

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07843

研究課題名(和文)ハイブリッド型葉緑体を持つ植物の創出とその機能解析

研究課題名(英文) Generation and characterization of transgenic plants carrying hybrid chloroplasts

研究代表者

稲葉 丈人 (INABA, TAKEHITO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：00400185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、葉緑体タンパク質輸送機構を利用してシアノバクテリアの重炭酸イオン輸送体を葉緑体内包膜に導入し、CO<sub>2</sub>濃縮機構を持つ「ハイブリッド型葉緑体」を創出することを目的とした。その結果、シアノバクテリアが持つ重炭酸イオン輸送体BicA及びSbtAのキメラタンパク質(BicAI, BicAII, SbtAII, 及びSbtAIII)を発現する植物の作出に成功した。さらに、これらのキメラ重炭酸イオン輸送体は、いずれも葉緑体内包膜に局在することが明らかになった。また、これらの形質転換植物から単離した葉緑体を用いて、重炭酸イオン輸送活性の測定条件も検討した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed at installing cyanobacterial bicarbonate transporters into the inner envelope membrane of chloroplasts and creating "hybrid-chloroplast" carrying CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism. We have successfully generated transgenic plants expressing chimeric cyanobacterial bicarbonate transporters (BicAI, BicAII, SbtAII, and SbtAIII). Furthermore, we have demonstrated that these chimeric bicarbonate transporters are localized to the inner envelope membrane of chloroplasts. We have also explored conditions to investigate bicarbonate transport activity using isolated chloroplasts.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：葉緑体 光合成 シロイヌナズナ 重炭酸イオン輸送体

### 1. 研究開始当初の背景

葉緑体における光合成・CO<sub>2</sub> 固定反応は地球上の生命を支える最も重要な化学反応のひとつである。とりわけ、化石燃料の消費により大気中の CO<sub>2</sub> 濃度が年々上昇し、近い将来、食糧不足も予想される今日においては、植物の CO<sub>2</sub> 固定能力・物質生産能力を向上させることは人類にとって最重要課題の一つであると言っても過言ではない。CO<sub>2</sub> 固定反応を触媒する鍵酵素・リブローズ二リン酸カルボキシラーゼ (Rubisco) は、CO<sub>2</sub> を取り込む「カルボキシラーゼ活性」に加え、酸素を取り込む「オキシゲナーゼ活性」も持つ。大気中の O<sub>2</sub> 濃度 (約 21%) は CO<sub>2</sub> 濃度 (約 0.04%) に比べてはるかに高いのでオキシゲナーゼ反応は高頻度で起こり、生じた化合物が代謝される過程で一度固定された CO<sub>2</sub> が再放出されるため、結果的に多くの陸上植物 (C<sub>3</sub> 植物) における光合成効率を著しく低下させている。

一方、葉緑体の祖先である「シアノバクテリア」は、重炭酸イオン輸送体により細胞内に CO<sub>2</sub> を濃縮することで Rubisco のオキシゲナーゼ活性を抑えることが知られている。現在までに、少なくとも 5 種類の重炭酸イオンあるいは CO<sub>2</sub> 輸送体が報告されており、これらを葉緑体内包膜に導入して葉緑体内に CO<sub>2</sub> を濃縮することができれば、多くの陸上植物の CO<sub>2</sub> 固定能を飛躍的に向上させることが可能になると期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、葉緑体タンパク質輸送機構を利用してシアノバクテリアの重炭酸イオン輸送体を葉緑体内包膜に導入し、CO<sub>2</sub> 濃縮機構を持つ「ハイブリッド型葉緑体」を創出することを目的とした。さらに、ハイブリッド型葉緑体を持つ植物の生理学的解析を行うことも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 内包膜輸送シグナルを付加した重炭酸イオン輸送体遺伝子の核ゲノムへの導入と形質転換植物の作出

まず、葉緑体内包膜タンパク質 Cor413im1 をシアノバクテリアの重炭酸イオン輸送体 BicA 及び SbtA に融合したコンストラクトを作製し、これをシロイヌナズナの核ゲノムに導入した。さらに、これらのタンパク質を高発現する植物をスクリーニングした。

(2) 導入した重炭酸イオン輸送体の葉緑体内局在の調査

(1) でスクリーニングした植物から葉緑体を単離・分画して、導入したキメラ重炭酸イオン輸送体の葉緑体内局在を調査した。

(3) 単離したハイブリッド型葉緑体を用いた重炭酸イオン輸送活性測定の見直し

重炭酸イオン輸送体を導入した植物から無傷葉緑体を単離し、重炭酸イオン輸送活性測定条件の見直しを行った。

(4) 形質転換体の解析

目的のハイブリッド型葉緑体を持つ植物の生理学的解析を行った。具体的には、ストレス条件下における植物の成長などを調査した。また、遺伝子発現解析やタンパク質のプロファイリングも行った。

### 4. 研究成果

まず、*Synechocystis* sp. PCC6803 株より、ナトリウムイオン依存型重炭酸イオン輸送体 *BicA* 及び *SbtA* 遺伝子をクローニングし、既知の葉緑体内包膜タンパク質 *Cor413im1* とのキメラ遺伝子を作製した (図 1)。

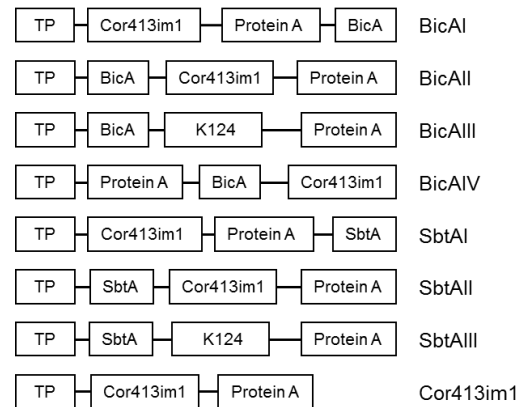


図 1. BicA 及び SbtA キメラ遺伝子の概要

作出したコンストラクトをシロイヌナズナに形質転換し、キメラタンパク質発現株のスクリーニングを行った。その結果、*BicAI*, *BicAII*, *SbtAII*, *SbtAIII* において高発現株が得られた (図 2)。

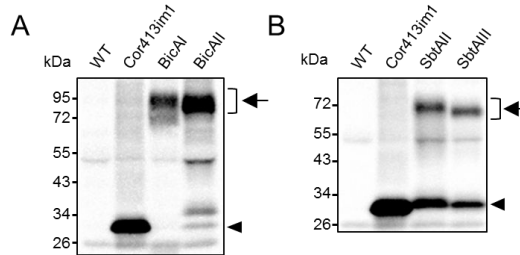


図 2. BicA 及び SbtA キメラタンパク質の検出。矢印がキメラタンパク質、矢頭は Cor413im1 と protein A のキメラタンパク質の位置を示している。

次に、*BicAI*, *BicAII*, *SbtAII*, *SbtAIII* タンパク質の葉緑体内局在を調査した。その結果、いずれのタンパク質も期待通りに葉緑体内包膜に局在することが判明した (図 3)。

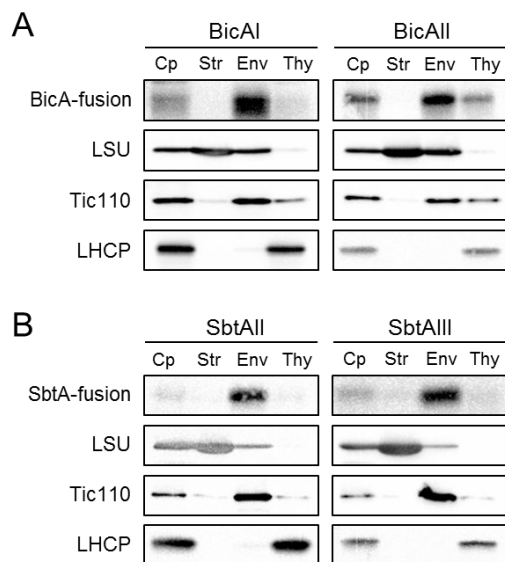


図 3. BicA 及び SbtA キメラタンパク質の葉緑体内局在。いずれの融合タンパク質も包膜画分 (Env) に局在することが分かる。

さらに、形質転換体から単離した葉緑体の重炭酸イオン輸送活性を測定するため、シリコンオイル法を用いて測定条件の検討を行った。その結果、粘度の異なるシリコンオイルを混合して葉緑体を回収可能な条件を見出した。今後は、本研究成果をさらに発展させるために、単離葉緑体の重炭酸イオン輸送活性の測定を行う予定である。

加えて、BicA 及び SbtA キメラタンパク質を発現するシロイヌナズナの生理学的解析を行った。形質転換体を様々な非生物ストレス条件下で生育させてその成長を調べたところ、一部の重炭酸イオン輸送体発現株においてコントロール株よりも良い成長が観察された。

また、前述のキメラ型重炭酸イオン輸送体には、葉緑体内包膜輸送シグナルが付加されているが、これが重炭酸イオン輸送活性に悪影響を与えている可能性が否定できない。そこで、輸送体以外の部分を除去するためのプロテアーゼを植物に導入するためのコンストラクトを作製した(図4)。具体的にはプロテアーゼ遺伝子に葉緑体移行シグナルを付加し、プロテアーゼを葉緑体ストロマに導入するためのキメラ遺伝子を作製した。さらに、プロテアーゼ切断部位を含むキメラ重炭酸イオン輸送体遺伝子を新たに作製した。最終的に、同一ベクター上にキメラ型重炭酸イオン輸送体遺伝子とプロテアーゼ遺伝子を持つコンストラクトを完成させることができ、これをシロイヌナズナに形質転換した。その結果、複数コンストラクトにおいて融合部位を除去し、重炭酸イオン輸送体のみを発現させることに成功した。

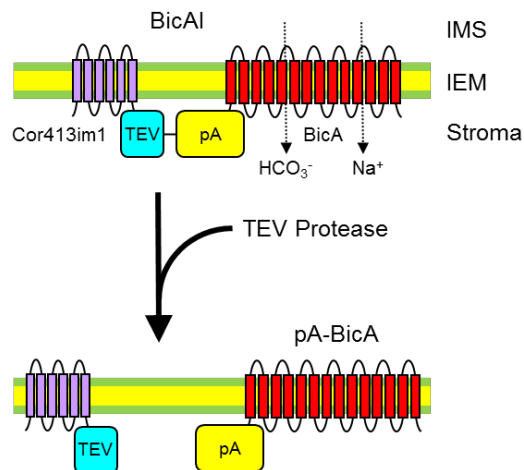


図 4. TEV プロテアーゼを用いたキメラタンパク質の切断戦略

## 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 5 件)

1. Uehara, S., Ito-Inaba, Y. and \*Inaba, T. (2018) Investigating localization of chimeric transporter proteins within chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *BIO-PROTOCOL*, 7, e2723. (査読有り)
2. Hirose, Y., Ito-Inaba, Y. and \*Inaba, T. (2017) Ubiquitin-proteasome dependent regulation of bidirectional communication between plastids and the nucleus. *Front. Plant Sci.*, 8, article 310. (査読有り)
3. Tokumaru, M., Adachi, F., Toda, M., Ito-Inaba, Y., Yazu, F., Hirose, Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Kakizaki, T. and \*Inaba, T. (2017) Ubiquitin-Proteasome Dependent Regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 Transcription Factor in Response to Plastid Signals. *Plant Physiol.*, 173, 524-535. (査読有り)
4. Ito-Inaba, Y., Masuko-Suzuki, H., Maekawa, H., Watanabe, M. and Inaba, T. (2016) Characterization of two PEBP genes, SrFT and SrMFT, in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *Sci. Rep.*, 6, article 29440. (査読有り)
5. Uehara, S., Adachi, F., Ito-Inaba, Y. and \*Inaba, T. (2016) Specific and efficient targeting of cyanobacterial bicarbonate transporters to the inner envelope membrane of chloroplasts in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.*, 7, article 16. (査読有り)

〔学会発表〕(計 15件)

1. 木下寛子, 西田文香, 稲葉靖子, **稲葉丈人** (2018) シロイヌナズナ CONSTANS-LIKE 遺伝子による光合成関連遺伝子及びクロロフィル量の制御. 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28 日-30 日, 札幌
2. 深澤仁, 多田朱里, 稲葉靖子, **稲葉丈人** (2018) 青色光を介した TOC 及び TIC 遺伝子の発現調節とプラスチドタンパク質輸送の制御. 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28 日-30 日, 札幌
3. 上原晋, 稲葉靖子, **稲葉丈人** (2018) シリコンオイル遠心法を用いたシロイヌナズナに導入したシアノバクテリア重炭酸イオン輸送体の輸送活性測定法の検討. 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28 日-30 日, 札幌
4. 三原良太, 稲葉靖子, **稲葉丈人** (2018) シロイヌナズナの低温シグナル伝達を阻害する化合物のスクリーニング. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 15 日-18 日, 名古屋
5. 清絢音, 上原晋, 稲葉靖子, **稲葉丈人** (2017) protease 切断法を用いたシアノバクテリア重炭酸イオン輸送体の植物への導入. 2017 年度日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会, 2017 年 9 月 21 日-22 日, 大阪
6. **Inaba, T.**, Tokumaru, M., Kakizaki, T. and Ito-Inaba, Y. (2017) Roles of GOLDEN2-LIKE 1 transcription factor in the regulation of plastid-to-nucleus retrograde signaling. XIX International Botanical Congress, July, 2017, Shenzhen, China (招待有り)
7. Uehara, S., Ito-Inaba, Y., Mori, I.C. and **Inaba T.** (2017) Expression of cyanobacterial bicarbonate transporters in Arabidopsis chloroplasts and their effects on the growth and photosynthetic performance. XIX International Botanical Congress, July, 2017, Shenzhen, China
8. 上原晋, 稲葉靖子, 森泉, **稲葉丈人** (2017) 葉緑体内包膜に導入したシアノバクテリア重炭酸イオン輸送体がシロイヌナズナの生育に及ぼす影響. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日-18 日, 鹿児島
9. 廣澤嘉洸, 多田朱里, 稲葉靖子, 松浦恭和, 森泉, **稲葉丈人** (2017) 植物ホルモン処理が葉緑体形成阻害を示すシロイヌナズナに及ぼす影響. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日-18 日, 鹿児島

10. 三原良太, 上村沙織, 稲葉靖子, **稲葉丈人** (2017) 水中栽培法を用いたシロイヌナズナの低温馴化機構の解析. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日-18 日, 鹿児島

11. 上原晋, 安達ふみ, 稲葉靖子, 森泉, **稲葉丈人** (2016) 重炭酸イオン輸送体を発現するシロイヌナズナにおける光合成能の評価. 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2016 年 8 月 26 日-28 日, 指宿

12. **稲葉丈人**, 上村沙織, 三原良太, 稲葉靖子 (2016) ケミカルバイオロジーを利用した植物の低温シグナル伝達機構の解析. 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2016 年 8 月 26 日-28 日, 指宿

13. 上原晋, 安達ふみ, 稲葉靖子, **稲葉丈人** (2016) シロイヌナズナにおけるシアノバクテリアの重炭酸イオン輸送体 SbtA の葉緑体内包膜へのターゲティング. 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日-20 日, 盛岡

14. 上原晋, 安達ふみ, 稲葉靖子, **稲葉丈人** (2015) ナトリウムイオン依存型重炭酸イオン輸送体を発現するシロイヌナズナの解析. 第 39 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2015 年 9 月 10 日-12 日, 別府

15. **稲葉丈人** (2015) 葉緑体内包膜への膜タンパク質の輸送～メカニズムとその応用～. 第 8 回トランスポーター研究会九州部会, 2015 年 7 月 18 日, 鹿児島 (招待有り)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲葉 丈人 (INABA TAKEHITO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号: 00400185

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし