

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450074

研究課題名(和文) カルビンサイクル酵素の多重増強によるイネの光合成および個体生育の改良

研究課題名(英文) Challenges for the improvement of photosynthesis and plant growth by multiple overexpression of enzymes of the Calvin-Benson cycle in rice

研究代表者

鈴木 雄二 (Suzuki, Yuji)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：80374974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イネにおける光合成機能と個体生育の改良を目指し、カルビンサイクル酵素Rubiscoおよびトランスケトラーゼを同時に増強した。これらの遺伝子を同時に過剰発現したところ転写産物量の増加がみられるとともに、Rubiscoとトランスケトラーゼの量が葉面積あたりでそれぞれ35-53%および39-84%増加した。しかし、光合成速度は野生型から大きく変化することはなかった。以上のように、イネにおけるRubiscoとトランスケトラーゼの同時増強はカルビンサイクル代謝の改善による光合成機能改良には結び付かなかった。

研究成果の概要(英文)：The Calvin-Benson cycle enzymes Rubisco and transketolase were co-overproduced in rice in order to enhance photosynthetic performance and plant growth. The mRNA levels of these genes were increased in transgenic plants with their co-overexpression. The protein levels of Rubisco and transketolase on a leaf area basis were increased by 35 to 53% and 39 to 84%, respectively. However, the rates of CO₂ assimilation were similar to those in wild-type plants. Thus, co-overproduction of Rubisco and transketolase did not lead to enhancement of photosynthetic performance via improvement of the Calvin-Benson cycle metabolism in rice.

研究分野：植物栄養学

キーワード：光合成 炭素同化 カルビンサイクル 遺伝子組換え イネ

1. 研究開始当初の背景

高等植物における光合成機能と個体生育の改良は大気中 CO₂ の削減や食糧およびバイオマスの増産につながるだけでなく、同一の施肥量でも増産効果が得られる場合には施肥量の節減にもつながる。

C₃ 植物の最大光合成速度は、現在の大気環境下ではカルビンサイクルにおける光合成炭酸固定酵素 Rubisco の能力により決定されると考えられている。そこで申請者は Rubisco 量を特異的に増強したイネを作製したが、光合成速度の増大は認められなかった。このことは、イネにおいて光合成を Rubisco とともに律速する未知の因子があることを意味している。

その候補を見出すために、Rubisco 増強イネにおけるカルビンサイクル代謝産物の定量解析を行ったところ、Rubisco の反応生成物である 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) とともに、セドヘプツロース-7-リン酸 (S7P) の量が増加していた (図 1)。

この結果に対し、3-PGA の代謝の段階は光合成を律速しないとの知見が得られていた。すなわち、この段階を担う酵素の活性をアンチセンス法で抑制したタバコでは、光合成速度には大きな影響は認められなかった (引用文献)。また、この段階で消費される ATP や NADPH の供給量に Rubisco 増強イネと野生型イネで差がなかったことも根拠の一つとして挙げられた。

その一方で、S7P の代謝が光合成を律速しうるとの知見が得られていた。すなわち、その代謝を担う酵素トランスケトラゼの活性をアンチセンス法で抑制したタバコでは、酵素活性の低下の分だけ光合成速度も低下していた (引用文献)。これらのことから、イネにおいて光合成を Rubisco とともに律速しているのはトランスケトラゼであると予測された。

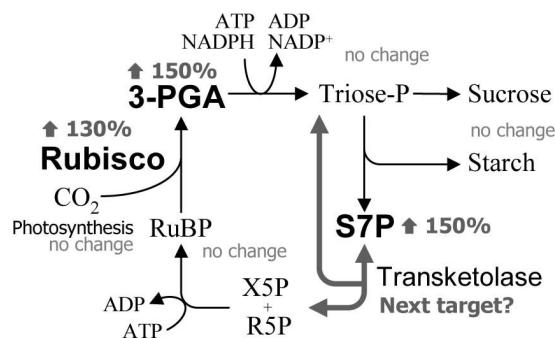


図 1. Rubisco 増強イネの光合成特性の模式図

2. 研究の目的

そこで本研究では、Rubisco とトランスケトラゼを同時に増強したイネを作製することで、光合成機能および個体生育の改良を目指した。はじめに光合成への影響を調べることにした。光合成機能が改良されていた場合、さらに光合成代謝や個体生長に生じる変

化を調べることにした。

なお、トランスケトラゼの増強による光合成や個体生育への影響についての情報が研究開始当初にはなく、その抑制についても報告が 1 例しかなかったため (引用文献)、これらについても調べることにした。

3. 研究の方法

すでに作製済である Rubisco 増強イネとトランスケトラゼ遺伝子を過剰発現することで作製したトランスケトラゼ増強イネ (野生型の 120-180%) を交配し、これらを同時に増強したイネを作製することとした。その後自殖を繰り返し、導入遺伝子がホモ化し形質が安定した系統を選抜することとした。選抜はリアルタイム PCR 法による導入遺伝子のコピー数、ならびに Rubisco とトランスケトラゼのタンパク質の量を指標として行うこととした。これらのタンパク質の量は、最上位完全展開葉の粗抽出液を電気泳動に供した後、タンパク質を色素で染色し、該当するバンドの染色強度から評価することとした。同時に、トランスケトラゼ遺伝子を単独で過剰発現ないし発現抑制したイネについても選抜を行うこととした。

選抜の後、Rubisco およびトランスケトラゼのタンパク質の量を同様に調べるとともに、これらの mRNA 量を定量的 RT-PCR にて測定することとした。なお、Rubisco の mRNA 量は葉のエイジに応じて大きく変動することが知られているが、トランスケトラゼでも同様の現象がみられるかを、エイジの異なるイネ葉を用いて調べることにした。

さらに光合成特性の解析を行った。強光および異なる CO₂ 濃度条件下での CO₂ 固定速度を測定した。なお、トランスケトラゼを単独で過剰発現ないし発現抑制したイネについても解析を行うこととした。

光合成機能に改善がみられた場合、カルビンサイクル代謝産物の定量を CE/MS 解析等に供することで行う予定とした。また、個体生育特性の解析として、個体乾物重、光合成産物であるショ糖、デンプン、ブドウ糖と果糖の蓄積量、窒素の含量を測定する予定とした。

4. 研究成果

まず、Rubisco・トランスケトラゼ同時増強イネの作製を試みた。Rubisco 増強イネとトランスケトラゼ増強イネを交配したところ、これらのタンパク質の量がそれぞれ野生型の 110-120%および 120-180%となった F1 イネを得た。さらにこれらを自殖させ、導入遺伝子をホモ化した F2 世代を獲得した。同様に、トランスケトラゼ遺伝子を単独で過剰発現ないし発現抑制したイネについても、導入遺伝子がホモ化した T2 世代を獲得した。

これらの遺伝子組換えイネ、Rubisco 増強イネおよび野生型イネの Rubisco 量およびトランスケトラゼ量を測定した (図 2)。単位

葉面積当たりで見ると、Rubisco 増強イネでは Rubisco 量が野生型と比べ 40-47%増加し、トランスケトラーゼ増強イネではトランスケトラーゼ量が 80-94%増加した。これらを同時増強したイネでは Rubisco が 36-53%増加し、トランスケトラーゼ量が 39-84%増加した。Rubisco およびトランスケトラーゼの増強によりこれらのタンパク質への窒素分配が増加していたため、特異的に量的増強が行われていたことが確認された。なお、トランスケトラーゼ抑制イネではトランスケトラーゼ量の減少が 20%程度と少なく、その光合成への寄与を調べるのが困難であったため、以降の解析からは除外した。

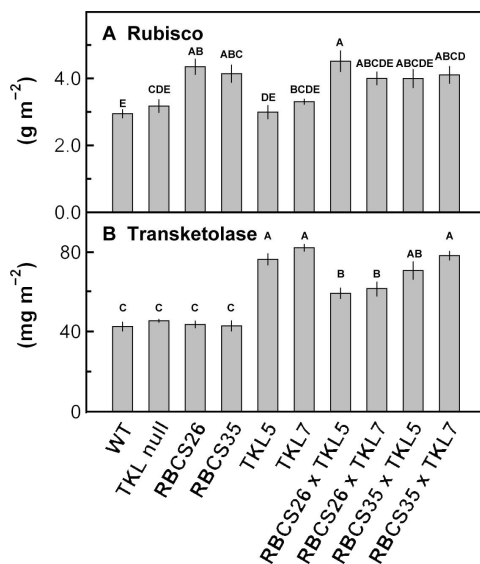


図 2. 野生型イネおよび遺伝子組換えイネの Rubisco およびトランスケトラーゼのタンパク質の量

また、Rubisco 増強イネでは Rubisco 大小サブユニットの mRNA 量が野生型のそれぞれ 1.3-1.4 倍および 1.6-2.0 倍となり、トランスケトラーゼ増強イネではトランスケトラーゼの mRNA 量が 2.5-2.6 倍となっていた。Rubisco・トランスケトラーゼ同時増強イネでもこれらの mRNA 量に増加がみられた (図 3)。

Rubisco とトランスケトラーゼを同時増強した場合、トランスケトラーゼタンパク質の増加量が単独増強時よりも若干低下する傾向にあったが、これは mRNA 量の変化とは必ずしも一致していなかった。Rubisco とトランスケトラーゼの遺伝子発現はともに葉の展開中に活発であり、それ以降は低下していくという共通のパターンを示していた。このため、これらの遺伝子を同時に過剰発現すると、葉に元々大量に存在する Rubisco の増強のために窒素が奪われ、トランスケトラーゼタンパク質の増加量が抑制されたものと考えられた。

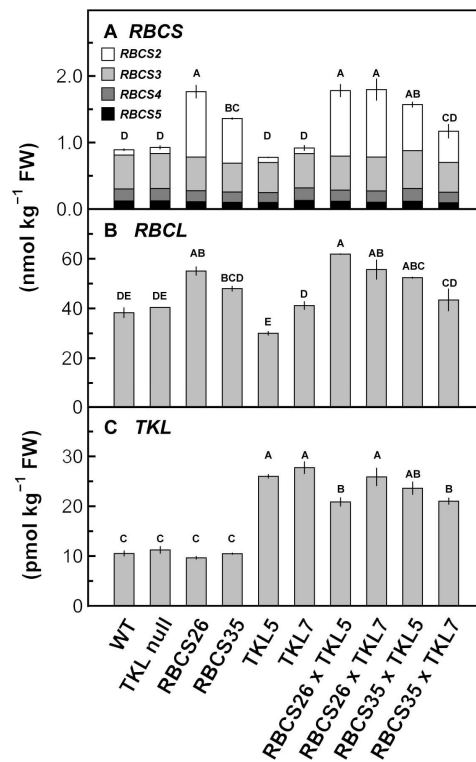


図 3. 野生型イネおよび遺伝子組換えイネの Rubisco およびトランスケトラーゼの mRNA 量

次いで、これら遺伝子組換えイネの光合成特性を評価した。晴天時に相当する光強度、現在の大气 CO₂ 濃度、光合成がより強く Rubisco により律速されると考えられている低 CO₂ 濃度、および過去にトランスケトラーゼにより光合成が律速されているとされた高 CO₂ 濃度での光合成速度を測定したものの、いずれも野生型と比べ大きく変化することはなかった (図 4)。同様に、遺伝子組換えイネと野生型イネとの間に著しいフェノタイプの違いは見られなかった。

以上の結果から、Rubisco およびトランスケトラーゼの同時増強はイネの光合成機能の改良に大きく寄与することはないと現時点では考えられる。なお、光合成特性に大きな変化が見られなかったことから、ここまでの解析結果を論文としてまとめ、以降のカルビンサイクルの代謝産物の解析や生長解析等は中止した。

Rubisco 量を増強するとセドヘプツロース 7-リン酸のプールサイズが増加し、これ以降のカルビンサイクルの代謝が滞るために光合成機能が改良されないと考えられるが、トランスケトラーゼの増強ではこれが解消されなかったと予測された。近年、トランスケトラーゼを増強したタバコでは光合成特性に大きな変化が見られないとの報告もなされているが (引用文献)，これは本研究の結果と一致する。

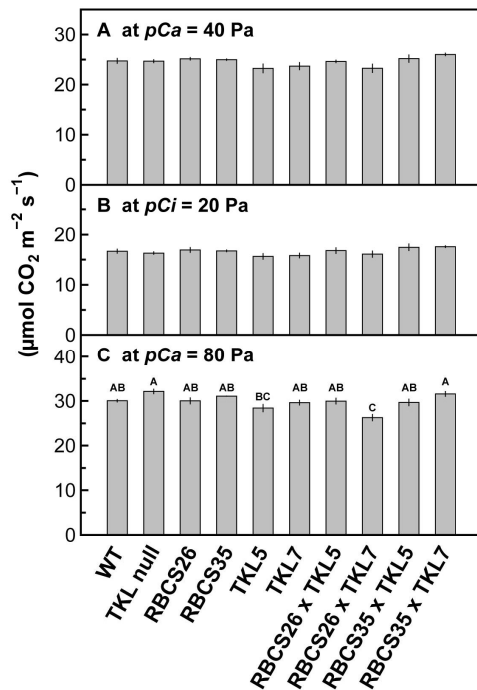


図 4. 野生型イネおよび遺伝子組換えイネの光合成速度

したがって、イネの光合成機能改良に向けたカルビンサイクルの代謝改変ではこれ以外の酵素をターゲットとする必要があるといえる。トランスケトラーゼ以降の反応に着目すると、ペントースリン酸の代謝を担うリブローズ 5-リン酸 3-エピメラーゼの活性の文献値が非常に低かった。そこで、同酵素の増強および対照実験として抑制を行った遺伝子組換えイネの作製に着手した。

<引用文献>

Price GD, Evans JR, von Caemmerer S, Yu JW, Badger MR (1995) Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO₂ assimilation via a reduction in ribulose biphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta* 195:369-378, DOI: 10.1007/BF00202594

Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R, Stitt M (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 13:535-551, DOI: 10.1105/tpc.13.3.535

Khozaei M, Fisk S, Lawson T, Gibon Y, Sulpice R, Stitt M, Lefebvre SC, Raines CA (2015) Overexpression of

plastid transketolase in tobacco results in a thiamine auxotrophic phenotype. *Plant Cell* 27:432-447, DOI: 10.1105/tpc.114.131011

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 2 件)

Suzuki Y, Kondo E, Makino A (2017) Effects of co-overexpression of the genes of Rubisco and transketolase on photosynthesis in rice. *Photosynthesis Research*, 131 : 281-289, DOI: 10.1007/s11120-016-0320-4, 査読有

Yamaoka C, Suzuki Y, Makino A (2016) Differential expression of genes of the Calvin-Benson cycle and its related genes during leaf development in rice. *Plant and Cell Physiology* 57 : 115-124, DOI: 10.1093/pcp/pcv183, 査読有

[学会発表](計 3 件)

鈴木 雄二, 近藤 依里, 牧野 周. イネにおける Rubisco とトランスケトラーゼの同時増強が光合成に及ぼす影響. 日本土壌肥料学会年会, 2016 年 9 月 20-22 日, 佐賀大学本庄キャンパス (佐賀県佐賀市)

山岡 千尋, 鈴木 雄二, 牧野 周. イネ葉の一生におけるカルビンサイクル関連酵素の遺伝子発現の変動. 日本土壌肥料学会年会, 2015 年 9 月 9-11 日, 京都大学吉田キャンパス (京都府, 京都市)

山岡 千尋, 鈴木 雄二, 牧野 周. イネ葉の一生におけるカルビン回路関連酵素の遺伝子発現に窒素供給量が及ぼす影響. 日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16-18 日, 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都, 世田谷区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 雄二 (SUZUKI, Yuji)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号 : 8 0 3 7 4 9 7 4