

# 葉緑体タンパク質が働く場所を変化させ 光合成の能力を柔軟に維持する仕組みを発見

## 概要

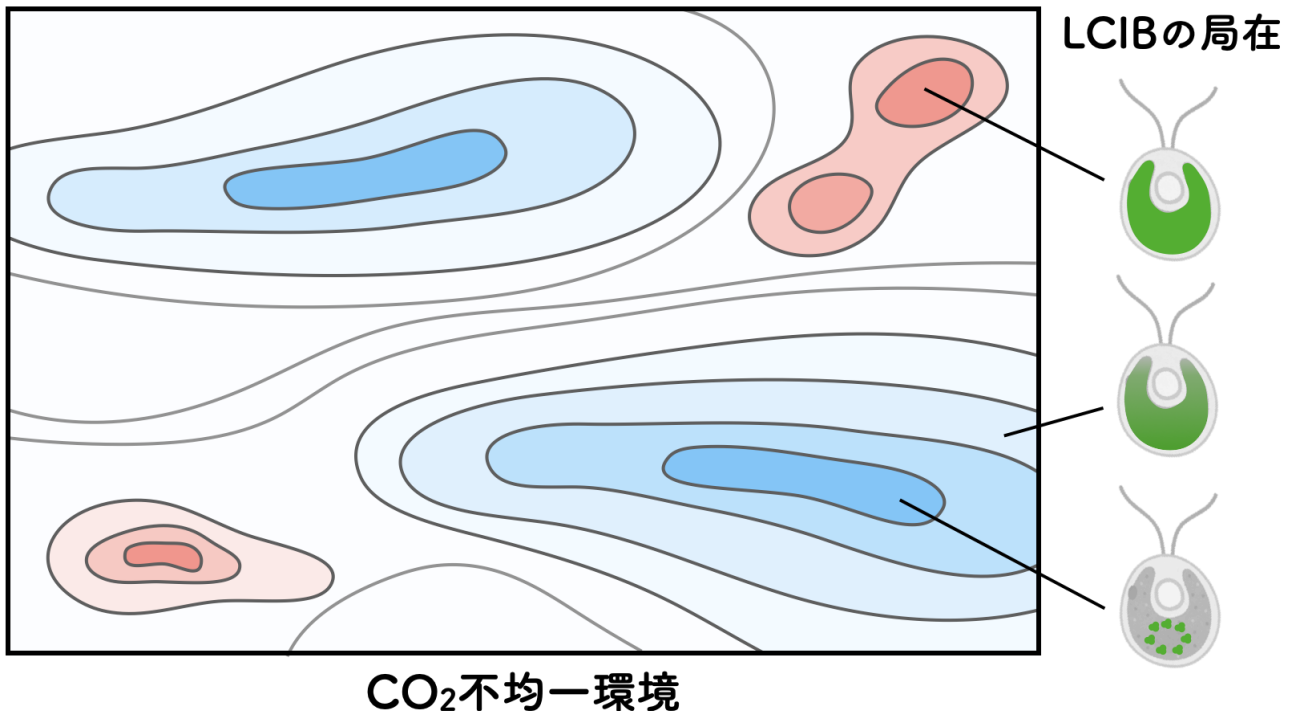
山野隆志 生命科学研究所 准教授、豊川知華 同元博士課程学生、福澤秀哉 同教授らの研究グループは、葉緑体のタンパク質が CO<sub>2</sub> の濃度変化を受けて働く場所を変化させ、光合成の能力を柔軟に維持する仕組みを発見しました。

植物は、太陽光のエネルギーを利用して光合成により CO<sub>2</sub> を吸収し、ショ糖やデンプンなどの炭水化物を作ります。陸上植物は、主に受動的な拡散によって細胞内に入る CO<sub>2</sub> を葉緑体で吸収しますが、藻類が生息する水中では CO<sub>2</sub> の拡散する速度が遅く、光合成の能力が制限されます。そのため多くの藻類は、CO<sub>2</sub> を固定する酵素を葉緑体の中の一區画（ピレノイドと呼ばれる特殊な構造）に閉じ込め、ピレノイドに CO<sub>2</sub> を濃縮することで、CO<sub>2</sub> を獲得しづらい環境でも光合成の能力を維持する仕組み「CO<sub>2</sub> 濃縮機構」をもちます。これまで本研究グループは、葉緑体タンパク質 LCIB が藻類の CO<sub>2</sub> 濃縮機構に必要な不可欠であること、そして LCIB が葉緑体の中で働く場所（局在）を変化させることを報告してきました。しかし、LCIB の局在変化にどのような環境因子が不可欠なのか、そして LCIB の局在変化にどのような生理学的な意義があるのかについてはよく分かっていませんでした。

本研究グループは、微細藻の一種でモデル緑藻として知られるクラミドモナスを用いて、培地中の CO<sub>2</sub> 濃度を測定しながら様々な培養条件における LCIB の局在変化を調べました。そして、LCIB の局在変化には、LCIB と結合するタンパク質 LCIC が必要であること、また、光合成が起こらない暗所や薬剤添加により光合成を停止させても、CO<sub>2</sub> 濃度が約 7 μM を境に LCIB の局在が切り替わることを発見しました。LCIB は、CO<sub>2</sub> と重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) の交換反応を触媒する酵素の構造的特徴を持ちます。そのため、LCIB がピレノイドの周囲に局在する場合はピレノイドから漏れ出た CO<sub>2</sub> を捕捉する働きを、そして LCIB が葉緑体全体に広がっている場合は外環境から CO<sub>2</sub> を取り込む働きを考えると考えられます。

本研究は、CO<sub>2</sub> の濃度が変動する不均一な環境下で、藻類が葉緑体タンパク質の局在を細やかに変化させることで、光合成の能力を柔軟に維持する仕組みの一端を明らかにしました。近い将来、藻類がもつ CO<sub>2</sub> 濃縮機構を陸上植物に導入し、作物の生産性向上や CO<sub>2</sub> 削減に貢献する応用研究の礎となることが期待されます。

本研究成果は、2021 年 11 月 16 日に国際学術誌「Plant Physiology」のオンライン版に公開されました。



図：微細藻が生息する環境における CO<sub>2</sub> 濃度の不均一性と、それに依存した LCIB タンパク質の葉緑体内での局在変化。

## 1. 背景

植物は、太陽光のエネルギーを利用して二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) と水からショ糖やデンプンなどの炭水化物を作る光合成を行い、地球上の全ての生命活動を根底から支えています。特に、CO<sub>2</sub> の供給は光合成の反応速度を律速する要因となることから、植物が CO<sub>2</sub> を効率的に細胞の中に取り込み、CO<sub>2</sub> 固定<sup>注1)</sup> を行うメカニズムを理解することは極めて重要です。地球温暖化に関わる大気中の CO<sub>2</sub> 濃度の上昇<sup>注2)</sup> が問題となっている現在、作物の光合成を改良し CO<sub>2</sub> を固定する能力を向上させることで、CO<sub>2</sub> 削減に貢献しようとする研究も盛んに行われています。

植物の細胞の中で、光合成を活発に行う場所は葉緑体です。葉緑体の中には、チラコイド膜と呼ばれる袋のような構造があり、その膜上に光合成を行う装置 (酸素発生や ATP 合成に関わるタンパク質複合体) が配置されています。さらに、葉緑体の中には、CO<sub>2</sub> を固定する酵素リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) が大量に存在しており、その酵素は頭文字をとってルビスコ (Rubisco) と呼ばれています。つまり、植物が光合成によって CO<sub>2</sub> を固定し炭水化物を作るためには、CO<sub>2</sub> は細胞外から葉緑体の中のルビスコへと効率よく運ばれる必要があります。

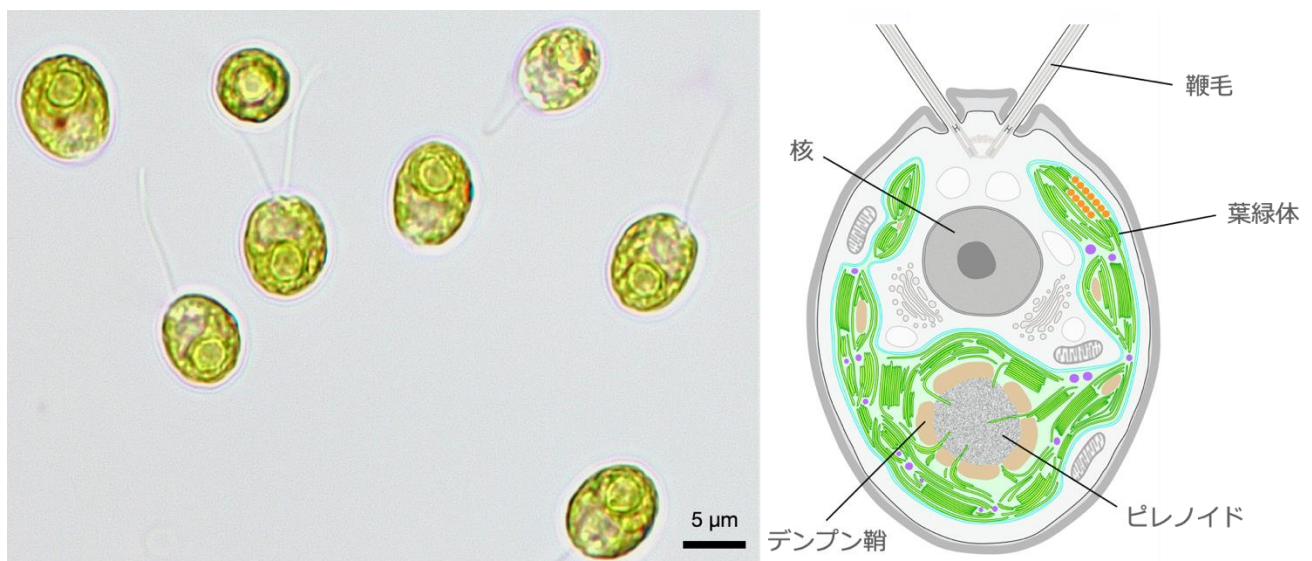
陸上植物では、葉の表皮にある気孔の開閉を調節し、拡散によって葉緑体の中に取り込む CO<sub>2</sub> の量を調節しています。一方、多くの藻類が生息する水圏環境では、CO<sub>2</sub> の拡散速度は大気中の約 10,000 分の 1 に低下するだけでなく、CO<sub>2</sub> は水と反応して重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) の形で多く存在しています。無極性分子である CO<sub>2</sub> とは異なり、電荷を帯びた HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> は細胞の生体膜 (細胞膜や葉緑体包膜) を通過することができません。従って、藻類は CO<sub>2</sub> を受動的な拡散によって細胞内に取り込むことが難しく、光合成に不利な CO<sub>2</sub> 欠乏環境にさらされます。

そこで多くの藻類は、1) 生体膜を介して HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> を能動的に取り込む輸送体やチャネル、2) 取り込んだ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> を葉緑体内で CO<sub>2</sub> へと変換する炭酸脱水酵素、3) 大量のルビスコを狭い区画に閉じ込めることでルビ

スコの CO<sub>2</sub> への親和性を上昇させる構造、により、CO<sub>2</sub> 欠乏環境でも光合成を維持することができる生存戦略を進化的に獲得してきました。この仕組みは、水圏における CO<sub>2</sub> 濃縮機構 (CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism, CCM) と呼ばれ、CCM を持たない陸上植物の光合成を効率よく改変するのに利用できると期待されています。

私たちは、単細胞緑藻クラミドモナス<sup>注3)</sup> を CCM のモデル生物として研究材料に使い、CCM の分子メカニズムの解明に一貫して取り組んできました。そのなかで、CCM を駆動するために重要な HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 輸送体や (2015年5月27日京都大学プレスリリース「藻類の光合成を支える二酸化炭素濃縮システムを解明」<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2015-05-27> を参照)、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 輸送体の発現を調節するカルシウム結合タンパク質 (2016年10月28日京都大学プレスリリース「光合成のターボエンジンCO<sub>2</sub>濃縮機構が葉緑体を介して制御される仕組みを新たに発見」<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2016-10-28-2> を参照) などを報告してきました。

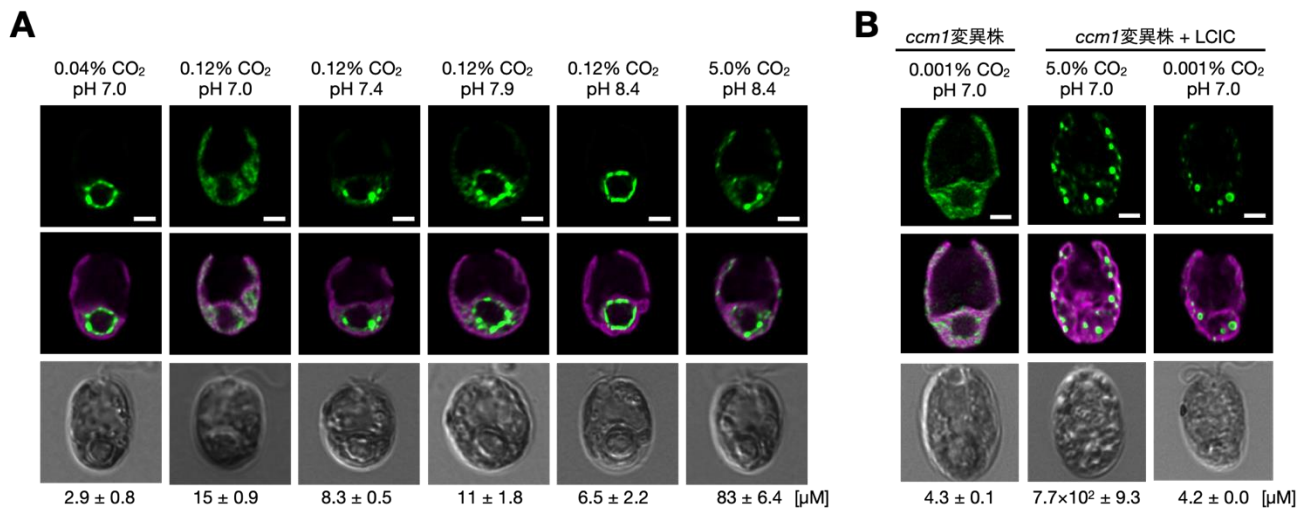
クラミドモナスを含めた真核藻類では、ルビスコが葉緑体の一区画に密に閉じ込められた構造はピレノイド<sup>注4)</sup> (pyrenoid) と呼ばれています (図1)。また、ピレノイドの周囲には、光合成の同化産物であるデンプンが集まることが知られています。この構造を電子顕微鏡で観察すると、ちょうど刀の鞘を上から見た形と似ていることから、デンプン鞘 (starch sheath) と呼ばれています。私たちは、炭酸脱水酵素の構造的な特徴をもつタンパク質 Low-CO<sub>2</sub> inducible protein B (LCIB) がクラミドモナスの CO<sub>2</sub> 濃縮機構に必須であり、そして LCIB が葉緑体の中で働く場所 (局在) を変化させることも報告してきました。しかし、LCIB の局在変化にどのような環境因子が不可欠なのか、そしてその局在変化にどのような生理学的な意義があるのかについては、これまでよく分かっていませんでした。



**図1.** 緑藻クラミドモナスの明視野像 (左) と細胞内微細構造の模式図 (右, ドイツHelmholtz Zentrum München研究所の Benjamin Engel博士より提供された図を、許可を得て改変)。クラミドモナスは、葉緑体と核を1つずつ持つ単細胞の真核緑藻である。2本の鞭毛を平泳ぎのように動かしながら遊泳する。カップ状に見える葉緑体の基底部に、CO<sub>2</sub>固定酵素ルビスコが凝集したピレノイドと呼ばれる構造を1つ持つ。ピレノイドの周りには、光合成により生じたデンプンが取り囲み、デンプン鞘と呼ばれる構造を形成する。

## 2. 研究成果

私たちは、LCIB の局在が培地中の  $\text{CO}_2$  濃度変化に応答して変化すると考え、モデル緑藻クラミドモナスを用いて、培地中の  $\text{CO}_2$  濃度を測定しながら様々な培養条件における LCIB の局在変化を追跡しました (図 2)。培地中の pH の条件を変えることで無機炭素中の  $\text{CO}_2$  と  $\text{HCO}_3^-$  の存在比を変化させたり、タンパク質合成や光合成を阻害する薬剤を加えたり、細胞に照射する光の影響を調べたりしながら、共焦点蛍光レーザー顕微鏡を用いて LCIB の局在変化を詳細に観察したところ、LCIB の局在変化には、LCIB と相互作用するタンパク質 LCIC が必要であること、また光合成が起こらない暗所や薬剤添加により光合成を停止させても、培地中の  $\text{CO}_2$  濃度が約  $7 \mu\text{M}$  を境に LCIB の局在が切り替わることを見出しました。すなわち、 $\text{CO}_2$  濃度が約  $7 \mu\text{M}$  以下では LCIB/LCIC 複合体はピレノイドの周囲に局在し、約  $7 \mu\text{M}$  以上では LCIB/LCIC 複合体は葉緑体全体に広がるということが分かりました。LCIB と LCIC は、 $\text{CO}_2$  と  $\text{HCO}_3^-$  の交換反応を触媒する酵素の構造的特徴を持ちます。



そのため、LCIB/LCIC 複合体がピレノイドの周囲に局在する場合はピレノイドから漏れ出した  $\text{CO}_2$  を補足する働きを、そして LCIB/LCIC 複合体が葉緑体全体に広がっている場合は外環境から  $\text{CO}_2$  を取り込む働きをすることが考えられます。これは、時々刻々と変動する  $\text{CO}_2$  不均一環境下で藻類が葉緑体タンパク質の局在を細やかに変化させ、光合成の能力を柔軟に維持する仕組みを持っていることを示しています。

**図2.** (A) 通気する  $\text{CO}_2$  濃度と培地の pH を変化させたときの LCIB の局在を、蛍光タンパク質 Clover と LCIB の融合タンパク質を用いて可視化した。上段：LCIB-Clover の蛍光像。中段：LCIB-Clover とクロロフィル蛍光の重ね合わせ像。下段：細胞の微分干渉像。スケールバーは  $2.0 \mu\text{m}$ 。写真の下の値は、培地中の全無機炭素濃度から計算した  $\text{CO}_2$  濃度。  $\text{HCO}_3^-$  濃度は省略してある。  $\text{CO}_2$  濃度が約  $7 \mu\text{M}$  を境にして、葉緑体内の LCIB-Clover の局在が切り替わることが分かる。(B) CCM を誘導できない *ccm1* 変異株における LCIB の局在を、蛍光タンパク質 Clover と LCIB の融合タンパク質を用いて可視化した。*ccm1* 変異株では LCIC が発現しておらず、 $\text{CO}_2$  濃度が  $7 \mu\text{M}$  未満でも LCIB-Clover は葉緑体全体に局在していた。しかし、LCIC を過剰発現させるとスペckル状の蛍光が生じ、 $7 \mu\text{M}$  以下ではピレノイド周囲への局在変化が観察された。スケールバーは  $2.0 \mu\text{m}$ 。

## 3. 研究の意義と今後の展開

現在の地球環境は、温暖化・食糧不足・エネルギー枯渇などの様々な問題を抱えています。これに対して、藻類が持つ CCM を利用・改変し、光合成の能力を極限まで高めた植物を創出することで解決しようとする試みが世界的な競争のなか進められています。例えば、イネやコムギなどの主要作物の葉緑体の中にピレノイドを合成し、CCM を駆動させることで、 $\text{CO}_2$  の吸収量と生産量を高めることを目的とした研究が進められてい

ます。そのためには、CCM を構成するタンパク質の詳細な「分子設計図」と、それぞれの分子の「動作原理」の解明が不可欠です。

私たちは、CCM を駆動するためにはピレノイドだけでは不十分であり、ピレノイドの周りにデンプン鞘を形成させ、LCIB を正しく配置させることが必要であることを示した分子設計図を報告しています（2020年5月26日京都大学プレスリリース「光合成により生じたデンプンの新たな機能を発見」<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2020-05-26-1> を参照）。本研究は、その LCIB の配置において、LCIB と相互作用する LCIC が必要であることを示しただけでなく、CO<sub>2</sub> の濃度変化だけで LCIB の局在を変化させることができることを示し、LCIB/LCIC 複合体を介した CO<sub>2</sub> 濃縮機構の動作原理の解明へと一歩近づくことに成功しました。

一方で、植物細胞の中でピレノイドを維持するためには、その分裂や生成に関わる因子の情報も必要であり、その解明にはより多くの変異株を単離して調べる必要があります。私たちは、大規模かつ超高速に藻類の変異株をスクリーニングできる技術である画像活性型細胞選抜法の実証にも成功しています（2018年9月5日京都大学プレスリリース「世界初の Intelligent Image-Activated Cell Sorter を開発 –細胞画像の深層学習により高速細胞選抜を実現–」<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2018-09-05> を参照）。今後は、このような最先端の技術を使い、ピレノイドの構成因子がどのように配置されるのかを明らかにしていくなかで、ピレノイドを中心とする CCM の「分子設計図」と「動作原理」の理解をさらに深める研究が進展していくものと期待されます。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学研究費補助金（JP16H04805, JP16K07399, JP17J08280, JP20H03073, JP21K19145, JP21H05660）、JST「先端的低炭素化技術開発（ALCA）」、ImPACT「セレンディピティの計画的創出による新価値創造」、京都大学リサーチ・ディベロップメントプログラム「いしずえ」の支援を受けた成果です。

##### <用語解説>

注1) **CO<sub>2</sub>固定**: 炭素固定、炭酸同化とも呼ばれる。植物が光合成で得られたエネルギーを用いて、空気中から取り込んだ CO<sub>2</sub> を同化する反応で、糖やデンプンなどの有機物を合成する反応を含める事が多い。

注2) **大気中の CO<sub>2</sub> 濃度の上昇**: 温室効果ガス世界資料センター（World Data Centre for Greenhouse Gases; WDCGG）のデータによると、18世紀半ばに起きた産業革命の前の平均濃度 278 ppm に対して、2020年の世界の平均濃度は 413 ppm であった。10,000 ppm は 1%に相当する。

注3) **クラミドモナス**: 単細胞緑藻の一種。クラミドモナスといえば *Chlamydomonas reinhardtii*（和名はコナミドリムシ）を指すことが多い。本研究でもこのコナミドリムシを用いている。細胞の大きさは約 10 μm（1 mm の 100 分の 1 に相当）。光合成、鞭毛運動、生殖、母性遺伝などの基礎研究だけでなく、バイオ燃料生産を目指した応用研究を含めたモデル生物として世界中で利用されている。脳科学研究の革新的な手法である光遺伝学（オプトジェネティクス）で使われるチャンネルロドプシンは、クラミドモナスの眼点に局在するタンパク質であり、その遺伝子は当研究室の cDNA ライブラリ情報を利用してクローニングされた。

注4) **ピレノイド**: 藻類の葉緑体内に見られる構造で、最初の発見は1803年に神学者 Vaucher がアミミドロ（網目の形をした淡水性藻類）を観察したスケッチに遡る。その後 Schmitz (1882) が、藻類の葉緑体を顕微鏡で観察した時に見える屈折率の高い球状の物質をピレノイド (pyrenoid: ギリシャ語で pyren は果実の核、eidos は形を意味する) と名付けた。CO<sub>2</sub>固定酵素ルビスコが密に詰まっている。ルビスコの酵素としての触媒速度の遅さや基質となる CO<sub>2</sub>への親和性の低さを解消するために、ルビスコの活性部位を CO<sub>2</sub>で飽和させる役割があると考えられている。

#### <研究者のコメント>

地球上の全ての生命活動を根底から支える光合成の理解は、人類の幸福を左右する食糧自給率の向上や生産性の高い作物の供給に直結します。光合成は CO<sub>2</sub>を原料とするため、その効率は環境中の CO<sub>2</sub>濃度に大きく影響を受けます。私たちは、光合成改変の要となる CO<sub>2</sub>濃縮機構の駆動に最も重要なタンパク質のひとつである LCIB に注目し、LCIB の局在変化とその意義について調べてきました。本研究では、環境中で変動する CO<sub>2</sub>濃度こそが、その局在変化の鍵であることを発見しました。今後も、藻類の生存戦略のひとつである CO<sub>2</sub>濃縮機構の分子設計図を解き明かし、これを利用することで光合成による生産性を向上する夢を実現したいと考えています。詳細は、私たちの研究室のウェブサイト (<http://www.molecule.lif.kyoto-u.ac.jp>) を参照して下さい。

#### <論文のタイトルと著者>

タイトル: CO<sub>2</sub>-dependent migration and relocation of LCIB, a pyrenoid-peripheral protein in *Chlamydomonas reinhardtii*.

(緑藻クラミドモナスのピレノイド周辺タンパク質 LCIB の CO<sub>2</sub>依存的な移動と再配置)

著者: Takashi Yamano, Chihana Toyokawa, Daisuke Shimamura, Toshiki Matsuoka, Hideya Fukuzawa

掲載誌: Plant Physiology

DOI: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab528>