

令和 3 年 3 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04443

研究課題名(和文) RubiscoのC4化によるイネの光合成能力の改良

研究課題名(英文) Introduction of C4-like enzymic properties of Rubisco into rice

研究代表者

深山 浩 (Fukayama, Hiroshi)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60373255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：光合成は、CO₂固定反応を担う酵素Rubiscoの反応速度が遅く制限要因となっている。本研究では、Rubisco活性の高いC4植物ソルガムのRubisco小サブユニット(RbcS)をイネで発現させ、イネRbcSをゲノム編集CRISPR/Cas9法によってノックアウトしたイネ(CSS系統)を作出した。RbcSがソルガム型となったCSS系統のRubiscoは、C4植物並みの触媒速度を示した。結晶構造解析からRbcSの102番目のアミノ酸がソルガムではロイシン、イネではイソロイシンと異なることで、CSS系統のRubiscoは触媒サイトの柔軟性が増し、高活性となったと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CO₂固定反応を担う酵素Rubiscoの触媒速度が遅く、光合成の光合成の主要な律速因子であることは広く知られている。しかし、Rubiscoの触媒速度の改良に成功した例はなかった。我々はC4植物のRbcSを利用することで、C3植物であるイネのRubiscoの触媒速度の大幅な改良に成功した。また、これまで不明であった植物種による触媒速度の違いを決定する分子構造についても明らかにしている。本研究で得られた知見は、今後の作物の光合成能力の改良、生産性の改良を考える上で非常に有用な知見を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Rubisco is a key rate-limiting enzyme of photosynthetic CO₂ fixation because of its low catalytic rate. It was known that Rubisco in C4 plants showed higher catalytic rate than that in C3 plants. In this study, we succeeded to enhance the catalytic rate of Rubisco in a C3 plant rice by the introduction of sorghum C4-type Rubisco small subunit (RbcS) and knockout of endogenous rice RbcS using CRISPR/Cas9. X-ray crystallography suggest that leucine 102 (isoleucine in rice RbcS) of sorghum RbcS would affect the flexibility of catalytic site of Rubisco. We consider that leucine 102 should be an important amino acid responsible for higher catalytic rate in hybrid Rubisco. We propose that the strategy shown here is an alternative use of C4 plants, has the potential to increase crop yields in the future.

研究分野：作物生産生理学

キーワード：光合成 Rubisco RbcS C4植物 イネ ソルガム X線結晶構造 高CO₂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

個葉の光合成能力は重要な収量決定因子であるが、実用レベルでの改良に成功した研究例は無い。光合成 CO₂ 固定の初発反応を触媒する Rubisco は、触媒反応速度が極端に遅いこと、O₂ をも基質として光呼吸を起こすことから、光合成の主な律速因子となっている。Rubisco の酵素特性には種間差があり、C₃ 植物では触媒速度が低く、CO₂ 濃縮回路を持つ C₄ 植物では高いことが知られている。イネ、ムギ類、ジャガイモ、ダイズなど主要な作物の多くは C₃ 植物であり、その中でもイネの Rubisco の触媒速度は特に遅い。しかし Rubisco の触媒速度と CO₂ 親和性の間にはトレードオフの関係があり、C₃ 植物の Rubisco は触媒速度は遅いが CO₂ 親和性は高い。このような C₃ 植物の Rubisco の特性は、産業革命以前の低い CO₂ 濃度(250 ppm 程度)において光呼吸を抑制するように進化・適応した結果といえる。現在の地球環境を見ると、大気 CO₂ 濃度は増加の一途をたどっており、2050 年には 600 ppm 程度にまで増加すると予想されている。そのような大気条件下では光呼吸はおのずと抑制されることから、今後は C₃ 植物も C₄ 植物のような高活性型 Rubisco を持ち Rubisco への窒素の投資を減らすことが、光合成や生産性の高い作物の開発につながると考えられる。

我々はこれまでの研究において、進化的に近いイネ科植物の中で触媒速度が高い Rubisco の探索を行ったところ、C₄ 植物であるソルガムの Rubisco が触媒速度が高く、CO₂ に対する親和性も比較的高いため、高 CO₂ 環境下でのイネの光合成の改良に有効であると考えられた。Rubisco は核ゲノムにコードされている RbcS、葉緑体ゲノムにコードされている RbcL によって構成されており、触媒部位は RbcL に存在する。そこで、RbcL はパーティクルガンを利用した相同組換え法、RbcS はアグロバクテリウム法によりイネへの遺伝子導入を試みた。イネの葉緑体形質転換は技術的に確立されておらず、RbcL の導入には成功しなかった。一方、ソルガム RbcS の高発現には成功し、驚くべきことに、RbcS を導入するだけで Rubisco の触媒速度が約 50% 高まることが明らかとなった。形質転換イネの Rubisco の触媒速度はソルガムに比べると低い、イネの光合成能力の改良に十分有効であることが、光合成速度のシミュレーションから明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究課題では(1)ソルガム RbcS 高発現形質転換イネの Rubisco 含量を RNAi 法で減少させた 2 重形質転換イネの生理生化学的特性を解析する。(2)ソルガム以外の C₄ 植物の RbcS の効果を解析し、イネ Rubisco の酵素特性の改良に、より適した RbcS があるのかを検討する。(3)ソルガム RbcS が組込まれたイネの Rubisco の X 線結晶構造解析を行い、Rubisco の構造と触媒特性の関係(構造機能相関)の解明する。(4)多収性品種についてもソルガム RbcS を導入し、光合成への効果について既存の形質転換イネ(日本晴)と比較する。以上の研究から、C₄ 植物の RbcS を導入し Rubisco の触媒速度を高めるという手法を利用して、イネの光合成能力の改良を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)ソルガム RbcS 高発現・イネ RbcS ノックダウン形質転換イネの生理生化学的特性

ソルガム RbcS 形質転換イネで Rubisco 含量を適切なレベルにコントロールし、かつソルガム RbcS のみを発現させる目的でイネ RbcS を RNAi 法によりノックダウンした。その 2 重形質転換イネ(iSS 系統)では、イネ RbcS タンパク質の発現は認められなくなっており、Rubisco に組み込まれている RbcS のほぼ全てがソルガム RbcS となっている。これらの iSS 系統を用いて光合成特性、生育特性など基本的な生理解析を進める。

iSS 系統では Rubisco 含量が減少しすぎており(多い系統でも非形質転換イネの 35%)、我々が目標とする適量(50-60%)よりもかなり低い。この実験では、イネが持つ複数の RbcS 遺伝子を同時にノックダウンするために、保存されたコード領域の約 400bp をトリガーとして RNAi を行っている。しかし、その領域はソルガム RbcS とも相同性があることから、2 重形質転換イネではソルガム RbcS についても発現が減少している。より特異的にイネ RbcS の発現を低下させる目的で、イネ RbcS を CRISPR/Cas9 法によりノックアウトを行う。

ソルガム RbcS 形質転換イネでは、イネ RbcS とソルガム RbcS がキメラとなった Rubisco を発現しているが、2 重形質転換イネで発現している Rubisco は、ほぼ全ての RbcS がソルガム RbcS に置き換わっている。そこで、これらの Rubisco の酵素特性について、¹⁴CO₂ を用いる方法により詳細な解析(触媒速度、CO₂ に対する Km、CO₂ 特異性)を行う。

(2)ソルガム以外の C₄ 植物の RbcS の効果

イネの Rubisco 活性を高めるのにソルガム RbcS よりも効果的な RbcS があるのかを探索する。先行研究により、C₄ 植物の中ではソルガム以外にネピアグラス、ギニアグラスの Rubisco の触媒速度が高く、特にネピアグラスの触媒速度は解析した植物種の中で最も高かった。そこでこれら 2 種類の C₄ 植物の RbcS のイネへの導入を、ソルガム RbcS の場合と同じ方法で行う。

(3)ソルガム RbcS が組込まれた Rubisco の構造解析

既に得られている RbcS がほぼ全てソルガム RbcS に置き換わった iSS 系統、さらに CRISPR/Cas9 でイネ RbcS をノックアウトした系統(CSS 系統)で発現する Rubisco を実験に用いる。そのこれらのイネの葉身から Rubisco を硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、結晶化させ、X 線結晶構造解析を行う。

(4) 多収性品種へのソルガム RbcS の導入

光合成能力、シンク能力が高く多収である日印交雑品種タカナリ、モミロマンについてもソルガム RbcS を導入し、その効果を日本晴の場合と比較する。これら日印交雑品種を用いた形質転換は困難であることが知られているが、形質転換効率を改善できる方法として、カルス誘導培地に一般的な N6D 培地ではなく CM 培地を用いる。得られた形質転換イネについて生理生化学的特性を解析する。

4. 研究成果

(1) ソルガム RbcS 高発現・イネ RbcS ノックダウン形質転換イネの生理生化学的特性

iSS 系統で発現する Rubisco の酵素特性を解析した。2 重形質転換イネの Rubisco は、ソルガム RbcS を高発現しただけの形質転換イネの Rubisco に比べて、触媒速度、CO₂ に対する Km が高くなることが明らかとなった。しかし、RNAi 法によるノックダウンでは Rubisco 含量を適度に調節することが困難であり、光合成速度を増加させることはできなかった。ただし、窒素当たりの光合成速度は iSS 系統の方が高くなった。つまり、光合成の窒素利用効率が向上したと言える。生育特性（シュートと根の乾物重）に関しては、大気条件では明らかに非形質転換イネに比べて iSS 系統で悪かった。高 CO₂ では、差は少なくなったが、やはり非形質転換イネに比べて iSS 系統の方が低くなった。iSS 系統では Rubisco 含量が多い系統でも非形質転換イネの 35% であり、Rubisco 含量が低下しすぎたために光合成速度も生育も低くなったと考えられた。

Rubisco 含量をより厳密にコントロールする目的で、ソルガム RbcS を高発現する形質転換イネのイネ RbcS を CRISPR/Cas9 法によりノックアウトすることを試みた。イネ RbcS は 4 つの遺伝子 (OsRbcS2-5) が存在し、塩基配列の保存性が高い領域を用いて CRISPR/Cas9 のターゲット配列を設計し、ソルガム RbcS 高発現形質転換イネに導入した。SDS-PAGE による RbcS の発現解析を行ったところ、イネ RbcS のバンド強度が明らかに低下した系統が複数得られた。塩基配列を解析したところ、系統により OsRbcS2-5 の遺伝子が様々なパターンで変異導入されていることがわかった。最終的にイネ RbcS の 4 つ全てが欠損し、Rubisco の発現量が異なる 2 種類の CSS 系統 (CSS10, CSS16) を得ることができた。

CSS 系統について Rubisco の酵素特性、光合成特性、生育特性を解析したが、その結果については現在投稿論文を作成中であり、公表を延期させていただきます。

(2) ソルガム以外の C4 植物の RbcS の効果

イネの Rubisco 活性を高めるのにソルガム RbcS よりも効果的な RbcS があるのかを探索することも重要と考え、ソルガムと同様に C4 植物であるギニアグラス、ネピアグラスから RbcS をクローニングし、イネへの遺伝子導入を行った。形質転換イネの RbcS の発現レベルを SDS-PAGE で解析したところ、導入した RbcS の発現レベルは最大でイネ RbcS の 40% 程度であった。Rubisco の酵素特性を測定したところ、ギニアグラスとネピアグラスのいずれの RbcS もイネ Rubisco の触媒速度を増加させる効果を持つことが明らかとなった。ただし、効果には種間差があり、ソルガムとネピアグラスの RbcS は同程度で、ギニアグラス RbcS は多少劣っていた。また、ギニアグラス RbcS では CO₂ に対する Km の増加が大きかった。一方、ネピアグラス RbcS では、CO₂ に対する Km の増加が最も小さかったことから Rubisco の酵素特性の改良においてネピアグラス RbcS が最も効果的であることが示唆された。現在、ネピアグラス RbcS 高発現・イネ RbcS ノックアウトイネの作出を進めている。

(3) ソルガム RbcS が組込まれた Rubisco の構造解析

まずは作出が完了していた iSS 系統を用いて Rubisco の精製を行った。葉身から Rubisco を抽出し、硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。そして硫酸イオン存在下で、ハンギング・ドロップ蒸気拡散法により結晶化を行い、X 線結晶構造解析を行った。非形質転換イネ Rubisco は 1.75Å の解像度で結晶構造を明らかにすることができた。iSS 系統の Rubisco に関しては 2.1Å の解像度で結晶構造を明らかにすることができた。iSS 系統の Rubisco の X 線結晶構造解析は解像度が多少低かったが、それはイネの RbcS が多少発現しており、RbcS がキメラとなっていたためである可能性がある。そこで、本研究課題で作成した完全にソルガム RbcS に置き換わっている CSS 系統についても X 線結晶構造解析を行った。CSS 系統の Rubisco は予想通り、1.7Å の高い解像度で結晶構造を明らかにすることができた。基本的な構造は iSS 系統と同じであり、構造解析の信憑性を高めることができた。

これまでに多くの研究者が Rubisco の構造機能相関の解明を試みてきたが、決定的な結果を得ることが出来ていなかった。今回の我々が得た結果は、Rubisco の触媒特性の種間差を説明する上で、非常に重要な発見となったが、その内容については、現在、投稿論文を作成中であり、公表を延期させていただきます。

(4) 多収性品種へのソルガム RbcS の導入

CM 培地を用いてタカナリとモミロマンからカルスを誘導し、アグロバクテリウム法によりソルガム RbcS を導入した。タカナリの形質転換は難しく、タカナリでは 3 系統、モミロマンでは多数のソルガム RbcS を高発現する形質転換イネが得られた。光合成特性を解析したとこ

る，ソルガム RbcS 高発現タカナリでは，非形質転換イネに比べて高い光合成速度を示す傾向が得られた．今後，それらの形質転換イネのイネ RbcS のノックアウトを行う予定である．

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hiroshi Fukayama, Takashi Kobara, Keita Shiomi, Ryutaro Morita, Daisuke Sasayama, Tomoko Hatanaka, Tetsushi Azuma, Rubisco small subunits of C4 plants, Napier grass and guinea grass confer C4-like catalytic properties on Rubisco in rice, *Plant Production Science*, 査読有, 22 巻, 2018, p296-300. doi: 10.1080/1343943X.2018.1540279

Hiroshi Fukayama, Akina Mizumoto, Chiaki Ueguchi, Jun Katsunuma, Ryutaro Morita, Daisuke Sasayama, Tomoko Hatanaka, Tetsushi Azuma, Expression level of Rubisco activase negatively correlates with Rubisco content in transgenic rice, *Photosynthesis Research*, 査読有, 137 巻, 2018, p465-474. doi: 10.1007/s11120-018-0525-9

Ryutaro Morita, Hiroshi Teramura, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, Hiroshi Fukayama, Overexpression of CO₂ responsive CCT protein, a key regulator of starch synthesis strikingly increases the glucose yield from rice straw for bioethanol production, *Plant Production Science*, 査読有, 20 巻, 2017, p441-447. doi: 10.1080/1343943X.2017.1389614

Koichi Morita, Tomoko Hatanaka, Shuji Misoo, Hiroshi Fukayama, Identification and expression analysis of non-photosynthetic Rubisco small subunit, OsRbcS1-like genes in plants, *Plant Gene*, 査読有, 8 巻, 2016, p26-31. doi: 10.1016/j.plgene.2016.09.004

Ryutaro Morita, Kanako Inoue, Ken-ichi Ikeda, Tomoko Hatanaka, Shuji Misoo, Hiroshi Fukayama, Starch content in leaf sheath controlled by CO₂-responsive CCT protein is a potential determinant of photosynthetic capacity in rice, *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 57 巻, 2016, p2334-2341. doi: 10.1093/pcp/pcw142

Hiroshi Fukayama, Atsushi Koga, Tomoko Hatanaka, Shuji Misoo, Small subunit of a cold-resistant plant, timothy, does not significantly alter the catalytic properties of Rubisco in transgenic rice, *Photosynthesis Research*, 査読有, 124 巻, 2015, p57-65. doi: 10.1007/s11120-015-0085-1

〔学会発表〕(計 12 件)

小林則之, 森田耕一, 笹山大輔, 畠中知子, 東哲司, 深山浩, Functional analysis of Rubisco small subunit, OsRbcS1, that is not expressed in photosynthetic organs in rice, *International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis*, 2018 年 11 月

塩見慶太, 笹山大輔, 畠中知子, 東哲司, 吉川大貴, 松村浩由, 深山浩, イネ Rubisco の C4 化と構造機能相関, *日本作物学会第 246 回講演会*, 2018 年 9 月

水本晃那, 小林亜希子, 松岡大介, 山内靖雄, 笹山大輔, 畠中知子, 東哲司, 深山浩, イネ Rubisco activase 様タンパク質 OsRca2 は Rubisco の活性化を阻害する, *日本光合成学会講演会 2018 年 5 月*

小原崇, 笹山大輔, 畠中知子, 東哲司, 深山浩, C4 植物の Rubisco 小サブユニットを高発現する形質転換イネの Rubisco 酵素特性, *日本作物学会第 245 回講演会*, 2018 年 3 月

水本晃那, 小林亜希子, 山内靖雄, 松岡大介, 笹山大輔, 畠中知子, 東哲司, 深山浩, イネの Rubisco activase 様タンパク質 Rca2 は Rubisco activase の機能を阻害する, *日本作物学会講演会 2018 年 3 月*

深山浩, 山本滉樹人, 塩見慶太, 小林則之, 吉川大貴, 谷口洋二郎, 松村浩由, Introduction of C4-like enzymic properties and nitrogen distribution of Rubisco into C3 plant, rice, *日本植物生理学会年会シンポジウム*, 2018 年 3 月

塩見慶太, 山本滉樹人, 畠中知子, 笹山大輔, 東哲司, 深山浩, ソルガム高活性型 Rubisco の小サブユニットを利用したイネの光合成能力の改良, *農芸化学会関西支部会*, 2017 年 11 月

水本晃那, 小林亜希子, 畠中知子, 笹山大輔, 東哲司, 深山浩, イネにおける Rubisco activase 様タンパク質 OsRca2 の機能解析, *農芸化学会関西支部会*, 2017 年 11 月

森田耕一，笹山大輔，東哲司，深山 浩，マイクロアレイ法による OsRbcS1 発現抑制イネの遺伝子発現プロファイリング，日本作物学会講演会，2017 年 3 月

Koichi Morita, Tomoko Hatanaka, Shuji Misoo, Hiroshi Fukayama, Functional analysis of OsRbcS1, a non-photosynthetic small subunit that increases the catalytic turnover rate of Rubisco in rice, The 17th International Congress on Photosynthesis Research, 2016 年 8 月

山本滉樹人，迫田和馬，畠中知子，三十尾修司，深山浩，高 CO₂ 条件で育成したソルガム RbcS 高発現・イネ RbcS 発現抑制 2 重形質転換イネの生理特性，日本作物学会講演会，2016 年 3 月

森田耕一，畠中 知子，三十尾修司，草野都，深山浩，OsRbcS1 の代謝機能：植物における OsRbcS1 様 RbcS の発現解析と OsRbcS1 発現抑制イネのメタボローム解析，日本作物学会講演会，2016 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松村 浩由

ローマ字氏名：Hiroyoshi Matsumura

所属研究機関名：立命館大学

部局名：生命科学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：30324809

研究分担者氏名：谷口洋二郎

ローマ字氏名：Taniguchi Yojiro

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：本部

職名：主任研究員

研究者番号 (8 桁): 50462560

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。