

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05998

研究課題名（和文）Rubiscoの触媒特性改変による光合成能力の改良と構造機能相関の解明

研究課題名（英文）Improvement of photosynthesis by the enhancement of catalytic turnover rate of Rubisco and elucidation of structure-function relationships

研究代表者

深山 浩（Fukayama, Hiroshi）

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60373255

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ソルガムRbcSとイネRbcLのハイブリッドRubiscoを発現するCSS系統の戻し交配を行ったが、稔実率は回復しなかった。ソルガムRbcS-L1021イネのRubiscoではCSS系統よりも触媒速度が有意に低く、イネRbcS-I102LイネではCO₂に対するミカエリス定数が高くなった。ネピアグラスRbcS・イネRbcLハイブリッドRubiscoを発現するイネを作出したが、正常に機能しなかった。OsRbcS1高発現・イネRbcS発現抑制系統のRubiscoのX線結晶構造解析より、これまでに報告のない触媒サイトの構造の違いを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rubiscoは光合成速度の主要な律速因子である。本研究ではソルガムRbcSをイネに導入することで、イネに高活性型のRubiscoを付与することに成功した。また、ソルガムRbcSの102番目のロイシンが触媒速度に関係することを点突然変異を導入したRbcSを用いて明らかにした。また、102番目がイソロイシンであるOsRbcS1にも触媒速度を高める効果があるが、そのメカニズムについてもX線結晶構造解析から推定することに成功した。これらの成果は学術的な価値だけでなく、光合成の改良による作物生産性の改良に繋がる重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：Backcrossing of CSS lines expressing hybrid Rubisco composed of sorghum RbcS and rice RbcL, did not restore seed fertility. Transgenic rice plants expressing sorghum RbcS L1021 and rice RbcS I102L mutant RbcS were produced and the Rubisco activity was measured. The catalytic rate of Rubisco was significantly lower in sorghum L1021 line than in CSS line, and the Kc tended to be higher in rice I102L line. We produced rice plants expressing a complete hybrid Rubisco of napier grass RbcS and rice RbcL, but this Rubisco could not function normally. X-ray crystallographic analysis of hybrid Rubisco containing OsRbcS1 revealed a previously unreported difference in the structure of the catalytic site.

研究分野：作物生産科学

キーワード：光合成 Rubisco C4植物 X線結晶構造 イネ 酵素特性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Rubisco は触媒速度が遅い、光呼吸の原因となるオキシゲナーゼ反応を持つことから、光合成の主要な律速因子となっている。Rubisco の酵素特性には種間差があり、C3 植物では触媒速度が低く C4 植物では高い。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。触媒サイトは RbcL 上に存在することから、多くの研究者は RbcL に着目して研究を行ってきた。我々はアミノ酸配列の種間差が大きい RbcS に着目して研究を進め、C4 植物であるソルガムの RbcS とイネ RbcL で構成されるハイブリッド Rubisco を発現するイネ (CSS 系統) を作出した。この Rubisco は触媒速度が C4 植物と同等レベル (WT の Rubisco の約 2 倍) にまで高くなった。X 線結晶構造解析からソルガム RbcS の 102 番目の Leu が触媒速度の増加に関係していることが示唆された。

作出した CSS 系統の葉身における Rubisco 含量は、高い系統 (CSS10) で非形質転換イネの約 60% であった。触媒速度の増加から計算上で十分な Rubisco 含量と考えられ、実際に高 CO₂ 条件での光合成速度は非形質転換イネよりも高い値を示した。しかし、高 CO₂ 条件においても CSS10 の乾物重や玄米収量は非形質転換イネよりも低かった。その原因は未解明であった。

2. 研究の目的

ソルガム RbcS とイネ RbcL で構成されるハイブリッド Rubisco は高い触媒速度を示し、光合成速度も増加した。しかしながら、それらの系統は乾物重が低く、稔実率が悪いため玄米収量も低下した。このような生産性の低下が生じた原因を明らかにし、Rubisco 触媒速度の改良によって生産性の改良が本当に可能なかを明らかにすることを目的とした。また、ソルガム RbcS の 102 番目のロイシンの効果について、点突然変異を導入した RbcS、他の C4 植物の RbcS やイネ OsRbcS1 の効果を解析することで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

高活性型 Rubisco による光合成能力の改良

これまでにソルガム RbcS を高発現しイネ RbcS を CRISPR/Cas9 法で欠損させた CSS 系統を 2 系統 (CSS10, CSS16: 背景は日本晴) 得ている。Rubisco 含量は CSS10 で非形質転換イネの約 60% である。CSS10 では CO₂ 飽和での光合成速度が非形質転換イネよりも高い傾向があるにもかかわらず、高 CO₂ 条件での乾物重が低く玄米収量も少ない傾向があった。その原因として、CSS 系統を作出する過程で、生育に負の影響をおよぼす体細胞変異が生じている可能性が考えられる。この影響を排除するために CSS 系統に日本晴を戻し交配する。また、CSS10 よりも Rubisco 含量が多い CSS 系統も作出する。本研究では、それらの CSS 系統について生育特性、光合成特性、葉内成分 (Rubisco、光合成関連タンパク質、窒素、代謝産物) について解析する。

これまでソルガム RbcS の高発現には、Cab プロモーターを用いてきた。Rubisco 触媒特性の改良が生育促進に繋がらない原因として、オリジナルの RbcS プロモーターを用いていないことが予想される。そこで計画当初に予定していなかったが、新たに OsRbcS3 プロモーターを用いてソルガム RbcS を高発現する系統を作出する。また、それらの系統と CSS 系統を交配した後代からソルガム RbcS を高発現し、イネ RbcS が欠損した系統を選抜する。得られた系統について、戻し交配系統と同様な生理解析を行う。

以上の結果から、我々の戦略により光合成能力と収量性の改良が可能かを明らかにする。

Rubisco の構造に及ぼす RbcS の効果の解明

Rubisco の結晶構造解析から、ソルガム RbcS の 102 番目の Leu (イネでは Ile) が Rubisco の触媒速度を高める効果を持つことが示唆された。この仮説を検証するために、ソルガム RbcS の 102 番目の Leu が Ile (ソルガム L102I)、イネ RbcS の 102 番目の Ile が Leu (イネ I102L) となった変異型 RbcS を発現する系統 (ソルガム L102I 系統、イネ I102L 系統) を作出する。さらに、これらの形質転換イネの野生型イネ RbcS を欠損した系統を CSS 系統と交配して得た F1 を自殖させた後代から得る。それらの系統で発現する Rubisco の酵素特性を解析する。また必要であれば X 線結晶構造解析を行う。得られた結果から、Rubisco の触媒作用における RbcS の 102 番目の Leu または Ile の効果について考察する。

我々は、ソルガム RbcS 以外にも様々な RbcS をイネに導入し、Rubisco 触媒速度への効果を解析してきた。興味深いことに、C4 植物ネピアグラス RbcS や光合成器官で発現しないイネ OsRbcS1 は、イネ Rubisco の触媒速度を増加させる効果があったが、102 番目のアミノ酸が低活性タイプの Ile であった。このことからネピアグラス RbcS や OsRbcS1 はソルガム RbcS と異なるメカニズムにより、Rubisco 触媒速度に作用していることが予想される。OsRbcS1 高発現イネについてはイネ RbcS を RNAi で発現抑制した系統を作成済みである。ネピアグラス RbcS 高発現イネについては CSS 系統との交配を行い、得られた F1 を自殖させた後代から、ネピアグラス

RbcS を高発現しイネ RbcS を欠損した系統を得る。計画当初は予定にしていなかったが、さらに Ile 型 RbcS としてトウモロコシ RbcS, Leu 型 RbcS としてギニアグラス RbcS とイネ RbcL の完全ハイブリッド Rubisco を発現する系統も作出することとした。得られた系統の Rubisco の酵素特性を解析し、必要な場合は X 線結晶構造の解析を行う。

以上の研究から、RbcS がおよぼすイネ Rubisco への効果について構造と機能の両面から明らかにする。

4. 研究成果

高活性型 Rubisco による光合成能力の改良

CSS 系統の戻し交配を 2 回行った系統を自殖させて目的の CSS 系統を得た。この戻し交配 CSS 系統を育成したが、生育や稔実率の低下は回復しなかった。よって、これはおそらく生育不良を起こす原因の変異とソルガム RbcS 導入遺伝子（もしくはイネ RbcS ノックアウト）が連鎖している可能性が考えられた。これまで用いていなかったソルガム RbcS 高発現系統を用いて、新たな CSS 系統を 3 系統作出しており、今後、成長解析、光合成解析、収量解析等を行う予定である。OsRbcS3 プロモーターを用いてソルガム RbcS を高発現させた系統も作出中であり、今後、同様に生理解析を行う予定である。

Rubisco の構造に及ぼす RbcS の効果の解明

ソルガム L102I 系統、イネ I102L 系統を作出した。Rubisco 触媒特性の測定を行ったところ、102 番目の Leu は触媒速度を増加させるが、その効果は限定的であることが分かった。ソルガム L102I 系統、イネ I102L 系統はいずれも生育良好であり、稔実率の低下も見られなかった。特にソルガム L102I 系統はソルガム RbcS と 1 アミノ酸が異なるだけであり、ソルガム RbcS ほどではないが、Rubisco の触媒速度は WT よりも大幅に高かった。これらのことから、これまで解析に用いてきた CSS 系統の望ましくない表現型は導入遺伝子によるものではない可能性が高いと考えられた。

ソルガム以外の C4 植物の RbcS については、ネピアグラス (Ile 型)以外にギニアグラス (Leu 型)とトウモロコシ (Ile 型)についてもイネ完全置換系統を作出した。ギニアグラス RbcS のハイブリッド Rubisco に関しては、ソルガムと同様に顕著に触媒速度が増加した。つまり、Leu 型 C4 植物の RbcS はイネ Rubisco の触媒速度を増加させるのに効果的であることが示唆された。ネピアグラス RbcS のハイブリッド Rubisco を発現する系統に関しては、Rubisco タンパク質が不安定となりタンパク質の発現量が非常に低くなり、生育不良を起こした。触媒速度に関しては測定できなかった。

触媒速度が高い Ile 型の OsRbcS1 のハイブリッド Rubisco に関しては、形質転換イネよりイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等により精製を行い、X 線結晶構造解析を行った。WT の Rubisco に比べて OsRbcS1 のハイブリッド Rubisco では 60S ループ周辺の構造にずれが生じていることが明らかとなった。この構造のずれは、ソルガム RbcS のハイブリッド Rubisco にも共通することが明らかとなった。ただ、この構造のずれがどのアミノ酸に由来するのを特定することはできなかった。

解析が終了していない系統もあるが、最も重要と考えていた 102 番目の Leu の効果については検証することができ、ある程度の触媒速度の促進効果があることを明らかにした。今後は、102 番目の Leu 以外の触媒速度の促進効果を持つアミノ酸の探索と効果の検証を進めていくつもりである。また、ソルガム L102I 系統は生育良好であり、稔実率の低下も見られなかったことから、これまで解析に用いてきた CSS 系統の望ましくない表現型は導入遺伝子によるものではないことが示唆された。よって、我々の戦略により収量生の高いイネを作出できる可能性が高まったと言える。また、RbcS の 102 番目が Ile 型の OsRbcS1 のハイブリッド Rubisco の構造解析からこれまでに報告のない、有用な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Fukayama H., Miyagawa H., Shibatani N., Koudou A., Yamauchi Y., Matsuoka D., Sasayama D., Hatanaka T., Azuma T., Morita R.	4. 巻 44
2. 論文標題 CO2-Responsive CCT Protein interacts with 14-3-3 proteins and controls the expression of starch synthesis-related genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Environment	6. 最初と最後の頁 2480-2493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14084	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 -
1. 著者名 Qu Y., Sakoda K., Fukayama H., Kondo E., Suzuki Y., Makino A., Terashima I., Yamori W.	4. 巻 44
2. 論文標題 Overexpression of both Rubisco and Rubisco activase rescues rice photosynthesis and biomass under heat stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Environment	6. 最初と最後の頁 2308-2320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14051	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 -
1. 著者名 深山浩, 松村浩由	4. 巻 31
2. 論文標題 Rubiscoの高活性化によるイネの光合成能力と生産性の改良	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 110-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Hiroyoshi Matsumura, Keita Shiomi, Akito Yamamoto, Yuri Taketani, Noriyuki Kobayashi, Takuya Yoshizawa, Shun-ichi Tanaka, Hiroki Yoshikawa, Masaki Endo, Hiroshi Fukayama,	4. 巻 13
2. 論文標題 Hybrid Rubisco with Complete Replacement of Rice Rubisco Small Subunits by Sorghum Counterparts Confers C4-Plant-like High Catalytic Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 1570-1581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2020.08.012	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 -

1. 著者名 Kazuma Sakoda , Akito Yamamoto , Chie Ishikawa , Yojiro Taniguchi , Hiroyoshi Matsumura & Hiroshi Fukayama	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of Introduction of Sorghum RbcS with Rice RbcS Knockdown by RNAi on Photosynthetic Activity and Dry Weight in Rice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Production Science	6. 最初と最後の頁 346-353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1343943X.2020.1847669	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 -

1. 著者名 Yuchen Qu, Kazuma Sakoda, Hiroshi Fukayama, Eri Kondo, Yuji Suzuki, Amane Makino, Ichiro Terashima, Wataru Yamori	4. 巻 44
2. 論文標題 Overexpression of both Rubisco and Rubisco activase rescues rice photosynthesis and biomass under heat stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Environ	6. 最初と最後の頁 2308-2320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14051	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 -

1. 著者名 Morita, Ryutaro, Crofts, Naoko, Miura, Satoko, Ikeda, Ken-ich, Aoki, Naohiro, Fukayama, Hiroshi, Fujita, Naoko	4. 巻 64
2. 論文標題 Characterization of the Functions of Starch Synthase IIIb Expressed in the Vegetative Organs of Rice (<i>Oryza sativa</i> L.).	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 94-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac143	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 -

1. 著者名 深山 浩、松村 浩由	4. 巻 61
2. 論文標題 C3-C4ハイブリッドRubiscoによるイネの光合成能力の改良	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 222-228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Fukayama, Keita Shiomi, Hiroki Yoshikawa, Daisuke Sasayama, Tomoko Hatanaka, Tetsushi Azuma, Takuya Yoshizawa, Shun-ichi Tanaka, Hiroyoshi Matsumura
2. 発表標題 A Challenge for the Improvement of Photosynthetic Capacity by the Introduction of C4-Like Rubisco in Rice
3. 学会等名 アジア作物学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曲玉辰, 迫田和馬, 深山浩, 寺島一郎, 矢守航
2. 発表標題 RubiscoとRubisco activaseの二重過剰発現は高温環境におけるイネの光合成と生産性を向上させる
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮川文宏・柴谷直幹, 高堂愛子, 笹山大輔, 畠中知子, 東哲司, 森田隆太郎, 深山 浩
2. 発表標題 イネ葉鞘におけるCRCTによるデンブ合成関連遺伝子の発現調節とその品種間差
3. 学会等名 近畿作物育種研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹谷友里・大河世生・塩見慶太・笹山大輔・畠中知子・東哲司・深山浩
2. 発表標題 Rubiscoの高活性化に関係する可能性のあるC4植物型RbcSの ロイシン102の酵素特性への効果
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮川文宏・森田隆太郎・笹山大輔・畠中知子・東哲司・深山浩
2. 発表標題 イネにおいてCRCTが制御するデンブン合成関連遺伝子の糖応答性の品種間差の解析
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

光合成におけるCO2固定酵素Rubiscoの触媒活性の改良に成功
https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2020_08_31_01.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
研究分担者	松村 浩由 (Matsumura Hiroyoshi) (30324809)	立命館大学・生命科学部・教授 (34315)	

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