



植物機能高度活用のための分子基盤開発

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教授 横田 明 穂

1. はじめに

地表に届いている太陽光子数で決まる葉面積当たりの植物の最大光合成速度は $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ である。一方、葉に含まれる CO_2 固定酵素、ルビスコの最大活性は $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ である。すなわち、植物光合成最大能力は現在の地球環境に完全に適応していることになる。しかし、実在する植物の光合成 CO_2 固定速度は高くても $25\sim 35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 程度である。光合成炭素代謝の全容が解明された1975年以降、世界の研究者は植物の生産力を強化する上で避けて通れないこのギャップの解消にチャレンジしてきた。私もその内の一人である。20年前に(財)地球環境産業技術研究機構で研究室を主宰して以来、それまでの光合成研究の経験を踏まえつつ、植物光合成機構のさらなる理解とそれに基づいた植物機能の高度利用を目標に基礎から応用にわたって研究してきた。

2. 植物機能強化の分子基盤

2-1 炭酸ガス固定機能

光合成が一義的にルビスコの酵素能力の劣悪な諸性質によって制限されていることは、現在でも広く世界的に受け入れられている(図1)。1970年にルビスコが ribulose bisphosphate (RuBP) のカルボキシラーゼ反応に加えオキシゲナーゼ反応も触媒し、この反応が光呼吸での CO_2 放出現象とも相俟って光合成効率を $30\sim 50\%$ も減じていることが明らかになってきた。また、ルビスコの反応速度は普通の酵素の $0.1\sim 1\%$ 程度で、基質 CO_2 への親和性が低いことも植物光合成が低速度でしか進行できない原因になっていることが分かってきた。そこで世界の光合成研究者は植物光合成においてルビスコのこれら3つの劣悪機能を改良することで光合成効率の強化を目指した。

ルビスコは大小2種類のサブユニットが8個ずつ会合した分子質量 550 kDa の巨大蛋白質である。触媒残基は大サブユニット上に存在し、その遺伝子は葉緑体DNAにコードされている。

る。従ってルビスコの酵素機能の飛躍的向上を目指す時、葉緑体DNAの遺伝子操作が不可欠であった。この技術が米国で開発された直後、我々も直ちにその技術の確立に成功した。この成功は、それまで生理学的研究でその存在が提唱されていたが、その実在については大きな論争的であった光合成循環型電子伝達系に関与する遺伝子を世界に先駆けて見出すという副産物も生んだ。その後、この分野は光合成研究の重要な研究分野になっている。

我々はまず、 50°C で pH 2前後という溶存 CO_2 がごく僅か存在しない状態で活発に生育する原始紅藻 *Galdieria partita* に、植物ルビスコの3倍ほど CO_2 固定反応に特化したルビスコが存在することを見出し、その諸性質を明らかにした(図2)。直ちに *Galdieria* 酵素の大小サブユニット遺伝子を葉緑体DNAに導入して葉緑体での発現が世界で試みられたが、我々を含めてまだ成功していない。

様々な生物のルビスコの構造活性相関研究研究では、*Galdieria* ルビスコには CO_2 固定反応に特化した構造があること(図2)、植物ルビスコには触媒部位以外に RuBP を結合して反応速度を 50% ほど高くする活性調節部位が存在することを発見し、さらに植物ルビスコでは N-末端から 21 及び 305 残基目はリジンであるが、光合成細菌 *Chromatium* ルビスコにこれらのリジン残基を導入し反応速度を植物ルビスコの5倍ほどに高めることに成功した。しかし、当初目指した植物ルビスコ機能の全面的改良に未だに至っていない。

一方、ルビスコの蛋白工学的な機能改良は難しいが、ルビスコがより活発に機能できる葉緑体内環境を整備することの重要性に世界に先駆けて着目している。葉緑体内の RuBP 濃度を高濃度に維持するための代謝工学を施すことによって、ルビスコはルビスコ活性化酵素を介して活性化され、さらには活性調節

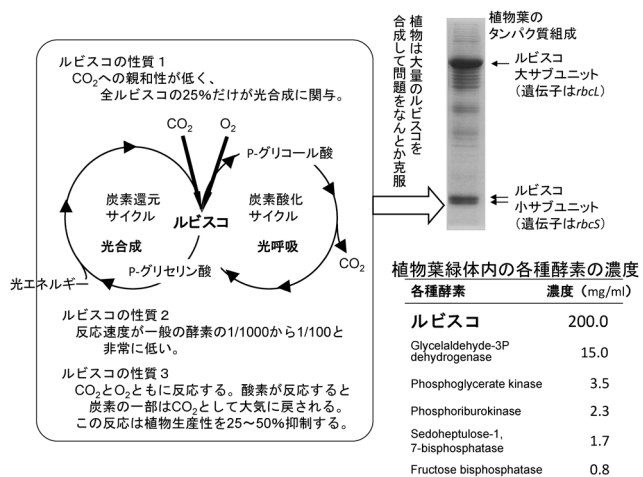


図1 ルビスコの諸性質は光合成 CO_2 固定反応に適さない

Carboxylaseoxygenase Relative Specificity of RuBisCO, S_{rel}

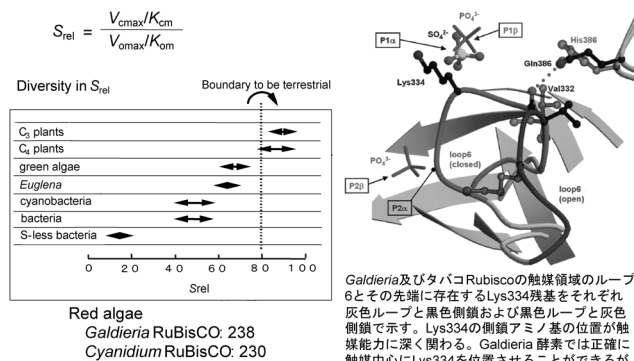


図2 ルビスコのカルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応の反応比特異性と生物界におけるその多様性 $V_{\text{cmx}}, K_{\text{cm}}, V_{\text{omx}}, K_{\text{om}}$ はそれぞれカルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応の $V_{\text{max}}, K_{\text{m}}$ を示す。

部位に RuBP が結合することでルビスコはさらに高活性型になっていると思われる。最近、ルビスコと NADPH 複合体の構造を発表したが、その結合様式から判断して NADPH の結合もルビスコの高活性型維持に重要であると考えている。今後は、ルビスコ自体のタンパク質工学的な改良よりも、ルビスコが機能しやすい葉緑体環境を整備することの重要性を積極的に発信していきたい。

またこの 15 年間に大きく発展した各種生物のゲノム解読の成果を高度活用し、光合成ルビスコの祖先型に近い遺伝子を古細菌や枯草菌に見出してきた。枯草菌が持つルビスコ様蛋白質 (RuBisCO-like protein, RLP) はメチオニンのメチル基が利用された後に残った硫黄原子を再利用するためのメチオニン再生経路で、ルビスコの初発反応に酷似した触媒機能を持つ。ヒトでは再生経路内の酵素蛋白質がガン細胞の細胞死に関与することが最近見出された。また、この我々の RLP 研究は、ポストゲノム時代の生物の分子進化研究の一つの方向性を提起してきた。現在は、カルビン回路の原型が地球上で完成したもっとも原始型の CO₂ 固定回路をメタン産生菌に見出し、投稿準備中である。

2.2 野生種スイカの環境耐性機構

光合成に多量の水を必要とする野生種スイカはカラハリ砂漠で乾燥に比較的耐性を示す C₄ 型雑草が枯死した後も青々と繁茂している。このことは野生種スイカには強光乾燥耐性分子機構が備わっていることを意味しており、この 15 年間その解明を目指してきた。その結果、強光乾燥初期には光合成電子伝達系を正常に保つために ATP 合成酵素の ϵ サブユニットを量的に制御すること、細胞膜にシトクローム b_{559} を誘導して細胞外のアスコルビン酸化酵素と連携して葉緑体内の過剰エネルギーを細胞外に水として放出する系を構築すること、根を急速に発達させるために根端や側根の分裂組織に細胞分裂誘導に関わると思われる RanGTPase1 や転写因子 COL1 を誘導することを見出した。野生種スイカ RanGTPase1 (CLRAN1) をジャガイモに導入するとその先端に塊茎を付けるストロンを分化誘導した。現在、CLRAN1 がストロン誘導を引き起こす分子機構を詳細に解析している (図 3)。一方、CLCOL1 はシロイヌナズナ CONSTANS-Like 4 (COL4) に酷似していた。CLCOL1 は野生種スイカ培養毛状根では主根根端や側根原基で発現していた。また、同様な毛状根を用い、人為的誘導系を用いて 35S プロモーター下で CLCOL1 を発現させると、野生種スイカの根は急速に発達伸長した。現在、CLCOL1 をジャガイモやイネ科植物に導入中である。

またストレス後期には下位葉のルビスコ蛋白質等を分解してシトルリンに変え、上位葉をヒドロキシルラジカルから防御する。この発見を基に、2007 年にシトルリンは医薬品リストから除かれ、非医薬品に新規記載された。

3. 植物機能の高度利用

植物葉緑体は興味ある性質を持っている。大腸菌やヒトの細胞の蛋白質濃度は 20~25% だが、葉緑体内の蛋白質濃度は 40% 程度である。葉緑体形質転換が容易なタバコを用いて、もっとも強力なプロモーターを付して葉緑体 DNA にオワンクラゲの緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子を導入すると、最大 200 mg/ml 程度にまで GFP 蛋白質が蓄積することを見出した。こ

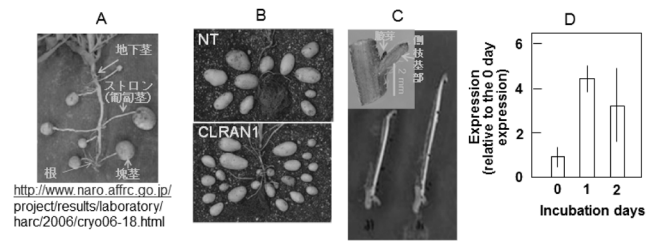


図 3 ジャガイモ地下茎腋芽からのストロン誘導に RAN1 が関与する可能性
A: ジャガイモ地下部各組織の名称, B: CLRAN1 導入によるジャガイモ塊茎数の増加, C: ジャガイモ外植片腋芽からのストロン発達を解析するための *in vitro* 系の確立. この系で *in vitro* 培養 4, 5 日後にストロンの発達してくる, D: ジャガイモ外植片培養初期の腋芽における内生 RAN1 の発現誘導.

の技術をすでに技術確立していたレタス葉緑体に応用し、医用蛋白質 (ヒトチオレドキシニン-1, hsTrx-1) を合成することに成功した。合成された組換え hsTrx-1 はヒトのものとは何ら変わらない生物活性を有していた。この技術をさらに発展させることを目指し、所属大学が果敢に進めている課題創出型研究第一号として大手企業と共同研究している。

これらの研究の過程で、148 報の原著論文を発表し、4 編の専門書への招待総説を発表した。また、特許成立 4 件 (この 1 つは米・欧でも成立し、他の 1 つは欧・中で成立)、特開 2 件 (この 1 件は米・中・豪で認可、他の 1 件は国際的大企業にライセンス化) の実績を持つ。

これらの業績から、平成 23 年度の文部科学大臣表彰「科学技術賞 (研究部門)」を受賞した。

謝辞 本研究は、この 45 年間の多くの方々のご支援とご協力の下で成し得たものです。島根大学農芸化学科で光合成の反応機構に興味を持ち、平山修先生と落合英夫先生 (故人) のご指導を皮切りに、大阪府立大学大学院では北岡正三郎先生と中野長久先生のご指導の下で光合成研究に邁進できました。その後、当時京都大学農学部の山田康之先生 (元奈良先端大学長) と大山莞爾先生 (故人) のお世話で (財) 地球環境産業技術研究機構 (RITE) に移り、近藤次郎研究所長と山口務専務理事のご支援の下で光合成機能の利活用研究に大きく舵を切りました。3 年後に、山田先生と大山先生のご尽力に加え、山口務専務理事のご理解もあって、奈良先端科学技術大学院大学 (NAIST) バイオサイエンス研究科分化・形態形成学講座で大きく研究展開できる機会を得、今日に至っています。この間、府立大後輩の重岡成近畿大学教授の協力は得難いものでした。府立大時代には和田野晃先生 (現名誉教授) には定量的発想を、RITE では鹿内利治君 (現京大教授) はじめ多くの優秀な若手研究者に恵まれ、NAIST 分化・形態形成学講座では河内孝之君 (現京大教授)、竹村美保さん (現石川県立大学准教授)、三宅親弘君 (現神戸大学准教授)、明石欣也君 (現鳥取大学准教授)、蘆田弘樹君 (現神戸大学准教授)、宗景ゆりさん (現 NAIST 助教) には、各自の専門分野から多大な協力を得ました。また、この間の多くの博士研究員や学生諸君の積極的で献身的な研究参加や、その他の研究室メンバーの皆さんの協力によるものです。お世話になった方々に心から感謝します。