

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840109

研究課題名(和文) CCM1複合体によるCO₂感知の分子機構研究課題名(英文) Molecular mechanism of CO₂-sensing by CCM1 protein complex

研究代表者

山野 隆志 (Yamano, Takashi)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70570167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多くの藻類はCO₂濃度の低下にともなって無機炭素輸送体を発現誘導し、細胞内に能動的に無機炭素を輸送・濃縮する無機炭素濃縮機構(CCM)を持つ。真核生物のCCMにおけるCO₂の感知機構や、無機炭素輸送体分子は不明であった。本研究ではCCM1複合体によるCO₂感知機構の解析と平行して、新規シグナル伝達因子としてシロイヌナズナで葉緑体のカルシウムセンサーとして報告されているCASのホモログ遺伝子を同定した。さらにHLA3とLCIAがそれぞれ細胞膜と葉緑体包膜に局在し無機炭素輸送体として機能すること、CCM1とCASがこれらの2つの遺伝子の発現制御に関わることを示した。

研究成果の概要(英文)：Aquatic microalgae induce a CO₂-concentrating mechanism (CCM) to maintain photosynthetic activity in low-CO₂ conditions. However, many aspects of the CO₂-signal transduction pathways remain to be elucidated. In this study, we report the isolation of novel high-CO₂-requiring mutants defective in the induction of CCM by DNA tagging. In H82 mutant, a calcium-sensing receptor CAS was disrupted by the insertion. Photosynthetic affinity for inorganic carbon (Ci) was significantly decreased in the H82 and accumulation of both LCIA and HLA3 were defected. Additionally, by characterizing the photosynthetic phenotype of LCIA and HLA3 insertion/overexpressing strains, it was revealed that HLA3 and LCIA are parts of the mechanism of HCO₃⁻ uptake through the plasma membrane and chloroplast envelope.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：CO₂シグナル伝達 光合成 無機炭素濃縮機構 クラミドモナス

1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素 (CO₂) は、動物・植物の生理応答を引き起こすシグナル因子のひとつである。例えば、マウスは CO₂ に対して忌避行動を示す。これは嗅覚細胞において CO₂ が炭酸脱水酵素 (CA) によって感知され、生じた HCO₃⁻ によるグアニル酸シクラーゼの活性化、cGMP によるカチオンチャネルの活性化を介して細胞が脱分極することによる (Luo et al. 2009)。また陸上植物シロイヌナズナの葉の表皮に存在する気孔は、CO₂ 濃度が高いと閉じる。この CO₂ 感知にも CA が関与し (Hu et al. 2009)、下流のリン酸化タンパク質 HT1 を介してアニオンチャネル SLAC1 が活性化され、細胞の脱分極を引き起こす (Hashimoto et al. 2006; Negi et al. 2008)。このように、生物による CO₂ 感知には、CA が関与することが報告されているが、他の真核生物においても共通性があるかどうかは不明である。

光合成を行う藻類も、水圏環境中の CO₂ を感知する生物のひとつである。CO₂ 濃度の低下は光合成活性の低下を引き起こす。そのため多くの藻類は、CO₂ 濃度の低下にともなって無機炭素 (CO₂ と HCO₃⁻ の総称) 輸送体と CA を発現誘導し、細胞内に能動的に無機炭素を輸送・濃縮する無機炭素濃縮機構

(Carbon-concentrating mechanism; CCM) を持つ。CCM は、1) CO₂ センサー分子による低 CO₂ 濃度の感知、2) 低 CO₂ シグナルの伝達、3) 無機炭素輸送体と CA をコードする遺伝子群の発現誘導、として捉えることができる。しかしながら、真核生物の CCM における CO₂ の感知機構や、実際に無機炭素の濃縮に関わる輸送体分子は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、CCM をモデルとした CO₂ 感知機構と輸送体分子の解明に向けて、単細胞緑藻クラミドモナスを用いる。クラミドモナスはゲノムが解読され (Merchant et al. 2007)、遺伝学的ツールが揃っているため、分子遺伝学的な研究を行うことが可能である。本研究ではクラミドモナスが持つ CO₂ 感知・濃縮機構の分子メカニズムを明らかにし、動物や陸上植物の知見と比較することで、生物が持つ CO₂ 感知・濃縮機構の共通性と多様性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

クラミドモナスの CO₂ センサー分子の候補として CCM1 が同定されている (Fukuzawa et al. 2001; Xiang et al. 2001)。CCM1 より上流に位置する因子が同定されていないこと、また CCM1 欠損株の表現型を相補するサプレッサー変異株が単離できないことから、CCM1 は CO₂ シグナル伝達の上流に位置する可能性が高い。これまでに、CCM1 が CO₂ 濃度に関わらず恒常的に発現していること (Kohinata et al. 2007)、低 CO₂ 濃度に応答して CA と無機炭素輸送体の発現を誘導するマスター因子

であること (Miura et al. 2004; Yamano et al. 2008)、P80、P45 と名付けたタンパク質と相互作用することが分かっている (未発表)。しかし、CCM1-P80-P45 から構成される CCM1 複合体がどのようにして CO₂ 濃度変化を感知し、下流にそのシグナルを伝達するのかについては全く不明であった。

本研究では (1) CCM1 複合体における P80 と P45 遺伝子の解析、(2) CCM1 複合体以外の CO₂ シグナル伝達因子の探索、(3) CO₂ シグナル伝達により制御される無機炭素輸送体の機能解析を進めることで、CCM における CO₂ 応答の全体像の理解を試みた。

4. 研究成果

1) CCM1 複合体における P80 と P45 遺伝子の解析

CO₂ シグナル伝達因子のマスターレギュレータ CCM1 と相互作用する因子を免疫沈降法により 2 つ同定し、P45、P80 と名付けた。CO₂ 応答におけるこれら相互作用因子の機能を推定するために、P45、P80 をそれぞれコードする遺伝子のノックアウト株の作出を試みた。まず、パロモマイシンに対して耐性を付与する *aphVIII* 遺伝子の PCR カセットを、クラミドモナス雄株 C-9 にランダムに導入し、約 100,000 株の遺伝子タグ挿入変異株ライブラリを作成した。形質転換には新たに開発した迅速かつ高効率のクラミドモナス形質転換系 (Yamano et al. 2013) を用いた。P45 と P80 についてそれぞれ 3 種類の DNA タグ挿入変異株を単離した。

CCM 複合体の *in vitro* 再構成を目的として、実験を進めた。大腸菌を用いた CCM1 全長の発現は困難であったが、コムギ抽出胚を用いた *in vitro* translation により、P80 については全長の合成をウェスタン解析により確認した。合成した P80 を用いたプルダウンアッセイにより、*in vitro* においても P80 と CCM1 の相互作用を検出できた。

(2) CCM1 複合体以外の CO₂ シグナル伝達因子の探索

CO₂ シグナル伝達に関わる新奇な因子を同定するために、高 CO₂ 要求性を指標とした変異株スクリーニングを行った。約 20,000 株の遺伝子タグ挿入変異株ライブラリについて高 CO₂ 条件と低 CO₂ 条件での生育を比較し、3 株の高 CO₂ 要求性変異株 (H24, H82, P103) を単離し、その表現型について報告した

(Wang et al. 2014)。P103 株はすでに高 CO₂ 要求性であることが分かっている CCM1 遺伝子に変異が導入されていたことから、スクリーニング系が機能していることが示された。

H82 株の原因遺伝子はシロイヌナズナで葉緑体のカルシウムセンサーとして報告されている CAS のホモログ遺伝子であることを報告した (Wang et al. 2014)。また H82 株と野生株の比較トランスクリプトーム解析により、CAS は CCM1 によって制御される 2

つの遺伝子 *HLA3* と *LCIA* の転写の維持に働くことを明らかにした。

3) CO₂ シグナル伝達により制御される無機炭素輸送体の機能解析

CCM1 と CAS により転写が制御されることが明らかになった *HLA3* と *LCIA* は、以前より無機炭素輸送体をコードする遺伝子であることが示唆されていたが、その証拠はなかった。間接的免疫蛍光染色法及び膜画分の分画により、*HLA3* が細胞膜に、*LCIA* が葉緑体包膜に局在することを明らかにした。また、*HLA3* と *LCIA* のノックアウト株・強制発現株を単離し、*HLA3* と *LCIA* が無機炭素のなかでも重炭酸イオン (HCO₃⁻) の取り込みに関与することを明らかにした。以上のことから、水中において *HLA3* と *LCIA* が細胞外から葉緑体ストロマへと重炭酸イオンを輸送する輸送体として協調的に働くことが示され、論文として報告した (Yamano et al. in press)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Yamano T, Sato E, Iguchi H, Fukuda Y, Fukuzawa H “Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*” Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press (査読有り)
DOI:10.1073/pnas.1501659112
京大レポジトリ:
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/198148>
 2. Kajikawa M, Sawaragi Y, Shinkawa H, Yamano T, Ando A, Kato M, Hirono M, Sato N, Fukuzawa H “Algal dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase TAR1 regulates accumulation of triacylglycerol in nitrogen- or sulfur-deficiency” Plant Physiology 168(2):752-764 (査読有り)
DOI:10.1104/pp.15.00319
 3. Wang L, Yamano T, Kajikawa M, Hirono M, Fukuzawa H “Isolation and characterization of novel high-CO₂ requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*” Photosynthesis Research 121(2-3):175-184 (2014) (査読有り)
DOI:10.1007/s11120-014-9983-x
京大レポジトリ:
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/182922>
 4. Yamano T, Asada A, Sato E, Fukuzawa H “Isolation and characterization of mutants defective in the localization of LCIB, an essential factor for the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*” Photosynthesis Research 121(2-3):193-200 (2014) (査読有り)
- DOI: 10.1007/s11120-013-9963-6
京大レポジトリ:
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/182921>
5. Yamano T, Iguchi H, Fukuzawa H “Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal” Journal of Bioscience and Bioengineering 115:691-694 (2013) (査読有り)
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.020
京大レポジトリ:
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/174155>
- 〔学会発表〕(計25件)
1. 山野 隆志、佐藤 江美、井口 ひろ、福田 有里、福澤 秀哉 (口頭発表)「細胞膜 *HLA3* と葉緑体包膜 *LCIA* は重炭酸輸送に協調的に働き、低 CO₂ 環境において光合成を維持する」 2015 年 3 月 16-18 日 第 56 回日本植物生理学会年会(東京農業大学 世田谷キャンパス)
 2. 王 連勇、山野 隆志、高根 俊輔、津田 高佑、得津 隆太郎、廣野 雅文、皆川 純、福澤 秀哉 (口頭発表)「葉緑体カルシウムセンサーホモログ CrCAS は緑藻無機炭素輸送体の発現に必要である」 2015 年 3 月 16-18 日 第 56 回日本植物生理学会年会(東京農業大学 世田谷キャンパス)
 3. Hideya Fukuzawa, Lianyong Wang, Takashi Yamano, Shunsuke Takane (ポスター発表) “Molecular components of carbon-dioxide-sensing and regulation of carbon-concentrating mechanism in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*” 2015 年 3 月 13-15 日 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing (産業技術総合研究所 臨海副都心センター)
 4. 山野 隆志、佐藤 江美、井口 ひろ、福澤 秀哉 (口頭発表)「葉緑体包膜と細胞膜における HCO₃⁻ 輸送体」 2014 年 10 月 3-4 日 第 11 回 クラミドモナス研究会 (高知市文化プラザかるぼーと)
 5. Lianyong Wang, Takashi Yamano, Masafumi Hirono, Hideya Fukuzawa (ポスター発表) “CO₂-requiring mutants defective in CCM-induction generated by high frequency transformation with square electric pulses: Is CAS protein essential for CO₂-signaling?” 2014 年 10 月 3-4 日 第 11 回 クラミドモナス研究会 (高知市文化プラザかるぼーと)
 6. Takashi Yamano, Emi Sato, Hiro Iguchi, Hideya Fukuzawa (Oral presentation) “*HLA3* and *LCIA* are associated with inorganic carbon transport in *Chlamydomonas reinhardtii*” 2014 年 6 月 8-13 日 16th International Conference on the Cell and Molecular Biology of

- Chlamydomonas* (Pacific Grove, CA, USA)
7. Lianyong Wang, Takashi Yamano, Masataka Kajikawa, Masafumi Hirono, Hiro Iguchi, Hideya Fukuzawa (Poster presentation) “CO₂-requiring mutants defective in CCM-induction generated by high frequency transformation with square electric pulses” 2014年6月8-13日 16th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Pacific Grove, CA, USA)
 8. 高根 俊輔、山野 隆志、福澤 秀哉 (ポスター発表) 「緑藻クラミドモナスにおける新規高 CO₂ 要求性変異株の単離の解析」 2014年5月30-31日 第5回日本光合成学会年会および公開シンポジウム (近畿大学 奈良キャンパス)
 9. 王 連勇、山野 隆志、梶川 昌孝、廣野 雅文、福澤 秀哉 (ポスター発表) ”Isolation and characterization of novel high-CO₂ requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*” 2014年5月30-31日 第5回日本光合成学会年会および公開シンポジウム (近畿大学 奈良キャンパス)
 10. 山野 隆志、佐藤 江美、井口 ひろ、福田 有里、福澤 秀哉 (ポスター発表) 「細胞膜に局在する HLA3 と葉緑体包膜に局在する LCIA は緑藻クラミドモナスの HCO₃ 輸送に働く」 2014年5月30-31日 第5回日本光合成学会年会および公開シンポジウム (近畿大学 奈良キャンパス)
 11. 山野 隆志、佐藤 江美、井口 ひろ、福澤 秀哉 (口頭発表) 「細胞膜に局在する HLA3 と葉緑体包膜に局在する LCIA は緑藻クラミドモナスの HCO₃ 輸送に働く」 2014年3月18-20日 第55回日本植物生理学会年会 (富山 富山大学五福キャンパス)
 12. 王 連勇、山野 隆志、高根 俊輔、舟津 尚子、梶川 昌孝、廣野 雅文、福澤 秀哉 (ポスター発表) ”Isolation and Characterization of Novel High-CO₂ Requiring Mutants of *Chlamydomonas Reinhardtii*” 2014年3月18-20日 第55回日本植物生理学会年会 (富山 富山大学五福キャンパス)
 13. Emi Sato, Takashi Yamano, Hiro Iguchi, Hideya Fukuzawa (Poster presentation) ”HLA3 and LCIA are associated with inorganic carbon transport in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*” 2014年2月17-20日 The 12th International Student Seminar (京都 京都大学芝蘭会館)
 14. Lianyong Wang, Takashi Yamano, Syunsuke Takane, Hideya Fukuzawa (Poster presentation) ”Isolation and characterization of novel high-CO₂ requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*” 2014年2月17-20日 The 12th International Student Seminar (京都 京都大学芝蘭会館)
 15. 山野 隆志、佐藤 江美、福澤 秀哉 (口頭発表) 「細胞膜に局在する HLA3 と葉緑体包膜に局在する LCIA は CO₂ 濃縮に協調的に働く」 2013年11月29-30日 第10回クラミドモナス研究会 -微細藻類研究のブレイクスルー- (名古屋 基礎生物学研究所)
 16. 王 連勇、山野 隆志、舟津 尚子、高根 俊輔、福田 有里、梶川 昌孝、廣野 雅文、福澤 秀哉 (ポスター発表) 「緑藻クラミドモナスにおける新規高 CO₂ 要求性変異株の単離と解析」 2013年11月29-30日 第10回クラミドモナス研究会 -微細藻類研究のブレイクスルー- (名古屋 基礎生物学研究所)
 17. Hideya Fukuzawa, Takashi Yamano, Masataka Kajikawa, Emi Sato, Yuri Sawaragi (Invited oral presentation) ”Genetic engineering of microalgae for photosynthetic biofuel production” 2013年11月11-15日 10th IMBC, International Marine Biotechnology Conference (Australia Brisbane Convention and Exhibition Centre)
 18. 佐藤 江美、山野 隆志、福澤 秀哉 (口頭発表) 「緑藻クラミドモナスの低 CO₂ 誘導性無機炭素輸送体の機能解析」 2013年9月13-15日 日本植物学会第77大会 (北海道 北海道大学 高等教育推進機構)
 19. 山野 隆志、浅田 温子、福澤 秀哉 (口頭発表) 「緑藻の無機炭素濃縮機構に必須な因子 LCIB の局在異常変異株の単離と解析」 2013年9月13-15日 日本植物学会第77大会 (北海道 北海道大学 高等教育推進機構)
 20. 佐藤 江美、山野 隆志、福澤 秀哉 (ポスター発表) 微細緑藻クラミドモナスの低 CO₂ 誘導性無機炭素輸送体の機能解析 2013年6月15-16日 第8回トランスポーター研究会年会 (熊本 熊本大学薬学部)
 21. Takashi Yamano, Atsuko Asada, Hideya Fukuzawa (Poster presentation) ”Isolation and characterization of mutants defective for suborganellar localization of LCIB, an essential factor for CCM in *Chlamydomonas reinhardtii*” 2013年5月27-6月1日 The VIIIth International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (CCM8) (U.S.A., New Orleans, Loyola University)
 22. Lianyong Wang, Takashi Yamano, Hideya Fukuzawa (Poster presentation) “Isolation and characterization of novel high-CO₂ requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by gene tagging” 2013年5月27-6月1日 The VIIIth International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (CCM8)
 23. 佐藤 江美、山野 隆志、福澤 秀哉 (ポスター発表) 「無機炭素濃縮能の増強を目指す

した低 CO₂ 誘導性無機炭素輸送体の機能解析」2013年5月31-6月1日 第4回日本光合成学会年会および公開シンポジウム(名古屋 名古屋大学 野依記念学術交流館)

24. 舟津 尚子、山野 隆志、井口 ひろ、福澤 秀哉(ポスター発表)「無機炭素濃縮の制御因子 CCM1 に結合する CBP1 の機能解析」2013年5月31-6月1日 第4回日本光合成学会年会および公開シンポジウム(名古屋 名古屋大学 野依記念学術交流館)
25. 王 連勇、山野 隆志、高根 俊輔、福澤 秀哉(ポスター発表)「緑藻クラミドモナスにおける新規高 CO₂ 要求性変異株の単離の解析」2013年5月31-6月1日 第4回日本光合成学会年会および公開シンポジウム(名古屋 名古屋大学 野依記念学術交流館)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: Method of transferring gene into algal cell involving utilizing multiple square-wave pulses in three steps

発明者: Hideya Fukuzawa, Takashi Yamano, Kentaro Ifuku, Yasuhiko Hayakawa

権利者: Nepa Gene Co. Ltd., Kyoto University

種類: Patent application

番号: US 2015/0011008 A1

出願年月日: Jan. 8, 2015

国内外の別: 国外(米国)

○取得状況(計1件)

名称: 3段階方式矩形波多重パルスを利用した藻類細胞への遺伝子導入法

発明者: 福澤秀哉、山野隆志、伊福健太郎、早川靖彦

権利者: 国立大学法人京都大学、ネッパジン株式会社

種類: 特許

番号: 特許第 5721191 号

出願年月日: 平成 25 年 7 月 2 日

取得年月日: 平成 27 年 4 月 3 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.molecule.lif.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 隆志 (YAMANO, Takashi)

京都大学大学院生命科学研究科・助教

研究者番号: 70570167