

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26292193

研究課題名(和文)炭素固定酵素ルビスコの高機能化と活性化促進による光合成リミットブレイク

研究課題名(英文)Limit break of photosynthesis by improvement of RuBisCO functions

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：メタン生成アーキアのルビスコが光合成カルビン回路と一部のみが異なる新規CO₂固定回路で機能していることを明らかにした。これらの結果から、ルビスコが機能する光合成カルビン回路の進化的原型を発見した。

高いCO₂識別能を示す好熱性シアノバクテリアと常温性シアノバクテリアルビスコのラージとスモールサブユニットをスワップしたキメラルビスコの解析から、CO₂識別能にスモールサブユニットが大きく関与していることが明らかになった。タバコにおけるルビスコアクチベース過剰発現が、光合成CO₂固定速度を促進する傾向が見られた。

研究成果の概要(英文)：We found methanogenic archaeal RuBisCO functions in the novel CO₂ fixation pathway which has some different steps from the photosynthetic Calvin cycle, suggesting that this novel pathway should be the ancient Calvin cycle. Enzymatic analysis of hybrid RuBisCO created by swap of large and small subunits between thermophilic cyanobacteria RuBisCO with high CO₂ specificity and mesophilic cyanobacteria RuBisCO revealed that small subunit was involved in CO₂ specificity. Transplastomic tobacco with over expression of RuBisCO activase tends to be enhanced a photosynthetic CO₂ fixation rate.

研究分野：光合成科学

キーワード：光合成 CO₂固定 ルビスコ アーキア シアノバクテリア 進化

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リミットされている。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、生命の起源に近いと考えられるアーキアや非光合成細菌、また植物葉緑体の起源であるシアノバクテリアに、ルビスコの進化的祖先タンパク質を発見してきた。また、これまでに、高温適応している光合成生物が利用するルビスコのO₂反応性が抑制され、CO₂識別能力が高いことを発見してきた。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%に抑制されており、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と比較しO₂反応性が40%に抑制されている。このように、祖先タンパク質と好熱性光合成生物ルビスコは、ルビスコ機能進化における両極に位置しており、ルビスコの分子進化・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?を明らかにする好材料である。

ルビスコが触媒能を獲得するためには、触媒残基Lys201が基質と異なるCO₂によってカルバミル化修飾(活性化)されることが必

須である。しかし、大気CO₂条件下では、全ルビスコの20%しか活性化型を採れない。このため、植物はルビスコ活性化タンパク質ルビスコアクチベースを用いて活性化率を高めているが、それでも尚20~50%は不活性化されたままである。この眠ったルビスコを起動させることができれば、光合成を促進することが可能であると予想された。

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、植物光合成のリミットブレイクを介した植物の光合成・収量増加を目指すための基盤研究を行った。このために、ルビスコ(1)機能分子進化解析を行うことで、ルビスコのO₂反応性抑制・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反応性機構の解析

アーキアの原始ルビスコの解析

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O₂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メタン生成アーキアである*Methanospirillum hungatei*の祖先ルビスコを研究対象とし、大腸菌リコンビナントタンパク質として発現・精製した*M. hungatei*ルビスコの酵素学的特徴付けおよび¹³CO₂を取り込ませルビスコによって固定された¹³Cの行方をメタボローム解析によって調べ、*M. hungatei*生体内におけるルビスコの機能解析を行った。

好熱性シアノバクテリアにおけるO₂反応性抑制部位の解析

好熱性シアノバクテリア*Thermosynechococcus elongatus* BP1のルビスコは常温性シアノバクテリアルビスコと比較してO₂反応性が40%抑制されている。このことから、*T. elongatus*ルビスコにおいてO₂反応性抑制に関わる部位を特定する解析を行った。植物やシアノバクテリアのルビスコは触媒部位を含むラージサブユニット8個と触媒反応には直接関わらないスモールサブユニット8個からなる16量体で機能している。*T. elongatus*ルビスコのラージサブユニットとスモールサブユニットのどちらが低O₂反応性に関わっているかを解析するために、*T. elongatus*ルビスコと常温性シアノバクテリアである*Synechococcus elongatus*

PCC7942 間でルビスコのサブユニットをワップさせたキメラ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ビスコの酵素特性を解析し、 O_2 反応性に関わるサブユニットの解析を行った。

(2) ルビスコ活性化機構の解析

植物葉における、ルビスコの活性化とルビスコアクチベース量の関係性を解析し、ルビスコの活性化メカニズムを明らかにするために研究を行った。これまでに、アンチセンス法でルビスコアクチベース遺伝子発現量を抑制させた植物の研究から、ルビスコアクチベース量の減少に伴い光合成速度が低下することが報告されている。しかしながら、ルビスコアクチベース量を増加させる研究は、核ゲノムへの遺伝子導入のみにより行われてきたため、ルビスコアクチベースを過剰発現させた研究は行われていない。本研究ではタバコでルビスコアクチベースを過剰発現させるために、高発現が期待され、さらにルビスコアクチベースの機能場所である葉緑体のゲノムにルビスコアクチベース遺伝子を導入した葉緑体形質転換タバコの作製を行い、解析を行った。

4. 研究成果

(1) ルビスコの O_2 反応性機構の解析

アーキアの原始ルビスコの解析

大腸菌で発現させ、精製したメタン生成アーキア *M. hungatei* のルビスコを用いて CO_2 識別能力値を解析した結果、植物、真核緑藻ルビスコが示す値のそれぞれ 1 / 40 倍、1 / 30 倍低いことが明らかになった。また、光合成生物の中で最も低い CO_2 識別能力を示す光合成細菌ルビスコよりもさらに 1 / 5 倍であった。これらのことから、*M. hungatei* のルビスコは、これまで報告されているルビスコの中で最も低い CO_2 識別能力値を示すルビスコグループに属することが明らかになった。

M. hungatei を含むアーキアは、非光合成生物であり、これまで光合成 CO_2 固定のためのカルビン回路を利用していないと考えられてきた。このため、この生物におけるルビスコの生体内機能が不明であったため、機能解析を行った。*M. hungatei* のゲノム情報から、ルビスコの CO_2 固定反応における CO_2 のアクセプター基質であるリブローズビスリン酸をリブローズ 5 リン酸から合成するホスホリプロキナーゼ遺伝子ホモログを有していることとこのホモログがホスホリプロキナーゼ活性を有していることをこれまでの研究から発見していた。ホスホリプロキナーゼはルビスコ同様、光合成カルビン回路に特徴的な酵素で、アーキアでははじめての発見となった。そこで、*M. hungatei* ホスホリプロキナーゼの X 線結晶解析を行い、立体構造を明らかにした。その結果、モノマーの全体構造、さらに活性部位のアミノ酸残基とその

配置が構造が明らかにされている光合成細菌のホスホリプロキナーゼと類似していた。しかしホモダイマーの形成様式が光合成細菌のものとは異なっていることが明らかになった。

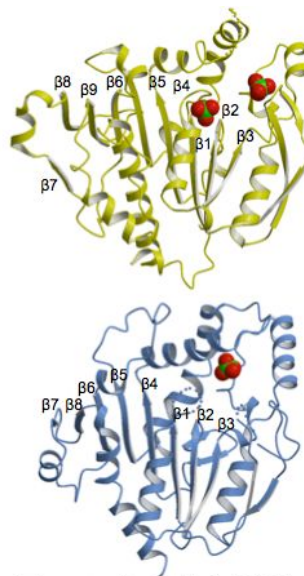


図1 アーキアと光合成細菌のホスホリプロキナーゼ構造比較
上:メタン生成アーキア*M. hungatei*、
下:光合成細菌

M. hungatei 生体内において、ルビスコが機能する代謝経路を明らかにするために、*M. hungatei* の菌体に $^{13}CO_2$ を取り込ませ、ルビスコによって固定された ^{13}C の行方を CE-MS を用いたメタボローム解析により追跡し、各代謝産物において ^{13}C ラベル速度を算出した。その結果、ルビスコの CO_2 固定反応産物である 3-ホスホグリセリン酸への ^{13}C ラベル速度が最も高かったことから、*M. hungatei* においてルビスコが主要な CO_2 固定ステップを触媒していることが明らかとなった。また、ルビスコが固定した固定炭素の大部分は、解糖系と糖新生へ分配されていた。さらに、一部の固定炭素はホスホリプロキナーゼの触媒によりルビスコの CO_2 固定反応基質リブローズビスリン酸にリサイクルされていた。このリサイクルは、光合成カルビン回路のフルクトース 6 リン酸からリブローズ 5 リン酸のステップがアーキアやバクテリアに特有のリブローズモノリン酸経路に置換されることで可能となっていた。つまり、*M. hungatei* において、光合成カルビン回路の一部のみ異なったルビスコを利用した CO_2 固定回路、いわば原始カルビンサイクルが機能していることを明らかにした。これらの結果は、ルビスコの機能進化をアーキアにまで遡り明らかにしただけでなく、光合成カルビン回路の進化的原型を発見し、光合成炭素代謝の進化に迫るものであった。これらの成果は Nature Communications に掲載されるとともに、文科省や JST を介してプレスリリースを行い、産経新聞、日本経済新聞、神戸新聞、奈良新聞等で大々的に報道された。

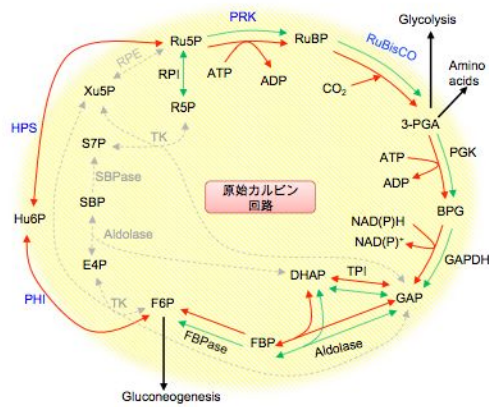


図2 原始カルビン回路
赤矢印は原始カルビン回路の代謝ステップ、
緑矢印は原始カルビン回路と光合成カルビン
回路で共通のステップ、破線矢印は原始カル
ビン回路で置換されているステップを示す。

好熱性シアノバクテリアにおける O₂ 反応性抑制部位の解析

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP1 と常温性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 ルビスコのラージサブユニットとスモールサブユニットの組み合わせをスワップさせたキメラルビスコの大腸菌発現系を構築した。発現させた2種のキメラルビスコを精製し、SDS-PAGE によって解析した結果、好熱性ラージサブユニットと常温性スモール1サブユニット、また常温性ラージサブユニットと好熱性スモールサブユニットが会合していることが分かった。また両キメラルビスコは、ルビスコ CO₂ 固定反応触媒能を有していたことから、好熱性と常温性シアノバクテリア間でのサブユニットの交換によって機能的なラージサブユニットとスモールサブユニットから成る16量体ルビスコの形成が可能であることが明らかになった。キメラルビスコと同じように大腸菌で発現させ精製した好熱性と常温性の野生型ルビスコの酵素特性を解析した。その結果、常温性ラージサブユニットに好熱性スモールが会合することで、常温性野生型ルビスコよりも CO₂ 識別能力が高くなった。また、逆に好熱性ラージサブユニットに常温性スモールサブユニットが会合することで、常温性野生型ルビスコよりも CO₂ 識別能力は低くなった。これらの結果から、スモールサブユニットがルビスコの CO₂ 識別能力を決定する一つの要因であることを明らかにした。

(2) ルビスコ活性化機構の解析

タバコの核ゲノムにコードされるルビスコアクチベース遺伝子 *rca1* と *rca2* の2種類のcDNA を葉緑体で高発現が期待できる *psbA* プロモーターにそれぞれ連結させ、抗生物質スペクチノマイシン耐性遺伝子とともに、タバコ葉緑体へパーティクルボンバードメント法により形質転換を行った。スペクチノマイ

シン添加の再分化培地上で3回の再分化処理を行ったルビスコアクチベース遺伝子導入タバコの葉緑体ゲノムDNAをPCR及びサザンブロットによって解析した結果、葉緑体ゲノムに目的のルビスコアクチベース遺伝子を持つホモプラズミック形質であることが明らかになった。無菌寒天培地で栽培していたこれらの形質転換タバコを土壌栽培に移し、種子を取得した。*rca1*、*rca2* 導入葉緑体形質転換タバコにおけるルビスコアクチベース遺伝子の発現をRT-PCRによって解析した結果、それぞれにおいて導入遺伝子が過剰発現していることを確認することができた。特に発現が高い *rca1* 過剰発現株の光合成 CO₂ 固定速度を解析した結果、野生株と比較して、高い光強度下で高くなる傾向が見られた。

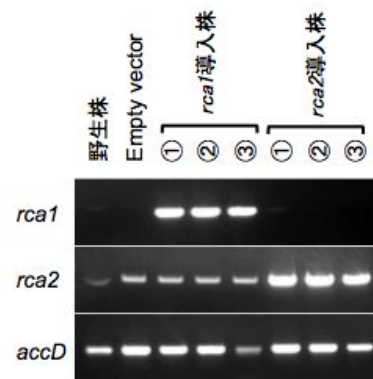


図3 葉緑体形質転換タバコにおける *rca* 遺伝子発現
内在コントロール遺伝子として *accD* 遺伝子を用いた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Takunari Kono, Sandhya Mehrotra, Chikako Endo, Natsuko Kizu, Mami Matusda, Hiroyuki Kimura, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Tomohisa Hasunuma, Akiho Yokota, Hiroyoshi Matsumura, Hiroki Ashida, A RuBisCO-mediated carbon metabolic pathway in methanogenic archaea., Nature Communications, 査読有、8:14007, 2017, DOI:10.1038/ncomms14007 <https://www.nature.com/articles/ncomms14007>

日原由香子、朝山宗彦、蘆田弘樹、天尾豊、新井宗仁、粟井光一郎、得平茂樹、小山内崇、鞆達也、成川礼、蓮沼誠久、増川一、多彩な戦略で挑むシアノバクテリア由来の燃料生産 持続可能な第三世代バイオ燃料生産、日本農芸化学会誌化学と生物、査読有、vol. 55、2017、pp. 88-97

蘆田弘樹、CO₂資源化を目指した光合成炭素固定酵素 RuBisCO の機能進化研究、日本化学会誌 化学と工業、査読有、vol. 69、2016、pp. 957-959

Akira Katoh, Hiroki Ashida, Ichiro Kasajima, Shigeru Shigeoka, Akiho Yokota, Potato yield enhancement through intensification of sink and source performances. *Breeding Science*, 査読有、vol. 65, 2015, pp. 77-84

Wonchull Kang, Se Hoon Hong, Hye Min Lee, Na Yeon Kim, Yun Chan Lim, Le Thi My Le, Bitna Lim, Hyun ChulKim, Tae Yeon Kim, Hiroki Ashida, Akiho Yokota, Sang Soo Hah, Keun Ho Chun, Yong-Keun Jung, Jin Kuk Yang, Structural and biochemical basis for the inhibition of cell death by APIP, a methionine salvage enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 査読有、vol. 111, 2014, pp. 54-61

〔学会発表〕(計 7 件)

河野卓成、Sandhya Mehrotra、遠藤千夏子、松田真実、木村浩之、蓮沼誠久、横田明穂、松村浩由、蘆田弘樹、アーキアに発見した光合成カルビンサイクルの進化的原型、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017.3.20、京都女子大学(京都府)

蘆田弘樹、光合成機能の研究と応用、日本品質管理学会第 112 回研究発表会 2016.9.2、大阪大学中之島センター(大阪府)

西村隆秀、高木祐子、中山泰宗、傳寶雄大、福崎英一郎、蘆田弘樹、陀安一郎、秋田求、泉井桂、C4 光合成の炭酸固定酵素と脱炭酸酵素の C3 植物への導入による代謝系の改変：水ストレス耐性の向上とその基盤のメタボローム解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.3.28、北海道コンベンションセンター(北海道)

河野卓成、蘆田弘樹 光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究からの CO₂ 資源化への展開、日本化学会第 96 回春季年会特別企画 生命化学研究から見た CO₂ 資源化：光合成研究と人工光合成の融合を目指して、2016.3.24、同志社大学京田辺キャンパス(京都府)

蘆田弘樹、光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究、農芸化学会関西支部第 492 回講演会、2015 年度日本農芸化学会

奨励賞受賞講演、2016.12.5、神戸大学(兵庫県)

蘆田弘樹、光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究、日本農芸化学会 農芸化学奨励賞受賞講演、2015.3.26、岡山大学(岡山県)

蘆田弘樹、光合成炭素固定酵素の機能進化、環境変動の生態・生理学に関する研究会、2015.3.16、神戸大学(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蘆田 弘樹(Hiroki, Ashida)
神戸大学・大学院人間発達環境学研究所・准教授
研究者番号：50362851