

TOPICS

トピックス

日焼けし難いラン藻

Photo-tolerant cyanobacterium
created by *in vitro* random mutagenesis

小林裕和, 佐藤公行

岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所

光は、光合成に必要な唯一のエネルギー源であり、光合成反応により、我々人類を含めた地球上の生命の維持に必要な有機化合物と酸素を提供する。ところが、光は諸刃の剣であり、過剰な光は光合成生物に有害である。一般に、植物種によって光感受性は異なり、陰生植物は光障害を受けやすい。また、植物の生育ステージによっても感受性は異なり、実生は成熟植物よりも障害を受けやすく、農業上は遮光されることが多い。光合成の進行に不利な低温下、低CO₂濃度下で光障害を受けやすいことも知られている。このように、光合成が強光のもとで阻害を受ける現象は強光阻害と呼ばれる。その機構としては、光化学系IIにおいて、(1)その還元側で、第二次電子受容体として働くQ_Aキノン⁻の過還元(2電子還元)の結果、第一次電子受容体フェオファチンとP 680⁺との間の電荷の再結合により生ずる³P 680(三重項状態)の反応性に原因する場合と、(2)その酸化側で、水分解による酸素発生を可能にする強力な酸化力が形成されることに原因する場合

が考えられ、この両者とも、反応中心を構成するD1タンパク質の損傷を導くものと考えられている。また、(3)光化学系Iの還元側で生成される活性酸素(酸素フリーラジカル)がチラコイド膜の構成成分や炭酸固定系の酵素などを破壊するといわれているが、不明な点が多い。

従来、強光耐性植物の作出にあたっては、上記過程で産生される活性酸素の消去系が着目されてきた。活性酸素消去系として、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ、グルタチオンレダクターゼ、カタラーゼ、あるいはグルタミン合成酵

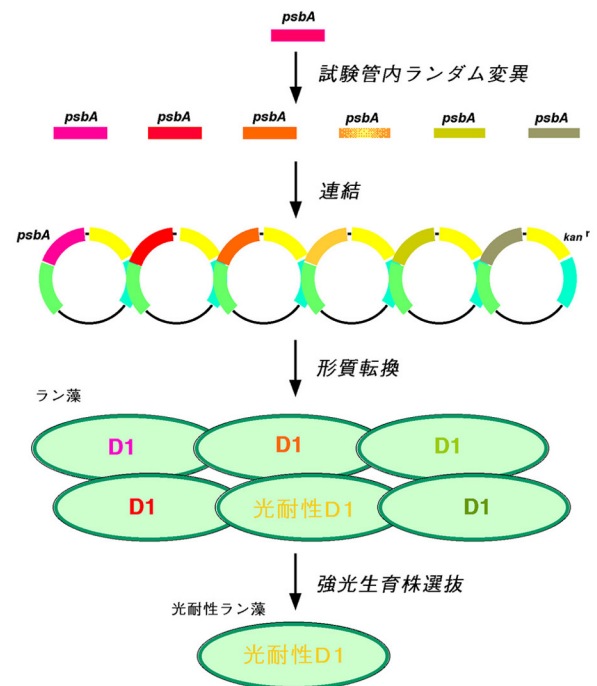


図1 試験管内ランダム突然変異誘導とラン藻形質転換株選抜による強光耐性D1タンパク質作出の模式図

筆者紹介: こばやし・ひろかず(KOBAYASHI, Hirokazu) 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科(Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka)助教授 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所(National Institute for Basic Biology)客員助教授 昭和57年名古屋大学大学院農学研究科博士課程修了 農学博士 専門: 植物分子生物学 連絡先: 〒422 静岡市谷田52-1(勤務先)

さとう・きみゆき(SATO, Kimiyuki) 岡山大学理学部(Faculty of Science, Okayama University)教授 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所(National Institute for Basic Biology)客員教授 昭和33年岡山大学農学部卒業 理学博士 専門: 植物生理学 連絡先: 〒700 岡山市津島中3-1-1(勤務先)

素などの活性を増大させるために、これら遺伝子の高発現系が植物に導入され、その効果が検証されてきた。一方、(1)と(2)の機構で標的と考えられるD1タンパク質については、タンパク質工学的な手法を用いて、タンパク質の一次構造の改変が試みられてきたが、強光耐性光合成生物の作出には至っていない。方法論的に、ペプチド鎖のアミノ酸置換は難しくはないが、どのアミノ酸をどう換えれば強光耐性能を獲得するかの予測は不可能に近い。

筆者らは、この問題点を克服するために、まず試験管内でD1タンパク質遺伝子をランダムに改変した後、光合成生物に返し、強光耐性を獲得している形質転換体を選抜し、そのD1タンパク質遺伝子を取り出してDNAの塩基配列を決定し、変異アミノ酸を特定するという方法を試みた(図1)。D1タンパク質上の特定のアミノ酸が特定の他のアミノ酸に変換される場合は、単純に計算して、19(置換により生ずるアミノ酸)×344(D1タンパク質アミノ酸残基数)となり、1/6536と計算される。この実験を満足させるだけの形質転換頻度を高等植物で得ることは容易ではなく、また強光耐性変異株の選抜の簡便さも加味し、植物型光合成を営む原核生物であるラン藻 *Synechocystis* sp.

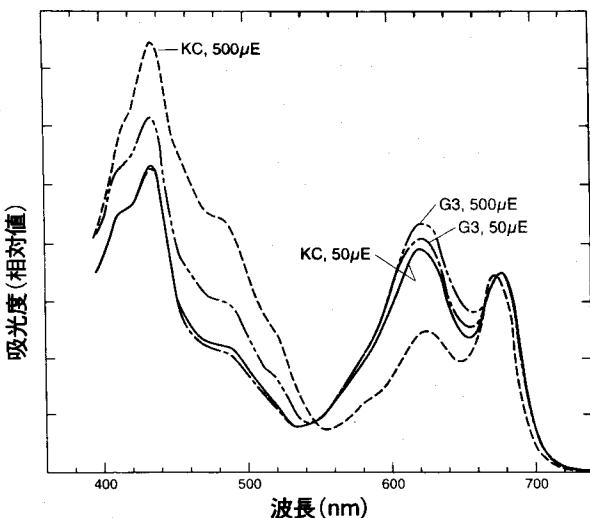


図2 *Synechocystis*強光耐性突然変異株の可視光吸収「G3, 50 μ E」, 「KC, 50 μ E」, 「G3, 500 μ E」, および「KC, 500 μ E」は、それぞれ、50 μ mol photons m^{-2} sec^{-1} あるいは500 μ mol photons m^{-2} sec^{-1} において36時間生育させた突然変異株(G3)あるいは野生型(*psbA*で形質転換したコントロール株)(KC)を示す。スペクトルはクロロフィルの赤色吸収の強度でそろえてある。

PCC 6803 を実験に供することにした。

本ラン藻の三つのD1タンパク質遺伝子(*psbA*)のうち、最も発現している*psbA2*に着目し、DNAポリメラーゼ増幅法(PCR)、ヒドロキシルアミン法、および合成オリゴヌクレオチド法により、試験管内ランダム突然変異誘導を行い、*psbA1*および*psbA3*をあらかじめ破壊しておいたラン藻株(Cm4 Δ -1株)に形質転換により導入した。これらの形質転換体を、野生株が正常に生育できない強光条件下(320 μ mol photons m^{-2} sec^{-1})で選抜し、約50万の形質転換株から約50の光耐性株を得た。強光条件下において、野生株ではフィコビルンおよびクロロフィル含量が低下するのに対し、光耐性株では光合成色素組成の変化がほとんど認められなかった(図2)。

多数の変異株について、変異が導入された*psbA2*のDNA塩基配列を効率よく決定するために、コローナからのダイレクトシーケンシング法を開発した。この方法により、光耐性株として得られたすべての株のDNA塩基配列を決定した結果、同一株と判断されるものが複数存在し、最終的に18の異なる株が選抜されていたことが明らかになった。つぎに、野生型*psbA*遺伝子に、ここで明らかになったアミノ酸置換を部位特異的突然変異誘導により導入し、これらアミノ酸置換の強光耐性付与への関与を確認した。これらの実験により、D1タンパク質の限定された部位(1ないし複数箇所)に生じた変異が重要なことが明らかになった。現在、これらのアミノ酸置換による光耐性発現の分子機構の解明を行っている。

ところで、真核植物においては、*psbA*遺伝子は葉緑体にコードされている。したがって、葉緑体ゲノムに内在する*psbA*遺伝子と改変*psbA*遺伝子との置換えにより、タバコおよびシロイヌナズナ葉緑体への強光耐性D1タンパク質を導入することが可能になる。この実験が成功すれば、日焼けし難い栽培植物創製への新たな道が開かれるものと確信する。

○参考文献

Y. Narusaka, A. Murakami, M. Saeki, H. Kobayashi and K. Satoh: *Plant Sci.*, **115**, 261~266 (1996)