

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02084

研究課題名（和文）炭酸固定からトリオースリン酸生成の増強による光合成と個体生育の窒素利用効率の改良

研究課題名（英文）Improvement of N use efficiency in photosynthesis and plant productivity via enhancement of the photosynthetic carbon metabolism from carbon fixation to triose phosphate production

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では光合成及び個体生産性の窒素利用効率の改良を目指した。このため、イネを材料とし、光合成炭酸同化系において、炭酸固定からトリオースリン酸生成までの代謝経路を強化することとした。まず、炭酸固定の下流の反応について検討し、代謝の強化ポイントとなる酵素を特定した。さらに、過去に効果的だった酵素も加え、この経路における酵素を三重同時増強したものの、光合成とその窒素利用効率に大きな影響は見られなかった。その理由は、炭酸固定の下流の酵素を二重増強しても、この経路の代謝亢進が十分ではなかったことにあると考えられた。今後は、この経路で要求されるATPやNADPHの供給能力も強化する必要がある。

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、今後の光合成炭酸同化系の強化ポイント特定に有用な情報を提示することができた。方法的には、光合成炭酸同化に關与する酵素の三重増強という世界的に類を見ない試みがなされ、本研究の独自性となっている。また、これまでの光合成に関する常識を覆す結果等も得られている。例えば、これまでは光合成にとって大過剰に存在するとされてきた酵素が、実際には大過剰ではなく光合成をある程度律速しうるものであった。以上から、本研究の成果は、光合成炭酸同化の研究において、世界的にみても貴重なものとなっている。

研究成果の概要（英文）：In this study, N use efficiency in photosynthesis and plant productivity was tried to be improved in rice. For this purpose, the photosynthetic carbon metabolism from carbon fixation to triose phosphate production was enhanced. Firstly, the reactions downstream carbon fixation were investigated and the enzyme for metabolic enhancement was identified. Then, three enzymes, including one previously found to be effective, were simultaneously overexpressed. However, photosynthesis or its N use efficiency was scarcely affected. Possibly, simultaneous overexpression of two enzymes downstream carbon fixation was not enough for substantial enhancement in the photosynthetic carbon metabolism. It seems necessary to simultaneously enhance the ATP and NADPH supply, which are required in this pathway.

研究分野：植物栄養学

キーワード：光合成 カルビンサイクル 遺伝子組換え イネ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

作物の収量は窒素肥料の多投入により増加してきているが、これは葉の窒素含量の増加による光合成能力の上昇に依存している。しかし現在では、エネルギーの節減や環境保全の観点から、窒素肥料の多投入に依存しない作物増産が必要である。その解決策の一つが、光合成窒素利用率、すなわち、葉の単位窒素量当たりの光合成能力の改良による個体生産性の強化である。

現在の環境下の最大光合成速度の律速因子は、炭酸同化を担うカルビンサイクルの酵素 Rubisco による炭酸固定能力である。このため、光合成窒素利用率改良のためには Rubisco 量の増強が必須である。しかし、以前に作製した Rubisco 増強イネ(Rubisco 量が野生型の 120%)では光合成窒素利用率は改良されず、Rubisco 以外の他の因子も共に光合成を律速すると考えられた。これまでに、Rubisco の基質であるリブローズ 1,5-ビスリン酸の再生産に関与するいくつかの酵素が光合成の律速因子となりうる事が、他の研究グループから発表されている。しかし、これまでに Rubisco とこれらの酵素を同時増強したが、光合成へのプラスの効果は見られず、他の方策が必要であった。

以前に Rubisco 増強イネのカルビンサイクル代謝を解析した際に、Rubisco の反応生成物である 3-ホスホグリセリン酸(3-PGA)の過剰蓄積がみられた。このことから、3-PGA の代謝の段階で、Rubisco 増強イネのカルビンサイクルが滞留していると予測された。3-PGA はホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)、NADPH-グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の作用でトリオースリン酸であるグリセルアルデヒド 3-リン酸に変換され、さらにトリオースリン酸イソメラーゼ(TPI)の作用により、同じくトリオースリン酸であるジヒドロキシアセトンリン酸との相互変換を受ける。この代謝経路を Rubisco と同時増強すれば、3-PGA の代謝亢進により Rubisco 増強イネのカルビンサイクル代謝の滞留が解消され、光合成能力及び光合成窒素利用率の強化が達成できると期待される。研究開始当初では、GAPDH を野生型の 5 倍程度に増強したところ、Rubisco 以降のカルビンサイクル代謝が亢進される傾向にあること、予備的試験において TPI の抑制及び増強により Rubisco 以降のカルビンサイクル代謝がそれぞれ抑制及び亢進される傾向にあることがわかっていった。PGK に関しては、その抑制が光合成速度を低下させるとの報告がシロイヌナズナでなされていたが、PGK 活性はカルビンサイクル酵素のうち高い部類に属しており、一般的には光合成の律速段階とはならないと考えられていたため、PGK の抑制効果は検証する必要があった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、光合成及び個体生育の窒素利用率を改良することを目的とし、イネにおいて Rubisco から、PGK、GAPDH、TPI まで、すなわち、炭酸固定からトリオースリン酸生成までの一連の経路を強化することとした。GAPDH に関しては、前述のように増強による光合成への効果があったが、これに加え、TPI 抑制・増強、PGK 抑制・増強の光合成への効果を明らかにしたうえで、効果のあった酵素を Rubisco と同時増強することとした。

3. 研究の方法

(1) PGK は光合成を律速しうるかの検証

PGK 遺伝子を RNAi 法にて発現抑制した遺伝子組換えイネを作製した。遺伝子組換えイネの後代を屋内型人工気象器内で、現在の大気環境及び晴天時を模した強光条件で、水耕法にて栽培した。光合成能力は CO₂ 固定速度をガス交換法にて測定することで評価した。測定は強光、及び異なる CO₂ 濃度で行った。なお、Rubisco 以降のカルビンサイクル代謝の能力は高 CO₂ 条件の光合成速度に反映されるとされているため、本研究でも同様に評価した。PGK タンパク質の量はイミュノプロット法により評価した。

(2) TPI 抑制・増強イネの光合成特性の解析

TPI 遺伝子をアンチセンス法にて発現抑制した遺伝子組換えイネ (TPI タンパク質の量及び光合成特性まで調査済み) を(1)と同様に栽培し、強光・高 CO₂ 条件で光合成が定常状態になった葉における一次代謝産物の量を CE-TOFMS にて測定した。また、作製済みの TPI 遺伝子を過剰発現した遺伝子組換えイネから、導入遺伝子が安定している後代を選抜し、(1)と同様に栽培及び光合成測定を行った。TPI タンパク質の量はイミュノプロット法により評価した。TPI 増強イネについては高 CO₂ 条件でも栽培し、個体乾物重からバイオマス生産量を評価した。

(3) Rubisco・GAPDH・TPI 同時増強イネの光合成特性の解析

論文公表済みの Rubisco・GAPDH 同時増強イネと TPI 増強イネを交配することで、これらの同時増強イネを作製した。その過程に分離した、Rubisco・TPI 同時増強イネも対照植物として用いた。また、GAPDH・TPI 同時増強イネは、論文公表済みの GAPDH 増強イネと、(2)で作製した TPI 増強イネを交配することで得た。栽培及び光合成測定は(1)と同様に行った。Rubisco 量は SDS-PAGE 及びクマシー染色後の Rubisco バンドへのクマシー結合量により、GAPDH 量はイミ

ユノプロット法により評価した。

4. 研究成果

(1) PGK は光合成を律速しうるかの検証 (雑誌論文 Suzuki, Konne et al. 2022)

PGK タンパク質の量が最小で野生型の 2 割程度に減少した複数の系統を得た。しかし、種々の CO₂ 濃度条件の光合成速度には野生型との大きな差は見られなかった。このため、PGK はイネにおいてカルビンサイクル代謝及び光合成を律速する因子とはならないとの結論となり、PGK 増強イネの作製は中止することにした。

(2) TPI 抑制・増強イネの光合成特性の解析 (雑誌論文 Suzuki, Ishiyama et al. 2022; Suzuki, Shiina et al. 2022)

TPI タンパク質の量が野生型の 14–45% になった複数の系統がすでに得られていた。低 CO₂ 条件の光合成速度には、TPI の抑制程度が最も大きい系統以外では影響がみられていなかった。その一方で、高 CO₂ 条件の光合成速度は低下がみられ、抑制程度が最も大きかった系統で、野生型の約 6 割となっていた。さらに、系統間で高 CO₂ 条件の光合成速度と TPI タンパク質の量との間に正の相関関係がみられていた。そこで本研究で、新たに TPI 抑制イネのカルビンサイクル代謝を調べたところ、葉緑体内で ATP 合成に用いられる無機リン酸の供給が光合成を律速する際に類似した代謝変動がみられた。このため、TPI は Rubisco 以降のカルビンサイクル代謝及び高 CO₂ 条件の光合成能力に寄与していると考えられた。

次いで、TPI タンパク質の量が増加し、導入遺伝子が安定した TPI 増強イネ 2 系統を選抜した。これらの系統においては、TPI タンパク質の量が野生型の 4.8 倍及び 12.1 倍となった。これらのイネでは、強光・高 CO₂ 条件下の光合成速度が 10% 弱上昇しており、TPI のカルビンサイクル代謝及び光合成への寄与が再度示唆される結果となった。TPI 増強イネと野生型イネの葉身窒素量にはほとんど差がなく、光合成窒素利用効率も同程度に上昇したと考えられた。なお、これらの系統では高 CO₂ 条件でのバイオマス生産量には増加がみられなかった。このため、バイオマス生産性の強化のためには、さらなる光合成能力の改良が必要であると考えられた。

(3) Rubisco・GAPDH・TPI 同時増強イネの光合成特性の解析 (雑誌論文 Suzuki, Yamashita et al. 2023)

作製した Rubisco・GAPDH・TPI 同時増強イネでは、それぞれのタンパク質の量が野生型の 1.1 倍 (Rubisco への窒素分配率として) 4.9 倍、2.1 倍となった。同時に得られた Rubisco・TPI 同時増強イネではそれぞれ 1.3 倍、3.1 倍、GAPDH・TPI 同時増強イネではそれぞれ 10.5 倍、9.5 倍であった。それぞれの酵素の同時増強には成功したもの、Rubisco・GAPDH・TPI 同時増強や Rubisco・TPI 同時増強は種々の CO₂ 条件の光合成速度に大きく影響しなかった。その一方で、GAPDH・TPI 同時増強より高 CO₂ 条件の光合成速度が 10% 程度増加したが、これはそれぞれの単独増強により得られる効果と同程度のものであり、同時増強による相加的効果はみられなかった。

以上のことから、炭酸固定からトリオースリン酸生成までの一連の経路の強化は、酵素のキャパシティという側面からは、光合成能力及び光合成窒素利用効率の改良にはつながらなかった。GAPDH と TPI の同時増強には相加効果がなく、代謝の亢進も限られた範囲であり、Rubisco 増強による 3-PGA 代謝の滞留が解消されなかったと予測された。

なお、光合成への改良効果は見られなかった、ないし、少なかったため、バイオマス生産量は調べなかったが、少なくとも外観上で個体生育が大きく抑制されることはなかった。

(4) その他 (雑誌論文 Suzuki, Ohsaki et al. 2023)

光化学系 II 及び I の挙動が炭酸同化系の活性変動とどのような関係にあるかを調べ、光化学系 II 及び I が光合成能力の改良ポイントとなるかに関する基礎的情報を得た。材料はイネとし、炭酸同化系の活性の指標として、全窒素量、Rubisco 量、Rubisco 態窒素が全窒素に占める割合を用い、これらの変動を葉の老化過程において経時的に調べ、光化学系の挙動の関係を解析した。また、栽培は通常窒素条件に加え、葉の老化を促進させるため、窒素欠乏条件でも行った。その結果、光化学系 II 及び I の挙動は全窒素量、Rubisco 量、Rubisco 態窒素の割合と密接に関連しており、この中では特に Rubisco 態窒素の割合でよく説明できた。以上から、光化学系 II 及び I の挙動は基本的に炭酸同化系の活性に依存していること、すなわち、光化学系は光合成の強化ポイントにはならないことが示唆された。また、Rubisco 態窒素の割合が光化学系 II 及び I の挙動と特に密接に関連していたのは、Rubisco 態窒素の割合が Rubisco と他の光合成プロセスの能力間のバランスの指標となっていたためであると考えられた。

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

前述のように Rubisco は光合成の律速因子として世界的にも広く受け入れられているが、Rubisco 量の増強により光合成能力や光合成窒素利用効率が改善されなかったことは、これまでの光合成への理解では説明できない。その原因の解明までには本研究では至らなかったが、本研究を含むこれまでの一連の研究により、原因となる要因の絞り込みは進んできていると言える。

方法的な面に関してであるが、光合成能力の強化にあたって、光合成機能因子の多重増強が行

われた例は世界的にいくつかあるが、カルビンサイクル酵素の三重増強の例はなく、本研究の独自性は世界的にみても高い。

さらに、本研究の成果のなかには、光合成制御メカニズムに関する新たな知見を加えるものがある。TPIはその活性がカルビンサイクル酵素で最も高いため、光合成に対し大過剰に存在すると考えられてきた。これに対し、本研究の成果により、TPI活性は大過剰に存在するというわけではなく、光合成やカルビンサイクル代謝に対しある程度の律速性を有し、光合成の強化ポイントとなりうることが明らかとなった。これとは逆に、PGKは光合成の律速因子とはならないといった、これまでに考えられてきた光合成制御メカニズムの正当性を証明する成果もあった。

以上、本研究の成果は、光合成炭素代謝研究において、世界的にみても貴重なものとなっている。

(6) 今後の展望

本研究の成果により、Rubisco増強を介した光合成能力及び光合成窒素利用効率の改良への新たな方策が考えられた。GAPDHとTPIの単独増強が高CO₂条件の光合成速度、すなわち、Rubisco以降のカルビンサイクル代謝にプラスに作用するため、この代謝経路自体は光合成能力改良にとって有用であり、Rubiscoとの同時増強は検討し続ける価値がある。ただし、この代謝経路を強化する場合には、酵素のキャパシティ以外の因子を考慮する必要がある。すなわち、PGKの反応ではATPが、GAPDHの反応ではNADPHが要求される。これらの供給能力も合わせて強化することが、光合成能力及び光合成窒素利用効率の改良に向けた今後の課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Yuji Suzuki, Yume Konno, Yuki Takegahara-Tamakawa, Chikahiro Miyake, Amane Makino	4. 巻 153
2. 論文標題 Effects of suppression of chloroplast phosphoglycerate kinase on photosynthesis in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photosynthesis Research	6. 最初と最後の頁 83-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11120-022-00923-w	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 Yuji Suzuki, Keiki Ishiyama, Dong-Kyung Yoon, Yuki Takegahara-Tamakawa, Eri Kondo, Mao Suganami, Shinya Wada, Chikahiro Miyake, Amane Makino	4. 巻 188
2. 論文標題 Suppression of chloroplast triose phosphate isomerase evokes inorganic phosphate-limited photosynthesis in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1550-1562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiab576	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 Yuji Suzuki, Mizuki Shiina, Yuki Takegahara-Tamakawa, Chikahiro Miyake, Amane Makino	4. 巻 63
2. 論文標題 Overexpression of Chloroplast Triosephosphate Isomerase Marginally Improves Photosynthesis at Elevated CO ₂ Levels in Rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1500-1509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac115	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 Yuji Suzuki, Mikuri Yamashita, Haruka Takada, Yuki Takegahara-Tamakawa, Chikahiro Miyake, Amane Makino	4. 巻 Published online
2. 論文標題 Effects of simultaneous Rubisco, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and triosephosphate isomerase overexpression on photosynthesis in rice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2023.2255213	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 Suzuki Y, Ohsaki K, Takahashi Y, Wada S, Miyake C, Makino A	4. 巻 64
2. 論文標題 Behavior of Photosystems II and I Is Modulated Depending on N Partitioning to Rubisco in Mature Leaves Acclimated to Low N Levels and Senescent Leaves in Rice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 55-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac139	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 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木 雄二, 石山 敬貴, 尹 棟敬, 竹ヶ原(玉川) 夕紀, 近藤 依里, 菅波 眞央, 和田 慎也, 三宅 親弘, 牧野 周
2. 発表標題 葉緑体型トリオースリン酸イソメラーゼの抑制がイネの光合成に及ぼす影響
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 菅波 眞央, 今野 壮, 丸橋 凌, 高木 大輔, 田副 雄士, 和田 慎也, 山本 宏, 鹿内 利治, 石田 宏幸, 鈴木 雄二, 牧野 周
2. 発表標題 Flavodiiron protein の導入はRubisco activase 過剰発現イネにおけるPSI 電子伝達 異常を回復させる
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 鈴木雄二、椎名美月、竹ヶ原(玉川)夕紀、三宅親弘、牧野周
2. 発表標題 葉緑体型トリオースリン酸イソメラーゼの増強がイネの光合成と個体生育に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会東北支部大会2022年度山形大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木雄二
2. 発表標題 イネにおける外因性・内因性ストレスとP700 酸化：水ストレスと葉の老化の事例 から
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木雄二, 山下みくり, 高田遥日, 竹ヶ原(玉川), 夕紀, 三宅親弘, 牧野 周
2. 発表標題 Rubisco・GAPDH・TPIの同時増強がイネの光合成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会東北支部大会2023年度岩手大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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