

「光合成のターボエンジン」CO₂濃縮機構が 葉緑体を介して制御される仕組みを新たに発見

<概要>

福澤秀哉 生命科学研究科教授、王連勇 同教務補佐員、山野隆志 同助教らの研究グループは、基礎生物学研究所、岡山大学、東京農業大学との共同研究により、光合成改良の要となる「CO₂濃縮機構」が、植物特異なカルシウム結合タンパク質によって葉緑体を介して制御されることを明らかにしました。光合成を調節する全く新しいメカニズムの解明につながる成果であるとともに、藻類が持つCO₂濃縮機構を陸上植物に導入し、作物の生産性向上につながるものが期待されます。本成果は、2016年10月17日に米国科学アカデミー紀要(*Proceedings of the National Academy of Science USA*)のオンライン速報版で公開されました。

<背景>

植物は太陽光のエネルギーを利用して水と二酸化炭素(CO₂)から炭素化合物と酸素(O₂)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ます。特に、植物がCO₂を効率的に細胞の中に取り込み、CO₂固定^{注1)}を行うメカニズムを理解することは重要です。この知見は、地球温暖化に関わる大気中のCO₂削減が問題になっている現在、光合成を改良しCO₂を固定する能力を向上させ、CO₂削減に貢献する作物を作ることに利用できると考えられます。

植物の細胞の中には、光合成を活発に行う葉緑体^{注2)}と呼ばれる構造があります。葉緑体の中にはチラコイド膜と呼ばれる袋のような構造があり、その表面に光合成を行う装置がたくさん並んでいます。また葉緑体の中にはRubisco(ルビスコ)と呼ばれる、CO₂固定を行う酵素リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)が大量に存在しています。光合成によりCO₂を固定するためには、CO₂を細胞の外から葉緑体の中のルビスコへ運ぶ必要があります。

陸上植物では、葉の表皮にある気孔が閉じたり開いたりして、CO₂が拡散によって葉緑体の中に取り込まれる量を調節します。一方、水中ではCO₂の拡散速

度は大気中の 10,000 分の 1 に低下し、また CO_2 は水と反応して重炭酸イオン (HCO_3^-) の形で多く存在します。 CO_2 と異なり、電荷を帯びた重炭酸イオンは細胞や葉緑体を覆う生体膜（それぞれ細胞膜と葉緑体包膜と呼ばれる）を通過することができません。従って、水中に生息する藻類は CO_2 を拡散によって細胞内に取り込むことが難しく、 CO_2 が欠乏して光合成に不利な環境にさらされます。藻類はこのような環境においても光合成の活性を維持するために、細胞膜と葉緑体包膜に局在する輸送体^{注3)} を用いて積極的に重炭酸イオンを取り込み、葉緑体の中に濃縮する仕組みを持っています。濃縮された重炭酸イオンは最終的に CO_2 に戻され、ルビスコによって固定されます。 CO_2 濃縮機構と呼ばれるこの仕組みは、ちょうど自動車のターボ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のと似ているため、「光合成のターボエンジン」とも呼ばれています。藻類が持つこの CO_2 濃縮機構は、それを持たない陸上植物の光合成をより効率よく改変するのに利用できると注目されています。

我々は単細胞緑藻クラミドモナス^{注4)} (図 1) を水中で光合成を行う生物のモデルとして研究材料に使い、 CO_2 濃縮機構を駆動するために重要な重炭酸イオン輸送体 HLA3 と LCIA を昨年発見しました (2015 年 5 月 27 日のプレスリリース「藻類の光合成を支える二酸化炭素濃縮システムを解明」を参照)。重炭酸イオン輸送体は CO_2 濃縮に中心的な役割を果たすため、 CO_2 が欠乏して光合成が不利になる時にだけ蓄積するよう、その量は厳密に制御される必要があります。HLA3 と LCIA 遺伝子は、 CO_2 濃縮機構が誘導される CO_2 欠乏条件において素早く転写^{注5)} が誘導され、HLA3 タンパク質と LCIA タンパク質が合成され、それぞれ細胞膜と葉緑体包膜に運ばれます。この転写は、核に局在する CCM1 タンパク質が担うことが分かっていたのですが、 CO_2 濃縮を駆動するのに十分な量の重炭酸イオン輸送体を維持する仕組みは分かっていませんでした。

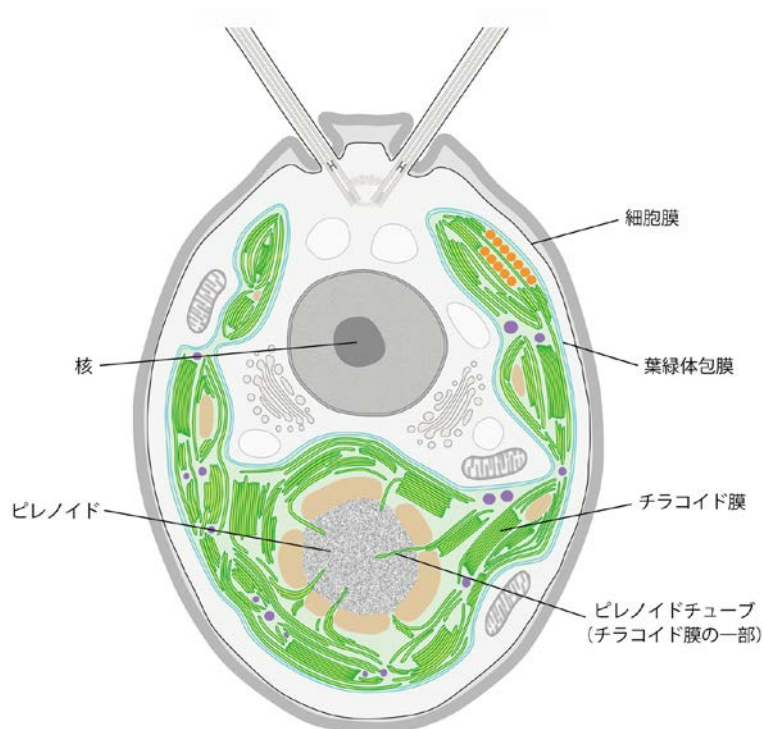


図 1. 緑藻クラミドモナスの細胞内構造（ドイツ マックス・プランク生化学研究所の Benjamin Engel 博士より提供されたものを許可を得て改変）

クラミドモナスはカップ状の葉緑体と核を 1 つずつ持つ単細胞の真核緑藻である。葉緑体は葉緑体包膜に囲まれており、その中にルビスコが凝集したピレノイドと呼ばれる構造を 1 つ持つ。葉緑体の中にはチラコイド膜と呼ばれる袋のような構造がある。ピレノイドにはチラコイド膜が部分的に貫入しており、ピレノイドチューブと呼ばれる。

<成果>

福澤教授らの研究グループは、重炭酸イオン輸送体の量が減少すれば CO_2 濃縮が損なわれ、 CO_2 欠乏条件において生育できなくなるだろうと考えました。そこで、形質転換^{注6)} という手法を用いて、クラミドモナスの DNA を無作為に傷つけた約 20,000 種類の変異株を作出し、その中から生育に高濃度の CO_2 を必要とする変異株を選抜しました。その結果、重炭酸イオン輸送体 HLA3 と LCIA の蓄積量が顕著に減少し、光合成の効率が低下した変異株を単離しました。この変異株では、カルシウムイオン (Ca^{2+}) を結合するタンパク質^{注7)} CAS をコードする遺伝子が欠損していました (図 2 A, B)。

Ca^{2+} は細胞の様々な機能を調節するための情報伝達物質として知られています。これまで、 Ca^{2+} は光合成の酸素発生複合体の構成因子であり、光合成の調節にも関わることは知られていましたが、 Ca^{2+} が CO_2 濃縮機構の制御にも関わ

ることが今回初めて明らかになりました。実際に細胞内の Ca^{2+} 濃度を攪乱する薬剤を野生株に添加すると、HLA3 と LCIA の蓄積量が減少し、 CO_2 を濃縮する能力が損なわれ、光合成の効率が低下しました (図 2C)。このことから、CAS が媒体となりカルシウムのシグナル伝達が核における *HLA3* と *LCIA* の発現に伝わり、 CO_2 濃縮機構を調節していることが分かりました。

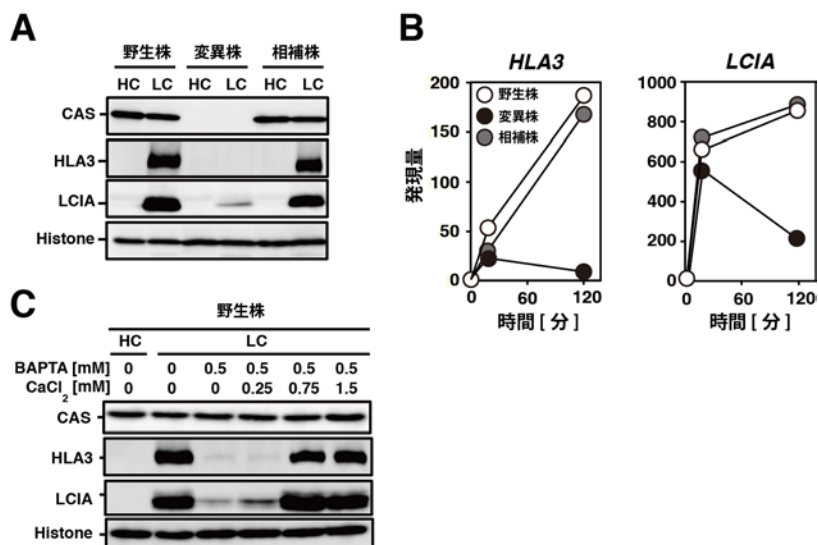


図 2. カルシウム結合タンパク質 CAS は重炭酸イオン輸送体の発現と蓄積を制御する

(A) 野生株、変異株、相補株における CAS、HLA3、LCIA タンパク質の蓄積。変異株では CAS が欠損していると共に、HLA3 と LCIA の蓄積量が顕著に減少した。HC; 高 CO_2 条件、LC; 低 CO_2 条件。(B) 野生株、変異株、相補株における *HLA3* と *LCIA* 遺伝子の発現量。 CO_2 欠乏条件に移して 20 分後では、変異株でも野生株と同様に転写が誘導されたが、120 分後にはその発現量が維持されなかった。(C) 細胞内のカルシウムイオン濃度を攪乱することが知られている薬剤 BAPTA を野生株に加えたときの CAS、HLA3、LCIA タンパク質の蓄積量。数字はその濃度を示す。塩化カルシウム (CaCl_2) を過剰に加え、細胞内のカルシウムイオン濃度を回復させると、変異株における HLA3 と LCIA の蓄積も回復した。

次に、CAS が細胞の中のどこで働くのかを調べました。クラミドモナスは単細胞であるにも関わらず、その細胞内の構造は複雑です (図 1)。葉緑体の中に目立って見える構造はピレノイドと呼ばれ、 CO_2 欠乏条件ではほとんどのルビスコがピレノイドの中に凝集しています。また、一部のチラコイド膜はピレノイドに貫入しており、ピレノイドチューブと呼ばれる構造を取っています。これまでに CAS はチラコイド膜上に局在することが分かっていたましたが、その詳細な場所は不明でした。そこで間接的免疫蛍光染色法^{註8)}を用いて CAS の細胞内局在を調べました (図 4A)。興味深いことに、 CO_2 濃縮機構が誘導されない高 CO_2 (5% CO_2) 条件では CAS は葉緑体全体に分散していましたが、 CO_2 濃縮機

構が誘導される明所かつ低 CO₂ (0.04% CO₂) 条件ではピレノイド内部にチューブ状に局在しました。また CO₂ 濃縮機構が誘導されない暗所では、低 CO₂ 条件にも関わらず葉緑体全体に分散していました。このことから、**CAS は光と CO₂ の濃度変化に依存してその局在を変化させるという非常に興味深い性質を持つことが明らかになりました。**

次に、Ca²⁺の細胞内分布と CAS の細胞内局在との関係を調べるために、細胞内の Ca²⁺濃度を調べることができる指示薬を野生株に添加し、その蛍光を観察しました。明所かつ CO₂ 欠乏条件下ではピレノイド内部のカルシウム濃度が上昇することが分かりました (図 4B)。以上の結果から、**CAS を媒体として Ca²⁺ が葉緑体から核へとシグナルを伝達し、CO₂ 濃縮機構を制御するモデルを提唱しました (図 5)。**

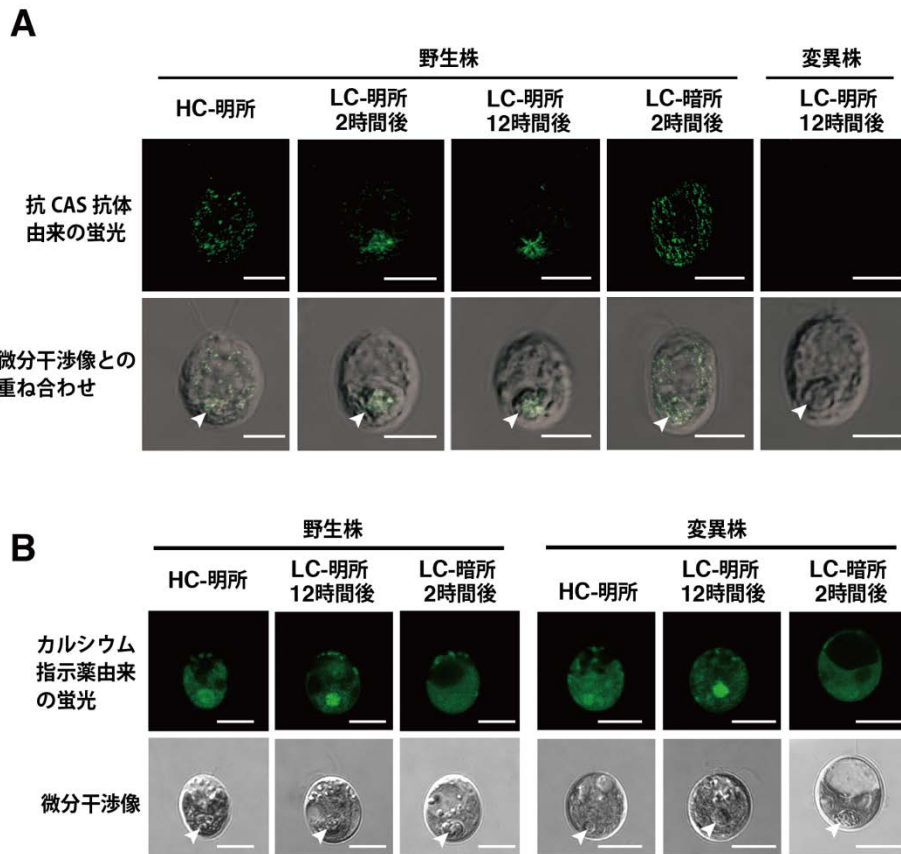


図 3. カルシウム結合タンパク質 CAS の細胞内局在とカルシウムの細胞内分布

(A) CO₂ 濃縮機構が誘導されない高 CO₂ (HC; 5% CO₂) 条件では、CAS は葉緑体全体に局在するが、CO₂ 濃縮機構が誘導される明所かつ低 CO₂ (LC; 0.04% CO₂) 条件では、ピレノイド内部にチューブ状に局在

した。一方、CO₂濃縮機構が誘導されない暗所では、低 CO₂ 条件でも再び葉緑体全体に広がった。(B)細胞内のカルシウムイオン濃度を調べる指示薬に由来する蛍光は、明所かつ CO₂ 欠乏条件下でピレノイド内部で上昇した。このカルシウムイオン濃度の上昇は変異株でも観察されたことから、CAS 非依存的に起こることが分かった。白線はスケールバーで 5 μm を示す。白矢尻は葉緑体の中のピレノイドの位置を示す。

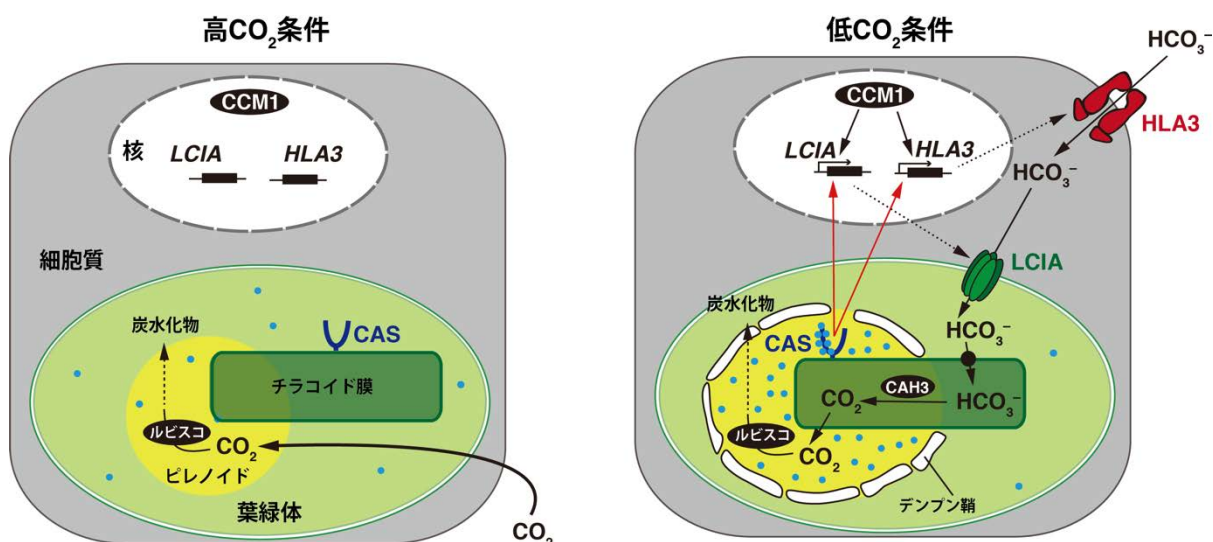


図 4. クラミドモナスの CO₂ 濃縮機構の制御モデル

高 CO₂ 条件では CO₂ 濃縮機構を誘導する必要がないため、核内における HLA3 と LCIA 遺伝子の転写誘導は起こらない。CO₂ 濃縮機構が誘導される明所かつ低 CO₂ 条件にさらされると、まず CCM1 によって HLA3 と LCIA の速やかな転写が誘導される（20 分以内）。さらに葉緑体全体に局在していた CAS はチラコイド膜を介して速やかにピレノイド内部へと局在を変化させ、さらにピレノイド内部のカルシウムイオン（Ca²⁺）濃度が上昇する。CAS が Ca²⁺ と結合し活性化することで、葉緑体から核へとシグナルを伝達する（レトログレードシグナル）。これにより低 CO₂ 条件にさらして 20 分後以降の HLA3 と LCIA の転写量が維持され、合成された HLA3 タンパク質は細胞膜へ、LCIA タンパク質は葉緑体包膜へ局在し、細胞外から葉緑体内へと重炭酸イオンを輸送し、CO₂ 濃縮機構を駆動する。葉緑体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。葉緑体の中の青丸は Ca²⁺ を、チラコイド膜の黒丸はまだ同定されていない重炭酸イオン輸送体を示す。CAH3 は重炭酸イオンを CO₂ へと交換する反応を触媒する炭酸脱水酵素である。

< 研究の意義と今後の展開 >

現在の地球環境は、温暖化・食糧不足・エネルギー枯渇などの様々な問題を抱えています。これに対して、藻類が持つ CO₂ 濃縮機構を利用・改変し、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試みが世界的な競争のなか進められています。例えば、イネやコムギなどの主要作物に CO₂ 濃縮機構を導入し、CO₂ の吸収量と生産量を高めるといった応用研究が進められていますが、生物種間を超えて導入した遺伝子の働きを制御することが難しいなどの技術的な問題も多く、成功していません。本研究で明らかになった藻類

の CO₂濃縮の制御機構に関する新しい知見は、上記の問題を解決するためのブレイクスルーにつながることを期待されます。

生物が環境中の様々なストレスに順化するために、葉緑体やミトコンドリアから核へとシグナルを伝達し、遺伝子群の転写を調節する仕組みはレトログレード（逆行）シグナルと呼ばれます。これまで、葉緑体の機能が核に制御されることは知られていましたが、本研究では藻類の CO₂濃縮機構が葉緑体から核へのレトログレードシグナルによって調節されることを初めて明らかにしました。陸上植物が持つ CAS も葉緑体に局在し、レトログレードシグナルによって植物の免疫応答に関わる遺伝子群の転写を調節していることが分かっています。今後は、コケ植物や多細胞藻類など、他の緑色植物における CAS の働きを調べることで、レトログレードシグナルが制御する植物の多様な生理応答反応が明らかになると期待されます。また、陸上植物が CAS を介したカルシウムシグナル伝達によって気孔の閉鎖を調節し、CO₂の取り込みを調節していることも報告されています。藻類の CO₂濃縮と陸上植物の CO₂ガス交換といった、光合成維持のための CO₂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が分かってきました。Ca²⁺と CO₂のシグナル伝達がどのように影響し合って（シグナル伝達のクロストークと呼ばれる）いるのかを調べることで、緑色植物が持つ光合成の調節機構の進化と多様性を解明できると期待されます。さらに、CAS が光と CO₂の濃度変化に依存して葉緑体の中でその局在を変化させることが、CO₂濃縮の制御に重要であることも分かりました。葉緑体の中を動いて光合成の特性を変化させるような因子は全く報告されておらず、光合成を調節する全く新しいメカニズムの解明につながることを期待されます。

<用語解説>

注1) CO₂固定

炭素固定、炭酸同化とも呼ばれる。植物が光合成で得られたエネルギーを用いて、空気中から取り込んだ CO₂ を同化し、炭素化合物として留めること。

注2) 葉緑体

光合成を行う細胞内小器官。外包膜と内包膜からなる二重の生体膜（葉緑体包膜）に囲まれている。葉緑体の内部は、ストロマと呼ばれる空間で満たされており、チラコイド膜と呼ばれる袋状の膜構造が存在する。

注3) 輸送体

細胞膜や葉緑体包膜などの生体膜を貫通し、膜を通して物質の輸送をするタンパク質の総称。トランスポーターとも言う。

注4) クラミドモナス

単細胞の緑藻の一種。クラミドモナスと言えば *Chlamydomonas reinhardtii*（和名はコナミドリムシ）を指すことが多い。本研究でもこのコナミドリムシを用いている。光合成、鞭毛運動、生殖などの基礎研究だけでなく、バイオ燃料生産を目指した応用研究を含めたモデル生物として世界中で利用されている。

注5) 転写

必要となるタンパク質を必要な時期に正確に合成するために、DNA の塩基配列（遺伝子）を伝令 RNA（mRNA）に写し取る反応。遺伝子の遺伝情報に基づくタンパク質合成反応の第一段階である。

注6) 形質転換

細胞の外部から何らかの DNA を導入し、細胞の遺伝的性質を変えること、またその操作を言う。

注7) カルシウム結合タンパク質

カルシウムイオンを特異的に結合するタンパク質の総称。細胞内におけるシグナル伝達に関わるものが多く、様々な生命現象に関与する。例えば真核生物に共通して存在するカルモジュリンは、炎症、代謝、記憶、免疫など様々な生命現象に関わっている。

注8) 間接的免疫蛍光染色法

抗体を用いて細胞内のタンパク質の局在を調べる手法のひとつ。抗体に蛍光色素を標識し、抗原抗体反応の後で特定の励起波長を当てて蛍光を発色させ、蛍光顕微鏡で観察する。

<論文情報>

Lianyong Wang, Takashi Yamano, Shunsuke Takane, Yuki Niikawa, Chihana Toyokawa, Shin-ichiro Ozawa, Ryutaro Tokutsu, Yuichiro Takahashi, Jun Minagawa, Yu Kanesaki, Hirofumi Yoshikawa, and Hideya Fukuzawa

“Chloroplast-mediated regulation of CO₂-concentrating mechanism by Ca²⁺-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*”, in press

DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1606519113>