

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02169

研究課題名(和文) 合成生物学的手法を用いた高効率CO₂流入経路の構築とそれに基づく光合成能の改良研究課題名(英文) Construction of an efficient CO₂ influx pathway using synthetic biology and improvement of photosynthetic capacity based on this approach

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、効率的なCO₂流入経路を植物体内に人為的に構築するための分子基盤の確立を目的とした。まず、シアノバクテリア重炭酸イオン輸送体を融合したキメラタンパク質とプロテアーゼを植物体内で共発現させ、重炭酸イオン輸送体を野生型タンパク質として葉緑体内に蓄積させる事に成功した。また、プロテインAあるいはGFPと融合した複数の重炭酸イオン輸送体キメラ遺伝子を構築し、これを共発現させることで二種類の重炭酸イオン輸送体を同時に葉緑体に高蓄積させることができた。加えて、気孔開口調節因子と相互作用するタンパク質の同定や、重炭酸イオン輸送体のCO₂取り込み能に影響を与えうる植物側の調節機構を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体における光合成・CO₂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。光合成能力の向上には、葉緑体内のRubisco周辺のCO₂濃度を上げることが重要であり、C₃植物へのCO₂濃縮機構の導入は注目を集めている研究課題である。植物細胞で野生型のシアノバクテリア重炭酸イオン輸送体を発現させる手法や、複数の輸送体を共発現させる方法を確立したことは、CO₂濃縮による光合成改良の分子基盤の一つを築いたと言える。カルボキシソームと重炭酸イオン輸送体の共導入によるハイレベルな合成生物学的光合成能改良に結び付く可能性があり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at establishing a molecular basis for artificial construction of an efficient CO₂ influx pathway in plants. First, we co-expressed a chimeric protein fused with cyanobacterial bicarbonate transporter and a protease in plants, and succeeded in accumulating the bicarbonate transporter as an authentic protein in chloroplasts. In addition, by constructing multiple bicarbonate transporter chimeric genes fused with protein A or GFP, two types of bicarbonate transporters could be simultaneously accumulated in chloroplasts at high levels. In addition, we identified proteins that interact with GLK1 protein and analyzed the regulatory mechanisms that may affect the CO₂ uptake capacity of bicarbonate transporters.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：葉緑体 光合成 アクアポリン GLK 重炭酸イオン輸送体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉緑体における光合成・CO₂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CO₂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CO₂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。CO₂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/オキシゲナーゼ(Rubisco)は、CO₂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O₂濃度(約21%)はCO₂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CO₂が再放出されるため、結果的にイネなど多くの陸上植物が分類される「C₃植物」の光合成効率を著しく低下させている。

Rubiscoによるオキシゲナーゼ反応を抑えるには「Rubisco周辺のCO₂濃度を高くすればよい」ということは良く知られた事実である。そのため、CO₂濃縮機構をC₃植物に導入して光合成能改良を試みる取り組みが行われてきた。特に近年注目を集めているのが、シアノバクテリアが持つCO₂濃縮機構のC₃植物への導入である。その理由は、「C₃植物のC₄植物化」のように細胞構造を変化させる必要が無い、単一あるいは少数のサブユニットで機能するタンパク質複合体がCO₂濃縮に関与している、ことなどがあげられる。一方、葉緑体までのCO₂取り込み経路には、CO₂が細胞膜を通過する際の抵抗や、外気CO₂が細胞間隙に入るまでの気孔抵抗など、様々な拡散障壁が存在する。したがって、葉緑体内でCO₂濃度を上昇させるには、特定のポイントにおける拡散抵抗を低減させるだけでなく、外気から葉緑体内へ至るまでの一連の拡散抵抗を連続的に低減させることが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえ、本研究では「効率的なCO₂流入経路を植物体内に人為的に構築する」という合成生物学的手法により、葉外から葉緑体内までのCO₂拡散抵抗全体を低減させた植物を作出する分子基盤の確立を目的とした。具体的には、葉緑体内包膜へのシアノバクテリアの重炭酸イオン輸送体の蓄積と機能発現法の確立、CO₂透過型アクアポリンの機能改良に基づくCO₂取り込み能の分子基盤確立、気孔開口調節因子GLK1の相互作用因子解明、およびCO₂濃縮やそれに附随した葉緑体発達を調節する因子の同定、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体での野生型重炭酸イオン輸送体発現株の作出と解析

以前に、シアノバクテリアの重炭酸イオン輸送体BicAおよびSbtAをキメラタンパク質として葉緑体に蓄積させることに成功した。しかしながら、シアノバクテリアが持つ野生型BicAおよびSbtAとして発現させることには成功していなかった。そこで、葉緑体胞膜輸送シグナルと重炭酸イオン輸送体の間にTEVプロテアーゼ切断部位を導入したコンストラクトを作製した。さらに、葉緑体移行シグナルを付加したTEVプロテアーゼコンストラクトを作製した。これをシロイヌナズナに同時に導入し、葉緑体内でキメラタンパク質を切断することで内在性BicAおよびSbtAを蓄積させた。

(2) 重炭酸イオン輸送体共発現株の作出

前述の(1)と同時に、シアノバクテリア由来の重炭酸イオン輸送体BicA及びSbtAを共発現するシロイヌナズナの作出を試みた。BicAには黄色ブドウ菌由来proteinA、SbtAにはオワンクラゲ由来GFPをタグとして融合し、同一ベクター上に導入したコンストラクトを作製した。これをシロイヌナズナに形質転換した。

(3) 転写因子GLK1と相互作用する因子の探索

転写因子 GLK1 は葉緑体発達と気孔開口を調節することが知られているが、その作用メカニズムは不明な点が多い。そこで、*glk1glk2* 二重変異体を GFP-TEV-GLK1 遺伝子で相補した株を作出した。これを用いて GFP-TEV-GLK1 複合体を精製した。精製したタンパク質を iTRAQ 法で定量的に分子同定し、候補因子を同定した。

(4) 重炭酸イオン輸送体の効率的な葉緑体ターゲティングに関与する因子の探索

(1)および(2)により導入した BicA や SbtA は葉緑体タンパク質透過装置 TOC-TIC 複合体を介して葉緑体内に輸送されると考えられるが、タンパク質を効率的に輸送するための TOC-TIC 複合体の調節機構は不明な点が多い。そこで、光環境が TOC-TIC 複合体の調節に及ぼす影響を調査した。

(5) 植物ホルモンと光合成機能のクロストーク

CO₂ 濃縮に影響を与える植物が持つ内因性因子として、植物ホルモンが予想される。しかしながら、具体的にどの植物ホルモンが葉緑体発達や CO₂ 応答に関与するかは不明な点が多い。そこで、ストレス条件下で葉緑体発達を調節する植物ホルモンの同定と、その作用機構を解析した。

(6) CO₂ 透過能の高い細胞膜アクアポリン創出のための分子基盤

これまでの研究で CO₂ 輸送活性の高いオオムギのアクアポリン分子を見出し、活性に影響を与えるアミノ酸残基を同定してきた。そこで、その情報に基づきシロイヌナズナから CO₂ 輸送活性の特に高い分子をスクリーニングし、その調節機構を調査した。

4. 研究成果

(1) 葉緑体での野生型重炭酸イオン輸送体発現株の作出と解析

まず、BicA (BicAI, BicAII) および SbtA (SbtAII, SbtAIII) のキメラコンストラクトを作製し、

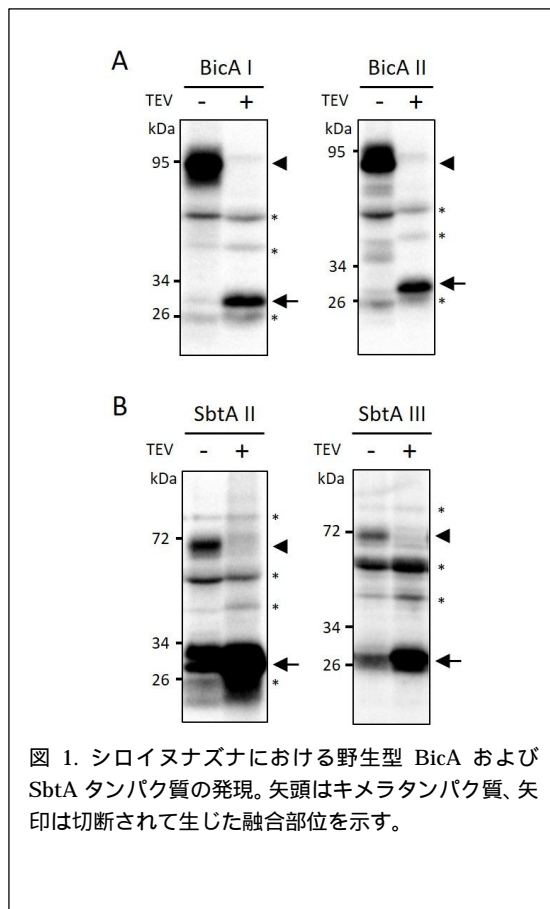


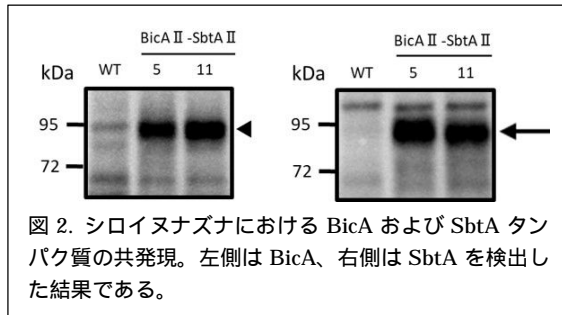
図 1. シロイヌナズナにおける野生型 BicA および SbtA タンパク質の発現。矢頭はキメラタンパク質、矢印は切断されて生じた融合部位を示す。

これをシロイヌナズナに導入した。同時に、同一ベクター上に RBCS-MBP-TEVprotease 遺伝子を持つコンストラクトもそれぞれ作製し、シロイヌナズナに導入した。それぞれの形質転換体からタンパク質を抽出しウエスタンブロットを行った結果を図 1 に示した。TEV (-) はキメラコンストラクトのみ、TEV (+) はキメラコンストラクトと TEV 遺伝子を同時に導入した植物の結果を示している。いずれの場合も、TEV(-)では高分子のキメラタンパク質のバンドが検出されたが(図 1 の矢頭)、TEV プロテアーゼを共発現させた植物では融合したタグ部分がおよそ 30kDa のタンパク質として検出された(図 1 の矢印)。このことから、TEV プロテアーゼが葉緑体内でキメラタンパク質を切断できたことが明らかになった。

さらに、切断されて生じた野生型 BicA および SbtA が葉緑体包膜上に存在することを調査するため、BicA および SbtA 側に付加した HA タグを用いてこれらの検出を行った。その結果、いずれのタンパク質も期待通りに内包膜に局在することが判明した。

これらの成果は、付加配列無しでシアノバクテリア重炭酸イオン輸送体を葉緑体内包膜に蓄積させた初めての例となり、Scientific Reports 誌に報告した。

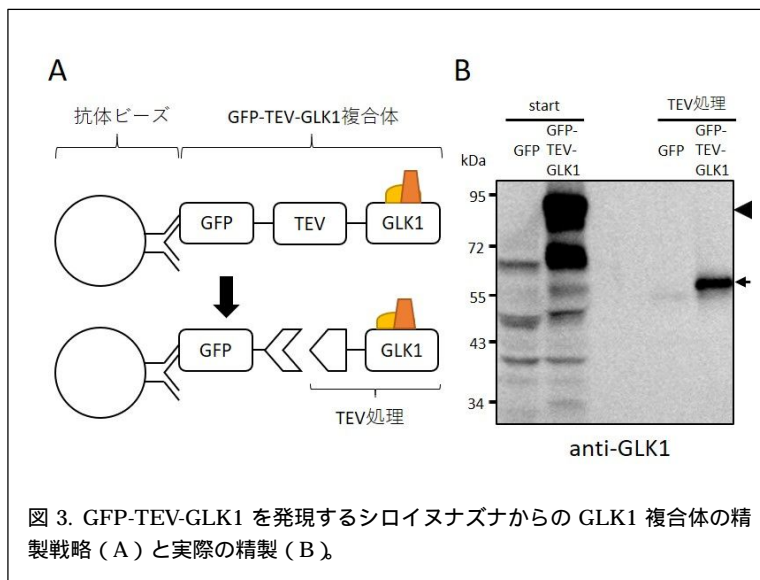
(2) 重炭酸イオン輸送体共発現株の作出



当初、シアノバクテリアの重炭酸イオン輸送体 SbtA および BicA のキメラ型タンパク質を発現するシロイヌナズナを交配し、共発現株の作出を試みた。交配により作出した株を PCR 法で調査した結果、双方の遺伝子を持つ植物を作出できたことが確認できた。一方で、交配後に得られた株では親株での輸送体タンパク質発現レベルよりも低いレベルでしか発

現しない株も見られた。そこで、同一ベクターから SbtA および BicA を発現する植物の作出を試みた。プロテイン A 抗体を用いて BicA、GFP 抗体を用いて SbtA のそれぞれのキメラタンパク質を検出した結果、いずれのタンパク質も高発現していることが明らかになった（図 2）。このことから、BicA および SbtA を植物で共発現させ、葉緑体包膜上に蓄積させることに成功した。

(3) 転写因子 GLK1 と相互作用する因子の探索



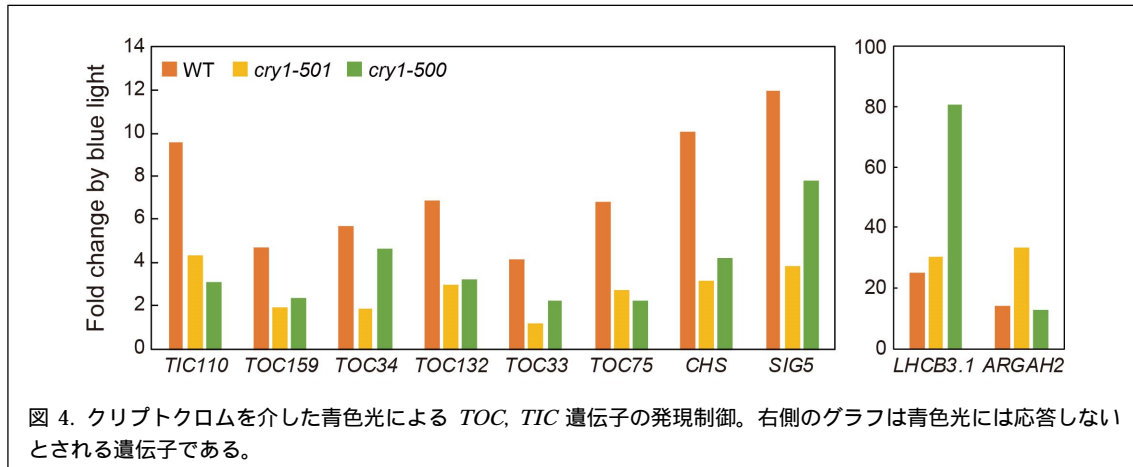
まず、*glk1glk2* 二重変異体を GFP-TEV-GLK1 遺伝子で相補した株を作出した。この植物と自作した GFP 抗体カラムを用いて GFP-TEV-GLK1 複合体を精製した（図 3）。この際、夾雑タンパク質を極力取り除くため、最終段階の複合体溶出には TEV プロテアーゼによる切断法を用いた（図 3）。さらに、精製したタンパク質を iTRAQ 法で定量的に分子同定し、候補因子を同定した。その結果、数多くのタンパク質が同定

されたが、その中から GLK1 との共発現プロファイルや細胞内局在などを基準にデータマイニングを行い、最終的に 15 個の候補遺伝子を選抜した。これらと GLK1 との相互作用について、酵母ツーハイブリッド法を用いて解析した結果、複数のタンパク質がツーハイブリッドにおいても GLK1 と相互作用しうることが判明した。現在、これらのタンパク質と GLK1 の関連について解析を行っている。

(4) 重炭酸イオン輸送体の効率的な葉緑体ターゲティングに関与する因子の探索

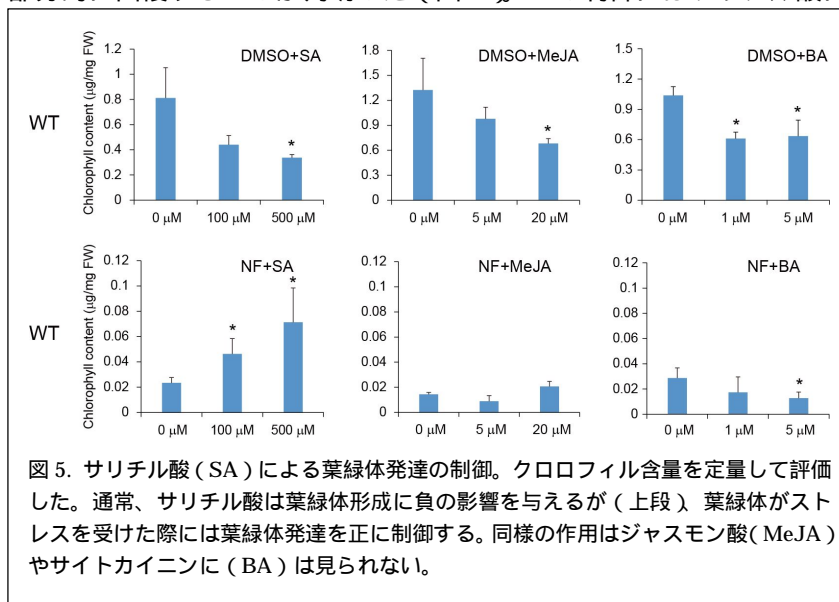
葉緑体タンパク質透過装置に欠陥を持つ *ppi2* 変異体と光受容体を欠損した *cry* 変異体、*hy* 変異体の光応答を比較解析した。その結果、*ppi2* 変異体の光応答は正常であり、葉緑体タンパク質輸送の欠陥は光応答に影響は与えないことが判明した。一方で、単色光源を用いた照射実験により、タンパク質透過装置複合体の構成因子の遺伝子発現が青色光により誘導されることが明らかになった。また、青色光受容体クリプトクロム 1 を欠損した *cry1* 変異体では光誘導が損なわれたことから（図 4）この制御にはクリプトクロム 1 が関与していることが明らかになった。

この成果は、学術論文として Scientific Reports 誌に報告した。



(5) 植物ホルモンと光合成機能のクロストーク

葉緑体におけるカロテノイド生合成や翻訳が阻害されるストレスを受けた際に変動する植物ホルモンについて調査した。その結果、サリチル酸及びジャスモン酸のレベルが変化していた。さらに調査した結果、葉緑体がダメージを受けた植物にサリチル酸を処理すると、葉緑体発達が部分的に回復することが判明した（図 5）。この制御にはサリチル酸による光合成関連タンパク



質のアップレギュレーションが関与しており、翻訳レベルの制御であった。一方、気孔開口や葉緑体発達を調節する転写因子 *GLK1* の発現レベルとは相関がなかった。この成果は、学術論文として *Plant and Cell Physiology* 誌に報告した。

(6) CO₂ 透過能の高い細胞膜アクアポリン創出のための分子基盤

シロイヌナズナの PIP₂ 型アクアポリンの CO₂ 透過性について、微小 pH 電極法より評価した。クローニングした PIP₂ 型アクアポリンの cDNA に対応する cRNA を合成し、アフリカツメガエルに顕微注入させることにより、アクアポリン分子を発現させた。その結果、全ての PIP₂ 型アクアポリンについて、CO₂ 輸送活性が認められることが明らかとなった。現在、さらに詳細な解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukazawa Hitoshi, Tada Akari, Richardson Lynn G. L., Kakizaki Tomohiro, Uehara Susumu, Ito-Inaba Yasuko, Inaba Takehito	4. 巻 10
2. 論文標題 Induction of TOC and TIC genes during photomorphogenesis is mediated primarily by cryptochrome 1 in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76939-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Uehara Susumu, Sei Ayane, Sada Misaki, Ito-Inaba Yasuko, Inaba Takehito	4. 巻 10
2. 論文標題 Installation of authentic BicA and SbtA proteins to the chloroplast envelope membrane is achieved by the proteolytic cleavage of chimeric proteins in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59190-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito-Inaba, Y., Sato, M., Sato, M.P., Kurayama, Y., Yamamoto, H., Ohata, M., Ogura, Y., Hayashi, T., Toyooka, K., Inaba, T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Alternative oxidase capacity of mitochondria in microsporophylls may function in cycad thermogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.19.00150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 上原晋, 稲葉丈人	4. 巻 2
2. 論文標題 光合成能改良を目指した植物へのシアノバクテリア重炭酸イオン輸送体の組み込み	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1214-1218
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 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 DeTar Rachael Ann, Barahimipour Rouhollah, Manavski Nikolay, Schwenkert Serena, H?hner Ricarda, B?lter Bettina, Inaba Takehito, Meurer J?rg, Zoschke Reimo, Kunz Hans-Henning	4. 巻 33
2. 論文標題 Loss of inner-envelope K+/H+ exchangers impairs plastid rRNA maturation and gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2479 ~ 2505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koab123	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 該当する

1. 著者名 Hirosawa Yoshihiro, Tada Akari, Matsuura Takakazu, Mori Izumi C, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Uehara Susumu, Ito-Inaba Yasuko, Inaba Takehito	4. 巻 62
2. 論文標題 Salicylic Acid Acts Antagonistically to Plastid Retrograde Signaling by Promoting the Accumulation of Photosynthesis-associated Proteins in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1728 ~ 1744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab128	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 Maekawa Haruhiko, Otsubo Miyabi, Sato Mitsuhiko P., Takahashi Tomoko, Mizoguchi Koichiro, Koyamatsu Daiki, Inaba Takehito, Ito-Inaba Yasuko	4. 巻 41
2. 論文標題 Establishing an efficient protoplast transient expression system for investigation of floral thermogenesis in aroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 263 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-021-02806-1	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15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀之内冬紅, 湯浅日菜子, 稲葉靖子, 森仁志, 稲葉丈人
2. 発表標題 iTRAQ法を用いたシロイヌナズナGLK1相互作用候補因子の同定
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深沢仁, 多田朱里, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 青色光受容体による葉緑体タンパク質透過装置複合体の制御
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東恵, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 RBSS法を用いたシロイヌナズナ転写因子GLK1の標的DNA配列の探索
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀之内冬紅, 湯淺日菜子, 稲葉靖子, 森仁志, 稲葉丈人
2. 発表標題 iTRAQ 法を用いた転写因子GLK1 相互作用因子の探索
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 上原晋, 清絢音, 佐田美咲, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 葉緑体内包膜への重炭酸イオン輸送体の導入と形質転換植物の解析
3. 学会等名 第11回トランスポーター研究会九州部会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊東恵, 堀之内冬紅, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 転写因子Golden2-like1(GLK1)のDNA結合配列の探索
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐田美咲, 上原晋, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 重炭酸イオン輸送体BicA及びSbtAを共発現するシロイヌナズナの作出
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原晋, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 重炭酸イオン輸送体を導入したシロイヌナズナにおける葉緑体関連タンパク質の変動
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牛山真里, 三原良太, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 トボイソメーラーゼ阻害剤がシロイヌナズナの低温馴化に及ぼす影響
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀之内冬紅, 湯淺日菜子, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 相補株を用いたシロイヌナズナGLK1タンパク質複合体の探索
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉丈人, 廣澤嘉洸, 多田朱里, 松浦恭和, 森泉, 小椋義俊, 林哲也, 上原晋, 稲葉靖子
2. 発表標題 プラスチドシグナルと植物ホルモンの相互作用による葉緑体発達の制御
3. 学会等名 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三原良太, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 シロイヌナズナの低温応答を阻害する化合物が遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東恵, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 転写因子Golden2-like1(GLK1)のDNA 結合特性の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田幸誠, 上原晋, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 シロイヌナズナ葉緑体関連遺伝子の低CO2に対する応答
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎧麻理, 倉本祥吾, 稲葉靖子, 稲葉丈人
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける単一B-box 型CONSTANS-LIKE 遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	森 泉 (MORI Izumi) (40379805)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	

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
---------	---------