

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20380041

研究課題名 (和文) イネ *rbcS* 遺伝子組換え体にみる個葉光合成能力の改善にむけての分子的基盤研究課題名 (英文) Research on Photosynthesis Improvement in Transgenic Rice Transformed with *RBCS*

研究代表者

牧野 周 (MAKINO AMANE)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70181617

研究成果の概要 (和文)：

イネ *RBCS* 遺伝子組換え体を用いて、個葉光合成能力の改善とバイオマス生産の向上をめざした。*RBCS* 遺伝子の増強は Rubisco タンパク質量増にはむすびついたが、光合成速度やバイオマス生産向上の効果はなかった。ただし、低 CO<sub>2</sub> (28 Pa) や低温 (19°C) 栽培には効果があった。複数種ある *RBCS* 遺伝子は第 12 染色体に座乗する *OsRBCS2* から *OsRBCS5* が発現していて、分子種別の *RBCS*-RNAi 体を作製したところ、互いの遺伝子発現には相補関係がなかった。それらの分子種 RNAi 体は高 CO<sub>2</sub> 条件のみで野生種を越える光合成を示した。

研究成果の概要 (英文)：

Photosynthesis improvement and the enhancement of biomass production were examined in transgenic rice transformed with *RBCS*. Overexpression of *RBCS* led an increase in Rubisco protein, but did not result in increases in photosynthesis and plant biomass. However, such transgenic rice were grown better under conditions of low CO<sub>2</sub> or low temperatures. For *RBCS* multigene family, *OsRBCS2* to *OsRBCS5*, which are located on Chromosome 12, are expressed substantially, and were not compensated for each other. Each *RBCS*-RNAi plant had higher photosynthesis only under conditions of elevated [CO<sub>2</sub>].

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,900,000  | 2,670,000 | 11,570,000 |
| 2009年度 | 3,300,000  | 990,000   | 4,290,000  |
| 2010年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 15,200,000 | 4,560,000 | 19,760,000 |

研究分野：植物栄養学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：ルビスコ、イネ、光合成、バイオマス生産、*RBCS*組換え体

## 1. 研究開始当初の背景

私たちはポテンシャルとしての炭酸固定能力の決定因子が光合成の炭酸固定酵素

Rubisco にあること(総説：Makino. *Soil Sci. Plant Nutr.* **49**, 319-327, 2003)、また、光化学系電子伝達活性の決定因子がチラコイド

膜に存在するチトクローム *b6f* 複合体にあることを明らかにした(Sudo et al. *Plant Cell Environ.* **25**:255-263 2003)。したがって、これら両者のタンパク質を増強することで、光合成能力の改善は可能であると考えていた。そこで、まず *rbcS* のセンス遺伝子を導入した組換え体イネの作成を試みた。そして、その結果、Rubisco の大サブユニットをコードしている葉緑体側の遺伝子を操作しなくとも核にコードされる小サブユニットの遺伝子導入のみによって Rubisco 量の増加に結びつくことを確認した。しかしながら、作成された *rbcS* センス組換え体イネは Rubisco 量が増加しているにもかかわらず、必ずしも高い光合成速度を発揮せず、その要因は非常に複雑であることがわかった(当時論文投稿中)。

Rubisco 量は、葉身中にもっとも多量に存在する酵素タンパク質で、全窒素量の 25 から 30% をも占める。ゆえにその量的増減は他の光合成構成成分の量に影響を与えるのみならず、光合成全体の代謝にさまざまな影響を及ぼす。例えば、*rbcS* アンチセンス遺伝子を導入し、Rubisco 量を特異的に減少させた *rbcS* アンチセンス組換え体では、電子伝達の構成成分の量的増加が見られ、Rubisco の活性化状態を常に高く保つ補償作用が観察された。それは光化学系(PS)I における循環的電子伝達の活性発現によるチラコイド膜での高い  $\Delta pH$  形成を介したものであることがわかった(Makino et al. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1027-1035 2002)。さらに、この PSI の循環的電子伝達は Rubisco 量の減少により低下した炭酸固定能力にバランスを合わせるために、もう一つの光化学系 PSII の量子収率も制御し、電子伝達速度を下げた(Makino et al. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1027-1035 2002、Ushio et al. *Soil Sci Plant Nutr* **49**: 77-83 2003、Hirotsu et al. *Plant Cell Physiol.* **46**:

1377-1383 2005)。このように Rubisco 量の活性発現は電子伝達活性の制御と深く関わっており、*rbcS* センス組換え体においても光化学系電子伝達からの Rubisco への活性抑制がかかったことが容易に予想された。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、イネにおける個葉光合成能力の改善の方向性を見出すことを目的に、Rubisco の小サブユニット遺伝子 *rbcS* の組換え体イネに見られる高度に制御された光合成の複雑な制御機構解明とバイオマス生産への貢献度を定量的に明らかにしようとするものであった。具体的には、1) *rbcS* 遺伝子をセンス方向およびアンチセンス方向に導入し、Rubisco 量を特異的に増加あるいは減少させたイネにおける光合成機能全体での調節機構の解明。2) 核ゲノムに複数種存在する *rbcS* 遺伝子を個別ノックダウンし、Rubisco 量を制御的に減少させたイネを作製。それらの組換え体にみられる光合成能力低下の補償作用機構の解明とそれらの結果から出てくる光合成能力改善にむけての分子的基盤を確立することにあつた。

## 3. 研究の方法

1) *RBCS* 遺伝子をセンス方向で導入し、Rubisco 量を増やしたイネ形質組換え体を窒素濃度を変えて栽培し、光合成機能の評価を行った。また、そのイネの葉位別の光合成機能の評価を行い、葉のエイジとの関係を調べた。さらに、生体内での Rubisco の活性化状態について調べた。また、低温環境(19/16°C: day/night)および低 CO<sub>2</sub> 分圧 (28 Pa) 下での個体レベルでの基本的な成長解析を行い、バイオマス生産の評価を行った。さらに、*RBCS* 過剰生産イネでは、Rubisco 量が増強されているにもかかわらず、大気 CO<sub>2</sub> 条件(39 Pa) では光合成は増加しておらず、バイオマス増

産も認められなかったので、その要因を探るべく、CE-TOFMS による網羅的な光合成中間代謝産物のメタボローム解析を行った。

2) イネの核ゲノム上に 5 種ある *RBCS* 遺伝子の器官別・生育ステージ別発現量の変動を追って、幼植物から出穂期まで調べた。第 12 染色体に存在する 4 種、*OsRBCS2* から *OsRBCS5* までの RNAi 形質転換体の作製を試み、*RBCS3* の RNAi 系統に明確な Rubisco 量低下がみられたので、その系統の個葉レベルでの光合成速度を光飽和の条件 (1500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )、25°C で CO<sub>2</sub> レベルを変えて測定した。また、*RBCS3* RNAi 系統の、現在の CO<sub>2</sub> 分圧 (39 Pa) 下における個体レベルでの基本的な成長解析を行い、バイオマス生産の評価および収量調査を行った。

#### 4. 研究成果

1) Rubisco を増強し、現在より低 CO<sub>2</sub> レベルでの光合成機能の向上をねらった。Rubisco は葉緑体と核遺伝子の両方にコードされるが、核コードの *RBCS* 遺伝子導入のみで Rubisco 量の増強には成功した。しかし、葉内では部分的な不活性化を伴い光合成機能の向上には結びつかなかった。現在の CO<sub>2</sub> レベルでのバイオマス生産や成長パラメータにも wild-type との差は認められなかった。しかしながら、63 日目の個体レベルでのバイオマス生産では、*RBCS* 過剰生産イネが低温環境 (19/16°C: day/night) および低 CO<sub>2</sub> 分圧 (28 Pa) 下で Wild-type 系統のバイオマス生産を有意に越えることがわかった。特に低温条件での差が大きかった。このことは、Rubisco 量の増強が、冷涼な環境でのバイオマス確保に有力な手段であり、北方適応型高バイオマスイネの一つのモデルになることを示した。光合成解析は現在進行中である。また、*RBCS* 過剰生産イネの Rubisco の活性化低下の要因を探るため、メタボローム解析

を行ったところ、3-PGA、FBP および S7P の 1.4 から 1.5 倍程度の増加が認められた。RuBP のプールには変化がなかったが、CO<sub>2</sub> 同化の初期産物 (3-PGA) の蓄積、カルビン回路鍵酵素、SBPase の産物である S7P の蓄積は RuBP 再生産系の律速が強くなっている結果を示唆した。Rubisco 量を減少させ Rubisco の律速性を高めたイネではまったく逆の関係が認められた。なお、ATP と ADP および NADPH と NADP<sup>+</sup> には有意な差は見られなかった。

2) 葉身では、第 12 染色体に座乗する 4 種 (*OsRBCS2* から *OsRBCS5*) が発現、生育ステージ (21 日目、44 日目、81 日目) を問わず、*RBCS3* の発現がやや強かった (図 1)。

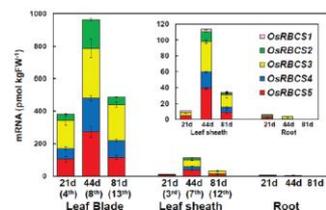


図 1 生育ステージ・器官別 *OsRBCS* multigene family の発現。数字は発芽後日数、カッコ内数字は分析に供した最上位の展開中の葉の葉齢、右上図は葉齢と根の拡大図。

表 1. *RBCS* 各分子種を個別にノックダウンした形質転換体イネの系統数、葉身全窒素量、Rubisco 総 N が葉身全窒素に占める割合およびノックダウンした分子種の mRNA 量

| Target         | Line No. | Total N<br>(mmol m <sup>-2</sup> ) | Rubisco-N/total N<br>(%) | Target mRNA<br>(% of WT) |
|----------------|----------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>OsRBCS2</i> | 4        | 115 ± 3                            | 20.0 ± 1.0               | 75.0 ± 3.3               |
| <i>OsRBCS3</i> | 2        | 89                                 | 19.2                     | 76                       |
| <i>OsRBCS4</i> | 3        | 117 ± 1                            | 23.7 ± 0.7               | 88.0 ± 2.5               |
| <i>OsRBCS5</i> | 3        | 94 ± 4                             | 20.1 ± 1.2               | 79.0 ± 4.2               |

データは平均、または、平均 ± 標準誤差 (n = 3-4)。

第 2 染色体の *OsRBCS1* はほとんど発現していなかった。そして、全 *RBCS* mRNA の発現量、葉緑体コードの *RBCL* mRNA の発現量および Rubisco タンパク質量との間には非常に高い正の相関関係があった。*RBCS2* から *RBCS5* の分子種別の RNAi 体を作製したところ、4 分子種のすべての RNAi 体において発現抑制を行った分子種の *RBCS* mRNA の発現低下と Rubisco タンパク質量の減少が認められた (表 1)。このことは、複数種存在

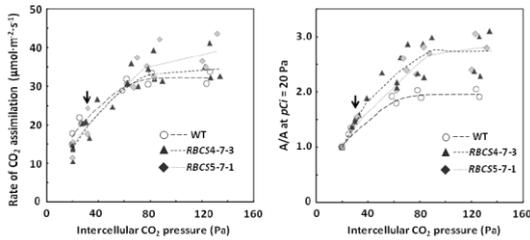


図2. 選抜したRBCS4-5-3とRBCS5-7-1-RNAi体のA/Ci(光合成：葉内CO<sub>2</sub>分圧変化の応答)曲線。矢印は大気CO<sub>2</sub>(39 Pa)での光合成速度。光強度1500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>と葉温25°Cで測定。

する *RBCS* の一つの分子種のノックアウトが他の分子種の発現や翻訳レベルでは相補されないことを意味した。

次に、その *RBCS3* RNAi 系統において、個葉レベルでの光合成機能評価を、葉身窒素含量あたりで行ったところ、Rubisco 量が光合成機能に対して過剰となる高 CO<sub>2</sub> 分圧領域でやや光合成速度の向上が認められた(図2)。また、*RBCS3* RNAi 系統の現在の CO<sub>2</sub> レベル(39 Pa)での個体レベルバイオマス生産を 21 日目、42 日目および 70 日目で調べたところ、72 日目でバイオマス生産の低下が明確に認められ、以前、*RBCS* アンチセンス遺伝子導入で観察された(Makino et al., 2000, *Aust J Plant Physiol*, 27, 1-12)ような、生育初期において強い *RBCS* 発現抑制とそれに伴う強い翻訳低下は生じなかった。収量も *RBCS3* RNAi 系統で低下していた。次に、高 CO<sub>2</sub> レベル(100Pa)での個体レベルでのバイオマス生産を 70 日目で調べたところ、残念ながら Wild-type 系統のそれを上回ることはなかった。詳細な成長解析を行ったところ、初期生育が劣ることが原因であった。生育後半では、*RBCS3* RNAi 系統は Wild-type 系統の成長速度を越えるものの最終バイオマス生産は同等のものとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- 1) **Makino A** (2011) Photosynthesis, grain yield and N utilization in rice and

wheat. *Plant Physiol.* 155 : 125-129. 査読有

- 2) Seneweera S, **Makino A**, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y (2011) New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub>: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves. *Environ. Exp. Bot.* 71: 128-136. 査読有
- 3) Yamori W, Nagai T and **Makino A** (2011) The rate-limiting step for CO<sub>2</sub> assimilation at different temperatures is influenced by the leaf nitrogen content in several C<sub>3</sub> crop species. *Plant Cell Environ.* 34: 764-777. 査読有
- 4) Suzuki Y, Kihara-Doi T, Kawazu T, Miyake C and **Makino A** (2010) Differences in Rubisco content and its synthesis and degradation in leaves at different positions in *Eucalyptus globulus* seedlings. *Plant Cell Environ.* 33, 1314-1323. 査読有
- 5) Kanno K and **Makino A** (2010) Increased grain yield and biomass allocation in rice under cool night temperature. *Soil Sci Plant Nutr.* 56, 412-417. 査読有
- 6) Irving LJ, Suzuki Y, Ishida H and **Makino A** (2010) Protein turnover in grass leaves. *Advances in Botanical Research* 54: 139-182. 査読有
- 7) Izumi M, Wada S, **Makino A** and Ishida H (2010) The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies is specially linked to leaf carbon status but not nitrogen status in

- Arabidopsis. *Plant Physiol.* **154**: 1196-1209. 査読有
- 8) Kanno K, Mae T and Makino A (2009) High night-temperature stimulates photosynthesis, biomass production and plant growth during the vegetative stage of rice plants. *Soil Sci. Plant Nutr* **55**, 124-131. 査読有
- 9) Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T and Makino A (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.* **149**, 885-893. 査読有
- 10) Suzuki Y, Miyamoto, T, Yoshizawa R, Mae, T and Makino A (2009) Rubisco content and photosynthesis at different positions in transgenic rice with an overexpression of *RBCS*. *Plant Cell Environ.* **32**, 417-427. 査読有
- 11) Tanaka A and Makino A (2009) Photosynthesis research in plant science. *Plant Cell Physiol.* **50**, 681-683. 査読有
- 12) Nagai T and Makino A (2009) Differences between rice and wheat in temperature responses of photosynthesis and plant growth. *Plant Cell Physiol.* **50**, 744-755. 査読有
- 13) Suzuki Y, Nakabayashi K, Yoshizawa R, Mae T and Makino A (2009) Differences in expression of the *RBCS* multigene family and Rubisco protein content in various rice plant tissues at different growth stages. *Plant Cell Physiol* **50**, 1851-1855. 査読有
- 14) Izumi M, Ishida H, Makino A (2009) The analysis of factors affecting the creation of Rubisco-containing bodies (RCBs), a specific autophagic process for chloroplast degradation in plants. *Autophagy* **5**, 914. 査読有
- 15) Suzuki Y, Mae T and Makino A (2008) RNA extraction from various recalcitrant plant tissues with a cethyltrimethylammonium bromide-containing buffer followed by acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform treatment. *Biosci, Biotechnol. Biochem.* **72**, 1951-1953. 査読有
- 16) Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson M and Mae T (2008) Mobilization of Rubisco and stromal-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an *ATG* gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol* **148**, 142-155. 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
- 1) 小川瞬ら (代表者、牧野を含む他4名) : イネにおいて *OsRBCS* multigene family の個別発現抑制は葉身Rubisco量を減させる 日本植物生理学会年会 2010年3月20-23日 熊本
- 2) 菅野圭一ら (代表者、牧野を含む他3名) : *OsRBCS3* を発現抑制したイネの大気CO<sub>2</sub>分圧下での個体成長 日本植物生理学会年会 2010年3月20-23日 熊本
- 3) 泉正範ら (代表者、牧野を含む他 1 名) : デンプン代謝変異がRubisco-containing body (RCB) の形成に及ぼす影響の解析 日本植物生理学会年会 2010年3月20

- 23日 熊本
- 4) 牧野 周：イネの生産性と個葉光合成  
日本光合成学会シンポジウム 2010年5月29日 東京
  - 5) 和田慎也ら(代表者、牧野を含む他4名)：  
シロイヌナズナ個別暗処理葉におけるオートファジー葉緑体分解機構 日本土壤肥料学会札幌大会 2010年9月7日—9日 札幌
  - 6) 菅野圭一ら(代表者、牧野を含む他2名)：  
異なるCO<sub>2</sub>分圧下でのO<sub>s</sub>RBCS3ノックダウンイネの乾物生産と窒素利用 日本土壤肥料学会札幌大会 2010年9月7日—9日 札幌
  - 7) 鈴木雄二ら(代表者、牧野を含む他4名)：  
葉位の異なるEucalyptus globulus葉におけるRubiscoの遺伝子発現 日本土壤肥料学会札幌大会 2010年9月7日—9日 札幌
  - 8) 鈴木雄二ら(代表者、牧野を含む他2名)：  
Rubiscoタンオーバーと窒素栄養 日本土壤肥料学会札幌大会 2010年9月7日—9日 札幌
  - 9) 鈴木雄二ら(代表者、牧野を含む他4名)：  
RBCS 遺伝子を過剰発現した形質転換体イネの Rubisco 量、光合成および個体生育 日本植物生理学会年会 2009年3月21-24日 名古屋
  - 10) 中林 香(代表者、牧野を含む他4名)：  
イネ RBCS multigene family の生育別・器官別の発現の違いについて 日本植物生理学会年会 2009年3月21-24日 名古屋
  - 11) Irvingら(代表者、牧野を含む他2名)：Nitrogen oscillation in the tiller axes of grasses A role in leaf production 日本植物生理学会年会 2009年3月21-24日 名古屋

- 12) 泉正範ら(代表者、牧野を含む他2名)：  
シロイヌナズナ切離葉におけるRubisco-containing body (RCB)の形成に影響を及ぼす要因 日本植物生理学会年会 2009年3月21-24日 名古屋

[図書] (計2件)

1. Mae T and **Makino A** (2010) Nitrogen utilization, growth and yield in rice plants. *In Nitrogen Assimilation in Plants: Chapter 17*, Eds by Ohyama T and Sueyoshi K pp. 243-253 Research Signpost, Kerala
2. Ishida H, Suzuki Y and **Makino A** (2010) Rubisco turnover and photosynthesis in a leaf. *In Nitrogen Assimilation in Plants: Chapter 17*, Eds by Ohyama T and Sueyoshi K pp. 277-285 Research Signpost, Kerala

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/syokuei/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 周 (Makino Amane)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：70181617

(2) 研究分担者

なし