



原始的葉緑体の成立過程における表層膜構造・機能の進化の解明と応用

パナソニック ホールディングス株式会社 児島 征司

はじめに

細胞内外への物質の流入出制御はあらゆる細胞の生存の要であり、膜の安定的な維持は流入出制御の必須条件である。著者は、反芻動物第一胃（ルーメン）内の嫌気性グラム陰性細菌 *Selenomonas ruminantium* から発見した外膜安定化因子「細胞壁ペプチドグリカン (PG) 結合型ポリアミン」¹⁻³⁾ が、類縁の細菌種だけでなく最も原始的な植物の一つである灰色藻類の葉緑体 PG に存在していることを見出した。葉緑体の起源は原始真核細胞内に共生したシアノバクテリア（グラム陰性酸素発生型光合成細菌）であるとされ、灰色藻の葉緑体の表層膜構造はシアノバクテリアと同様に内膜、PG、外膜の3層から成るが、奇妙なことに葉緑体 PG の由来であるべきシアノバクテリア PG にポリアミンは存在しない。この事実から、シアノバクテリアから葉緑体への進化過程がその表層膜構造・機能の何らかの変貌を伴っている可能性が想起された。これを出発点とし著者はこれまで、グラム陰性細菌と葉緑体の表層膜構造・機能及びその進化的関係性の解明と、そこから得られた新しい知見の応用に取り組み以下の成果を得た。

1. ルーメン内主要細菌の特異な外膜安定化機構の解明と原始的葉緑体膜構造との共通性の発見

グラム陰性細菌の表層構造は内膜、PG、外膜の3層で形成され、外膜は PG と接着することで安定化される。グラム陰性細菌モデルの Proteobacteria 門細菌ではムレインリポ蛋白質 (Lpp) と Tol-Pal 複合体が外膜接着を担う。一方で著者らは、ルーメン内主要細菌として動物栄養生理を支える *S. ruminantium* 及びその近縁種では Lpp と Tol-Pal 複合体は存在せず、PG に共有結合したポリアミン (カダベリン) が外膜の非選択的チャネル蛋白質 Mep45 のペリプラズム側に突出した N 末端側領域との結合を介し外膜を接着させる新しいタイプの外膜安定化機構を保持していることを解明した¹⁻³⁾。Lpp と Tol-Pal の系統分布は Proteobacteria 門細菌に限定されるのに対し、ポリアミンは灰色藻の葉緑体 PG に存在する⁴⁾。灰色藻は *lpp* や *tol-pal* 遺伝子を保持しないことから、葉緑体 PG 結合型ポリアミンが *S. ruminantium* と同様に外膜安定化因子として機能する可能性が想定された。

2. グラム陰性モデル細菌での外膜透過性解析法の確立とシアノバクテリア・葉緑体研究への技術導入

近年の研究で灰色藻だけでなくコケの葉緑体で PG の存在が

実証され、さらにシダやシャジクモ藻の葉緑体にも PG の存在が示唆されるなど、細菌由来 PG 関連因子が広範な植物種で機能することが認識されている⁵⁾。従って葉緑体 PG 及び PG と相互作用する外膜の構造・機能の解明はシアノバクテリアから葉緑体に至る変貌過程を追うための重要な切り口となり得る。しかし一方で、シアノバクテリアや葉緑体外膜の構造的安定性や物質透過等の機能が細胞の生理・生存にどのように影響するのかを理解する手法は確立されていなかった。

そこで著者は博士研究員として、外膜に関する理解や実験手法が最も進んでいるグラム陰性細菌モデルである大腸菌の外膜透過性に関する研究にシフトした。大腸菌生菌体を用いた外膜透過性解析に取り組み、 β -lactam 系抗生物質や lactose などの糖をプローブとして簡単な比色分析や生育速度測定、数理解析手法を組み合わせて透過性を実測する方法を開発した⁶⁻⁹⁾。外膜透過性と、細胞増殖速度や薬剤耐性等の細胞生理指標を定量的に結び付ける当手法は任意の生細胞に適用できる汎用性があり、シアノバクテリアや葉緑体の外膜透過性・構造的安定性と細胞生理との関係性の解明に応用できる技術となった。

3. 原始的葉緑体表層で機能する外膜安定化機構と物質透過機構の解明

上述の知見と実験技術を基盤として、シアノバクテリア及び灰色藻葉緑体の外膜構造・機能の解明と進化的関係性の調査に取り組み次の発見を得た¹⁰⁻¹²⁾。①灰色藻 *Cyanophora paradoxa* の葉緑体外膜ではシアノバクテリア由来の主な外膜構成因子は失われており、代わりに葉緑体1個に約 10^6 分子存在し PG に結合する性質を持つ相同な新規蛋白質 CppS と CppF が外膜を覆い尽くす様に存在していた。精製 CppS/F の解析から両者とも糖やアミノ酸等の分子量約1,000以下の生体分子を非選択的に透過するチャネルと判明した。② CppS/F はシアノバクテリ

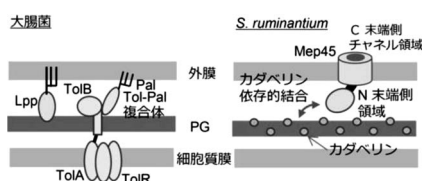


図1. 大腸菌と *S. ruminantium* の外膜安定化機構

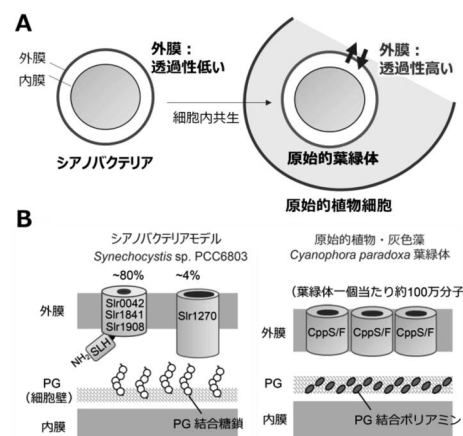


図2. シアノバクテリアと原始的葉緑体の進化的関係性の概念図 (A) と表層構造 (B)

アには存在せず、グラム陰性細菌 Planctomycetes 門の外膜蛋白質に類似していた。③葉緑体PG結合型ポリアミンの合成阻害物質としてノルスベルミジンを見出し、当該物質存在下でポリアミンを欠損させると葉緑体は破裂して細胞死に至った。④シアノバクテリアモデル種 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の外膜は有機物を透過しないイオンチャンネルで占められ、外膜透過性は大腸菌の20分の1程度であった。⑤シアノバクテリアではPGと外膜蛋白質 Slr1841, Slr1908 のペリプラズム側に突出したN末端領域との相互作用により外膜がPGに接着し安定化されていた。上記成果から「原始的葉緑体表層にはシアノバクテリアと別系統のグラム陰性細菌由来の分子機構が共存し、外膜の物質透過性がシアノバクテリアと比較し顕著に高まっている」ことが明らかとなった。

4. 葉緑体進化を模倣した外膜高透過性型シアノバクテリアの特性とその応用と展望

外膜透過性の変化を切り口として、葉緑体成立の仕組みを産業利用する応用研究を2018年より開始した。原始的葉緑体の「外膜高透過性化」を現存シアノバクテリアで模倣しその特性を調べるため、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の外膜に CppS/F を発現させる、或いは Slr1841 のN末端側領域とPGとの接着を欠損させ外膜を脱離させる手法で外膜高透過性型シアノバクテリア変異株を得た。両変異株はよく似た表現型を示し、光合成により生育するが固定した有機炭素の約50%を細胞外に放出した¹³⁾。外膜を脱離させたシアノバクテリア変異株をさらに詳細解析し次の発見を得た。①当該変異株は光合成由来の電気的還元力を細胞外に漏出し、照射下で最大 $30 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ の細胞外電流を生成した¹⁴⁾。②培養上清に含まれる多様な生体分子群を葉面散布することでトマト、トウモロコシ等の複数農作物の農地での収穫量が1.1~1.4倍増加した。作物の成長増進は地上部で顕著であり、スクロースの代謝に寄与する液胞インペルターゼ活性が約2倍上昇した¹⁵⁾。ただし有効成分の同定は今後の課題である。

上記成果によりシアノバクテリアと別系統のグラム陰性細菌に由来する分子機構が「シアノバクテリアの光合成産物(電力と有機分子)を細胞外へ取り出す」仕組みとして利用できることが示され、 CO_2 を原料とした植物成長促進剤の生産や微生物太陽電池としての産業利用を目指す取り組みに繋がった。特に有機分子の利用に関しては、上述の外膜脱離型シアノバクテリア変異株の培養上清を作物に噴霧することで植物が成長増進するため、当該シアノバクテリア及び作物自身の光合成による空气中 CO_2 の活用拡大と農作物生産効率向上が同時に実現でき、ひいては CO_2 削減や食糧生産の持続可能性担保といった時代の要請に応えることが期待できる。

おわりに

自然環境で棲息するシアノバクテリアを細胞内で葉緑体に変換して利用する過程には多くの未知の仕組みが詰まれている。本研究を通じて表層膜構造・機能の進化の解明と応用に取り組んだ結果、当該領域での研究開発が葉緑体誕生のメカニズムを紐解く基礎研究面の価値や面白さを提供するだけでなく、そこから得られた知見を応用できる産業的価値を併せ持つこと

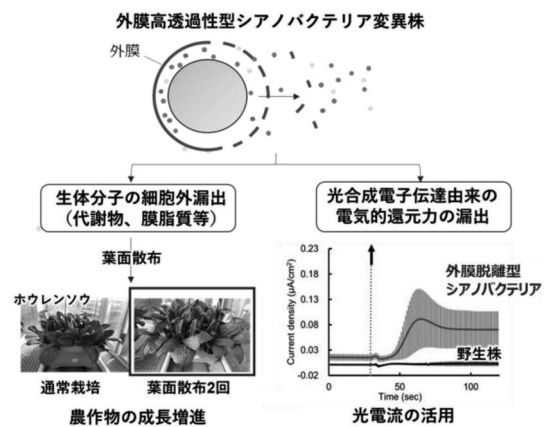


図3. 外膜高透過性型シアノバクテリア変異株の特性とその応用

を実証できた。本研究は、光合成能力を基盤とする持続可能な産業構築の鍵の一つとされるシアノバクテリアの人為的利用に向けた基盤的知見と指針を葉緑体成立の仕組みから導き出す、応用微生物研究の新たな方向性を示している。

(引用文献)

- 1) Kojima et al. *J. Bacteriol.* 192: 5953–5961, (2010)
- 2) Kojima et al. *J. Bacteriol.* 193: 2347–2350, (2011)
- 3) Kojima et al. *Biosci. Biotech. Biochem.* 80:1954–1959, (2016)
- 4) Pfanzagl et al. *J. Bacteriol.* 178:332–339, (1996)
- 5) Hirano et al. *Plant Cell*, 28:1521–1532, (2016)
- 6) Kojima & Nikaido *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: E2629–E2634, (2013)
- 7) Kojima & Nikaido *J. Biol. Chem.* 289:26464–26473, (2014)
- 8) Sugawara, Kojima & Nikaido *J. Bacteriol.* 198:3200–3208, (2016)
- 9) Kowata, [...], Kojima *J. Antibiotics.* 69:863–870, (2016)
- 10) Kojima, Muramoto, & Kusano *J. Biol. Chem.* 291:20198–20209, (2016)
- 11) Kowata, [...], Kojima *J. Bacteriol.* 199:e00371–17, (2017)
- 12) Kojima et al. *J. Biol. Chem.* 293:7777–7785, (2018)
- 13) 特許出願 WO2021100640, WO2021100642
- 14) Kusama, Kojima, [...], Nakanishi. *Nat. Commun.* 13:3067, (2022)
- 15) 特許出願 WO2021132110, WO2022138466

謝辞 本研究は主に東北大学、カリフォルニア大学バークレー校、およびパナソニックホールディングス(株)にて行われました。本研究を行うに際し様々なご指導・ご支援を賜りました全ての方々に感謝申し上げますと共に、故・伊藤義文先生(元東北大学大学院農学研究科教授)、草野友延先生(東北大学名誉教授)、高橋秀幸先生(東北大学名誉教授)、金子淳先生(東北大学大学院農学研究科准教授)、Hiroshi Nikaido先生(カリフォルニア大学バークレー校名誉教授)、パナソニックホールディングス(株)奥村泰章博士、下野健博士、草間翔子博士、若林万紗也氏、若井純子博士、パナソニック環境エンジニアリング(株)坂田俊彦氏、野島博明氏に改めて厚く御礼申し上げます。最後に、学生時代から多大なご指導を賜り、また現在に至るまで本研究を温かく見守って下さりました神尾好是先生(東北大学名誉教授)に改めて心より感謝申し上げます。