

イネの光合成能力の改良に向けた炭素同化関連タンパク質の生理・生化学的研究
深山浩 (神戸大学大学院農学研究科)

農業技術の発展により、世界の人口増加を補うペースで食糧生産の増大が図られてきた。しかし、地球環境の悪化とさらなる人口増加により、将来的に食糧危機が訪れることが危惧されている。今後は、限られた耕地面積の中で作物生産量を大幅に増大させなければならない。それを達成するためには、従来の品種改良と栽培技術の改善に加えて、ゲノム情報と遺伝子工学的手法を利用した光合成能力の改良が必要と考えられる。このような観点から深山氏は、主にイネを研究材料として「Rubisco の触媒能力の改良」「 C_3 植物への C_4 光合成回路の付与」「高 CO_2 応答の分子メカニズムの解明」といった挑戦的な課題について精力的な研究を展開し、先駆的かつ顕著な研究成果をあげてきた。研究業績の内容は以下のように要約できる。

1. Rubisco の触媒能力の改良

Rubisco の触媒反応は他の酵素に比べて非常に遅く、光合成の主要な律速因子となっている。Rubisco の触媒速度には種間差があり、イネでは特に低く、 C_4 植物や寒冷地に適応した C_3 植物では高いことがわかっている。触媒速度の高い高活性型 Rubisco は CO_2 に対する親和性が低いために、 CO_2 濃度の低い条件下では植物にとって不利となる。しかし、今後の大気 CO_2 濃度の増加を考えると、将来的にはイネも高活性型の Rubisco を持ち、Rubisco 含量を減らすことで光合成の窒素利用効率を高めることが、物質生産にとって有利となると予想される。

まず深山氏は、 C_4 植物と寒冷地型 C_3 植物の Rubisco の酵素特性と遺伝子配列について解析し、イネの光合成能力の改良に適した Rubisco のスクリーニングを行った (業績 1)。その結果、 C_4 植物のソルガムの Rubisco が顕著に触媒速度が高く、イネ Rubisco との遺伝子配列の相同性も高いことから適していると考えられた。Rubisco は大サブユニット (RbcL) と小サブユニット (RbcS) の 2 種類のタンパク質から構成されている。深山氏は、ソルガムの RbcS を導入することで、イネ Rubisco の触媒速度の大幅な改良に成功した (業績 2)。多くの研究者が Rubisco の触媒特性の改良に取り組んで来たが、目立った成功例が無かったことから、我々の成功は Rubisco 研究におけるブレイクスルーとなった。

Rubisco activase は、Rubisco の活性化を担う分子シャペロン様タンパク質である。高温や変動光の条件下では、Rubisco activase が光合成の律速因子になることが知られている。深山氏は、イネ葉の Rubisco activase 含量を解析し、若い発達中の葉では Rubisco に対する Rubisco activase の量比が低いために Rubisco の活性化速度が低くなることを明らかにした (業績 3, 4)。そして光合成能力の改良のために Rubisco activase を高発現する形質転換イネを作成したところ、予想に反して、Rubisco activase の高発現は Rubisco 含量の減少を引き起こし、光合成能力を低下させてしまうことが明らかとなった (業績 5-7)。葉緑体内での Rubisco の生合成には多数の分子シャペロンや修飾酵素の働きが必要である。深山氏は、過剰に Rubisco activase が存在すると Rubisco の翻訳後の生合成が阻害される可能性があることを示した (業績 7)。これらの結果は Rubisco 含量と Rubisco 活性の最適化を考える上で重要な知見となった。

その他 Rubisco に関しては、寒地型 C_3 植物の RbcS (業績 8)、光合成に関係しない RbcS (業績 9, 10)、Rubisco activase と高温耐性 (業績 11) の研究においても、光合成能力の改良に関係する成果をあげている。

2. C_3 植物への C_4 光合成回路の付与

C_4 植物は、 C_4 光合成回路により Rubisco 周囲の CO_2 濃度を増加させ、Rubisco の触媒効率を高めることで、高い光合成能力を示す。 C_4 光合成には、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、ピルビン酸リン酸ジキナーゼなどの 4 種類の酵素と維管束鞘細胞が光合成的に発達したクランツ構造が必要である。クランツ構造の形成に関する分子メカニズムは不明であり、遺伝子工学を適用できないが、水生植物のクロモは単細胞で C_4 光合成回路を駆動させていることが知られている。そこで深山氏らは、クロモをモデルとした単細胞 C_4 光合成回路をイネに導入することにより、光合成能力の改良を試みた。

C_4 光合成関連酵素は C_4 植物において非常に発現が高い。深山氏らは、トウモロコシ由来の C_4 光合成酵素を C_3 植物のイネで C_4 植物並みに高発現させる手法を開発した (業績 12-14)。また、PEPC の単独の高発現により、光合成の見かけの酸素阻害が軽減されることを明らかにした (業績 12, 15)。しかしながら、4 種類の C_4 光合成関連酵素の全てを同時に高発現させても、 C_4 光合成回路を駆動させることはできなかった (業績 16)。これらの結果から C_3 植物内で C_4 光合成回路を駆動させるためには、やはりクランツ構造の導入が必要であろうことが示唆された。しかし、 C_4 光合成回路において初期炭酸固定を担う PEPC が、イネ内では明期において低活性型 (リン酸化されていない) となることも、イネで C_4 光合成回路が駆動しない原因の 1 つと考えられた (業績 15, 17)。この点について解析を進め、イネが持つ PEPC リン酸化酵素が、他の植物と異なり明期で機能していないことを明らかにした (業績 17)。さらに、イネが持つ PEPC 遺伝子に着目して解析を進め、イネは葉緑体型 PEPC を持つことを発見した (業績 18)。つまり、イネでは葉緑体型 PEPC が明期で働くために、通常の細胞質型 PEPC は明期で働く必要がないことが示唆された。イネへの C_4 光合成回路の付与には未だ成功していないが、PEPC に関して学術的に有用な知見を得ることができた。

3. 高 CO_2 応答の分子メカニズムの解明

大気 CO_2 濃度の増加に対する植物の応答を遺伝子レベルで解明し、将来的な高 CO_2 環境で高い光合成能力や生産性を示す作物を開発することを目的に研究を行った。まず最初に、様々な施設 (環境制御室、雫石 FACE など) を用いてイネを高 CO_2 条件下で育成し、遺伝子レベルでの高 CO_2 応答をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、多くの CO_2 応答性遺伝子を同定することに成功した (業績 19, 20)。その中でも高 CO_2 条件下で顕著に発現が促進される CCT タンパク質 (CRCT) について着目し、機能解析を行った (業績 21)。CRCT を高発現する形質転換イネでは葉鞘と稈といった栄養器官においてデンプン含量が 3-5 倍に増加し、発現抑制イネでは減少した。遺伝子発現解析を行ったところ、形質転換イネでは多くのデンプン合成関連遺伝子の発現が顕著に変化していた。以上の結果から、CRCT はデンプン合成を一括制御するマスター因子であり、イネの収量に関わる栄養器官の一時貯蔵デンプン量を決定する上で重要な遺伝子であることが明らかとなった。さらに、CRCT 高発現イネを高 CO_2 条件下で育成した場合、非形質転換イネに比べて有意に光合成速度が高くなる傾向が得られた (業績 22)。CRCT 高発現イネでは、葉鞘のデンプン含量が増加する一方で、葉身の糖含量が低下していた。つまり、CRCT の高発現により葉鞘のシンク能力が高まり、葉身における糖の転

流が促進されることで、光合成能力を改良することができたとと言える。CRCTは、将来的な高CO₂環境での光合成能力を改良する上でも有用な遺伝子であることが明らかとなった。

その他CRCTに関しては、CRCT高発現イネのわらがバイオエタノール生産のための原料として有用であることについても明らかにしている（業績23）。

以上のように深山氏は、これまで目立った研究成果のない光合成能力の改良という研究分野で多岐にわたる顕著な成果をあげ、この分野の研究推進に大きく貢献した。発表した業績は、国内外の研究グループから高く評価され、数多く引用されている。また、これらの研究成果については日本語の総説にも著しており、広範囲の読者に発信している（業績24-26）。深山氏の業績は日本作物学会賞に値するものと考えられる。

研究業績

1. Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S. & Fukayama, H. (2009) Screening of high kcat Rubisco among Poaceae for improvement of photosynthetic CO₂ assimilation in rice. *Plant Production Science*, 12, 345-350.
2. Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S., Miyake, C., & Fukayama, H. (2011) Functional incorporation of sorghum small subunit increases the catalytic turnover rate of Rubisco in transgenic rice. *Plant Physiology*, 156, 1603-1611.
3. Fukayama, H., Uchida, N., Azuma, T., & Yasuda, T. (1996) Relationships between photosynthetic activity and the amounts of Rubisco activase and Rubisco in rice leaves from emergence through senescence. *Japanese Journal of Crop Science*, 65, 296-302.
4. Fukayama, H., Uchida, N., Azuma, T., & Yasuda, T. (1998) Light dependent activation of CO₂ assimilation and the ratio of Rubisco activase to Rubisco during leaf aging of rice (*Oryza sativa* L.). *Physiologia Plantarum*, 104, 541-548.
5. Masumoto, C., Fukayama, H., Hatanaka, T., & Uchida, N. (2012) Photosynthetic characteristics of antisense transgenic rice expressing reduced levels of Rubisco activase. *Plant Production Science*, 15, 174-182.
6. Fukayama, H., Ueguchi, C., Nishikawa, K., Katoh, N., Ishikawa, C., Hatanaka, T., & Misoo S. (2012) Overexpression of Rubisco activase decreases the photosynthetic CO₂ assimilation rate by reducing Rubisco content in rice leaves. *Plant & Cell Physiology*, 53:976-986. 2012.
7. Fukayama, H., Mizumoto, A., Ueguchi, C., Katsunuma, J., Morita, R., Sasayama, D., Hatanaka, T., & Azuma, T. (2018) . Expression level of Rubisco activase negatively correlates with Rubisco content in transgenic rice. *Photosynthesis Research*, (in press)
8. Fukayama, H., Koga, A., Hatanaka, T., & Misoo, S. (2015) Small subunit of a cold-resistant plant, timothy, does not significantly alter the catalytic properties of Rubisco in transgenic rice. *Photosynthesis Research*, 124, 57-65.
9. Morita, K., Hatanaka, T., Misoo, S., & Fukayama, H. (2014) Unusual small subunit that is not expressed in photosynthetic cells alters the catalytic properties of Rubisco in rice. *Plant Physiology*, 164, 69-79.
10. Morita, K., Hatanaka, T., Misoo, S., & Fukayama, H. (2016) Identification and expression analysis of non-photosynthetic Rubisco small subunit, OsRbcS1-like genes in plants. *Plant Gene*, 8, 26-31.
11. Yamori, W., Masumoto, C., Fukayama, H., & Makino, A. (2012) Rubisco activase is a key regulator of non steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *Plant Journal*, 71, 871-880.
12. Ku, M.S.B., Agarie, S., Nomura, M., Fukayama, H., Hirose, S., Toki, S., Miyao-Tokutomi, M., & Matsuoka, M. (1999) High level expression of maize C₄-specific phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotechnology*, 17, 76-80.
13. Fukayama, H., Tsuchida, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, H., Ono, K., Lee, B.-H., Hirose, S., Toki, S., Ku, M.S.B., Makino, A., Matsuoka, M., & Miyao, M. (2001) Significant accumulation of C₄-specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C₃ plant, rice. *Plant Physiology*, 127, 1136-1146.
14. Tsuchida, H., Tamai, T., Fukayama, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, H., Ono, K., Nishizawa, Y., Lee, B.-H., Hirose, S., Toki, S., Ku, M.S.B., Matsuoka, M., & Miyao, M. (2001) High level expression of C₄-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth of a C₃ plant, rice. *Plant & Cell Physiology*, 42, 138-145.
15. Fukayama, H., Hatch, M.D., Tamai, T., Tsuchida, H., Sudoh, S., Furbank, R.T., & Miyao, M. (2003) Activity regulation and physiological impacts of the maize C₄-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. *Photosynthesis Research*, 77, 227-239.
16. Taniguchi, Y., Ohkawa, H., Masumoto, C., Fukuda, T., Tamai, T., Lee, K.H., Sudoh, S., Tsuchida H., Sasaki, H., Fukayama, H., & Miyao, M. (2008) Overproduction of C₄ photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C₄-like photosynthetic pathway into rice. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1799-1809.
17. Fukayama, H., Tamai, T., Taniguchi, Y., Sullivan, S., Miyao, M., & Nimmo, H.G. (2006) Characterization and functional analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in rice. *Plant Journal*, 47, 258-268.
18. Masumoto, C., Miyazawa, S., Ohkawa, H., Fukuda, T., Taniguchi, Y., Murayama, S., Kusano, M., Saito, K., Fukayama, H., & Miyao, M. (2010) Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 5226-5231.
19. Fukayama, H., Fukuda, T., Masumoto, M., Taniguchi, Y., Sakai, H., Cheng, W., Hasegawa, T., & Miyao, M. (2009) Rice plant response to long term CO₂ enrichment: Gene expression profiling, *Plant Science*, 177, 203-210.
20. Fukayama, H., Sugino, M., Fukuda, T., Masumoto, C., Taniguchi, Y., Okada, M., Sameshima, R., Hatanaka, T., Misoo, S., Hasegawa, T., & Miyao, M. (2011) Gene expression profiling of rice grown in free air CO₂ enrichment (FACE) and elevated soil temperature. *Field Crops Research*, 121, 195-199.
21. Morita, R., Sugino, M., Hatanaka, T., Misoo, S., & Fukayama, H. (2015) CO₂-responsive CONSTANS, CONSTANS-like, and time of chlorophyll a/b binding protein Expression1 protein is a positive regulator of starch synthesis in vegetative organs of rice. *Plant Physiology*, 167, 1321-1331.

22. Morita, R., Inoue, K., Ikeda, K., Hatanaka, T., Misoo, S., & Fukayama, H. (2016) Starch content in leaf sheath controlled by CO₂-responsive CCT protein is a potential determinant of photosynthetic capacity in rice. *Plant & Cell Physiology*, 57, 2334-2341.
23. Morita, R., Teramura, T., Ogino, C., Kondo, A., & Fukayama, H. (2017) Overexpression of CO₂ responsive CCT protein, a key regulator of starch synthesis strikingly increases the glucose yield from rice straw for bioethanol production. *Plant Production Science*, 20, 441-447.
24. 徳富（宮尾）光恵・深山浩 2005. C₃ 植物への C₄ 光合成回路の付与 可能性, 問題点, そして展望. 化学と生物 43 : 642-647.
25. 深山浩 2013. 高 CO₂ 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 23 : 24-31.
26. 深山浩 2013. 植物の高 CO₂ 応答における遺伝子発現変化. 化学と生物, 51 : 710-716.