

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20780044

研究課題名（和文）葉の光合成機能維持に向けた Rubisco 分解機構の分子遺伝学的解析

研究課題名（英文）Molecular genetic analysis of Rubisco degradation to maintain leaf photosynthesis

研究代表者

石田 宏幸（ISHIDA HIROYUKI）

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：60312625

研究成果の概要（和文）：

本研究では、光合成機能と栄養素のリサイクル機構の両面から植物の生長に深く関わる「老化葉における CO₂ 固定酵素、Rubisco の分解機構」について分子レベルで明らかにすることを目的とし、特に分子遺伝学解析に焦点を絞り、ストロミュール形成変異体や Rubisco 分解抑制変異体の選抜とそれらの原因遺伝子の同定を行い、研究基盤の整備を行った。またオートファジーによる Rubisco 分解機構についてメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

I performed genetic analysis of the degradation mechanism of CO₂-fixing enzyme, Rubisco, in senescing leaves, which is closely related to plant growth through photosynthesis and nutrient recycling. I isolated mutants which show abnormal stromule formation and mutants which delay the decrease in Rubisco content during leaf senescence. In addition, I revealed the mechanism of Rubisco degradation by autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

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：Rubisco、老化、オートファジー、葉緑体

1. 研究開始当初の背景

C₃ 植物では、葉の全窒素の実に 75–80% が葉緑体に分配され、その大部分がタンパク質として主に光合成機能を担っている。中でも光合成の CO₂ 固定と光呼吸の初発反応を触

媒する Rubisco は単一タンパク質として葉の全窒素の約 30% を占めている。これまでの多くの研究から葉の最大光合成ポテンシャルは Rubisco 含量と極めて高い正の相関関係があり、多くの局面で Rubisco が光合成の律速

段階となっていることが明らかにされている。一方で、**Rubisco** を含めた多くの葉緑体ストロマトンパク質は葉の老化初期から中期にかけて盛んに分解され、それらを構成していた窒素は生長部位へ転流し再利用され、最終的には子実に蓄えられ次世代へと引き継がれる。植物にとってこのリサイクルシステムは土壌に不足しがちな窒素を有効利用し、生長の恒常性を確保するための重要な機構であると考えられる。しかし、**Rubisco** の分解は必然的に光合成能力の低下、ひいては乾物生産、子実収量の減少につながるため、農学的見地からはマイナス要因となる局面がある。このような背景があり、かつ多くの研究者が注目しているにもかかわらず、葉の老化時に **Rubisco** が一体どのような制御のもとに、どのようなメカニズムで分解されているのかについては、未だにその全体像は明らかにされていない。

研究代表者は先に老化葉における **Rubisco** の細胞内局在性について免疫電顕により詳細に検討した結果、**Rubisco** が葉緑体ストロマに加え、細胞質や稀に液胞内に存在する直径 0.4–1.2 μm の小胞にも存在することを発見し、この小胞を **Rubisco-containing body (RCB)** と名付けた。種々の形態学的な特徴から、申請者は葉緑体の一部分が本体から切り離され、小胞としてオートファジー様の機構により液胞に輸送、分解される経路 (**RCB 経路**) の存在を提唱した。また葉緑体ストロマにターゲットされる緑色蛍光タンパク質、**GFP** や赤色蛍光タンパク質、**DsRed** を発現するシロイヌナズナ形質転換体を用いて、**RCB** の生きた細胞内での可視化法を確立した。

2. 研究の目的

Rubisco 分解のメカニズムを明らかにするためには多角的なアプローチが必要であるが、本研究では特に分子遺伝学的な解析に焦点を絞り、その中核となる変異体の選抜や原因遺伝子の同定を中心に行うことを目的とした。具体的には、葉緑体から **RCB** が形成される過程に関わる分子実体、オートファジー (**ATG** 遺伝子) に依存しない葉緑体内の **Rubisco** 分解システム、**Rubisco** 分解に関わる複数の分解システムを制御する因子、これらの特定につながる特徴ある変異体の獲得である。

3. 研究の方法

(1) ストロミュール形成変異体の選抜

35S プロモーター制御下で葉緑体移行 **GFP** を発現する形質転換体の種子をアルキル化剤、**EMS** で処理し、化学的突然変異を誘起させ、次世代 (**M2**) の植物体を用いて変異体の選抜を行った。ストロミュールは光合成

を活発に行う葉肉細胞の葉緑体ではあまり見られず、表皮や胚軸、その他の非緑色組織で多く見られる。そこで **M2** 種子を **MS** 培地下、暗所で 4 日間置いて得られる芽生えの胚軸を材料とし、蛍光顕微鏡下でストロミュールが全く、あるいはほとんど見られないもの、逆に形成が著しく促進される変異体を選抜した。得られた変異体については、順次親株との戻し交配、異なるエコタイプとの交配を行った。

(2) **Rubisco** 分解抑制変異体の選抜

選抜に先立ち、老化時に **Rubisco** 量が減少しない変異体を分離するため、定量的な選抜法を確立させた。まず、**Rubisco** スモールサブユニット (**RBCS**) のプロモーター領域と翻訳領域を含むゲノム断片に終始コドンの 1 つ手前の位置で **GFP** を連結し、バイナリーベクターに組み込んだ。このコンストラクトを用いて **RBCS-GFP** 量が Native な **Rubisco** 量と同レベルで発現する形質転換体を作成した。(1) と同じ方法で突然変異を誘起させた **M2** 種子を得た後、**M2** 植物の老化葉を用いて **Rubisco** が残存する変異体の選抜を行った。**Rubisco-GFP** 量の定量は蛍光イメージングシステムにより非破壊的に行った。

分離した変異体と異なるエコタイプの交配により得られた **F2** 集団を材料に、既に整備されている **PCR** ベースの分子マーカー

(**CAPS**, **SSLP**) を利用し、突然変異のマッピングを行った。マップされた領域についてデータベースの予想遺伝子やアノテーションを参照し、変異が期待される遺伝子から順次塩基配列を読み、原因遺伝子を特定した。

(3) オートファジーによる **Rubisco** 分解先に確立した **RCB** の可視化法をオートファジー遺伝子の欠損変異体に適用し、変異体における **RCB** の有無を精査した。

4. 研究成果

(1) ストロミュール形成変異体の選抜

計 20000 個体の **M2** 植物のスクリーニングを終え、ストロミュールがほとんど見られない 1 系統 (計 4 アリル) と形成が促進される 1 系統 (1 アリル) を得た。これらについて、変異遺伝子の同定を行った。ストロミュールがほとんど見られない 1 系統では糖代謝に関わる遺伝子の 1 つに変異が見つかった。またストロミュールの形成が促進される変異体では第 3 染色体にある機能未知の遺伝子に変異が見つかった。

(2) **Rubisco** 分解抑制変異体の選抜

老化時に **Rubisco** 量が減少しない変異体を分離するため、定量的な選抜法を確立した。**Rubisco** スモールサブユニット (**RBCS**) のプロモーターで制御された **RBCS-GFP** を発現する形質転換体を作成した。(1) と同じ方法で突然変異を誘起させた **M2** 種子を得た後、

M2 植物の老化葉を用いて Rubisco が残存する変異体の選抜を蛍光イメージングシステムにより非破壊的に行った。当該変異体数個体を得たが、原因遺伝子の特定までには至らなかった。

(3) オートファジーによる Rubisco 分解
オートファジー遺伝子の欠損変異体を用いた逆遺伝学解析から、Rubisco が小胞 RCB を介してオートファジーにより液胞に輸送分解されていることを明らかにした。

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 8 件)

1. Nakano, R., Ishida, H., Kobayashi, M., Makino, A., Mae, T. Biochemical changes associated with in vivo RbcL fragmentation by reactive oxygen species under chilling-light conditions. *Plant Biol.*, 12: 35-45 (2010) (査読有)

2. Wada S., Ishida, H. Chloroplasts autophagy during senescence of individually darkened leaves. *Plant Signal Behav.*, 4: 565-567 (2009) (査読有)

3. Ishida, H., Wada, S. Autophagy of whole and partial chloroplasts in individually darkened leaves: a unique system in plants? *Autophagy*, 5: 736-737 (2009) (査読有)

4. Ishida, H., Yoshimoto, K. Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy*, 4: 961-962 (2008) (査読有)

5. Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., Makino, A. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.*, 149: 885-893 (2009). (査読有)

6. Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R., Mae, T. Mobilization of Rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.*, 148: 142-155 (2008). (査読有)

7. 石田 宏幸、和田 慎也 「葉緑体タンパク質の分解とオートファジー」 光合成研究、

53: 89-94 (2008) (査読なし)

8. Makino, A., Ishida, H. Rubisco and photosynthesis in cereal crops. *Tohoku Journal of Agricultural Research.* 58: 127-135 (2008) (査読なし)

[学会発表] (計 9 件)

1. 泉 正範、石田 宏幸、牧野 周、シロイヌナズナ切離葉における栄養要因がRCBの形成に及ぼす影響の解析、日本植物生理学会、2010年3月20日、熊本大学

2. Yoshimoto, K., Ishida, H., Wada, S., Ohsumi, Y., Shirasu, K. The role of autophagy in nutrient starvation and aging. 5th International Symposium on Autophagy、2009年9月24日、大津

3. Izumi, M., Ishida, H., Makino, A. The analysis of factors affecting the creation of Rubisco-containing bodies(RCBs), a specific autophagic process for chloroplast degradation in plants. 5th International Symposium on Autophagy、2009年9月24日、大津

4. Wada, S., Ishida, H., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Makino, A. The chloroplast degradation in two different pathways in individually darkened leaves of Arabidopsis by autophagy. 5th International Symposium on Autophagy、ポスター、2009年9月24日、大津

5. 泉 正範、石田 宏幸、牧野 周、シロイヌナズナ切離葉における栄養要因がRCBの形成に及ぼす影響の解析、日本土壌肥料学会、2009年9月15日、京都大学

6. 泉 正範、石田 宏幸、牧野 周、シロイヌナズナの切離葉におけるRCBの形成に影響を及ぼす要因の解析、日本植物生理学会、2009年3月22日、名古屋大学

7. 和田 慎也、石田 宏幸、他、シロイヌナズナ個別暗処理葉におけるオートファジーに依存した葉緑体の分解、日本植物生理学会、2009年3月22日、名古屋大学

8. 泉 正範、石田 宏幸、牧野 周、膜小胞RCBを介した液胞におけるRubiscoの分解、日本土壌肥料学会、2008年9月9日、名古屋市立大学

9. 和田 慎也、石田 宏幸、他、シロイヌナズナの個葉・個体暗処理による老化誘導とオートファ

ジーによる葉緑体分解、日本土壌肥料学会、2008年9月9日、名古屋市立大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 宏幸 (ISHIDA HIROYUKI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：60312625

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：