

ユーカリ葉における CO₂ 同化酵素ルビスコの 量的制御機構の解析

Analysis of Molecular Mechanism that Regulates the Amount of Carbon-Fixing Enzyme “Rubisco” in a Leaf of *Eucalyptus* Plant

鈴木 雄二

東北大学大学院農学研究科 助教

Yuji SUZUKI

Assistant Professor, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

研究の概要

植物葉の光合成能力は、葉緑体に存在する光合成炭酸同化酵素の量により決定される。木本植物の葉の光合成能力を強化することで大気中の CO₂ 削減の効率化を図る際には、葉の光合成炭酸同化酵素の量を分子生物学的な手法を用いて最適化するという手段が有効であると期待される。これを行うためには、生体内で光合成炭酸同化酵素の量を制御する機構が解明されていなければならないが、木本植物においては全くわかっていない。そこで本研究では、有用な木本植物であるユーカリを材料とし、葉が出葉してから成熟し、その後老化し枯死するまでの一生の間において光合成炭酸同化酵素の量がどのように制御されているのかを、その生合成に関与する分子機構のレベルから明らかにすることを目的とする。本研究の結果から、光合成炭酸同化酵素の量の最適化を図る際に必須となる基礎的な知見を得ることができる。

Abstract

Chloroplastic enzyme “Rubisco” plays a central role as a key enzyme for carbon fixation in photosynthesis. It is supposed that optimization of Rubisco content is effective for an enhancement of photosynthesis in tree leaves. However, mechanisms that regulate Rubisco content are still unclear in trees. To clarify this point, changes in biosynthesis of Rubisco will be studied during a lifetime of *Eucalyptus* leaves.

1. 研究目的

植物葉の光合成能力は、葉緑体に局在し CO₂ 同化反応を行う酵素 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (ルビスコ; EC 4.1.1.39) の量により決定される。木本植物の葉の光合成能力を強化することで大気中の CO₂ 削減の効率化を図る際には、葉のルビスコ量を分子生物学的な手法を用いて最適化するという手段が有効であると期待される。これを行うためには、生体内でルビスコ量を制御する機構が解明されていなければならない。草本植物においては、ルビスコの量的制御に関わる研究は多く行われてきている。例えば、イネやダイズにおいては、葉の一生におけるルビスコの量的変動がルビスコタンパク質の生合成と分解によりどのように説明されるかが明らかにされている (Mae et al. *Plant Cell Physiol* 24, 1079-1086, 1983; 戸内ら, *土肥誌* 59, 573-578, 1988)。両植物種において、ルビスコの生合成は葉の展開の過程において活発であり、ルビスコ量の増加の主要因となる。その一方で、完全展開した成熟葉ではルビスコの生合成は著しく低下し、これに代わってルビスコの分解が活発となり、葉の老化に伴うルビスコ量の低下の主要因となる。また、イネ葉の一生においてルビスコの生合成は遺伝子発現により制御されていることが、ルビスコの生合成速度と mRNA 量の変動がおおむね一致することから示唆されている (Suzuki et al. *Plant Cell Environ* 24,

1353-1360, 2001)。しかし、木本植物においてはこれらのことが全くわかっていない。

そこで本研究では、有用な木本植物であるユーカリを材料とし、葉が出葉してから成熟し、その後老化し枯死するまでの一生の間においてルビスコ量がどのように制御されているのかを、ルビスコタンパク質の生合成に関与する分子機構のレベルから明らかにすることを目的とする。本研究を行うことで、木本植物の光合成能力を強化する際に必須となる基礎的な情報を提供する、という寄与ができる。具体的には、以下の解析を行う。ルビスコの生合成速度を、植物体を重窒素でラベルした際のルビスコへの重窒素の取り込み量から測定する。ルビスコの生合成速度と密接な関係にある葉への窒素流入速度を、葉への重窒素の取り込み量から測定する。また、ルビスコの遺伝子である *RBCS* および *rbcL* の mRNA 量を定量する。

2. 研究経過

ユーカリ・グロブラス (*Eucalyptus globulus globulus*) をガラス温室内で水耕法にて栽培した。栽培中には腋芽を全て取り除き植物体の分枝を防ぐことで、葉齢の違いを葉位により容易に判別できるようにした。播種後 4.5 ヶ月後に、重窒素でラベルした硫酸を含む水耕液を与え、3 日後に葉位別に葉をサンプリングした。このときの樹高および節数はそれぞれ 159 ± 7 cm および 28 ± 2 (平均 \pm 標準誤差, $n = 3$)

であった。上位葉の中で大きさが完全展開葉の約半分となった葉、および、下位葉の中で大きさが完全展開葉と同等であった最下位の葉を、それぞれ解析に用いる最上位葉と最下位葉とし、実際には上位6葉、中位3葉、下位3葉を用いた。最上位完全展開葉は第3葉であった。

葉のルビスコ定量は、葉の磨砕液を SDS-PAGE に供した後クーマシー染色を行い、ルビスコのバンド強度を測定することで行った。ルビスコの生合成速度の測定は、葉の磨砕液を SDS-PAGE に供した後 Zn を用いたネガティブ染色を行い、ルビスコのバンドからタンパク質を回収し、重窒素アナライザー (N-151, 日本分光) でその重窒素含量を測定することで行った。葉の全窒素量は、葉の磨砕液をキエルダール分解後ネスラー法にて測定した。葉への窒素流入速度の測定は、

このキエルダール分解液に含まれる重窒素含量を測定することで行った。

3. 研究成果

葉の単位新鮮重当たりのルビスコ量は葉の展開に伴いやや増加し、最上位完全展開葉ではほぼ最大に達した後、中位葉までは維持されていたが、下位葉ではやや減少する傾向にあった (図 1a)。一方で、ルビスコの生合成速度は最上位葉で最大となり、葉位の低下に伴い速やかに低下した (図 1b)。最上位葉と比べ、最上位完全展開葉では 58%、第 6 葉では 8%、中位葉では 5% 程度、下位葉では 2% 程度であった。全窒素量は全ての葉位においてほぼ一定であったが、最上位葉で最も高く、葉位の低下に伴いわずかに低下する傾向にあった (図 1c)。葉への窒素流入速度は、ルビスコの生合成速度と同様な変動を示した (図 1d)。両者の関

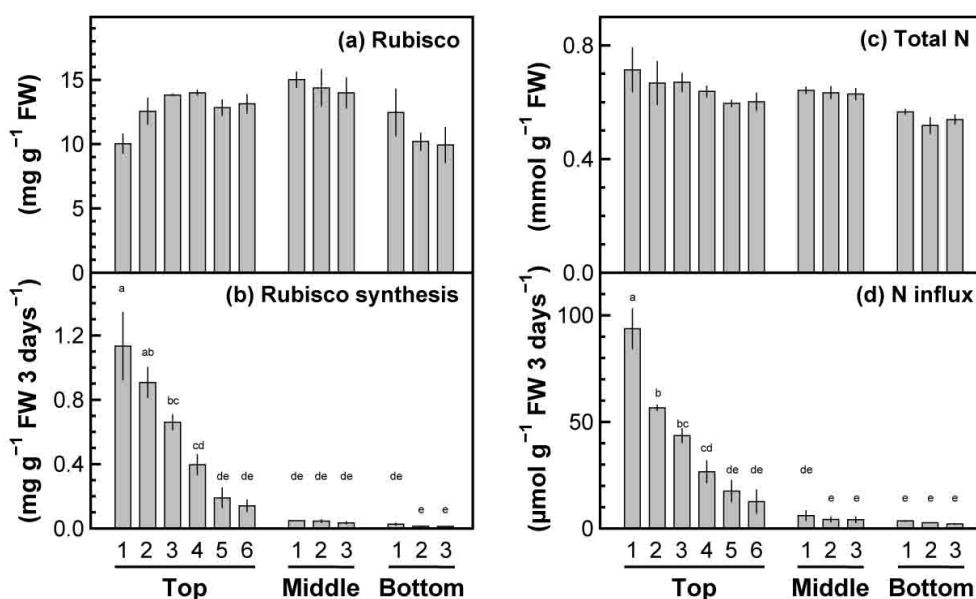


図 1. 異なる葉位のユーカリ・グロブラス葉におけるルビスコ量 (a)、その生合成速度 (b)、全窒素量 (c) および窒素流入速度 (d)。データは平均 ± 標準誤差 (n = 3)。同じアルファベットの間には有意差がない (Tukey 法、 $P < 0.05$)。

係を調べたところ、ほぼ原点を通る 1 本の直線に回帰され、きわめて高い正の相関関係にあることが分かった (図 2)。以上のことから、ユーカリ・グロブラスにおいて、ルビスコの生合成は展開中の若い葉で活発であり、葉面積の拡大に伴うルビスコ量の増加の主要因となる一方で、葉の成熟後には著しく低くなり、ルビスコ量の維持にはほとんど貢献しておらず、むしろルビスコタンパク質の安定性の高さがその主要因であることが強く示唆された。葉の老化に伴いみられたルビスコ量の減少の原因は、ルビスコタンパク質の分解であると予想される。また、葉への窒素流入速度がルビスコの生合成速度を支配する因子であることが強く示唆された。これらの特徴は、イネやダイズでみられたものと基本的には同様であり、ルビスコ量を制御するメカニズムは木本・草本の違いによらず共通していると考えられる。

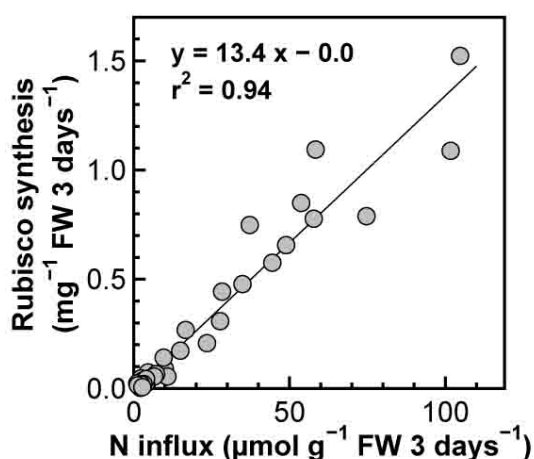


図 2. 異なる葉位のユーカリ・グロブラス葉におけるルビスコ生合成速度と窒素流入速度との間の関係。

4. 今後の課題と発展

ルビスコの mRNA 量については、当初はノーザンブロット法にて測定する予定であったが、**multigene family**を形成していると強く予想されるルビスコ小サブユニット *RBCS* 遺伝子に関する情報が、ユーカリにおいては全く分かっていないため、その全分子種の塩基配列を決定したうえで、RT-qPCR 法にて定量することとした。現在は、total RNA の抽出を終え、*RBCS* の塩基配列の決定を行っているところである。木本植物において *RBCS* 遺伝子の分子種の構成と発現を調べた例は皆無であり、ここで得られる結果はきわめて貴重なものとなる。これを行うことで、ルビスコ量の最適化による葉の光合成能力の強化を、より緻密な制御をもって試みることができるようになる。なお、申請者はユーカリの遺伝子組換えに関するノウハウを現時点では持っていないので、国内外でこれが可能なグループと共同研究を行うことが望ましい。

5. 発表論文リスト (印刷中も含む)

なし