

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580021

研究課題名(和文) イネが持つ新規 Rubisco 小サブユニット OsRbcS1 の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a novel Rubisco small subunit, OsRbcS1 in rice

## 研究代表者

深山 浩 (Fukayama, Hiroshi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60373255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：炭酸固定を担う Rubisco の小サブユニット遺伝子はイネにおいて 5 つある。そのうち OsRbcS1 は他の 4 つとアミノ酸配列が大きく異なり、光合成器官の葉身で発現しないことがわかった。この OsRbcS1 を葉身で高発現する形質転換イネを作出したところ、Rubisco の触媒速度、CO<sub>2</sub> に対するミカエリス定数が増加した。また、OsRbcS1 は葉鞘における非光合成組織で発現しており、実際に Rubisco に組込まれていることがわかった。OsRbcS1 が組込まれた Rubisco の酵素特性は、今後の高 CO<sub>2</sub> 環境で有利と考えられることからイネの光合成能力の改良に有効である。

研究成果の概要(英文)：Rubisco small subunits (RbcS) are encoded by a nuclear multigene family consisting five RbcS genes (OsRbcS1-5) in rice. Among them, the amino acid sequence of OsRbcS1 differs notably from those of OsRbcS2-5. In addition, OsRbcS1 was not expressed in leaf blade, a major photosynthetic organ, but was expressed in leaf sheath, culm, anther and root central cylinder. In leaf blade of transgenic rice overexpressing OsRbcS1 and leaf sheath of non-transgenic rice, OsRbcS1 was incorporated into the Rubisco holoenzyme. Incorporation of OsRbcS1 into Rubisco increased the catalytic turnover rate and K<sub>m</sub> for CO<sub>2</sub> of the enzyme, indicating that the catalytic properties were shifted to those of a high activity type Rubisco. These results indicate that the catalytic properties of Rubisco can be altered by ectopic expression of OsRbcS1, and useful for improvement of photosynthetic capacity under near future elevated CO<sub>2</sub> conditions.

研究分野：作物生理学

キーワード：光合成 炭素同化 イネ 遺伝子組換え ルビスコ 二酸化炭素 一次代謝 酵素

## 1. 研究開始当初の背景

Rubisco は  $\text{CO}_2$  を有機物に変換する光合成の初発反応を触媒する酵素である。本酵素は触媒回転速度が遅いこと、 $\text{O}_2$  をも基質として光呼吸を起こすことから現在の気象条件 (380 ppm) での光合成の主な律速因子となっている。Rubisco は分子量約 15 kDa の小サブユニット (RbcS) 8 個と分子量約 55 kDa の大サブユニット 8 個からなる約 550 kDa の大きな複合体タンパク質として機能している。この 2 種類のサブユニットの中で、Rubisco の触媒作用に重要なアミノ酸残基のほとんどは大サブユニットに存在している。一方、小サブユニットについては機能が不明確であった。よって、Rubisco の触媒作用の改良を目指した研究の多くは大サブユニットに焦点が当てられてきた。

Rubisco の酵素特性には種間差が存在することが知られている。 $\text{C}_4$  植物や寒冷地に適応した植物の Rubisco では触媒速度は高いが、 $\text{CO}_2$  に対する親和性が低い。一方、イネを含めた温暖な地域に適応した  $\text{C}_3$  植物の Rubisco は触媒速度は低いが、 $\text{CO}_2$  に対する親和性が高い。このような酵素特性の違いは、前述の通り RbcL のアミノ酸配列の違いによるところが大きいと考えられてきた。しかし、我々は RbcL のアミノ酸配列には種間差がとてもし少ないこと、RbcS には比較的種間差が存在することから、種による酵素特性の違いに RbcS の配列が重要な役割を果たしている可能性があると考えた。そこでイネ Rubisco の 2.5 倍の触媒回転速度を示す  $\text{C}_4$  植物ソルガムの Rubisco に着目し、その RbcS をイネに導入して酵素特性への効果を解析した。形質転換イネではソルガムとイネの RbcS が両方発現しているが、ソルガム RbcS が全 RbcS の 30% 以上組み込まれたキメラな Rubisco では、Rubisco の触媒速度が約 1.5 倍増加することが明らかとなった。このことは、あまり重要でないと考えられてきた RbcS が酵素特性の

重要な決定因子になっていることを示唆している。

RbcS 遺伝子は核に存在し、ほとんどの植物において多重遺伝子族を形成している。このように遺伝子は複数存在するが、葉緑体移行シグナル配列を除いた RbcS のアミノ酸配列は相同性が高いことから、主に発現量を高めるために遺伝子が複数存在すると考えられてきた。我々が実験材料としているイネでは、ゲノム上に 5 つの *RbcS* (*OsRbcS1-5*) が存在する。この中で、*OsRbcS2-5* は成熟タンパク質のアミノ酸配列は完全に一致している。一方、本研究課題で着目した *OsRbcS1* については他の RbcS と約 55% の相同性しかなかった。系統樹解析を行ったところ、*OsRbcS1* は *OsRbcS2-5* と異なるクレードに入り、イヌカタビバなどのシダ植物やブドウなどの木本植物の RbcS と相同性が高いことが分かった。また、RT-PCR 解析を行ったところ *OsRbcS1* は主要な光合成器官である葉身では発現しておらず、葉鞘や稈での発現が高いことが明らかとなった。これらのことから、*OsRbcS1* は他の RbcS とは全く異なる代謝的役割を担っている可能性が考えられた。さらに、他の *OsRbcS* とアミノ酸配列が大きく異なることから *OsRbcS1* が Rubisco に組み込まれることにより Rubisco の酵素特性が大きく変化する可能性が期待された。

## 2. 研究の目的

Rubisco は触媒回転速度が遅く、光合成の主要な律速要因と考えられる。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るが、我々のこれまでの研究から Rubisco の酵素特性の種間差において RbcS の違いが重要であることが示唆されていた。イネゲノムには 5 種類の *RbcS* (*OsRbcS1-5*) が存在するが、*OsRbcS1* のみアミノ酸配列が大きく異なり、その発現パターンも他の RbcS と異なってい

る。これらのことから、OsRbcS1 は他の RbcS と異なる働きを担っていること、OsRbcS1 が Rubisco に組み込まれると酵素特性が変化する可能性が考えられた。本研究課題では、イネが持つ新規の RbcS である OsRbcS1 の機能を明らかにすると共に、OsRbcS1 を利用した光合成能力の改良の可能性を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

イネが持つ新規の RbcS である OsRbcS1 に着目し、発現解析、組換え体を用いた生理機能解析を行った。まず、RT-PCR 法、プロモーター-GUS 法により、OsRbcS1 の発現の組織・細胞特異性を解析した。さらに、OsRbcS1 を高発現する形質転換イネ、RNAi 法により発現抑制した形質転換イネを作成し、OsRbcS1 の発現量が光合成速度、生育におよぼす効果を解析した。特に、OsRbcS1 高発現形質転換イネでは、OsRbcS1 がイネ Rubisco の酵素特性におよぼす効果に着目して解析した。また、OsRbcS1 ノックダウン形質転換イネでは、OsRbcS1 の発現が比較的高い、葉鞘を用いてメタボローム解析を行った。

### 4. 研究成果

イネが持つ新規 Rubisco 小サブユニット OsRbcS1 の細胞内局在部位を明らかにする目的で OsRbcS1 の N 末端延長配列に GFP 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を含むプラスミドを構築し、パーティクルガン法によりタマネギ表皮細胞に導入した。GFP の蛍光がプラスチドに観察されたことから、OsRbcS1 はプラスチドに局在することが明らかとなった。

OsRbcS1 の発現の組織・細胞特異性を明らかにする目的でプロモーター-GUS 解析を行った。OsRbcS1 は主な光合成組織であ

る葉身では発現しておらず、葉鞘や稈の維管束の周辺で発現していることが明らかとなった。

イネ Cab プロモーターに OsRbcS1 の cDNA コード領域全長を連結したキメラ遺伝子を含むプラスミドを作成し、アグロバクテリウム法でイネ胚盤由来のカルスに導入した。約 40 個体の形質転換イネが得られた。形質転換イネの OsRbcS1 タンパク質の発現量は全 RbcS の 5-80%であり、OsRbcS1 を非常に高発現する形質転換イネを得ることが出来た。また、OsRbcS1 mRNA の 3'非翻訳領域をトリガーとして RNAi ノックダウン形質転換イネについても作出した。OsRbcS1 が発現する葉鞘を用いて発現量をウエスタンブロット解析したところ、形質転換イネでは OsRbcS1 の発現が大きく低下していた。

OsRbcS1 高発現形質転換イネで発現する Rubisco の酵素特性を解析したところ、触媒速度、CO<sub>2</sub> に対するミカエリス定数が増加することが分かった。よって、OsRbcS1 が組み込まれることによって Rubisco が高活性型となるものと考えられた。また、Rubisco のサブユニット構造について blue native-PAGE により解析したところ、形質転換イネにおいて OsRbcS1 は正常に Rubisco に組み込まれていることが分かった。また、OsRbcS1 が発現する葉鞘の Rubisco についてもサブユニット構造の解析を行い、非形質転換イネにおいても OsRbcS1 は Rubisco の小サブユニットとして機能していることが分かった。

OsRbcS1 を発現させることによって Rubisco が高活性型を高活性型に変換させることに成功したが、光合成速度は増加しなかった。現在、OsRbcS1 高発現 RbcS ノックダウン 2 重形質転換イネのホモ系統を選抜中である。

OsRbcS1 の代謝機能を明らかにするた

めにノックダウン形質転換イネを作出したが、重大な問題があった。それはイネの葉鞘においてはOsRbcS1以外のRbcSも発現していることである。様々な条件でイネを育成したところ、イネの株元に砂を被せて部分的に黄化させた葉鞘ではOsRbcS1のみが発現し、他のRbcSはほとんど発現しないことがわかった。この材料を用いてメタボローム解析を行ったが、今のところ有意な代謝産物量の変化は認められていない。今後、同じように調整した材料を用いてマイクロアレイ解析を行う予定である。

計画当初には予定していなかったが、OsRbcS1のオーソログと考えられる遺伝子がミヤコグサ、トマトにおいても存在することがわかったため、それらについても発現解析を行うこととした。トマトでは雌ずい、雄ずい、未熟な果実、ミヤコグサでは種子や生殖器官で発現が確認できた。しかしながら、イネと同様に葉では全く発現が確認できなかった。

以上のことからOsRbcS1オーソログは様々な植物に存在し、光合成とは直接的に関係のない代謝に関与していると考えられた。今後、様々な角度から研究を展開し、OsRbcS1の機能解明を行いたいと考えている。また、OsRbcS1を利用したイネの光合成の改良についても進めるつもりである。

#### 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4件)

- 1) 深山浩, 高CO<sub>2</sub>環境に適したRubiscoの導入によるイネの光合成能力の改良, 光合成研究 査読有 23巻, 1号 2013年 pp. 24-32.
- 2) Morita K., Hatanaka T., Misoo S., Fukayama H. Unusual small subunit that is not expressed in photosynthetic cells alters the catalytic properties of Rubisco in rice. Plant Physiology, 査読有, 164巻, 1号 2014年, pp. 69-79.
- 3) Adachi M., Hasegawa T., Fukayama H., Tokida T., Sakai H., Matsunami T., Nakamura

- H., Sameshima R., Okada M., Effect of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) and soil/water warming on leaf photosynthetic parameters in rice. Plant Cell Physiology, 査読有, 55巻, 2号, 2014年, pp. 370-380.
- 4) Fukayama H., Koga A., Hatanaka T., Misoo S., Small subunit of a cold-resistant plant, timothy, does not significantly alter the catalytic properties of Rubisco in transgenic rice. Photosynthesis Research, 査読有, 124巻, 1号, 2015年, pp. 57-65.

〔学会発表〕(計8件)

- 1) 深山浩, 石川智恵, 畠中知子, 三十尾修司, ソルガム高活性型Rubiscoの小サブユニットを高発現しRNAi法等でRubisco量を減少させた形質転換イネの生理特性, 日本作物学会, 2013.3.29, 明治大学(神奈川県)
- 2) 森田耕一, 畠中知子, 三十尾修司, 深山浩, イネにおいて葉身で発現しない新規Rubisco小サブユニットOsRbcS1の機能解析, 日本作物学会, 2013.3.29, 明治大学(神奈川県)
- 3) 古賀敦士, 畠中知子, 三十尾修司, 深山浩, 寒地型イネ科牧草チモシーのRbcSを高発現する形質転換イネの光合成特性. 日本作物学会, 2014.3.30, 千葉大学(千葉県)
- 4) 迫田和馬, 畠中知子, 三十尾修司, 深山浩, ソルガム高活性型Rubiscoの小サブユニットを高発現しRNAi法でRubisco含量を減少させた二重形質転換イネの光合成特性. 日本作物学会, 2014.3.30, 千葉大学(千葉県)
- 5) 森田耕一, 畠中知子, 三十尾修司, 深山浩, イネ高活性型Rubisco小サブユニットOsRbcS1の機能解析, 日本作物学会, 2014.3.30, 千葉大学(千葉県)
- 6) 森田耕一, 畠中知子, 三十尾修司, 深山浩, イネ高活性型Rubisco小サブユニット遺伝子OsRbcS1のオーソログの発現解析, 日本作物学会, 2014.9.10. 愛媛大学(愛媛県)
- 7) 深山浩, C<sub>3</sub>植物のC<sub>4</sub>化: Rubiscoだけでも役に立つ? 日本植物学会シンポジウム「C<sub>4</sub>光合成研究の新展開」, 2014.9.12, 明治大学(神奈川県)
- 8) Kobayashi, A., Hatanaka, T., Misoo, S. and Fukayama, H., Functional analysis of Rubisco activase-like protein, OsRca2 in rice. 日本植物生理学会 2015.3.17, 東京農業大学(東京都)

〔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〕(計3件)

報道関係等

- 1) 「でんぶん制御遺伝子を特定」  
神戸新聞など 2015.2.26.

ホームページ等

- 2) 資源植物生産学研究室  
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-sa-kumotsu/>

- 3) 神戸大学インターゲノミクス研究会  
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-intergenomics/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
深山 浩 (FUKAYAMA, Hiroshi)  
神戸大学大学院・農学研究科・助教  
研究者番号：60373255

- (2) 研究分担者  
なし

- (3) 連携研究者  
なし