

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780047  
 研究課題名 (和文) イネ葉における *rbcS* 遺伝子の過剰発現による Rubisco 量の増強  
 研究課題名 (英文) Enhancement of Rubisco content of rice leaves by an overexpression of *rbcS*  
 研究代表者  
 鈴木 雄二 (SUZUKI YUJI)  
 東北大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：80374974

研究成果の概要：イネ葉において、光合成の鍵酵素である Rubisco の量を Rubisco の小サブユニットの遺伝子である *rbcS* を過剰発現させることで増強することに成功した。しかし、光合成速度は葉の一生を通じて改善されなかった。その要因として、成熟葉では Rubisco の酵素活性が低下していたこと、また、老化葉では Rubisco の量が増強されておらず野生型と同程度にまで低下していたことが挙げられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	0	2,700,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	240,000	3,740,000

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, *RBCS*, 過剰発現, *RBCL*, 光合成, 葉の老化, イネ

## 1. 研究開始当初の背景

Rubisco は葉緑体に局在し、光合成における CO<sub>2</sub> 同化の初発反応を担う酵素である。また、Rubisco は高等植物の葉において全窒素の 15-30% をも占める特異的に多量に存在するタンパク質であり、その量は現在の気象条件下の最大光合成速度を律速する因子となっている (Makino et al., *Planta* 174:30-38, 1988)。したがって、葉の Rubisco 量を特異的に増強することにより、個葉光合成や個体生育が改善されることが期待される。この場合、近年その重要性が訴えられている食料やバイオマスの増産に対して多大な貢献がで

きる。

Rubisco は、葉緑体ゲノムに存在する *RBCL* 遺伝子がコードする大サブユニットおよび核ゲノムに multigene family として存在する *RBCS* 遺伝子がコードする小サブユニットそれぞれ 8 つずつからなる 16 量体である。そこで申請者は、イネにおいて *RBCS* 遺伝子をセンス方向で導入し過剰発現させることで、成熟葉の Rubisco 量が野生型の 120% までに増加した形質転換体 (*RBCS* センスイネ) を得ることに成功した。

## 2. 研究の目的

本研究では、「Rubisco 量の増強が個葉光合成および個体生育へ及ぼす影響」についてまず明らかにすることとした。次いで、「*RBCS* の過剰発現による Rubisco 量増強の分子メカニズム」を Rubisco 遺伝子の mRNA 量のレベルから調べることにした。

### 3. 研究の方法

*RBCS* センスイネの作製は、イネの *RBCS* multigene family のうちの 1 分子種である *OsRBCS2* (Os12g0274700, RAP-DB) をオウンプロモーターの制御下で発現させるベクターをアグロバクテリウム法にて導入することで行った。*RBCS* センスイネおよび野生型イネを PIP 人工気象室で水耕法にて栽培した。CO<sub>2</sub> ガス交換法による光合成測定、Rubisco および窒素の定量は Makino et al. (1988) にしたがって行った。Rubisco 活性測定は酵素法により Nakano et al. (Australian Journal of Plant Physiology 27:167-173, 2000) にしたがって行った。個体生育は個体乾物重を指標として調べた。*RBCS* および *RBCL* の mRNA の定量は、total RNA を Suzuki et al. (Biotechniques 37:542, 544, 2004) にしたがって抽出したのち、RT-qPCR 法にて行った。個体生育調査以外の解析は、異なる葉位の葉を材料として行った。展開中の葉、最上位完全展開葉および下位葉は、それぞれ若い葉、成熟葉および老化葉に相当する。

### 4. 研究成果

#### (1) Rubisco 量の増強が個葉光合成および個体生育へ及ぼす影響

Rubisco 量は成熟葉である最上位完全展開葉で最大となり、形質転換体では単位葉面積あたりで野生型の 1.2 倍に増加していた。Rubisco 量は下位葉において、葉の老化に伴い徐々に減少したが、両者の間の差はなくなった(図 1)。強光および現在の大気 CO<sub>2</sub> 分圧下での光合成速度には葉位によらず差は認められなかった。最上位完全展開葉については、*RBCS* センスイネの他の系統においても同様の結果が得られた。これらのことは、イネにおいて *RBCS* の過剰発現は成熟葉における Rubisco 量を増強するが老化葉の Rubisco 量には影響を及ぼさないこと、および、葉の発達段階によらず光合成能力を改善しないことを示している。

Rubisco の活性化状態を調べたところ、最上位完全展開葉では *RBCS* センスイネが野生型を下回っていた一方で、下位葉では両者の間に差はみられなかった。このことは、*RBCS* センスイネの成熟葉で光合成能力が改善されなかったのは、Rubisco が十分に活性化されていないことが原因であることを示している。

葉内の窒素分配を調べたところ、*RBCS* セン

スイネの成熟葉では Rubisco への特異的増加が認められたと同時に、他の画分には低下が認められた。したがって、Rubisco 量が特異的に増加したことで他の光合成の反応を担う因子群の量が低下し、光合成の一連の反応においてアンバランスが生じたことで、Rubisco 活性化率が低下したと考えられた。なお、老化葉においては *RBCS* センスイネと野生型イネの両者ともに、Rubisco への窒素分配が低下し、その分だけ他の画分への分配が高くなっていった。このことは、Rubisco の能力が他の光合成因子群の能力よりも相対的に低くなっていることを示唆するものである。

個体生育には、*RBCS* センスイネと野生型との間に差は認められなかった。これは、個葉光合成に両者の間で差が認められなかったことと一致する。

以上の結果から、イネにおける *RBCS* の過剰発現は、成熟葉における Rubisco 量を増強するものの、個葉光合成速度も個体生育も改善しないことが明らかとなった。

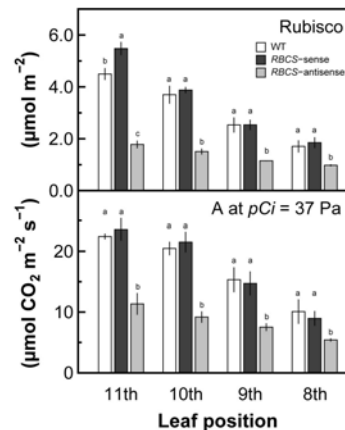


図 1. 野生型および *RBCS* センスイネの異なる葉位の葉の Rubisco 量 (上図) および光合成速度 (下図). Suzuki et al. (2009) を改変。

これまで、光合成に関与する酵素の遺伝子組換えにより葉の光合成能力を改善しようとする試みが、世界的に見ても多くなされてきているが、光合成能力を決定する要因である Rubisco 量の増強に成功した研究例は全くなかった。本研究はその世界初の成功例である。しかし、個葉光合成能力は改善されなかった。このことは、Rubisco 以外にも光合成のボトルネックとなっている因子の存在を示唆するものであり、これを増強することで光合成能力の向上を見込むことができる。この因子は、オミックス解析を駆使することで特定が可能であると強く期待される。

また、イネの老化葉においては Rubisco の能力が他の光合成関連因子の能力と比べ相対的に低くなっていたことも示唆された。このことにより、老化葉における Rubisco 量の

増強が光合成能力の改善につながると期待された。そのための戦略については後述する。

## (2) *RBCS* の過剰発現による Rubisco 量増強の分子メカニズム

Rubisco の遺伝子発現は若い葉において活発になされるが、成熟葉や老化葉においては著しく低下することが、イネにおいてこれまでに明らかになっている (Suzuki et al. *Plant, Cell and Environment* 24:1353-1360, 2001)。そこで、*RBCS* および *RBCL* の mRNA を、若い展開中の葉も含めた異なる葉位の葉を対象に調べた。

野生型イネの *RBCS* mRNA 量は過去の報告例と同様に、展開中の葉において最大となり、以降急激に低下し、下位葉においては非常に低くなっていた。*RBCS* センスイネでは導入遺伝子である *OsRBCS2* の mRNA 量が葉齢によらず野生型の 7 倍以上に増加していた一方で、他の分子種には変化が認められなかった。このため、*RBCS* センスイネの全 *RBCS* mRNA 量は、葉齢によらず野生型の 2 倍以上に増加していたが、下位葉においては野生型の最大値と比べ非常に低いものとなっていた (図 2)。

*RBCL* mRNA 量の変動は *RBCS* のそれと同様な傾向を示した。*RBCS* センスイネでは葉位によらず野生型よりも若干高くなる傾向にあったが、下位葉においては全 *RBCS* mRNA 量と同様に非常に低くなっていた。

以上の結果から、*RBCS* センスイネの若い葉では *RBCS* の過剰発現に対し *RBCL* が協調的に応答することで Rubisco 量が増加していたことが強く示唆された。その一方で、老化葉では両遺伝子間の協調的な発現は認められるものの、mRNA 量が著しく低下していたために Rubisco の生合成活性が低下していたことにより、Rubisco 量が増加していなかったものと考えられた。

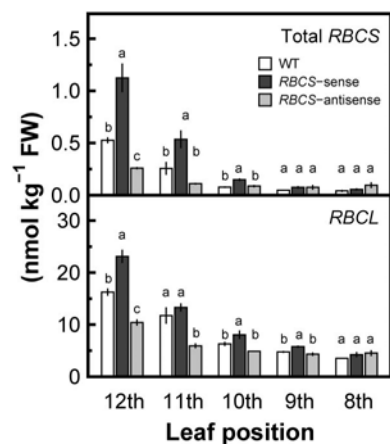


図2. 野生型および *RBCS* センスイネの異なる葉位の葉の全 *RBCS* (上図) および *RBCL* (下図) の mRNA 量. Suzuki et al. (2009) を改変.

これまでの *RBCS* の過剰発現を試みた研究例では、CaMV35S プロモーター (Valjakka et al. *Tree Physiology* 20:607-613, 2000) や トウモロコシ由来のユビキチンプロモーター (Mitchell et al. *Annals of Applied Biology* 145:209-216, 2004) が用いられていたが、十分な効果は得られていなかった。その一因として Rubisco 遺伝子を過剰発現するためにはプロモーター活性が低かったということが予想された。これに対し、本研究においては *RBCS* のオウンプロモーターを用いることで、若い葉における十分な *RBCS* mRNA 量の増加により成熟葉での Rubisco 量の増強を達成することができたと考えられた。

*RBCS* のプロモーター活性は若い葉で強い一方で老化葉では著しく弱くなるのが、*RBCS* mRNA の蓄積パターンから予想される。したがって、*RBCS* プロモーターの使用が、Rubisco 量が老化葉で増強されていなかった主な原因であると考えられた。老化葉においては Rubisco 量の増強が光合成能力の改善につながると期待されるので、senescence associated genes のプロモーターや chemically inducible なプロモーターで活性の高いものを用いて老化葉において *RBCS* を過剰発現させることは有用であると考えられる。ただし、*RBCS* センスイネの成熟葉で増強されていた分の Rubisco 量が葉の老化を通じて維持されてはいなかったことから (図 1)、Rubisco 量がタンパク質分解のレベルでの調節も受けていると考えられる。これが葉の老化過程における Rubisco 量増強の試みにどの程度の影響をおよぼすかについては、注視しなければならない。

興味深いことに、*RBCS* の過剰発現に伴い *RBCL* の発現も同時に高くなっていた。このことは、Rubisco 遺伝子の発現において核-葉緑体間でクロストークがなされていることを示唆するものである。これまでに、タバコにおいて *RBCS* を発現抑制した場合には、葉緑体での *RBCS* 量の低下を受けて *rbcl* の発現が翻訳のレベルで down-regulation を受けるとの報告がある (Rodermel et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:3881-3885, 1996; Wostrikoff and Stern. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:6466-6471, 2008)。しかし、*RBCS* を過剰発現させたときにはどのような調節がなされるかについては、今のところ全く知見はない。このことを調べることで、核-葉緑体間のクロストークを担う新奇の因子を特定できると期待される。このためにも、オミックス解析は重要なツールとなろう。

## 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6件)

- ① Y. SUZUKI, T. MIYAMOTO, R. YOSHIZAWA, T. MAE, A. MAKINO. Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of *RBCS*. *Plant, Cell and Environment* 32:417-427, 2009. 査読有
- ② C.R. Zhao, T. Ikka, Y. Sawaki, Y. Kobayashi, Y. Suzuki, T. Hibino, S. Sato, N. Sakurai, D. Shibata, H. Koyama. Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 9:32, 2009. 査読有
- ③ Y. SUZUKI, M. OHKUBO, H. HATAKEYAMA, K. OHASHI, R. YOSHIZAWA, S. KOJIMA, T. HAYAKAWA, T. YAMAYA, T. MAE, A. MAKINO. Increased Rubisco Content in Transgenic Rice Transformed with “Sense” *rbcS* Gene. J.F. Allen, E. Gantt, J.H. Golbeck, and B. Osmond (eds.), *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, pp885-888, Springer, 2008. 査読有
- ④ Y. SUZUKI, T. MAE, A. MAKINO. RNA extraction from various recalcitrant plant tissues with a cetyltrimethylammonium bromide-containing buffer followed by acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform treatment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72:1951-1953, 2008. 査読有
- ⑤ K. IMAI, Y. SUZUKI, T. MAE, A. MAKINO. Changes in the synthesis in the rice leaves in relation to senescence and N influx. *Annals of Botany* 101:135-144, 2008. 査読有
- ⑥ Y. SUZUKI, M. OHKUBO, H. HATAKEYAMA, K. OHASHI, R. YOSHIZAWA, S. KOJIMA, T. HAYAKAWA, T. YAMAYA, T. MAE, A. MAKINO. Increased Rubisco Content in Transgenic Rice Transformed with “Sense” *rbcS* Gene. *Plant and Cell Physiology* 48:1472-1483, 2007. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 鈴木 雄二. *RBCS*遺伝子を過剰発現した形質転換体イネのRubisco量, 光合成速度および個体生育. 日本植物生理学会年会, 2009年3月21-24日, 名古屋, 千種区
- ② Y. Suzuki. Changes in Rubisco content during leaf development in *Eucalyptus globulus*. NISSAN SCIENCE FOUNDATION Woody Plants Biotechnology Symposium, 2009年2月26日, 東京, 千代田区

- ③ 鈴木 雄二. *RBCS*遺伝子を過剰発現したイネの葉の一生におけるRubisco量および光合成特性の変化. 日本土壤肥料学会年会, 2008年9月9-11日, 名古屋, 瑞穂区
- ④ 鈴木 雄二. CTABを含む緩衝液とAGPC処理を用いた厄介な植物組織からのRNA抽出法. 日本植物生理学会年会, 2008年3月20-22日, 札幌
- ⑤ 鈴木 雄二. イネにおける*rbcS* gene familyの部位特異的発現特性. 日本土壤肥料学会年会, 2007年8月22-24日, 東京, 世田谷区
- ⑥ Y. Suzuki. Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with “sense” *rbcS* gene. 14th International Congress on Photosynthesis, 2007年7月22-27日, Glasgow, 英国
- ⑦ Y. Suzuki. Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with “sense” *rbcS* gene. *Research Frontiers with Rubisco, the “Elixir of Life” in the Biosphere*, 2007年7月20-21日, Harpenden, 英国

[図書] (計0件)

[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

鈴木 雄二 (SUZUKI YUJI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 80374947

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし