

である CO_2 に変換し、外部に逃がさずに Rubisco に供給するためのシステムとしてカルボキシソーム（緑藻ではピレノイド）の重要性が認識されてきた。¹²⁾ カルボキシソームは多面体構造を持つ細胞内顆粒で、Rubisco を構成主成分としている。能動輸送系によって、細胞内に蓄積された HCO_3^- は細胞質からカルボキシソームに入り、そこに局在する CA によって CO_2 に変換された後、Rubisco によってただちに固定されると考えられている。⁸⁾ カルボキシソームの中には Rubisco がほとんど結晶化されるほどの高いタンパク質濃度で存在している。これまで報告されている Rubisco のデータはほとんど、生体内に比べて非常に薄いタンパク質濃度で行われたものである。今後、Rubisco のピレノイドやカルボキシソーム中での挙動が研究されていくものと考えられる。

4. おわりに

最後に、現在考えられている CO_2 固定能を上げる方策を述べる。植物はラン藻などと異なり、空気中の CO_2 濃度では CO_2 固定能は100%発現していない。これはラン藻などで作動している CO_2 濃縮機構が植物にないことに起因している。このため無機炭素輸送タンパク質遺伝子を分離し、植物に導入することが考えられている。第2の方策として、宮地らによって考えられている内石藻 *Emiliania huxleyi* を育て、 CO_2 を吸収させようとするものである。このとき、この石灰藻の多くは CA を持っていないので、このような石灰藻に CA 遺伝子を導入して CO_2 への変換を促進し、石灰化を盛んにして、石灰藻内に炭酸カルシウムを作ろうとするものである。¹³⁾ 第3の考え方は Rubisco のオキシゲナーゼ活性に対するカルボキシルラーゼ活性の比率の大きい Rubisco を得ることである。これには種々の変異 Rubisco タンパク質を、大腸菌などのホストを用いて活性型として発現させ、調べるのが考えられている。現在までのところ、植物体の Rubisco を

E. coli 中で活性型として発現させる試みは、うまく行っていないが、シャペロンなどの発見とあいまって、近いうちに植物の Rubisco を活性型として *E. coli* 中で発現できるようになり、オキシゲナーゼ活性に対するカルボキシルラーゼ活性の比率の大きい Rubisco が得られる可能性があると考えられている。

以上のように、無機炭素の能動輸送系の本体、それに CA やカルボキシソームの働きがより良く理解され、さらにまた Rubisco タンパク質自体の分子生物学が発展して、いずれ近い将来、バイオマスの量産にこれらの研究成果が生かされることになるであろう。勿論、光合成の電子伝達に関する分子生物学的研究や効率的な宿主・ベクター系の開発研究からの貢献も無視できないことは言うまでもない。

文 献

- 1) 佐藤公行：光合成（現代植物生理学 1，宮地重遠編）1，朝倉書店（1992）。
- 2) Namba, O. and Satoh, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 109 (1987)。
- 3) Soth, K.: *Physiol. Plant.*, **72**, 209 (1988)。
- 4) Yu, J. and Vermaas, W. F. J.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 7407 (1993)。
- 5) 竹嶋康誠，萩原秀昭：バイオサイエンスとインダストリー，**49**, 1263 (1991)。
- 6) 横田明穂，和田野晃：化学と生物，**30**, 682 (1992)。
- 7) Harpel, M. R. and Hartman, F. C.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 6475 (1992)。
- 8) 小俣達男，和田 元，村田紀夫：蛋白質核酸酵素，**35**, 2542 (1990)。
- 9) 福澤秀哉：植物細胞工学，**15**, 83 (1993)。
- 10) Ogawa, T.: *Plant Physiol.*, **94**, 760 (1990)。
- 11) Ogawa, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4275 (1991)。
- 12) Codd, G. A. and Marsden, W. J. N.: *Biol. Rev.*, **59**, 389 (1984)。
- 13) 宮地重遠：バイオテクノロジーは地球環境問題解決のために何ができるか，p. 46，バイオインダストリー協会（1990）。

3. 遺伝子操作による光合成生物の炭酸固定能の増強にむけて

泉井 桂（京都大学農学部農林生物学）

大気中の CO_2 濃度の上昇が地球環境に深刻な影響を及ぼしつつある。このため CO_2 をその排出源また

は大気中から効率よく捕集し、有用な物質に転換する技術の開発が求められている。クリーンな太陽光をエ

エネルギー源とする光合成微生物や植物をこの問題の解決に役立てることができれば大変好ましい。われわれは永年の間ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC と略, EC 4.1.1.31) に関する研究を行ってきたので, 本酵素が CO_2 問題に資することができるかどうかを検討している。PEPC は PEP に HCO_3^- を固定してオキサロ酢酸 (OAA) とリン酸 (Pi) を生成する反応を不可逆的に触媒する酵素で, 大部分の細菌, 原生動物, すべての光合成生物に存在する。解糖系や還元的ペントースリン酸回路 (カルビン-ベンソン回路) からクエン酸回路の有機酸を供給する役割をもち, グルタミン酸やアスパラギン酸生合成の主要調節点でもある。さらにトウモロコシなどの C4 植物やサボテンなどの CAM 植物では大気中の CO_2 を捕集・濃縮する役割を担っている。

本酵素は CO_2 よりも化学的反応性の低い HCO_3^- を基質とする点でその反応機構の解明は化学触媒のモデルとしても重要である。また, 大部分の PEPC はアスパラギン酸やリンゴ酸をアロステリック・エフェクターとするフィードバック阻害を受けるので, これらのエフェクターに対して感受性を失わせた酵素 (脱感作酵素) を作出することはアミノ酸発酵の面からも要請されている。さらに, C3 光合成を行う微生物や植物に PEPC をはじめとする C4 回路の酵素群を導入し

てその光合成能を増強することも企図されている。Fig. 1 は筆者らの研究の流れ図である。研究はまだ完成からほど遠いが, 若干の筆者らの知見を中心に紹介させていただきたい。大部分の文献は総説¹⁻³⁾を参照していただきたい。

1. PEPC 遺伝子のクローン化と構造解析

筆者らは1981年にはじめて本酵素遺伝子は大腸菌からクローン化して以来, ラン藻 (*Anacystis nidulans* 6301) およびトウモロコシからクローン化してきた。最近では (1993年8月現在) 18種類の PEPC の構造が明らかとなっている。^{4,5)} PEPC は分子量約10万 (800-1000 アミノ酸残基) のサブユニットの4量体であるが, アミノ酸配列のアラインメントから保存性の高い配列と低い配列部分, PEPC に特有な部分などが明らかとなった。全体としてのホモロジーは30%から90%に及び, ホモロジーはC-末端側の半分の方がN-末端側より約10%高い。PEPC のアロステリック・エフェクターの種類は生物種によって多様性に富むので, 保存性の高い領域は触媒機能に, 低い領域は生物種固有の活性調節機能などに関与しているのではないかと考えられる。大腸菌酵素は多コピープラスミドを利用すると, 全可溶性タンパクの30%に達するほどの高発現がみられるので, 現在では湿重量1gの菌体から20mgの均

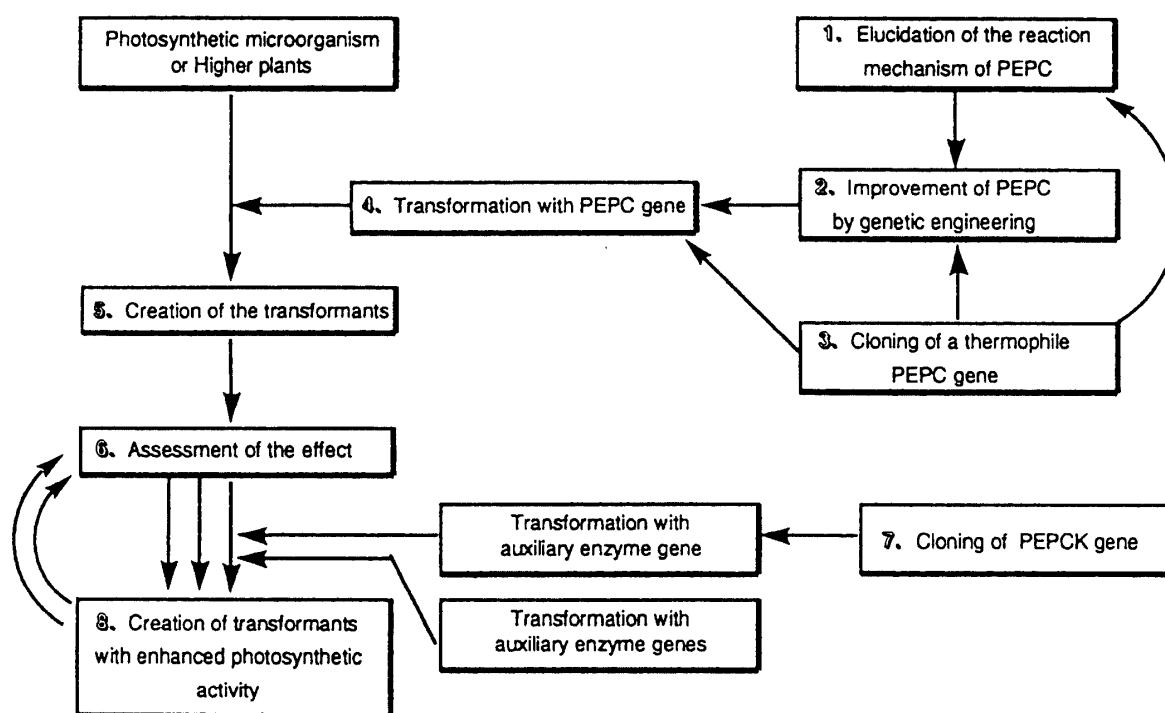


Fig. 1. Flow-chart to create photosynthetic organisms with enhanced CO_2 -fixing activity.

一酵素標品を3日間で得られるようになっている。これらのことは本酵素の遺伝子操作による改変の研究の基礎をなすものである。また、ラン藻酵素、トウモロコシおよびソルガム酵素も大腸菌で発現でき、⁶⁾ PEPC 遺伝子の欠失による表現型を相補することができるので、遺伝子操作による改変が可能である。⁷⁾

2. 部位特異的変異の導入による酵素機能の解析

本酵素において活性に必須な残基として His (H) と Arg (R) が化学修飾の実験から推測されているが、保存性のものはそれぞれ2個および13個である。大腸菌酵素遺伝子を用いて、保存性の H138 と H579 を Asn (N) に R587 を Ser (S) に置換した酵素を調製した。H579N は野生型の60%の V_{max} を示したが、 K_m (PEP) は20倍増大していた。H138N と R587S はまったく活性を示さなかった。^{8,9)} しかし、 HCO_3^- に依存した PEP の加水分解活性をもつことを見いだした (Fig. 2)。これは本酵素の反応がカルボキシリン酸 (CP) を中間体と仮定する2段階反応モデルにおいてこれらの残基が部分反応 (2) に不可欠であることを示す重要な知見である。⁸⁾ これらの変異酵素を用いて CP の生成を PEPC についてはじめて証明することができた。¹⁰⁾ CP は大変不安定な炭酸の活性化型であり、 HCO_3^- より容易に還元されると予想されるので、これを NADPH など還元できるような人工酵素をデザインすれば、将来メタノールなどの有用物質を光合

成微生物に生産させることも可能ではないかと思われる (Fig. 3)。

アロステリック・エフェクターに対する感受性は保存性アミノ酸残基の変異によってもかなり影響をうけやすいことがわかってきた。今後より系統的に変異導入やキメラ酵素の実験を行えば、脱感作酵素などを作成できるであろう。

3. PEPC 遺伝子のラン藻およびタバコへの導入

ラン藻 (シアノバクテリア) は遺伝子操作がもっとも容易に行える光合成生物であり、その中には高等植物とは異なって、従属栄養的にも生長できるものがあるので、光合成系の遺伝子とその機能の研究において大変重要な役割を果たしている。ベクター系も開発されており、その上外来 DNA を自発的に細胞内に取り込んで形質転換を受ける性質も備えている。^{11,12)}

筆者らは *A. nidulans* の小プラスミド¹³⁾ と *E. coli* 用プラスミドベクター pBR328 を *Bam*HI 部位でつないだシャトルベクターを構築し、これにラン藻の PEPC 遺伝子を組み込んだものを形質転換に用いた。小プラスミドは細胞あたりのコピー数が5~10とされているため PEPC 遺伝子のコピー数の増加による PEPC の活性増強をねらったわけである。しかし結果は不成功で、形質転換体が得られてももとのプラスミドが安定に保持されなかった。¹⁴⁾ おそらくは相同的組換え活性が非常に高いためであろう。最近、目的は異なるが

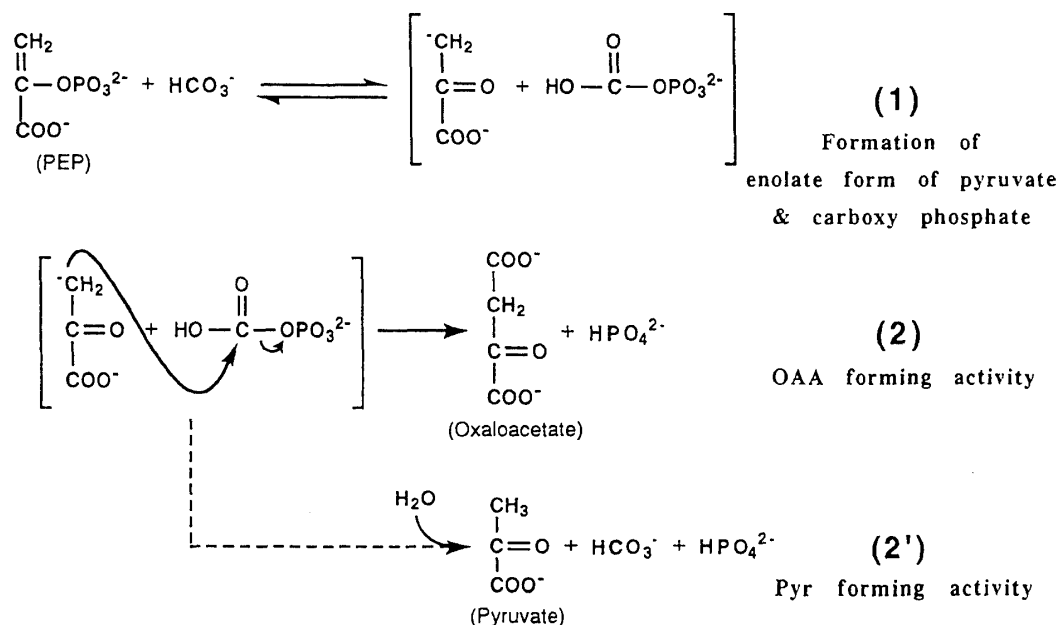


Fig. 2. Two-step reaction mechanism for PEPC.

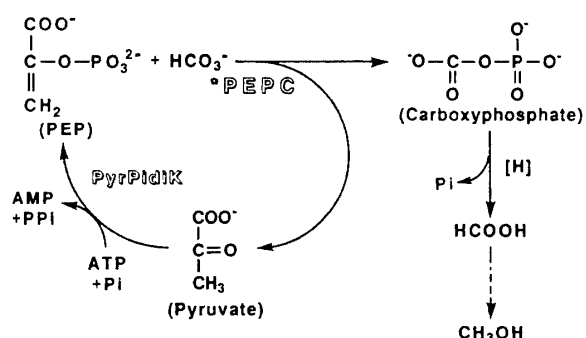


Fig. 3. An idea of catalytic CO_2 reduction by the use of the mutant PEPC and pyruvate Pi dikinase (Pyr PidiK).

E. coli の PEPC をラン藻に導入してゲノム DNA に組み込み、発現させることができたとの報告がある。¹⁵⁾

つぎに、トウモロコシ PEPC の cDNA をカリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターの下流につないだものをタバコに導入したトランスジェニックタバコを作成した。^{3,16)} 得られた 4 株のうち、2 株では葉における PEPC 活性が 1.5–2 倍増大していた。成長速度や個体の大きさには特に変化はなかったが、高温下での光合成能が野生株ではいちじるしく低下するのに対して、形質転換株ではあまり低下せず高温耐性を示した。高温耐性は C4 植物の特徴の一つであり興味深い。筆者らとは独立に米国のグループはタバコのクロロフィル a/b 結合タンパクのプロモーターを用いて同様の実験を行い、リンゴ酸の蓄積をみとめたが、常温での光合成能はとくに増強されなかったと報告した。¹⁷⁾

このような研究はまだ緒についたばかりであり、顕著な成績を得るにはいたっていないが、炭酸固定酵素の増強が代謝系にどのような影響をおよぼすかをはじめて実験的に検討したものとして意味があるように思われる。今後他の補助酵素の強化によってさらに炭酸固定能の増強を目指すつもりである。

4. おわりに

光合成微生物を用いるバイオリクターの開発は、メタノール、グリセロールあるいはアミノ酸など比較的単純な有用物質の合成や、強い還元力を必要とする

有用化合物の合成などのためにその必要性が高まっている。合成産物を培養液中に放出させるためにはこれらの物質の膜透過能も付与する必要があるが、これも遺伝子操作による膜輸送体の導入によって可能であろう。光独立栄養的に生育できる高等植物細胞の培養も達成されているので、¹⁸⁾ この系の利用も期待される。

本研究の一部は地球環境産業技術研究機構 (RITE) の援助を受けて行われた。

文 献

- 1) 泉井, 香月: 細胞工学, 5, 478 (1986).
- 2) 泉井: 化学と生物, 28, 714 (1990).
- 3) 泉井, 内宮, 柳沢, 寺田: 植物細胞工学, 5, 74 (1993).
- 4) Kawamura, T., Shigesada, K., Toh, H., Okumura, S., Yanagisawa, S., Izui, K.: *J. Biochem.*, **112**, 147 (1992).
- 5) Toh, H., Kawamura, T., Izui, K.: *Plant Cell and Environment*, 印刷中 (1993).
- 6) Yanagisawa, S., Izui, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **54**, 241 (1990).
- 7) Wang, Y. H., Duff, S. M. G., Lepiniec, L., Cretin, C., Sarath, G., Condon, S. A., Vidal, J., Gadai, P., Chollet, R.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 16759 (1992).
- 8) Terada, K., Murata, T., Izui, K.: *J. Biochem.*, **109**, 49 (1991).
- 9) Terada, K., Izui, K.: *Eur. J. Biochem.*, **202**, 797 (1991).
- 10) Terada, K., Yano, M., Izui, K.: *Res. Photosynthesis* (Murata, N. ed.), Kluwer, Academic Publishers, Dordrecht, Vol. 3, 823 (1992).
- 11) 小俣, 和田, 村田: 蛋白質・核酸・酵素, **35**, 2542 (1990).
- 12) 柳沢, 泉井: 蛋白質・核酸・酵素, **36**, 1621 (1991).
- 13) Shinozaki, K., Tomioka, N., Yamada, C., Sugiura, M.: *Gene*, **19**, 221 (1982).
- 14) 香月, 加藤, 泉井, 西野: 日産科学振興財団研究報告書, **8**, 59 (1985).
- 15) Luinenburg, I., Coleman, J. R.: *Plant Physiol.*, **101**, 121 (1993).
- 16) 土岐, 小神, 庄野, 小池, 柳沢, 泉井, 内宮: 日本植物生理学会第33回シンポジウム講演要旨集, p. 45 (1993).
- 17) Hudspeth, R. L., Grula, J. W., Dai, Z., Edwards, G. E., Ku, M. S. B.: *Plant Physiol.*, **98**, 458 (1992).
- 18) 佐藤: 植物組織培養, **3**, 63 (1986).