

緑藻のピレノイド局在性因子ならびに核局在性因子による
無機炭素濃縮機構の調節

嶋村 大亮

目次

序論

1. 植物の CO₂ 欠乏ストレス……………1
2. モデル緑藻クラミドモナスにおける無機炭素濃縮機構 CCM……………3
3. CCM における無機炭素輸送体の役割……………5
4. CCM における炭酸脱水酵素の役割……………8
5. ピレノイド構成因子 EPYC1 及び SAGA1 ……10
6. CCM の制御因子 ……12
7. CCM1 結合タンパク質 CBP1 ……15

目的……………19

第1章 ピレノイド局在性因子の CCM 調節における役割

結果

1. CO₂ 要求性変異株の生育速度と光合成特性……………20
2. CO₂ 要求性変異株における CCM 関連タンパク質の蓄積……………23
3. *saga1* 変異株における CCM 関連遺伝子の発現……………28
4. *saga1* 変異株におけるカルシウム結合性タンパク質 CAS 及び低 CO₂ 誘導性因子 LCIB の細胞内局在……………32

考察

1. *saga1* 変異株における Ci 親和性低下の要因……………35
2. SAGA1 の欠損が LCIB の局在制御に与える影響……………36
3. CAS の局在と遺伝子発現制御の関係……………37

第2章 核局在性因子の CCM 調節における役割

結果

1. CBP1 と CCM1 の核内相互作用…………… 39
2. *cbp1* 変異株における Ci 親和性……………42
3. *cbp1* 変異株における CCM 関連タンパク質の蓄積……………44

4. <i>cbp1</i> 変異株における CCM 関連遺伝子の発現	46
考察	
1. CBP1 の保存性	51
2. CBP1 は核内で遺伝子発現を制御する	53
3. CBP1 は HC 条件で CCM1 依存性遺伝子の発現を抑制する	54
4. HC 条件における CCM 抑制機構	55
結論	58
材料と方法	59
参考文献	64
謝辞	74

要旨

地球上の一次生産の約半分を担う水圏光合成生物にとって、二酸化炭素 (CO₂) の供給速度は光合成の律速要因となるため、微細藻類は能動的に無機炭素 (Ci) を葉緑体内に取り込み、CO₂ 固定酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

(Rubisco) に CO₂ を供給する無機炭素濃縮機構 (CCM) をもつ。この CCM には、複数の膜局在型の Ci 輸送体と炭酸脱水酵素 (CA) に加えて、葉緑体内で CO₂ 固定の場となる Rubisco の集合体であるピレノイドの形成が重要である。CCM の発現は、大気レベルの CO₂ を含む空気を通気する低 CO₂ 条件で誘導され、逆に 5% (v/v) CO₂ を含む空気を通気する高 CO₂ (HC) 条件では抑制されるが、誘導や抑制の機構はまだ明らかにされていない。本研究において申請者は、CCM 関連遺伝子の発現誘導時におけるピレノイドの形態形成の重要性を検証すると共に、細胞外の CO₂ 濃度上昇による CCM の抑制に必要な因子の同定に成功した。

申請者は、CO₂ 要求性変異株をスクリーニングすることで、既知の CCM 誘導因子である亜鉛結合性の核タンパク質 CCM1 ならびにカルシウム結合性タンパク質 CAS が正常に蓄積するにも関わらず、複数の Ci 輸送体タンパク質の蓄積レベルが低下する株を単離した。この変異株では野生株では単一のピレノイドの個数が増加し、デンプン鞘の伸長、ピレノイドチューブの数の減少といったピレノイドの形態が異常となっており、ピレノイドを構成するタンパク質 StArch Granules Abnormal 1 (SAGA1) をコードする遺伝子に変異していた。さらにこの変異により発現が低下する遺伝子の中には、CCM1 ならびに CAS に依存して発現誘導される CCM に必要な Ci 輸送体 HLA3 と LCIA や、CA をコードする核コードの遺伝子が含まれていた。

また、核内で CCM1 と複合体を形成する CCM1-binding protein 1 (CBP1) は、CCM の誘導に関わる可能性が考えられていたが、CBP1 欠損変異株では CCM の誘導は正常である一方、HC 条件で CCM 抑制が不完全となり、光合成における細胞の Ci に対する親和性が上昇した。さらに、HC 条件で本来発現が抑制される Ci 輸送体や CA などをコードする 21 個の遺伝子の発現が部分的に誘導されたことから、CBP1 は CCM 関連遺伝子の発現抑制に寄与する新規因子であることが明らかになった。以上の結果から、本研究は、水圏における CO₂ 欠乏環境への順化に必要な CCM の誘導に伴う核遺伝子の発現に葉緑体内のピレノイドの形態形成が必要であること、さらに細胞外 CO₂ 濃度の上昇に伴う CCM の抑制ならびに CCM 関連核遺伝子の発現抑制を担う新規核タンパク質の同定に成功し、CO₂ 環境の変動に応答する光合成の制御機構の一端を明らかにした。

略語表

BiFC	Bimolecular fluorescence complementation
CA	Carbonic anhydrase
CAM	Rassulacean Acid Metabolism
Cas9	CRISPR associated protein 9
CBP1	CCM1-binding protein 1
CCM	carbon-concentrating mechanism
Chl	Chlorophyll
Ci	Inorganic carbon
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat
FDR	False discovery rate
gRNA	Guide RNA
HC	High-CO ₂
HLA3	high-light activated 3
K _{0.5} (Ci)	Inorganic carbon concentration required for half-maximal rate of O ₂ -evolution
LC	Low-CO ₂
LCI	Low-CO ₂ Inducible protein
mCherry	Monomeric red fluorescent protein
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
PAM	Protospacer adjacent motif
PCR	Polymerase chainreaction
PGA	Glycerate 3-phosphate
Rubisco	Ribulose1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SAGA1	StArch Granules Abnormal 1
TPM	Transcripts per million
TAP	Tris acetate phosphate
UTR	Untranslated region
VLC	Very low-CO ₂
Vmax	Maximum rate of photosynthetic oxygen evolution
YFP	Yellow fluorescence protein

序論

1. 植物の CO₂ 欠乏ストレス

光合成生物は太陽からの光エネルギーを捉え、大気中の二酸化炭素 (CO₂) を還元して有機物を生産する。地球上の光合成生物にとって基質となる CO₂ の濃度変化の感知と効率的な取り込みが重要となる。植物やシアノバクテリアが持つ CO₂ 固定酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) はカルビン=ベンソン回路における炭酸固定の初発反応であるカルボキシラーゼ反応を触媒し、リブローズ 1,5-ビスリン酸 (RuBP) に CO₂ を結合し、2分子の 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) を生成する。一方で Rubisco は CO₂ の代わりに O₂ を結合し、3-PGA と 2-ホスホグリコール酸 (2-PG) を 1 分子ずつ生成するオキシゲナーゼ反応も触媒する (Bowes et al., 1971)。2-PG は葉緑体における炭素代謝を阻害するため、葉緑体、ペルオキシソーム及びミトコンドリアを介した光呼吸により、3-PGA に変換される。特に CO₂ が不足する条件では、Rubisco がカルボキシラーゼ反応よりもオキシゲナーゼ反応に傾きやすくなるため、一部の陸上植物は Rubisco 周囲へ CO₂ を濃縮する無機炭素濃縮機構 (CCM) を持つ。

乾燥条件下で生息する植物は水分の蒸発を防ぐために気孔を閉じ、CO₂ の取り込みが低下する。トウモロコシやキビなどの植物は、葉肉細胞 (Mesophyll Cell : MC) と維管束の周りに存在する維管束鞘細胞 (Bundle Sheath Cell : BSC) の 2 種類の構造に分かれた、クランツ構造と呼ばれる独特な葉の構造を持つ。そこで、MC と BSC でそれぞれ CO₂ の固定と同化を行うことで、BSC 内部に CO₂ を濃縮する。また、CO₂ 固定の最初の産物が炭素原子を 4 つ持つ C₄ 化合物であることから C₄ 植物と呼ばれ、3-PGA を固定する C₃ 植物と区別される。一方、ベンケイソウ、サボテンなどの植物は夜間に C₄ 化合物を液泡に蓄積し、日中にカルビン=ベンソン回路を駆動させる機構を持つ。この光合成機構は、ベンケイソウ型有機酸代謝 (Crassulacean Acid Metabolism) の頭文字をとって、CAM 光合成と呼ばれる。したがって、C₄ 化合物の合成と分解を、C₄ 植物では 2 つの細胞内区画、CAM 植物では昼と夜に分けることで、CCM を駆動する。

一方で、光合成による地球上の一次生産の半分を占める水圏環境では、CO₂ の拡散速度は大気中の 10,000 分の 1 程度にまで低下し (Jones, 1992)、塩基性条件では

無機炭素 (Ci) の多くは重炭酸イオン (HCO_3^-) や炭酸イオン (CO_3^{2-}) として存在する (図 1-1)。ある pH 条件での溶存 Ci における CO_2 と HCO_3^- の割合はヘンダーソン・ハッセルバルヒの式

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}([\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2])$$

から算出できる。ここで pKa は炭酸の第一段階目の解離定数 $\text{pKa} = 6.35$ を示す。また、水圏環境に生息するシアノバクテリアや藻類が持つ Rubisco は陸上植物が持つものと比べ CO_2 に対する親和性が約 1.6-13.4 倍低く、オキシゲナーゼ反応に傾きやすい (Jordan and Ogren, 1981)。このような環境において、水圏の微細藻類やシアノバクテリアは無機炭素を輸送体によって能動的に取り込み、炭酸脱水酵素 (CA) によって変換した CO_2 を Rubisco 近傍に濃縮する、陸上植物とは異なる CCM を誘導する。これは陸上植物が持つ生化学的な CCM (biochemical CCM) と区別して生物物理的な CCM (biophysical CCM) と呼ばれる。ここでは真核緑藻において明らかになった CCM について述べる。

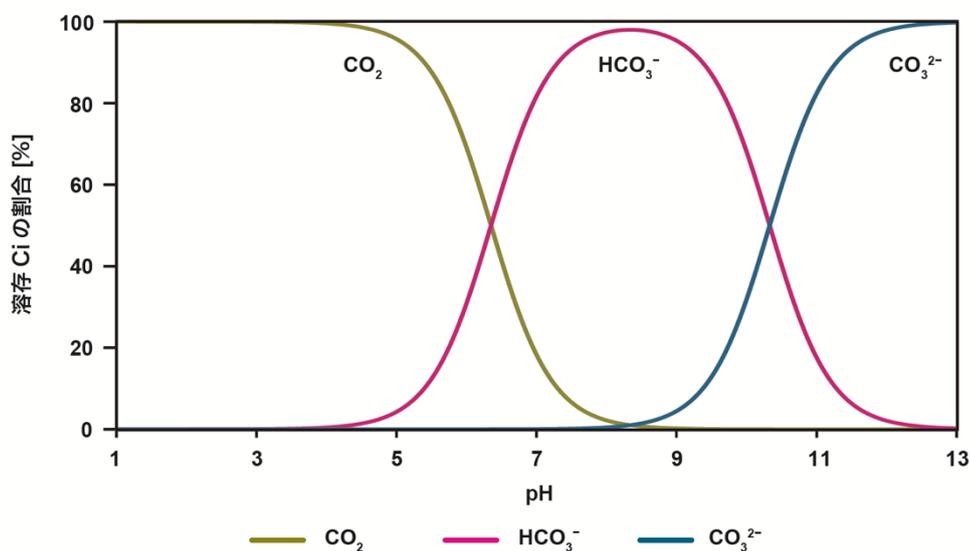


図 1-1 : pH 依存的な溶存 Ci の平衡状態

異なる pH 条件における CO_2 (黄)、 HCO_3^- (赤)、 CO_3^{2-} (青) の割合をそれぞれ示した。

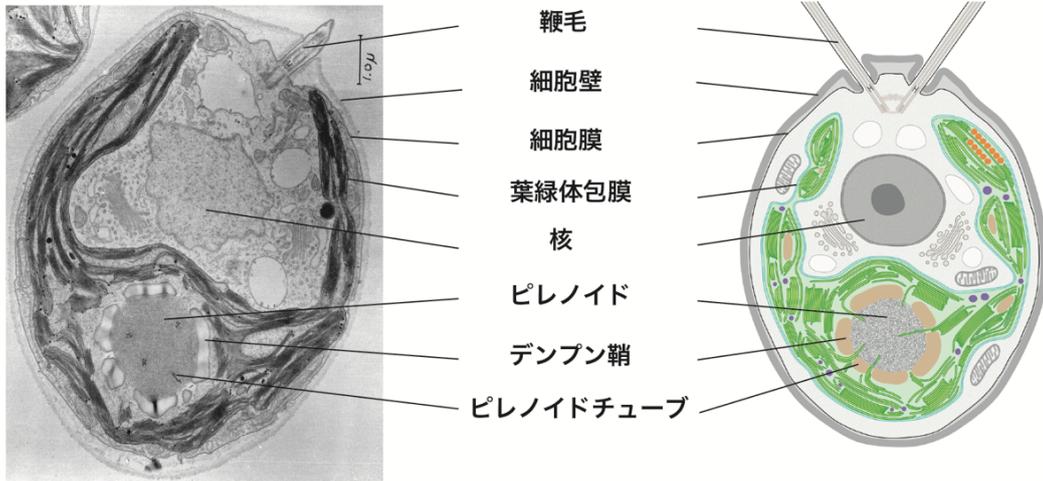
2. モデル緑藻クラミドモナスにおける無機炭素濃縮機構 CCM

0.04% CO₂ 通気条件で培養した緑藻クロレラ *Chlorella vulgaris* 細胞は、高い CO₂ 濃度である 4% CO₂ 通気条件で培養した細胞と比較して C_i に対する親和性が上昇することから、微細藻類が CCM を持つことが初めて示された (Hogetsu and Miyachi, 1977)。また同時期に緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* においても同様のメカニズムを持つことが示されている (Badger et al., 1980)。これまでに CCM に関わる因子は主に緑藻クラミドモナスと珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* および *Thalassiosira pseudonana* において同定された。ここではクラミドモナスの CCM 因子について述べる。

クラミドモナスは全ゲノム情報が解読され (Merchant et al., 2007; Craig et al., 2022)、エレクトロポレーション法による迅速かつ簡便な形質転換法が確立している (Yamano et al., 2013)。また、近年では CRISPR-Cas9 法による遺伝子破壊法や (Greiner et al., 2017; Tsuji et al., 2022)、大規模変異株ライブラリー *Chlamydomonas* Library Project (CLiP) を用いた、逆遺伝学的な解析が容易である (Li et al., 2016)。クラミドモナスは、2本の鞭毛を持つ単細胞緑藻であり、カップ状の葉緑体を1つ持つ (Harris, 1989)。また、葉緑体の基底部に Rubisco が凝集したピレノイドと呼ばれる構造を1つ持つ。ピレノイドは CO₂ 固定の場として働き、周囲をデンプン鞘に囲まれている。また、ピレノイド内に葉緑体チラコイド膜が貫入しており、ピレノイドチューブと呼ばれる (図 1-2)。

クラミドモナスは、周囲の溶存 CO₂ 濃度に応じて、異なる C_i 取り込み機構を持つ。70 μM 以上の高 CO₂ (High-CO₂: HC) 条件では CCM が抑制され、CO₂ は拡散によって Rubisco へと供給される (図 1-3)。一方 CCM が駆動する 7~70 μM の低 CO₂ (Low-CO₂: LC) 条件及び 7 μM 未満の超低 CO₂ (Very Low-CO₂: VLC) 条件において、それぞれ異なる C_i 取り込み機構を持つ (Vance and Spalding, 2005) (図 1-4)。

A



B

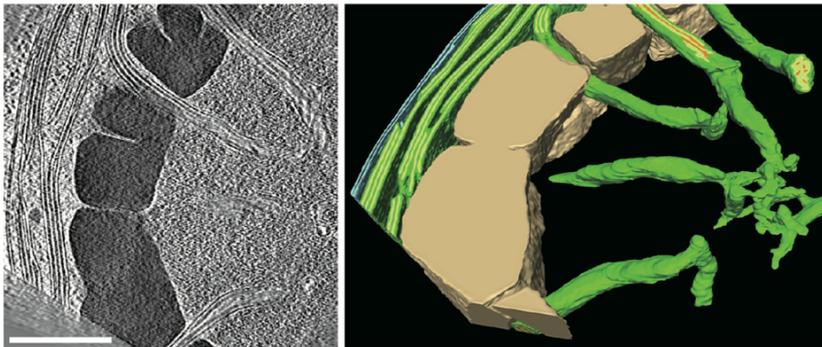


図 1-2 : クラミドモナスの細胞及びピレノイドチューブの構造

(A) クラミドモナス細胞の細胞内構造及びその模式図 (Ohad et al., 1967 及び Engel et al., 2015 を改変)。(B) クライオ電子顕微鏡により観察されたピレノイドチューブの構造及びそれを元に構築した立体構造。スケールバーは 500 nm を示す。チラコイド膜は緑色、デンプン鞘は黄褐色で示している (Engel et al., 2015 を改変)。

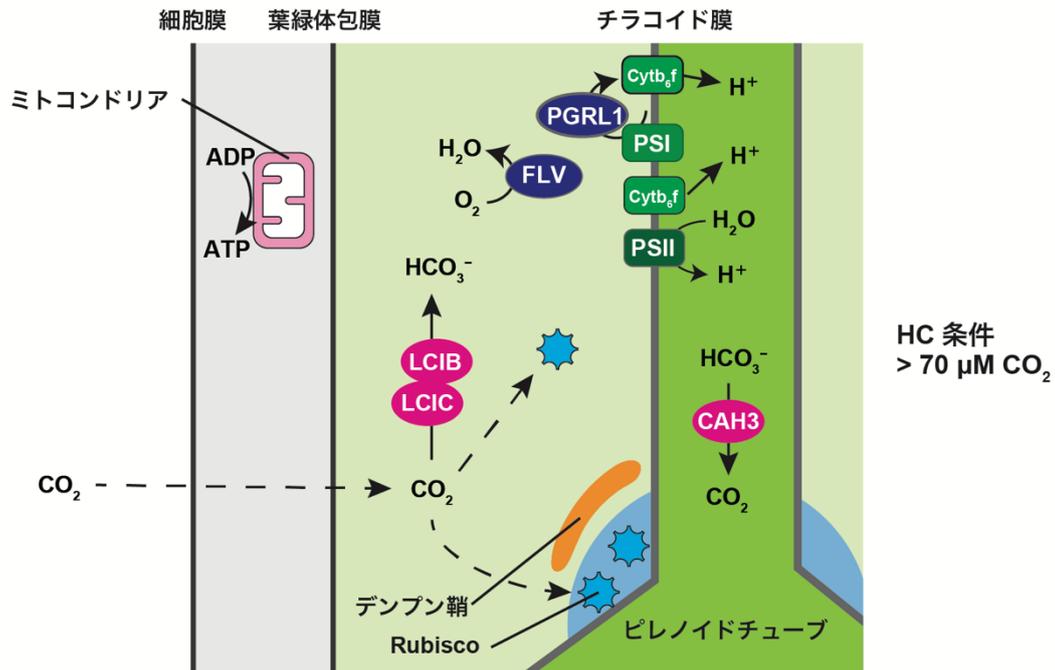


図 1-3 : HC 条件におけるクラミドモナスの CCM モデル

HC 条件における C_i 取り込み機構のモデル (Wang et al., 2016 を参考に作図)。 CO_2 の拡散は点線の矢印で示している。CAH3 はチラコイドルーメンに局在する CA であり、LCIB 及び LCIC は葉緑体ストロマに局在する CA と予測されている。光合成電子伝達系のタンパク質は緑色、チラコイドルーメンのプロトン勾配形成に関わる因子は紺色で示している。

3. CCM における無機炭素輸送体の役割

クラミドモナスの CCM では細胞膜、葉緑体包膜及びチラコイド膜の 3 つの生体膜において C_i が輸送されるが、輸送機構は CO_2 濃度条件によって変化する。LC 条件では、細胞外の C_i は主に CO_2 の形で細胞膜及び葉緑体包膜を透過することで、葉緑体内ストロマ内へと拡散する。また、細胞膜に局在する Low- CO_2 inducible protein 1 (LCI1) が HCO_3^- ではなく CO_2 を選択的に輸送する機能を持つ (Ohnishi et al., 2010; Kono and Spalding, 2020)。結晶構造解析から、LCI1 は 4 回膜貫通ドメインを持ち、細胞膜上でホモ 3 量体を形成する (Kono et al., 2020)。また、葉緑体包膜における CO_2 の輸送体やチャネルは未同定だが、葉緑体ゲノムにコードされる Chloroplast envelope membrane protein A (CemA/ycf10) が、葉緑体内への CO_2 の取り込みに関わると考えられている (Rolland et al., 1997)。

一方 VLC 条件では、Ci は主に HCO_3^- として、細胞膜に局在する HCO_3^- 輸送体 High-light activated 3 (HLA3) と葉緑体包膜に局在するアニオンチャネル Low- CO_2 inducible protein A (LCIA) により、葉緑体内ストロマへと輸送される (Yamano et al., 2015)。HLA3 遺伝子は ATP-binding cassette (ABC) transporter をコードし、当初は強光ストレスで発現誘導される遺伝子群の 1 つとして同定されたが、 CO_2 欠乏条件においても誘導され、 HCO_3^- の輸送に関わる (Im and Grossman, 2002; Duanmu et al., 2009)。また、HLA3 は LCII 及び、 H^+ の輸送に関わると予測される Autoinhibited Ca^{2+} -ATPase 4 (ACA4) と複合体を形成する (Mackinder et al., 2017)。そのため、HLA3 による HCO_3^- 輸送や LCII による CO_2 輸送に、ACA4 によるプロトン濃度勾配の形成に関わる可能性が考えられるが、複合体形成の生理学的な意義は未解明である。また、HC 条件で細胞質全体に分散しているミトコンドリアが、VLC 条件移行後に細胞膜側に移動することから (Rai et al., 2021)、ミトコンドリアから供給された ATP によって HLA3 が駆動することが示唆される。LCIA は硝酸塩輸送体である Nitrate Assimilation Related 1 (NAR1) のホモログであるが、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能解析により LCIA が HCO_3^- と N_2 の両方に対して ATP 依存的な輸送活性を持つことが示された (Mariscal et al., 2006)。

また、LC 条件、VLC 条件どちらにおいても葉緑体ストロマからチラコイドルーメン内への HCO_3^- の輸送にはチラコイド膜上の 3 つの輸送体ベストロフィンチャネル BST1-3 が関わる。ベストロフィンは真核生物に広く保存されており、陸上植物のチラコイド膜に局在する Voltage-gated chloride channel 1 (VCCN1) は、塩化物イオンの輸送に関わる (Herdean et al., 2016; Hagino et al., 2022)。クラミドモナスの BST1-3 はチラコイド膜に局在し、VCCN1 と 30% の相同性を示し、陰イオンの輸送に関わる非極性アミノ酸残基を持つ。BST3 単独変異株は CO_2 欠乏条件では生育は遅延しないが、BST1-3 ノックダウン株では生育が遅延することから、3 つのベストロフィタンパク質が HCO_3^- 輸送において冗長的な機能を持つと考えられている (Mukherjee et al., 2019)。

光合成電子伝達系において、光化学系 II (PSI)、シトクロム b6-f 複合体及び光化学系 I (PSI) によるリニア電子伝達系によって、チラコイド内腔にプロトン勾配は形成され、NADPH 及び ATP が合成される。一方で、PSI 周囲のサイクリック電子伝達によってもプロトン勾配が形成され、ATP の生産に利用される。サイクリック

電子伝達には、チラコイド膜上の Proton gradient regulation 5 (PGR1) 及び Proton gradient regulation like 1 (PGRL1) タンパク質が関わる (Munekage et al., 2002; DalCorso et al., 2008)。さらに、シアノバクテリアや緑藻及び裸子植物が持つ Flavodiiron protein (FLV) が、PSI から供給された電子により酸素が還元されるシュードサイクリック電子伝達によるプロトン勾配の形成を触媒する (Helman et al., 2003; Shimakawa et al., 2009; Chaux et al., 2009)。クラミドモナスにおいて、PGRL1 及び FLV の二重変異株では CO₂ 欠乏条件で培養した際の生育速度が低下し、C_i 親和性が低下する (Burlacot et al., 2022)。この結果から、サイクリック電子伝達及びシュードサイクリック電子伝達により形成されたプロトン濃度勾配が、BST1-3 による HCO₃⁻ 輸送に利用されるモデルが提唱されている。

4. CCM における炭酸脱水酵素の役割

クラミドモナスではこれまでに 14 種類の CA 及び CA 候補遺伝子が報告されているが、(Aspatwar et al., 2018) ここでは CCM に関わるものや CO₂ 欠乏条件で発現が誘導されるものについて述べる。 α -CA をコードする *cah3* 変異株は CO₂ 欠乏条件で生育速度が顕著に低下することから、CCM に必須の CA として同定された (Spalding et al., 1983)。CAH3 はチラコイドルーメンに局在し、輸送された HCO₃⁻ を CO₂ に変換し Rubisco に供給する (Karlsson et al., 1998)。

葉緑体ストロマに局在する Low-CO₂ inducible protein B (LCIB) タンパク質は β -CA 型の反応中心と類似した立体構造を持つ (Jin et al., 2016)。光照射下では、チラコイドルーメン内にプロトンが流入するため、葉緑体ストロマ内は pH が約 8.0 の弱塩基性条件になり、C_i の多くが HCO₃⁻ として存在する「C_i プール」を形成する。そこで LCIB は CO₂ を HCO₃⁻ に変換し、C_i プールを維持する役割を持つと考えられている。また、LCIB 葉緑体内で HCO₃⁻ ではなく CO₂ 濃度依存的に局在を変化させ、HC 及び LC 条件において LCIB は葉緑体ストロマに分散しているが、VLC 条件移行後はピレノイド周囲に局在を変化させる (Yamano et al., 2022)。そのため、LCIB は LC 条件では葉緑体ストロマの CO₂ を HCO₃⁻ に変換し C_i プールを維持し、VLC 条件ではピレノイドから漏れ出た CO₂ を HCO₃⁻ に再変換する機能を持つと考えられる (Wang and Spalding, 2014) (図 1-4)。LCIB はそのホモログである Low-CO₂

inducible protein C (LCIC) と複合体を形成するが、LCIB、LCIC 及び LCIB-LCIC 複合体は *in vitro* では CA 活性を示さないため、アロステリックな制御が LCIB の機能に関わると考えられている (Yamano et al., 2010; Jin et al., 2016)。また、CO₂ 欠乏条件下で発現が誘導される Low-CO₂ inducible protein D (LCID) 及び Low-CO₂ inducible protein E (LCIE) は LCIB と約 60%の相同性を持つが、CA 活性の有無や CCM における役割は分かっていない (Fang et al., 2012)。

CAH1 はペリプラズム層に局在する亜鉛結合型の CA であり、光照射下かつ CO₂ 欠乏条件下で遺伝子の発現レベルが顕著に増加する (Fujiwara et al., 1990; Fukuzawa et al., 1990)。CAH1 変異体では野生株と比較して VLC 条件下における光合成活性がわずかに低下するが、生育速度は変化しないことから、CCM の駆動には必須の因子ではないと考えられている (Van and Spalding, 1999)。

CAH4 及び CAH5 はクラミドモナスで最初に発見された β -CA で、ミトコンドリア内に局在している (Eriksson et al., 1995)。CAH4/5 は CO₂ 欠乏条件下で発現が誘導されることが知られているが、CCM における役割は不明である (Fang et al., 2012)。CAH4/5 のノックダウン株では LC 及び VLC 条件下での生育が低下することから、ミトコンドリアにおいて CO₂ から変換された HCO₃⁻ を供給することで CCM の駆動に寄与しているモデルが提唱されている (Rai et al., 2021)。

5. ピレノイド構成因子 EPYC1 及び SAGA1

ピレノイドは多くの藻類及びツノゴケ類が、葉緑体内に持つ顆粒状の構造体である (Barrett et al., 2021)。クラミドモナスでは CO₂ 欠乏条件下で Rubisco の 90%がピレノイド内部に凝集し、CO₂ 固定の中心的な役割を持つ (Borkhsenius et al., 1998)。一方で、ピレノイドは Rubisco の静的な凝集体ではなく、液-液相分離した動的なオルガネラであり (Freeman Rosenzweig et al., 2017)、その形成に複数のピレノイド局在タンパク質が関わる。Rubisco 結合性タンパク質 Essential Pyrenoid Component 1 (EPYC1) の変異株では、ピレノイドが縮小し、Rubisco 密度が低下する (Mackinder et al., 2016) (図 1-5A,B)。また、*in vitro* で混合した Rubisco と EPYC1 タンパク質が相分離し液滴を形成することから (Wunder et al., 2018)、EPYC1 が Rubisco 同士をつなぎ合わせるリンカータンパク質として機能する。さらにクライオ

電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、EPYC1 が Rubisco のスモールサブユニットとの結合部位を少なくとも 5 つ持つことが明らかとなっている (He et al., 2020)。

ピレノイドに局在する StArch Granules Abnormal 1 (SAGA1) の変異株はピレノイドの数の増加、ピレノイドチューブの減少、及びデンプン鞘の伸長といった、ピレノイドの形態変化を示す (Itakura et al., 2019) (図 1-5C,D)。デンプン鞘と Rubisco マトリックスとの間に局在する SAGA1 は N 末端側にデンプン結合ドメインである Carbohydrate Binding Module family 20 (CBM20) ドメインを持ち、Rubisco と相互作用することから、デンプン鞘と Rubisco をつなぐリンカータンパク質として機能すると考えられている (Itakura et al., 2019)。特に SAGA1 が C 末端に持つアミノ酸配列モチーフ [D/N]W[R/K]XX[L/I/V/A] は Rubisco との相互作用に必要であり、同様の Rubisco 結合モチーフを持つ SAGA2、Rubisco-binding membrane protein 1

(RBMP1)、RBMP2 もピレノイドに局在する (Meyer et al., 2020) (図 1-5E)。その局在パターンから SAGA2 は SAGA1 と同様にデンプン鞘と Rubisco との結合を、RBMP1/RBMP2 はピレノイドチューブと Rubisco との結合を媒介するモデルが提唱されている (図 1-5F)。

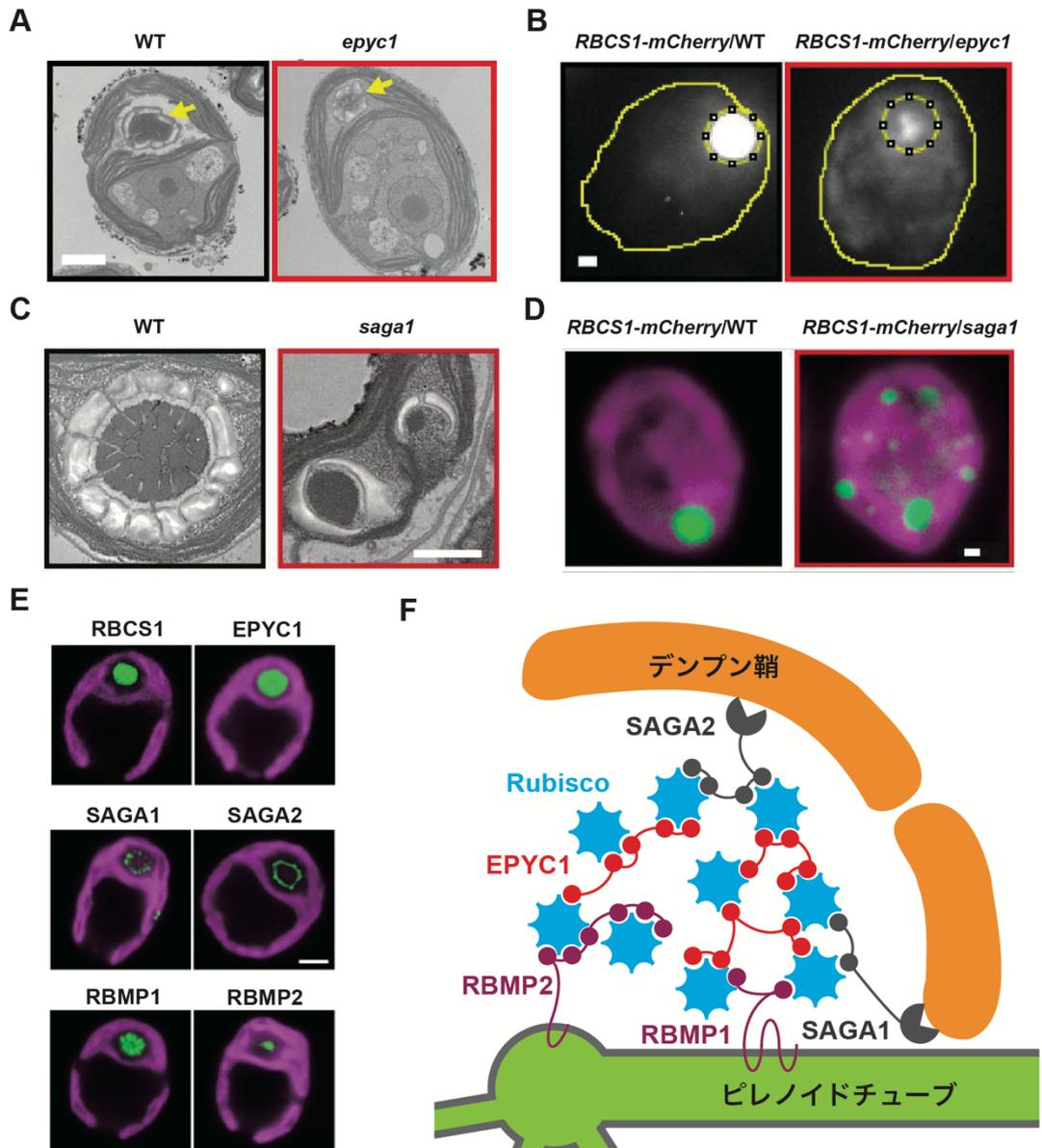


図 1-5 : *epyc1* 及び *saga1* 変異株におけるピレノイド形態及びピレノイド形成に関わる Rubisco 結合性タンパク質の局在と機能モデル

(A) EPYC1 変異株 (*epyc1*) におけるピレノイドの形態及び (B) *RBCS1-mCherry* を発現させ可視化した Rubisco の局在。スケールバーは 1 μm を示す。(Mackinder et al., 2016 を改定) (C) *saga1* 変異株 (*saga1*) におけるピレノイドの形態及び (D) *RBCS1-mCherry* を発現させ可視化した Rubisco の局在。緑が mCherry 蛍光、マゼンタがクロロフィル自家蛍光、スケールバーは 500 nm を示す。(Itakura et al., 2019 を改定) (E) Venus で可視化した RBCS1 及び Rubisco 結合モチーフを持つタンパク質の細胞内局在。緑が Venus 蛍光、マゼンタがクロロフィル自家蛍光、スケールバーは 2 μm を示す (Meyer et al., 2020 を改定)。(F) 細胞内局在から予測された EPYC1、SAGA1、SAGA2、RBMP1 及び RBMP2 の機能モデル。

6. CCM の制御因子

これまでに CCM に関わる遺伝子の発現を制御する 4 種類の因子 CCM1、Low-CO₂ stress response 1 (LCR1)、CAS 及び BLZ8 が同定されている。699 アミノ酸の可溶性タンパク質をコードする *CCM1/CIA5* 遺伝子の変異株では CCM の誘導が損なわれることから、CCM のマスター制御因子として同時期に 2 つの研究グループによって同定された (Fukuzawa et al., 2001; Xiang et al., 2001)。野生株と *CIA5* 変異株を用いたトランスクリプトーム解析から、*HLA3*、*LCII*、*LCIA*、*BST1-3*、*CAHI*、*LCIB/C* といった、CO₂ 欠乏条件で発現が誘導される 533 個の遺伝子発現に CCM1 が必要である (Miura et al., 2004; Fang et al., 2012) (図 1-6)。CCM1 は核に局在し、N 末端側に 2 つの亜鉛結合部位を持つ (Wang et al., 2005)。亜鉛結合部位のシステイン及びヒスチジン残基をバリン及びチロシンに置換し、亜鉛結合能が失われた改変型 CCM1 を発現させた株では、CO₂ 欠乏条件における生育遅延や、CCM 関連タンパク質の減少が見られることから、CCM1 と亜鉛の結合が CCM1 の機能に重要である (Kohinata et al., 2008)。一方で CCM1 が直接 DNA 配列を認識し転写因子として働くといった知見が得られていないことから、CCM1 が他の転写因子と相互作用し、発現を制御する転写共役因子として働く可能性も考えられている。これまでに CCM1 が CO₂ 条件に関わらず、290-580 kDa の複合体を形成することが知られているが、相互作用因子は同定されていない (Kohinata et al., 2008)。

MYB 型転写因子である LCR1 は CO₂ 欠乏条件における *CAHI* と *LCII* の発現に必要であり、*CAHI* のプロモーター領域に結合する (Yoshioka et al., 2004)。また、LCR1 自身が CCM1 の下流で発現が誘導されることから、LCR1 が CCM1 の下流で CO₂ シグナルを伝達する。一方で、クラミドモナスでは転写因子や転写調節因子をコードすると予測される 234 遺伝子が同定されているが (Riaño-Pachón et al., 2008)、CCM 制御に関わる転写因子は LCR1 の他には同定されていない。

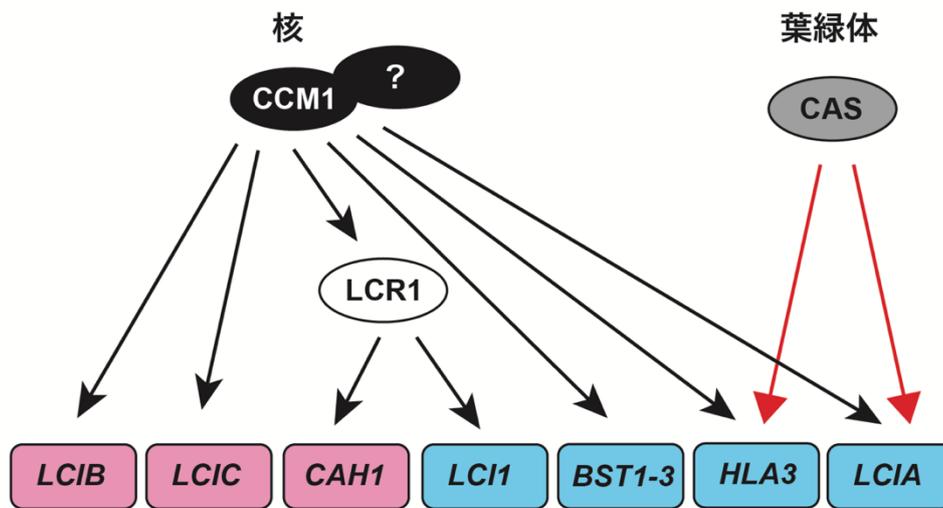


図 1-6 : CO₂ 欠乏条件における CCM 関連遺伝子の制御モデル

緑藻の CCM におけるマスター制御因子 CCM1、Myb 型転写因子 LCR1 及び葉緑体内の Ca²⁺結合性タンパク質 CAS による CCM 関連遺伝子の発現制御モデル。CA 及び CA と類似した構造を持つ因子をコードする遺伝子は赤色、Ci 輸送体をコードする遺伝子は青色で示している。黒矢印は核における発現誘導、赤矢印は葉緑体からのレトログレードシグナルを示す。

葉緑体に局在する Ca²⁺結合タンパク質をコードする CAS は、CO₂ 欠乏条件における生育速度及び、Ci 親和性が低下する CO₂ 要求性株 H82 の、原因遺伝子として同定された (Wang et al, 2014)。さらに CAS が Ci 輸送体をコードする HLA3 及び LCIA、ミトコンドリア局在性 CA をコードする CAH4、CAH5 に加えて、ミトコンドリアの膜タンパク質 CCP1 および CCP2、シャペロンタンパク DJN31、非光化学的消光に関与するタンパク質 LHCSR3.1 及び LHCSR3.2、タンパク質リン酸化酵素 PPP30、LCID、及び 2 つの機能未知因子をコードする 13 個の遺伝子の発現誘導に必要であることが RNA-seq 解析により示された (Wang et al, 2016)。これらの遺伝子は、H82 において CO₂ 欠乏条件誘導後 20 分では一過的に発現が誘導されるが、2 時間後には野生株と比較して発現量が低下する。このことから、CAS は CCM1 依存性遺伝子の初期誘導後の発現維持に必要であることが示唆された。さらに CAS は高 CO₂ 条件下では葉緑体チラコイド膜上に分散しているが、CO₂ 欠乏条件移行後にピレノイドチューブを通してピレノイドに移行する (Yamano et al., 2018: 図 1-7)。さらに CO₂ 欠乏条件においてピレノイド内の Ca²⁺濃度が CAS 非依存的に上昇することから (Wang et al, 2016)、ピレノイド内部における CAS と Ca²⁺の結合が CCM の制御に重要であると考えられている。

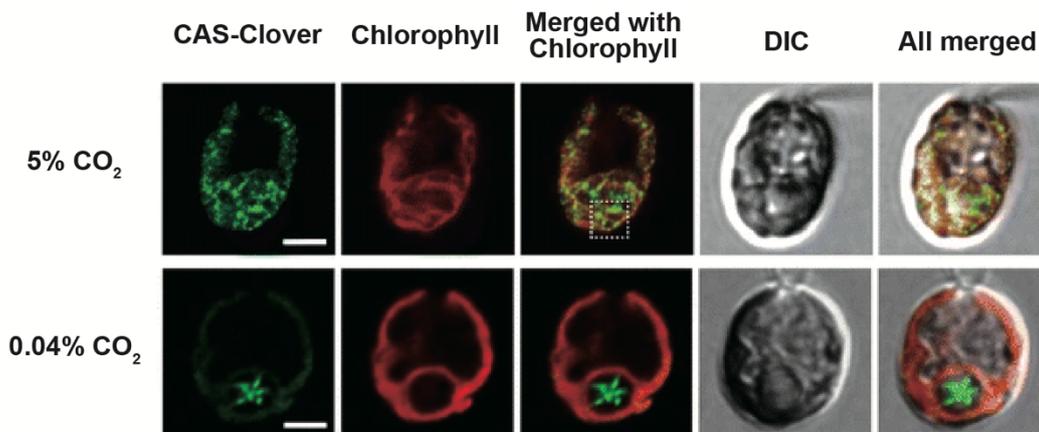


図 1-7：異なる CO₂ 条件における CAS の局在変化

cas 変異株に CAS と蛍光タンパク質 Clover 融合タンパク質を発現させた株における CAS-Clover 由来の蛍光シグナル。5% CO₂ 及び 0.04% CO₂ 通気条件で培養した細胞を観察した。スケールバーは 2 μm を示す。（Yamano et al., 2018 を改定）

さらに、葉緑体で過酸化水素 (H₂O₂) の生成を誘発するメトロニダゾールの添加による酸化ストレスにより、発現が誘導される Basic leucine zipper (bZIP) 転写因子である BLZ8 が、HLA3 や炭酸脱水酵素である CAH7 及び CAH8 をコードする遺伝子の発現に関わる (Choi et al., 2022)。このことから酸化ストレス応答における CCM の寄与が示唆されている。一方で *BLZ8*、*CAH7* 及び *CAH8* が低 CO₂ 誘導性遺伝子ではなく、CCM1 による制御も受けていないことから (Fang et al., 2012)、低 CO₂ ストレスと酸化ストレスにおいて、異なる遺伝子発現の制御機構が存在すると考えられる。

HC 条件では、CO₂ は拡散によってピレノイド内の Rubisco に供給されると考えられる。CO₂ 欠乏条件ではなく、HC 条件で発現が誘導される遺伝子がこれまで複数報告されている。ヒトの赤血球膜に局在するタンパク質と相同性を持つ Rhesus-like protein 1 (RHP1) は HC 条件で発現が誘導され、RHP1 のノックダウン株では HC 条件における生育速度が低下する (Soupene et al., 2002; Soupene et al., 2004)。RHP1 は細胞膜に局在し、CO₂ チャネルとして働くと考えられている (Kustu and Inwood, 2006; Yoshihara et al., 2008)。このことから、RHP1 が HC 条件における CO₂ の透過に寄与している可能性も考えられる。また、ペリプラズム層に局在する炭酸脱水酵素 CAH2 も HC 条件で発現が誘導される (Fujiwara et al., 1990; Fukuzawa et al., 1990; Rawat and Moroney, 1991)。さらにペリプラズム層に局在する 43 kDa のタンパク質

である H43/FEA1 は HC 条件及び鉄欠乏条件においてそれぞれ独立して発現が誘導されるが、その機能は明らかになっていない (Allen et al., 2007; Hanawa et al., 2007; Baba et al., 2011)。

シアノバクテリアでは、LysR 型転写因子である NAD(P)H dehydrogenase regulator (NdhR/CcmR)が、HC 条件において Ci 輸送体をコードする遺伝子の発現を抑制する、リプレッサーとして機能する (Figge et al., 2001; Wang et al., 2004)。また、珪藻 *Phaeodactylum tricoratum* の β 型 CA をコードする *PtCAI* の上流には、HC 条件における *PtCAI* の発現抑制に重要なシスエレメント配列が存在する (Ohno et al., 2012)。しかし緑藻では、HC 条件における CCM 関連遺伝子の発現抑制に関わる転写因子や、シスエレメント配列は未同定である。緑藻 *Chlorella ellipsoidea* において、HC 条件下で生育しても CO₂ 欠乏条件下で生育した野生型の細胞と同等の Ci 親和性を示す変異株が単離されているが、原因遺伝子の同定には至っていない (Matsuda and Colman, 1996)。

7. CCM1 結合タンパク質 CBP1

CCM1 複合体の構成因子は CCM の制御に重要な機能を持つ可能性があることから、CCM1 相互作用因子の探索が行われている (山原洋佑, 佐々木優 unpublished data)。CCM1 とポリペプチドタグ FLAG の融合タンパク質を発現する株を作出し、抗 FLAG 抗体を用いたプルダウンアッセイにより CCM1 複合体構成因子の探索が行われた。そして、推定分子量 75 kDa 及び 45 kDa のタンパク質が複合体の構成因子候補として同定された (図 1-8A)。特に 75 kDa のタンパク質は CO₂ 条件に関わらず CCM1 と強く相互作用した (図 1-8B)。質量分析によって、75 kDa のタンパク質は相互作用する他のタンパク質に金属イオンを供給する、金属シャペロンと予測される機能未知のタンパク質であった。45 kDa のタンパク質はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ GDH1 及び GDH2 であることが明らかになった。特に 75 kDa の機能未知タンパク質は CCM1 との強い相互作用を示したことから、CCM1 複合体による遺伝子発現制御に関わると予測し、CCM1-binding protein 1 (CBP1) と命名された (図 1-8C)。CBP1 が CO₂ 条件に関わらず蓄積し、CCM1 と相互作用することか

ら、CBP1 が CO₂ 欠乏条件における CCM 関連遺伝子の発現誘導に関わる可能性や、HC 条件における CCM 関連遺伝子の発現抑制に関わる可能性が考えられる。

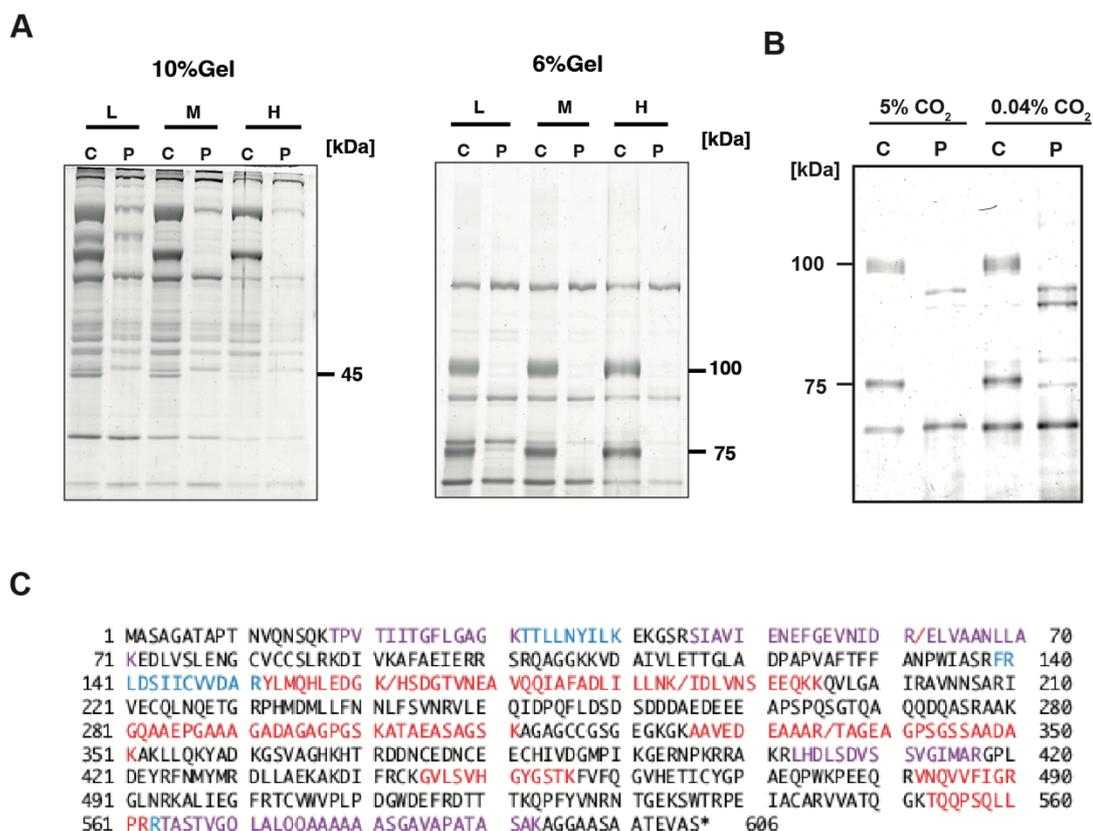


図 1-8 : CCM1-FLAG 複合体の展開と CCM1 結合タンパク質の検出

(A) 従属栄養条件で培養した CCM1-FLAG 発現株および親株から可溶性タンパク質を調製し、M2 FLAG Affinity Gel に吸着した。回収後、それぞれをイオン強度が異なる洗浄液 (L: 100 mM KCl, M: 500 mM KCl, H: 1.5 M KCl,) で洗浄した精製サンプルを 6%、または 10%ポリアクリルアミドゲルで展開し、Flamingo ゲルスチンで染色することでタンパク質を検出した。C: CCM1-FLAG 複合体を含むサンプルを展開したレーン P: 親株を同様に精製処理したサンプルを展開したレーン (B) 5%及び 0.04% CO₂ 通気条件で培養した CCM1-FLAG 発現株および親株から可溶性タンパク質を調製し、6% ポリアクリルアミドゲルで展開し、Flamingo ゲルスチンで染色することでタンパク質を検出した。(C) 質量分析結果と推定された CBP1 タンパク質のアミノ酸配列を示した。LC-MS/MS 解析は奈良先端大学院大学の藤原正幸及び岡山大学の高橋裕一郎によって行われた。赤字は岡山大学での解析、青字は奈良先端大学院大学での解析、紫字は両大学での解析で検出された配列を示した。(山原洋佑、未発表データ)。

CBP1 は N 末端側に GTPase 活性を持つと予測される CobW ドメインと C 末端側に機能未知の CobW_C ドメイン及びタンパク質間相互作用に関わる WW ドメインを保存している (図 1-9A)。また、特定の立体構造を取らない天然変性領域

(Intrinsically disordered regions: IDR) を 2 つ持つ。CBP1 が持つ CobW ドメインは ATPase もしくは GTPase 活性に必要な walker A 及び walker B モチーフと、GTP のグアニンを特異的に認識するモチーフを持つため、GTPase として機能すると予想された。

CobW ドメイン及び CobW_C ドメインを両方持つ Cluster of Orthologous Groups (COG) 0523 タンパク質は原核生物から植物、ヒトに至るまで広く保存されており、特定の金属イオンを他のタンパク質に輸送する金属シャペロンとして働くと考えられている (Haas et al., 2009)。特に *E.coli* がもつ COG0523 タンパク質である YjiA は X 線結晶構造解析により分子構造が明らかになっており、CobW ドメインにおいて亜鉛イオンと結合することから、亜鉛シャペロンとして働くと考えられている (Khil et al., 2006)。そこで、YjiA タンパク質を鋳型としたホモロジーモデリングにより、CBP1 の CobW ドメインにおける亜鉛イオンの結合を予測した、YjiA では 2 つのグルタミン酸と 1 つのシステイン残基が Zn^{2+} と結合することが知られているが (Khil et al., 2006)、CBP1 の CobW ドメインにおいても同様の Zn^{2+} 結合部位を持つことが予測された (図 1-9B)。COG0523 タンパク質に広く保存されている CobW_C ドメインの機能は不明だが、金属シャペロンの機能を補助する役割を持つと予測されている (Edmonds et al., 2021)。

また、CBP1 が持つ WW ドメインは相互作用するタンパク質のプロリンリッチな配列に結合することが予測されている (Macias et al., 1996)。特に核に局在する WW ドメイン含有タンパク質は、転写の共活性化や RNA ポリメラーゼ II 活性の調節に関与していると考えられている (Sudol et al., 2001)。また、CCM1 が WW ドメインとの相互作用に関わるプロリンリッチモチーフ (PPLPモチーフ) を持つことから (Bedford et al., 2000)、WW ドメインが CBP1 と CCM1 との結合に関わる可能性が考えられる。

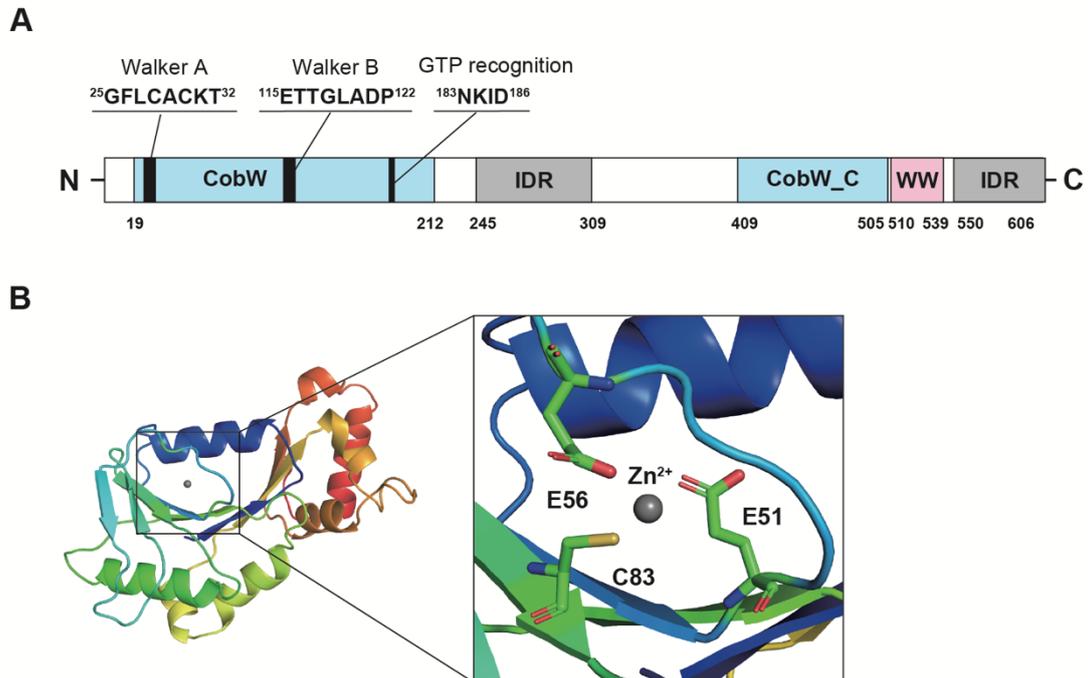


図 1-9 : CBP1 のドメイン構造

(A) CBP1 タンパク質の CobW ドメイン、CobW_C ドメイン、WW ドメイン及び天然変性領域 (IDR) をそれぞれ示す。CobW ドメインにおける、GTPase 活性に必要なアミノ酸モチーフを示す。数字はアミノ酸数を示す。(B) YjiA タンパク質を鋳型にした CBP1 の CobW ドメインの予測構造 (PDB エントリー 4IXM.2.b)。予測されるリガンド Zn²⁺ は灰色で示されている。2つのグルタミン酸 (E) と 1つのシステイン (C) 残基からなる Zn²⁺ 結合部位の予想を示す。

目的

本研究では、CCM の制御に関わる新規因子の同定を目的とした。第 1 章では CO₂ 要求性変異株を新たに単離することで、CCM の誘導に必要な新規因子の同定を目的とした。第 2 章では CCM の包括的制御因子である CCM1 と結合するタンパク質をコードする *cbp1* 変異株の解析から、CBP1 の CCM 制御における役割を明らかにすることを目的とした。

第1章：ピレノイド局在性因子の CCM 調節における役割

結果

CO₂ 要求性変異株の生育速度及び C_i 親和性

CCM が誘導されない変異株を得るために、ランダム挿入変異により CO₂ 欠乏条件下で生育速度が低下する CO₂ 要求性変異株の単離を行った。まず、野生株 C9 にハイグロマイシン耐性を付与する *aphVII* カセットを形質転換により導入し、約 72,000 株のランダム挿入変異株を得た。さらに変異株の CO₂ 欠乏条件における生育を、0.04% CO₂ を通気したチャンバー内でのスポットテストにより評価し、野生株と比較して生育速度が遅延した 149 株を、CO₂ 要求性変異株として選抜した (KO1~KO149)。変異株ライブラリーの作成及びスクリーニングは、当研究室の新川友貴及び Hu Donghui と共同で行った。その中でも、生育速度の大きな遅延がみられた KO-60 及び KO-62 を、更なる解析を行う株として選択した。

次に CO₂ 濃度条件と pH 条件を変化させることによる HCO₃⁻/CO₂ 比の変化に応じた変異株の生育を評価した。HC、LC 及び VLC 条件における生育を評価するために、5%、0.04% 及び 0.01 % CO₂ を通気したチャンバー内での生育速度を、スポットテストにより調べた (図 2-1)。また HCO₃⁻/CO₂ 比を変化させるために、pH 6.2 (HCO₃⁻/CO₂ = 0.71)、pH 7.0 (HCO₃⁻/CO₂ = 4.46)、pH 7.8 (HCO₃⁻/CO₂ = 28.18) および pH 9.0 (HCO₃⁻/CO₂ = 446.68) の寒天プレートを用いた。コントロールとして C9 及び既知の CO₂ 要求性変異株である *cas* 変異株 (H82) を用いた。CO₂ が過剰となる 5% CO₂ 通気条件では株間で生育速度に差は見られなかったことから、光合成による CO₂ 固定は正常に働くことが示された。一方で、0.04% CO₂ 通気条件で KO-60 と KO-62 株は pH 条件に関わらず生育速度の低下を示した。さらに 0.01 % CO₂ 通気条件では、H82 と同様に全ての pH で野生株と比較して大幅な生育遅延が見られたことから、*cas* 変異株と同様に CCM の誘導が損なわれた株や、CAH3 のような CCM に必須の因子に欠損を持つ株であることが示唆された。

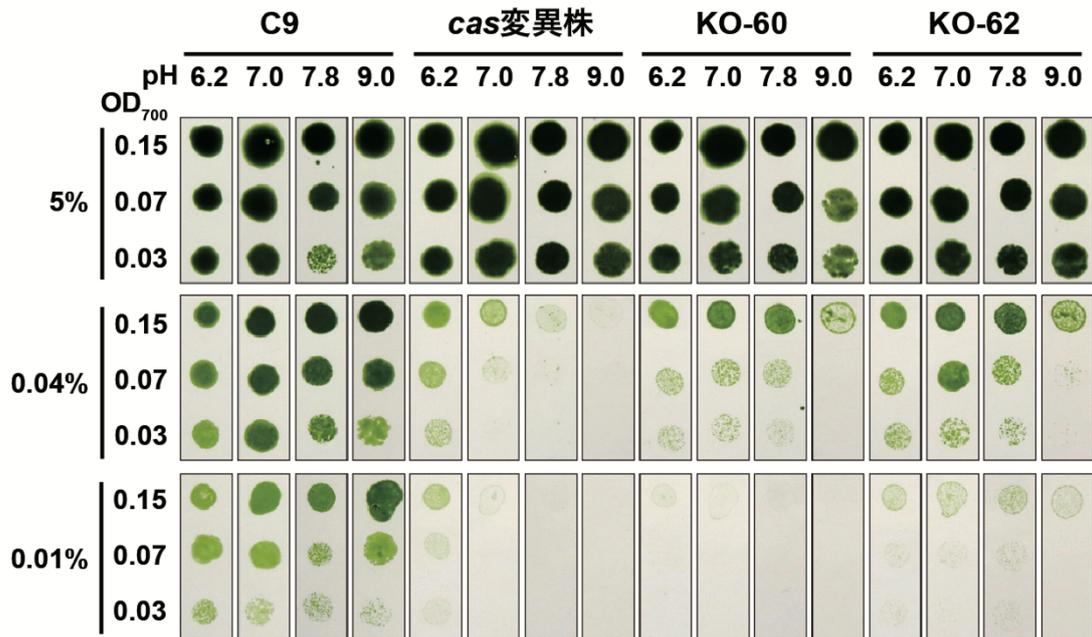


図 2-1 : CO₂ 要求性変異株の生育評価

野生株 C9、H82 (*cas* 変異株)、CO₂ 要求性株 KO-60 及び KO-62 の培養液を OD₇₀₀ = 0.15、0.07、0.03 に希釈し、3 μ L の細胞懸濁液を異なる pH 条件の寒天培地 (pH 6.2、7.0、7.8、9.0) にスポットした。細胞を 120 μ mol photons m⁻² s⁻¹ の連続白色光で 5% CO₂、0.04% CO₂、0.01% CO₂ を通気したチャンバー内で 4 日間の培養を行った。

次に変異株の C_i に対する光合成親和性を評価するために、異なる pH 条件における光合成の酸素発生速度を測定した。 C_i 親和性の指標として、最大酸素発生速度 (V_{max}) の半分の酸素発生速度に必要な C_i 濃度である $K_{0.5}$ (C_i) 値を算出し、 $P < 0.05$ の基準で株間の有意差検定を行った。 $K_{0.5}$ (C_i) 値の低下は、 C_i 親和性の上昇を示す。特に pH 9.0 で KO-60 ($554 \pm 130 \mu$ M) および KO-62 ($471 \pm 40 \mu$ M) では、C9 ($126 \pm 34 \mu$ M) と比較して、 $K_{0.5}$ (C_i) 値がそれぞれ 4.4 倍および 3.7 倍有意に上昇していた (図 2-2A)。pH 6.2、7.0、7.8 においても、KO-60 と KO-62 の $K_{0.5}$ (C_i) 値は C9 よりも 1.5 倍以上有意に上昇していた。一方、KO-60 と KO-62 の V_{max} は pH 9.0 では C9 の 47-61% にまで有意に減少しており、pH 6.2、7.0、7.8 においても、C9 の 69-84% となっていた (図 2-2B)。これらの結果から、KO-60 と KO-62 は共に HCO_3^-/CO_2 比に関わらず C_i 親和性と V_{max} が低下した。 C_i 親和性の低下から、CO₂ 要求性変異株では CCM の誘導が損なわれていることが改めて示唆された。一方で、 V_{max} 値も低下したことから、CO₂ 要求性変異株が Rubisco の蓄積量が

低下した株である可能性や、Rubisco の活性制御及びピレノイド形成に関わる因子に欠損を持つ株である可能性が示唆された。

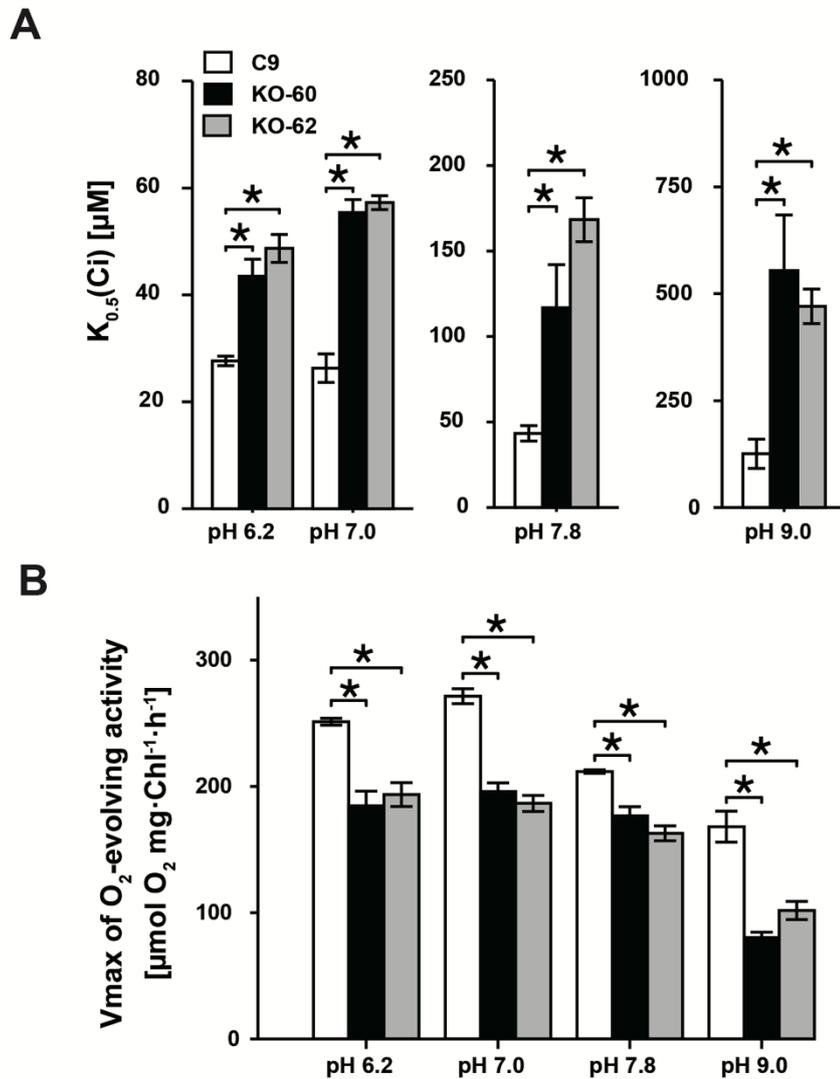


図 2-2 : CO₂ 要求性変異株の C_i 親和性及び最大酸素発生速度

0.04% CO₂ 通気条件 12 時間培養した C9、KO-60、KO-62 の pH 6.2、7.0、7.8 及び 9.0 条件における $K_{0.5}(C_i)$ 値 (A) と酸素発生最大速度 (V_{max}) (B) を示す。 $K_{0.5}(C_i)$ 値は、 V_{max} の半分の値の酸素発生速度を与える C_i 濃度を示す。独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差を示す。* : t 検定により P 値 < 0.05 を示す。

CO₂ 要求性変異株における CCM 関連タンパク質の蓄積

CO₂ 欠乏条件下における、CO₂ 要求性変異株の生育遅延及び Ci 親和性の低下は、CCM 関連タンパク質の減少が原因であると考え、CCM に関わる Ci 輸送体、CA 及び CCM 制御因子のタンパク質蓄積レベルを調べた。変異株を 5% CO₂ 及び 0.04% CO₂ 通気条件で培養し、Ci 輸送体 (HLA3、LCIA、LCI1)、CA (LCIB、CAH1、CAH3)、既知 CCM 制御因子 (CCM1、CAS) の蓄積レベルを調べた (図 2-3)。コントロールとして C9、*ccm1* 変異株 (*ccm1*^{ge-2})、H82 を用いた。

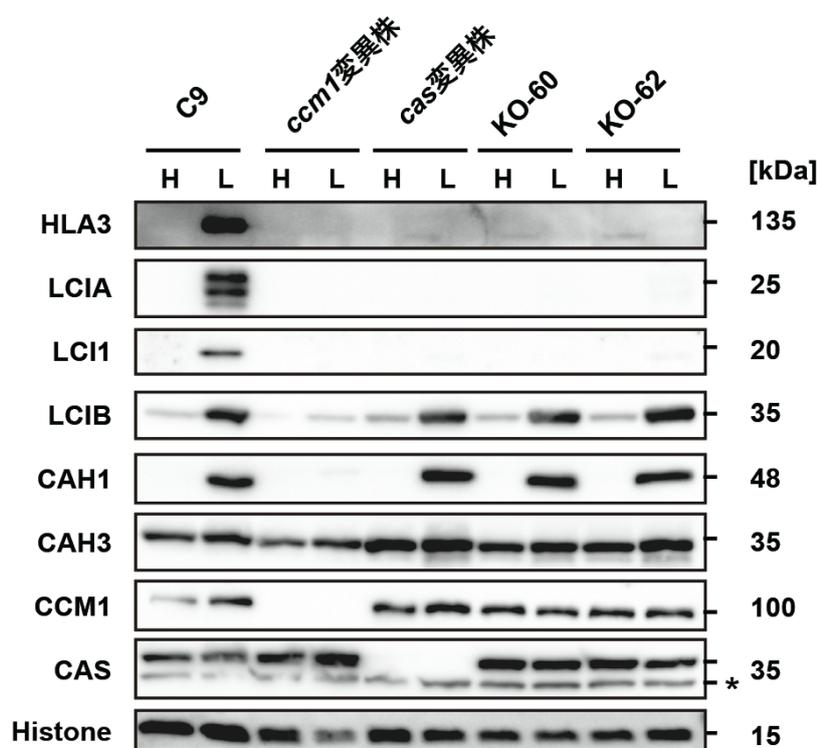


図 2-3 : CO₂ 要求性変異株における CCM 関連タンパク質の蓄積

C9、*ccm1*^{ge-2} (*ccm1* 変異株)、H82 (*cas* 変異株)、KO-60 及び KO-62 における CCM 関連タンパク質の蓄積。それぞれの細胞を 5% CO₂ 通気条件で 24 時間培養し、その後 5% (H) または 0.04% (L) CO₂ 通気条件で 12 時間培養した細胞からタンパク質を抽出した。ローディングコントロールとして Histone H3 抗体を使用した。アスタリスクは、非特異的なバンドを示す。

過去に単離された *ccm1* 変異株である C16 は、C9 と異なる 5D 株に由来するため (Fukuzawa et al., 1998)、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を用いて C9 の *CCM1* 遺伝子の第 2 エキソンに *aphVII* カセットを導入し、*ccm1* 変異株を作出した (図 2-4A)。遺伝子カセットの挿入が確認され、CCM1 タンパク質の蓄積が C16 と同程度

にまで減少した3株の中から(図2-4B,C)、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の3塩基上流に、遺伝子カセットの全長が欠失無く挿入された *ccm1*^{se-2} 株を解析に用いた(図2-4A)。

野生株 C9 では HLA3、LCIA、LCI1、LCIB、CAH1 の蓄積レベルが、5% CO₂ と比較して 0.04% CO₂ 通気条件で上昇した。*ccm1*^{se-2} 株では C9 と比較して、上記5つの低 CO₂ 誘導性タンパク質の蓄積が低下した。この表現型は親株の異なる *ccm1* 変異株である C16 と同様であった(Wang et al., 2014)。一方、KO-60 および KO-62 では、0.04% CO₂ 通気条件における HLA3、LCIA、LCI1 の蓄積レベルが、H82 と同程度にまで低下した。また、既知の CCM 制御因子である CCM1 及び CAS の蓄積レベルに、大きな変化は見られなかった。また、CO₂ 要求性変異株において、H82 と同様に Ci 輸送体の蓄積のみが減少したことから、CAS によるレトログレードシグナル制御に欠損を持つ株である可能性や、Ci 輸送体の発現を制御する新たな制御因子の変異株である可能性が示唆された。

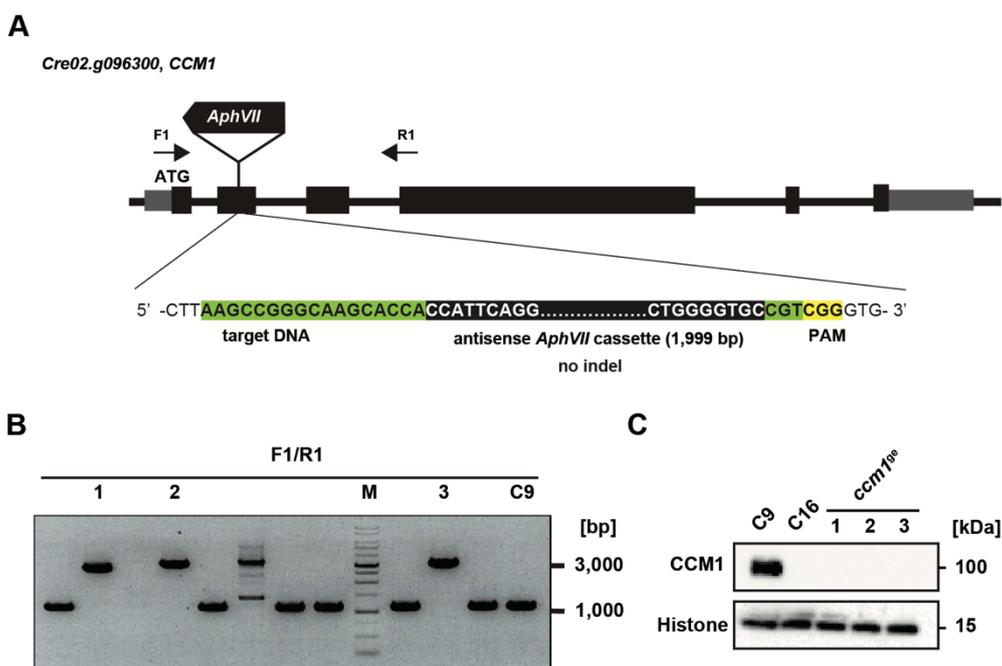


図2-4: CRISPR-Cas9 法による *ccm1* 変異株の作出

(A) CRISPR-Cas9 による *ccm1* 変異株作出のために設計したガイド RNA (gRNA) によって認識されるゲノム上の標的 DNA 配列 (target DNA) と、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列を示した。ゲノム PCR に用いたプライマーは矢印で示した。(B) *aphVII* カセットの挿入を確認するためのゲノム PCR。ネガティブコントロールとして C9 を用いた。CRISPR-Cas9 法による遺伝子破壊は山野隆志氏により行われた。(C) 挿入変異体における CCM1 タンパク質の蓄積レベル。C9 をポジティブコントロール、先行研究で用いられた CCM1 欠損変異体 C16 (Fukuzawa et al., 2001) をネガティブコントロールとして用いた。ローディングコントロールとして Histone H3 抗体を用いた。

次に KO-60 及び KO-62 における、*aphVII* カセットが挿入された周辺ゲノム領域を決定するために、Thermal asymmetric interlaced-PCR (TAIL-PCR) を行った。KO-60 と KO-62 では、*aphVII* カセットがピレノイドの形成に関わる *SAGA1* 遺伝子の 10 番目と 15 番目のイントロンに、それぞれ挿入されていた (図 2-5A,B)。先行研究において、CO₂ 欠乏条件下で培養した *saga1* 変異体 (*saga1*) は pH7.3 条件において生育遅延、K_{0.5} 値の増加、V_{max} 値の減少を示す (Itakura et al., 2019)。また、野生株が 1 細胞あたり 1 つ持つピレノイドが、*saga1* では複数個形成される (Itakura et al., 2019)。そこで、KO-60 と KO-62 において *SAGA1* の機能が損なわれていれば、ピレノイドの個数が増加していると考えた。蛍光タンパク質 Venus を融合させた Rubisco small subunit 1 (RBCS1-Venus) を C9、KO-60 及び KO-62 で発現させ、Venus 蛍光が見られた *RBCS1-Venus* /C9、*RBCS1-Venus* /KO-60、*RBCS1-Venus* /KO-62 を作出し、その蛍光像を観察した。*RBCS1-Venus* /C9 では葉緑体の基底部に単一の蛍光シグナルが観察されたが、*RBCS1-Venus* /KO-60 および *RBCS1-Venus* /KO-62 では、先行研究における結果と同様に複数の蛍光シグナルが観測され、葉緑体基底部に特に大きな蛍光が見られた (図 2-5C)。このことから、野生株では葉緑体基底部に位置する単一のピレノイドに凝集する Rubisco の一部が、*SAGA1* が欠損したことにより葉緑体中に分散したと考えられる。よって、KO-60 および KO-62 は *SAGA1* の機能欠損により、ピレノイドの個数が増加した株であることが示された。

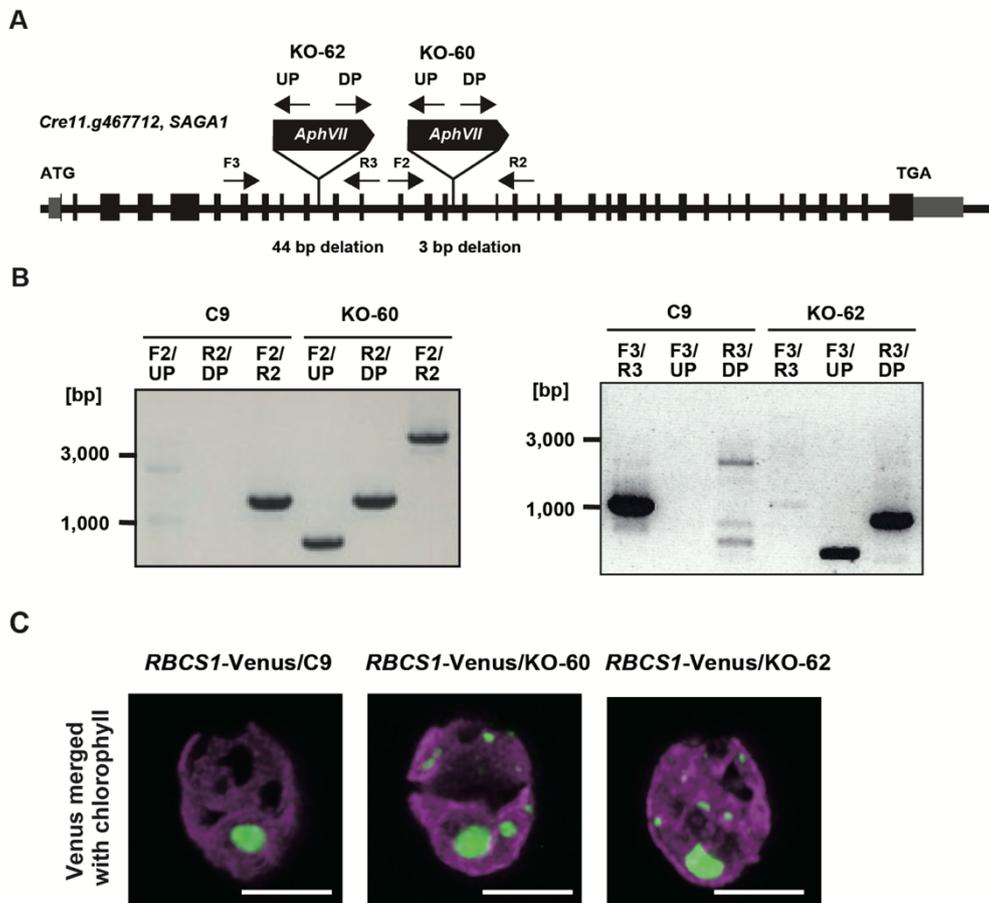


図 2-5 : CO₂ 要求性変異株の解析

(A) *SAGA1* 遺伝子及び CO₂ 要求性変異株 KO-60 及び KO-62 ゲノムにおける *aphVII* カセットの挿入位置。黒色の長方形はエキソン、黒線はイントロン、灰色の長方形は UTR を示す。矢印はゲノム PCR に用いたプライマーの位置を示す。(B) KO-60 および KO-62 における *aphVII* カセットの挿入を確認するためのゲノム PCR。(C) C9、KO-60 及び KO-62 に RBCS1-Venus 融合タンパク質を発現させた株を 0.04% CO₂ 通気条件で培養した細胞における蛍光像。緑は Venus 蛍光、マゼンタはクロロフィルの自家蛍光を示す。スケールバーは 5 μm を示す。

SAG1 が KO-60 及び KO-62 における HLA3、LCIA 及び LCI1 の蓄積減少の原因遺伝子であれば、Ci 輸送体の蓄積レベルが *sagal* では低下し、先行研究で用いられた相補株 (*SAG1-Venus/sagal*) では回復すると予測し、CCM 関連タンパク質の蓄積レベルを評価した。相補株は *sagal* に *SAG1-Venus* 融合タンパク質を発現させ、作出されたものである。KO-60 や KO-62 と同様に、*sagal* では親株である CC-5325 株と比較して、HLA3、LCIA 及び LCI1 の蓄積レベルが低下した (図 2-6)。さらに、*SAG1-Venus/sagal* ではこれらの Ci 輸送体の蓄積が回復した。よって、*SAG1* の破壊によるピレノイド形態の変化が、Ci 輸送体の蓄積低下に関与していることが示唆された。一方 CAH1 の蓄積レベルは CC-5325 に比べて *sagal* で減少し、*SAG1-Venus/sagal* では蓄積がわずかに回復した。KO-60 と KO-62 では CAH1 の蓄積量は減少していないことから、この表現型は *sagal* における *SAG1* 以外の遺伝子への変異や親株の違いによる影響により引き起こされたと考えられる。

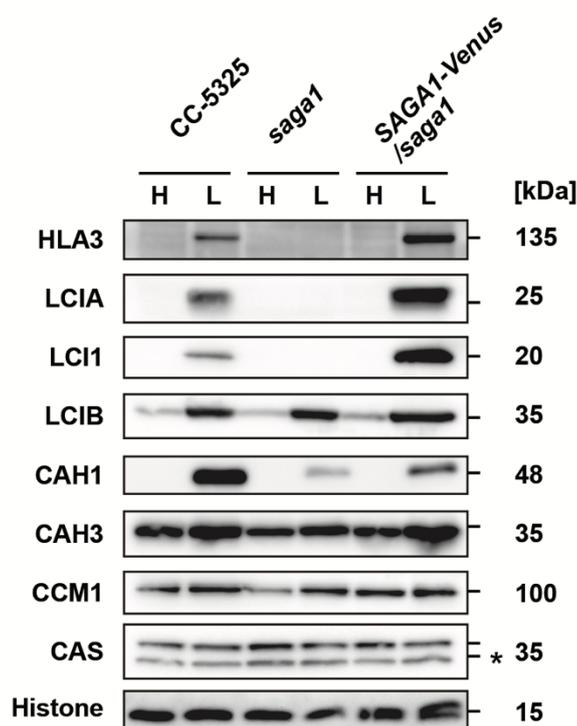


図 2-6 : CO₂ 要求性変異株における CCM 関連タンパク質の蓄積

CC-5325、*sagal* 及び *SAG1-Venus/sagal* における CCM 関連タンパク質の蓄積。それぞれの細胞を 5% CO₂ 通気条件で 24 時間培養し、その後 5% (H) または 0.04% (L) CO₂ 通気条件で 12 時間培養した細胞からタンパク質を抽出した。ローディングコントロールとして Histone H3 抗体を使用した。アスタリスクは、非特異的なバンドを示す。

saga1 変異株における CCM 関連遺伝子の発現

saga1 変異株で見られた C_i 親和性低下の、HLA3、LCIA 及び LCII の蓄積減少以外の原因を明らかにするために、SAGA1 変異により発現レベルが変動する遺伝子の探索を行った。C9、KO-60、CC-5325、*saga1*、および SAGA1-Venus/*saga1* を、5% CO_2 から 0.04% CO_2 通気条件に移行 2 時間後において、各遺伝子にマッピングされたリードカウントを RNA-seq 解析により算出した。その後、各サンプルにおけるリードカウントの Trimmed mean of M-values (TMM) 正規化を行い、C9 と KO-60、CC-5325 と *saga1* の発現レベルを比較すると、それぞれ 2,288、3,633 遺伝子の発現レベルが有意に低下しており (false discovery rate (FDR) < 0.01)、どちらの株においても低下した遺伝子の数は 1,344 個であった。重複する遺伝子が全体の 3 割未満と少ない原因として、親株である C9 と CC-5325 の形質の違いに起因する可能性が考えられる。また遺伝子タグの挿入位置が KO-60 及び *saga1* においてそれぞれ SAGA1 遺伝子の第 15 イントロン、第 26 イントロンであったため (Itakura et al., 2019)、挿入変異の差に起因する可能性も考えられる。さらに、KO-60 と *saga1* において発現レベルが低下した遺伝子のうち、532 個の遺伝子が SAGA1-Venus/*saga1* で回復した (図 2-7A)。次に、*saga1* 変異体で発現が上昇した遺伝子に着目し発現量を比較したところ、KO-60 と *saga1* で発現レベルが上昇した遺伝子のうち、570 個の遺伝子が SAGA1-Venus/*saga1* で減少していた (図 2-7B)。

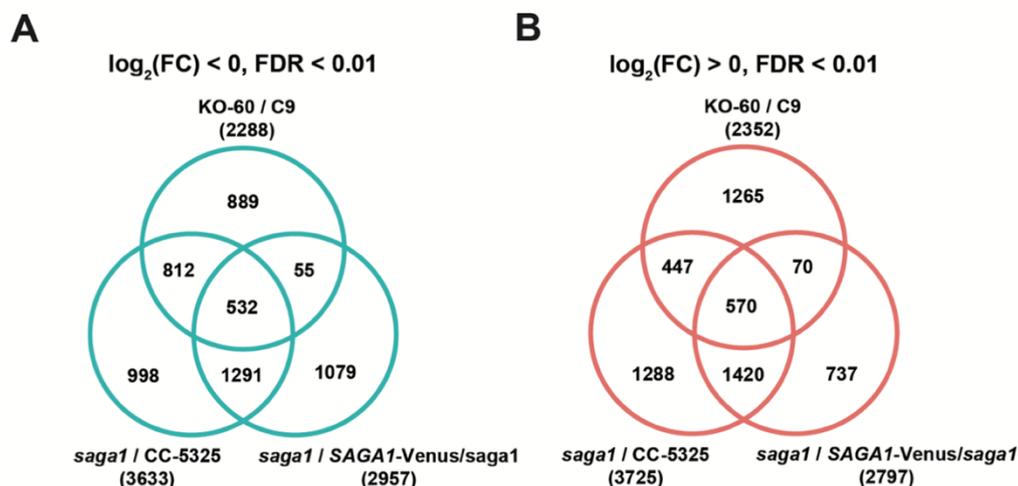


図 2-7 : KO-60 と *saga1* における発現変動遺伝子

RNA-seq 解析により 0.04% CO_2 通気条件で 2 時間培養した際に KO-60 及び *saga1* で発現量が上昇あるいは減少した遺伝子の数を示したベン図。2 系統間の発現量の比較には Trimmed mean of M values (TMM) 正規化法を用い、False Discovery Rate (FDR) < 0.01 の有意水準で遺伝子を選抜した。

sagal 変異株におけるピレノイド形態の変化が、CCM 関連遺伝子の発現に与える影響を調べるために、*SAGAI* 依存的に発現レベルが低下する 532 個の遺伝子と、CCM1 によって制御される 533 個の低 CO₂ 誘導性遺伝子を比較した (Fang et al., 2012)。その結果、31 個の CCM1 制御下遺伝子の発現レベルが *SAGAI* 依存的に低下していた (表 2-1)。特に、CAS によって制御されている 13 個の遺伝子のうち (Wang et al., 2016)、10 個の遺伝子 (*HLA3*、*LCIA*、*LHCSR3.1*、*LHCSR3.2*、*CAH4*、*CAH5*、*CCP1*、*CCP2*、*LCID*、*DNJ31*) の発現レベルが KO-60 と *sagal* で減少し、*SAGAI-Venus/sagal* で回復した (図 2-8)。特に C9 と比較して KO-60 において最も発現レベルが低下した *DNJ31* はシャペロンタンパク質をコードし、野生株では CO₂ 欠乏条件で発現が誘導される (Fang et al., 2012)。しかしながら、CCM における *DNJ31* の詳細な機能は未解明である。これらの結果から、*SAGAI* 変異によるピレノイドの形態変化が、CAS によって制御される遺伝子の発現に影響を与えることが示された。

また、CAS によって制御される遺伝子に加え、CCM1 が制御する *LCIE* と *DNJ15* の発現レベルも *SAGAI* 変異により 4 倍以上減少していた (表 2-1)。*LCIE* は *LCIB* のホモログであり、CA 活性を持つことが予測されている (Yamano et al., 2010)。また、*DNJ15* はシャペロンドメインを有しており、*LCIB* や *LCIC* と相互作用することから、*LCIB/LCIC* 複合体の機能調節に関わると考えられている (Mackinder et al., 2017)。また、CO₂ 欠乏条件に誘導後 12 時間後において、タンパク質の蓄積レベルが KO-60 及び *sagal* で低下した *LCI1* の遺伝子発現量は、*sagal* では CC-5325 と比較して低下し、*SAGAI-Venus/sagal* では回復していたが、KO-60 と C9 との間で有意な差は見られなかった。そのため、*SAGAI* 変異が CO₂ 欠乏条件に誘導後 2 時間後における、*LCI1* の発現に与える影響には、親株による差が存在することが考えられる。

一方で、*SAGAI* 依存的に発現量が増加する 570 遺伝子の中には、チラコイド膜の HCO₃⁻ 輸送体 *BST1* 及び *BST2*、デンプン鞘に局在するデンプン合成酵素 *STA2* 及び、ピレノイドに局在する機能未知の ABC 輸送体をコードする、4 個の CCM1 依存的性遺伝子が含まれていた (表 2-2)。このことから、*SAGAI* 遺伝子の変異が、ピレノイドに局在する CCM 関連遺伝子の発現に影響を与えることが示唆された。

表 2-1 : KO-60 と *saga1* で発現レベルが低下する CCM1 依存性遺伝子

遺伝子ID	遺伝子名	説明	KO-60 / C9		<i>saga1</i> / CC_5325		<i>saga1</i> / SAGA1-Venus/ <i>saga1</i>	
			logFC	FDR	logFC	FDR	logFC	FDR
Cre03.g204577	DNJ31	DnaJ-like protein	-4.0	4.4E-41	-2.9	2.3E-21	-1.4	1.2E-09
Cre07.g321800	—	—	-3.8	5.7E-54	-2.7	2.3E-26	-1.4	2.0E-06
Cre04.g223250	LCIE	Low-CO ₂ inducible protein E	-3.8	8.5E-77	-2.3	7.1E-15	-2.5	2.7E-22
Cre02.g097800	HLA3	Bicarbonate ABC transporter	-3.0	3.8E-63	-2.4	2.7E-39	-1.0	7.7E-19
Cre12.g555700	DNJ15	DnaJ-like protein	-2.7	1.3E-11	-5.6	1.5E-44	-3.1	2.4E-31
Cre08.g367500	LHCSR3.1	Stress-related chlorophyll a/b binding protein 2	-2.6	1.0E-54	-1.0	2.2E-13	-0.9	9.8E-25
Cre08.g367400	LHCSR3.2	Stress-related chlorophyll a/b binding protein 3	-2.2	1.3E-33	-0.8	6.4E-19	-0.4	2.2E-04
Cre09.g399252	—	—	-2.1	8.3E-38	-0.3	2.4E-04	-0.4	1.1E-06
Cre06.g281600	LCI23	Low-CO ₂ -inducible protein 23	-1.7	2.0E-28	-1.7	1.3E-34	-1.2	2.7E-25
Cre05.g234652	—	—	-1.7	2.6E-22	-1.2	1.8E-41	-0.8	1.1E-25
Cre02.g080800	—	—	-1.7	5.4E-20	-0.9	1.6E-08	-0.5	9.6E-04
Cre12.g547100	CGL2	putative methyltransferase	-1.5	2.9E-05	-1.4	9.4E-21	-0.6	1.0E-04
Cre13.g591550	SRR20	Scavenger receptor cysteine-rich protein	-1.5	6.6E-07	-1.5	1.6E-10	-1.3	5.0E-08
Cre05.g237800	CYG64	Adenylate/guanylate cyclase	-1.4	2.3E-15	-1.6	5.3E-33	-0.9	1.1E-10
Cre02.g095294	—	—	-1.4	3.1E-11	-1.2	6.5E-07	-0.7	9.2E-03
Cre05.g248450	CAH5	Mitochondrial carbonic anhydrase	-1.4	2.0E-09	-3.6	2.9E-108	-2.4	2.0E-84
Cre04.g223300	CCP1	Low-CO₂-inducible membrane protein	-1.3	5.9E-14	-2.8	1.5E-197	-1.6	3.0E-117
Cre04.g222750	CCP2	Low-CO₂-inducible membrane protein	-1.3	1.7E-17	-0.9	4.5E-12	-0.4	1.7E-03
Cre02.g096700	—	—	-1.3	1.2E-15	-0.8	2.1E-18	-0.5	2.6E-09
Cre05.g248400	CAH4	Mitochondrial carbonic anhydrase	-1.2	4.8E-08	-3.5	1.9E-139	-2.4	2.9E-125
Cre11.g467617	LCI19	Gamma hydroxybutyrate dehydrogenase	-1.2	8.7E-12	-1.6	2.7E-53	-1.0	5.1E-26
Cre06.g309000	LCIA	Inorganic carbon channel localized at chloroplast membrane	-1.2	1.1E-15	-1.7	1.1E-37	-1.4	2.7E-42
Cre04.g222800	LCID	Low-CO₂ inducible protein D	-1.1	7.9E-13	-2.0	6.7E-39	-0.4	3.3E-03
Cre17.g696850	—	—	-1.0	3.9E-10	-0.9	1.5E-20	-0.8	1.3E-35
Cre02.g105800	—	—	-0.9	3.5E-07	-0.4	1.7E-04	-0.8	9.9E-19
Cre04.g214000	—	—	-0.9	6.1E-07	-1.3	7.4E-42	-1.1	4.6E-29
Cre03.g189550	ZIP3	Zinc/iron transporter	-0.7	2.0E-04	-1.0	1.6E-21	-0.7	1.9E-12
Cre02.g145800	MDN3	NAD-dependent malate dehydrogenase	-0.7	1.5E-05	-0.7	3.2E-17	-0.6	2.4E-15
Cre12.g485600	—	—	-0.6	1.6E-04	-1.2	4.4E-37	-0.8	5.4E-40
Cre16.g682100	TDR1	Tropine dehydrogenase/reductase	-0.6	5.0E-04	-0.8	2.8E-15	-0.5	1.9E-09
Cre05.g241950	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein	-0.5	2.6E-03	-1.0	1.3E-30	-0.6	8.5E-32

CO₂ 欠乏条件に誘導後 2 時間後において、KO-60 と C9、*saga1* と CC-5325 および *SAGA1-Venus/saga1* の発現レベルを比較し、KO-60、*saga1* で発現が有意に減少した CCM1 依存性の遺伝子を示す (false discovery rate (FDR) < 0.01)。太文字は CAS 依存性遺伝子を示す。

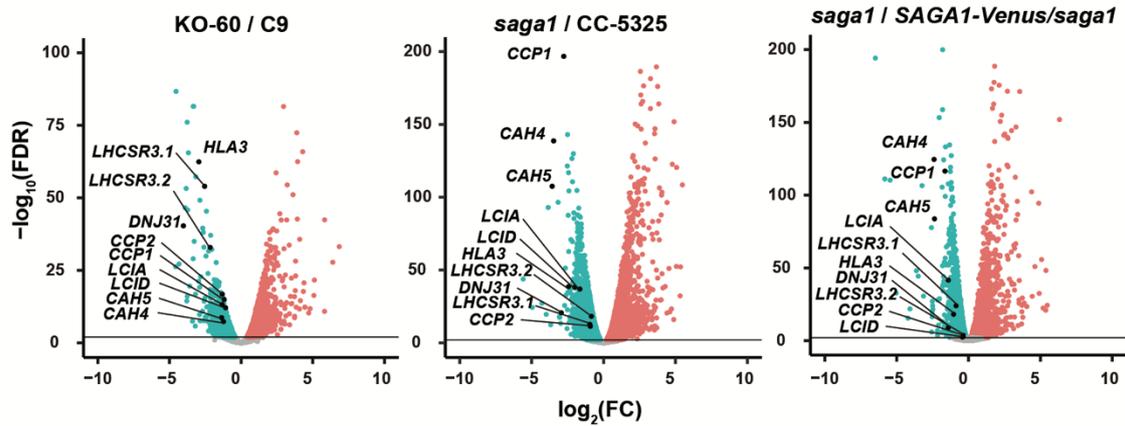


図 2-8 : KO-60 と *saga1* における発現変動遺伝子

KO-60 と C9、*saga1* と CC-5325 および *SAGA1-Venus/saga1* のトランスクリプトームを比較したボルケーノプロット。X 軸は $\log_2(\text{FC})$ 、Y 軸は $-\log_{10}(\text{FDR})$ をそれぞれ表す。青と赤の点は、 $\text{FDR} < 0.01$ の有意水準で KO-60 及び *saga1* で発現が減少及び上昇した遺伝子を表している。灰色の点は、トランスクリプトームに有意な差がないことを表す。

表 2-2 : KO-60 と *saga1* で発現レベルが上昇する CCM1 依存性遺伝子

遺伝子ID	遺伝子名	説明	KO-60 / C9		<i>saga1</i> / CC_5325		<i>saga1</i> / SAGA1-Venus/ <i>saga1</i>	
			logFC	FDR	logFC	FDR	logFC	FDR
Cre06.g271850	—	ATP-binding transport protein-related	1.46	3.12E-08	1.17	2.54E-32	1.01	3.06E-23
Cre16.g663400	<i>BST2</i>	Low-CO ₂ -inducible membrane protein	0.89	3.80E-08	0.55	1.73E-09	0.26	5.96E-06
Cre17.g721500	<i>STA2</i>	Granule-bound starch synthase I	0.76	3.12E-06	0.61	1.46E-13	0.37	6.12E-11
Cre16.g662600	<i>BST1</i>	Low-CO ₂ -inducible membrane protein	0.55	7.43E-03	0.87	3.88E-08	1.58	4.41E-18

CO₂ 欠乏条件に誘導後 2 時間後において、KO-60 と C9、*saga1* と CC-5325 および *SAGA1-Venus/saga1* の発現レベルを比較し、KO-60、*saga1* で発現が有意に上昇した CCM1 依存性の遺伝子を示す (false discovery rate (FDR) < 0.01)。

***sagal* 変異株における CCM 制御因子 CAS と低 CO₂ 誘導性因子 LCIB の細胞内局在**

sagal 変異株ではピレノイドの数の増加、ピレノイドチューブの減少、及びデンプン鞘の伸長といった、ピレノイドの形態変化が見られる (Itakura et al., 019)。また、CCM 制御に関わる CAS は、HC 条件では葉緑体全体に分散しているが、CO₂ 欠乏条件に移行し 2 時間にはピレノイドチューブ上に移動することから、CAS のピレノイドへの局在が CCM に関わる遺伝子の発現に重要であると考えられている

(Yamano et al., 2018)。そこで、*sagal* 変異株におけるピレノイド形態の変化が、CO₂ 欠乏条件における CAS のピレノイド内部への局在に影響を与えると考え、C9、KO-60、CC-5325、*sagal* 及び *SAGAI-Venus/sagal* を、5% CO₂ から 0.04% CO₂ 通気条件に移行した 2 時間における、CAS の局在を間接的免疫蛍光染色法により調べた。野生型では先行研究と同様に、ピレノイドチューブに蛍光シグナルが検出されたが、KO-60 及び *sagal* では葉緑体に蛍光シグナルが分散していた (図 2-9)。このことから、*sagal* 変異株のピレノイド形態変化が、CO₂ 欠乏条件における CAS のピレノイド内部への局在を阻害することが示唆された。

また、LCIB は CO₂ 濃度が 7 μM 未満の VLC 条件においてピレノイド周囲に局在し、デンプン鞘の間隙から流出した CO₂ を HCO₃⁻ に変換し、再利用する役割を持つと考えられている (Wang and Spalding, 2014; Yamano et al., 2022)。そこで、*sagal* 変異株におけるピレノイド形態の変化が、VLC 条件における LCIB のピレノイド周囲への局在に影響を与えると考え、C9、KO-60、CC-5325、*sagal* 及び *SAGAI-Venus/sagal* の、CO₂ 濃度が 7 μM 未満の条件における、LCIB の局在を間接的免疫蛍光染色法により調べた。0.04% CO₂ 通気 12 時間後において、C9、CC-5325、*SAGAI-Venus/sagal* では LCIB はピレノイド周囲に局在していたが、KO-60 と *sagal* では培地中の CO₂ 濃度が 7 μM 未満だったにも関わらず、LCIB が葉緑体中に分散した (図 2-10)。このことから、*sagal* 変異株のピレノイド形態変化が、CO₂ 欠乏条件における CAS のピレノイド内部への局在を阻害することが示唆された。

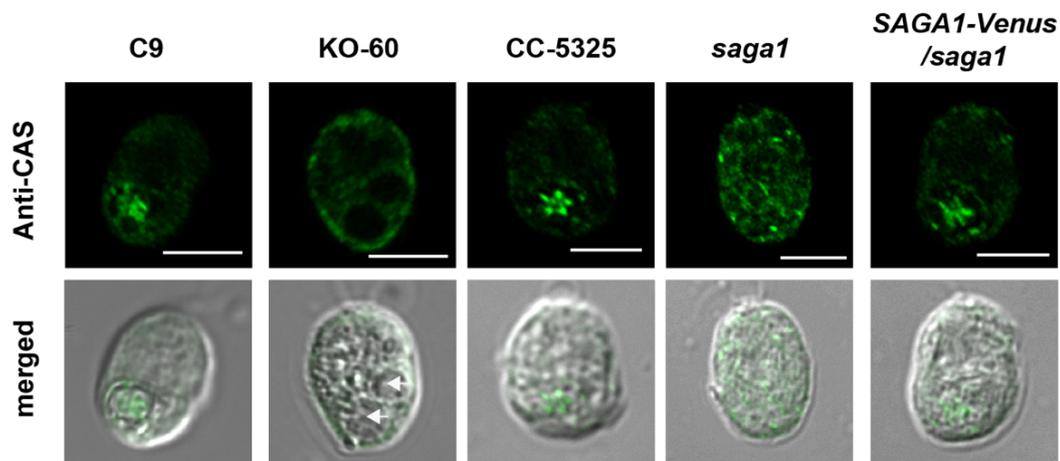


図 2-9 : KO-60 及び *saga1* における CAS の細胞内局在。

C9、KO-60、CC-5325、*saga1*、*SAGA1-Venus/saga1* における CAS の細胞内局在を、抗 CAS 抗体を用いた間接的免疫蛍光染色法によって評価した。細胞は 0.04% CO₂ 通気条件で 2 時間培養した。白矢印は KO-60 で見られた顆粒状の構造、スケールバーは 5 μm を示す。

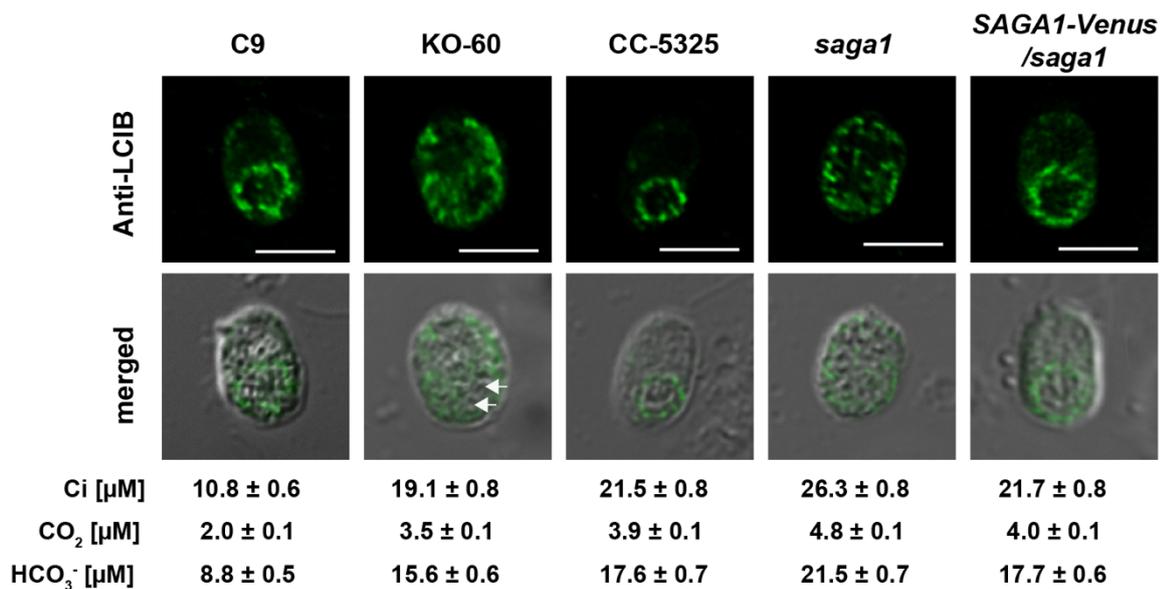


図 2-10 : KO-60 及び *saga1* における LCIB の細胞内局在。

C9、KO-60、CC-5325、*saga1*、*SAGA1-Venus/saga1* における LCIB の細胞内局在を、抗 LCIB 抗体を用いた間接的免疫蛍光染色法によって評価した。細胞は 0.04% CO₂ 通気条件で 12 時間培養した。また培養液中の Ci 濃度をガスクロマトグラフィーによって測定し、pH 7.0 における CO₂ 濃度を算出した。白矢印は KO-60 で見られた顆粒状の構造、スケールバーは 5 μm を示す。

ここで、KO-60 の葉緑体には間接的免疫蛍光染色による蛍光が観察されない、直径が 1-3 μm 程度の顆粒状の構造が観察された (図 2-9、2-10)。また、顆粒状の構造は変異体ライブラリーの親株として用いた C9 (C9-3) 細胞でも見られた (図 2-11)。C9-3 は、窒素欠乏時にクロロフィル分解速度が上昇するという性質を、長期の継代培養中の変異によって獲得した株と考えられている (Tsuji et al., 2022)。しかし、凍結保存から回収した直後の C9 (C9-1) 細胞には顆粒状の構造が見られないことから、顆粒状の構造は親株である C9-3 の特徴であることが示唆された。

KO-60 において、CAS 及び LCIB の由来の蛍光シグナルが、顆粒状の構造により不明瞭となった。しかし、顆粒状の構造を持たない *sagal* において CAS や LCIB 由来の蛍光シグナルが分散しており、*SAGAI-Venus/sagal* では親株である CC-5325 と同様の蛍光パターンを示したことから、*SAGAI* 変異によるピレノイドの形態変化が CAS や LCIB の局在変化に影響を与えることが示された。

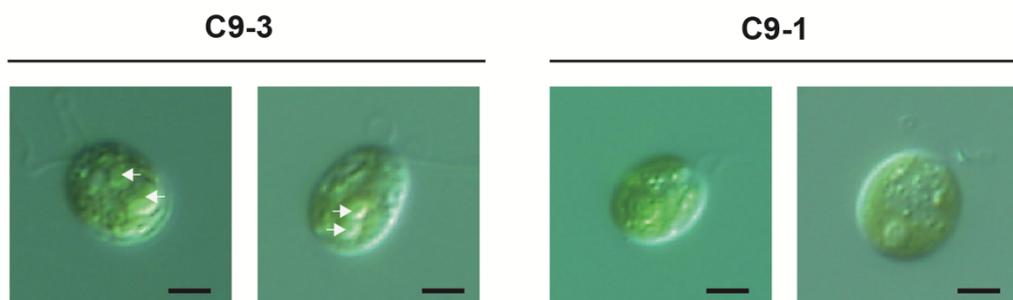


図 2-11 : C9-3 及び C9-1 の細胞形態

0.04% CO_2 通気条件で培養した C9-3 及び C9-1 の細胞写真。C9-3 は長期の形態培養中に形質が変化したと考えられる C9 系統、C9-1 は形質変化が発生する以前の C9 系統を示す。白矢印は C9-3 で見られた顆粒状の構造を示す。スケールバーは 5 μm を示す。

考察

saga1 変異株における C_i 親和性低下の要因

先行研究において、*saga1* 変異株は CO_2 要求性を示し、 C_i 親和性が低下する株として単離された (Itakura et al., 2019)。また、*saga1* 変異株ではピレノイド数の増加、デンプン鞘の伸長、ピレノイドチューブの減少といった、ピレノイド形態の変化が観察される。野生株と *saga1* 変異株との間で Rubisco タンパク質の蓄積レベルは変化しないが、野生株では葉緑体基底部のピレノイドに凝集されている Rubisco の一部が、*saga1* 変異株では葉緑体中に分散し (Itakura et al., 2019)、この表現型は KO-60 及び KO-62 でも再現した (図 2-5C)。葉緑体基底部のピレノイド内部に凝集した Rubisco が減少したことが、光合成の最大酸素発生速度が低下した一因であると考えられる。

本研究では、*saga1* 変異株において、HLA3、LCIA 及び LCII の蓄積減少、CCM 関連遺伝子の発現レベルの低下、及び LCIB や CAS の葉緑体中への分散といった、新たな 3 つの表現型が明らかとなった (図 2-12)。このことから、*saga1* 変異株で見られた C_i 親和性の低下が、3 つの変化による複合的な要因であると考えた。

まず KO-60、KO-62、及び *saga1* では、HLA3、LCIA、LCII といった C_i 輸送体の蓄積レベルが低下していた (図 2-3、2-6)。 HCO_3^- 輸送体である HLA3 及び LCIA 二重変異株では、特に pH 9.0 で C_i 親和性が低下し (Yamano et al., 2015)、 CO_2 輸送体である LCII 変異体では、pH 6.0 条件で C_i 親和性が低下する (Kono and Spalding, 2020)。よって、*saga1* 変異株で見られた C_i 輸送体の蓄積低下が、pH 6.2 及び 9.0 における C_i 親和性低下の一因となった可能性が考えられる。

また、*saga1* 変異株において発現が低下した CAS によって制御される遺伝子が、 C_i 親和性低下の一因となった可能性も考えられる。HLA3 及び LCIA を除く CAS によって制御される遺伝子の CCM における機能は未知であるが、 CO_2 欠乏条件で発現が誘導されるミトコンドリア局在型 CA である CAH4 及び CAH5 のノックダウン株は、 CO_2 欠乏条件における C_i 親和性が低下する (Rai et al., 2021)。このためミトコンドリア局在型 CA が、 CO_2 欠乏条件でミトコンドリアにおいて発生した CO_2 が HCO_3^- に変換され、LCIA によって細胞質から葉緑体内へ輸送される機能モデルが提唱されている (Santhanagopalan et al., 2021)。

さらに、VLC 条件において LCIB がピレノイド周囲ではなく葉緑体内に分散した表現型も *sagal* 変異株における C_i 親和性の低下の一因となった可能性がある。デンブン鞘はピレノイドから流出する CO_2 の拡散を制限する物理的な障壁として働き、LCIB はデンブン鞘の隙間から流出した CO_2 を HCO_3^- に変換し、再補足する機能を持つと考えられている (Toyokawa et al., 2020)。そのため、VLC 条件で LCIB が葉緑体中に分散している *sagal* 変異株では、野生型に比べてより多くの CO_2 がピレノイドから流出し、 C_i 親和性低下の一因となった可能性が考えられる。

SAGA1 の欠損が LCIB の局在制御に与える影響

sagal 変異株では、VLC 条件下において LCIB がピレノイド周囲ではなく、葉緑体中に分散していた (図 2-10)。一方野生株では、チラコイド膜が陥入するデンブン鞘の隙間近傍に、LCIB が局在する (Yamano et al., 2010)。LCIB が CO_2 条件の変化に応じて葉緑体からピレノイド周囲に局在を変化させる機構は明らかになっていないが、これまでの知見から少なくとも 2 つの可能性が考えられる。1 つめに、LCIB はチラコイド膜に局在する HCO_3^- チャネルである BST3 と相互作用することから (Mackinder et al., 2017)、BST3 を介した LCIB とチラコイド膜の相互作用が、LCIB の局在制御に関わる可能性が考えられる。2 つめに、 CO_2 欠乏条件において発達するデンブン鞘が、LCIB のピレノイド周囲の局在に必要なことから、未知のタンパク質を介した LCIB とデンブン鞘との間接的な相互作用が、局在制御に重要となる可能性も考えられる (Toyokawa et al., 2020)。

sagal 変異株ではピレノイドの個数が増加するが、ピレノイドチューブを持つピレノイドは 1 細胞に最大 1 個しか観察されない (Itakura et al., 2019)。また、野生株のピレノイドチューブでは複数のチラコイド膜がピレノイドを貫通する様子が観察されるが、*sagal* 変異株に残存したピレノイドチューブでは、チラコイド膜はピレノイドを貫通せず、チラコイド膜の個数も減少する。*sagal* 変異株における上記のようなピレノイドチューブの形態変化が、チラコイド膜と LCIB の間接的な相互作用を阻害している可能性が考えられる。

一方で、LCIB とデンブン鞘との間接的な相互作用を媒介するタンパク質の蓄積や機能が、*sagal* 変異株で欠失している可能性も考えられる。*sagal* 変異株において発

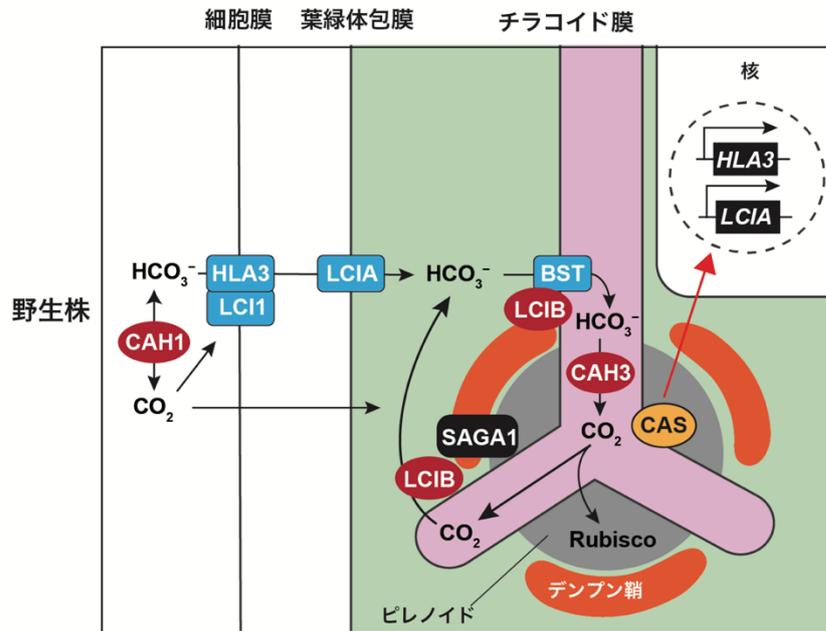
現が有意に減少した 532 個の遺伝子の中に、既知のデンブリン結合ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子は含まれていなかったが、この中に、LCIB とデンブリン結合タンパク質との結合に関わる因子が含まれる可能性が考えられる。

CAS の局在と遺伝子発現制御の関係

CAS は CO₂ 欠乏条件において、チラコイドチューブ上を通過してピレノイド内部に局在移動するが、*sagal* 変異株では CAS 由来の蛍光が葉緑体全体に分散しているため (図 2-9)、葉緑体チラコイド膜上に局在していると考えられる。*SAGA1* 変異株におけるピレノイドチューブはピレノイドを貫通せず、ピレノイドチューブの個数も減少するため (Itakura et al., 2019)、CAS のピレノイド内への移動が阻害されている可能性が考えられる。また局在観察により、*SAGA1* の一部がチラコイド膜と共局在することが示唆されており (Itakura et al., 2019)、*SAGA1* がチラコイド膜上を移動する CAS と直接相互作用し、CAS をピレノイド内部に呼び込む機能を持つ可能性も考えられる。

CAS は N 末端側に Ca²⁺ 結合部位、C 末端側にシグナル伝達に関わると予測される Rhodanase-like ドメインを持ち、どちらも葉緑体ストロマ側に露出している (Wang et al., 2016)。CAS と Ca²⁺ との結合は低親和性であるが (Han et al., 2003)、CO₂ 欠乏条件下において、ピレノイド内の Ca²⁺ 濃度が CAS 非依存的に上昇するため、CAS と Ca²⁺ との結合が、シグナル伝達に重要であると考えられている。CAS が葉緑体中に分散した *sagal* 変異株において、10 個の CAS 依存性遺伝子の発現レベルが減少したことから、CAS のピレノイド内部への移動が、CCM 制御に重要である可能性が改めて示唆された。一方で 3 つの CAS 依存性遺伝子 (*PPP30*, *Cre12.g541550*, *Cre26.g756747*) は *sagal* 変異株においても発現量が変動しなかったため、CAS のピレノイド局在が、全ての遺伝子発現制御に必須ではない可能性も考えられる。

A



B

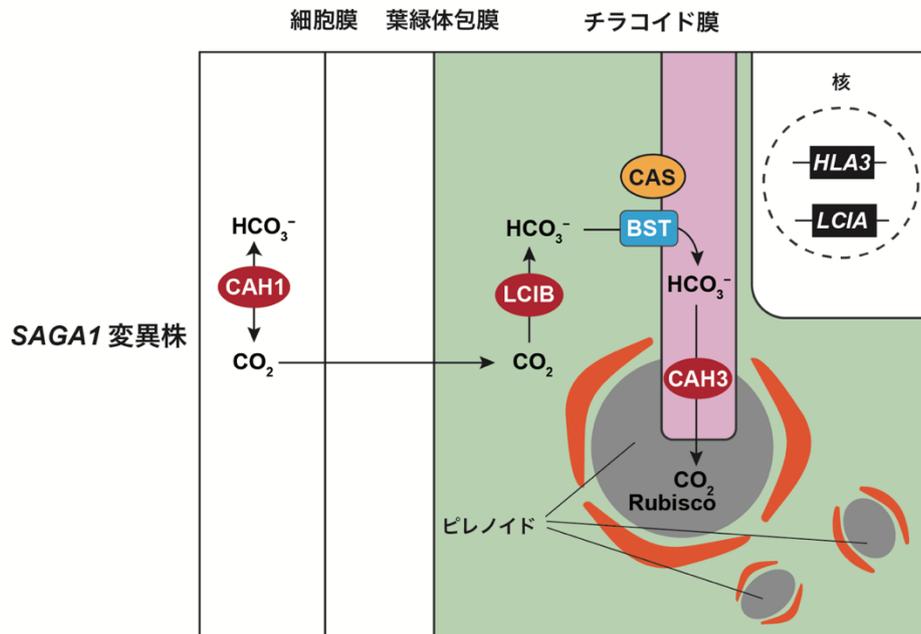


図 2-12：野生株と *saga1* 変異株における C_i 取り込み機構のモデル

(A) 野生型では、 C_i 輸送体と CA により無機炭素がピレノイドに濃縮される。チラコイド膜に局在する HCO_3^- 輸送体である BST が LCIB と相互作用する。HLA3 および LCIA の発現誘導に必要な、CAS から核へのレトログレードシグナルを赤矢印で示す。(B) *saga1* 変異株では、 C_i 輸送体の蓄積レベルが減少し、ピレノイドの個数が増加する。しかしピレノイドチューブを持つピレノイドは 1 細胞に 1 つ程度しか存在せず、ピレノイドチューブはピレノイドを貫通しない。

第2章：核局在性因子の CCM 調節における役割

結果

CBP1 と CCM1 の核内相互作用

CBP1 の CCM 制御における機能を明らかにするために、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子破壊技術により、野生株 C9 の *CBP1* 遺伝子の第7エクソン上に *aphVII* カセットが導入された株を当研究室の安田詢子が単離した (図 3-1A)。PAM 配列の3塩基下流に遺伝子カセットの全長が欠失無く挿入された *cbp1^{ge-2}* 株を、*cbp1* 変異株として解析に用いた (図 3-1A,B)。

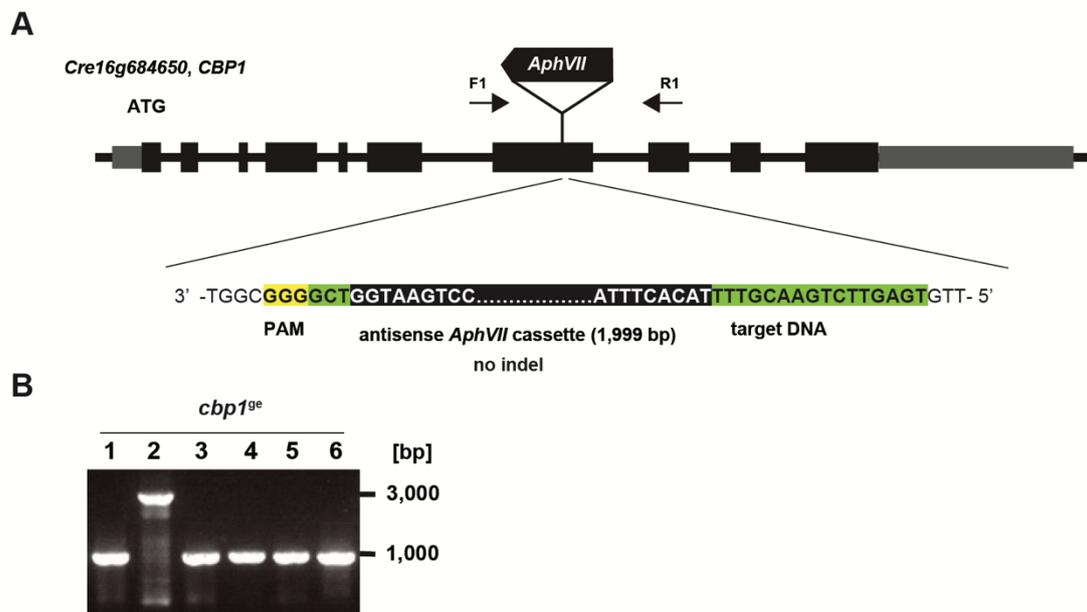


図 3-1 : CRISPR-Cas9 法による *cbp1* 変異株の作出

(A) CRISPR-Cas9 による *cbp1* 変異株作出のために設計したガイド RNA (gRNA) によって認識されるゲノム上の標的 DNA 配列 (target DNA) と、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列を示した。黒四角はエクソン、黒線はイントロン、灰四角は UTR を示した。ゲノム PCR に用いたプライマーは矢印で示した。(B) *aphVII* カセットの *CCM1* 遺伝子への挿入を確認するためのゲノム PCR。上の数字は形質転換により得られたハイグロマイシン耐性株の名称を示す。遺伝子破壊及びゲノム PCR は安田詢子によって行われた (安田詢子, unpublished data)。

CCM1 は核に局在するため (Wang et al., 2005)、CCM1 と結合する CBP1 も同様に核に局在すると予測し、CBP1 の細胞内局在を調べた。自身のプロモーターによって CBP1 の C 末端に Venus を融合させたタンパク質を発現する DNA 断片を *cbp1^{ge-2}* に導入し (図 3-2A)、融合タンパク質の蓄積が確認された CBP1-Venus 株を作出した (図 3-2B)。また CCM1 の細胞内局在と比較するために、CCM1 の C 末端に Venus を融合させた融合タンパク質を、*ccm1^{ge-2}* において発現させ、核に蛍光が見られた株を CCM1-Venus 株として用いた。5%及び 0.04% CO₂ 通気条件において、CCM1-Venus 株及び CBP1-Venus 株に、リング状の蛍光シグナルが観察され (図 3-2C)、過去にクラミドモナスで観察された核転写因子 Nuclear Transcription factor YB (NF-YB) と同様の局在パターンであった (Tokutsu et al., 2019)。このことから CBP1 が CCM1 と同様に、CO₂ 条件に関わらず核に局在することが示された。蛍光が観察されない中央の領域は核小体であると考えられる。

次に、CCM1 と CBP1 の核での相互作用を *in vivo* で評価するために、二分子蛍光補完 (bimolecular fluorescence complementation : BiFC) 解析を行った。CCM1 と CBP1 にそれぞれ EYFP の N 末端側 (nEYFP) 及び C 末端側 (cEYFP) を融合させた CCM1-nEYFP 及び CBP1-cEYFP タンパク質を、タバコ (*Nicotiana benthamiana*) 葉の表皮細胞で一過的に共発現させた。また、CCM1 は WW ドメインが認識するプロリンリッチモチーフを持つことから、CBP1 の WW ドメインが CCM1 との相互作用に関わると考え、WW ドメインを含む C 末端を欠失させた CBP1(1-508 aa)-cYFP と CCM1-nEYFP との相互作用も評価した (図 3-3A)。

CCM1-nEYFP と CBP1-cEYFP を共発現させた細胞では、核に再構成された YFP 蛍光シグナルが観察された (図 3-3B)。これらの結果から CCM1 と CBP1 が核内で相互作用していることが改めて示された。一方で CCM1-nEYFP と CBP1(1-508 aa)-cYFP を共発現させた細胞においても、核に蛍光シグナルが観察されたことから、WW ドメインが CCM1-CBP1 相互作用に関わらない可能性が示唆された。

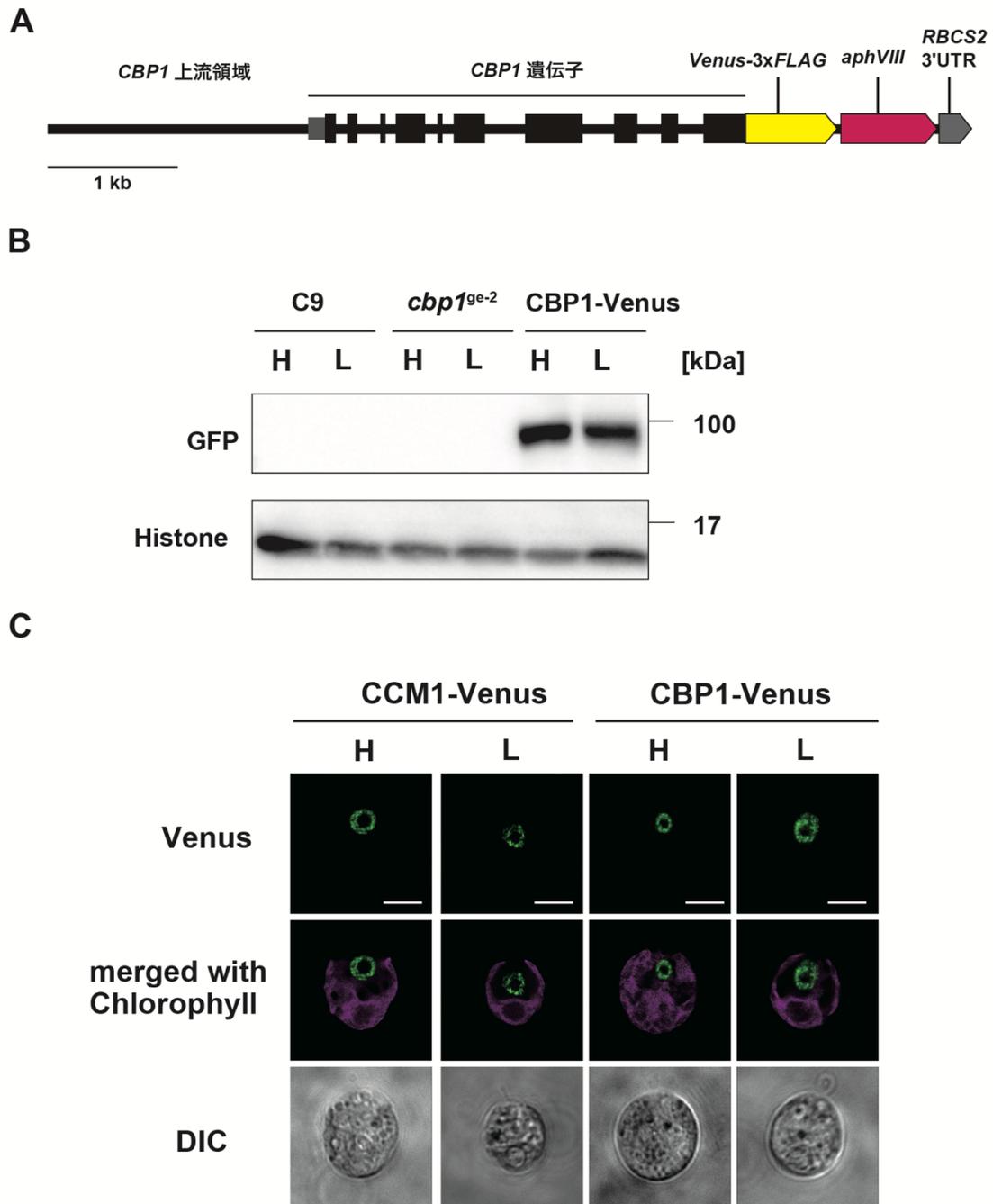


図 3-2 : CBP1-Venus 融合タンパク質を発現する DNA 断片及びクラミドモナスにおける CCM1-Venus と CBP1-Venus の細胞内局在

(A) CBP1-Venus 融合タンパク質をコードする遺伝子と、パロモイシン耐性を付与する *aphVIII* を発現させる DNA 断片を作成した。*CBP1* 遺伝子の黒四角はエクソン、黒線はイントロン、灰四角は 5'UTR を示す。(B) ウェスタンブロッティング解析による、CBP1-Venus 融合タンパク質の蓄積評価。コントロールとして C9 及び *cbp1^{ge-2}* を用いた。ローディングコントロールとして Histone H3 抗体を用いた。(C) CCM1-Venus 及び CBP1-Venus 株において蛍光観察を行った。細胞は 5% CO₂ (H) 及び 0.04% CO₂ (L) 通気条件で 12 時間培養した。スケールバーは 5 μm を示す。

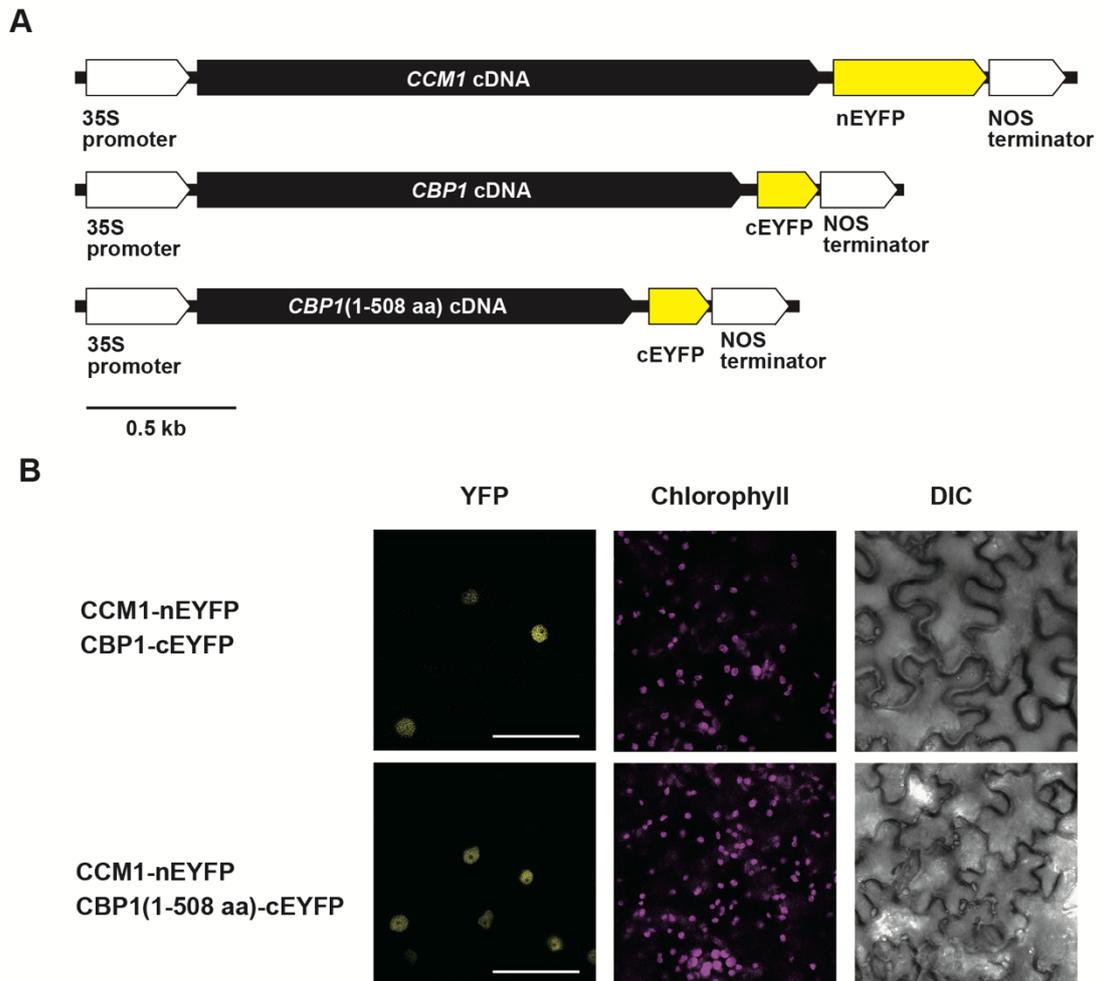


図 3-3：タバコ葉を用いた BiFC アッセイによる CCM1 及び CBP1 の相互作用解析

(A) CCM1-nYFP、CBP1-cYFP 及び CBP1(1-508 aa)-cYFP を発現させるコンストラクトの構造。(B) CCM1-nYFP、CBP1-cYFP 及び CBP1(1-508 aa)-cYFP を *Nicotiana benthamiana* の葉の細胞に一過的に共発現させ、蛍光観察を行った。スケールバーは 50 μm を示す。CCM1-nYFP、全長の CBP1-cYFP 発現用コンストラクトは安田詢子によって作成された (安田詢子, unpublished data)。

cbp1 変異株における C_i 親和性

CBP1 が CO_2 条件に関わらず CCM1 と相互作用することから、CBP1 が CO_2 欠乏条件における CCM の誘導や、HC 条件における CCM の抑制に関わる可能性が考えられるため、5% CO_2 及び 0.04% CO_2 通気条件で培養した *cbp1* 変異株細胞の C_i 親和性を評価した (図 3-4、表 3-1)。5% CO_2 通気条件では、 V_{max} 値では野生株と *cbp1* 変異株との間に有意な差はなかったが、 $K_{0.5}$ 値では、野生株が $381 \pm 26 \mu\text{M}$ を示した一方で、*cbp1^{gc-2}* では $248 \pm 27 \mu\text{M}$ に低下した ($P < 0.05$)。また *cbp1* 変異株に、オ

ウンプロモーターを含む *CBP1* 遺伝子を増幅した PCR 断片を導入し、作出した *CBP1* 相補株では、 $K_{0.5}$ 値が $475 \pm 40 \mu\text{M}$ を示し、*cbp1^{ge-2}* と比較して上昇した。よって、*cbp1* 変異株では HC 条件における C_i 親和性が上昇することが示された。一方で、0.04% CO_2 通気条件では、野生株、*cbp1^{ge-2}* 及び *CBP1* 相補株の間で、 V_{max} 値及び $K_{0.5}$ 値に有意な差は見られなかった。以上の結果から、*CBP1* が CO_2 欠乏条件における CCM の誘導ではなく、HC 条件における CCM の抑制に関わることが示唆された。

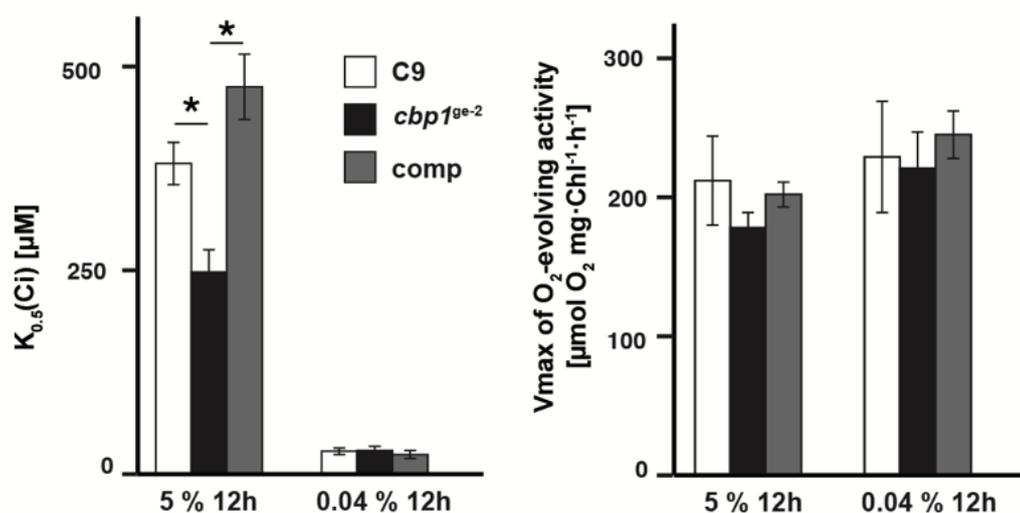


図 3-4 : *cbp1* 変異株における C_i 親和性

5%及び0.04% CO_2 通気条件で12時間培養した C9、*cbp1^{ge-2}* 及び *CBP1* 相補株 (comp) における $K_{0.5}$ (C_i) 値と V_{max} 値を示す。それぞれの値は独立した3回の実験の平均値と標準偏差を示す。* : t 検定により P 値 < 0.05 を示す。

表 3-1 : *cbp1* 変異株、*ccm1* 変異株、相補株及び
CBP1-Venus 発現株における最大酸素発生速度と C_i 親和性

生育条件	株名	V_{max} [$\mu\text{mol O}_2 \text{ mg} \cdot \text{Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	$K_{0.5}(C_i)$ [μM]
5% CO_2 12h	C9	212 \pm 32	381 \pm 26
	<i>cbp1</i> ^{ge-2}	178 \pm 11	248 \pm 27
	CBP1 相補株	202 \pm 9	475 \pm 40
	CBP1-Venus	167 \pm 13	825 \pm 58
0.04% CO_2 12h	C9	229 \pm 40	28 \pm 4
	<i>cbp1</i> ^{ge-2}	221 \pm 26	29 \pm 5
	CBP1 相補株	245 \pm 17	24 \pm 5
	CBP1-Venus	214 \pm 3	42 \pm 17
	<i>ccm1</i> ^{ge-2}	224 \pm 52	254 \pm 111
	CCMI 相補株	217 \pm 10	22 \pm 4

5% CO_2 通気条件で 12 時間培養した C9、*cbp1*^{ge-2}、CBP1 相補株、CBP1-Venus 及び、0.04% CO_2 通気条件で 12 時間培養した C9、*cbp1*^{ge-2}、CBP1 相補株、CBP1-Venus、*ccm1*^{ge-2}、CCMI 相補株における $K_{0.5}(C_i)$ 値と V_{max} 値を示す。なお *cbp1*^{ge-2}、*ccm1*^{ge-2} 及び CBP1 相補株における酸素発生速度測定及び $K_{0.5}(C_i)$ 値の算出は、安田詢子と共同で行った（安田詢子, unpublished data）。

cbp1 変異株における CCM 関連タンパク質の蓄積

HC 条件において *cbp1* 変異株の C_i 親和性が上昇したことから、*cbp1* 変異株では CCM が HC 条件で部分的に誘導されていると考え、CCM 関連タンパク質の蓄積を調べた。HC 条件下で生育した *cbp1* 変異株では、CA と予測される LCIB の蓄積が野生株と比較してわずかに増加し、相補株では減少していた（図 3-5）。このことから CBP1 が HC 条件における LCIB の蓄積を抑制することが示唆された。また、HC 条件における *cbp1* 変異株での LCIB 局在パターンは野生型と変化しないため、CBP1 が LCIB の局在制御には関わらないことが示唆された（図 3-6）。一方で、 CO_2 欠乏条件下で生育した *cbp1* 変異株では、 C_i 輸送体である HLA3 や LC11 の蓄積がわずかに減少したが、相補株では回復しなかった。このことから、HLA3 及び LC11 の蓄積レベルの変化は CBP1 変異によるものではなく、CBP1 は CO_2 欠乏条件下における CCM の誘導には関わらないことが示唆された。

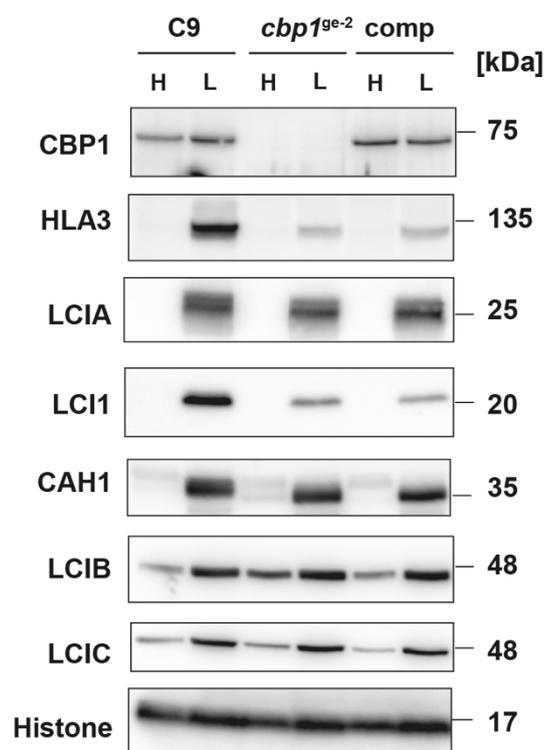


図 3-5 : *cbp1* 変異株における CCM 関連タンパク質の蓄積

C9、*cbp1^{ge-2}* 及び CBP1 相補株 (comp) における CCM 関連タンパク質の蓄積を示す。それぞれの細胞を 5% CO₂ 通気条件で 24 時間培養した後 5% (H) または 0.04% (L) CO₂ 通気条件で 12 時間培養した細胞からタンパク質を抽出した。ローディングコントロールとして Histone H3 抗体を用いた。CBP1 抗体、CAH1 抗体、LCIB 抗体及び LCIC 抗体を用いたウェスタンブロッティングは、安田詢子によって行われた (安田詢子, unpublished data)。

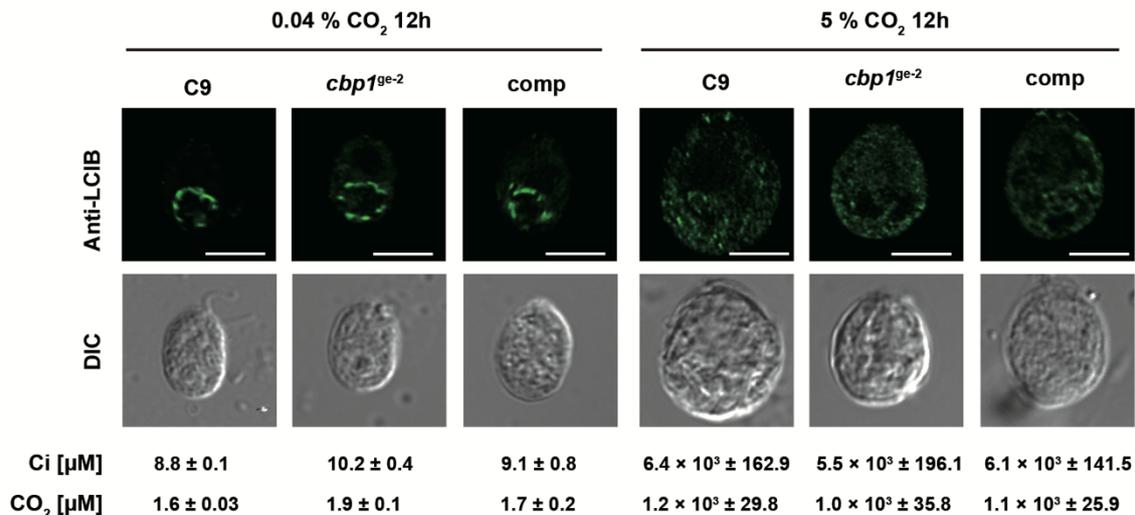


図 3-6 : *cbp1* 変異株における LCIB の細胞内局在。

C9、*cbp1*^{ge-2} 及び *CBP1* 相補株 (comp) における LCIB の細胞内局在を、抗 LCIB 抗体を用いた間接的免疫蛍光染色法によって評価した。細胞は 5% CO₂ もしくは 0.04% CO₂ 通気条件で 12 時間培養した。また培養液中中の Ci 濃度をガスクロマトグラフィーによって測定し、pH 7.0 における CO₂ 濃度を算出した。スケールバーは 5 μm を示す。

cbp1 変異株における CCM 関連遺伝子の発現

これまでの結果から *CBP1* が CCM の誘導ではなく HC 条件における CCM の抑制において働くことが示唆された。HC 条件及び CCM 誘導時において *CBP1* の欠損が遺伝子発現に与える影響を調べるために、C9、*cbp1*^{ge-2} 及び *CBP1* 相補株をにおける遺伝子発現量を定量化し比較した。また、*CBP1* 依存性遺伝子と *CCM1* 依存性遺伝子との比較を行うために、C9 由来の *ccm1* 変異株 *ccm1*^{ge-2} 及び新たに作出した *CCM1* 相補株における遺伝子発現も、同様の培養条件で定量化した。*ccm1*^{ge-2} に *CCM1* のゲノム領域を導入し、CO₂ 欠乏条件における K_{0.5} 値が C9 と同程度の 22 ± 4 μM を示した株を *CCM1* 相補株として用いた (表 3-1)。

C9、*ccm1*^{ge-2}、*CCM1* 相補株、*cbp1*^{ge-2}、*CBP1* 相補株の 5 株を、5% CO₂ 通気条件で 24 時間培養した細胞、その後 0.04% CO₂ 通気条件で 0.3 及び 2 時間培養した細胞から RNA を抽出し (図 3-7A)、RNA-seq 解析により各遺伝子にマッピングされたリードカウントを算出した。その後、各サンプルにおけるリードカウントの TMM 正規化を行い、FDR < 0.05, |log₂ fold change (FC)| > 1 の基準で有意に変動した遺伝子を、DEGs (Differentially Expressed Genes) として選抜した。C9 において、5% から 0.04% CO₂ 通気条件移行後に有意に発現量が上昇した 328 個の DEGs を低 CO₂ 誘導

性遺伝子と定義した (図 3-7B)。また 3 つの培養条件で、C9 と比較して *cbpI*^{ge-2} において発現量が有意に上昇あるいは減少した遺伝子の中で、相補株で発現量が C9 と同程度に回復した 248 個の DEGs を *CBP1* 依存性遺伝子と定義した。同様の基準で 3,974 個の *CCM1* 依存性遺伝子も定義した。低 CO₂ 誘導性かつ *CCM1* 依存性遺伝子は 232 個存在し、その中には Ci 輸送体 (*HLA3*, *LCIA*, *LCII*, *BST1-3*) や CA 及び CA と予測されるタンパク質 (*CAH1*, *LCIB*, *LCIC*) などをコードする既知の *CCM* 関連遺伝子が含まれていた。その中で、低 CO₂ 誘導性、*CCM1* 依存性かつ *CBP1* 依存性な遺伝子が 21 個存在した。

次に C9、*ccmI*^{ge-2} 及び *cbpI*^{ge-2} における、低 CO₂ 誘導性遺伝子の発現パターンの特徴を可視化するために、主成分分析を行った (図 3-7C)。*ccmI*^{ge-2} では、CO₂ 通気条件が変化しても、低 CO₂ 誘導性遺伝子の多くが誘導されていないことが示された。一方で、*cbpI*^{ge-2} では 5% CO₂ 通気条件において、低 CO₂ 誘導性遺伝子の一部が誘導されていることが示唆された。そこで、低 CO₂ 誘導性、*CCM1* 依存性かつ *CBP1* 依存性な 21 個の遺伝子の中で、*CBP1* 変異の影響により、発現量が有意に変動する遺伝子群に着目したところ、*cbpI* 変異株で HC 条件における発現量が野生株と相補株に比べて上昇する 13 個の遺伝子を見出した (表 3-2)。その中には、既知 *CCM* 関連遺伝子 *BST1*, *LCRI*, *LCIA*, *CAH1*, *LCII*, *LCIB* 及び *BST* が含まれていた (図 3-7D)。また、*cbpI* 変異株で 0.04% CO₂ 通気条件において、野生株と相補株に比べて発現量が変動する遺伝子に着目すると、誘導後 0.3 時間後及び 2 時間後において、8 個及び 1 個の遺伝子の発現レベルが有意に変動していたが (表 3-3, 表 3-4)、その中には既知の *CCM* 関連遺伝子は含まれていなかった。そのため、*CBP1* が LC 条件では *CCM* 関連遺伝子の制御には関与しておらず、HC 条件において複数の *CCM* 関連遺伝子の発現を抑制する機能を持つことが示唆された。

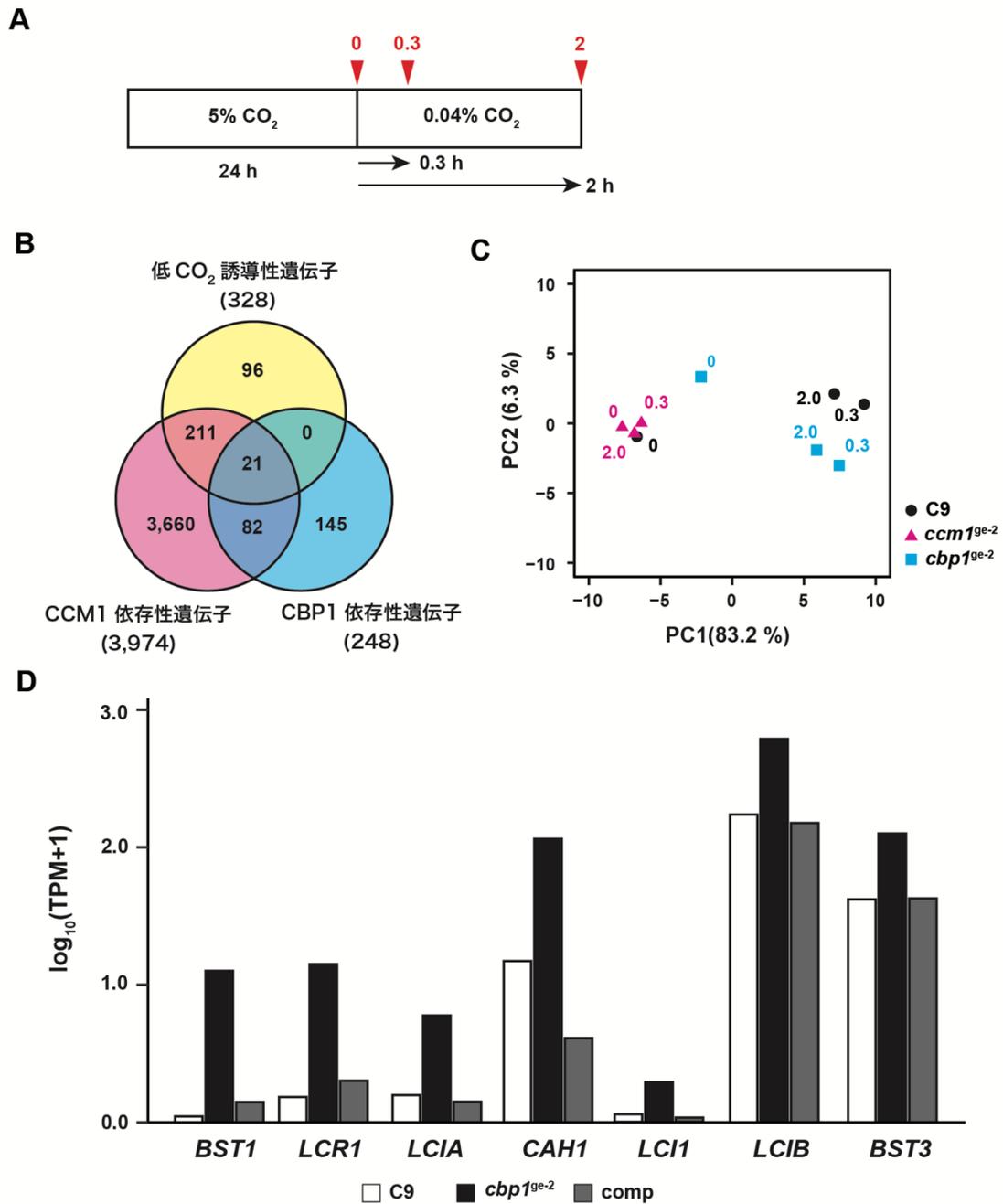


図 3-7 : *cbp1* 変異株における発現変動遺伝子

(A) RNA-seq に用いた細胞の培養条件を示す。赤矢印は細胞を回収した条件を示す。5% CO₂ 通気条件で 24 時間培養した細胞 (0) を 0.04% CO₂ 通気条件に移し、0.3 時間後 (0.3) 及び 2 時間後 (2) の細胞から RNA を抽出した。(B) FDR < 0.05, |log₂ FC| > 1 の基準で発現量が有意に変動した低 CO₂ 誘導性遺伝子、CCM1、CBP1 依存性遺伝子の数をベン図で示した。(C) C9、*ccm1^{ge-2}* 及び *cbp1^{ge-2}* における低 CO₂ 誘導性遺伝子の発現パターンを PCA プロットにより可視化した。(D) 5% CO₂ 通気条件において CBP1 依存的に FDR < 0.05, |log₂ FC| > 1 の基準で発現量が有意に変動した既知の CCM 関連遺伝子の発現レベルを示す。

表 3-2 : CCM1 依存性かつ低 CO₂ 誘導性の遺伝子の中で 5% CO₂ 通気条件
 において CBP1 依存的に発現レベルが変動した遺伝子

遺伝子ID	遺伝子名	説明	<i>cbp1</i> ^{9e-2} /C9		<i>cbp1</i> ^{9e-2} /CBP1 相補株	
			logFC	FDR	logFC	FDR
<i>Cre16.g662600</i>	<i>BST1</i>	Low-CO ₂ -inducible membrane protein	6.4	6.3E-12	5.0	2.3E-08
<i>Cre09.g399552</i>	<i>LCR1</i>	Low-CO ₂ response regulator, Myb-like transcription factor	4.2	3.2E-12	3.8	7.2E-10
<i>Cre01.g053950</i>	<i>MOX1</i>	Monooxygenase	3.7	3.9E-12	2.1	3.8E-04
<i>Cre03.g212977</i>	<i>TAZ3</i>	TAZ zinc finger	3.6	4.6E-12	1.8	3.0E-03
<i>Cre06.g309000</i>	<i>LCIA</i>	Inorganic carbon channel localized at chloroplast membrane	2.7	2.8E-04	3.7	1.1E-05
<i>Cre04.g223100</i>	<i>CAH1</i>	Carbonic anhydrase	2.6	3.3E-08	5.3	8.4E-24
<i>Cre07.g339000</i>	<i>RbcX2B</i>	Chaperonin-like RBCX Protein	2.5	3.8E-10	1.3	6.6E-03
<i>Cre03.g162800</i>	<i>LCI1</i>	Low-CO ₂ -inducible membrane protein	2.4	3.8E-02	3.7	1.1E-02
<i>Cre09.g394473</i>	<i>LCI9</i>	Low-CO ₂ -inducible protein	1.6	8.4E-06	1.9	3.9E-06
<i>Cre16.g685050</i>	<i>LCI15</i>	PRLI-interacting factor L	1.6	2.1E-06	2.0	1.0E-08
<i>Cre10.g452800</i>	<i>LCIB</i>	Low-CO ₂ -inducible protein B	1.4	1.4E-04	2.2	2.6E-08
<i>Cre03.g151650</i>	<i>SMM7</i>	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	1.4	2.3E-03	1.8	3.9E-04
<i>Cre16.g663450</i>	<i>BST3</i>	Low-CO ₂ -inducible membrane protein	1.2	1.6E-02	1.7	1.9E-03

5% CO₂ 通気条件において、C9 及び *CBP1* 相補株と比較して、*cbp1*^{9e-2} で発現レベルが有意に上昇した *CCM1* 依存性かつ低 CO₂ 誘導性遺伝子を示す (|logFC| > 1, false discovery rate (FDR) < 0.05)。

**表 3-3 : CCM1 依存性かつ低 CO₂ 誘導性の遺伝子の中で 0.04% CO₂ 通気条件
移行 0.3 時間後において CBP1 依存的に発現レベルが変動した遺伝子**

遺伝子ID	遺伝子名	説明	<i>cbp1^{9e-2}/C9</i>		<i>cbp1^{9e-2}/CBP1</i> 相補株	
			logFC	FDR	logFC	FDR
<i>Cre12.g555700</i>	<i>DNJ15</i>	DnaJ-like protein	2.7	6.6.E-04	3.0	1.4.E-03
<i>Cre04.g223250</i>	<i>LCIE</i>	Low-CO ₂ inducible protein E	2.4	2.0.E-04	2.7	2.2.E-04
<i>Cre03.g204577</i>	<i>DNJ31</i>	DnaJ-like protein	2.3	9.7.E-03	2.6	2.0.E-02
<i>Cre03.g204465</i>	—	GT90 family protein 36	2.1	2.7.E-04	1.5	3.6.E-02
<i>Cre12.g527250</i>	—	—	1.8	3.3.E-04	1.6	8.9.E-03
<i>Cre01.g047650</i>	—	—	1.3	2.7.E-03	1.3	2.0.E-02
<i>Cre02.g095063</i>	—	—	1.1	2.0.E-02	1.3	2.9.E-02
<i>Cre05.g245500</i>	<i>FAP175</i>	Ankyrin Repeat Flagellar Associated Protein	-1.8	2.9.E-04	-1.9	7.9.E-04

0.04% CO₂ 通気条件移行後 0.3 時間後において、C9 及び *CBP1* 相補株と比較して、*cbp1^{9e-2}* で発現レベルが有意に減少した *CCMI* 依存性かつ低 CO₂ 誘導性遺伝子を示す ($|\logFC| > 1$, false discovery rate (FDR) < 0.05)。

**表 3-4 : CCM1 依存性かつ低 CO₂ 誘導性の遺伝子の中で 0.04% CO₂ 通気条件
移行 2 時間後において CBP1 依存的に発現レベルが変動した遺伝子**

遺伝子ID	遺伝子名	説明	<i>cbp1^{9e-2}/C9</i>		<i>cbp1^{9e-2}/CBP1</i> 相補株	
			logFC	FDR	logFC	FDR
<i>Cre05.g245500</i>	<i>FAP175</i>	Ankyrin Repeat Flagellar Associated Protein	-1.1	3.9.E-02	-1.5	1.8.E-02

0.04% CO₂ 通気条件移行後 2 時間後において、C9 及び *CBP1* 相補株と比較して、*cbp1^{9e-2}* で発現レベルが有意に減少した *CCMI* 依存性かつ低 CO₂ 誘導性遺伝子を示す ($|\logFC| > 1$, false discovery rate (FDR) < 0.05)。

考察

CBP1 の保存性

Phytozome データベース (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) にゲノム情報が登録されている種の中から、CCM1 ホモログを持つ 5 種の緑藻ドナリエラ *Dunaliella salina*、ボツリオコッカス *Botryococcus braunii*、ボルボックス *Volvox carteri*、コッコミクサ *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 及びクロモクロシス *Chromochloris zofingiensis* における、CBP1 の保存性を調べた。ドナリエラ、ボツリオコッカス及びボルボックスでは、CBP1 と同様に C 末端側に WW ドメインを持つ COG0523 タンパク質が保存されていた (図 3-8)。また CobW ドメインにおける、GTPase 活性に必要なドメインや、Zn²⁺結合に関わるアミノ酸残基は、クラミドモナスを含む 4 種において保存されていた。一方で、コッコミクサとクロモクロシスは CCM1 ホモログを持つが、C 末端側に WW ドメインを持つ COG0523 タンパク質は保存されていなかった。CBP1 パラログを持つ緑藻種では、クラミドモナスと同様に CBP1 による CCM 抑制機構が保存されている可能性が考えられる。

CBP1 は核内で遺伝子発現を制御する

CBP1-Venus 融合タンパク質を用いた解析により、CBP1 は CCM1 と同様に核内に局在することが示された。また、RNA-seq 解析により *cbp1* 変異株において、HC 条件で 13 個、CO₂ 欠乏条件で 8 個の CCM1 依存性遺伝子の発現レベルが変動することから、核局在性因子である CBP1 が遺伝子発現を制御することが示唆された。しかし、CBP1 は既知の DNA 結合部位や遺伝子の転写調節に関わるドメインを持たないため、DNA と直接相互作用する転写抑制因子とは異なる機能を持つ可能性が考えられる。

CBP1 は Zn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺などの配位に関わる金属シャペロンとして働く COG0523 タンパク質ファミリーに属する (Haas et al., 2009)。配列類似性ネットワーク (A sequence similarity network: SSN) 解析によって、異なる生物種における COG0523 タンパク質の分類を行うと、CBP1 を含むクラミドモナスの COG0523 タンパク質が、E.coli の Zn²⁺シャペロン YjiA と同じクラスターに含まれる (Edmonds et al., 2021)。また、YjiA が持つ Zn²⁺結合領域が CBP1 においても保存されていたことから、CBP1 が Zn²⁺シャペロンとして働く可能性が考えられる。CBP1 と相互作用する CCM1 は CCM の誘導に重要な Zn²⁺結合領域を持つ (Kohinata et al., 2008)。このことから CBP1 が CCM1 の Zn²⁺との結合を補助する金属シャペロンとして機能すると予測された。しかしながら、CO₂ 欠乏条件に誘導した *cbp1* 変異株において CCM1 依存性遺伝子が誘導されたことから、CCM1 が持つ既知の Zn²⁺結合部位における配位に、CBP1 は関与しない可能性が考えられる。また、CBP1 が持つ CobW ドメインは GTPase 活性を持つことが予測されるが、CBP1 の機能における GTPase の役割は明らかではない。今後は CBP1 が持つ walker A/B モチーフに変異を導入した dominant negative 型 CBP1 発現株を作出することで、CBP1 の機能における GTPase の重要性を明らかに出来ると考えている。

CBP1 タンパク質は CobW ドメインに加えて、タンパク質間相互作用に重要な WW ドメインを持つ。WW ドメインを持つタンパク質は真核生物で広く保存されており、核に局在する WW ドメイン含有タンパク質の多くは遺伝子の発現制御に関わると考えられている (Sudol et al., 2001)。特にヒトが持つ WW domain-containing transcription regulator protein 1 (WWTR1) は Transcriptional coactivator with PDZ-

binding motif (TAZ) と呼ばれ、核における遺伝子発現に関わることが知られている。WWTR1 は直接 DNA と結合せず、WW ドメインを介して転写因子上に存在する PPXY モチーフと結合することで転写を制御する転写共役因子として機能する (Kanai et al., 2000)。また、WWTR1 と配列的な類似性を持つ yes-associated protein 1 (YAP1) も転写共役因子として働き、転写因子である Transcriptional enhancer factor domain family member (TEAD) と相互作用する (Zhao et al., 2008)。一方で CBP1 と WWTR1 及び YAP1 との間に配列相同性が見られないことから、CBP1 はこれらの既知転写共役因子とは異なる機能を持つと考えられる。CBP1 の WW ドメインが、転写因子や CCM 関連遺伝子の発現を抑制するリプレッサー因子と相互作用することで遺伝子発現を制御する可能性がある。

CBP1 は HC 条件において複数の CCM1 依存性遺伝子の発現を抑制する

cbp1 変異株では HC 条件において 13 個の CCM1 依存性遺伝子の発現が抑制される (表 3-2)。これらの遺伝子の中には既知の Ci 輸送体 (LCII、LCIA、BST1、BST3) や CA 及び CA 活性を持つと予測されるタンパク質 (CAH1、LCIB) 及び転写因子 LCR1 が含まれていた。特に LCR1 は *LCII* 及び *CAH1* の発現を誘導する転写因子であるため (Yoshioka et al., 2004)、HC 条件における LCR1 の誘導によって 2 遺伝子の発現が誘導された可能性が考えられる。また、既知の因子を除いた 6 遺伝子の中にも新規 CCM 因子が含まれている可能性が考えられる。LCI9、MOX1 及び SMM7 はピレノイド局在性タンパク質をコードすることから、低 CO₂ 条件におけるピレノイドの発達に関わることが予測されている (Mackinder et al., 2017)。

この先行研究において、LCI9 は 2 つのデンブリン結合ドメインを持ち、デンブリン鞘の間に局在することからデンブリン鞘同士を繋ぐリンカータンパク質として働くと予測されている。モノオキシゲナーゼ MOX1 及びメチルトランスフェラーゼ SMM7 は Rubisco や EPYC1 と同様にピレノイドマトリックスに局在するため、Rubisco の機能制御に関わる可能性がある。また、SMM7 と同様にメチルトランスフェラーゼドメインを持つタンパク質をコードする *CIA6* の変異株ではピレノイドの形成が阻害されることから (Ma et al., 2011)、SMM7 が *CIA6* と同様に Rubisco の重合を介したピレノイドの形成に関わる可能性も考えられる。*cbp1* 変異株ではピレノイド形

成に関わる複数の因子の発現が HC 条件で抑制されていないことから、今後はピレノイドの形態に着目する必要がある。

ジンクフィンガードメインを持つ TAZ3 は、CO₂ 欠乏ストレスだけではなく、寒冷ストレスにおいても発現が誘導され、ヒストンのアセチル化に関わると予測されている (Li et al., 2020)。また、陸上植物では寒冷ストレス下において、ヒストンアセチル化によるクロマチンリモデリングが、寒冷ストレス応答性遺伝子の発現に必要である (Roy et al., 2014)。クラミドモナスの CO₂ 欠乏ストレスに応答した遺伝子発現とクロマチンリモデリングの関係は不明だが、TAZ3 によるヒストンアセチル化がクロマチン構造の変化を引き起こし、CCM 関連遺伝子の発現が誘導される可能性が考えられる。

HC 条件における CCM 抑制機構

本研究において、CBP1 が HC 条件において Ci 輸送体、CA 及び転写因子の mRNA の蓄積レベルを部分的に抑制することが示された (図 3-9)。CBP1 は CO₂ 条件に関わらず核に局在し (図 3-2)、またタンパク質の蓄積レベルも大きく変動しない (図 3-5)。そのため、CO₂ 条件に応じてリン酸化などの翻訳後修飾を受けることでその機能を制御している可能性や、DNA に結合し遺伝子発現を抑制するリプレッサー因子と CBP1 が HC 条件特異的に結合することで遺伝子発現を抑制する可能性が考えられる。CCM の駆動には、光合成により生産されたエネルギーを用いた ATP の生産や、チラコイド内腔のプロトン濃度勾配の形成が必要である (Burlacot et al., 2022)。しかし CO₂ が過剰となる HC 条件では、CO₂ は拡散によってピレノイドに供給されると考えられるため、エネルギー消費を抑えるために、HC 条件に誘導された際に素早く Ci 輸送体や CA の発現を抑制する必要がある。シアノバクテリアや珪藻では、CCM 抑制に関わる転写因子やシスエレメントの存在が知られている (Figge et al., 2001; Wang et al., 2004; Ohno et al., 2012)。また緑藻 *Chlorella ellipsoidea* では、HC 条件下で生育しても CO₂ 欠乏条件下で生育した野生型の細胞と同等の Ci 親和性を示す変異株が単離されたことから、CCM の抑制因子の存在は示唆されていたが原因遺伝子の同定には至っていない (Matsuda and Colman, 1996)。

本研究では恒常的な HC 条件から CO₂ 欠乏条件に誘導した際に発現量が変動する遺伝子に着目した。この条件における CBP1 依存性遺伝子の数は CCM1 依存性遺伝子の数と比較して 1/16 程度であり (図 3-7B)、その半分以上の遺伝子が CCM1 依存性ではなかったことから、CBP1 による CCM1 依存性遺伝子の部分的な抑制を行うことが示唆された。しかし、CBP1 が CCM の抑制因子として働くのであれば、恒常的な HC 条件よりも CO₂ 欠乏条件から HC 条件に誘導した際に、より多くの遺伝子発現を抑制する可能性が考えられる。そのため、CBP1 の CCM 抑制における機能をより明らかにするためには、高 CO₂ 条件誘導時における野生株と *cbp1* 変異株との発現パターンを比較する必要がある。

また、HC 条件で CBP1 が他の CCM 抑制因子と協調的に働くことで、CCM 関連遺伝子の発現を抑制する可能性が考えられる。クラミドモナスは CBP1 を含めて 5 つの COG0523 タンパク質を持つことが知られているが (Haas et al., 2009)、これらが協調的に働くことで、CCM を抑制する可能性が考えられる。また、低 CO₂ 条件で発現が誘導される low-CO₂ inducible protein 15 (LCI15) は CobW_C ドメインと WW ドメインのみを持ち CobW ドメインを持たないが (Yamano et al., 2008)、CBP1 と約 50% の相同性を持つため CBP1 と同様に CCM の抑制因子として働く可能性が考えられる。これらの因子が CCM の抑制に関わるかを検証するためには、今後 CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子破壊を行い、表現型を調べる必要がある。

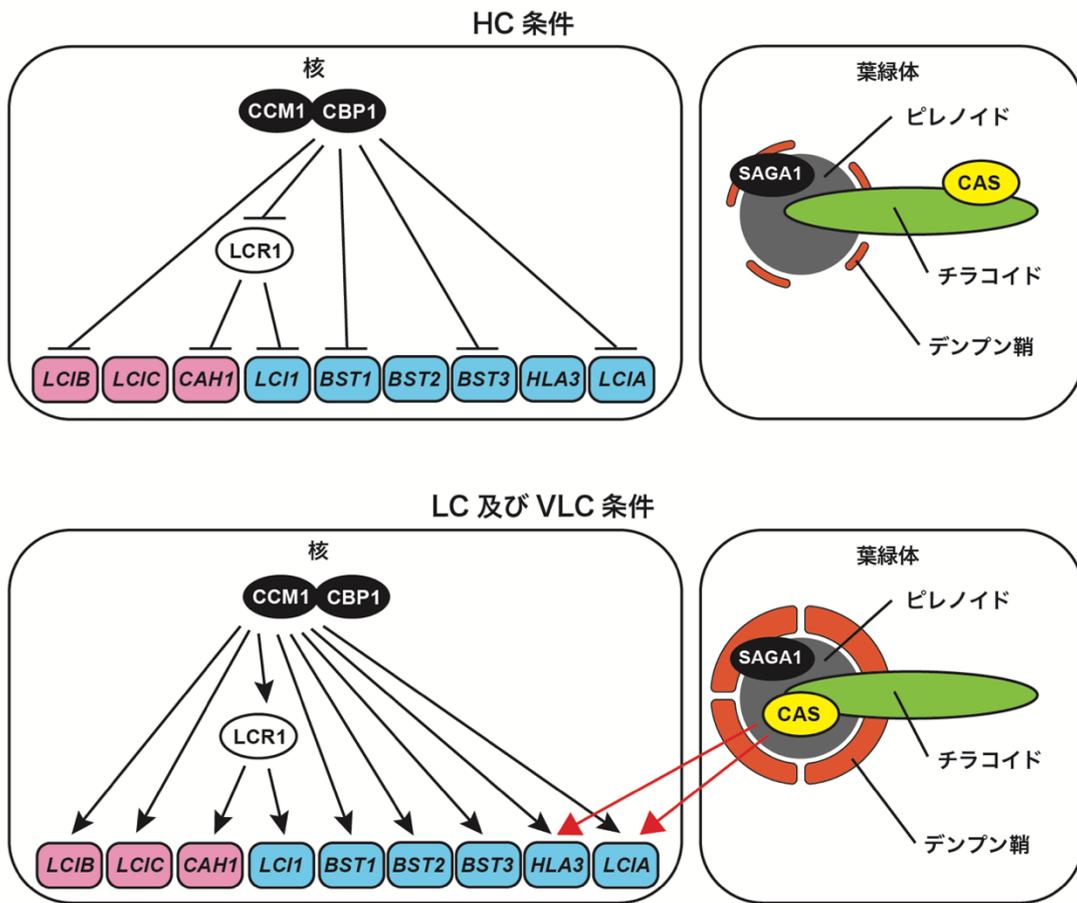


図 3-9 : HC 条件及び CO₂ 欠乏条件における CCM 関連遺伝子の発現調節

クラミドモナスの HC 条件及び CO₂ 欠乏条件における CA 及び Ci 輸送体をコードする遺伝子の発現調節機構。CA 及び CA と類似した構造を持つ因子をコードする遺伝子は赤色、Ci 輸送体をコードする遺伝子は青色で示している。黒矢印は核における CCM 関連遺伝子の発現誘導を示す。赤矢印はピレノイドから核へのレトログレードシグナルによる *HLA3* 及び *LCIA* の発現調節を示す。

結論

本研究では、クラミドモナスにおいて SAGA1 がピレノイドの形成だけでなく、CCM 関連遺伝子の発現にも必要であることが判明した。さらに CCM1 と結合する CBP1 が、これまで知られていなかった、HC 条件において CCM を抑制する因子であることを明らかにした。

実験材料及び方法

使用株と培養条件

本研究で用いた *Chlamydomonas reinhardtii* C9 (mt) 株は東京大学 IAM カルチャーコレクションから提供された株であり、現在は Chlamydomonas Resource Center に CC-5098 として保存されている (Gallaher et al., 2015)。CC-5325, CC-5420 (*sagal*), CC-5422 (*SAGAI-Venus/sagal*) は Chlamydomonas resource center から入手した。クラミドモナスの従属栄養条件での培養及び継体には Tris-acetate-phosphate (TAP) 培地を用いた (Harris, 1989)。光独立栄養条件における培養には、High salt medium (HSM) 培地に 20 mM の MOPS を添加した HSM+MOPS 培地 (Harris, 1989)、もしくは炭素源となる酢酸を含まない phosphate 培地に 20 mM の MOPS を添加した MOPSP 培地を用いた (Toyokawa et al., 2020)。

生理学的実験の際には、細胞を 5 mL の TAP 培地で 12 時間以上前培養したのちに、50 mL の HSM+MOPS 培地もしくは MOPSP 培地に懸濁し、5% CO₂ を含む空気を通気して、25°C かつ 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射化で 24 時間培養を行った。培養後の細胞を遠心分離し (600 \times g, 5 分, 25°C)、ペレットを培地に再懸濁したのちに、5% CO₂ もしくは 0.04% CO₂ を含む空気を通気して、同様の温度及び光条件下で 12 時間以上培養を行った。

細胞の形質転換

クラミドモナスにハイグロマイシン耐性を付与する *aphVII* カセットは pHyg3 プラスミドから増幅した (Berthold et al., 2002)。NEPA-21 エレクトロポレーター (NEPAGENE) を用いたエレクトロポレーション法により、C9 細胞に *aphVII* カセットを導入した (Yamano et al., 2013)。形質転換体は、1.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の照明下で穏やかに攪拌しながら 25°C で 12-24 時間の回復培養を行った。その後、30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ハイグロマイシンあるいはパロモマイシンを含む TAP プレート上で、25°C かつ 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下でコロニーの直径が 0.5 mm 程度になるまで培養を行った。

CO₂ 要求性変異株のスクリーニング

形質転換により得られた細胞は、液体 TAP 培地を 200 μL 加えた 96 ウェルマイクロタイタープレートに移したのちに、25°C かつ 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下で 2 日間培養を行った。スクリーニングでは、pH 6.2 と 8.4 の酢酸を含まない寒天プレート上に細胞をスポットし、0.04% CO₂ を通気させたチャンバー内で 4 日間培養を行い、その生育速度を評価した。そこで選抜した株を濁度 (OD₇₀₀) が 0.15、0.07、0.03 となるように希釈し、各懸濁液 3 μL を pH 6.2、7.0、7.8、9.0 の寒天プレートにスポットした。寒天プレートをそれぞれ 5%、0.04% 及び 0.01% CO₂ を含む空気を通気させたチャンバー内で 4 日間培養を行い、生育速度の評価を行った。

酸素発生速度の測定

緩衝液に NaOH を加えて pH を調整した MES-NaOH buffer (pH 6.2)、MOPS-NaOH buffer (pH 7.0)、HEPES-NaOH buffer (pH 7.8) 及び AMPSO-NaOH buffer (pH 9.0) で細胞を懸濁した。クラークタイプ酸素電極 (Hansatech Instruments) を用いて 750 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下で NaHCO₃⁻ を 30 秒ごとに段階的に添加し、酸素発生量をレコーダー LR4220 (Yokogawa) によって記録した (Yamano et al., 2008)。この結果から、最大酸素発生速度 (V_{max}) を算出し、 V_{max} の半分の速度を示す溶存 Ci 濃度 $K_{0.5}$ (Ci) を算出した。

タンパク質の定量法

クラミドモナスのタンパク質を抽出するために、PBS による洗浄を行った細胞を Complete protease inhibitor cocktail (Roche) を含む PBS 溶液に懸濁し、ハンディソニケーター UR-20P (TOMY) を用いて氷上で超音波処理を行い、細胞を破砕した。その後遠心分離を行い、上清を可溶性タンパク質画分とした。タンパク質の濃度は Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen) を用いて測定を行い、10 μg に相当するタンパク質を泳動に使用した。全タンパク質を抽出する際にはクロロフィル濃度を測定後に超音波処理を行い、クロロフィル量 1 μg 分に相当するタンパク質を泳動に使用した。粉砕した細胞に 2 \times SDS ローディングバッファー及び 100 mM DTT を加え、可

溶性タンパク質は 65°C で 10 分、総タンパク質は 37°C で 30 分インキュベートし、泳動に使用した。

ウェスタンブロットティング解析

ウェスタンブロットティング解析は Wang et al., 2016 に従って行った。一次抗体はそれぞれ以下の希釈度で反応させた。HLA3 抗体 (1:1,250)、LCIA 抗体 (1:5,000)、LCI1 抗体 (1:5,000)、LCIB 抗体 (1:5,000)、CAH1 抗体 (1:2,500)、CAH3 抗体 (1:2,000)、CCM1 抗体 (1:2,500)、CBP1 抗体 (1:5,000)、CAS 抗体 (1:5,000) および Histone H3 抗体 (1:10,000)。二次抗体として Goat anti Rabbit IgG 抗体を 1:10,000 の希釈濃度で使用した。

CRISPR-Cas9 法による遺伝子破壊

ガイド RNA (gRNA) の設計サイト CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) を用いて、各遺伝子のエクソン上に gRNA を設計した。細胞の培養、Cas9 RNP の合成、遺伝子カセットの形質転換は Tsuji et al., 2022 に従って行った。

RNA-Seq 解析

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した total RNA を用いて、Novaseq (Illumina) により RNA-seq を行った。得られたリードは、*Chlamydomonas reinhardtii* ゲノム配列 Ver.5.5 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/> からダウンロード) に、HISAT2 プログラムを用いてアライメントを行った (Kim et al., 2015)。各遺伝子にマッピングされたリード数を、HTSeq プログラムを用いて算出した (Anders et al., 2015)。得られたマッピング数に対して、edgeR パッケージに実装されている TMM 正規法を用いて、サンプル間のリードカウント数の比較を行った。

間接的免疫蛍光染色法によるタンパク質の局在観察

培養した細胞を遠心分離により回収し、細胞懸濁液をポリ-L-リジン処理したスライドグラス (Poly-Prep Slides, Sigma) 上に静置した。細胞固定および免疫蛍光染色は Yamano and Fukuzawa, 2016 に従って行った。CAS および LCIB 抗体は、それぞれ 1:500 および 1:200 の希釈率で使用した。Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies) を 1:500 の希釈で使用した。

CCM1-Venus 及び CBP1-Venus 発現株の作出

恒常発現プロモーターの下流で Venus との融合タンパク質を発現させるベクター pMO449 (Onishi and Pringle, 2016) に PCR で増幅した CCM1 及び CBP1 の全長配列を SliCE 法 (Motohashi, 2015) によって組み込んだ。CCM1 及び CBP1 の C 末端側に、Venus-3×FLAG 配列が位置するようにコンストラクトを設計した。さらに、ゲノム配列を鋳型として CCM1 及び CBP1 のオウンプロオーター領域を含む前半領域と、CCM1 及び CBP1 の C 末端側に Venus を融合したコンストラクトを鋳型として PCR で増幅した後半領域を、それぞれ 10 塩基程度の重複領域を持つよう作出した。この前半と後半の断片を同時に鋳型としてオーバーラップ PCR を行い、オウンプロモーターで CCM1-Venus 及び CBP1-Venus を発現するコンストラクトを作出した。これらのコンストラクトを *ccm1* 変異株及び *cbp1* 変異株に導入し、Venus 蛍光が観察される株をスクリーニングした。

BiFC 法に用いるコンストラクトの作成

コンストラクトの作製には、Gateway クローニング法 (ThermoFisher) を用いた。エントリーベクターに組み込む cDNA 断片は、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いた逆転写 PCR によって合成した cDNA を鋳型として、PCR により作出した。次に、Topo クローニング反応を行ってエントリークローンを作成した。さらに、LR 反応により目的遺伝子配列をエントリークローンに組み込み、デスティネーションクローンを作成した。

アグロバクテリウムのタバコ葉への感染

コンストラクトを形質転換したアグロバクテリウムを適切な抗生物質を加えた YEP 培地で震とう培養した。培養液を遠心し、上清を捨てた後、感染用バッファーで OD600 が 0.8 になるように菌体を懸濁した (Yamagami et al., 2017)。その後、テルモシリンジを用いてタバコの葉の裏側から菌体懸濁液を注入し、2-3 日後の葉を採取して観察に用いた。

参考文献

- Adler L, Díaz-Ramos A, Mao Y, Pukacz KR, Fei C, McCormick AJ** (2022) New horizons for building pyrenoid-based CO₂-concentrating mechanisms in plants to improve yields. *Plant Physiol.* **190**: 1609–1627
- Allen MD, del Campo JA, Kropat J, Merchant SS** (2007) FEA1, FEA2, and FRE1, encoding two homologous secreted proteins and a candidate ferrireductase, are expressed coordinately with FOX1 and FTR1 in iron-deficient *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **6**: 1841–1852
- Anders S, Pyl PT, Huber W** (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166–169
- Aspatwar A, Winum J-Y, Carta F, Supuran CT, Hammaren M, Parikka M, Parkkila S** (2018) Carbonic Anhydrase Inhibitors as Novel Drugs against Mycobacterial β -Carbonic Anhydrases: An Update on In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules* **23**: 2911
- Baba M, Suzuki I, Shiraiwa Y** (2011) Proteomic Analysis of High-CO₂-Inducible Extracellular Proteins in the Unicellular Green Alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1302–1314
- Badger MR, Kaplan A, Berry JA** (1980) Internal Inorganic Carbon Pool of *Chlamydomonas reinhardtii*: EVIDENCE FOR A CARBON DIOXIDE-CONCENTRATING MECHANISM. *Plant Physiol* **66**: 407–413
- Barrett J, Girr P, Mackinder LCM** (2021) Pyrenoids: CO₂-fixing phase separated liquid organelles. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* **1868**: 118949
- Berthold P, Schmitt R, Mages W** (2002) An engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* **153**: 401–412
- Bedford MT, Sarbassova D, Xu J, Leder P, Yaffe MB** (2000) A novel pro-Arg motif recognized by WW domains. *J Biol Chem* **275**: 10359–10369
- Borkhsenius ON, Mason CB, Moroney JV** (1998) The intracellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in *chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **116**: 1585–1591
- Bowes G, Ogren WL, Hageman RH** (1971) Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem Biophys Res Commun* **45**: 716–722
- Burlacot A, Dao O, Auroy P, Cuiné S, Li-Beisson Y, Peltier G** (2022) Alternative photosynthesis pathways drive the algal CO₂-concentrating mechanism. *Nature* **605**: 366–371

- Chaux F, Burlacot A, Mekhalfi M, Auroy P, Blangy S, Richaud P, Peltier G** (2017) Flavodiiron Proteins Promote Fast and Transient O₂ Photoreduction in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **174**: 1825–1836
- Choi BY, Kim H, Shim D, Jang S, Yamaoka Y, Shin S, Yamano T, Kajikawa M, Jin E, Fukuzawa H, Lee Y** (2022) The *Chlamydomonas* bZIP transcription factor BLZ8 confers oxidative stress tolerance by inducing the carbon-concentrating mechanism. *Plant Cell* **34**: 910–926
- Craig RJ, Gallaher SD, Shu S, Salomé P, Jenkins JW, Blaby-Haas CE, Purvine SO, O'Donnell S, Barry K, Grimwood J, Strenkert D, Kropat J, Daum C, Yoshinaga Y, Goodstein DM, Vallon O, Schmutz J, Merchant SS** (2022) The *Chlamydomonas* Genome Project, version 6: reference assemblies for mating type plus and minus strains reveal extensive structural mutation in the laboratory. *Plant Cell* in press
- DalCorso G, Pesaresi P, Masiero S, Aseeva E, Schünemann D, Finazzi G, Joliot P, Barbato R, Leister D** (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in Arabidopsis. *Cell* **132**: 273–285
- Duanmu D, Miller AR, Horken KM, Weeks DP, Spalding MH** (2009) Knockdown of limiting-CO₂-induced gene *HLA3* decreases HCO₃⁻ transport and photosynthetic C_i affinity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 5990–5995
- Edmonds KA, Jordan MR, Giedroc DP** (2021) COG0523 proteins: a functionally diverse family of transition metal-regulated G3E P-loop GTP hydrolases from bacteria to man. *Metallomics* **13**: mfab046
- Eriksson M, Gardestrom P, Samuelsson G** (1995) Isolation, Purification, and Characterization of Mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **107**: 479–483
- Fang W, Si Y, Douglass S, Casero D, Merchant SS, Pellegrini M, Ladunga I, Liu P, Spalding MH** (2012) Transcriptome-wide changes in *Chlamydomonas reinhardtii* gene expression regulated by carbon dioxide and the CO₂-concentrating mechanism regulator CIA5/CCM1. *Plant Cell* **24**: 1876–1893
- Figge RM, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, Cerff R** (2001) Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. *Mol Microbiol* **39**: 455–468
- Freeman Rosenzweig ES, Xu B, Kuhn Cuellar L, Martinez-Sanchez A, Schaffer M, Strauss M, Cartwright HN, Ronceray P, Plitzko JM, Förster F, Wingreen NS, Engel BD, Mackinder**

- LCM, Jonikas MC** (2017) The Eukaryotic CO₂-Concentrating Organelle Is Liquid-like and Exhibits Dynamic Reorganization. *Cell* **171**: 148-162.e19
- Fujiwara S, Fukuzawa H, Tachiki A, Miyachi S** (1990) Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9779–9783
- Fukuzawa H, Fujiwara S, Tachiki A, Miyachi S** (1990) Nucleotide sequences of two genes *CAH1* and *CAH2* which encode carbonic anhydrase polypeptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res* **18**: 6441–6442
- Fukuzawa H, Ishizaki K, Miura K, Matsueda S, Inoue T, Kucho K, Ohyama K** (1998) Isolation and characterization of high-CO₂ requiring mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* by gene tagging. *Can J Bot* **76**: 1092–1097
- Fukuzawa H, Miura K, Ishizaki K, Kucho KI, Saito T, Kohinata T, Ohyama K** (2001) Ccm1, a regulatory gene controlling the induction of a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* by sensing CO₂ availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 5347–5352
- Gallaher SD, Fitz-Gibbon ST, Glaesener AG, Pellegrini M, Merchant SS** (2015) *Chlamydomonas* Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *Plant Cell* **27**: 2335–2352
- Greiner A, Kelterborn S, Evers H, Kreimer G, Sizova I, Hegemann P** (2017) Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell* **29**: 2498–2518
- Haas CE, Rodionov DA, Kropat J, Malasarn D, Merchant SS, de Crécy-Lagard V** (2009) A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics* **10**: 470
- Hagino T, Kato T, Kasuya G, Kobayashi K, Kusakizako T, Hamamoto S, Sobajima T, Fujiwara Y, Yamashita K, Kawasaki H, Maturana AD, Nishizawa T, Nureki O** (2022) Cryo-EM structures of thylakoid-located voltage-dependent chloride channel VCCN1. *Nat. Commun.* **13**: 2505
- Hanawa Y, Watanabe M, Karatsu Y, Fukuzawa H, Shiraiwa Y** (2007) Induction of a high-CO₂-inducible, periplasmic protein, H43, and its application as a high-CO₂-responsive marker for study of the high-CO₂-sensing mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **48**: 299–309

- Harris EH** (1989) *The Chlamydomonas Source Book: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. San Diego: CA: Academic Press.
- He S, Chou HT, Matthies D, Wunder T, Meyer MT, Atkinson N, Martinez-Sanchez A, Jeffrey PD, Port SA, Patena W, He G, Chen VK, Hughson FM, McCormick AJ, Mueller-Cajar O, Engel BD, Yu Z, Jonikas MC** (2020) The structural basis of Rubisco phase separation in the pyrenoid. *Nat Plants* **6**: 1480–1490
- Helman Y, Tchernov D, Reinhold L, Shibata M, Ogawa T, Schwarz R, Ohad I, Kaplan A** (2003) Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. *Curr Biol* **13**: 230–235
- Herdean A, Teardo E, Nilsson AK, Pfeil BE, Johansson ON, Ünnep R, Nagy G, Zsiros O, Dana S, Solymosi K, Garab G, Szabó I, Spetea C, Lundin B** (2016) A voltage-dependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants. *Nat. Commun.* **7**: 11654
- Hogetsu D, Miyachi S** (1977) Effects of CO₂ concentration during growth on subsequent photosynthetic CO₂ fixation in *Chlorella*. *Plant Cell Physiol.* **18**: 347–352
- Im CS, Grossman AR** (2002) Identification and regulation of high light-induced genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **30**: 301–313
- Itakura AK, Chan KX, Atkinson N, Pallesen L, Wang L, Reeves G, Patena W, Caspari O, Roth R, Goodenough U, McCormick AJ, Griffiths H, Jonikas MC** (2019) A Rubisco-binding protein is required for normal pyrenoid number and starch sheath morphology in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**: 18445–18454
- Jin S, Sun J, Wunder T, Tang D, Cousins AB, Sze SK, Mueller-Cajar O, Gao Y-G** (2016) Structural insights into the LCIB protein family reveals a new group of β -carbonic anhydrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**: 14716–14721
- Jones HG** (1992) *Plants and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology*. Second edition, Cambridge, UK: Cambridge University Press
- Karlsson J, Clarke AK, Chen Z-Y, Huggins SY, Park Y-I, Husic HD, Moroney JV, Samuelsson G** (1998) A novel α -type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂. *EMBO J.* **17**: 1208–1216
- Khil PP, Obmolova G, Teplyakov A, Howard AJ, Gilliland GL, Camerini-Otero RD** (2004) Crystal structure of the *Escherichia coli* YjiA protein suggests a GTP-dependent regulatory function. *Proteins* **54**: 371–374

- Kim D, Langmead B, Salzberg SL** (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* **12**: 357–360
- Kohinata T, Nishino H, Fukuzawa H** (2008) Significance of zinc in a regulatory protein, CCM1, which regulates the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 273–283
- Kono A, Chou TH, Radhakrishnan A, Bolla JR, Sankar K, Shome S, Su CC, Jernigan RL, Robinson CV, Yu EW, Spalding MH** (2020) Structure and function of LC11: a plasma membrane CO₂ channel in the *Chlamydomonas* CO₂ concentrating mechanism. *Plant J* **102**: 1107–1126
- Kono A, Spalding MH** (2020) LC11, a *Chlamydomonas reinhardtii* plasma membrane protein, functions in active CO₂ uptake under low CO₂. *Plant J* **102**: 1127–1141
- Kustu S, Inwood W** (2006) Biological gas channels for NH₃ and CO₂: evidence that Rh (Rhesus) proteins are CO₂ channels. *Transfus. Clin. Biol.* **13**: 103–110
- Li X, Zhang R, Patena W, Gang SS, Blum SR, Ivanova N, Yue R, Robertson JM, Lefebvre PA, Fitz-Gibbon ST, Grossman AR, Jonikas MC** (2016) An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **28**: 367–387
- Ma Y, Pollock SV, Xiao Y, Cunnusamy K, Moroney JV** (2011) Identification of a Novel Gene, *CIA6*, Required for Normal Pyrenoid Formation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **156**: 884–896
- Macias MJ, Hyvönen M, Baraldi E, Schultz J, Sudol M, Saraste M, Oschkinat H** (1996) Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* **382**: 646–649
- Matsuda Y, Colman B** (1996) A New Screening Method for Algal Photosynthetic Mutants (CO₂-Insensitive Mutants of the Green Alga *Chlorella ellipsoidea*). *Plant Physiol* **110**: 1283–1291
- Mackinder LCM, Chen C, Leib RD, Patena W, Blum SR, Rodman M, Ramundo S, Adams CM, Jonikas MC** (2017) A Spatial Interactome Reveals the Protein Organization of the Algal CO₂-Concentrating Mechanism. *Cell* **171**: 133-147.e14
- Mackinder LC, Meyer MT, Mettler-Altmann T, Chen VK, Mitchell MC, Caspari O, Freeman Rosenzweig ES, Pallesen L, Reeves G, Itakura A, Roth R, Sommer F, Geimer S, Mühlhaus T, Schroda M, Goodenough U, Stitt M, Griffiths H, Jonikas MC** (2016) A repeat protein links

Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**: 5958–5963

Mariscal V, Moulin P, Orsel M, Miller AJ, Fernández E, Galván A (2006) Differential Regulation of the *Chlamydomonas* Nar1 Gene Family by Carbon and Nitrogen. *Protist* **157**: 421–433

Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, 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 PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riaño-Pachón DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martínez D, Ngau WC, Otilar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**: 245–250

Meyer MT, Itakura AK, Patena W, Wang L, He S, Emrich-Mills T, Lau CS, Yates G, Mackinder LCM, Jonikas MC (2020) Assembly of the algal CO₂-fixing organelle, the pyrenoid, is guided by a Rubisco-binding motif. *Sci. Adv.* **6**: eabd2408

Miura K, Yamano T, Yoshioka S, Kohinata T, Inoue Y, Taniguchi F, Asamizu E, Nakamura Y, Tabata S, Yamato KT, Ohyama K, Fukuzawa H (2004) Expression profiling-based identification of CO₂-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **135**: 1595–1607

Motohashi K (2015) A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol* **15**: 47

- Mukherjee A, Lau CS, Walker CE, Rai AK, Prejean CI, Yates G, Emrich-Mills T, Lemoine SG, Vinyard DJ, Mackinder LCM, Moroney JV** (2019) Thylakoid localized bestrophin-like proteins are essential for the CO₂ concentrating mechanism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**: 16915–16920
- Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T** (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. *Cell* **110**: 361–371
- Onishi M, Pringle JR** (2016) Robust Transgene Expression from Bicistronic mRNA in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *G3 (Bethesda)* **6**: 4115–4125
- Ohnishi N, Mukherjee B, Tsujikawa T, Yanase M, Nakano H, Moroney JV, Fukuzawa H** (2010) Expression of a low CO₂-inducible protein, LC11, increases inorganic carbon uptake in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **22**: 3105–3117
- Ohno N, Inoue T, Yamashiki R, Nakajima K, Kitahara Y, Ishibashi M, Matsuda Y** (2012) CO₂-cAMP-Responsive cis-Elements Targeted by a Transcription Factor with CREB/ATF-Like Basic Zipper Domain in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* **158**: 499–513
- Rai AK, Chen T, Moroney JV** (2021) Mitochondrial carbonic anhydrases are needed for optimal photosynthesis at low CO₂ levels in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **187**: 1387–1398
- Rawat M, Moroney JV** (1991) Partial characterization of a new isoenzyme of carbonic anhydrase isolated from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **266**: 9719–9723
- Riño-Pachón DM, Corrêa LGG, Trejos-Espinosa R, Mueller-Roeber B** (2008) Green transcription factors: a *chlamydomonas* overview. *Genetics* **179**: 31–39
- Rolland N, Dorne AJ, Amoroso G, Sültemeyer DF, Joyard J, Rochaix JD** (1997) Disruption of the plastid *ycf10* open reading frame affects uptake of inorganic carbon in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* **16**: 6713–6726
- Roy D, Paul A, Roy A, Ghosh R, Ganguly P, Chaudhuri S** (2014) Differential acetylation of histone H3 at the regulatory region of *OsDREB1b* promoter facilitates chromatin remodelling and transcription activation during cold stress. *PLoS One* **9**: e100343
- Santhanagopalan I, Wong R, Mathur T, Griffiths H** (2021) Orchestral manoeuvres in the light: crosstalk needed for regulation of the *Chlamydomonas* carbon concentration mechanism. *J. Exp. Bot.* **72**: 4604–4624

- Shimakawa G, Ishizaki K, Tsukamoto S, Tanaka M, Sejima T, Miyake C** (2017) The Liverwort, *Marchantia*, Drives Alternative Electron Flow Using a Flavodiiron Protein to Protect PSI. *Plant Physiol.* **173**: 1636–1647
- Soupene E, Inwood W, Kustu S** (2004) Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 7787–7792
- Soupene E, King N, Feild E, Liu P, Niyogi KK, Huang C-H, Kustu S** (2002) Rhesus expression in a green alga is regulated by CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7769–7773
- Spalding MH, Spreitzer RJ, Ogren WL** (1983) Carbonic Anhydrase-Deficient Mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* Requires Elevated Carbon Dioxide Concentration for Photoautotrophic Growth. *Plant Physiol.* **73**: 268–272
- Strakova Z, Reed J, Ihnatovych I** (2010) Human Transcriptional Coactivator with PDZ-Binding Motif (TAZ) Is Downregulated During Decidualization. *Biol. Reprod.* **82**: 1112–1118
- Sudol M, Sliwa K, Russo T** (2001) Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* **490**: 190–195
- Tokutsu R, Fujimura-Kamada K, Matsuo T, Yamasaki T, Minagawa J** (2019) The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas*. *Nat. Commun.* **10**: 4099
- Toyokawa C, Yamano T, Fukuzawa H** (2020) Pyrenoid Starch Sheath Is Required for LCIB Localization and the CO₂-Concentrating Mechanism in Green Algae. *Plant Physiol.* **182**: 1883–1893
- Tsuji Y, Kinoshita A, Tsukahara M, Ishikawa T, Shinkawa H, Yamano T, Fukuzawa H** (2022) A YAK1-type protein kinase, triacylglycerol accumulation regulator 1, in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is a potential regulator of cell division and differentiation into gametes during photoautotrophic nitrogen deficiency. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **advpub**: 2022.08.001
- Van K, Spalding MH** (1999) Periplasmic carbonic anhydrase structural gene (*Cah1*) mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **120**: 757–764
- Vance P, Spalding MH** (2005) Growth, photosynthesis, and gene expression in *Chlamydomonas* over a range of CO₂ concentrations and CO₂/O₂ ratios: CO₂ regulates multiple acclimation states. *Can. J. Bot.* **83**, 796–809.
- Wang H-L, Postier BL, Burnap RL** (2004) Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. *J Biol Chem* **279**: 5739–5751

- Wang L, Yamano T, Kajikawa M, Hirono M, Fukuzawa H** (2014) Isolation and characterization of novel high-CO₂-requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* **121**: 175–184
- Wang L, Yamano T, Takane S, Niikawa Y, Toyokawa C, Ozawa SI, Tokutsu R, Takahashi Y, Minagawa J, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Fukuzawa H** (2016) Chloroplast-mediated regulation of CO₂-concentrating mechanism by Ca²⁺-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**: 12586–12591
- Wang Y, Sun Z, Horken KM, Im C-S, Xiang Y, Grossman AR, Weeks DP** (2005) Analyses of CIA5, the master regulator of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*, and its control of gene expression. *Can J Bot* **83**: 765–779
- Wang Y, Spalding MH** (2014) Acclimation to Very Low CO₂: Contribution of Limiting CO₂ Inducible Proteins, LCIB and LCIA, to Inorganic Carbon Uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **166**: 2040–2050
- Wunder T, Cheng SLH, Lai S-K, Li H-Y, Mueller-Cajar O** (2018) The phase separation underlying the pyrenoid-based microalgal Rubisco supercharger. *Nat. Commun.* **9**: 5076
- Xiang Y, Zhang J, Weeks DP** (2001) The *Cia5* gene controls formation of the carbon concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 5341–5346
- Yamagami A, Saito C, Nakazawa M, Fujioka S, Uemura T, Matsui M, Sakuta M, Shinozaki K, Osada H, Nakano A, Asami T, Nakano T** (2017) Evolutionarily conserved BIL4 suppresses the degradation of brassinosteroid receptor BRI1 and regulates cell elongation. *Sci Rep* **7**: 5739
- Yamano T, Miura K, Fukuzawa H** (2008) Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **147**: 340–354
- Yamano T, Tsujikawa T, Hatano K, Ozawa S, Takahashi Y, Fukuzawa H** (2010) Light and Low-CO₂-Dependent LCIB–LCIC Complex Localization in the Chloroplast Supports the Carbon-Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1453–1468
- Yamano T, Iguchi H, Fukuzawa H** (2013) Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 691–694
- Yamano T, Sato E, Iguchi H, Fukuda Y, Fukuzawa H** (2015) Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**: 7315–7320
- Yamano T, Fukuzawa H** (2016) Indirect Immunofluorescence Assay in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bio-protocol*: 6(13):e1864

- Yamano T, Toyokawa C, Fukuzawa H** (2018) High-resolution suborganellar localization of Ca²⁺-binding protein CAS, a novel regulator of CO₂-concentrating mechanism. *Protoplasma* **255**: 1015–1022
- Yamano T, Toyokawa C, Shimamura D, Matsuoka T, Fukuzawa H** (2022) CO₂-dependent migration and relocation of LCIB, a pyrenoid-peripheral protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **188**: 1081–1094
- Yoshihara C, Inoue K, Schichnes D, Ruzin S, Inwood W, Kustu S** (2008) An Rh1-GFP fusion protein is in the cytoplasmic membrane of a white mutant strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Plant* **1**: 1007–1020
- Yoshioka S, Taniguchi F, Miura K, Inoue T, Yamano T, Fukuzawa H** (2004) The novel Myb transcription factor LCR1 regulates the CO₂-responsive gene *Cah1*, encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **16**: 1466–1477
- Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, Guan KL** (2008) TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* **22**: 1962–1971

謝辞

本研究を進めるにあたり、京都大学大学院 生命科学研究科 福澤秀哉教授、山野隆志准教授、辻敬典助教に心より感謝申し上げます。日々の研究や、学内外での研究成果発表、論文執筆など多岐にわたりご指導いただきました。

国立遺伝学研究所 豊田敦特任教授には次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析についてお世話になりました。また、京都大学生命科学研究科 中野雄司教授、山上あゆみ助教にはベンサミアナタバコを用いた BiFC アッセイについてお世話になりました。基礎生物学研究所 真野昌二准教授には BiFC アッセイに用いるベクターをご提供いただきました。ルイジアナ州立大学 James Moroney 教授には、国際学会でお会いした際に研究内容について多くのご提言をいただきました。また、ルイジアナ州立大学 Lilly LaPlace 氏には投稿論文について多くの助言をいただきました。

事務補佐員の山岡恵氏、秋吉由加理氏、技術補佐員の島田寛子氏には、研究生活について多大なサポートしていただきました。

また、微生物細胞機構学分野の皆様にも大変お世話になりました。豊川知華氏、新川友貴氏、新川はるか氏、Hu donghui 氏には当研究室に在籍されていた当時、実験技術や様々な知識をご教授いただき、多くのご助言をいただきました。また、安田詢子氏には *cbp1* 変異株の作出や解析について手助けをいただきました。また CCM1 結合タンパク質の同定を行った卒業生の山原洋佑氏 佐々木優氏にも感謝申し上げます。

最後に、研究生活を送る間、温かく応援してくれた家族の皆様には感謝します。本当にありがとうございました。

嶋村 大亮

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Shimamura D, Yamano T, Niikawa Y, Donghui H, Fukuzawa H

A pyrenoid-localized protein SAGA1 is necessary for Ca²⁺-binding protein CAS-dependent expression of nuclear genes encoding inorganic carbon transporters in *Chlamydomonas reinhardtii*

Photosynthesis Research (in press)

その他学術雑誌に発表した論文

Yamano T, Toyokawa C, **Shimamura D**, Matsuoka T, Fukuzawa H.

CO₂-dependent migration and relocation of LCIB, a pyrenoid-peripheral protein in *Chlamydomonas reinhardtii*

Plant Physiology 2022 Feb 4;188(2):1081-1094