

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780055

研究課題名（和文） イネにおける光化学系 ATP 生産能力の増強による光合成機能の改良

研究課題名（英文） Improvement of photosynthetic capacity by an enhancement of ATP synthesis in rice

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（和文）：イネ葉の光合成能の増強を目指し、光合成の律速段階となっている ATP の生産を担う葉緑体型 ATPase の量を遺伝子組換えにより増強することを試みた。葉緑体型 ATPase の各サブユニット間の結合と活性制御を担っている *ATPD* を単独で過剰発現およびコントロールとして発現抑制を行い、それぞれ 10 系統および 16 系統の組換え体を得たが、葉緑体型 ATPase の量が大きく変化した個体は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：In order to improve photosynthetic capacity of rice leaves, it was tried to increase the amount of chloroplastic ATPase by genetic manipulation. *ATPD*, which functions for the binding of each subunit and the regulation of ATPase activity, was overexpressed or antisense-suppressed. However, the transformants whose ATPase content was drastically changed were not obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：イネ、光合成、ATP 生産、過剰発現

1. 研究開始当初の背景

高等植物における葉の光合成機能の改良は、昨今その重要性が強く認識されている大気中 CO₂ の削減や食糧およびバイオマスの増産のための有効な手段である。C₃ 植物の光合成速度は、主に以下に挙げるの 3 つ光合成律速因子のいずれかにより決定されると考えられている。①光合成炭酸固定酵素 Rubisco の能力 ②光化学系による ATP や NADPH の生産能力 ③ATP 生産に供給される無機リン酸 (Pi) の、光合成最終産物であるデンプンや

ショ糖の生合成からの再生産速度。現在の大气条件下では①が、また、将来予測される高 CO₂ 環境下では②がそれぞれ光合成速度を律速すると考えられてきている。その一方で、③による光合成の律速性は植物種間で異なっており、例えばイネでは通常の生育環境下ではこれが生じない。そこで申請者は、現在の大气条件および生育適温下での光合成速度の増大を目指して、Rubisco 量を特異的に増強した形質転換体イネを世界で初めて作製したものの、そのような効果は得られな

かった。このことは、イネにおいては現在の大気条件および生育適温下では Rubisco による光合成の律速性は高くはなく、その他の因子が重要となっていることを示唆している。有力な候補としては ATP や NADPH の生産能力が強く予想され、その強化により現在の大気条件下の光合成速度や個体生育量が増大し植物の生産性が向上すると見込まれる。さらには、高 CO₂ 環境下でも同様の効果が得られると期待される。

光化学系の ATP 生産を司っているのはチラコイド膜に存在する葉緑体型 ATPase 複合体であるが、そのサブユニット構成は核コード 3 分子種および葉緑体コード 6 分子種と非常に複雑であり、量的増強を試みた研究例は世界的に見てもこれまでにない。その一方で Rubisco では、サブユニット構成はより単純であるものの、核コードの小サブユニット遺伝子 *RBCS* の過剰発現により葉緑体コードの大サブユニット遺伝子 *RBCL* が協調的に高発現することで Rubisco タンパク質の量が増加することを申請者が明らかにしている。したがって、葉緑体型 ATPase 複合体においても、量的増強は核コードのサブユニットの遺伝子組換えのみで可能であると期待できる。

2. 研究の目的

そこで本申請研究では、イネにおいて光合成光化学系の ATP 生産能力を増強することで個葉光合成速度および個体生育量の増大を目指す。将来的には、得られた形質転換体を Rubisco の量を増減させた形質転換体イネと交配することで、さらなる葉の光合成の増大も目指す。このため、以下の点について研究を進める。

3. 研究の方法

核コードのサブユニットの過剰発現による葉緑体型 ATPase 複合体の量的増強を行うこととした。はじめに、*ATPC* (*Os07g051300*)、*ATPD* (*Os02g0750100*) および *ATPG* (*Os03g0278900*) の全長 cDNA 配列を、イネゲノムデータベースの情報 (RAP-DB; <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) をもとに、5' -および 3' -RACE 法を用い特定することとした。

次いで、これらを緑葉で強力に発現するイネ *RBCS* プロモーターの制御下で 3 重過剰発現するベクターを構築することを試みた。しかし、複雑な構造を有し、また、サイズが非常に大きくなるため、現在のところ成功には至っていない。このため、各サブユニットの結合と ATPase 活性の制御を担っている *ATPD* を単独で過剰発現するベクターの構築をした。より強力な遺伝子発現を狙うため、イネ *RBCS* のプロモーターおよび 5' -UTR 領域からシームレスに *ATPD* の開始コドンが始まるよ

うなコンストラクトとすることができた。同時にコントロールとして *ATPD* をアンチセンス法にて発現抑制するためのベクターも構築した。

これらのベクターを用い、アグロバクテリウム法にてイネ (*Oryza sativa* L. cv Notohikari) の形質転換を行った。得られた形質転換体当代の最上位完全展開葉をサンプルとし、以下のようなスクリーニングを行った。膜画分を調製し SDS-PAGE 後クマシー染色を行った。ATPase の葉緑体コードサブユニットである CF₁ の α および β サブユニットをデンストメーターで定量した。内部標準として集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質 LHC II も同時に定量した。スクリーニングの指標として、CF₁ $\alpha + \beta$ / LHC II のバンド強度比を算出した。

4. 研究成果

これまでのところ、*ATPD* を過剰発現および発現抑制するための遺伝子コンストラクトを導入した個体がそれぞれ 10 系統および 16 系統得られている。スクリーニングのため CF₁ $\alpha + \beta$ / LHC II のバンド強度比を測定したところ、いずれの場合にも野生型と比べたときの量的変化は 20% 以内であり、葉緑体型 ATPase の量が大幅に変化した個体は得られなかった (図 1)。

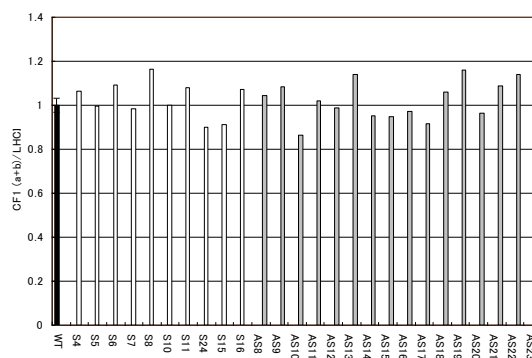


図 1. 葉緑体型 ATPase のサブユニット *ATPD* 遺伝子を過剰発現または発現抑制した遺伝子組換え体イネにおける CF₁ $\alpha + \beta$ / LHC II の量比。データは野生型の値を 1 とした相対値で表した。黒、白および灰色のカラムはそれぞれ野生型、過剰発現体および発現抑制体を示す。

その原因として、過剰発現体については *RBCS* の 5' -UTR からシームレスに *ATPD* の開始コドンを接続したため、翻訳が正常になされなかったのではないかと推測された。また、*RBCS* の遺伝子発現がなされる時期が葉緑体型 ATPase のそれと若干異なっていたため、過剰発現および発現抑制の遺伝子コンストラクトの効果が強く得られなかつ

たということも予想された。今後葉緑体型 ATPase の量的改変を行う際には、オウンプロモーターを用いる等の方法的な改変が必要であると考えられる。

また、将来的な目標としては Rubisco 量を増減させた遺伝子組換え体イネとの交配により葉の光合成能をさらに強化しようということも挙げていた。例えば、Rubisco 量を増加させたイネの最上位完全展開葉の強光および現在の大気 CO₂ 条件下の光合成には野生型との間に差はみられないが、光合成にとって不足している代謝経路を強化することで光合成能を Rubisco が増加した分だけ強化することができると考えられる。このため、Rubisco 量を増減させた遺伝子組換え体イネの最上位完全展開葉における光合成およびその他の一次代謝産物のメタボローム解析を行った。ATP, ADP, AMP の量や ATP/ADP 比, NADPH + NADP⁺ 量には Rubisco 量を増強した形質転換体イネと野生型イネとの間に差はみられず (表 1), これらの量が Rubisco 量を増強した形質転換体イネにおける光合成にとって不足しているとは考えにくい結果となった。なお、Rubisco 量を特異的に減少させた形質転換体イネにおいては ATP や ADP の量および ATP/ADP 比が増加しているが、これは Rubisco 量の減少のためにカルビンサイクルの代謝が滞り、ATP の消費が低下したためであると考えられる。その場合にも NADPH + NADP⁺ 量に野生型との差はみられなかった。

表 1. Rubisco 量を増減させた形質転換体イネの最上位完全展開葉における ATP, ADP, AMP の量および NADPH + NADP⁺ 量

	(μmol m ⁻² or ratio)		
	Wild type	<i>RBCS</i> -sense	<i>RBCS</i> -antisense
ATP	6.8 ± 0.6	7.3 ± 0.6 (107) ^d	13.2 ± 0.9 (195)*
ADP	10.8 ± 1.4	11.9 ± 0.6 (110)	15.2 ± 1.2 (141)*
AMP	4.6 ± 1.6	5.7 ± 0.6 (123)	5.6 ± 0.7 (121)
ATP + ADP + AMP	22.2 ± 2.9	24.9 ± 1.2 (112)	34.0 ± 2.5 (153)*
ATP/ADP ^e	0.66 ± 0.08	0.62 ± 0.05 (93)	0.88 ± 0.03 (132)*
NADPH + NADP ⁺	5.17 ± 0.28	6.26 ± 0.39 (121)	5.35 ± 0.52 (104)

カルビンサイクルの光合成中間代謝産物に関しては、3-phosphoglycerate (3-PGA) や sedoheptulose 7-phosphate (S7P) の量が Rubisco 量の増減にともないそれぞれ増減している結果となった (図 2)。Rubisco 量を増加させたイネの最上位完全展開葉から 1 葉位下位の葉では光合成特性が野生型の最上位完全展開葉と全く同じになるが、3-PGA や S7P の量も野生型と同じレベルにまで戻っていた。以上のことから、Rubisco 量を増加させたイネにおいては、光化学系の能力が光合成にとって律速段階となっているというよりも、カルビンサイクルの Rubisco 以外の段階の代謝が滞っており、これが光合成の律速段階となっていることが考えられた。このこと

は、本申請研究で仮定した ATP 生産能を増強することで葉の光合成能が強化されるといった点について再考する必要があることを示唆している。

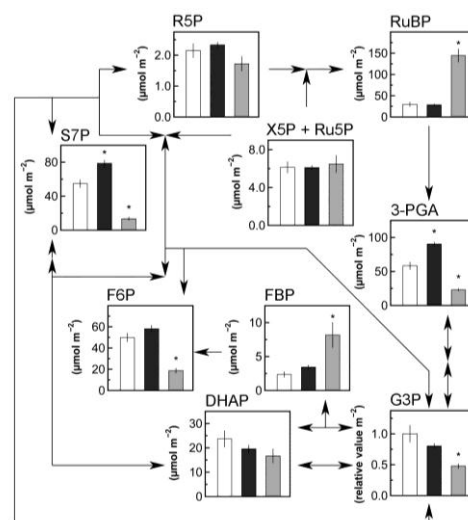


図 2. Rubisco 量を増減させた形質転換体イネの最上位完全展開葉におけるカルビンサイクルの代謝産物の量。白、黒、灰色のカラムはそれぞれ野生型、Rubisco 量を増加および減少させた形質転換体イネを示す。

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. FUJIMORI, K. KANNO, A. SASAKI, Y. OHASHI, A. MAKINO. Metabolome analysis of photosynthesis and the related primary metabolites in the leaves of transgenic rice plants with increased or decreased Rubisco content. *Plant, Cell & Environment*, 2012, *in press*, 査読有

2) S. OGAWA, Y. SUZUKI, R. YOSHIZAWA, K. KANNO, AMANE MAKINO. Effect of individual suppression of *RBCS* multigene family on Rubisco contents in rice leaves. *Plant, Cell & Environment* 35, 546-553, 2012, 査読有

3) S. SENEWEERA, A. MAKINO, N. HIROTSU, R. NORTON, Y. SUZUKI. New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environmental and Experimental*

Botany 71, 128-136, 2011, 査読有

4) S. KUBO, T. MASUMURA, Y. SAITO, H. FUKAYAMA, Y. SUZUKI, T. SUGIMOTO, A. MAKINO, K. AMAKO, C. MIYAKE. Cyclic electron flow around PSI functions in the photoinhibited rice leaves. Soil Science and Plant Nutrition 57, 105-113, 2011, 査読有

5) Y. SUZUKI, T. KIHARA-DOI, T. KAWAZU, C. MIYAKE, A. MAKINO. Differences in Rubisco content and its synthesis in leaves at different positions in *Eucalyptus globulus* seedlings. Plant, Cell and Environment 33, 1314-1323, 2010, 査読有

6) L. J. IRVING, Y. SUZUKI, H. ISHIDA, A. MAKINO. Protein turnover in grass leaves. Advances in Botanical Research 54, 139-182, 2010, 査読有

〔学会発表〕 (計 4 件)

1) 鈴木雄二. 異なる葉位のイネ葉における *RBCS* および *RBCL* 遺伝子の転写酸物量および転写後調節レベルでの協調的発現. 日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月 16-18 日, 京都市北区

2) 鈴木雄二. Rubisco 量を特異的に変化させた形質転換体イネにおける光合成およびその他の一次代謝産物のメタボローム解析. 日本土壌肥料学会年会, 2011 年 8 月 8-10 日, つくば市

3) 鈴木雄二. Rubisco タンパク質の量を増強した形質転換体イネにおける光合成中間代謝産物およびその他の一次代謝産物のメタボローム解析. 日本土壌肥料学会年会, 2011 年 3 月 20-22 日, 仙台市青葉区

4) 鈴木雄二. 葉位の異なる *Eucalyptus globulus* 葉における Rubisco の遺伝子発現. 日本土壌肥料学会年会, 2010 年 9 月 7-9 日, 札幌市北区

5) 鈴木雄二. Rubisco ターンオーバーと窒素栄養. 日本土壌肥料学会年会, 2010 年 9 月 7-9 日, 札幌市北区

〔図書〕 (計 1 件)

1) H. ISHIDA, Y. SUZUKI, A. MAKINO. Rubisco turnover and photosynthesis in a leaf. T. OHYAMA and K. SUEYOSHI (eds.), Nitrogen Assimilation in Plants pp. 277-285,

Research Signpost, Kerala, India, 2011

〔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