

日産科学振興財団助成研究

特別研究課題

樹木の光合成促進を目指した基礎研究：
CO₂固定酵素ルビスコの機能改良

成果報告書 要報
(2005年～2007年)

研究代表者

横田明穂

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 教授

2008年5月8日 提出

1. 特別研究課題の概要

・研究の学術的・社会的意義

植物光合成は、葉細胞に含まれる細胞内小器官である葉緑体で行われる太陽エネルギー固定反応である。一般に植物葉においては、葉表面に存在する気孔を通してCO₂を吸収すると同時に、その際に気孔から水が蒸散し、蒸散水の気化熱によって葉面温度は低く調整される。根系から葉までの距離の短い草本植物は、葉の水分含量を高く保つことができ、気孔は全開可能である。その結果、光合成中の葉内の炭酸ガス濃度は大気中の70%程度である。しかし、土壌水から光合成組織までの距離が長い木本植物では水の確保が難しく、気孔は閉じ気味である。その結果、葉は蒸散を抑制できる代わりに葉内のCO₂濃度は低く、大気の半分以下の濃度で光合成することを強いられている。したがって、樹木地上部の最先端では直射日光が照射され太陽エネルギーは豊富に存在するが気孔が閉鎖気味で葉内CO₂濃度は低く、生産性は葉が有する光合成能力ほどには達せず、逆に活性酸素の生成など、光酸化ストレスを蒙る危険性が大きい。樹木は葉面積指数*を大きくすることによってこの三重苦による低光合成効率を補っている。したがって、より多くの水を吸収し葉に供給でき、低い気孔開度で葉内CO₂濃度が低い状態でも光合成CO₂固定が可能な樹木創成のための基盤構築が本研究の目標である。

日本国土全体に降り注ぐ年間太陽エネルギー量は 6×10^{17} kcalである。一方、この国土全体を植物で埋め尽くして植物に光合成させると 10^{15} kcalの太陽エネルギーをセルロースなど有機化合物として固定できる。一方、我々は快適な車生活に年間 10^{15} kcalの化石燃料を使っている。しかし、我が国土の67%が森林で、15%が耕作地である。この限られた国土で、より多くのCO₂を数百年にわたり地下に隔離できる樹木根に貯蔵する方策は、高機能化樹木による大気CO₂吸収である。この科学技術は日本のみならず、中国、インドネシアやオーストラリアなどの広大な未利用地を持つ諸国の緑化に最適である。また、樹木光合成機能の向上技術樹木としてのヤトロファ (*Jatropha curcas* L.) に適応可能であり、この技術に期待される社会的な意義は大きい。

*葉面積指数：Leaf Area Index (LAI)といい、土地面積1平方メートル当たりの全葉面積のこと。もっとも多く見られるLAIは、熱帯雨林で $8 \text{ m}^2/\text{m}^2$ 、常緑温帯林や北方針葉樹林で $1.2 \text{ m}^2/\text{m}^2$ 、農作物で $4 \text{ m}^2/\text{m}^2$ である。

・ 研究の概要

上述したように、樹木の光合成は、その生産性において多くの不都合を不可避的に有している。言わば、非効率、高リスク、低生産性プロセスで、そのために樹木は3次元的に多くの葉を付け、この低生産性を克服しようとしている。樹木光合成のこれらの負の要因は、植物科学が過去に研究してきた成果で解決可能な過程であり、本研究はまさにそこに焦点を絞り、樹木生産性の拡大を図ることによって環境 CO₂ 削減に資する理想型樹木光合成の実現を目指すものである。本研究では(1) CO₂固定酵素ルビスコの改良と(2)根からの水分獲得能強化に着目して研究を行った。

(1) CO₂固定酵素ルビスコの機能改良

現植物が持つ光合成 CO₂固定酵素ルビスコの酵素としての性質は、植物にとって劣悪である。CO₂固定(カルボキシラーゼ反応)は3.3/秒/反応部位と極めて遅く、O₂との反応(オキシゲナーゼ反応)によって拮抗的に阻害される。植物はこの劣悪さの克服のために、大量のルビスコを合成し、CO₂取り込み口である気孔を大きく開けて光合成を行う。このような適応の結果でさえ、ルビスコの触媒ステップが植物のCO₂固定のボトルネックとなっている。一方、樹木の光合成はルビスコの劣悪さに加え、光合成組織である葉が地上部から高く、水の供給面で草本類に比べ不利である。この二重苦が原因で、樹木葉の光合成能力は一般的に高くない。植物が現在の地球上で遭遇している、あるいは近い将来遭遇するであろう環境下においても十分な生産性を保つためには、反応速度が大きく、CO₂への親和性が高く、O₂と反応せず、カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ比特異性(Srel)が高いルビスコ酵素を持つ必要がある。我々の研究の究極的ゴールは、CO₂高親和性でオキシゲナーゼ活性を欠失したルビスコ、Super-ルビスコの創成とその植物葉緑体での機能発現の達成である。

(1)では、(a)研究代表者が発見した最も高いSrel値を示す紅藻 *Galdieria* ルビスコと植物ルビスコのタンパク質構造比較から *Galdieria* ルビスコにおけるオキシゲナーゼ反応抑制残基を明らかにすることと、明らかにした残基をタバコ植物に導入することによる構造活性相関研究を目指した。また、(b)タバコ植物に *Galdieria* ルビスコ遺伝子を導入して機能させるための系の確立を目指した。

(2) 根からの水分獲得能強化

我々はこれまでに、乾燥・強光ストレス耐性を示す野生種スイカの研究から、

野生種スイカがストレス時に土壌水獲得のために根を生長させる現象と、このストレス応答性の根の生長促進に関与する遺伝子 DRIP49 を発見してきた。さらに、DRIP49 をモデル植物であるシロイヌナズナに導入することにより、根の生長が促進されることを明らかにしてきた。これらの成果から、DRIP49 は、樹木の土壌水分獲得能強化を行う上で、強力なツールとなると期待された。

一方、これまでにルビスコとともに光合成 CO₂ 固定経路のボトルネックとなっている FBP/SBPase 触媒ステップをラン藻由来の FBP/FPase 遺伝子を導入し強化することで、タバコの光合成 CO₂ 固定能力と植物生産性を増加させることに成功している。ラン藻 FBP/SBPase 遺伝子導入は、ルビスコの活性化を引き起こし、これが光合成 CO₂ 固定能力向上の原因であった。

このように、ソース器官である葉における光合成強化技術とシンク器官、または水分獲得器官である根の生長促進技術を用い、シンクソース両強化による植物光合成能力と生産性改良を行い、多重遺伝子導入による樹木生産性拡大の可能性を明らかにすることを目的として研究を行った。

(1)、(2) 両研究の成果は、タバコの光合成機能向上に資する知見を与える。すでに、樹木であるヤトロファで核の、ポプラで核および葉緑体の形質転換系が確立されており、本研究成果は樹木光合成機能の改良に威力を発揮すると期待される。

・ 目標値

(1) CO₂ 固定酵素ルビスコの機能改良

(a) 紅藻ルビスコにおけるオキシゲナーゼ反応抑制残基の同定とその残基の植物ルビスコへの導入

優良な紅藻ルビスコと植物ルビスコの構造比較から想定された、紅藻ルビスコにおいてオキシゲナーゼ反応抑制に関与する残基をラン藻、タバコルビスコに導入し、導入効果の評価を行う。

(b) 紅藻ルビスコの植物における機能発現

紅藻ルビスコ遺伝子をタバコに導入し、最適な紅藻ルビスコ発現系の構築を行う。

(2) シンクソース同時強化による植物生産性の改良

DRIP49 単独、または DRIP49、FBP/SBPase 両遺伝子を導入した形質転換タバコの作製とその植物体の解析を行う。

・ 研究従事者と研究分担

研究代表者：横田明穂（国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 教授）

本研究プロジェクトの全進行指揮と統括

共同研究者 1：加藤晃（国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 助教）

（1）CO₂固定酵素ルビスコの機能改良（b）紅藻ルビスコの植物における機能発現における、紅藻ルビスコ小サブユニット遺伝子のタバコ核ゲノムへの導入とルビスコ発現抑制タバコの作製を担当した。

共同研究者 2：蘆田弘樹（国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 助教）

共同研究者 1 以外の（1）CO₂固定酵素ルビスコの機能改良と（2）シンクソース同時強化による植物生産性の改良に関する研究を担当した。

2. 研究成果の総括

（1）CO₂固定酵素ルビスコの機能改良

（a）紅藻ルビスコにおけるオキシゲナーゼ反応抑制残基の同定とその残基の植物ルビスコへの導入

紅藻ルビスコと植物ルビスコの X 線結晶解析からの立体構造比較から、紅藻ルビスコに特異的にみられる触媒ループ安定化構造を見出した。触媒ループは全てのルビスコが有しており、カルボキシラーゼ反応における CO₂ 付加後の反応中間体を安定化するために必須の構造である。紅藻ルビスコでは、触媒ループ上の 332 番目のバリリンと 386 番目のグルタミンの間に水素結合が形成されており、触媒ループを反応中間体をより安定化する場所に最適化していると予想された。我々は、この水素結合をラッチ構造と命名した。ラン藻や植物ルビスコでは 386 番目のグルタミンがヒスチジンに置換されているために、ラッチ構造は形成されない。ラッチ構造が紅藻ルビスコにおけるオキシゲナーゼ反応抑制残基であるかを検証するために、ラン藻ルビスコの 386 番目のヒスチジンを紅

藻型のグルタミンに置換した。その結果、変異ラン藻ルビスコ野生型ルビスコと比較して、オキシゲナーゼ反応が抑制され、CO₂識別能力が約 1.2 倍に増加した。これまでのルビスコ改良研究で CO₂識別能力を向上させた例はほとんどなく、今回の結果は、植物ルビスコの改良法技術の代表的なものになると考えられる。この結果を受け、ルビスコ遺伝子に 386 番目のヒスチジンをグルタミンに置換するための変異を導入した形質転換タバコを作製した。

目標に対する達成度と今後の課題

紅藻ルビスコにおけるオキシゲナーゼ反応抑制残基を同定し、この残基をラン藻ルビスコに導入することによりオキシゲナーゼ反応抑制による CO₂ 識別能力を増加させることができたことから、ほぼ目標を達成できたと考えている。今後の課題は、オキシゲナーゼ抑制残基を導入したタバコのルビスコとそのルビスコを有する形質転換植物体の光合成機能評価を行い、植物への応用性を確認する必要がある。

(b) 紅藻ルビスコの植物における機能発現

紅藻においてルビスコの大サブユニットと小サブユニット遺伝子は葉緑体ゲノムにコードされているが、植物においては、核ゲノムに小サブユニット、葉緑体ゲノムに大サブユニット遺伝子がコードされている。これらの事実から、紅藻ルビスコを植物で機能発現させるために、植物における紅藻ルビスコの発現様式として、葉緑体ゲノムにルビスコ大サブユニットと小サブユニット遺伝子を導入する方法と、核ゲノムに小サブユニット、葉緑体ゲノムに大サブユニット遺伝子を導入する方法が考えられた。そこで、まず葉緑体ゲノムに紅藻ルビスコの両サブユニット遺伝子を導入した形質転換タバコを作製した。しかしながら、形質転換タバコにおいて、紅藻ルビスコの発現を確認することはできなかった。さらに、この形質転換タバコは生育遅延、不稔の表現系を示し、この原因が内在性タバコルビスコの著しい減少であると考えられた。これらの結果から、葉緑体ゲノムに両サブユニット遺伝子を導入しても紅藻ルビスコを機能発現させることができないこと、内在性タバコルビスコと紅藻ルビスコの発現が競合し合っていることが示唆された。この問題を解決するために、内在性タバコルビスコの発現を抑制したタバコの核ゲノムに紅藻ルビスコ小サブユニット遺伝子、葉緑体に大サブユニット遺伝子を導入した形質転換タバコを作製

した。この形質転換タバコにおける紅藻ルビスコの発現を解析した結果、発現を確認することができなかった。以上の結果から、紅藻ルビスコを植物で機能発現させるためには、大小サブユニット遺伝子のみ、またはそれぞれの遺伝子配置のみでは不十分であり、特に、大小サブユニットを最適に折りたたみ会合させる因子が必要であると予想された。そこで、ルビスコの大、小サブユニットを最適に会合させる因子の探索と解析をルビスコ研究のモデル生物であるラン藻を用いて行った。その結果、ラン藻においてルビスコ会合因子を同定することができた。同定したラン藻ルビスコ会合因子は大腸菌におけるラン藻ルビスコ発現を促進したことから、紅藻におけるラン藻ルビスコ会合因子に相当する会合因子を同定し、紅藻ルビスコ遺伝子と会合因子遺伝子を植物で共発現させることにより、紅藻ルビスコ機能発現が可能になると期待された。

目標に対する達成度と今後の課題

紅藻ルビスコの植物における機能発現系の構築には至らなかったが、目標達成のために解決すべき問題点が明らかとなってきた。ラン藻において同定したルビスコ会合因子の研究情報から、紅藻ルビスコ会合因子を同定し、これを応用することにより、紅藻ルビスコの植物機能発現系を構築していくことが今後の課題である。

(2) シンクソース同時強化による植物生産性の改良

核ゲノムに DRIP49 遺伝子を導入したタバコ (DRIP タバコ)、また核ゲノムに DRIP49、葉緑体ゲノムにラン藻 FBP/SBPase 遺伝子を導入した形質転換タバコ (DRIP/FSase タバコ) の作製を行った。DRIP49、FBP/SBPase 遺伝子の導入と発現は、それぞれ PCR とウェスタンブロッティングにより確認した。まずはじめに、DRIP49 導入効果がシロイヌナズナと同様にタバコでも観察されるのかを、DRIP タバコ 6 ラインを用いて、DRIP49 遺伝子導入によるシンク器官である根の生長促進効果を解析した。その結果、DRIP49 遺伝子導入による根の生長促進効果が観察され、この促進効果は DRIP49 発現量と正の相関性を示した。さらに、このように根の生長促進が施された DRIP タバコにおいて、ソース器官である地上部の解析を行った結果、野生株と比較してシュートが伸長し、乾燥重量が増加した。この結果は、DRIP49 導入が根の生長促進とともに地上部の生育促進を可能とすることを示していた。DRIP/FSase タバコにおい

でも、根の生長と地上部生育が促進される傾向が観察された。タバコは樹木のモデル植物であり、タバコでの DRIP49 による根の生長促進成功は、この技術の樹木への応用の可能性を示唆している。DRIP49 の導入により樹木の根の生長促進を誘導し、樹木の土壌水分獲得能力を強化できると期待される。

目標に対する達成度と今後の課題

DRIP49 遺伝子導入により、樹木のモデルであるタバコの根の生長促進と地上部生育促進に成功したことから、本研究項目の目的であるシンクソース同時強化の目標はほぼ達成されたと考えている。しかしながら、最も効果が期待された DRIP/FSase タバコにおける根の生長と地上部の生育促進効果の程度が低かった。DRIP/FSase タバコに関しては、解析する形質転換体の個体数を増やし、再現性を取る必要がある。今後の最も重要な課題は、DRIP49 導入による根の生長促進と地上部生育促進の分子メカニズムを明らかにすることである。DRIP49 の根生長促進技術を用いて、樹木の水分獲得能力強化を目指した研究を行っていく予定である。