

光エネルギー駆動型の CO₂ 能動輸送体による光合成促進の研究 Studies for Enhancement of Photosynthesis by Introduction of a Light-driven CO₂ Transporter

大西紀和、京都大学大学院生命科学研究科、研究員（科学研究）

Norikazu OHNISHI, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Post-doctoral fellow

<研究要旨>

陸生植物は CO₂ 獲得能が低いため、CO₂ の供給が光合成の律速段階となっている。しかしラン藻や緑藻は陸生植物には無い“CO₂ 濃縮機構”と呼ばれるシステムを持っており、空気条件下において CO₂ や重炭酸イオン (HCO₃⁻) を能動的に細胞内に濃縮して最大の光合成能を獲得している (右図)。緑藻クラミドモナスの CO₂ 能動輸送体の実体は 20 年来未解明のままであったが、近年我々は cDNA アレイ解析から光エネルギーにより駆動される CO₂ 輸送体の候補遺伝子を *Lci1*、*Lci6*、*LciA*、*LciB* の 4 つにまで絞ってきた。本研究では、これらの遺伝子産物が光エネルギー駆動型の CO₂ 輸送体であること、遺伝子導入による植物の CO₂ 獲得能と光合成能の向上が可能であることを実証し、樹木への応用を目指す。

<Abstract>

The photosynthetic rate of land plants in their natural habitat is usually limited by the supply of CO₂ of which the concentration is usually lower than that required for the maximal carboxylase activity of Rubisco in natural habitat. In contrast, a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, is able to accumulate inorganic carbon by active CO₂ transport under low CO₂ conditions and maintain an optimal CO₂ concentration for photosynthesis. Although active CO₂ uptake by *Chlamydomonas* cells under low CO₂ conditions has been known for 20 years, CO₂ transporters still remain to be identified. Recently, we identified four candidate of CO₂ transporters (*Lci1*, *Lci6*, *LciA*, and *LciB*) by cDNA macroarray analysis. In this study, we will clarify the identity of the light-driven CO₂ transporter(s) of *Chlamydomonas* and attempt to enhance photosynthesis in land plants by introduction of the CO₂ transporter(s).

1. 研究目的

地球温暖化ガスとして近年注目を集めている CO₂ は、植物にとっては生き延びるための光合成基質として必須である。大気中の CO₂ 濃度が上昇の一途を辿っている今日においても、陸生植物は CO₂ 獲得能が低いため自然界では CO₂ の供給が光合成の律速段階となっている。そのため、最大の光合成能を発揮することは難しく、加えて CO₂ の供給不足は光障害をももたらす。従って、植物の CO₂ 獲得能を向上させることは

地球温暖化の軽減と共に、農作物などの生産量の向上にも繋がると期待される。一方、水圏環境に生育するラン藻や緑藻は、陸生植物には無い“CO₂ 濃縮機構”と呼ばれるシステムを持っており、淡水中では 5-30 mg CO₂ L⁻¹ と幅広く変動する CO₂ 環境において CO₂ が欠乏するような条件においても、無機炭素 (CO₂ や重炭酸イオン) を能動的に細胞内に濃縮して最大の光合成能を獲得している (図 1)。緑藻クラミドモナスの無機炭素濃縮に関わる CO₂ 能動輸送体の実体は 20 年来未解明のままであったが、近年我々

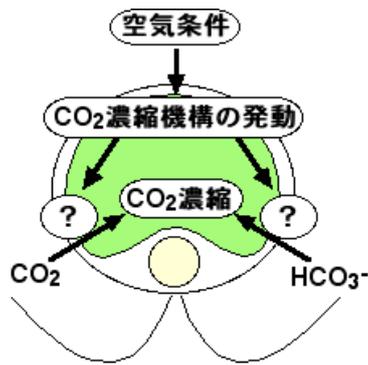


図 1. 緑藻クラミドモナスの CO₂ 濃縮機構のモデル図。緑藻クラミドモナスは空気条件下において CO₂ 濃縮機構を誘導し、CO₂ や重炭酸イオンを細胞内に能動的に取り込む事が知られているが、輸送体の実体は不明のままである。

は cDNA アレイ解析から光エネルギーにより駆動される CO₂ 輸送体の候補遺伝子を *Lci1*、*Lci6*、*LciA*、*LciB* の 4 つにまで絞ってきた。本研究では膜タンパク質をコードする *Lci1* 遺伝子を最終候補とし、この遺伝子産物が光エネルギー駆動型の CO₂ 輸送体であること、遺伝子導入による植物の CO₂ 獲得能と光合成能の向上が可能であることを実証し、樹木への応用を目指す。

2. 研究経過

○*Lci1* を導入したクラミドモナスは CO₂ 輸送能が向上した

CO₂ 輸送体の最終候補として *Lci1* に注目し機能解析を行うために、*Lci1* の発現誘導系を構築した。*Lci1* 遺伝子に硝酸塩誘導性のプロモーターを連結した DNA コンストラクトをゼオシン耐性を与える *Ble* 遺伝子と共に、*Myb* 転写因子 *Lcr1* を欠損した株 (*lcr1* 株) に導入した。*lcr1* 株は、*Cah1*、*Lci1*、*Lci6* の発現を CO₂ 欠乏条件においても誘導できなくなった株である。300 株のゼオシン耐性株を選抜した結果、CO₂ 条件に関わらず培地中の窒素源をアンモニウム塩から硝酸塩に交換することによって *Lci1* の発現を誘導できる形質転換株を得た。CO₂ 余剰条件 (5% CO₂

を含む空気を通気して培養) でアンモニウム塩、または硝酸塩存在下で生育させた細胞の CO₂ 輸送能を Open gas exchange system により測定した。その結果、アンモニウム塩存在下で生育させた細胞に比べ、硝酸塩存在下で生育させた細胞は、より高い CO₂ 輸送活性を示した (図 2)。アンモニウム塩存在下で生育させた細胞は $9.4 \pm 0.4 \mu\text{ml CO}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ の CO₂ 輸送活性を示したのに対し、硝酸塩存在下で生育させ *Lci1* の発現を誘導した細胞の CO₂ 輸送活性は $30.4 \pm 1.3 \mu\text{ml CO}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった。宿主として用いた *lcr1* 株では、CO₂ 輸送活性は培地中の窒素源の影響は受けなかった (表 1)。従って、*Lci1* の発現誘導により CO₂ 輸送活性がおよそ 3 倍に上昇することが示された。

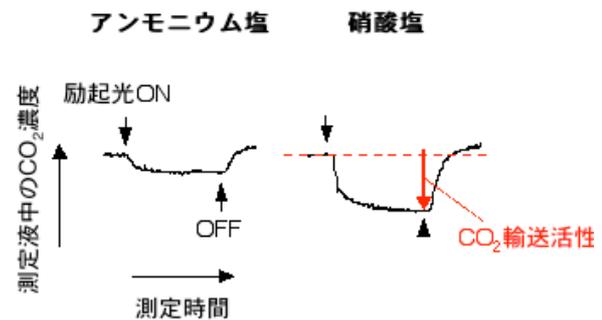


図 2. *Lci1* 導入株の CO₂ 輸送活性。5 $\mu\text{g chlorophyll mL}^{-1}$ の細胞 20 mL に対して 50 ppm CO₂ ガスを通気して、励起光 (2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) を 5 分間照射した時の測定液中の CO₂ 濃度の減少を、CO₂ 輸送活性とした。横軸は測定時間、縦軸は測定液中の CO₂ 濃度を示している。アンモニウム塩で生育させた時と比較して、硝酸塩で生育させた細胞はおよそ 3 倍の CO₂ 輸送活性を示した。

表 1. *lcr1* 株、*Lci1* 導入株の CO₂ 輸送活性

strain	窒素源	CO ₂ 輸送活性
<i>lcr1</i> 株	NH ₄ ⁺	11.6 ± 0.9
	NO ₃ ⁻	15.0 ± 2.7
<i>Lci1</i> 導入株	NH ₄ ⁺	9.4 ± 0.4
	NO ₃ ⁻	30.4 ± 1.3

○*Lci1* は低濃度の重炭酸イオン存在下でも高い光合成活性を与えた

上記の形質転換株について、同様の条件で生育させた細胞について光合成活性の測定も行った。測定液中の無機炭素 (CO₂ および重炭酸イオン) を枯渇させた状態から重炭酸ナトリウムの溶液を光合成基質として加えていき、様々な濃度の無機炭素存在下における光合成活性を測定した。その結果、硝酸塩存在下で生育させた細胞はより低い濃度の重炭酸イオン存在下で高い光合成活性を示した (図 3)。最大光合成活性 (Vmax) の 50%の活性を得るために必要な重炭酸ナトリウムの濃度 (K_{1/2} 値) は、アンモニウム塩存在下ではおよそ 450 μM であったのに対し、硝酸塩存在下では 250 μM であった。飽和濃度 (10 mM) の無機炭素存在下における最大光合成活性は、いずれの株においてもアンモニウム塩、硝酸塩存在下で大きな差は無かった (表 2)。また、宿主として用いた *lcr1* 株では、最大光合成活性 (Vmax)、K_{1/2} 値ともに窒素源の影響は受

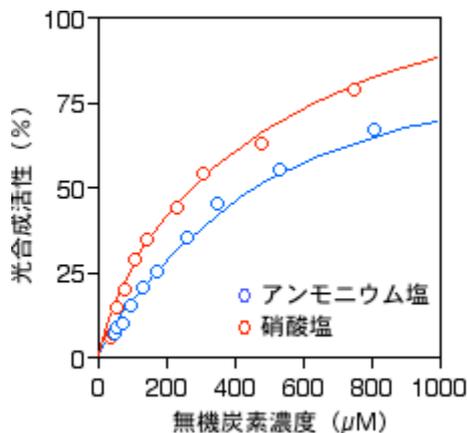


図 3. 光合成活性の無機炭素依存性。20 μg chlorophyll mL⁻¹ に調製した細胞懸濁液に対して、15 mM、150 mM、750 mM の NaHCO₃ 溶液を加えていき、各濃度における光合成活性を酸素発生活性で評価した。横軸は反応液中の無機炭素濃度 (終濃度)、縦軸は飽和濃度の NaHCO₃ 存在下 (10 mM) における光合成活性を 100%とした時の相対値を示している。アンモニウム塩存在下で生育した細胞に比べ硝酸塩存在下で生育させた細胞の方が、より低い濃度の無機炭素濃度において最大光合成活性の 50%に達した。

表 2. *lcr1* 株、*Lci1* 導入株の光合成活性

strain	窒素源	Vmax (μmol O ₂ mgChl ⁻¹ h ⁻¹)	K _{1/2} 値 (μM)
<i>lcr1</i> 株	NH ₄ ⁺	166.6 ± 17.7	456.7 ± 51.3
	NO ₃ ⁻	195.7 ± 16.7	445.0 ± 37.7
<i>Lci1</i> 導入株	NH ₄ ⁺	167.1 ± 5.6	493.9 ± 30.4
	NO ₃ ⁻	169.3 ± 25.6	256.3 ± 44.9

けなかった (表 2)。従って、*Lci1* を発現させることにより、より低い濃度の CO₂ でより高い光合成活性が得られることが示された。

○*LCII* タンパク質は葉緑体包膜に局在した
LCII タンパク質に対する特異抗体を作製し、クラミドモナスの細胞における局在を調べた。5% CO₂ を含む空気、または空気 (0.04% CO₂ を含む) を通気して培養した野生株の細胞について、間接免疫蛍光法による解析を行った。その結果、空気を通気して培養した細胞でのみ、クラミドモナスの葉緑体に特徴的なカップ型のシグナルが得られた。従って、LCII タンパク質は葉緑体の包膜に局在していることが明らかになった。

3. 研究成果

以上の結果より、LCII タンパク質がクラミドモナスの葉緑体包膜の CO₂ 輸送系で働くことにより、CO₂ 濃縮に寄与していることが明らかとなった (図 4)。また、CO₂ 濃度の低い環境においても、*Lci1* 遺伝子の導入によってクラミドモナスに高い光合成能を与えることが可能であることが示された。真核光合成生物で CO₂ 輸送と光合成能の向上に関わる遺伝子の発見は、今回が初めてである。

4. 今後の課題と発展

Lci1 を発現させることによって、CO₂ 輸送活性を向上することが可能であることが示された。しかしながら、このタンパク質がどのようなメカニズムによって CO₂ 輸送に関わっているのか

はまだ理解に至っていない。今後は、LCII タンパク質の細胞内における存在様式や相互作用するタンパク質を同定することにより、LCII による CO₂ 輸送の活性制御を明らかにしていく必要がある。緑藻クラミドモナスにおける LCII を中心とした CO₂ 輸送システムの全貌を解明することにより、高等植物への応用が可能になり、光合成の促進と地球温暖化の解消へと繋がって行くと期待される。

大西紀和、小日向務、福澤秀哉 緑藻クラミドモナスの CO₂ 欠乏誘導性遺伝子 *Lci1* は CO₂ 輸送に關与する

日本植物生理学会 2007 年度年会 愛媛大学 城北キャンパス 2007 年 3 月 28 日

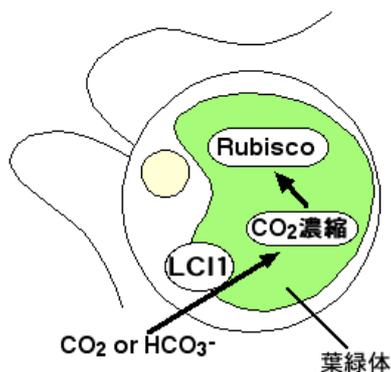


図 4. LCII タンパク質の機能モデル。LCII は葉緑体包膜に局在しており、CO₂ 輸送系で働くことにより CO₂ 濃縮に寄与していると考えられる。

5. 発表論文リスト

○学会発表

大西紀和、小日向務、福澤秀哉 緑藻クラミドモナスの CO₂ 能動輸送体に関する遺伝子 *Lci1* の機能解析

日本植物学会第 70 会大会 熊本大学 黒髪キャンパス 2006 年 9 月 14 日

大西紀和、小日向務、福澤秀哉 CO₂ 欠乏誘導性遺伝子 *Lci1* は緑藻クラミドモナスの CO₂ 輸送系で機能する

日本農芸化学会 2006 年度（平成 18 年度）関西支部大会 京都工芸繊維大学 松ヶ崎キャンパス 2006 年 10 月 1 日