

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

原形質膜 CO₂ 透過性の分子機構解析と利用

2. 研究代表者

且原 真木（岡山大学 資源植物科学研究所 准教授）

3. 研究シーズ探索成果の概要

本課題では植物光合成機能による大気中の二酸化炭素の固定効率を高めることを目標として、細胞の生体膜で二酸化炭素透過性をもつ輸送体(アクアポリン)の分子種をスクリーニングして同定する研究シーズ探索をおこなった。酵母細胞を使って新規スクリーニング系を確立し、その系を用いてイネ、オオムギ、シロイヌナズナのアクアポリン、計63分子種をスクリーニングした。その結果、原形質膜で機能していると考えられるアクアポリンのPIPファミリーで5つ(OsPIP2;1、HvPIP1;1、HvPIP2;1、HvPIP2;3、AtPIP2;5)、また液胞膜型アクアポリンTIPのうちで4つ(OsTIP2;2、HvTIP1;1、HvTIP3;1、AtTIP3;2)、さらにNIP型の1つ(HvNIP1;1)でCO₂透過活性があることを認めた。透過性をもつHvPIP2;1において1つのアミノ酸残基を置換した変異体T228MHvPIP2;1では透過性が消失していることを確認した。ホモロジーモデリングの結果によると、HvPIP2;3と、その類縁の分子種ではあるが二酸化炭素透過性がないHvPIP2;4では二酸化炭素が透過する孔の形状に違いがあることが示唆された。これらの成果は二酸化炭素が植物細胞に取り込まれる分子機構解明の一端を初めて明らかにしたものである。

4. 研究シーズ探索のねらい

植物科学黎明期より炭素固定は植物のもっとも重要な機能の一つであることが知られている。この機能を強化することは、世界中から排出され続ける二酸化炭素の増加に歯止めをかけ、減少させるために有効／有望な技術の一つと考えられている。地球規模で植物の炭素固定を増加させるためには生態学的なアプローチが、個々の植物で炭素固定能力を増強させるためには細胞分子工学的なアプローチが試みられてきた。後者についてはこれまで炭素固定の律速とされる光合成関連の代謝酵素(たとえば炭酸固定酵素 RubisCO)と気孔の開閉制御が研究されてきた。しかし最近になり律速となるステップがもう一つあることがわかってきた。それは気孔を通して葉組織内に入った二酸化炭素が葉緑体に到達する前に植物細胞の原形質膜(細胞全体を包んで外界と細胞質を隔てている生体膜)を透過する段階である。この過程にはアクアポリンと呼ばれる膜タンパクが関与することが示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。この課程を分子レベルで解明して改良することで二酸化炭素の原形質膜透過を高めて植物の炭素固定効率の向上につなげる、ということをも本課題のテーマとした。より具体的には酵母を用いた新規なハイスループットのスクリーニング系を使って、原形質膜で機能する複数のアクアポリンのなかでどの分子種が二酸化炭素透過活性を有するか分別して、二酸化炭素の膜透過性の分子機構解明の一端とすることをねらった。

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

酵母細胞を使ったスクリーニングシステムの構築

酵母 W303 株ゲノムにカーボニックアンヒドラーゼ (CA) と pH 感受性 GFP の遺伝子を組み込んだ。これらの遺伝子は恒常的に発現させている (以下 CA-EGFP 細胞と呼ぶ、図1)。アクアポリン遺伝子は pYES2 ベクター中でガラクトース誘導性プロモーターの支配下において CA-EGFP 細胞に導入した。アクアポリンの発現は 1%ラフィノース/1%ガラクトース SD 培地で誘導して細胞濃度が 1×10^7 (cells ml⁻¹) になるまで酵母を生育させた。細胞は集菌後に 5mM HEPES-NaOH, pH7.3 溶液に懸濁し、ここに

NaHCO₃ (終濃度 170mM) を加えて CO₂ を生成させて CO₂ 取り込みを開始させた。細胞へ取り込まれた CO₂ は細胞内で CA によって HCO₃⁻ と H⁺ に変換され、この H⁺ によって引き起こされる細胞内 pH の低下を pH 依存性の EGFP 発光強度変化によって検出する。検出には蛍光分光光度計 (RF-5300PC、島津) を用いて励起波長 470nm、蛍光波長 515nm で測定した。蛍光の減少速度 (($\Delta F/F$)/sec) で CO₂ 取り込み活性を評価した。ここで ΔF は単位時間当たりの蛍光減少、F は CO₂ 添加前の蛍光強度と、添加後充分時間 (>5秒) が経って新たな平衡状態になったときの蛍光強度の差である。測定時の細胞の濃度が揃っていれば、F の値は CA-EGFP 細胞がアクアポリンを発現していても発現していなくても同じであった。

植物アクアポリン分子種

イネ、オオムギ、シロイヌナズナのアクアポリン 63 分子種 (そのうち原形質膜型 (以下 PIP と呼ぶ) は 34 種) をスクリーニングした。イネアクアポリンの cDNA は共同研究者から分譲してもらい、オオムギアクアポリン cDNA は我々の研究室で同定したものである。シロイヌナズナ cDNA は理研 BRC から購入した。

蛋白分子の立体構造推定 (ホモロジーモデリング)

すでに X 線立体構造解析が完了しているホウレンソウの原形質型アクアポリン SoPIP2;2 をモデル分子として、アミノ酸配列の類似性と相違点に基づいてオオムギアクアポリン HvPIP2;3 と HvPIP2;4 の立体構造を 日本 SGI 社 PDFAMS ソフトウェアによるホモロジーモデリングによって推定した。

5.2 成果

酵母細胞に CA を恒常的に発現させると生育が遅くなり、導入したベクター上のアクアポリンを発現誘導するためにガラクトース培地に移すと成長が止まってしまうことが明らかになった。しかし 1%ラフィノース/1%ガラクトース SD 培地を使うと生育スピードは遅いながらも成長させることができるようになり、二酸化炭素透過性をもつ輸送体 (アクアポリン) の分子種をスクリーニングして同定する新規スクリーニング系を確立できた。

これまでに別のロースルーブットな方法で二酸化炭素透過性を持つことが測定されていたタバコの NtAQP1 (原形質膜型であるが、歴史的経過からこのような名前で呼ばれている、Nature 425:734(2003)) およびオオムギの HvPIP2;1 (Plant Cell Physiology 45:521(2004)) において、今回の方法でも二酸化炭素透過性を持つことが確認された (図2~4)。

今回確立したハイスルーブットの系を使ってイネ、オオムギ、シロイヌナズナのアクアポリン 63 分子種 (そのうち原形質膜型は 34 種) をスクリーニングした。その結果、原形質膜で機能して二酸

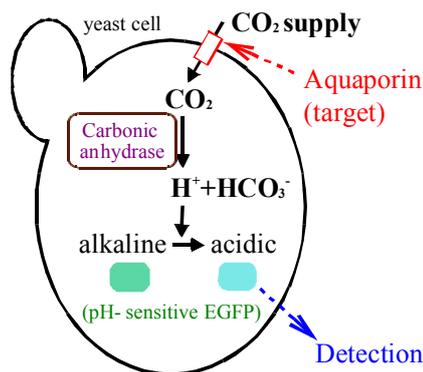


図1 CO₂ 透過性測定用 CA-EGFP 酵母細胞

化炭素透過を担っていると考えられるアクアポリンを新たに4種類 (OsPIP2;1、HvPIP1;1、HvPIP2;3、AtPIP2;5) 同定した(既知のHvPIP2;1と合わせて5種類)。調べた範囲においてTIP型、NIP型のアクアポリンも含めると10個のアクアポリン分子種にCO₂透過活性があると認められた(表1)。

次に透過孔を形成するアミノ酸残基1つを置換、すなわちHvPIP2;1の228番目のスレオニンをメチオニンに置換して水透過性を失っていることが確認されているHvPIP2;1の変異体(T228MHvPIP2;1)について、その二酸化炭素透過性を測定したところ二酸化炭素の透過性も同じく消失していることが認められた(図3, 4)。このことから、水の透過孔と同じ透過孔を二酸化炭素分子も透過している可能性が高いことがわかった。

アミノ酸配列上は非常に近縁であるHvPIP2;3とHvPIP2;4とは、289個のアミノ酸のうちわずかに6個のアミノ酸しか相違していない。しかしHvPIP2;3は本課題によって二酸化炭素透過性を持つことが示されたがHvPIP2;4は二酸化炭素透過性を持たないことが示された。ホモロジーモデリングによって得られた立体構造モデルによるとタンパク全体の形は互いによく似ているにもかかわらず、これらタンパクにある透過孔の形は違うことが認められた(図5)。この構造の違いが、CO₂透過性の違いにどのように影響しているか、また他のアクアポリン分子種における透過活性の有無と構造の違いの相関など、構造学的な詳細な解析は今後に残された課題である。

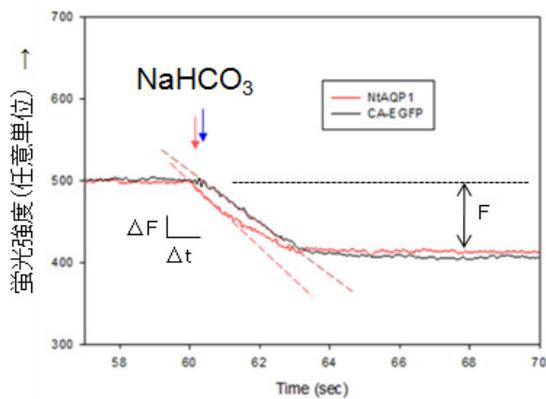


図2 CA-EGFP 酵母細胞からの蛍光の変化。NtAQP1を発現させた細胞と発現していないネガティブコントロールの例。↓で外液にNaHCO₃を加えてCO₂を生成して取り込みを開始した。

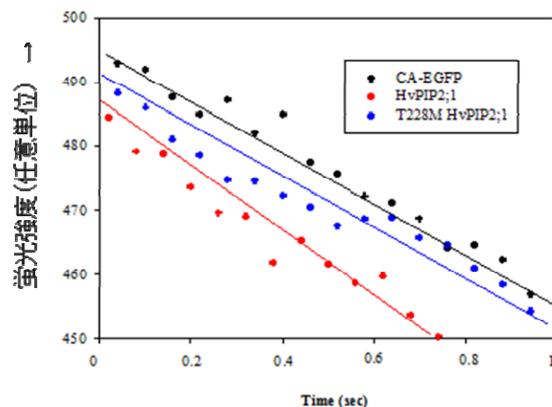


図3 HvPIP2;1およびその変異体を発現させた酵母における蛍光強度変化。NaHCO₃を加えてから1秒間のデータを拡大表示した。

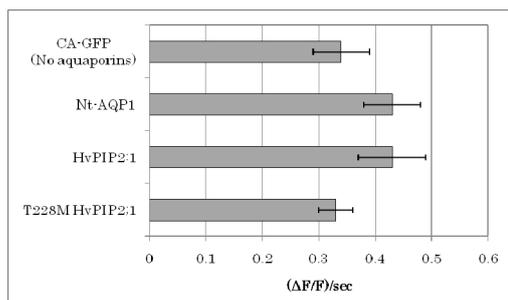


図4 CO₂ 取り込み時の蛍光強度減少速度の比較。Nt-AQP1 や HvPIP2:1 を発現している細胞は減少スピードが速く、CO₂ 取り込みが早くことが示された。

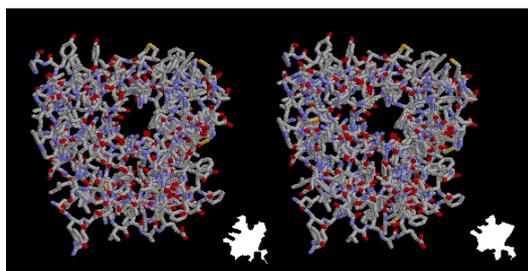


図5 ホモロジーモデリングによって決めた HvPIP2:3(左)と HvPIP2:4(右)の構造を上面から見たところ。タンパクの中央にある透過孔の部分抽出して白黒反転させたものを、各タンパクの右下に示した。

表1 イネ(OsPIPs)およびオオムギ(HvPIPs)の原形質膜型アキュアポリンを組み込んだ CA-EGFP 酵母における CO₂ 取り込み時の蛍光強度減少速度(平均値±標準偏差、N≥10)。アキュアポリンを発現していないネガティブコントロール(No PIPs)の CA-EGFP 細胞と比べて、有為(P < 0.05)に蛍光減少速度が速くなったものを赤字で示す。

genes	($\Delta F/F$)/sec	genes	($\Delta F/F$)/sec	genes	($\Delta F/F$)/sec	genes	($\Delta F/F$)/sec
No PIPs	0.34 ± 0.05	OsPIP2:1	0.43 ± 0.04	HvPIP1:1	0.50 ± 0.06	HvPIP2:1	0.43 ± 0.06
		OsPIP2:2	0.37 ± 0.04	HvPIP1:2	0.37 ± 0.07	HvPIP2:2	0.34 ± 0.04
OsPIP1:1	0.33 ± 0.05	OsPIP2:3	0.33 ± 0.04	HvPIP1:3	0.31 ± 0.08	HvPIP2:3	0.43 ± 0.07
OsPIP1:2	0.32 ± 0.03	OsPIP2:4	0.34 ± 0.03	HvPIP1:4	0.37 ± 0.02	HvPIP2:4	0.35 ± 0.06
OsPIP1:3	0.36 ± 0.05	OsPIP2:5	0.35 ± 0.03	HvPIP1:5	0.35 ± 0.07	HvPIP2:5	0.31 ± 0.04
		OsPIP2:6	0.33 ± 0.04				
		OsPIP2:7	0.38 ± 0.05				
		OsPIP2:8	0.33 ± 0.04				

6. 自己評価

一番の目標であった酵母を用いた新規測定系について、確立することができた。CA を発現させることで生育が悪くなったために、CA-EGFP 細胞のハンドリング方法を確立するまでに苦労したが、最終的に適当な培地/培養条件を決定することができた。ここまでで予想以上に時間がかかったために、スケジュール的に当初の計画が一部研究期間内に間に合わなかった(蛍光減少速度をアキュアポリンタンパク当たりの CO₂ 輸送速度に換算すること、ホモロジーモデリングによる構造解析と CO₂ 透過性機能との相関についての詳細な分析など)ところもあるが、これら遅れている部分についても引き続き研究を進めることに本質的な支障はないと考えている。全体的には、当初の計画が概ね達成できたものと思う。本課題の成果は非常に基礎的ではあり、たいへん小さな一歩ではあるが、低炭素社会実現へ向けた確実な前進に貢献するものとなったと考えている。なお本課題は全く新規なものであったため論文作成や学会発表については、ほとんど手を付けることができなかった。これは反省点である。今後は本課題を発展させる形を探りつつ研究開発を続けていきたい。

7. PO の見解

本研究は、アクアポリンが二酸化炭素を透過させることを見出したことから着想されたもので、植物による大気中のCO₂の固定能力・固定効率を強化することを目指し、CO₂固定の律速段階のうち、原形質膜での細胞へのCO₂の透過段階に着目し、そこに存在するアクアポリン分子を解析し、炭素固定高効率化植物を実現させるための知見を得ることを目的として始められた。

成果として、CO₂の透過性とアクアポリン構造の関係に迫る知見を出しており、十分に目標を達成している。数多くの推定アクアポリンについて、CO₂透過性の有無を決定し、それをタンパク質の立体構造と絡めて議論できるまでにした成果は高く評価できる。また、当初の予定よりも多くのアクアポリン遺伝子について測定を行い、CO₂透過性を持つアクアポリン分子種を10個同定することに成功している。一方、アクアポリンのCO₂透過性と分子構造との関係については本研究期間内では未達成であった。

絶え間ない努力により着実な成果を挙げたことに敬意を表したいが、細胞への透過過程がCO₂固定化に関与するかどうかは重要であるものの科学的に解明されたわけではない。

現時点ではCO₂の透過性のみが検討されているが、H₂Oの透過性も合わせて考える必要がある。CO₂透過性以外にもアクアポリンが存在する意義があると推定されるため、遺伝子導入によってCO₂アクアポリンを増やした場合に、どのような弊害があるかも検討する必要がある。CO₂を通して水を通さない構造を発見できれば応用展開が開けるが、その点については予断を許さないと思われる。

本研究は、新しい学術分野を拓きうるもので、低酸素社会構築の観点からも推進が期待されているところであるが、10年以上の長いスパンにわたる取り組みが必要と思われ、継続的な研究支援がなされることを期待したい。

8. 研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

該当なし

(2)特許出願

該当なし

(3)口頭発表

①学会

国内 1 件, 海外 0 件

Detection of transport activity in barley and rice aquaporins with newly developed yeast system. 李志芮, 森泉, 笹野静香, 且原真木 日本植物生理学会 2011 年度年会 (仙台) 2011. 3. 20-22

②その他

該当なし

(4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

該当なし