

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03964

研究課題名(和文) CO₂固定酵素ルビスコの機能発現最適化による光合成の機能改良

研究課題名(英文) Improvement of photosynthesis by functional optimization of RuBisCO

研究代表者

蘆田 弘樹 (Ashida, Hiroki)

神戸大学・人間発達環境学研究科・准教授

研究者番号：50362851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：光合成CO₂固定酵素ルビスコのCO₂/O₂識別機構を明らかにするために、CO₂/O₂識別能が大きく異なる常温性と好熱性シアノバクテリアのルビスコの構造活性相関研究を行い、この酵素のsmallサブユニットがこの機構に大きく関与していることを明らかにした。また、メタン生成アーキアのルビスコが最もCO₂/O₂識別能が低く、O₂反応性が非常に高いことを明らかにした。さらに、ルビスコが触媒能を発揮するために活性化を必要とするが、シアノバクテリアにおけるルビスコ活性化タンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食糧生産やバイオ燃料・バイオプラスチック生産のために、植物や藻類が行っている大気CO₂から有用物質を生産する光合成機能の改良が期待されている。光合成機能改良には、CO₂固定を行う酵素ルビスコの機能改良が必須である。本研究では、ルビスコのCO₂反応性を向上させるための構造とこの酵素の活性化を促進するタンパク質の同定に成功した。今後、ここで得られた成果を応用し、ルビスコの機能改良を行うことで、植物や藻類の光合成機能向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We found that the small subunit of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) is involved in the determination of CO₂/O₂ relative specificity in cyanobacterial RuBisCOs. Enzymatic analysis of methanogenic archaeal RuBisCO revealed that this enzyme showed the most lowest CO₂/O₂ relative specificity among RuBisCOs. We identified RuBisCO activase which catalyzes the activation of this enzyme in cyanobacteria.

研究分野：光合成科学

キーワード：光合成 CO₂固定 ルビスコ シアノバクテリア アーキア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ルビスコは CO₂ 固定反応を触媒する光合成鍵酵素である。農業作物の多くを含む C3 植物の光合成は、様々な局面においてルビスコの CO₂ 固定酵素としての非効率性により大きく抑制されている。ルビスコは O₂ を CO₂ と誤認識して起こる O₂ との反応性を有し、カルボキシラーゼ反応は 21% の高濃度 O₂ を含む大気下では大きく阻害されている。また、様々な環境下で植物内ルビスコの 20~50% は不活性化しており、CO₂ 固定効率をさらに低下させている。O₂ 反応性と不活性化により、植物ルビスコは自身の持つ CO₂ 固定触媒ポテンシャルの 50% も発揮できていない。これが植物の光合成 CO₂ 固定速度をリミットする原因となっている。このことから、ルビスコ O₂ 反応性抑制と活性化促進を行うことができれば、植物光合成を増大させることができると期待されている。これは実際、Faquhar の植物葉における光合成 CO₂ 固定速度シミュレーションモデルから計算したタバコ光合成 CO₂ 固定速度シミュレーションデータによって予想されている。

ルビスコは光合成生物進化に対応し、O₂ 反応性を抑制し、CO₂ 識別能力を高めるよう分子進化を果たしている。実際、CO₂ 識別能力は原始的な光合成細菌ルビスコで最も低く、次いで原核藻類であるシアノバクテリア、真核緑藻類、植物の順に高くなる。しかしながら、分子進化を果たした植物ルビスコでさえ CO₂ 識別能力は未だに劣悪であり、大気下において 2~3 回のカルボキシラーゼ反応を触媒する間に 1 回は O₂ と反応し、オキシゲナーゼ反応を触媒してしまう。このような植物ルビスコの CO₂ 固定酵素としての劣悪さは、祖先タンパク質からルビスコが誕生した際に獲得してしまい、長い分子進化の末でさえも O₂ 反応性を抑制しきれなかったと考えられる。

研究代表者はこれまでに、好熱性原始紅藻のルビスコは O₂ 反応性が低く、植物ルビスコの 30% に抑制されていること、また 50°C で生育可能な好熱性シアノバクテリアのルビスコは常温性シアノバクテリアのものと比較し O₂ 反応性が 40% に抑制されていることを明らかにしてきた。これらのルビスコは、この酵素の分子進化・機能進化がどのようにして起こったのか？どのように O₂ 反応性を獲得してしまったのか？また、分子進化過程で、どのように O₂ 反応性を抑制して CO₂ 識別能を高めてきたのか？を解析する好材料である。また、非光合成生物であるアーキアが有するルビスコは、光合成ルビスコの進化的原型に近く、ルビスコの分子進化過程や O₂ 反応性を獲得した経緯を解析する酵素として注目されている。

植物や真核藻類において、ルビスコアクチベースがルビスコの活性化率を高めているが、植物・真核藻類の葉緑体祖先であるシアノバクテリアではルビスコアクチベースの有無は明らかにされていなかった。研究代表者は、一部のシアノバクテリアでは、アクチベース様タンパク質がルビスコスモールサブユニットとの融合タンパク質としてゲノムにコードされている。このアクチベース様タンパク質-ルビスコスモールサブユニット融合タンパク質は、ルビスコの活性化促進を担っている可能性がある。しかし、ルビスコスモールサブユニット-アクチベース融合タンパク質の機能解析は全く行われてこなかった。このタンパク質の機能解析は、ルビスコの活性化機構および活性化機構の分子進化を理解する上で重要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ルビスコの O₂ 反応性抑制による高機能化、活性化促進による機能発現最適化を行い、植物光合成の促進を目指すための基盤研究を行った。このために、ルビスコの (1) 機能分子進化解析を行うことで、ルビスコの O₂ 反応性・CO₂ 識別能力に関わる部位や構造を明らかにするとともに、(2) ルビスコの活性化機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ルビスコの O₂ 反応性・CO₂ 識別能力の決定機構の解析

①好熱性と常温性シアノバクテリアルビスコの構造活性相関解析

原始好熱性紅藻のルビスコに代表されるように、高温に適応している光合成生物の利用しているルビスコは、CO₂/O₂ 反応比特異性が高い。この性質を常温で生育する植物のルビスコの機能改良に応用できれば、植物光合成の向上が可能となる。好熱性ルビスコの高い CO₂/O₂ 反応比特異性の原因を明らかにするために、アミノ酸配列と立体構造の相同性・類似性が非常に高い好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* のルビスコと常温性 *Synechococcus elongatus* PCC7942 のルビスコを研究対象とした。シアノバクテリアルビスコは、ラージサブユニット 8 個とスモールサブユニット 8 個が会合した 16 量体で機能するが、好熱性シアノバクテリアルビスコの CO₂/O₂ 反応比特異性が高い原因構造を解析するために、両野生型ルビスコおよび両ルビスコのスモールサブユニットを入れ替えたスワップ型の好熱性ラージサブユニット/常温性スモールサブユニット、常温性スモールサブユニット/好熱性スモールサブユニットの構造活性相関解析を行った。常温性、好熱性シアノバクテリアルビスコ野生型とサブユニットをワップさせたキメラルルビスコの大腸菌発現系を構築した。発現・精製を行ったキメラルルビスコの酵素特性を解析した。

②アーキアルルビスコの酵素特性解析

光合成ルビスコが機能進化の過程で、どのようにして O₂ 反応性を獲得してしまったのか、そ

の進化機構を明らかにすることは、ルビスコの O_2 反応性を抑制するための情報として重要であると考えられた。そこで、光合成ルビスコの進化的祖先である非光合成生物であり、生物進化において生命の起源に近いと考えられているアーキアが有するルビスコに着目した。特に、独立栄養生育が可能な絶対嫌気性メタン生成アーキア *Methanospirillum hungatei* のルビスコを大腸菌リコンビナントタンパク質として発現・精製したルビスコの酵素特性解析を行った。

(2) ルビスコ活性化タンパク質の解析

シアノバクテリアのルビスコアクチベース様タンパク質-ルビスコスモールサブユニット融合タンパク質機能解析を行うために、糸状性シアノバクテリア *Nostoc punctiforme* のこのタンパク質の大腸菌発現系を構築した。ルビスコアクチベース様タンパク質-ルビスコスモールサブユニット融合タンパク質とシアノバクテリアのルビスコを大腸菌で共発現させ、このタンパク質の機能を解析した。また、大腸菌発現系で得た、シアノバクテリアルビスコとルビスコアクチベース様タンパク質-ルビスコスモールサブユニット融合タンパク質を用いて、ルビスコの活性化能を解析した。

4. 研究成果

(1) ルビスコの O_2 反応性・ CO_2 識別能力の決定機構の解析

① 好熱性と常温性シアノバクテリアルビスコの構造活性相関解析

好熱性シアノバクテリアルビスコの CO_2/O_2 反応比特異性が高い原因構造を解析するために、両野生型ルビスコおよび両ルビスコのスモールサブユニットを入れ替えたスワップ型の好熱性ラージサブユニット/常温性スモールサブユニット、常温性ラージサブユニット/好熱性スモールサブユニットの構造活性相関解析を行った。その結果、常温性ラージサブユニット/好熱性スモールサブユニットのスワップ型ルビスコは常温性ルビスコ野生型よりも CO_2/O_2 反応比特異性が 6% 高くなり、逆に好熱性ラージサブユニット/常温性スモールサブユニットのスワップ型ルビスコは好熱性野生型よりも CO_2/O_2 反応比特異性が 19% 低くなった (表 1)。

$K_m(CO_2)$ に関しては、常温性ラージサブユニット/好熱性スモールサブユニットスワップ型ルビスコは常温性ルビスコ野生型と比較して 59% 低下し、好熱性ラージサブユニット/常温性スモールサブユニットスワップ型ルビスコは好熱性野生型より 2% 低下した。また、カルボキシラーゼ最大反応速度 $V_{max}(CO_2)$ について、常温性ラージサブユニット/好熱性スモールサブユニットスワップ型ルビスコは常温性野生型より 72% 低下し、一方で、好熱性ラージサブユニット/常温性スモールサブユニットのスワップ型が好熱性野生型よりも 7% 低くなった。熱安定性に関しても、常温性ラージサブユニット/好熱性スモールサブユニットスワップ型を常温性野生型と比較すると、失活温度が 65°C から 80°C へと高くなり、好熱性ラージサブユニット/常温性スモールサブユニットは好熱性野生型と比較して、失活温度が 75°C から 65°C へと低下した (図 1)。これらの結果から、好熱性シアノバクテリアルビスコのスモールサブユニットは、常温性ルビスコの酵素特性を好熱性型に近づけることが分かった。以上のことから、好熱性シアノバクテリアルビスコの高 CO_2/O_2 反応比特異性にスモールサブユニットが大きく関与していることを明らかにし、 CO_2/O_2 反応比特異性を決定する構造を同定した。

② アーキアルビスコの酵素特性解析

絶対嫌気性メタン生成アーキア *M. hungatei* のルビスコの酵素学的パラメータを解析した結果、カルボキシラーゼ最大反応速度が光合成ルビスコである植物のもの 7%、シアノバクテリアの 1.3%、光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* の 2% で、非常に低いことが明らかになった。また、このルビスコの CO_2/O_2 反応比特異性を解析した結果、植物のもの 2.5%、シアノバクテリアの 4%、光合成細菌 *R. rubrum* の 13% であった。この CO_2/O_2 反応比特異性は、これまでに報告さ

表 1 シアノバクテリア野生型とスワップ型ルビスコの CO_2/O_2 反応比特異性

シアノバクテリアルビスコ	CO_2/O_2 反応比特異性
常温性野生型	40.7 ± 5.9
常温性L/好熱性S	43.3 ± 4.2
好熱性野生型	65.2 ± 3.5
好熱性L/常温性S	60.3 ± 3.8

データは3回の独立した測定の平均値 ± SD で示す。LとSはそれぞれ、ラージサブユニットとスモールサブユニットを示す。

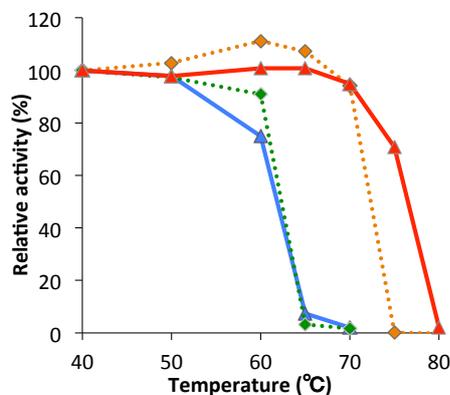


図 1 シアノバクテリア野生型とスワップ型ルビスコの熱安定性を示す。

緑色は常温性野生型、橙色は好熱性野生型、青線は好熱性L/常温性Sスワップ、赤線は常温性L/好熱性Sスワップを示す。LとSはそれぞれ、ラージサブユニットとスモールサブユニット

れているルビスコの中で最も低く、*M. hungatei* のルビスコは CO_2/O_2 識別能が非常に低く、 O_2 反応性がどのルビスコよりも高いことが明らかになった。また、これらの結果から、このメタン生成アーキアのルビスコは O_2 反応性に特化していると考えられ、ルビスコの O_2 反応性のメカニズムや O_2 反応性の分子進化を今後研究するための好材料を得ることができた。

(2) ルビスコ活性化タンパク質の解析

ルビスコアクチベース様タンパク質-ルビスコスモールサブユニット融合タンパク質のルビスコとの関係性を解析するために、このタンパク質とシアノバクテリアのルビスコを大腸菌で共発現させた結果、共発現させない場合と比較して、可溶性タンパク質におけるルビスコの発現量が増加した。このことから、ルビスコアクチベース様タンパク質-ルビスコスモールサブユニット融合タンパク質はシアノバクテリアルビスコの大腸菌での発現量・可溶化を促進させるシャペロンのような機能を果たしていることが明らかになった。さらに、基質であるリブローズ 1,5-ビスリン酸結合型、反応中間体アナログであるカルボキシアラビニトールビスリン酸結合型の不活性化型ルビスコとルビスコアクチベース様タンパク質-ルビスコスモールサブユニット融合タンパク質を ATP 存在下で反応させると反応させない場合と比較して、ルビスコの活性化が促進された。このことから、シアノバクテリアのルビスコアクチベース様タンパク質-ルビスコスモールサブユニット融合タンパク質は植物などのルビスコアクチベースと同じように、ルビスコを活性化させる能力を有していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroki Ashida, Eiichi Mizohata, Akiho Yokota	4. 巻 47
2. 論文標題 Learning RuBisCO's birth and subsequent environmental adaptation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Society transactions	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BST20180449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sekowska Agnieszka, Ashida Hiroki, Danchin Antoine	4. 巻 12
2. 論文標題 Revisiting the methionine salvage pathway and its paralogues	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbial Biotechnology	6. 最初と最後の頁 77-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1751-7915.13324	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Dinh Huyen, Nakata Eiji, Lin Peng, Saimura Masayuki, Ashida Hiroki, Morii Takashi	4. 巻 27
2. 論文標題 Reaction of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase assembled on a DNA scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115120	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 蘆田弘樹	4. 巻 25
2. 論文標題 光合成二酸化炭素固定酵素RuBisCO	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Society of Inorganic Materials	6. 最初と最後の頁 406-411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 蘆田弘樹	4. 巻 78
2. 論文標題 メタン生成アーキアにおけるRuBisCOを利用した新規CO2固定経路	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 酵素工学ニュース	6. 最初と最後の頁 14-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河野飛鳥、磯野香奈子、合田初奈、林美彩希、蘆田弘樹
2. 発表標題 好熱性と常温性シアノバクテリアRuBisCOの構造活性相関研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蘆田弘樹
2. 発表標題 CO2固定酵素RuBisCOの多様な機能進化
3. 学会等名 第4回光合成細菌ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤樹理、工藤悠希、堀千明、大井俊彦、蘆田弘樹、松本謙一郎
2. 発表標題 グリコール酸ポリマー合成系を用いたRuBisCOの性能比較
3. 学会等名 2018年度日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蘆田弘樹
2. 発表標題 光合成CO2固定酵素RuBisCOの機能進化解析と光合成機能改良への応用
3. 学会等名 第7回合成生物学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蘆田弘樹
2. 発表標題 光合成生物の枠を超えたCO2固定酵素RuBisCOの機能進化
3. 学会等名 新光合成 & 光合成若手の会ジョイント若手ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 磯野香奈子、合田初奈、河野卓成、蘆田弘樹
2. 発表標題 好熱性・常温生シアノバクテリアRuBisCOのCO2識別能力にスモールサブユニットが関与する
3. 学会等名 新光合成 & 光合成若手の会ジョイント若手ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蘆田弘樹
2. 発表標題 非光合成生物におけるCO2固定酵素RuBisCOホモログの機能
3. 学会等名 第12回日本ゲノム微生物学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蘆田弘樹
2. 発表標題 光合成機能の改良と応用
3. 学会等名 第43回バイオマスイノベーション研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 磯野香奈子、蘆田弘樹
2. 発表標題 常温性と好熱性シアノバクテリア間のサブユニットスワップ型 RuBisCO の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関