

解説

緑藻クラミドモナスにおける光合成ターボエンジンの駆動と制御

京都大学 大学院生命科学研究科

山野 隆志、福澤 秀哉*

多くの藻類は、二酸化炭素 (CO_2) 欠乏ストレス環境においても光合成を維持するために、膜輸送体やチャネルを用いて積極的に細胞外から葉緑体に無機炭素 (Ci : CO_2 と HCO_3^-) を取り込み、固定酵素周辺に CO_2 を濃縮する仕組み「無機炭素濃縮機構」を持つ。「光合成のターボエンジン」にも例えられるこの仕組みは、シアノバクテリア、緑藻、珪藻を用いた研究でその共通性と多様性が明らかになってきた。本稿では、無機炭素濃縮機構の駆動とその制御について、クラミドモナスを中心に最新の知見を紹介する。

1. はじめに

人類は、温暖化・食糧不足・エネルギー枯渇など様々な問題を抱えている。これに対して、藻類が持つ無機炭素濃縮機構 (Carbon-concentrating mechanism: CCM) を利用し、光合成の能力を極限まで高めた植物を創出することで解決しようとするプロジェクトが世界的規模で進められている。その研究の土台となる CCM の基礎的な知見が相次いで報告されるなど、CCM 研究はホットトピックスのひとつになりつつある。本稿では、その発見から約 40 年に渡る CCM の分子機構の解明の歴史について、最新の知見を踏まえながら振り返り、緑藻の CCM の分子機構の理解がどこまで進んだのかをクラミドモナスを中心に紹介する。

2. 水圏における光合成の CO_2 欠乏ストレス

植物は太陽光のエネルギーを利用して水と CO_2 から有機物と O_2 を作る光合成を行い、地球上の全ての生命活動を根底から支えている。特に、光合成に必要な CO_2 を効率よく細胞内に取り込む過程は、光合成の律速となる要因の一つである。陸上植物では、葉の表皮にある気孔が開閉して CO_2 を取り込む量を調節し、また受動的な CO_2

輸送に関わるアクアポリンが同定されている¹⁾。 C_4 植物では、維管束鞘細胞と葉肉細胞の複雑な相互作用による有機酸の脱炭酸反応を介する濃縮経路が存在するが、 CO_2 や HCO_3^- を能動的に葉緑体に運ぶ輸送体は見つかっていない。

微細藻類の光合成による一次生産は、地球上の光合成全体の約 50 % を占めることから、水圏環境における光合成を理解することは重要である^{2,3)}。微細藻類にとって電子供与体である水は豊富に存在するが、以下の i) – vi) に述べる理由から光合成の基質である CO_2 が欠乏し、Rubisco による CO_2 の固定能は理論値の約 25% に制限される⁴⁾。

i) 現在の大气と平衡状態にある淡水を模した系において、水圏環境の CO_2 濃度は通常 15 μM 以下であり、 CO_2 固定酵素 Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) の最大反応速度の半分を与える CO_2 濃度「 $K_m(\text{CO}_2)$ 値」よりも低い。Jordan and Ogren (1981) の試算によると、シアノバクテリアと緑藻の $K_m(\text{CO}_2)$ 値はそれぞれ 105–320 μM および 25–38 μM であり、9–19 μM を示す高等植物の $K_m(\text{CO}_2)$ 値に比べて高く、そのため CO_2 に対する親和性が低い⁵⁾。

*連絡先 E-mail: fukuzawa@lif.kyoto-u.ac.jp

ii) Rubisco は、Ribulose 1, 5-bisphosphate (RuBP) に CO_2 を結合して 3-Phosphoglycerate (3-PGA) を生成することでカルビン・ベンソン回路に入るカルボキシラーゼ反応だけでなく、RuBP に O_2 を結合して 3-PGA と 2-Phosphoglycolate (2-PG) を生成するオキシゲナーゼ反応も触媒する。 CO_2 の供給が限られる水圏環境においては、Rubisco の触媒反応は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。

iii) 光合成生物の細胞密度の増加に依存して、溶存 CO_2 の 50–80 % が光合成によって消費される⁶⁾。

iv) 水中における CO_2 の拡散速度は大気中の場合に比べて 10,000 分の 1 と低い⁷⁾。

v) CO_2 は中性以上の pH 条件では水と反応して重炭酸イオン (HCO_3^-) の形で多く存在する。例えば、pH 7.8 では HCO_3^- は CO_2 の約 30 倍、pH 9.0 では 400 倍以上になる。

vi) 電荷を帯びた HCO_3^- は細胞や葉緑体を覆う生体膜を通過することができない。

3. 藻類の無機炭素濃縮機構

藻類はこのような CO_2 欠乏環境においても光合成能を維持するために、無機炭素 (Ci : CO_2 と HCO_3^-) を積極的に細胞内に取り込み、 CO_2 を Rubisco の周囲に濃縮する仕組み「無機炭素濃縮機構 (Carbon-concentrating mechanism: CCM)」を持つ。

光合成が律速されない 3–5% 程度の高い濃度の CO_2 を含む空気を通気する「高 CO_2 条件」で生育させた細胞は、 C_3 植物型の光合成特性を示す。これに対して、大気レベルの 0.04 % の濃度の CO_2 を含む空気を通気する「低 CO_2 条件」で生育させた細胞は、 CO_2 が欠乏しているにも関わらず細胞は Ci に対して高い親和性を示し、効率的な光合成を行うことができる^{8,9)}。藻類細胞の Ci に対する親和性の指標の一つとして、光合成における酸素発生の最大反応速度の半分の値を与える Ci 濃度「 $K_{0.5}(\text{Ci})$ 値」を用いることが多い。例えば、緑藻クラミドモナスでは高 CO_2 条件における $K_{0.5}(\text{Ci})$ は pH 7.8 において約 300 μM であるのに対

して、低 CO_2 条件では親和性が上昇し、約 35–40 μM を示す⁹⁾。

C_4 型光合成における有機酸の脱炭酸反応を介する濃縮経路 (Biochemical な CCM) とは異なり、藻類の CCM は細胞膜や葉緑体包膜に局在する Ci 輸送体やチャネルを介した Ci の直接的な輸送 (Biophysical な CCM) による。これは、「細胞外から葉緑体内への Ci の輸送」→「 HCO_3^- から CO_2 への変換・濃縮」→「 CO_2 の固定」→「漏れた CO_2 のリサイクル」からなる 4 つの過程と、それを制御する仕組みとして捉えられる。これは、自動車などのターボ (チャージャー) エンジンが燃料を燃やすために使う酸素を圧縮し、より多くのパワーを作り出す仕組み「酸素の吸入」→「圧縮」→「燃焼・膨張」→「排出」に似ていることから、CCM は「光合成のターボエンジン」にも例えられる¹⁰⁾。

4. CCM の起源と多様性

シアノバクテリアが地球史に出現した約 30 億年前の地球の大気の CO_2 濃度は、現在の数百倍であったと考えられている。従って地球史初期のシアノバクテリアは CO_2 欠乏ストレスにさらされることなく、CCM をもつ必要はなかった。それ以降の時代における CCM の起源について実際に特定することは難しいが、微細藻類の CCM に多様性が生じたのは、大気中の CO_2 濃度が急激に減少した環境変化に起因すると考えられる。大気中の O_2 と CO_2 の濃度に関しては、少なくとも 6 億年前には O_2 濃度は現在とあまり変わらないレベルにあり、 CO_2 濃度は現在の 15–20 倍 (0.6–1.0%) 含まれていたとするモデルが報告されている¹¹⁾。従って、光強度の高い環境では相対的に光合成の基質となる CO_2 濃度が減少し、 CO_2 の欠乏ストレスにさらされる可能性が考えられ、藻類はこの時点ですでに CCM を持っていた可能性がある。さらに、約 4.5 億年前に始まった陸上植物の出現と活発な光合成により、大気中の CO_2 濃度が急激に減少し、逆に O_2 の濃度が 30 % 以上にまで上昇した。この急激な大気組成の変化は、水圏環境の微細藻類に極端な CO_2 欠乏ストレスを生じさせたと考えられ、その結果として微細藻類

は多様な CCM を進化的に獲得したのではないかと考えられている¹²⁾。つまり、現在の藻類が持つ多様な CCM は、地球史初期のシアノバクテリアに由来する単系統ではなく、約 4 億年前に存在していた微細藻類がそれぞれ独立に獲得した多系統のシステムであることが示唆される。シアノバクテリアが持つ CCM に関する膜輸送体やカルボキシゾームの構成因子などの遺伝子群が緑藻や珪藻には保存されていないことから、CCM の起源が多系統であることが示唆される¹¹⁾。シアノバクテリアの CCM は、*Synechocystis* sp. PCC6803 や *Synechococcus elongatus* PCC7942 などモデルとして精力的に研究されているが^{13,14)}、本稿では緑藻の CCM を中心に紹介する。

5. CCM 研究の幕開け

宝月と宮地らは、4%と 0.04%の CO₂を含む空気をそれぞれ通気して生育させたクロレラの光合成特性を調べ、細胞に与える Ci 濃度と CO₂固定量をプロットした。すると、0.04%の CO₂を通気した細胞は Ci への親和性が上昇することを見出し⁸⁾、その低 CO₂条件で誘導される炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase: CA) が細胞の Ci への親和性を変化させる重要な因子であることを示した¹⁵⁾。さらに、CA を利用した間接的な Ci 輸送を伴う濃縮機構の存在を示した¹⁶⁾。時を同じくして、アナバナやクラミドモナスでも CO₂を濃縮する仕組みがあることが示され^{9,17)}、CCM 研究は世界的に広まっていった。初期の CCM 研究においては、阻害剤を用いた実験や様々な環境条件における CCM の生理学について精力的な研究が行われていたが、微細藻類における Ci の輸送・濃縮に関わる CA については生化学的な解析が進んだ¹⁸⁾。さらに、CA の遺伝子構造が解かれ、一次配列の類似性から、緑藻の酵素がヒト赤血球の酵素と同じグループに含まれる真核型 α -CA に属しており¹⁹⁾、陸上植物の葉緑体やシアノバクテリアの酵素が属する β -CA とは別のグループに属することが示された²⁰⁾。しかし、CCM を実際に駆動する膜輸送体やその制御にどのような遺伝子群が関わるのかは長らく不明であった。藻類の光合成の仕組みを解明するうえで重要と

なるこの問題は、分子遺伝学の力により解決されていくことになる。

6. CCM 研究の分子遺伝学的解析

微細藻類の CCM の分子遺伝学的研究は、主に単細胞緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* を用いて進められてきた。クラミドモナスは、ゲノム情報が解読されていること²¹⁾、エレクトロポレーションによる迅速かつ容易な形質転換系が開発されていること^{22,23)}、大規模挿入変異株ライブラリーやゲノム編集を始めとした分子遺伝学的ツールが整備されていること²⁴⁻²⁶⁾、四分子解析を用いた遺伝解析 (分子育種) が可能であること²⁷⁾などの理由から、光合成、脂質蓄積、鞭毛運動などの生命機能を遺伝子レベルで明らかにすることができるモデル生物である²⁸⁾。

これまでに、高 CO₂ 条件では正常に生育できるが、CCM の駆動が必要な低 CO₂ 条件では生育できない、あるいは生育速度が遅延する変異株が複数単離され、その変異原因遺伝子を同定することで、CCM の駆動や制御に必要な因子が遺伝子レベルで同定されてきた (表 1)。これらの因子の詳細な機能については後述する。

また以前は、培養中の CO₂ 濃度について高 CO₂ 条件と低 CO₂ 条件の二条件に分けて議論されてきたが、少なくともクラミドモナスは溶存 CO₂ 濃度に応じて少なくとも三段階の順化機構を持つことが分かってきた⁶⁾。すなわち、溶存 CO₂ 濃度が 70 μ M 以上の高 CO₂ 条件 (high-CO₂: HC)、6–70 μ M の低 CO₂ 条件 (low-CO₂: LC)、6 μ M 未満の超低 CO₂ 条件 (very low-CO₂: VLC) にそれぞれ順化することができる²⁹⁾。例えば、後述する *LCIB* の変異株は、HC と VLC 条件では生育できるが、LC 条件では生育できない表現型を示す^{30,31)}。

7. クラミドモナスの葉緑体内構造

多くの藻類において、Rubisco は葉緑体ストロマのピレノイドと呼ばれる構造に集積している。従って、藻類は少なくとも細胞膜と葉緑体包膜の障壁を乗り越えて Ci を輸送し、Rubisco 近傍に

表 1. クラミドモナスにおける無機炭素濃縮機構の変異株と原因遺伝子

変異株名	遺伝子	コードされるタンパク質	細胞内局在	参考文献
炭酸脱水酵素				
<i>cal-3, cia3</i>	<i>CAH3</i>	α -type carbonic anhydrase	チラコイド膜 ルーメン	61, 62, 63, 64
<i>pmp1, ad1</i>	<i>LCIB</i>	Putative carbonic anhydrase	葉緑体ストロマ	29, 30, 31, 79, 90, 91
輸送体・チャネル				
<i>ycf10</i>	<i>Ycf10</i>	CemA-like proton extrusion protein-like protein	葉緑体包膜	92
<i>Ain-1, lcia</i>	<i>LCIA</i>	Anion channel	葉緑体包膜	29, 51, 52, 79, 93
<i>Hin-1</i>	<i>HLA3</i>	ABC-type transporter	細胞膜	50, 51, 52, 71
<i>cia8</i>	<i>CIA8</i>	Sodium:bile acid symporter subfamily	N.D.	94
制御因子				
<i>ccm1, cia5</i>	<i>CCM1, CIA5</i>	Zn ²⁺ -binding regulatory factor	核	49, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 95
<i>lcr1</i>	<i>LCR1</i>	MYB-transcription factor	N.D.	81
<i>H82</i>	<i>CAS</i>	Ca ²⁺ -binding protein with rhodanase-like domain	チラコイド膜	82, 83, 85
光呼吸酵素				
<i>pgp1</i>	<i>PGP1</i>	Phosphoglycolate phosphatase	N.D.	67, 68, 96
<i>hcr89</i>	<i>GDH1</i>	Glycolate dehydrogenase	N.D.	69
その他				
<i>lci5</i>	<i>EPYC1/LCI5</i>	Rubisco interacting protein	ピレノイド	39, 41, 42
<i>rca1</i>	<i>RCA1</i>	Rubisco activase	ピレノイド	97
<i>had1</i>	<i>HAD1</i>	Putative dehydrogenase	N.D.	98
<i>cia6</i>	<i>CIA6</i>	SET domain methyltransferase	N.D.	99
<i>cia7</i>	<i>CIA7</i>	Putative protein	N.D.	100

N.D., not determined.

CO₂を濃縮する必要がある。クラミドモナスの特徴的な葉緑体内構造（図 1）を利用して、巧みに CO₂濃縮を行う仕組みが見えてきた。

クラミドモナスは細胞内に 1 つのカップ状の葉緑体を持つ。細胞の鞭毛がある方向を apical、反対側を basal とした時、葉緑体の basal 側にピレノイドを持つ。また左右に lobe と呼ばれる尖った構造を持つ。この特徴的な構造の生理学的な意義については不明であるが、光化学系（PS）II

複合体のアセンブリと修復が葉緑体内で区画化されていることに関係する可能性がある³²⁾。

藻類の多くは、葉緑体の中に鮮明な顆粒として観察されるピレノイド（pyrenoid: ギリシア語で pyren: 果実の核、eidos: 形）と呼ばれる細胞内微細構造を持つ。ピレノイドの有無、位置、形状、数は同一種内で安定しているため、ピレノイドの形態や個数は微細藻の種同定に用いられる。ツノゴケ類の例外を除いて、植物が陸上化するに伴ってピレノイドは消失したため、ピレノイドは水圏

環境における光合成の機能に密接に関連することが示唆される。

クラミドモナスのピレノイドはデンプン鞘に囲まれ³³⁾、多方向からチラコイド膜が陥入しており、このチラコイド膜は特に「ピレノイドチューブ」と呼ばれる。この構造は少なくとも60年以上前の電子顕微鏡像で記述されており³⁴⁾、後述するようにピレノイドチューブを介してCO₂を濃縮するモデルが提唱されている。さらに、クライオ電子顕微鏡を用いて構築された葉緑体とピレノイドの三次元構造像から、ピレノイドチューブ（直径が約100 nm）の中に複数のミニチューブ（長軸の直径が約20 nm）が通っている様子が鮮明に観察された³⁵⁾。ミニチューブの内

腔は葉緑体ストロマと通じており、ストロマとピレノイドマトリックスの間で炭素固定代謝における低分子を拡散させるための管として働く説が提唱されている³⁵⁾。実際に、CCMが駆動される時に、RuBPと3-PGAの代謝フラックスがピレノイドとストロマの間で高くなることが示されている³⁶⁾。また、このミニチューブの構造についても、50年以上前の電子顕微鏡観察によりすでに指摘されていたことは特筆すべきことである³⁷⁾。

これまで、クラミドモナスのピレノイドの実体はRubiscoの集積による静的な結晶構造体であると考えられてきたが、その分裂と合成をリアルタイムで観察した結果から、ピレノイドは「液-液

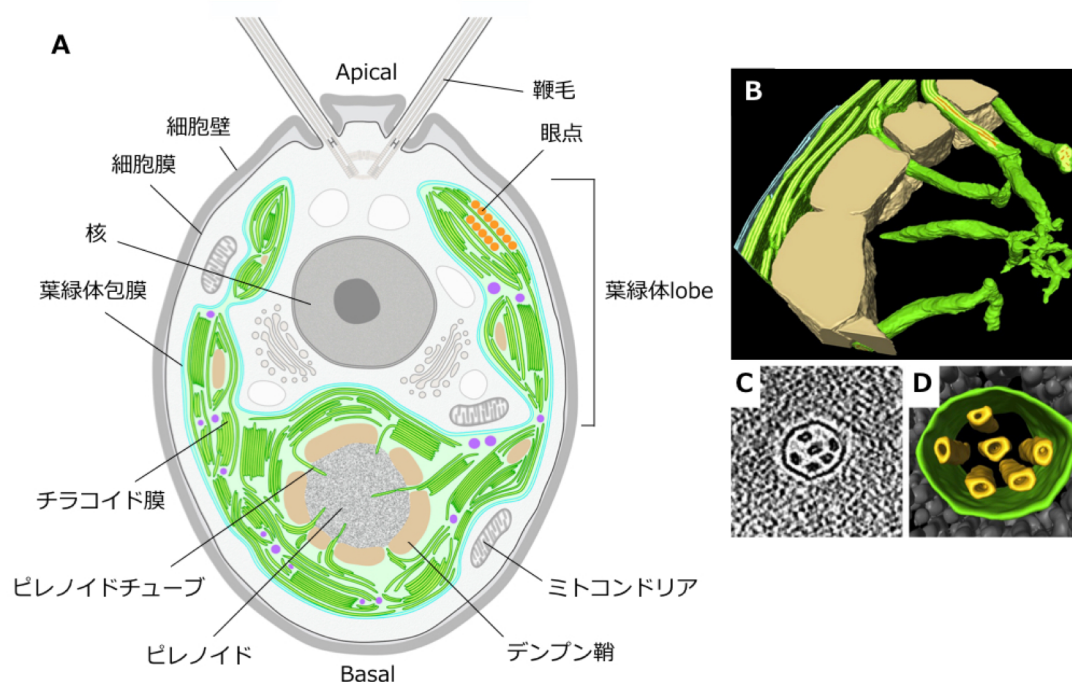


図1.

(A) 単細胞緑藻クラミドモナスの細胞内構造。(B, C, D) ピレノイド領域の微細構造。ピレノイドはデンプン鞘に囲まれ、チラコイド膜の一部はピレノイドに貫入したピレノイドチューブを形成している (B)。ピレノイドチューブの中にさらにミニチューブ構造が観察される。(C) はピレノイドチューブの断面のクライオ電子顕微鏡像、(D) はクライオ電子顕微鏡像から構築したピレノイドチューブとミニチューブの三次元構造を示す。(A) はマックス・プランク研究所の Benjamin Engel 博士から提供された図を改変した。(B, C, D) は文献 35 の図を改変した。

相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) 」された非膜系のオルガネラである可能性が示唆されている³⁸⁾。LLPS とは、よく振ったドレッシングの中で振る舞う油滴のように、分散していた小滴が素早く融合して、より大きい液滴を形成する性質を示す。また、単離したピレノイドのプロテオーム解析から、ピレノイドには Rubisco の他に デンプン・カロテノイド・アミノ酸の代謝、RNA 代謝・翻訳、テトラピロール・クロロフィルの合成に関わる因子や多くの機能未知タンパク質が約 200 種類も含まれていることが分かってきた^{39,40)}。

Essential pyrenoid component 1 (EPYC1) はピレノイドに局在するタンパク質の 1 つである。EPYC1 は、低 CO₂ 条件で発現誘導を受ける遺伝子として同定され⁴¹⁾、コードされるタンパク質が低 CO₂ 条件でリン酸化されることが報告されていた low-CO₂ inducible protein 5 (LCI5) と同一のタンパク質である⁴²⁾。EPYC1/LCI5 は Rubisco 小サブユニットと相互作用し、ピレノイド内部への Rubisco のアセンブリに必須であることが示されたが³⁹⁾、リン酸化との関係はまだ分かっていない。また、細胞から抽出した Rubisco と大腸菌で合成した EPYC1/LCI5 を *in vitro* で混合すると相分離された小滴を形成することも示されている⁴³⁾。オミクス解析からは、分子量が約 80 kDa を超えるタンパク質はピレノイドから排除されていることが分かり⁴⁴⁾、LLPS によって生じる表面張力がピレノイドへ移行するタンパク質の選抜に関わる可能性が示唆されている⁴⁵⁾。さらに、ピレノイド欠損株の解析から、ピレノイドは炭酸固定の場としてだけでなく、CCM 関連タンパク質の蓄積や代謝の制御に影響を与えることも分かってきた⁴⁶⁾。

8. クラミドモナスの Ci 輸送・濃縮モデル

上記の変異株の表現型解析、変異原因遺伝子の同定、葉緑体内構造、CCM の誘導に伴って発現する遺伝子群の情報から⁴⁷⁻⁴⁹⁾、クラミドモナスの Ci 輸送・濃縮経路に関して、以下のような分子メカニズムが推定されている。

i) 細胞外から葉緑体ストロマへの Ci 輸送

VLC 条件では、Ci は主に HCO₃⁻ の形で輸送され则认为られている。HCO₃⁻ の輸送には細胞膜に局在する ATP-binding cassette (ABC) 型輸送体 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-CO₂ inducible protein A (LCIA) が協調して働く⁵⁰⁻⁵²⁾。ATPase の阻害剤であるバナジン酸を添加すると CCM 駆動時における HCO₃⁻ 依存的な光合成が阻害され⁵³⁾、VLC 条件ではミトコンドリアが細胞膜近傍へ移動することから⁵⁴⁾、HLA3 はミトコンドリアから供給される ATP のエネルギーを利用して HCO₃⁻ を輸送することが示唆される。また、細胞膜に局在する膜タンパク質 low-CO₂ inducible protein 1 (LCI1) も Ci 輸送に関わり⁵⁵⁾、HLA3 とタンパク質間相互作用することが報告されているが⁴⁴⁾、LCI1 が HCO₃⁻ と CO₂ のどちらの輸送に関わるのかは明らかでない。

LC 条件では、Ci は主に CO₂ の形で輸送され则认为られている。CO₂ 輸送体はまだ明らかでないが、ストロマに流入した CO₂ は後述する LCIB/LCIC 複合体によって HCO₃⁻ へ変換され则认为られている。LC 条件と VLC 条件で発現誘導される遺伝子群に違いが認められないことから⁴⁹⁾、LC 条件では HLA3 と LCIA の HCO₃⁻ 輸送活性が翻訳後調節やアロステリック調節によって不活性化される可能性がある⁵⁶⁾。

HC 条件では、ヒト赤血球膜に存在する Rhesus (Rh) の相同タンパク質 Rh-1 が細胞膜に局在し、CO₂ の受動的な取り込みを担う⁵⁷⁾。Rh-1 の発現は HC 条件で誘導され、VLC 条件では抑制される。HC 条件における発現を RNAi によって抑制させた株では、HC 条件で生育が遅延し、VLC 条件では違いが見られないことから、Rh-1 は VLC 条件で誘導される CCM の Ci 輸送には直接関わらないと考えられる。

ii) Ci プールの形成

光照射条件における葉緑体ストロマの pH は約 8.0 の弱アルカリ性に保たれているため、輸送された Ci は主に HCO₃⁻ の分子種で存在し、葉緑体包膜に囲まれた Ci プールを形成する。CO₂ は生体膜を容易に透過するため、細胞外への漏出を避

けるには CO_2 が迅速に HCO_3^- へ変換されることが重要である。ストロマにおける CO_2 から HCO_3^- への変換反応には、 β -CA である CAH6 が関与すると考えられてきたが⁵⁸⁾、CAH6 は鞭毛に局在することが報告され⁴⁴⁾、モデルの修正が必要になった。最近になって、low- CO_2 inducible protein B (LCIB) の相同タンパク質かつ相互作用因子である LCIC が、亜鉛を配位した β -CA 型の反応中心構造を持つことが明らかになり⁵⁹⁾、LCIB/LCIC 複合体がストロマにおける Ci プールの維持に関わると推定されている。しかし、大腸菌でタンパク質合成した LCIB、LCIC、LCIB/LCIC 複合体の *in vitro* における CA 活性は検出されなかったため⁵⁹⁾、*in vivo* では葉緑体ストロマの $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 比に応じて CA 活性のオン・オフを調節するような制御機構がある可能性が示唆されている。

iii) ストロマからチラコイド膜ルーメンへの HCO_3^- 輸送

葉緑体ストロマにある HCO_3^- は、チラコイド膜に局在する HCO_3^- 輸送体あるいはチャネルを介して、ストロマからチラコイド膜ルーメンへと輸送されると考えられている。この輸送体あるいはチャネルはまだ明らかでないが、その候補として LCIB と相互作用する因子でチラコイド膜に局在が予測されるベストロフィンの相同タンパク質が報告されている⁴⁴⁾。卵黄状黄斑ジストロフィー（ベスト病）の原因遺伝子として同定されたベストロフィンは、その相同タンパク質がほぼすべての生物群で保存されているアニオンチャネルである。シロイヌナズナのベストロフィン相同タンパク質は、チラコイド膜に局在する Cl^- チャネルとして H^+ 濃度勾配形成により生じる膜電位を打ち消し、プロトン駆動力の調節に関わる⁶⁰⁾。クラミドモナスでは、LC/VLC 条件で発現が誘導されるベストロフィン相同遺伝子が複数見出されている⁴⁷⁾。遺伝子重複により変異株の表現型は解析が難しいが、今後はゲノム編集を用いた多重遺伝子破壊株の作出による機能解析が期待される。

iv) チラコイド膜ルーメンにおける HCO_3^- から CO_2 への変換

光照射下で、チラコイド膜ルーメン内はプロトンの流入により約 pH 5 の酸性に傾いている。そのため、 HCO_3^- と CO_2 の平衡は CO_2 側に偏っており、輸送された HCO_3^- はルーメンに局在する α -CA である CAH3 によって容易に CO_2 へ変換される⁶¹⁾。CAH3 が CCM の機能に必須であることは、その変異株の解析により示された。*cal-3/cia3* 株は HC 条件では正常に生育できるが、LC あるいは VLC 条件において生育が停止する。また、*cal-3/cia3* 株は HCO_3^- の輸送は正常だが、Rubisco へ供給するための HCO_3^- から CO_2 への変換が損なわれているため、細胞内に大きな Ci プールが形成される⁶¹⁻⁶⁴⁾。

v) ピレノイドへの CO_2 の拡散と Rubisco による固定

上述したように、チラコイド膜の一部はピレノイドチューブとしてピレノイドに貫入している。また、CAH3 は HC 条件ではストロマのチラコイド膜ルーメンで PSII と相互作用しているが、CCM 駆動時にはピレノイド内（ピレノイドチューブのルーメン）に局在を変化させ、この移動には CAH3 のリン酸化が関わることを示唆されている⁶⁵⁾。従って、CAH3 によって変換された CO_2 はピレノイドチューブを介して容易にピレノイド内部に拡散し、Rubisco によって固定される。

vi) ピレノイドから漏れ出た CO_2 の再利用

Rubisco によって固定されなかった CO_2 は葉緑体から細胞質側へ漏出する可能性がある。これを防ぐために、ピレノイドの周囲で CO_2 をトラップし HCO_3^- に再変換する機構が推定されている。興味深いことに、LCIB と LCIC は LC 条件では葉緑体ストロマに分散しているが、VLC 条件ではその局在を変化させ、ピレノイドの周りに集合する^{31,66)}。従って、 β -CA 型の反応中心構造を持つ LCIB/LCIC 複合体がピレノイドから漏れ出た CO_2 を HCO_3^- に変換することで、 CO_2 を再利用するモデルが提唱されている³¹⁾。

9. CCM を誘導するシグナル

真核生物において、CCM を誘導するシグナルの実体はいまだに明らかでない。単純に細胞内あ

るいは細胞外の Ci 濃度の低下がシグナルであるとする以外にも諸説ある。例えば、光呼吸酵素をコードする Phosphoglycolate phosphatase 1 (*PGPI*) と Glycolate dehydrogenase 1 (*GDHI*) の欠損変異株は CCM が駆動できずに生育が停止し⁶⁷⁻⁶⁹⁾、これらの遺伝子の発現は CO_2 欠乏条件で一過的に誘導されることから^{47,49)}、光呼吸経路の活性やその代謝産物が CCM の誘導に必要であることが示唆されている。また、DCMU の添加によりペリプラズム炭酸脱水酵素をコードする *CAH1* と *LCII* の発現誘導が抑制され^{19,70,71)}、細胞内への Ci 濃縮が阻害されることから⁹⁾、電子伝達鎖におけるレドックス状態の変化が CCM を誘導するシグナルの出発点である可能性も考えられる。また概日リズムが CCM の誘導に関わることも示唆されている⁷²⁾。近年、分子遺伝学的なアプローチにより、CCM の制御に関わる因子が以下のように複数同定されてきた。

10. CCM1/CIA5 と LCR1 による CO_2 シグナル伝達カスケード

生育に高 CO_2 が必要な CO_2 要求性変異株 *cia5* 株⁷³⁾と C16 株⁷⁴⁾は最初に単離された CCM 調節変異株であり、その変異原因遺伝子として Zn^{2+} 結合タンパク質をコードする CCM1/CIA5 が同定された^{75, 76)}。CCM1/CIA5 は、mRNA ならびにタンパク質レベルで CO_2 濃度条件に関わらず恒常的に発現しており、*in vivo* で約 280-500 kDa の高分子複合体を形成する⁷⁷⁾。また、CCM1/CIA5 は CO_2 濃度条件に関わらず核に局在することから、CCM1/CIA5 が核内で転写因子複合体として機能することが示唆されている⁷⁸⁾。CCM1/CIA5 の変異株では、LC/VLC 条件で誘導される多くの遺伝子群 (*LCIA*、*LCIB*、*LCIC*、*HLA3*、*CAH1*、*LCII* など) の発現誘導が損なわれていることから、CCM1/CIA5 が CO_2 のシグナル伝達の最上流に位置するマスターレギュレーターであると推定されているが^{49,78,79)}、実際に CCM1/CIA5 が CO_2 あるいは HCO_3^- と結合してセンサーとして機能しているかどうかは不明である。マイクロ流体デバイスを用いた実験から、クラミドモナスは約 30 mM の HCO_3^- に対して正の走化性を示すが、

cia5 株ではこの走化性が失われたという興味深い結果も報告されている⁸⁰⁾。

ペリプラズム層に局在する CA をコードする *CAH1* のプロモーター配列を用いたレポーターアッセイから、*CAH1* と *LCII* の発現制御を担う MYB 転写因子 low- CO_2 stress response 1 (LCR1) が同定された⁸¹⁾。LCR1 はそれ自身が CCM1/CIA5 によって発現制御を受けることから、LCR1 は CO_2 シグナルを増幅し、下流の遺伝子に伝える transmitter として機能すると考えられている。

11. 葉緑体から核へのレトログレードシグナルによる CCM 遺伝子の転写制御

CO_2 欠乏条件下で生育できない表現型を指標としたクラミドモナス変異株のスクリーニングにより、HLA3 と LCIA の蓄積量が低下した変異株 H82 が単離された⁸²⁾。H82 株の原因遺伝子は、植物に特有な Ca^{2+} 結合タンパク質 calcium sensing receptor (CAS) のオルソログをコードしていた⁸³⁾。CAS は疎水領域を挟んで N 末端側に Ca^{2+} 結合領域、C 末端側に機能未知の rhodanase-like ドメインを持つ⁸⁴⁾。

H82 株における HLA3 と LCIA の蓄積量の低下は、HLA3 と LCIA が転写レベルで抑制されていることによる⁸³⁾。興味深いことに、VLC 条件に移して 20 分後では、H82 株でも野生株と同様に 2 つの遺伝子の転写は誘導されるが、2 時間後にはその発現量が維持されない。従って、CAS は CCM1/CIA5 によって初期に転写誘導された HLA3 と LCIA の発現維持に関わると考えられる。

CAS の細胞内局在は、HC 条件では葉緑体全体に分散するが、VLC 条件ではピレノイドチューブに沿ってピレノイド内部へと集合する^{83,85)}。この時、ピレノイド内部の Ca^{2+} 濃度も上昇していることから、CAS はピレノイド内で Ca^{2+} と結合して、何らかのシグナルを発信していると考えられる。すなわち、CAS を介したピレノイドから核へのレトログレードシグナルが、HLA3 と LCIA の転写の維持に関わり、CCM の制御に関わるというモデルが考えられる (図 2)。藻類の CCM は主に CO_2 の濃度変化により制御されると多くの研究者が考えてきたが、CAS が CCM を制御す

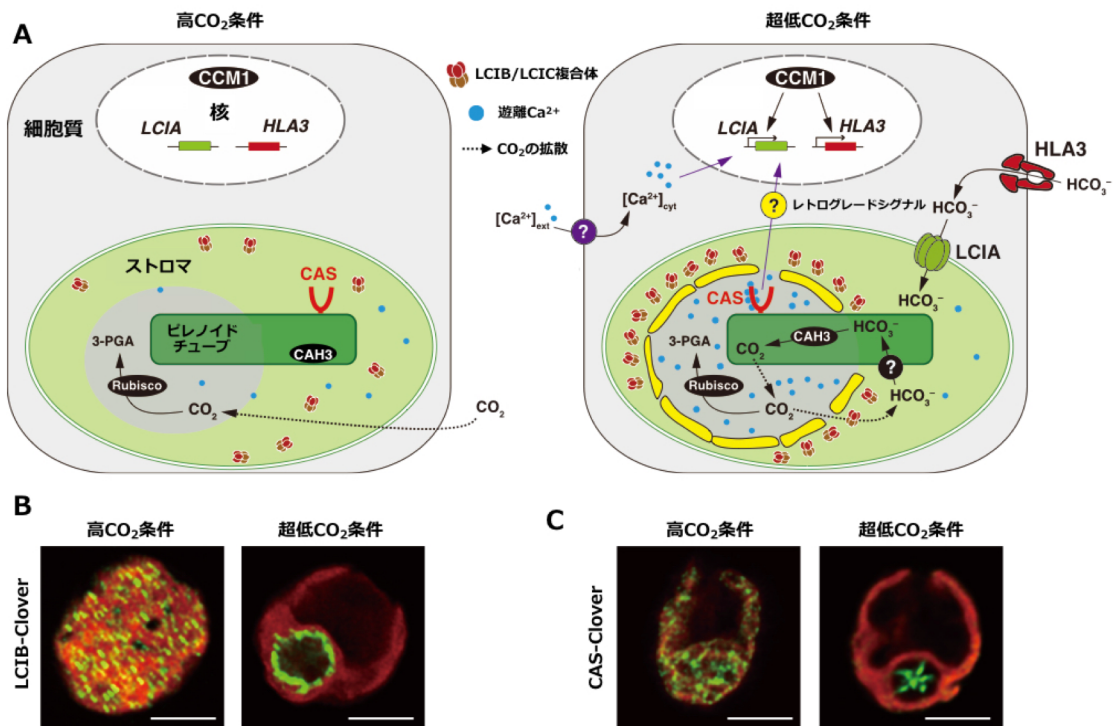


図2.

(A) 緑藻クラミドモナスにおける CCM の駆動と制御のモデル。黒丸で示したチラコイド膜に局在する重炭酸イオン輸送体/チャネル、黄丸で示したレトログレードシグナル、紫丸で示したカルシウムチャネルに関しては未解明である。(B) CCM の駆動に重要な LCIB の葉緑体内局在変化。Clover は改変型 GFP。スケールバーは 5 μm 。(C) CCM の制御に重要な CAS の葉緑体内局在変化。スケールバーは 5 μm 。文献 85 の図を改変した。

る発見は「 Ca^{2+} による光合成の制御」という古くて新しい問題を改めて提起するものとなった。

陸上植物の CAS もチラコイド膜に局在し、 CO_2 ガス交換を行う気孔の閉鎖や、葉緑体から核へのレトログレードシグナルにより植物の免疫応答に関わる遺伝子発現を制御することが報告されている^{86,87)}。つまり、CAS による葉緑体を介したレトログレードシグナルは、緑色植物の進化の途上で共生により緑藻が出現した早い段階ですでに獲得されていたことが示唆される。また、藻類の CO_2 濃縮と陸上植物の CO_2 ガス交換といった、光合成維持のための CO_2 の獲得が、CAS という共通の因子で制御され、植物進化の過程で保存されていることも分かってきた。今後は、 Ca^{2+} と

CO_2 のシグナル伝達のクロストークを調べることで、緑色植物が持つ光合成の調節機構の進化と多様性が解明できると期待される。

12. おわりに

これまでに述べた数多くの研究によって、緑藻の CCM における駆動と制御の全体像が少しずつ明らかになってきた。とはいえ、まだ未解明な点が多く残されている。例えば、チラコイド膜に局在することが予測される HCO_3^- 輸送体/チャネルや、ピレノイドから核へのレトログレードシグナルの実態は不明である。環境中の CO_2 濃度に応答してピレノイドの内部や周囲へと局在を変化させる LCIB や CAS の局在変化の制御機構につ

いても不明である。また、ピレノイドそのものの機能や、その構築に関わる因子についても明らかでない点が多い。ピレノイドの分裂様式の解明や、藻類におけるピレノイドの多様性と陸上植物におけるその消失の謎は、相分離されたオルガネラの性質が植物の進化の過程でどのように変遷していったのかを明らかにする上でも重要な課題である⁸⁸⁾。

このような現象を理解するためには、明確な表現型を持つ変異株を用いた順遺伝学的解析は依然として重要である。しかし、細胞内のタンパク質の局在やオルガネラの形態などの観察によって表現型を記述する必要がある場合は、顕微鏡による変異株スクリーニングに非常に時間がかかるという問題がある。最近筆者らは、蛍光顕微鏡・計算機による機械学習・セルソーターの三者を統合した「インテリジェント画像活性細胞選抜法」によって、機械ベースのクラミドモナス高速変異株スクリーニングが可能であることを示した⁸⁹⁾。今後は、このような先端技術を取り入れることで、光合成分野における CCM 研究がさらに加速することが期待される。

Received Mar 21, 2019; Accepted Apr 3, 2019; Published Apr 30, 2019.

参考文献

1. Hanba, Y.T., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I., Katsuhara, M. (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol.* 45, 521–529.
2. Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P. (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237–240.
3. 宝月 大輔、宮地 重遠 (1976) 「炭酸ガスと光合成」 34 巻 5 号 279–286.
4. Moroney, J.V., Ynalvez, R.A. (2007) Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 6, 1251–1259.
5. Jordan, D.B., Ogren, W.L. (1981) Species variation in the specificity of ribulose-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Nature* 291, 513–515.
6. Vance, P., Spalding, M.H. (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.
7. Jones, H.G. (1992) Plants and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology. Second edition, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
8. Hogetsu, D., Miyachi, S. (1977) Effects of CO₂ concentration during growth on subsequent photosynthetic CO₂ fixation in *Chlorella*. *Plant Cell Physiol.* 18, 347–352.
9. Badger, M.R., Kaplan, A., Berry, J.A. (1980) Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for a carbon dioxide concentrating mechanism. *Plant Physiol.* 66, 407–413.
10. Price, G.D., Howitt, S.M. (2014) Plant science: Towards turbocharged photosynthesis. *Nature* 513, 497–498.
11. Badger, M.R., Price, G.D. (2003) CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 54, 609–622.
12. Raven, J.A. (1997) Putting the C in phycology. *Eur. J. Phycol.* 32, 319–333.
13. Giordano, M., Beardall, J., Raven, J.A. (2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 99–131.
14. Fukuzawa, H., Ogawa, T., Kaplan, A. (2012) The uptake of CO₂ by cyanobacteria and microalgae. In photosynthesis "Plastid biology, energy conversion and carbon assimilation" (Ed. by Eaton-rye J.J., Tripathy B. C., and Sharkey T.D.) Springer, Advances in photosynthesis and respiration 34, 625–650.
15. Shiraiwa, Y., Miyachi, S. (1979) Enhancement of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylation reaction by carbonic anhydrase. *FEBS Lett.* 106, 243–246.
16. Tsuzuki, M., Miyachi, S. (1979) Effects of CO₂ concentration during growth and ethoxymethylamine on CO₂ compensation point in *Chlorella*. *FEBS Lett.* 103, 221–223.
17. Kaplan, A., Badger, M.R., Berry, J.A. (1980) Photosynthesis and the intracellular inorganic carbon

- pool in the bluegreen alga *Anabaena variabilis* - Response to external CO₂ concentration. *Planta* 149, 219–226.
18. Kamo, T., Shimogawara, K., Fukuzawa, H., Muto, S., Miyachi, S. (1990) Subunit constitution of carbonic anhydrase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 192, 557–562.
19. Fukuzawa, H., Fujiwara, S., Yamamoto, Y., Dionisio-Sese, M. L., Miyachi, S. (1990) cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: Regulation by environmental CO₂ concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4383–4387.
20. Fukuzawa, H., Suzuki, E., Komukai, Y., Miyachi, S. (1992) A gene homologous to chloroplast carbonic anhydrase (*icfA*) is essential to photosynthetic carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4437–4441.
21. Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J. et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245–250.
22. Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda. (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* 148, 1821–1828.
23. Yamano, T., Iguchi, H., Fukuzawa, H. (2013) Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 691–694.
24. Jinkerson, R.E., Jonikas, M.C. (2015) Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *Plant J.* 82, 393–412.
25. Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S.S., Blum, S.R., et al. (2016) An indexed, mapped mutant library enables reverse genetics studies of biological processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 28, 367–387.
26. 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.
27. Dutcher, S.K. (1995) Mating and tetrad analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods Cell Biol.* 47, 531–540.
28. 福澤 秀哉、山野 隆志、梶川 昌孝 (2012) 「緑藻 クラミドモナスにおける無機炭素濃縮機構と脂質代謝」 光合成研究 22, 174–184.
29. Wang, Y., Spalding, M.H. (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.
30. Wang, Y., Spalding, M.H. (2006) An inorganic carbon transport system responsible for acclimation specific to air levels of CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10110–10115.
31. 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.
32. Uniacke, J., Zerges, W. (2007) Photosystem II assembly and repair are differentially localized in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 19, 3640–3654.
33. Ramazanov, Z., Rawat, M., Henk, M.C., Mason, C.B., Matthews, S.W., Moroney, J.V. (1994) The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 195, 210–216.
34. Sager, R., Palade, G.E. (1954) Chloroplast structure in green and yellow strains of *Chlamydomonas*. *Exp. Cell Res.* 7, 584–588.
35. Engel, B.D., Schaffer, M., Cuellar, L.K., Villa, E., Plitzko, J.M., Baumeister, W. (2015) Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography. *eLife* 4, e04889.
36. Küken, A., Sommer, F., Yaneva-Roder, L., Mackinder, L.C.M., Höhne, M., et al. (2018) Effects of microcompartmentation on flux distribution and metabolic pools in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *eLife* 7, e37960.
37. Ohad, I., Siekevitz, P., Palade, G.E. (1967) Biogenesis of chloroplast membranes I. Plastid differentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii*). *J. Cell Biol.* 35, 521–552.
38. Freeman Rosenzweig, E.S., Xu, B., Kuhn Cuellar, L., Martinez-Sanchez, A., Schaffer, M., et al. (2017) The eukaryotic CO₂-concentrating organelle is liquid-like

- and exhibits dynamic reorganization. *Cell* 171, 148–162.
39. Mackinder, L.C.M., Meyer, M.T., Mettler-Altmann, T., Chen, V.K., Mitchell, M.C., et al. (2016) A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 5958–5963.
 40. Zhan, Y., Marchand, C.H., Maes, A., Mauries, A., Sun, Y., et al. (2018) Pyrenoid functions revealed by proteomics in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* 13, e0185039.
 41. Somanchi, A., Handley, E.R., Moroney, J.V. (1998) *Chlamydomonas reinhardtii* cDNAs upregulated in low-CO₂ conditions: expression and analyses. *Can. J. Bot.* 76, 1003–1009.
 42. Turkina, M.V., Blanco-Rivero, A., Vainonen, J.P., Vener, A.V., Villarejo, A. (2006) CO₂ limitation induces specific redox-dependent protein phosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics* 6, 2693–2704.
 43. Wunder, T., Cheng, S.L.H., Lai, S.K., Li, H.Y., Mueller-Cajar, O. (2018) The phase separation underlying the pyrenoid-based microalgal Rubisco supercharger. *Nat. Commun.* 9, 5076.
 44. Mackinder, L.C.M., Chen, C., Leib, R.D., Patena, W., Blum, S.R., et al. (2017) A spatial interactome reveals the protein organization of the algal CO₂-concentrating mechanism. *Cell* 171, 133–147.
 45. Bergeron-Sandoval, L.P., Safaei, N., Michnick, S.W. (2016) Mechanisms and consequences of macromolecular phase separation. *Cell* 165, 1067–1079.
 46. Mitchell, M.C., Metodieva, G., Metodiev, M.V., Griffiths, H., Meyer, M.T. (2017) Pyrenoid loss impairs carbon-concentrating mechanism induction and alters primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Bot.* 68, 3891–3902.
 47. 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.
 48. Brueggeman, A.J., Gangadharaiah, D.S., Cserhati, M.F., Casero, D., Weeks, D.P., Ladunga, I. (2012) Activation of the carbon concentrating mechanism by CO₂ deprivation coincides with massive transcriptional restructuring in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 24, 1860–1875.
 49. Fang, W., Si, Y., Douglass, S., Casero, D., Merchant, S.S., Pellegrini, M., et al. (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.
 50. Duanmu, D., Miller, A. R., Horken, K. M., Weeks, D. P., Spalding, M. H. (2009) Knockdown of limiting-CO₂-induced gene HLA3 decreases HCO₃⁻ transport and photosynthetic Ci affinity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5990–5995.
 51. Gao, H., Wang, Y., Fei, X., Wright, D.A., Spalding, M.H. (2015) Expression activation and functional analysis of HLA3, a putative inorganic carbon transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 82, 1–11.
 52. 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. U. S. A.* 112, 7315–7320.
 53. Karlsson, J., Ramazanov, Z., Hiltonen, T., Gardeström, P., Samuelsson, G. (1994) Effect of vanadate on photosynthesis and the ATP/ADP ratio in low-CO₂-adapted *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Planta* 192, 46–51.
 54. Geraghty, A.M., Spalding, M.H. (1996) Molecular and structural changes in *Chlamydomonas* under limiting CO₂ (a possible mitochondrial role in adaptation). *Plant Physiol.* 111, 1339–1347.
 55. Ohnishi, N., Mukherjee, B., Tsujikawa, T., Yanase, M., Nakano, H., et al. (2010) Expression of a low CO₂-inducible protein, LCII, increases inorganic carbon uptake in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 22, 3105–3117.
 56. Wang, Y., Stessman, D.J., Spalding, M.H. (2015) The CO₂ concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO₂: how *Chlamydomonas* works against the gradient. *Plant J.* 82, 429–448.
 57. 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. U. S. A.* 101, 7787–7792.
 58. Mitra, M., Lato, S.M., Ynalvez, R.A., Xiao, Y., Moroney, J.V. (2004) Identification of a new chloroplast carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 135, 173–182.

59. Jin, S., Sun, J., Wunder, T., Tang, D., Cousins, A.B., et al. (2016) Structural insights into the LCIB protein family reveals a new group of β -carbonic anhydrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 14716–14721.
60. Herdean, A., Teardo, E., Nilsson, A.K., Pfeil, B.E., Johansson, O.N., et al. (2016) A voltage-dependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants. *Nat. Commun.* 7, 11654.
61. Karlsson, J., Clarke, A.K., Chen, Z.Y., Huggins, S.Y., Park, Y.I., et al. (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.
62. Spalding, M.H., Spreitzer, R.J., Ogren, W.L. (1983) Carbonic anhydrase-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* requires elevated carbon dioxide concentration for photoautotrophic growth. *Plant Physiol.* 73, 268–272.
63. Funke, R.P., Kovar, J.L., Weeks, D.P. (1997) Intracellular carbonic anhydrase is essential to photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* at atmospheric levels of CO₂. Demonstration via genomic complementation of the high-CO₂-requiring mutant ca-1. *Plant Physiol.* 114, 237–244.
64. Moroney, J.V., Tolbert, N.E., Sears, B.B. (1986) Complementation analysis of the inorganic carbon concentrating mechanisms of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* 204, 199–203.
65. Blanco-Rivero, A., Shutova, T., Román, M.J., Villarejo, A., Martinez, F. (2012) Phosphorylation controls the localization and activation of the luminal carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* 7, e49063.
66. Duanmu, D., Wang, Y., Spalding, M.H. (2009) Thylakoid lumen carbonic anhydrase (CAH3) mutation suppresses air-dier phenotype of LCIB mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 149, 929–937.
67. Suzuki, K., Marek, L.F., Spalding, M.H. (1990) A photorespiratory mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 93, 231–237.
68. Mamedov, T.G., Suzuki, K., Miura, K., Kucho, K., Fukuzawa, H. (2001) Characteristics and sequence of phosphoglycolate phosphatase from a eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 276, 45573–45579.
69. Nakamura, Y., Kanakagiri, S., Van, K., He, W., Spalding, M.H. (2005) Disruption of the glycolate dehydrogenase gene in the high-CO₂-requiring mutant HCR89 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Can. J. Bot.* 83, 820–833.
70. Dionisio-Sese, M.L., Fukuzawa, H., Miyachi, S. (1990) Light-induced carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 94, 1103–1110.
71. Im, C.S., Grossman, A.R. (2002) Identification and regulation of high light-induced genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 30, 301–313.
72. Mitchell, M.C., Meyer, M.T., Griffiths, H. (2014) Dynamics of carbon-concentrating mechanism induction and protein relocalization during the dark-to-light transition in synchronized *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 166, 1073–1082.
73. Moroney, J.V., Husic, H.D., Tolbert, N.E., Kitayama, M., Manuel, L.J., Togasaki, R.K. (1989) Isolation and characterization of a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in the CO₂ concentrating mechanism. *Plant Physiol.* 89, 897–903.
74. Fukuzawa, H., Ishizaki, K., Miura, K., Matsueda, S., Inoue, T., et al. (1998) Isolation and characterization of high-CO₂ requiring mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* by gene tagging. *Can. J. Bot.* 76, 1092–1097.
75. Fukuzawa, H., Miura, K., Ishizaki, K., Kucho, K., Saito, T., et al. (2001) *Ccm1*, a regulatory gene controlling the induction of a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* by sensing CO₂ availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5347–5352.
76. Xiang, Y., Zhang, J., Weeks, D.P. (2001) The *Cia5* gene controls formation of the carbon concentrating mechanisms in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5341–5346.
77. 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.
78. Wang, Y., Sun, Z., Horken, K.M., Im, C.S., Xiang, Y., et al. (2005) Analysis 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.
79. Miura, K., Yamano, T., Yoshioka, S., Kohinata, T., Inoue, Y. et al. (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.
80. Choi, H.I., Kim, J.Y., Kwak, H.S., Sung, Y.J., Sim, S.J. (2016) Quantitative analysis of the chemotaxis of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, to bicarbonate using diffusion-based microfluidic device. *Biomicrofluidics* 10, 014121.
81. 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.
82. 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.
83. Wang, L., Yamano, T., Takane, S., Niikawa, Y., Toyokawa, C., et al. (2016) Chloroplast-mediated regulation of CO₂-concentrating mechanism by Ca²⁺-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12586–12591.
84. Han, S., Tang, R., Anderson, L.K., Woerner, T.E., Pei, Z. M. (2003) A cell surface receptor mediates extracellular Ca²⁺ sensing in guard cells. *Nature* 425, 196–200.
85. 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.
86. Nomura, H., Komori, T., Kobori, M., Nakahira, Y., Shiina, T. (2008) Evidence for chloroplast control of external Ca²⁺-induced cytosolic Ca²⁺ transients and stomatal closure. *Plant J.* 53, 988–998.
87. Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., et al. (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 3, 926.
88. 田中厚子 (2019) 「水圏の光合成を支える動的で柔らかいピレノイド」藻類 第67巻 第1号 5–10.
89. Nitta, N., Sugimura, T., Isozaki, A., Mikami, H., Hiraki, K., et al. (2018) Intelligent image-activated cell sorting. *Cell* 175, 266–276.
90. Spalding, M.H., Spreitzer, R.J., Ogren, W.L. (1983) Reduced inorganic carbon transport in a CO₂-requiring mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 73, 273–276.
91. Suzuki, K., Spalding, M.H. (1989) Adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii* high-CO₂-requiring mutants to limiting-CO₂. *Plant Physiol.* 90, 1195–1200.
92. Rolland, N., Dorne, A.J., Amoroso, G., Sültemeyer, D.F., Joyard, J., Rochaix, J.D. (1997) Disruption of the plastid *ycf10* open reading frame affects uptake of inorganic carbon in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* 16, 6713–6726.
93. Mariscal, V., Moulin, P., Orsel, M., Miller, A.J., Fernández, E., Galván, A. (2006) Differential regulation of the *Chlamydomonas* *Nar1* gene family by carbon and nitrogen. *Protist* 157, 421–433.
94. Machingura, M.C., Bajsa-Hirschel, J., Laborde, S.M., Schwartzenburg, J.B., Mukherjee, B., et al. (2017) Identification and characterization of a solute carrier, CIA8, involved in inorganic carbon acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Bot.* 68, 3879–3890.
95. Miura, K., Kohinata, T., Yoshioka, S., Ohya, K., Fukuzawa, H. (2002) Regulation of a carbon concentrating mechanism through CCM1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Funct. Plant Biol.* 29, 211–219.
96. Suzuki, K. (1995) Phosphoglycolate phosphatase-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* capable of growth under air. *Plant Cell Physiol.* 36, 95–100.
97. Pollock, S.V., Colombo, S.L., Prout, D.L., Godfrey, A.C., Moroney, J.V. (2003) Rubisco activase is required for optimal photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in a low-CO₂ atmosphere. *Plant Physiol.* 133, 1854–1861.
98. Adams, J.E., Colombo, S.L., Mason, C.B., Ynalvez, R.A., Tural, B., Moroney, J.V. (2005) A mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* that cannot acclimate to low CO₂ conditions has an insertion in the *Hdh1* gene. *Func. Plant Biol.* 32, 55–66.
99. Ma, Y., Pollock, S. V., Xiao, Y., Cunnusamy, K., Moroney, J.V. (2011) Identification of a novel gene, *CIA6*, required for normal pyrenoid formation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 156, 884–896.
100. Ruby, A., Ynalvez, A.C., Moroney, J.V. (2008) Identification and characterisation of a novel inorganic carbon acquisition gene, *CIA7*, from an

insertional mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*.
Funct. Plant Biol. 35, 373–381.

Running and regulation of photosynthetic turbocharger engine in the green alga,
Chlamydomonas reinhardtii

Takashi Yamano and Hideya Fukuzawa

Graduate School of Biostudies, Kyoto University