

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02089

研究課題名（和文）二酸化炭素固定化酵素Rubiscoの酸化失活・分解の生理生態学的意義の再定義

研究課題名（英文）Redefining the physiological and ecological significance of the oxidative inactivation and degradation of CO₂-fixing enzyme, Rubisco.

研究代表者

島田 裕士（Shimada, Hiroshi）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・准教授

研究者番号：80301175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、作物の生産性や窒素利用効率に対するRubisco酸化の影響を調査しました。実験により、Rubiscoの還元活性化率が日中に高まり夕方に低下することが確認され、これが窒素利用効率に関連する可能性が示されました。トマトやイチゴなどの光合成活性の日変化も調べ、CO₂濃度による影響を明らかにしました。さらに、新たなガス交換測定技術を開発し、より正確な光合成評価を可能にしました。本研究の成果は、作物の効率的な栽培方法の確立に貢献します。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、Rubisco酸化が作物の生産性と窒素利用効率に与える影響を明らかにし、農業生産の効率化に寄与する学術的・社会的意義を持ちます。Rubisco酸化が光合成能力および窒素利用効率に直接影響を与えることを実証し、作物の生産性向上のための新たな育種戦略の開発に貢献します。また、効率的なガス交換測定技術の開発により、光合成活性の正確な評価が可能となり、植物の生育環境に応じた管理方法の改善が期待されます。これらの成果は、持続可能な農業の実現や食糧生産の増加に向けた基盤を提供し、世界の食糧安全保障に貢献するものです。

研究成果の概要（英文）：We examined how Rubisco oxidation affects crop productivity and nitrogen use efficiency. Our results indicated Rubisco activation rates in field crops often fell below optimal levels, peaking in the morning and declining by evening. Diurnal variation in photosynthesis in tomato and strawberry showed a decrease in V_{cmax} , especially in afternoon and under high CO₂, suggesting the influence of Rubisco oxidation. Adjustment of rice nitrogen fertilization increased nitrogen uptake and biomass without affecting leaf nitrogen content, indicating that photosynthetic function was stable. The effect of gene expression on rice photosynthesis was examined, and rice plants overexpressing BSD2 did not show an increase in biomass, suggesting the possibility of reduced sink capacity. Furthermore, a precise gas exchange measurement technique was developed to enhance the evaluation of Rubisco activity under stress conditions and to enable continuous gas exchange measurements under natural conditions.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：Rubisco 光合成 酸化還元 酸化ストレス ガス交換 日変化 ダウンレギュレーション

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

2015年において73億人の世界人口は、2050年までには90億人を突破すると予想されている。それに伴う世界規模での食糧危機は、作物生産にさらなる収量増大と安定化を迫っている。更にCOP21による宣言では、世界共通の長期目標として地球平均気温上昇を抑える努力追求が挙げられており、CO₂を含む温室効果ガスの排出削減が求められている。植物の光合成はCO₂の吸収源かつバイオマス生産の源であり、光合成能力の増強は上記問題解決方法の一つと考えられる。光合成には多くの律速段階が有り、光合成の光エネルギー変換効率はずか数パーセントであり、このことは光合成の効率を上昇させる理論的余地が多く残っていることを示している。

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)は植物の光合成においてCO₂を固定する光合成の律速酵素の一つで、植物のバイオマスを決定する重要な働きを担っている。Rubiscoは還元状態では酵素活性を有しているが、酸化状態ではRubiscoのCys残基間でジスルフィド結合を形成し失活する事が報告されている。申請者は先行研究において、非ストレス条件下で生育している野生型シロイヌナズナの緑葉において、ジスルフィド結合を形成している酸化失活状態のRubiscoは全体の約20%であることを示した(*Plant J.* (2020) 102: 129-37)。このことは植物体内全Rubiscoの80%しか機能していないことを示している。一方、自然界では光ストレスに加え干ばつや温度ストレスが光合成電子伝達系やカルビンサイクル、気孔によるCO₂供給などが複合的に作用するため、自然環境で生育している植物では、より多くのRubiscoがダイナミックに酸化失活していると予想される。Rubiscoはその触媒速度が極端に遅く($K_{cat}=3\text{ sec}^{-1}$)、それを保証するためにC3植物では全窒素の約30%をRubiscoに投資している。進化における植物の成長戦略を考えると光合成器官である緑葉では全てのRubiscoが還元活性型であるほうが有利であると考えられるにも関わらず一部のRubiscoが酸化失活状態である理由は不明である。また、老化の始まった葉ではRubiscoは酸化とその結果生じる構造変化で分解が促進される。Rubisco分解は植物において重要な窒素転流源となると考えられている。しかし、我々が論文報告したBSD2高発現シロイヌナズナは酸化失活Rubiscoの割合がほぼゼロにも関わらず植物地上部の乾燥重量の増加とともに収穫種子量が増加しており、成長で不利となる現象は観察されていない。これらのことから、これまで言われていたRubiscoの酸化分解の生理的意義が正しいのか再検証が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Rubisco酸化が作物の生産性や窒素利用効率に与える影響を解明することであった。シロイヌナズナでBSD2を高発現させると、Rubiscoの還元活性化率が増加し、光合成のin vivo活性およびバイオマス生産が向上した。本研究では、作物種においても同様に還元活性化率が光合成活性や光合成を律速しているのか(そもそも自然条件において光合成活性が短期的に変動するのか)調査をおこない、作物の窒素利用の観点から考察した。

上記の目的を達成するためにRubiscoの酸化還元状態および光合成の活性状態(ここでは、Rubiscoの最大カルボキシル化速度(V_{cmax})を指す)の評価が重要である。葉のガス交換から V_{cmax} をin vivo測定できるため、ガス交換測定は自然環境でのRubisco活性評価には欠かせない。本研究では光合成活性の日変化を調査するために、ガス交換測定による迅速な V_{cmax} 測定技術を導入した。その際、二つの課題が見つかった。一つ目は、気孔が閉じてくると葉内CO₂濃度(C_i)が過大評価された。ガス交換測定で計算される C_i は V_{cmax} の測定に用いられており、 C_i が過大評価されると V_{cmax} を正確に評価できない。二つ目は、多検体測定が困難なため時系列解析が制限された。前者はガス交換モデルの問題であり、後者は測定デバイスの問題である。そこで、より頑健な光合成活性評価の為にガス交換測定技術を開発した。本研究では、ガス交換モデルの問題に対処できるよう既存のLI-6800を改良した。また、連続測定のアプリケーションに適した新たなガス交換測定原理を開発した。

3. 研究の方法

実験1. 圃場での数種作物のRubisco還元活性化率の日変化

前述のBSD2高発現によってRubiscoの酸化還元状態が変化したシロイヌナズナの栽培は、一定の環境(光強度、温湿度)に制御されたグローブチャンパーでおこなわれた。そこで、本実験では、他の作物種や自然条件においてもRubiscoの酸化活性状態が光合成のin vivo活性に影響するのかを調査した。広島大学東広島植物園圃場で栽培されたトマト、ダイズ、オクラ、トウモロコシ、ソルガムを対象に、夏季晴天時の朝(8時)、昼(12時)、夕(16時)に上位展開葉、中位葉、下位葉からそれぞれリーフディスクをサンプリングした。還元剤(DTT)添加または無添加のサンプル抽出液についてRubiscoのin vitro活性をそれぞれ測定し、それらの活性比率からRubiscoの還元活性化率を算出した。

実験2. 農業ハウスでの数種作物の光合成活性の日変化

実験1ではRubiscoのin vivo活性を評価していなかった。これは、ガス交換測定による V_{cmax} 評価(A-Ciカーブ測定)には1サンプル30分~1時間ほどを要すること、また、圃場では外部環境の変動が測定に影響することから、多検体測定が困難なためであった。そこで、農業ハウス2棟

(うち一棟は CO₂ 施肥)で栽培されるトマト、イチゴ、パプリカ、ヒロシマナ、バナナを対象に、ダイナミックガス交換測定技術(DAT)を搭載したガス交換測定装置 LI-6800 を用いて、迅速な A-Ci カーブ測定法(RaCir)により Vcmax の日変化を調査した。

実験3. 窒素施肥量の異なるイネの光合成日変化

光合成活性と窒素利用効率の関係を調査するために、窒素施用量の異なる区画で栽培されるイネを対象に調査をおこなった。ガス交換測定が困難であったため、クロロフィル蛍光測定法により主茎の最上位展開葉について測定時の日射条件において光化学系 II の光化学反応への量子収率(ϕ_{II})、非光化学消光への熱放散(ϕ_{NPQ})、その他エネルギー損失(ϕ_{ND})日変化および SPAD を測定した。

実験4. BSD2 高発現がイネの光合成活性や成長および収量に与える影響

BSD2 高発現によってイネ(cv. 日本晴)の光合成活性や収量が増加するのかを確かめるために、岡山大学資源植物研究所内ガラス温室でポット栽培された BSD2 高発現イネを対象にガス交換特性や収穫調査をおこなった。比較対象として遺伝子組換えでない日本晴(対象イネ)に加え、CYO1 高発現イネを用いた。CYO1 は、BSD2 と同じく葉緑体に局在するタンパク質ジスルフィド還元活性を持つ酵素をコードしている。また、チラコイドのアッセンブリに關与しており、CYO1 高発現イネでは機能的な stay-green 表現型を示すことがこれまでの研究で明らかになっている。葉のガス交換測定は最高分げつ期と出穂期の 2 回おこない、最高分げつ期では最上位展開葉、出穂期の測定では止葉から第4葉までを対象とした。RuBP カルボキシル化が律速する低 CO₂ 濃度条件(Ci<20ppm および Ci=150ppm)、栽培大気条件(Ca=400ppm)、RuBP 再生産が律速する高 CO₂ 濃度条件(Ci=1000 ppm)にて各ガス交換パラメータを測定し、低 CO₂ 濃度条件の測定結果から A/Ci 初期勾配(≒Vcmax)を算出した。

実験5. LI-6800×Ci 直接測定システムの検証

ストレス等で葉が気孔を閉じると、一般的なガス交換モデルのいくつかの仮定が崩れるために、気孔コンダクタンスが過大評価される。その結果、Ci は過大評価され、Vcmax は実際よりも小さく見積もられる。実際、実験2において気孔コンダクタンスが低かったバナナのいくつかの葉では Vcmax を測定できなかった。この問題を回避する為に、Ci を直接測定できるシステムを LI-6800 に組み込んだ。本システムでは、ガス交換測定される葉面の反対側で同時に Ci が直接測定される。実験には両面気孔性のヒマワリを用い、定常状態での CO₂ 応答と光応答を測定した。さらに、過大評価の特徴と原因を解析するために、仮定を含まない直接測定を用いてガス交換モデルを記述しなおし、一般的なガス交換モデルによる結果と比較した。

実験6. 新規ガス交換測定法の開発

変動する自然環境で光合成活性の変化を解析するには継続的な測定が必要だが、LI-6800 などの既存デバイスは大型かつ高価で多検体の連続測定には不向きである。その理由の一つに、測定原理(オープンフロー法)に伴うデバイス構成要素の多さや複雑さがあげられる。そこで、連続測定に適した簡易な測定原理(オープンディフュージョン法)を開発した。オープンディフュージョン法では、葉面と大気をガス透過膜で区切ってつくられる空間と大気の CO₂ 濃度差及び水蒸気濃度差とガス透過膜の拡散コンダクタンスから同化速度(A)と蒸散速度(E)がそれぞれ計測される。片面気孔性のブドウ、レモン、サクランボと両面気孔性のイチゴ、ヒマワリを用いて、定常状態での CO₂ 応答、光応答を測定し、開発した測定法を検証した。オープンディフュージョン法による測定システムを LI-6800 に組み込み、同じ葉面サンプルで同時に測定された A および E を比較した。

4. 研究成果

(1) Rubisco 酸化が作物の生産性や窒素利用効率に与える影響

実験1. 圃場での数種作物の Rubisco 還元活性化率の日変化

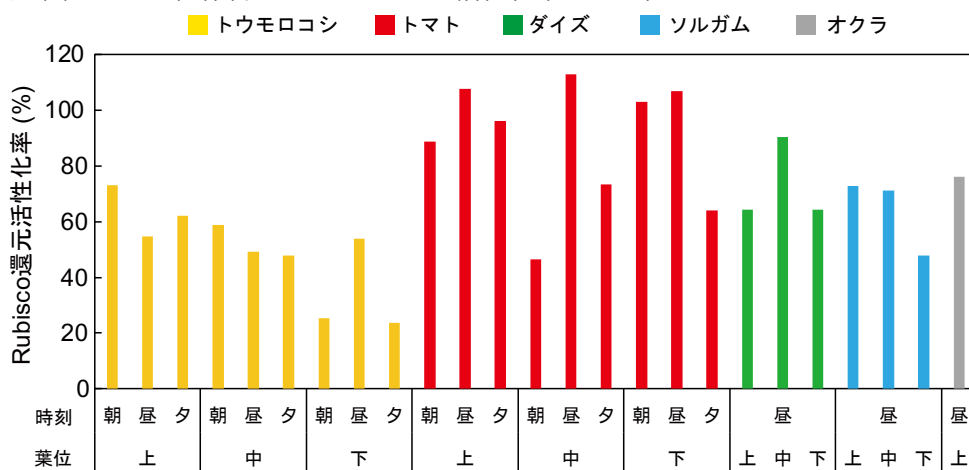


図1. 圃場作物の Rubisco 還元活性化率の日変化

圃場作物の Rubisco 還元活性化率は、多くの場合、グロースチャンバーで栽培したシロイヌナズナ野生型で観察された 85% を下回っていた。上位葉で Rubisco 還元活性化率は朝から正午にかけて

最も高く、夕方に低下した。下位老化葉ほど還元活性化率が低下していることから、Rubisco 還元活性化率の低下が Rubisco 分解に参与している可能性を示唆しており、Rubisco の失活・分解を介して窒素利用効率に影響を与えている可能性を支持している。

実験2. 農業ハウスでの数種作物の光合成活性の日変化

通常、A-Ci カーブ測定は雰囲気 CO₂ 濃度を段階的に変化させ、各濃度における定常状態でおこなわれる為、1 サンプルに要する時間が長くなる。一方、RaCir では CO₂ 濃度を一定の速さ(ランプ速度)で変化させながらの非定常状態でおこなわれるため、CO₂ のレンジにもよるが 1 サンプル当たり 5~10 分で測定が完了する。CO₂ 濃度を 50ppm から高濃度(>1000ppm)まで異なるランプ速度でトマトとイチゴの A-Ci カーブ測定を行ったところ、ランプ速度が高くなるにつれて A-Ci カーブの変曲点(律速段階の転換点)からダイナミックな TPU 律速が観察された。その為、ダイナミックな TPU 律速が起こらない最大のランプ速度(150~200ppm/min)で V_{cmax} の日変化を測定した。

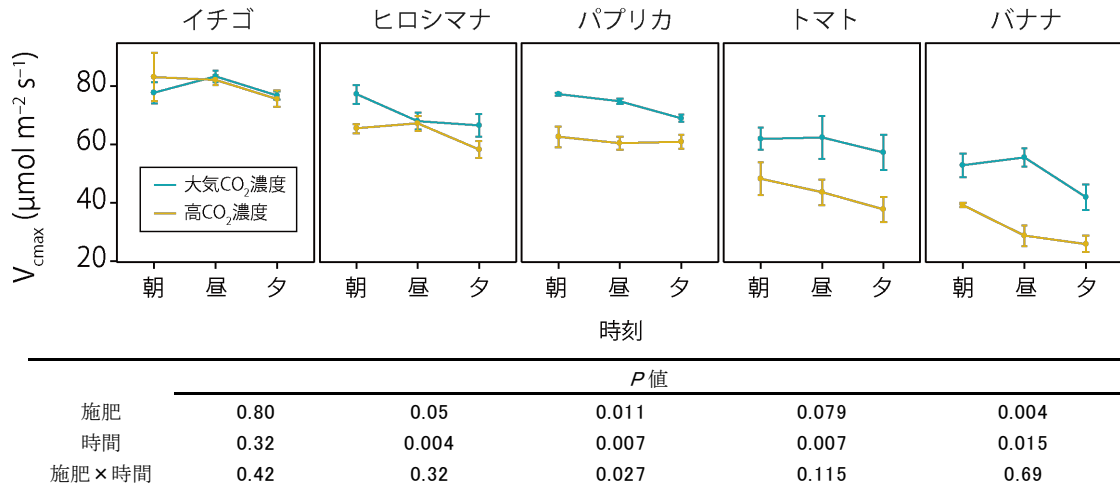


図2. 園芸作物の V_{cmax} の日変化. 表は種ごとの ANOVA における P 値を示す。

イチゴを除き、全ての種で V_{cmax} は午後に低下した(図2)。この傾向は、実験1での Rubisco 還元活性化率の日変化とも一致しており、午後の V_{cmax} に Rubisco の酸化が関与する可能性がある。高 CO₂ 濃度条件でも同様の低下が見られ、大気条件に比べると V_{cmax} は低下した。また、通常の大気 CO₂ 濃度条件に比べ高 CO₂ 濃度条件で V_{cmax} が低下したトマトとパプリカでは葉身の窒素含量(葉面積ベース)がそれぞれ 23%と 13%低下していた。午後の V_{cmax} 低下と高 CO₂ 濃度順化による V_{cmax} 低下にはともに種間差が見られ、これらの違いに Rubisco 酸化が関与している可能性がある。

実験3. 窒素施肥量の異なるイネの光合成日変化

株あたりの窒素吸収量や地上部バイオマス、LAI は窒素施用量に応じて増加し、やがて飽和したが、葉身の窒素含量(乾物重ベース)では施肥区間で差が見られなかった。同様に、施肥区間でφII 日変化の光強度依存性や SPAD に違いはなく、LAI は低下していたが葉面積当たりの光合成機能(光合成の窒素利用効率)は低下していなかったと推察された。

実験4. BSD2 高発現がイネの光合成活性や成長および収量に与える影響

BSD2 高発現イネと CYO1 高発現イネの草丈は対象イネと同等だったが、CYO1 高発現イネの分げつ数は対象イネに比べて約 1.5 倍増加した。BSD2 高発現イネでは最高分げつ期と出穂期ともに A/Ci 初期勾配の上昇は確認されず(図3)、バイオマスも増加しなかった(表1)。また、千粒重が 42%減少しており、登熟期の充実過程における阻害が示唆された。興味深いことに、CYO1 高発現イネでは分げつ数増加にともない地上部バイオマスが 22%増加しており、一株穂数も約 1.4 倍に増加していた(表1)。一方で、出穂期における止葉と第 2 葉の V_{cmax} や栽培 CO₂ 濃度条件における A は低下しており(図3)、ソース/シンク・バランスが低下したことで登熟歩合の低下が起こったと考えられる(表 1)。以上のように、シロイヌナズナで観察された BSD 高発現によるソース能向上はイネでは確認されず、シンク能が低下する結果となった。

表1. OsBSD2ox と OsCYO1ox の収量構成要素

	出穂日 数	地上部乾燥 重 (g/株)	一株穂 数	一穂籾 数	登熟歩 合 (%)	千粒重 (g)	玄米収 量 (g)
OsBSD2ox	63	45.4	13.8	53.4	45.5	11.8**	3.8
日本晴	64	42.8	12.6	57.9	38.5	20.2	6.0
OsCYO1	65	52.4*	17.2***	46.0*	20.2**	19.7	3.3

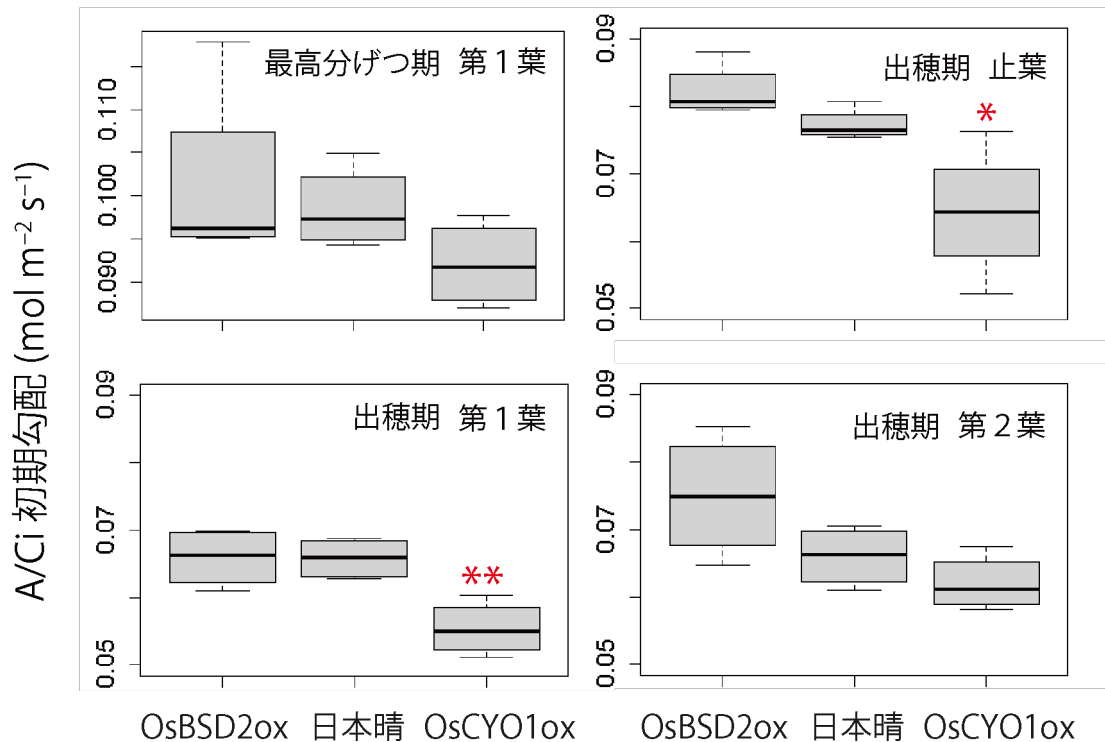


図3. BSD2 高発現イネ(OsBSD2ox)と CYO1 高発現イネ(OsCYO1ox)の A/Ci 初期勾配. *: P 値 < 0.05 , **: P 値 < 0.01 (t 検定)を示す。

(2)より頑健な光合成活性評価の為のガス交換測定技術を開発

実験5. LI-6800×Ci 直接測定システムの検証

ヒマワリの CO₂ 応答と光応答において、光応答測定の際の暗黒を除き、Ci の計算値と直接測定値はよく一致していた。暗黒で気孔コンダクタンスが低下する際には、一般的なガス交換モデルの気孔コンダクタンスは大きく見積もられていた。直接測定との比較から、気孔コンダクタンスの過大評価はクチクラコンダクタンスによることが明らかとなった。さらに、気孔が開いている場合には気孔コンダクタンスが小さく見積もられていることが明らかとなり、葉内湿度の不飽和が示唆された。Rubisco 活性が低下するようなストレス条件において、これらの不確定要素はより顕著になることが予想される。従って、本融合システムを用いることで Rubisco の活性低下をより正確に評価できると期待される。

実験6. 新規ガス交換測定法の開発

片面気孔性葉と両面気孔性葉ともに、オープンディフュージョン法とオープンフロー法で測定した光合成と蒸散の CO₂ 応答と光応答はどれもよく一致していた。既存のオープンフロー法では植物に CO₂ や空気を供給する必要があり、測定環境を安定させるために装置が複雑で大きい。新規オープンディフュージョン法では、ガス透過膜を介して植物-大気間をガス分子が直接移動するため、CO₂ や空気の供給を必要としない。また、装置の構成がシンプルなので小型化できる。従って、自然環境での継続的なガス交換測定に適しており、光合成活性の高時間分解能での解析に応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogo Yuto, Takemura Miho, Sakamoto Atsushi, Misawa Norihiko, Shimada Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Orange protein, phytoene synthase regulator, has protein disulfide reductase activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592324.2022.2072094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tominaga Jun, Kawamitsu Yoshinobu	4. 巻 1
2. 論文標題 Combined leaf gas-exchange system for model assessment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erae081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩坂凧紗, 富永淳, 高橋俊一, 佐藤綾人, 木下俊則, 坂本敦, 島田裕士
2. 発表標題 ハイスループット光合成測定装置の開発
3. 学会等名 第13回日本光合成学会年会およびシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuta Takeuchi, Hiroshi Shimada and Atsushi Sakamoto
2. 発表標題 Physiological roles of two allantoin synthase variants, produced by alternative splicing and differing in subcellular localization.
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yutong Song, Tayebeh Abedi, Yuma Mitsuzono, Hiroshi Shimada and Atsushi Sakamoto
2. 発表標題 GBL18, an Arabidopsis enzyme required for quick ABA production, contributes to early transcriptomic responses to drought stress.
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 富永淳
2. 発表標題 作物のバイタルセンシングに適した新規ガス交換測定法の開発
3. 学会等名 作物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩坂凧紗, 富永淳, 高橋俊一, 佐藤綾人, 木下俊則, 坂本敦, 島田裕士
2. 発表標題 ハイスループット光合成活性測定装置の開発
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永淳, Joseph Stinziano, David Hanson
2. 発表標題 気孔がある葉面でのクチクラコンダクタンス推定
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永淳, 川満芳信, Joseph Stinziano, David Hanson
2. 発表標題 葉内CO2濃度の直接測定：気孔面のクチクラコンダクタンス測定法の開発
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 生体情報測定器及び生体情報の測定方法	発明者 富永 淳	権利者 広島大学
産業財産権の種類、番号 特許、2023-013278	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 生体の水ストレス診断方法	発明者 富永 淳	権利者 広島大学
産業財産権の種類、番号 特許、2023-177144	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富永 淳 (Tominaga Jun) (20788632)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・助教 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------