

「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力
強化と生産物活用のための基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

鹿内 利治

京都大学大学院理学研究科・教授

構造と進化の理解に基づく光合成の環境適応能力の強化

§1. 研究実施体制

(1) 鹿内グループ

① 研究代表者: 鹿内 利治 (京都大学大学院理学研究科、教授)

② 研究項目

・サイクリック電子伝達の最適化

(2) 池内グループ

① 研究代表者: 池内 昌彦 (東京大学大学院総合文化研究科、教授)

② 研究項目

・光化学系Ⅱ水分解系の強化

・光化学系Ⅰの強化

(3) 高橋グループ

① 主たる共同研究者: 高橋 裕一郎 (岡山大学大学院自然科学研究科、教授)

② 研究項目

・光化学系Ⅱ水分解系の強化

・光化学系Ⅰの強化

(4) 牧野グループ

① 主たる共同研究者: 牧野 周 (東北大学大学院農学研究科、教授)

② 研究項目

・サイクリック電子伝達系の最適化

・炭酸固定の強化と光合成系全体の最適化

・革新的光合成測定技術の開発

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(1) 鹿内グループ

NDH 複合体に依存するサイクリック電子伝達は、葉緑体における酸化ストレスの回避に機能している。鹿内グループは、サイクリック電子伝達の最適化により、他のグループの成果として得られる光化学系の強化に耐えうる柔軟な光合成装置をデザインすることを目指している。NDH 複合体はプロトンポンプと考えられ、PGR5 依存経路に比べて効率のよいサイクリック電子伝達を触媒する。したがって、その機能を最適化しないと、逆に葉緑体内のレドックスバランスを乱す恐れがある。陸上植物の進化の過程で、葉緑体 NDH は葉緑体、核ゲノムの 30 以上の遺伝子にコードされ、また光化学系 I と相互作用し超複合体を形成するようになった¹⁾。電子伝達に関わる因子の最適化には、このような巨大複合体の蓄積量の制御が必要になる。この問題に挑戦するため、以下の2つのアプローチを取った。1) 複合体のアセンブリの解析からその律速過程を明らかにし、調節する。2) 植物が実際環境に応答し、NDH 複合体の蓄積量を調節する条件を調べ、情報伝達に関わる因子を遺伝学で特定する。1) では、活性部位を構成するサブユニットの発現に必須な CRR16 を特定し、その機能を明らかにした。また、ミトコンドリアの complex I においても情報の乏しい、膜貫通部分(プロトンポンプ)のアセンブリに関わる CRR3 の機能を明らかにし、律速因子としての可能性を検討中である。2) では、いくつかのシロイヌナズナのアクセシオンを用いて種々のストレス処理により発現が変動するサブユニット遺伝子を探索した。遺伝子発現の変動が最終的に複合体の蓄積量に反映されるアクセシオンはまだ得られていない。そこで切り取り葉を用いて種々のストレス条件に対し複合体の蓄積量を簡便に調査するシステムを開発し、スクリーニングを継続している。また公開されているマイクロアレイの情報から、一群のアクセシオンで NDH 関連遺伝子の発現が定常状態においても高いことを示唆する情報を得た。実際の植物の解析から、候補アクセシオンが得られれば、*in silico* の情報を最大限活用し、これらの NDH 関連遺伝子の発現を一括して調節する因子の遺伝学による特定を目指す。

(2) 池内グループ

池内グループのねらいは、シアノバクテリアの光合成機能の調節機構を操作することで、光合成機能やそのストレス耐性の増強を実現し、藻類や陸上植物に応用することである。初年度は、シアノバクテリアの遺伝子操作法の技術を改良して、遺伝子発現強化株の基本設計を構築した。2年目は、これに基づいて、以下に述べるさまざまな遺伝子強化を試みた。光化学系 I の強化としては、アセンブリ因子 (*ycf3*, *ycf4*, *ycf37*) の増強株、電子を逃がす *flv3-flv1* 増強株、系 I の発現を強化する株 (*OX-psaAB*) などを作成した。また、これらの遺伝子増強効果を見やすくする比較株として、 $\Delta menD$, $\Delta ndhI$, $\Delta flv3$ 株を作成した。現在、これらの組合せた複合株を作成中で、強光処理を含めたストレス条件などで、系 I 増強効果の確認を進めている。光化学系 II の水分解系の強化に関しては、変異導入の第2段階として、グルコース輸送体の導入を行った。現在は、この株

を基にして、*psbA* 遺伝子への変異導入による系 II 活性の幅広い改変を進めている。また、光化学系 II サブユニット *psbJ* のアセンブリにおける役割を明らかにした⁵⁾。光化学系 II の代謝回転にかかわるプロテアーゼの同定を試みた^{4, 9)}。光化学系 I の強化として、すでに同定した光化学系 II 特異的なアンテナ装置の強制発現株や破壊株を作出した。強制発現株では、アンテナ・系 I 超複合体の量が大きく増加することが確認された。なかでも系 I の四量体に1つ以上のアンテナ装置が結合した超複合体も確認できた。これは適切な発現強化を選択すれば、大きくアンテナ機能を増強できる可能性を実証したといえる。また、光化学系 I の電子受容体 FNR の結晶構造を決定した⁶⁾。光合成のアンテナの発現調節などさまざまな光調節にかかわる光受容体の結晶構造を決定した⁷⁾。また、その発色機構などを明らかにした^{3, 4, 8)}。

今後の見通しとしては、増強効果できた系 I による光合成のストレス耐性を、強光やさまざまなストレス下で検証すること、系 II にさまざまな水分解系への変異導入によって活性上昇株を探索すること、系 I アンテナ強化株における光合成活性の増強を検証することができるようになったので、構造と機能理解に基づく光合成とそのストレス耐性の増強の実証が期待できる。

(3) 高橋グループ

真核藻類を用いて、光化学系の機能強化・最適化を実現し、得られた結果をシアノバクテリアの結果と比較しつつ、高等植物の改変のために成果をフィードバックすることを目的とする。光化学系 I の損傷後の修復機能を強化するためアセンブリ因子の発現を促進し、もしくは光化学系 II の酸素発生系の機能強化を進め、ストレス耐性・光合成生産への効果を評価する。

光化学系 I の機能強化に関しては、初年度は光化学系 I アセンブリ因子および還元側電子伝達成分を過剰発現する形質転換ベクターの開発を行った。2 年目はアセンブリ因子である *Ycf3* と *Ycf4* の過剰発現ベクターを作製し、緑藻クラミドモナス葉緑体へ導入した。また、強光条件下での光化学系 I の損傷を解析する条件検討を進め、得られた光化学系 I 機能強化株の強光耐性の評価に用いる。一方、光化学系 II の機能強化に関しては、酸素発生系における水分解反応から発生するプロトンの排出チャンネルに関与すると予想されるアミノ酸残基 (*PsbA* および *PsbC* 上の残基) を他の 19 種のアミノ酸へ改変した形質転換体の作出を進めた。初年度に形質転換ベクターの作製を行い、2 年目にはアミノ酸置換した形質転換体をおよそ 120 種得た。得られた形質転換体の光化学系 II の光合成的生育を強光下、高二酸化炭素濃度、および低酸素濃度下で解析中である。また、光化学系 II 活性と光化学系 II のタンパク量との関係などの基本的な性質を調べた。

今後は得られた *Ycf3* と *Ycf4* を強化した形質転換体の光化学系 I 活性の強光耐性の解析を進める。また、光化学系 I の還元側電子伝達成分を強化した形質転換体の作出を進める。また、酸素発生系のプロトン排出チャンネルを改変した形質転換体の光化学系 II 活性の強光などの環境ストレス下における損傷耐性を解析し、強光耐性を示す株を見出したい。

(4) 牧野グループ

サイクリック電子伝達系を含めた電子伝達系からの炭酸同化反応の制御機構を調べた^{2, 12, 13})。まず、サイクリック電子伝達系に関しては、NDH 欠損変異体 *crr6* と *PGR5* 発現抑制体を用いた。*crr6* 欠損変異体においては、低温・低照度で光合成機能が低下していること、*PGR5* 発現抑制体では、やや低照度で光合成機能が低下していることがわかった。さらに、*PGR5* 発現抑制体では、Wild-type イネに比べて、強光下で光合成炭酸固定酵素 Rubisco の活性化率が下がることがわかった²⁾。Mehler 反応に関しては、酸素の効果について調べた^{12, 13})。さらに、リニア電子伝達系に関しては、律速要因である *PETC*(シトクロム *b6f* のリスキタンパク質)の過剰発現体と発現抑制体イネの作製を試みた。過剰発現体に関しては、数系統が選抜されてきている。また、発現抑制体に関しては、*b6f* 複合体のものの特異的な減少が確認された変異体が選抜され、リニア電子伝達活性と光合成炭酸同化速度の減少を観察した。今後は、これらの変異体を中心材料に、Rubisco の活性化に及ぼす影響について詳細に調べ、最適化バランスを解明していく。

*RBCS*過剰発現イネにおいて葉緑体側の *rbcL* 遺伝子発現が促進され、Rubisco 量が増加した個体では、部分的な Rubisco の不活性化を生じていた^{11, 14})。その問題を解消すべく、まず Rubisco activase (RCA)の発現過剰体と発現抑制体の生理解析を行った。その結果、RCA は Rubisco に対して飽和量存在していることがわかった¹⁰)。そこで、RuBP 再生産にかかわる候補タンパク質の増強を試みることにした。Rubisco の部分的な不活性化は、RuBP 再生産にかかわる光合成の律速要因とのアンバランスで生じることが示唆されていたので、カルビン回路酵素 SBPase と Transketolase の増強に着手した。

Rubisco 改変の試みとして、葉緑体形質転換による高比活性型 *rbcL* 遺伝子(高等植物由来)の導入を試みた。具体的には、葉緑体形質転換が可能なタバコを材料に、ポプラ *rbcL* との相同組換えに成功し、hybrid Rubisco を持ち、かつ独立栄養で成長する葉緑体組換えタバコを作製した。イネとコムギの *rbcL* の葉緑体相同組換えに関しては、mRNA の発現は確認できたものの RBCL タンパク質の検出はできなかった。一方、核コードの *RBCS* 置換は同じく高比活性型のコムギ *RBCS* のイネへの導入を試みた。核側の組換えにおいても hybrid Rubisco の部分形成を確認し、比活性はイネとコムギの中間型を示した。今後は、イネの *RBCS* 分子種別の RNAi 体三重変異体を作製し、それへの交配導入によって、コムギ *RBCS* の置換体イネの作製を目指す。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Ueda M., Kuniyoshi T., Yamamoto Y., Sugimoto K., Ishizaki K., Kohchi T., Nishimura Y. and Shikanai T. (2012) Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J.* 72, 683-693 (DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05115.x)
2. Nishikawa Y., Yamamoto H., Okegawa Y., Wada S., Sato N., Taira Y., Sugimoto K., Makino A. and Shikanai T. (2012) PGR5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO₂ fixation and biomass production in rice. *Plant Cell Physiol.* 53, 2117-2126 (DOI: 10.1093/pcp/pcs153)
3. Enomoto G., Hirose Y., Narikawa R. and Ikeuchi M. (2012) Thiol-based photocycle of the blue and teal light-sensing cyanobacteriochrome Tlr1999. *Biochemistry* 51, 3050-3058 (DOI: 10.1021/bi300020u)
4. Nagao R., Tomo T., Noguchi E., Suzuki T., Okumura A., Narikawa R., Enami I. and Ikeuchi M. (2012) Proteases are associated with a minor fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein from the diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 2110-2117 (DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.08.005)
5. Nowaczyk M.M., Krause K., Mieseler M., Sczibilanski A., Ikeuchi M. and Rögner M. (2012) Deletion of *psbJ* leads to accumulation of Psb27-Psb28 photosystem II complexes in *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1339-1345 (DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.017)
6. Liauw P., Mashiba T., Kopcak M., Wiegand K., Muraki N., Kubota H., Kawano Y., Ikeuchi M., Hase T., Rögner M. and Kurisu G. (2012) Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray studies of the ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68, 1048-1051 (DOI: 10.1107/S1744309112031910)
7. Narikawa R., Ishizuka T., Muraki N., Shiba T., Kurisu G. and Ikeuchi M. Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 918-23 (DOI: 10.1073/pnas.1212098110)
8. Hirose Y., Rockwell N.C., Nishiyama K., Narikawa R., Ukaji Y., Inomata, K., Lagarias J.C. and Ikeuchi M. (2013) Green/red cyanobacteriochromes regulate

- complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110, 4974-9 (DOI: 10.1073/pnas.1302909110)
9. Nagao R., Tomo, T., Narikawa, R., Enami I. and Ikeuchi M. (2013) Light-independent biosynthesis and assembly of the photosystem II complex in the diatom *Chaetoceros gracilis*. FEBS Lett. 587, 1340-1345 (DOI: 10.1016/j.febslet.2013.02.050)
 10. Yamori W., Matsumoto C., Fukayama H. and Makino A. (2012) Rubisco activase is a key regulator of non steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. Plant J. 71, 871-880 (DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05041.x)
 11. Suzuki, Y. and Makino, A. (2012) Availability of Rubisco small subunit up-regulates the transcript levels of large subunit for stoichiometric assembly of its holoenzyme in rice. Plant Physiol. 160, 533-540 (DOI: 10.1104/pp.112.201459)
 12. Takagi D., Yamamoto H., Sugimoto T., Amako K., Makino A. and Miyake C. (2012) O₂ supports 3-phosphoglycerate-dependent O₂ evolution in chloroplasts from spinach leaves. Soil Sci. Plant Nutr. 58, 462-468 (DOI: 10.1080/00380768.2012.706592)
 13. Miyake C., Suzuki Y., Yamamoto H., Amako K. and Makino A. (2012) O₂-enhanced induction of photosynthesis in rice leaves: The Mehler-ascorbate peroxidase (MAP) pathway drives cyclic electron flow within PSII and cyclic electron flow around PSI. Soil Sci. Plant Nutr. 58, 718-727 (DOI: 10.1080/00380768.2012.736078)
 14. Suzuki Y. and Makino A. (2013) Translational down-regulation of *RBCL* is operative in the coordinated expression of Rubisco genes in senescent leaves in rice. J. Exp. Bot. 64, 1145-1152 (DOI: 10.1093/jxb/ers398)