株と比較して顕著に高かったことから(Kobayashi et al., 2005, Murota et al., 2012)、*Chlamydomonas* のヒ酸耐性株は細胞内ヒ酸取込み量を抑制することで耐性能を得ていることが明らかとなった。なお、*PTB2* については、リン酸欠乏条件下にて顕著に転写レベルが上昇することがわかっており、リン酸欠乏条件下で誘導される高親和型リン酸輸送体の一つである可能性が考えられる。

*PTB2* をシアノバクテリアで発現させることで、よりリン酸選択性の高い細胞が得られないかと考え、シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942(以下、*Synechococcus*)のゲノム上に *PTB2* を形質転換により導入した。*Synechococcus* 野生株と *PTB2* 導入株において、リン酸およびそのアナログであるヒ酸を添加した際の細胞内取り込みを調べた。細胞内リン、ヒ素含量及びリン酸、ヒ酸取込み速度について調べたところ、両株間で有意差は認められなかった。しかし、野生株、*PTB2* 導入株ともにヒ酸 170 mM 存在下でも生育が可能であり、高いヒ酸耐性能が示された。また、リン酸欠乏条件下における取込み初速度に関しては、野生株、*PTB2* 導入株ともに、リン酸取込み速度は  $4.0\sim 5.0 \mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$  であったのに対し、ヒ酸取込み速度は  $0.05\sim 0.14 \mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$  と、リン酸とヒ酸の取込み速度に 30~90 倍程の差があることがわかった。

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

第 2 章において、*Synechococcus* の野生株及び *Chlamydomonas PTB2* 導入株において、細胞内への取込みがヒ酸よりもリン酸に対して選択性が高いことが明らかになった。*Synechocystis* においてもそのような選択性があるのか、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。実験には、*Synechocystis* 野生株に加え、リン酸輸送体欠損株、 $\Delta pst1$ 、 $\Delta pst2$ (Burut-Archanai et al., 2011)を使用した。まず、ヒ酸耐性能について調べたところ、リン酸十分条件下では *Synechocystis* 野生株や  $\Delta pst2$  と比較して  $\Delta pst1$  のヒ酸感受性が高かった。しかし、リン酸欠乏条件下では  $\Delta pst1$  よりも野生株と  $\Delta pst2$  の感受性が高かった。リン酸十分条件下、ヒ酸添加後の細胞内ヒ素含量を調べると、ヒ酸添加 1 時間後における  $\Delta pst1$  のヒ素含量が他株よりも多くなっていた。一方、リン酸欠乏条件下におけるヒ酸取込み速度は、野生株、 $\Delta pst2$  でそれぞれ  $0.5\pm 0.1$ 、 $0.4\pm 0.1 \mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$  であったのに対し、 $\Delta pst1$  では  $0.2\pm 0.1 \mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$  であった。このことから、 $\Delta pst1$  がリン酸十分条件においてヒ酸感受性が高いのは、ヒ酸添加直後の細胞内ヒ素含量が多いためであること、また、リン酸欠乏条件下でヒ酸耐性能が高いのは、リン酸欠乏条件下で活発な取込みを行う Pst1 をもたないため、ヒ酸の取込み速度も他株と比較して小さいためであることが示唆された。また、リン酸欠乏条件下におけるリン酸取込み速度については、野生株、 $\Delta pst2$  では  $3.8\pm 0.3$ 、 $3.6\pm 0.9 \mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$  であったのに対し、 $\Delta pst1$  では、 $0.3\pm 0.1 \mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$  であった。上述のリン酸欠

乏条件下におけるヒ酸取込み速度の結果とあわせて、Pst1 では、ヒ酸に対するリン酸の取込み速度が約 7~10 倍であるのに対し、Pst2 では 1.5 倍程度であることが示唆された。

さらに、リン酸十分条件下においてヒ酸を添加した際のリン酸輸送体関連遺伝子の発現を調べると、リン酸結合タンパク遺伝子の発現量が顕著に上昇しており、リン酸結合タンパクがヒ酸の取込みにも関与していることが確かめられた。そこで、リン酸結合タンパクの一つ、PstS1 の欠損株(Pitt et al., 2010)について細胞内リン、ヒ素含量や取込み速度について調べた。リン酸十分条件下、ヒ酸添加 36 時間後の細胞内ヒ素蓄積量について比較すると、野生株においては  $3.2 \mu\text{mol As} \cdot (10^{10} \text{ cells})^{-1}$  程度であったのに対し、 $\Delta pstS1$  では  $0.5 \sim 1 \mu\text{mol As} \cdot (10^{10} \text{ cells})^{-1}$  と低い値を維持していた。リン酸欠乏条件下の取込み速度については、 $\Delta pstS1$  のリン酸取込み速度は野生株の約 1/7 程度となっていた。

以上の結果から、*Synechocystis* においては、ヒ酸に比べリン酸の取込み速度が約 7 倍以上であることが高いヒ酸耐性能を示す要因の一つであること、また、リン酸結合タンパクがリン酸、ヒ酸両方の取込みに関与すること、リン酸十分条件下でもヒ酸の影響によりリン酸輸送体遺伝子の発現誘導が起こることが明らかとなった。本研究から、微細藻類、特に *Synechocystis* 及び *Synechococcus* によるリン酸、ヒ酸回収への有用性が示された。

#### 【研究成果が掲載された論文】

Murota, C., Matsumoto, H., Fujiwara, S., Hiruta, Y., Miyashita, S., Shimoya, M., Kobayashi, I., Hudock, M. O., Togasaki, R. K., Sato, N., 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

#### 【参考文献】

- Archanai, S. B., Eaton-Rye, J. J., Incharoensakdi, A. (2011),  $\text{Na}^+$ -stimulated phosphate uptake system in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with Pst1 as a main transporter. *BMC Microbiology*, vol. 11, 225
- Kobayashi, I., Fujiwara, S., Shimogawara, K., Sakuma, C., Shida, Y., Kaise, T., Usuda, H., Tsuzuki, M. (2005), High intracellular phosphorus contents exhibit a correlation with arsenate resistance in *Chlamydomonas* mutants. *Plant and Cell Physiology*, vol. 46, 489-496
- Pitt, F. D., Mazard, S., Humphreys, L., 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

## 審査結果の要旨

リンは生物にとって必須の元素であるが、産業界でも利用され、資源としての枯渇が懸念されている。また、ヒ素は生物にとって毒性を示すが、その酸化物であるヒ酸がリン酸と似た分子構造をとるため、リンとの分離は必ずしも容易でない。そのため、ヒ素による水汚染が深刻なチベット周辺地域では重要な問題となっている。申請者は、水界生態系の一次生産者である光合成微生物を用いた環境浄化技術開発の可能性を視野に置き、リンとヒ素の細胞内取り込みとリン酸輸送体との関わりを研究した。

まず、工場からの実排水を入手して、シアノバクテリア *Synechocystis* および単細胞緑藻 *Chlamydomonas* を用いて培養したところ、両者とも排水で増殖できたが、特定排水や焼却炉排水では *Synechocystis* のみ細胞増殖可能であった。また、細胞増殖によって排水等におけるリン濃度が顕著に低下し、90%以上リンを除去できることを示した。さらに、培養可能なリン濃度条件を *Synechocystis* で検討し、排水基準値の20倍のリン濃度まで増殖が可能であることも示した。

次に、光合成研究でよく用いられ、ヒ素耐性変異株の得られている緑藻 *Chlamydomonas* を用いて、培養液中リン濃度条件とリン酸輸送体遺伝子の発現量との関係、及びリンとヒ素の細胞内取り込み速度を調べた。その結果、2タイプ16種のリン酸輸送体の中で、特に Na<sup>+</sup>/Pi symporter Pho89 との相関性が高い *PTB2* の mRNA レベルが、リン酸欠乏条件下での野生株で顕著に高く、ヒ素耐性変異株ではリン濃度によらず常に高いことを見出した。また、ヒ素耐性と細胞内ヒ酸取り込み速度の低下とが相関していることを示し、*PTB2* がリン酸を特異的に輸送する輸送体である可能性を示した。その証明として *PTB2* をシアノバクテリアに導入することを試みたが、リン酸取り込み促進を直接示すことはできなかった。

そこで、2種のリン酸輸送体のみを持つ *Synechocystis* を用い、野生株と2種の輸送体欠損変異株 *Δpst1* および *Δpst2* のリンとヒ素の細胞内取り込み活性を調べた。その結果、リン酸十分条件下では *Synechocystis* 野生株や *Δpst2* と比較して *Δpst1* がヒ酸感受性を示した。一方、リン酸欠乏条件下では *Δpst1* が野生株と *Δpst2* より耐性であった。リン酸十分条件下、ヒ酸添加後の細胞内ヒ素含量を調べると、ヒ酸添加1時間のヒ酸取り込み量は *Δpst1* では他の2株よりも高かった。また、リン酸欠乏条件下では、*Δpst1* で低かった。すなわち、細胞内リン酸量に対するヒ酸の細胞内取り込み量がヒ素耐性に関係が深く、2つのリン酸輸送体のうちの主要な輸送体として働いている *Pst1* の方がリン酸に対する特異性が高いとの結論が得られた。さらに *Pst1* のリン酸結合タンパク質の寄与についても解析した。

提出論文と口頭発表、および質疑応答を審査した結果、合格と評価した。