

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20580014

研究課題名（和文）イネ科植物由来の高 kcat Rubisco を利用したイネの光合成能力の改良

研究課題名（英文）Improvement of photosynthetic efficiency by introduction of high kcat Rubisco from Poaceae.

研究代表者 深山 浩 (HIROSHI FUKAYAMA)

神戸大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：60373255

研究成果の概要（和文）：光合成速度の主要な律速因子は CO₂ 固定の初発反応を担う Rubisco と考えられる。将来的な高 CO₂ 環境でのイネの光合成能力の改良に有効な高活性型 Rubisco を C₄ 植物、寒地型牧草類、高山植物の中で探索した。その結果、チモシー、ウシノケグサ、ソルガムが触媒活性 (kcat) が高く、かつ CO₂ に対する親和性も比較的高い Rubisco を持つことがわかった。その 3 種の中で kcat がイネの約 2.5 倍と最も高かったソルガムの Rubisco をイネに導入することとした。Rubisco は大サブユニット (RbcL) と小サブユニット (RbcS) の 2 種類のタンパク質により構成されている。RbcL は葉緑体 DNA にコードされており、相同組み換えによるソルガム RbcL の導入を試みたが今のところ成功していない。しかし、ソルガム Rubisco 小サブユニットのイネへの導入は成功し、最大で全 RbcS の 80% がソルガム RbcS となる形質転換イネが得られた。そしてソルガム RbcS 形質転換イネでは Rubisco の分子当たりの kcat がイネに比べて 50% 増加した。しかし、形質転換イネでは Rubisco 量が増加し、Rubisco の活性化率が低下した。つまり形質転換イネでは窒素利用効率が低下したために光合成速度は増加しなかったと考えられる。本研究では光合成速度の改良までは達成できなかったが、Rubisco の触媒特性を改良することに成功したことから、今後の光合成能力の改良に大いに利用できる結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：The activity of Rubisco is a major limitation of photosynthetic CO₂ assimilation rate in C₃ plants. In order to find useful Rubisco for improvement of photosynthesis in rice under elevated CO₂, the catalytic turnover rate (k_{cat}) of Rubisco was analyzed in Poaceae including C₃ alpine plants, C₃ cold resistant plants and C₄ plants. Rubisco in these plants showed 1.1- to 2.8-fold higher k_{cat} than that in rice. Among plants analyzed, Rubisco in *Festuca ovina*, *Phleum pratense* and Sorghum showed relatively high k_{cat} to Kc. In our estimation, the expression of high k_{cat} Rubisco of *F. ovina* and *S. bicolor* in rice could significantly enhance CO₂ assimilation rates under elevated CO₂. We introduced the small subunit (RbcS) of Sorghum and it was found that Sorghum RbcS significantly enhances k_{cat} of Rubisco in transgenic rice (*Oryza sativa*). These results suggest that Rubisco in rice transformed with sorghum RbcS partially acquires the catalytic properties of sorghum Rubisco. Rubisco content in transgenic lines was significantly increased over wild type levels but Rubisco activation was slightly decreased. The expression of sorghum RbcS did not affect CO₂ assimilation rates under a range of CO₂ partial pressures. The J_{max}/V_{cmax} ratio was significantly lower in transgenic line compared to the nontransgenic plants. These observations suggest that the capacity of electron transport is not sufficient to support the increased Rubisco capacity in transgenic rice. Although the photosynthetic rate was not enhanced, the strategy presented in this study opens the way to engineering Rubisco for improvement of photosynthesis and productivity in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,460,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：酵素、遺伝子、光合成、作物学

1. 研究開始当初の背景

作物の生産性を飛躍的に増大させるには光合成能力の改良が必須である。光合成能力は複雑なプロセスであり、ターゲットが不明確である。しかし、今後の高 CO₂ 環境を考えると初期炭酸固定に働く酵素 Rubisco を高活性型にすることが有効と考えられた。Rubisco の触媒特性の改良は多くの研究者が挑戦してきたが成功していなかった。それは、遺伝的に遠縁な植物の遺伝子を使用してきたことが1つの原因と考えられた。また、Rubisco は葉緑体 DNA にコードされた大サブユニット (RbcL) と核の多重遺伝子族にコードされた小サブユニット (RbcS) から構成される。触媒作用に重要なのは RbcL と考えられていた。しかし、異種の RbcL を導入するには葉緑体形質転換が必要であるが、限られた植物でしか確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では光合成能力の強化による生産性の改良を目的とした。最重要作物であり単子葉植物のモデル植物であるイネを実験材料として、まず、光合成の主要な律速因子である Rubisco の触媒速度を高めるのに適した Rubisco をイネと近縁なイネ科植物から探索する。そして、有用と考えられた Rubisco の RbcL と RbcS をクローニングし、イネに導入することにより光合成能力の改良を試みる。RbcL に関しては葉緑体形質転換が必要であり、イネにおいてその方法の確立も含めて研究を進める。

3. 研究の方法

イネの光合成能力の改良のために、高 kcat Rubisco を持つことが予想される C₄ 植物、寒冷地に適応した植物 (牧草類、高山植物等) から kcat が高く、かつ CO₂ に対する Km がイネの Rubisco と比較的近い酵素をスクリーニングする。また、それらの植物の RbcL 遺伝子の塩基配列を決定しイネとの相同性を比較する。そして酵素特性が有用で塩基配列がよりイネに近い種を絞り込む。その条件を満たす Rubisco を持つ植物より、核ゲノムにコードされている小サブユニット遺伝子 (高 kcatRbcS)、葉緑体ゲノムにコードされている大サブユニット遺伝子 (高 kcatRbcL) の全長 cDNA をクローニングする。RbcS についてはアグロバクテリウム法によりイネに導入する。そして、得られた形質転換体について、RNAi 法によりイネが持つ RbcS をノックダウンする。また、RbcL についてはパーティクル

ガンを利用した相同組換え法によりイネの葉緑体ゲノムに導入する。高 kcat RbcL 形質転換体を母本として高 kcat RbcS 形質転換体と交配し、両方を発現する形質転換イネを得る。以上により、高 kcat Rubisco を発現する形質転換イネを作出し、光合成特性や収量への影響を解析する。

4. 研究成果

イネの光合成能力の改良に有効な高活性型 Rubisco を C₄ 植物、寒地型牧草類、高山植物の中で探索した (表 1)。

表 1. イネ科の耐寒性植物、C₄植物におけるRubiscoの回転数 (k_{cat})とCO₂に対するKm

植物種	k _{cat} (mol mol ⁻¹ s ⁻¹)	Km (CO ₂) (μM)
イネ	1.39 ± 0.01	9.7 ± 1.05
高山植物 (C ₃ 植物)		
ウシノケグサ	2.05 ± 0.07**	14.1 ± 1.63 *
タカネコウボウ	1.58 ± 0.05**	
ヒゲナガリヤス	1.92 ± 0.11**	
ミヤマアワガエリ	2.22 ± 0.11**	21.6 ± 1.07 **
寒冷地牧草類 (C ₃ 植物)		
オーチャードグラス	1.59 ± 0.04**	
スムースブロムグラス	1.73 ± 0.08**	
チモシー	2.18 ± 0.13**	16.4 ± 1.28 **
<i>Poa arctica</i>	1.93 ± 0.04**	14.6 ± 0.39 **
ライムギ	1.65 ± 0.09*	
C ₄ 植物		
エノコログサ	2.17 ± 0.24**	
オヒシバ	2.73 ± 0.09**	
ギニアグラス	3.48 ± 0.05**	
ススキ	3.34 ± 0.29**	
ソルガム	3.50 ± 0.09**	25.6 ± 1.27 **
トウモロコシ	3.05 ± 0.03**	
ネピアグラス	3.92 ± 0.06**	37.2 ± 1.35 **

数値は全て異なる葉を用いた3回の測定の前平均値±標準偏差で表す。

**イネとの比較で分散分析により1%水準で有意差有り。

*イネとの比較で分散分析により5%水準で有意差有り。

その結果、チモシー、ウシノケグサ、ソルガムが触媒活性 (kcat) が高く、かつ CO₂ に対する親和性も比較的高い Rubisco を持つことがわかった。これらは RbcL の塩基配列もイネと相同性が高かった。そこで、3 種の中で kcat がイネの約 2.5 倍と最も高かったソルガムの Rubisco をイネに導入することとした。Rubisco は RbcL と RbcS の 2 種類のサブユニットで構成されており、酵素特性を決める上で RbcL が重要と考えられるが、RbcS もカルボキシレーション効率に関係することが分かっている。そこで、ソルガムの RbcL と RbcL それぞれをイネに遺伝子導入することとした。

ソルガムの RbcL の配列は Genbank に登録されており、その全長を PCR 法により増幅した。RbcL は葉緑体 DNA にコードされていることからソルガムの RbcL をイネの RbcL の 5' 上流域と 3' 下流域で挟んだキメラ遺伝子を含む相同組換え用プラスミドを作成し、パーティクルガンによる遺伝子の導入を試みた。また、葉緑体形質転換の効率を改善させるためにカルスで葉緑体を発達させる GLK 高発現イネを材料に用いた。現在までに多数の再分化

個体が得られたが、今のところ導入遺伝子は確認できていない。現在、選抜条件、再分化条件について検討を行っている。

RbcS は核の多重遺伝子族にコードされている。そこで、ソルガム緑葉内で最も発現の高い RbcS を特定し、全長をクローニングしてイネにアグロバクテリウム法で遺伝子導入した。プロモーターには Cab を用いた。多数の形質転換イネが得られ、その中からソルガム RbcS 発現量が全 RbcS の 30, 44, 79% の異なる 3 つのホモ系統を選抜した (図 1)。

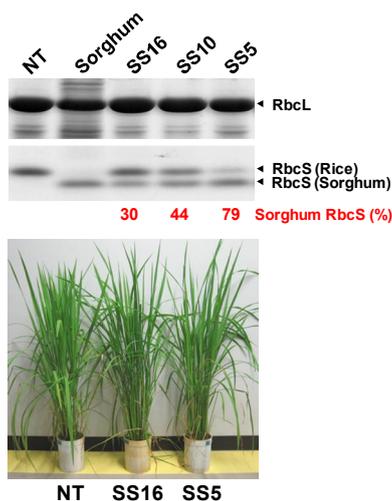


図 1. ソルガム RbcS を高発現する形質転換イネ. SDS-PAGE (CBB 染色) による発現解析と播種後 60 日目の非形質転換イネ (NT) と形質転換イネ (SS)。

形質転換イネにおける Rubisco の kcat はイネの 1.3–1.5 倍と有意に増加した。BN-PAGE では、ソルガム Rubisco はイネ Rubisco よりも見かけの分子量が少し小さいが、ソルガム RbcS を発現させた形質転換イネの Rubisco では、ソルガム RbcS の発現レベルが高くなるにつれて見かけの分子量がソルガムに近づく傾向が認められた。以上の結果から、ソルガム RbcS の部分的なイネ Rubisco へ組み込みが全体的な立体構造の変化を引き起こし kcat を増加させたものと考えられた。以上のようにソルガム RbcS の高発現のみで Rubisco の活性を高めることに成功し、この点は光合成の改良を図る上で大変重要な発見となった。しかし、形質転換イネの光合成速度は増加しなかった。形質転換イネでは Rubisco の含量が増加していたことから、今後 RNAi 法などにより Rubisco 含量を適切にコントロールすることができれば、光合成速度の改良も可能であろうと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Yamori W., Masumoto C., Fukayama H. and Makino A. (2012): Rubisco activase is a key regulator of non steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *Plant J.*, (In press)
- ② Fukayama H., Ueguchi C., Nishikawa K., Kato N., Ishikawa C., Hatanaka T. and Misoo S. (2012): Overexpression of Rubisco activase decreases the photosynthetic CO₂ assimilation rate by reducing Rubisco content in rice leaves. *Plant Cell Physiol.*, (In press)
- ③ Masumoto C., Fukayama H., Hatanaka T. and Uchida N. (2012) Photosynthetic Characteristics of Antisense Transgenic Rice Expressing Reduced Levels of Rubisco Activase. *Plant Prod Sci.* (In press)
- ④ Ishikawa C., Hatanaka T., Misoo S., Miyake C. and Fukayama H. (2011): Functional Incorporation of Sorghum Small Subunit Increases the Catalytic Turnover Rate of Rubisco in Transgenic Rice. *Plant Physiol.* 156: 1603-1611
- ⑤ Miyao M., Masumoto C., Miyazawa S. and Fukayama H. (2011): Lessons from engineering a single-cell C₄ photosynthetic pathway into rice. *J. Exp. Bot.*, 62: 3021-3029
- ⑥ Hirano T., Takahashi Y., Fukayama H. and Michiyama H. (2011): Characteristics of the plastid-targeted beta-amylase in rice. *Plant Prod. Sci.* 14: 318-324.
- ⑦ Fukayama H., Sugino M., Fukuda T., Masumoto C., Taniguchi Y., Okada M., Sameshima R., Hatanaka T., Misoo S., Hasegawa T. and Miyao M. (2011) Gene expression profiling of rice grown in free air CO₂ enrichment (FACE) and elevated soil temperature, *Field Crops Res.* 121:195-199
- ⑧ Kubo S, Masumura T., Saito Y., Fukayama H., Suzuki Y., Sugimoto T., Makino A.,

Amako K. and Miyake C. (2011) : Activation of Cyclic Electron Flow around PSI in the Photoinhibited Rice Leaves, *Soil Sci. Plant Nut.* 57, 105-113.

- ⑨ Masumoto C., Miyazawa S., Ohkawa H., Fukuda T., Taniguchi Y., Murayama S., Kusano M., Saito K., Fukayama H. and Miyao M. (2010) Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 5226-5231.
- ⑩ Fukayama H., Abe R. and Uchida N. (2010) SDS-dependent proteases induced by ABA and its relation to Rubisco and Rubisco activase contents in rice leaves, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 808-812.
- ⑪ Fukayama H., Fukuda T., Masumoto M., Taniguchi Y., Sakai H., Cheng W., Hasegawa T. and Miyao M. (2009): Rice plant response to long term CO₂ enrichment: Gene expression profiling, *Plant Science*, 177, 203-210.
- ⑫ Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S. and Fukayama, H. (2009): Screening of High kcat Rubisco among Poaceae for Improvement of Photosynthetic CO₂ Assimilation in Rice, *Plant Production Science*, 12, 345-350.

[学会発表] (計7件)

- ① 深山浩, 上口千晶, 西川薫, 石川智恵, 畠中知子, 三十尾修司 (2011) Rubisco activaseの高発現はRubisco含量の減少により光合成速度を低下させる. 第52回日本植物生理学会要旨集 pp152. 東北大学
- ② Ishikawa C., Hatanaka T., Misoo S. and Fukayama H. (2010) Chimeric Incorporation of Sorghum RbcS Increases the Catalytic Turnover Rate of Rubisco in Transgenic Rice Plants The 15th International Congress of Photosynthesis, Beijing, August 23-27, 2010. (Proceedings P144) 北京
- ③ 石川智恵, 畠中知子, 三十尾修司, 深山浩 (2010) ソルガム RbcS の高発現は形質

転換イネにおける Rubisco の反応回転速度を増加させる 第51回日本植物生理学会年会要旨集 P222. 熊本大学

- ④ 深山浩, 西川薫, 畠中知子, 三十尾修司 (2009): オオムギ Rubisco activase の高発現がイネの光合成特性と葉内成分含量におよぼす効果, *日本作物学会紀事*, 73 (別号1) 214-215. つくば国際会議場
- ⑤ 安立美奈子, 深山浩, 常田岳志, 程為国, 中村浩史, 大川原佳伸, 鮫島良次, 岡田益己, 長谷川利拓 (2009): 生育期間を通じた開放系大気 CO₂ 増加・水温上昇処理がイネの光合成に及ぼす影響, *日本作物学会紀事*, 73 (別号1) 230-231. つくば国際会議場
- ⑥ 深山浩, 福田琢哉, 長谷川利拓, 宮尾光恵, 畠中知子, 三十尾修司 (2008): 開放系大気 CO₂ 濃度増加条件 (FACE) で育成したイネの遺伝子発現プロファイリング, *近畿作物育種研究会要旨集*, p16. 神戸大学
- ⑦ 深山浩, 石川智恵, 畠中知子, 三十尾修司 (2008): イネの光合成能力改良に向けたイネ科植物内における高 Kcat Rubisco の探索. *日本作物学会紀事*, 第77巻 (別2号): 262 - 263. 神戸大学

[その他]
ホームページ等
神戸大学資源植物生産学研究室
(<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-sakumotsu/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深山浩 (FUKAYAMA HIROSHI)
神戸大学大学院・農学研究科・助教
研究者番号: 60373255

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者