

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19059

研究課題名（和文）方法的限界の打破から挑む、かつてない多様な植物種からの優れたRubiscoの発掘

研究課題名（英文）Screening for superior Rubisco from various plant species via improvement of its methodology

研究代表者

鈴木 雄二（Suzuki, Yuji）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80374974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では広い植物種を対象とし、酵素的特性が優れた光合成炭酸固定酵素Rubiscoを探索した。まず、葉内の夾雑物による悪影響を防ぎ、広い植物種に適用可能なサンプル調製方法を開発した。次いで、Rubiscoの酵素的特性を、高山植物を含む低温耐性植物、これまでに知見の少ないシダ植物や針葉樹等を対象とし調べた。残念ながら優れたRubiscoは発掘できなかったが、トクサ等はC4植物並みの高比活性Rubiscoを多量に有し、ヒカゲノカズラ類ではRubiscoの存在量が極めて少ないという新たな知見を得た。これらの植物の祖先が高CO2環境下で進化・多様化したことが、その原因となっていると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最終的な目的は果たせなかったが、Rubiscoの活性測定が可能な植物種を広げたという技術的進展は、今後のRubiscoの高性能化を介した光合成能力強化の研究にとって大きなプラスとなる。また、本研究で得られたRubiscoの特性に関する知見は、これまでの光合成研究の常識を覆すものであり、学術的な価値が高い。さらに、これらの原因を植物の進化の過程に関連付けて議論できたため、広い範囲の植物科学にとってインパクトを与えることができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, photosynthetic carbon fixing enzyme Rubisco with superior enzymatic properties was screened from various plant species via improvement of its methodology. Firstly, a sample preparation method that prevented the maleffects caused by leaf content was developed to expand the range of plant species whose Rubisco activity could be measured. Then, superior Rubisco was screened from plants tolerant to cold stress including alpine plants and evolutionary old plants including ferns and conifers. Although superior Rubisco could not be found, some surprising findings were obtained. For example, some horsetails had abundant Rubisco with high catalytic turnover rates comparable to those in C4 plants. Some club mosses had Rubisco fairly less than expected from their catalytic turnover rates. The elevated atmospheric CO2 environments when the ancestors of these plants diverged or diversified possibly led to such Rubisco properties, which were inherited to these plants.

研究分野：植物栄養学

キーワード：Rubisco 酵素的特性 スクリーニング 野生植物 実験系の改良

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Rubisco は光合成炭素代謝を担うカルビンベンソンサイクルにおいて、その初発反応である炭酸固定反応を担う。Rubisco の炭酸固定反応の触媒速度は極めて遅いため、Rubisco の能力は光合成の律速因子となり、植物の生産性に直接的に影響する。このため、Rubisco の「高性能化」は、光合成及びバイオマス生産性改良のターゲットとなっている。

Rubisco の高性能化に関しては、モデルケースとなる優れた Rubisco を自然界から探索するという手法が今も主流にあり、世界の多くの研究者が取り組んでいる。高性能な Rubisco とは、例えば炭酸固定反応の代謝回転数 k_{cat}^c が高いとともに、 CO_2 への親和性が高いものである。しかし、既知の Rubisco にはこのような性質を満たすものではなく、 k_{cat}^c と CO_2 親和性の間にはトレードオフの関係がみられている。また、Rubisco の酵素的特性と存在量との関係において、 k_{cat}^c の高い Rubisco ほど存在量が少ないという関係もみられている。

高性能な Rubisco が見出されていない一因は、Rubisco の活性測定が葉に含まれる物質により容易に妨害されるため、測定可能な植物種が極めて限られていることにある。これまでにデータが得られている植物種は全体の 0.2% に満たないと言われている。このため、高性能な Rubisco を見出すためには、より広い植物種における Rubisco 活性測定を可能にするような、サンプル調製法の開発が必須であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、新しいサンプル調製法を開発することでこの方法的限界を打破し、かつてない多様な植物種から優れた Rubisco の発掘を試みることにした。対象となる植物種として、強いストレス環境に適応した植物種を想定した。例えば、低温環境下で生育可能なものや高山植物である。また、これまでに知見が皆無であった、シダ植物や針葉樹も対象とすることとした。さらに、高 k_{cat}^c 型 Rubisco ほど存在量が少ないという関係性が広い植物種においても成り立つかも検証することとした。Rubisco の量の指標として、葉の全窒素に占める Rubisco への投資割合を示す、Rubisco 態窒素/全窒素比を用いることにした。高性能 Rubisco の候補を見出した場合、遺伝子配列を解析し、高性能 Rubisco の特徴となるアミノ酸モチーフを検索することも予定した。

3. 研究の方法

(1) サンプル調製法の開発

基本となる抽出緩衝液は Galmés et al. (2014, 引用文献) のものを用い、種々の添加剤を加え検討したところ、最終的には、ポリビニルピロリドン(PVPP)を緩衝液の 5% (w/v) 加えたものとなった。葉は個体に着生した状態で、あるいは切離して小型人工気象器内で、強光を 30 分以上照射した後、ただちに液体窒素で凍結した。凍結した葉を素早く前述の緩衝液中で冷却しつつ磨砕した。その遠心上清にポリエチレングリコール 4000 (PEG 4000) を加えて Rubisco を沈殿させ (Hall et al. 1978, 引用文献)、活性測定用の緩衝液で溶解した後脱塩し、Rubisco の炭酸固定活性の測定に供した。なお、サンプル調製法の開発は、夾雑物を多く含む粗抽出液の粘性が高いスギを主に用いた。

(2) 植物材料

低温環境で生育する植物として、早春に生育するフクジュソウ、ヒメオドリコソウ等の計 9 種及び厳冬期に生育するセリ、高山植物としてコマクサ、ミヤマホタルイ、ミネハリイ、シダ植物としてオオトクサ、トクサ等の計 9 種、針葉樹としてドイツトウヒ等の計 5 種を用いた。高山植物については環境省東北地方環境事務所及び森林管理署の許可を得て採取した。対照植物としては、 C_3 植物のイネ、コムギ、オオムギ、ハウレンソウ、 C_4 植物のトウモロコシ、ソルガムを用いた。

(2) Rubisco の炭酸固定活性の測定

Rubisco による 3-PGA 生成と NADH 酸化をカップリングさせた吸光光度法 (Lilley and Walker 1974, 引用文献) を用い、 k_{cat}^c ($mol\ CO_2\ mol^{-1}\ Rubisco\ s^{-1}$) を求めた。同じサンプルを用い、 $NaHCO_3$ を除き約 400 ppm の CO_2 ガスで飽和した反応溶液を用いて、 CO_2 不飽和条件の炭酸固定活性 (v_{cu}) も測定し、 v_{cu}/k_{cat}^c 比を Rubisco の CO_2 への親和性の指標とした。なお、副反応である酸素化反応の活性が低い Rubisco のスクリーニングも、酸素電極を用いて行う予定であったが、測定に十分な量の Rubisco を得ることが難しい場合が多く断念した。

(3) Rubisco 態窒素/全窒素比の測定

葉を液体窒素中で石英砂と共に磨砕し粉末状とした。この粉末をリン酸緩衝液に素早く懸濁し、一部をケルダール分解後のネスラー法を用いた全窒素定量に供した。残りの懸濁液に終濃度 3% (w/v) となるようにポリビニルピロリドン 25 を加えた後、よく磨砕し、SDS 化した。SDS 化したサンプルを SDS-PAGE に供した後クマシー染色し、Rubisco のバンドに吸着したクマシーを

溶媒抽出し吸光度測定を行うことで Rubisco 定量を行った。

(4) Rubisco の推定アミノ酸配列の決定

Rubisco 大サブユニットの配列は多くの植物種でデータベースから入手可能であった。その一方で、小サブユニットの情報は限られていたため、必要に応じて新規に決定した。サンプルから total RNA を調製後逆転写し、異種植物間で遺伝子配列に共通性の極めて高い領域でプライマーを設計し、5'-RACE 及び 3'-RACE 法により 5'-UTR と開始コドン及び終止コドンと 3'-UTR を含む領域の配列をそれぞれ決定した。その後、開始コドン近傍及び終止コドン近傍に設計したプライマーを用い RT-PCR を行い、コード領域を含む増幅断片をクローニング後、配列を決定した。

4. 研究成果

(1) サンプル調製法の確立

抽出緩衝液に加える PVPP の量を変えサンプル調製を行ったところ、スギでは 20% で k_{cat}^c の値が得られた。ただし、PEG 4000 を用いた沈殿後の Rubisco を溶解したサンプルには粘性が残り、脱塩することができなかった。イネを用いて同様の試験を行ったところ、サンプルを脱塩しないと k_{cat}^c が既報の値より 20-40% 低くなり、正確な測定が不可能であった。スギのサンプルの粘性を解決する方法は残念ながら確立することはできず、極端に粘性の高いサンプルの Rubisco 活性測定は困難であった。ただし、粘性が極めて高くはないサンプルであれば、PVPP 濃度が 5% で活性測定は可能であり、この系を用いて解析を進めることとした。なお、この PVPP 濃度は原報となった引用文献 の 2 倍であった。

(2) Rubisco の CO₂ 親和性の指標としての v_{cu}/k_{cat}^c の検討 (雑誌論文 Ito et al. 2024)

C₃ 及び C₄ の対照植物で、Rubisco の CO₂ に対するミカエリス定数 K_c の既知の値と v_{cu}/k_{cat}^c との間に負の相関関係がみられた。このため、 v_{cu}/k_{cat}^c は Rubisco の CO₂ 親和性の簡易的指標として使用できることが確認できた。さらに、対照植物では k_{cat}^c と v_{cu}/k_{cat}^c との間に負の相関がみられ、 k_{cat}^c と Rubisco の CO₂ 親和性の間に負の相関関係があるという既知の関係も、 v_{cu}/k_{cat}^c を指標として再現できた。

(3) 広い植物種における Rubisco 炭酸固定反応の特性 (雑誌論文 Ito et al. 2024)

前述の植物種において調べたものの、高 k_{cat}^c 型である C₄ 植物のトウモロコシやソルガム以上に高 k_{cat}^c の Rubisco は見出すことができなかった。ただし、生きている化石と呼ばれるシダ植物のオオトクサやトクサの Rubisco は、これらの C₄ 植物に匹敵する k_{cat}^c を有していた (図 1)。CO₂ 濃縮機構を持つ植物の Rubisco は高 k_{cat}^c 型であることは知られているが、CO₂ 濃縮機構を持たないオオトクサやトクサの Rubisco が高 k_{cat}^c 型であることは驚くべきことであった。オオトクサ Rubisco の CO₂ 親和性は同等の k_{cat}^c を有するソルガムよりもやや高かったものの、オオトクサ、トクサ共に総じてトウモロコシやソルガムと同程度であった。オオトクサやトクサがこのような性質の Rubisco を有するのは、トクサ科の植物が出現した太古では大気中 CO₂ 濃度が非常に高く、高 k_{cat}^c ・低 CO₂ 親和性型の Rubisco が光合成において有利であり、このような Rubisco がオオトクサやトクサに受け継がれたためであると考えられた。

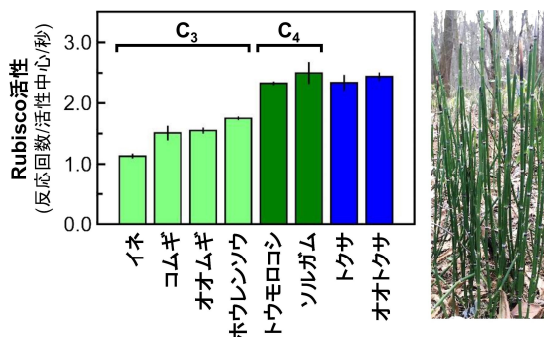


図 1. トクサ、オオトクサ、及び C₃・C₄ 対照植物の Rubisco k_{cat}^c 。

また、調べた植物種において、対照植物においてみられた k_{cat}^c と Rubisco の CO₂ 親和性の負の相関関係を大きく逸脱する Rubisco はみられなかった。ただし、シダ植物の多くでは、 k_{cat}^c から予測されるよりも Rubisco の CO₂ 親和性が低い傾向にあった。その原因は、これらの植物種が出現・多様化した時期の大気中 CO₂ 濃度が非常に高く、Rubisco の CO₂ 親和性が選択圧として働かなかったためであると考えられた。

(4) Rubisco の炭酸固定反応の特性と Rubisco の存在量の関係 (雑誌論文 Ito et al. 2024)

C₃ 及び C₄ の対照植物では、 k_{cat}^c と Rubisco 態窒素/全窒素比の間に負の相関関係があり、既知のように、高 k_{cat}^c 型の Rubisco ほど存在量が少ないという関係性が再現できた。しかし、植物種を広げると、このような関係性は必ずしも成り立たなくなった。例えば、オオトクサやトクサでは Rubisco が高 k_{cat}^c 型であるにも関わらず、Rubisco 態窒素/全窒素比は C₃ の対照植物並みであり、多量の Rubisco が存在していた。その一方で、現存するシダ植物の中で最も古いヒカゲノカズラ類では、Rubisco の k_{cat}^c は C₃ の対照植物並みである一方で、Rubisco 態窒素/全窒素比が C₄ の対照植物並みと、Rubisco の存在量が極めて少なかった。これらの理由は定かではないが、オオトクサやトクサの場合には、Rubisco が窒素の貯蔵タンパク質として働いていた可能性、ヒカゲノカズラ類の場合には、出現時の大気中 CO₂ 濃度が非常に高いため多量の Rubisco が不要であったといった可能性が考えられた。

(5) オオトクサ Rubisco の推定アミノ酸配列の他植物種との比較

高 k_{cat}^c 型であったオオトクサ Rubisco について解析を行った。大サブユニットについては非常に近縁であるトクサの配列 (YP_007374723.1, RefSeq) がデータベース上で入手可能であり、これを用いた。その結果、他のトクサ科植物のものとホモロジーが非常に高く、他のシダ植物や真正双子葉類とのホモロジーも比較的高かった。小サブユニットについては新規に cDNA 配列を決定し、推定アミノ酸配列を得た。その結果、ホモロジーが非常に高いものはデータベース上になかったが、コケ植物やシダ植物との間で比較的高かった。このように、オオトクサの Rubisco は大小のサブユニットでホモロジーの高い植物種が異なっていると考えられ、進化上非常に興味深い。なお、トクサの大サブユニットはスギナとのホモロジーが高かったが、スギナ Rubisco の酵素的特性は C_3 対照植物に近かった。このため、オオトクサやトクサの Rubisco が高 k_{cat}^c ・低 CO_2 親和性型であったのは、小サブユニットによる影響である可能性が考えられた。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、残念ながら高性能 Rubisco を見出すことはできなかったものの、Rubisco の活性測定が可能な植物種を広げることができた。このことは、今後の Rubisco の高性能化を介した光合成能力強化の研究にとって大きなプラスとなる。さらに、世界的にもこれまでに報告されていない、Rubisco の酵素的特性と存在量との関係を明らかにできたため、学術的価値は高い。さらに、これらを植物の進化と関連付けて考察することができたため、本研究は Rubisco 研究のみならず、広い範囲の植物科学に対してもインパクトを与えたものと考えられる。

(7) 今後の展望

今後も対象とする植物種を広げ、高性能 Rubisco の探索を続けていく予定である。これまでに、Rubisco の酵素的特性は、植物が適応した生育環境よりも系統的制約により決定される傾向があるとの説が提唱されているが、本研究の成果もこれを支持すると考えられる。今後の高性能 Rubisco の探索においても、この点に留意したい。なお、本研究の成果については、進化上古い植物である針葉樹やヒカゲノカズラ類に着目した論文、低温環境で生育する植物種に着目した論文の2報を、今後公表する予定である。

< 引用文献 >

- Galmés J, Kapralov MV, Andralojc PJ, Conesa MÀ, Keys AF, Parry MAJ, Flexas J, Expanding knowledge of the Rubisco kinetics variability in plant species: environmental and evolutionary trends, *Plant Cell Environ* 37, 2014, 1989–2001
- Hall NP, Tolbert NE, A rapid procedure for the isolation of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from spinach leaves, *FEBS Lett* 96, 1987, 167–169
- Lilley RM, Walker DA, An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate carboxylase. *Biochim Biophys Acta* 358, 1974, 226–229

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kana Ito, Sakiko Sugawara, Sota Kageyama, Naoki Sawaguchi, Takuro Hyotani, Shin Ichi Miyazawa, Amane Makino, Yuji Suzuki	4. 巻 137
2. 論文標題 Equisetum praealtum and E. hyemale have abundant Rubisco with a high catalytic turnover rate and low CO ₂ affinity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 255-264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-023-01514-z	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤佳菜、影山創大、宮澤真一、牧野周、鈴木雄二
2. 発表標題 早春に生育するC3草本植物におけるRubiscoのcarboxylase比活性の評価
3. 学会等名 2021年度日本土壌肥料学会東北支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 影山創大、伊藤佳菜、宮澤真一、牧野周、鈴木雄二
2. 発表標題 8種の針葉樹におけるRubiscoのcarboxylase比活性の評価
3. 学会等名 2021年度日本土壌肥料学会東北支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤佳菜、菅原早希子、宮澤真一、牧野周、鈴木雄二
2. 発表標題 シダ植物におけるRubiscoの酵素的特性の評価
3. 学会等名 2023年度日本土壌肥料学会東北支部大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手大学農学部研究紹介
<https://www.iwate-u.ac.jp/cat-research/2024/04/006170.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------