

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[‡]

神戸大学 大学院農学研究科
深山 浩*

C₃植物における光合成速度はCO₂固定反応を触媒するRubiscoによって主に律速されていると考えられる。Rubiscoは光呼吸の原因となるオキシゲナーゼ反応も触媒するという欠点を持つことから、C₃植物のRubiscoは触媒速度よりもCO₂に対する特異性を高めることを優先して進化してきた。そのために触媒速度が低く、C₃植物は多量の窒素をこの1つの酵素に投資し窒素利用効率を低下させている。しかし現在大気CO₂濃度は上昇しており、将来的な高CO₂環境下では光呼吸はおのずと抑制されると予想される。よって、今後はCO₂に対する特異性よりも触媒速度の高いRubiscoを持つ方が有利な状況となる。本稿では、我々が進めているC₄植物ソルガムの高活性型RubiscoをC₃植物のイネに導入する試みを紹介するとともに、最近のRubiscoエンジニアリングに関する研究の現状について解説する。

1. はじめに

三大作物の一つであるイネは、主食として世界でも消費されている作物であるとともに、単子葉植物におけるモデル植物でもある。イネの生産を世界的に見ると、現在においても供給が需要を上回っておらず、今後イネを主食とするアジア、アフリカでの人口増加が予想されることから、さらに需要は増加すると考えられる。作物の飛躍的な増産を達成するには、これまでに目立った成功例のない葉面積ベースでの光合成能力の改良のようなブレークスルーが不可欠である。しかしながら、光合成能力は様々な要因によって決まる量的形質であり、どこを改変すれば良いのかが不明確であった。そこで、現在の地球上で起こっているCO₂濃度の上昇を考えると、ターゲットを絞り込むことが可能である。

イネ、ムギ類、ダイズなど主要な作物の多くは、その光合成様式からC₃植物に分類される。リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) は光合成におけるCO₂固定反応を触媒する酵素であり、触媒速度が著しく低いこと、CO₂だけでなくO₂との反応も触媒して光呼吸を引き起こすことから、C₃植物における光合成の主な律速要因となっている^{1,2)}。そのためC₃植物では多量の窒素(緑葉の全窒素の15-35%)をRubiscoに投資している^{3,4)}。

しかしRubiscoが常に光合成を律速するわけではなく、光合成の律速因子はCO₂濃度によって変化する。C₃植物の光合成速度のモデルから⁵⁾、低CO₂から現在の大気条件ではRubiscoが主に光合成を律速するが、CO₂濃度が高まるにつれてRubiscoではなく、代わりにRubiscoの基質であるリブローズ-1,5-ビスリン酸 (RuBP) の再生速度が光合成を律速ようになる。よって、将来的に訪れる高CO₂環境における光合成能力を改良するには、RuBP再生能力を強化してRubisco含量を減少させることが有効と考えられる。しかし、RuBP再生能力はカルビンサイクルのRuBP再生系に働く酵素群や電子伝達系によって決まる複雑な過程であり、特定のターゲットを決めて遺伝子工学的に改変することは難しいと思われる。これまでにカルビンサイクルを構成する酵素であるセドヘプテロース-1,7-ビスリン酸ホスファターゼやフルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼを高発現させることによりRuBP再生能力を強化し、タバコの光合成能力を高めた例はあるが^{6,7)}、他の植物種において同様の効果があるかは不明である。一方Rubisco含量の減少に関しては、アンチセンス法でRubisco含量を減少させたイネで高CO₂条件における窒素当たりの光合成速度が増加することが報告されている⁸⁾。この場合、減少したRubisco分の窒素が他の光合成関連酵素に分配さ

[‡] 解説特集「植物とCO₂」

* 連絡先 E-mail: fukayama@people.kobe-u.ac.jp

れ、RuBP再生能力が高まったために窒素利用効率が改善されたと考えられる。この戦略は比較的簡単であるが理に適っており、多くの植物種に適用可能と思われる。さらにCO₂濃度が高い条件でRubiscoを働かせるC₄植物を考えると、C₄植物は多くの種において触媒速度の高いRubiscoを持ち、Rubiscoに投資する窒素を減少させて窒素利用効率を高めている^{9,10)}。これと同じこと、つまりイネのようなC₃植物に高活性型Rubiscoを導入するとともにRubisco含量を減少させれば、将来的な高CO₂環境で有利に光合成を行う植物を作出できると考えられる。

本稿では、最近我々が進めているC₄植物ソルガムの高活性型Rubiscoをイネに導入する試みについて紹介する。またそれに関連して、Rubiscoの酵素特性の種間差、Rubiscoの生合成と活性化、酵素特性の決定におけるRubisco小サブユニット (RbcS) の重要性、植物Rubiscoの触媒能力の改良に関する研究例について解説する。

2. Rubiscoの酵素特性の種間差とイネの光合成改良に適したRubiscoの探索

生物界に存在するRubiscoはアミノ酸配列、サブユニット構造、触媒機能により大きく4種類 (Form I - IV) に分類することができる¹¹⁾。Form I のRubiscoは8個の大サブユニット (RbcL) と8個のRbcSから構成されるヘテロ16量体 (L₈S₈) であり、プロテオバクテリア、シアノバクテリア、真核藻類、高等植物に広く分布している。それに対して、異なる種のプロテオバクテリア、渦鞭毛藻類はRbcSを持たずRbcLの2量体を基本単位として構成されるForm II のRubiscoを持つ。この他に、*Pyrococcus horikoshii*や*Archaeoglobus fulgidus*などの古細菌に存在するForm III のRubiscoも2個のRbcLで構成されるホモ2量体で機能するものが多いが、Form II のRubisco とのアミノ酸配列の相同性は低い¹²⁾。Form III のRubiscoでは、*Thermococcus kodakaraensis*のように5つの2量体RbcLで構成されるホモ10量体のRubiscoを持つ種も存在する¹³⁾。さらに古細菌、真正細菌においてRubisco活性を持たないRubisco-like Protein (Form IV) が同定されている¹⁴⁾。酵素特性に関してはForm II のRubiscoは触媒速度が高くCO₂/O₂特異性 (V_cK_o/V_oK_c ; V_c はカルボキシラーゼ反応の最大速度、 V_o はオキシゲナーゼ反応の最大速度、 K_c はカルボキシラーゼ反応のミカエリス定数、 K_o は

オキシゲナーゼ反応のミカエリス定数。この値が高いほどCO₂に対する触媒反応の特異性が高い) が低い、Form III のRubiscoはCO₂/O₂特異性が低い、Form I のRubiscoはCO₂/O₂特異性が高いものが多いといった特徴がある¹¹⁾。しかしForm I のRubisco の中でもRubiscoの酵素特性の種間差はそれなりに大きく、CO₂濃縮回路を持つシアノバクテリア、クラミドモナスなどの藻類は、触媒速度が高くCO₂/O₂特異性が低いRubiscoを持っている。一方、*Galdieria sulphuraria*や*Griffithsia monilis*などの紅藻類はCO₂/O₂特異性が非常に高いRubiscoを有している¹⁵⁾。

Form I のRubiscoについては高等植物内に限定してもRubiscoの酵素特性に種間差がある。C₃植物においては固定した炭素の約30%が光呼吸によって失われると見積もられている。そのため、C₃植物のRubiscoは光呼吸を抑制するためにCO₂に対する反応の特異性を高めるように進化してきたと考えられる。一方、CO₂濃縮回路を持つC₄植物、RubiscoのCO₂/O₂特異性と液相中の[CO₂]/[O₂]が高くなる低温に適應したC₃植物は、触媒速度の高いRubiscoを持つことが知られている^{16,17)}。これらの植物が持つ高活性型RubiscoはC₃植物の光合成の改良に有効と考えられる。一方、Rubiscoにおける触媒速度とCO₂/O₂特異性との間にはトレードオフの関係があることが示唆されている¹⁸⁾。つまり、CO₂/O₂特異性が高いRubiscoは触媒速度が低く、逆に触媒速度の高いRubiscoはCO₂/O₂特異性が低いことが予想される。しかしながら、現在大気CO₂濃度は上昇し続けており光呼吸はおのずと抑制されることから、将来的な高CO₂環境においては触媒速度の高い高活性型Rubiscoを持つ方が光合成を有利に行えると考えられる。ただし、当然ながら高活性型であるとともにCO₂/O₂特異性も高いに越したことはなく、例外として紅藻*Griffithsia monilis*は、そのような理想に近いRubiscoを持つことが報告されている¹⁵⁾。

イネの光合成能力の改良を考えた場合、イネ科には多くのC₄植物や寒冷地に適應した種が含まれている。後で述べるように、Rubiscoが生合成され触媒作用を示すまでには宿主内の様々なタンパク質との相互作用が必要であることから、できる限り遺伝的に近縁のイネ科植物の中から有用なRubiscoを探索することが戦略的に望ましいと考えられる。そこで我々はイネ科のC₄植物、耐寒性牧草類、高山植物についてRubiscoの酵素特性を解析した¹⁹⁾。図1に示すとおり、

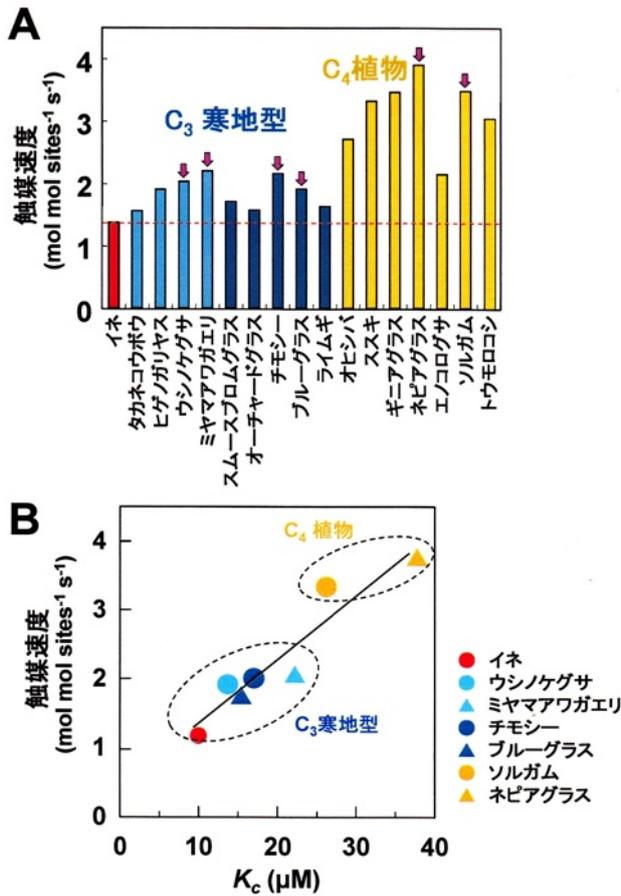


図1 イネ科植物におけるRubiscoの触媒速度
(A) イネ科の高山植物 (水色)、耐寒性牧草類 (青)、C₄植物 (黄) におけるRubiscoの触媒速度。矢印はそれぞれのグループで触媒速度の高かった2種を示し、それらについてK_cの測定を行った。(B) Rubisco触媒速度とK_cとの関係。文献18に記載のデータを用いてグラフを作成または改変した。

解析したすべての植物がイネよりも高いRubiscoの触媒速度を示した。次に、触媒速度が特に高かった植物種についてRubiscoのCO₂/O₂特異性を決める上で重要なK_cを解析した。それらの植物種のRubiscoはイネのRubiscoに比べて有意に高いK_cを示し、触媒速度とK_cには非常に高い正の相関が認められた (図1B)。この関係を見ると、Rubiscoの触媒速度とCO₂/O₂特異性の間にあるとされるトレードオフの関係は、触媒速度とK_cの間の高い相関に起因するものと考えられた。解析した植物の中で、C₄植物のソルガム、寒冷地牧草のチモシー、高山植物のウシノケグサのRubiscoは高い触媒速度の割にK_cが低い傾向を示したことから、イネの改良に有効であると考えられた。イネにソルガムまたはウシノケグサのRubiscoを発現させた場合の光合成速度のシミュレーションを行ったとこ

ろ、高CO₂条件 (葉緑体内CO₂濃度: 50 Pa) における光合成速度 (Rubiscoが律速すると仮定した場合) は、ソルガムRubiscoの導入により40%、ウシノケグサRubiscoにより21%増加することが予想された¹⁹⁾。ソルガムRubiscoの触媒速度はイネの2.5倍であり、ウシノケグサの1.5倍よりも顕著に高かったことから光合成速度の大きな促進効果につながるものと考えられた。

3. Rubiscoが生合成され活性化されるまでの過程は複雑

植物が持つForm IのRubiscoは、合成され活性を持つL₈S₈のサブユニット構造を取るまでの過程が非常に複雑であり、様々なタンパク質との相互作用や修飾を受ける必要がある (図2)。そのためForm IのRbcLを大腸菌などの再構成系の宿主や遠縁の植物内で正しくフォールディングさせて、L₈S₈の機能的なRubiscoを形成させることは困難であり、研究を進める上での障壁となっている。Rubiscoが生合成される過程において、まず葉緑体内でRbcLより転写され生じたmRNAの5'非翻訳領域に、MRL1というペントリコペプチドリピータンパク質が特異的に結合しmRNAを安定化させる²⁰⁾。また、RbcL mRNAの翻訳はRbcSと会合していないRbcLがmRNAに結合することによりフィードバック阻害的な調節を受ける²¹⁾。この現象によってRbcSとRbcLの量が協調的に調節されていると考えられている。そして翻訳後のRbcLは様々なN末端プロセッシングを受ける²²⁾。まず最初にホルミル化されたN末端のMet1がペプチド脱ホルミル酵素によって脱ホルミル化される。その後Met1とSer2が除かれて、N末端になったPro3がN-アセチルトランスフェラーゼによりアセチル化される。その他には、おそらくRbcLが2量体になった後にLys14がRbcLメチルトランスフェラーゼによりトリメチル化される。ただし、このトリメチル化が起こるかは種によって異なる。翻訳後にN末端修飾されたRbcLはHsp70シャペロンシステム (DnaK/DnaJ/GrpE) と相互作用してRbcLの異常なフォールディングを防ぐ¹¹⁾。Rubiscoの生合成に特異的に働くBSD2 (bundle sheath defective2) は、このHsp70シャペロンシステムに必要なタンパク質であると予想されるが、作用点は解明されていない²³⁾。そして部分的に折りたたまれたRbcLは、シャペロニン60/21複合体の中でさらに高度に折りたたまれて最終

表1 植物におけるRubiscoエンジニアリング

宿主	導入したRubisco	酵素特性	特徴	文献
タバコ	ワシ藻 (L)	ND	発現なし	39
タバコ	ヒマワリ (L)	変化なし	Rubisco低発現、生育不良	39, 40
タバコ	トマト (L)	変化なし	Rubisco発現、生育、光合成が少し低下	41
タバコ	フラベリア C ₄ (L)	高活性	Rubisco発現、生育、光合成が少し低下	32
タバコ	紅藻 <i>Galdieria</i> (L:S)	ND	発現するが不溶性	
タバコ	紅藻 <i>Phaeodactylum</i> (L:S)	ND	発現するが不溶性	15
タバコ	<i>R. Rubrum</i> (Form II)	<i>R. Rubrum</i>	Form IIのL ₂ が発現。生育不良、低光合成	36
タバコ	<i>M. burtonii</i> (Form III)	<i>M. burtonii</i>	Form IIIのL ₁₀ が発現。生育に高CO ₂ が必要	37
シロイヌナズナ	エンドウ (S)	変化なし	エンドウRbcS発現低い。活性化率低下	42
イネ	ソルガム C ₄ (S)	高活性	Rubisco高発現。光合成変化なし	35

ND: 測定不可

めにRbcSの効果が明確に出なかった可能性が考えられる。一方、植物以外の宿主を用いてRbcSの効果を検証した研究がある。シアノバクテリアのRbcLは大腸菌内で正しく折りたたまれ、RbcSと機能的な活性のあるサブユニット構造を取ることができる。大腸菌内で高等植物のRbcSとシアノバクテリアのRbcLのハイブリッドRubiscoを形成させたところ、そのハイブリッドRubiscoはシアノバクテリアRubiscoに比べて低いK_cを示した³³⁾。また、クラミドモナスにおいて作出した植物由来のRbcSとクラミドモナスRbcLのハイブリッドRubiscoは、クラミドモナス野生型Rubiscoに比べて高いCO₂/O₂特異性を示した³⁴⁾。これらの報告におけるハイブリッドRubiscoでは触媒速度が低下するなど、酵素特性に不具合を生じている可能性も考えられたため確定的とはいえないが、RbcLだけでなくRbcSも酵素特性の種間差の決定に関係していることを示唆した。後ほど詳しく述べるが、近年我々はRbcSの重要性を示す明確な証拠をソルガム高活性型RubiscoのRbcSを高発現する形質転換イネで得た³⁵⁾。形質転換イネにおけるRubiscoは部分的にソルガムRbcSが組み込まれたイネRbcLとのハイブリッドとなり、ソルガムRbcSの発現が高い系統ではRubiscoの触媒速度がイネ野生型Rubiscoに対して約50%増加した。ソルガムRubiscoの触媒速度はイネの約2.5倍であるので、酵素特性の違いを部分的にしか説明できないが、少なくともRbcSがRubiscoの酵素特性に大きく関わっていることは確かであるといえる。以上のことからRbcLだけではなくRbcSもRubisco酵素特性の重要な決定因子であるという結論となり、酵素特性の改良を考えた場合にRbcLとRbcSの両方がターゲットとなり得ると考えられる。

5. 植物におけるRubiscoエンジニアリング

Rubiscoの酵素特性の改良を目指して多くの研究が行われてきた。ここでは主に植物を実験材料に用いて行われたRubiscoエンジニアリングについて紹介する(表1)。RbcLを形質転換する場合、RbcLは葉緑体ゲノムにコードされていることから、高等植物の中で葉緑体形質転換法が確立されているタバコを用いた研究が多い。タバコのRbcSを残したまま葉緑体形質転換により様々な種のRbcLの導入が行われてきた。タバコ葉緑体はForm II、Form IIIのRubiscoを発現させることができるが^{36,37)}、生合成が複雑なForm Iに関しては特異性があり、シアノバクテリアやイネ、コムギ、トウモロコシといった単子葉植物のRbcLを正常に発現させることができない^{38,39)}。また、紅藻のCO₂/O₂特異性が非常に高いRubiscoについても導入が試みられたが、正常にタンパク質を発現させることができなかった¹⁵⁾。しかし双子葉植物のRbcLについては、比較的遠縁の種のRbcLであっても活性のある機能的なRubiscoが形成される。ヒマワリのRbcLを導入した例では、タバコRbcSと正常な活性のあるハイブリッドRubiscoが形成された⁴⁰⁾。ヒマワリとタバコのRubiscoの酵素特性には差が少ないためハイブリッドRubiscoの酵素特性は変化しなかったが、Rubisco量の低下により光合成や生育が阻害された⁴⁰⁾。一方、タバコと同じナス科に属するトマトのRbcLを導入した場合は、大気条件で生育するのに十分な発現量が得られた⁴¹⁾。よって、遠縁の種のRbcLを導入すると発現量が低くなるが、近縁の種の遺伝子を用いればその問題は克服できると考えられる。しかし、遠縁であれば必ず不具合を生じるというわけではないようで、ヒマワリと同じキク科のフラベリアのRbcLを導入した場合

については比較的高い発現量が得られている³²⁾。この研究ではアミノ酸配列の異なるC₃型、C₃-C₄中間型、C₄型のフラベリアのRbcLを導入しており、Rubiscoの発現量はC₃-C₄中間型において最も少なく非形質転換フラベリアの約50%、C₃型で最も多く75%であった。この3種におけるアミノ酸配列の違いはわずかに3個であるが、転写量に差異がないことから転写後の段階でRubiscoの蓄積量に違いが生じるようである。また重要なことは、C₄型フラベリアのRbcLを導入した形質転換タバコのRubiscoは、触媒速度がタバコに比べて約40%増加したことである。この戦略は有効であるが、葉緑体形質転換が可能な限られた植物種にしか適用できない。我々もイネにおいてソルガムRbcLの葉緑体形質転換を試みているが、今のところ成功していない。

RbcSに関する研究例は少なく、イネにソルガムRbcSを導入した我々の研究の他に、シロイヌナズナにエンドウのRbcSを導入した研究がある⁴²⁾。この場合、形質転換体におけるエンドウRbcSの発現量が少ないこと、エンドウRbcSが部分的に組み込まれたシロイヌナズナRubiscoでは活性化率の低下が起こることを報告している。RbcSについても遠縁の種であれば、Rubiscoの発現や機能に問題を生じる可能性があると考えられる。

植物以外を宿主とした研究としては、大腸菌や光合成細菌を用いて遺伝子シャッフリングなどによりRbcLにランダム変異を導入してRubiscoの酵素特性を改良する試みが行われてきた。これらの方法では、Rubiscoの触媒速度やRuBPに対するK_m値にプラスの効果をおよぼす新たなアミノ酸残基の同定につながった⁴³⁻⁴⁵⁾。ただし、期待されたほどの大きなRubisco酵素特性の改良には至っていないのが現状である。

6. ソルガムRbcSを高発現する形質転換イネ

これまでに述べてきたように、ソルガムの高活性型Rubiscoが将来的な高CO₂環境におけるイネの光合成の改良に有効であると考えられたため、イネへの導入を試みた。今のところソルガムRbcLの葉緑体形質転換には成功していないが、通常のアグロバクテリウム法によりソルガムRbcSを高発現する形質転換イネの作出に成功した³⁵⁾。形質転換イネにおけるソルガムRbcSの発現レベルは非常に高く、最大で全RbcSの約80%に達していた。形質転換イネで発現するRubisco

はblue native - PAGEにおける移動度が非形質転換イネのRubiscoと同等であったことから、正常なL₈S₈構造のRubiscoを形成していると考えられた。ただし、RbcSに関してはイネとソルガムのキメラとなっていると予想される。先にも述べたとおり、このソルガムRbcSが組み込まれたRubiscoは有意に高い触媒速度を示した。少し詳しく述べると、ソルガムRbcSの発現量が高い系統では触媒速度とK_cが30-50%増加し、CO₂/O₂特異性が若干低下する傾向があった。このような酵素特性はソルガムとイネの中間的な値であることから、RbcSの形質転換のみである程度はRubiscoを高CO₂に適した高活性型に改変できることが明らかとなった。このように形質転換イネRubiscoの酵素特性は高活性型になり、さらにRubisco含量が増加したことから、Rubiscoの触媒ポテンシャルは大きく増加したと考えられる。しかし、形質転換イネの光合成速度はRubiscoによって律速される低CO₂条件、RuBP再生系により律速される高CO₂条件のいずれにおいても非形質転換イネと同程度であり、違いは認められなかった。低CO₂条件における光合成速度が促進されなかったのは、形質転換イネRubiscoにおけるK_cの増加やCO₂/O₂特異性の低下が光合成速度に対して負の効果をもたらしたことが一つの要因と考えられる。一方もとよりRubiscoが律速しない高CO₂条件では、Rubiscoの触媒速度を増加させても光合成に変化がないのは当然と考えられる。高CO₂条件では非形質転換イネにおいてもRubiscoの能力は過剰であり、アンチセンス形質転換イネを用いた解析から、非形質転換イネの65%程度のRubisco含量が最適であると見積もられている⁸⁾。高活性型となったソルガムRbcS形質転換イネのRubiscoでは、さらに50%以下にまでRubisco含量を減少させることが可能となる。形質転換イネのRubiscoを適切に減少させることができれば、その分の窒素は他の光合成関連タンパク質に分配されると予想されることから、高CO₂条件での光合成能力のポテンシャルを高めることができるはずである。

したがって次に、ソルガムRbcS高発現イネにおいてRubiscoをRNAi法によりノックダウンすることを試みた。イネは5つのRbcS (*OsRbcS1-5*) を持ち、そのうちの*OsRbcS1*は葉身でほとんど発現していない。そして残りの4遺伝子 (*OsRbcS2-5*) の塩基配列は非常に相関性が高い。一方、*OsRbcS2-5*とソルガムRbcSの塩基配列はコード領域の3'側が比較的異なっている。そこ

で、できる限りイネ*RbcS*のみをノックダウンするように、イネで最も発現が高い*OsRbcS3*の3'側コード領域をRNAiのトリガーとしてソルガム*RbcS*高発現イネ*RbcS*ノックダウン2重形質転換イネを作出した。この戦略はうまく機能し、*Rubisco*含量が減少しイネ*RbcS*の発現がほとんど認められない2重形質転換イネが得られた(図3)。また、ソルガム*RbcS*高発現イネ(SS10系統)の後代からコサプレッションにより*Rubisco*量が減少した系統も得ることができた(図3)。不思議なことに、このコサプレッション系統においてもイネ*RbcS*が特異的にノックダウンされていた。現在、これらの系統を用いて光合成特性、高CO₂条件での生育特性など生理解析を進めている。

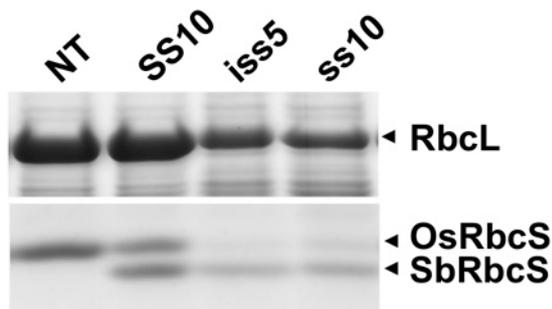


図3 ソルガム*RbcS*高発現イネ*RbcS*ノックダウン形質転換イネにおける*RbcL*と*RbcS*の発現解析

非形質転換イネ(NT)、ソルガム*RbcS*高発現イネ(SS10)、ソルガム*RbcS*高発現イネ*RbcS*ノックダウン2重形質転換イネ(iss5)、ソルガム*RbcS*高発現イネ*RbcS*コサプレッションイネ(ss10)の葉身より可溶性タンパク質を抽出しSDS-PAGE解析を行った。泳動後のタンパク質をCBB染色した。イネ*RbcS*(*OsRbcS*)に比べてソルガム*RbcS*(*SbRbcS*)はSDS-PAGEにおける移動度が大きい。

7. おわりに

我々は、高CO₂環境下での光合成能力を改良することを目的に、高CO₂環境に適応したC₄植物の高活性型*Rubisco*をイネで発現させることを試みた。そして、高活性型*Rubisco*の*RbcS*を導入するだけで、ある程度高活性型の酵素特性を持たせることが可能であることがわかった。*RbcS*のみでも有効ということは、葉緑体形質転換に必要な*RbcL*とは異なり、イネ以外の多くのC₃植物においても適用可能と思われる。コムギ、ジャガイモ、ダイズのような主要作物や多くの野菜類はC₃植物であることから農学的な意義は大きいと考えられる。イネは単子葉植物であるが、双子葉植物の中ではC₄植物のアマランサスが非常に高活性

の*Rubisco*を持つことがわかっており¹⁶⁾、その*RbcS*を同じく双子葉植物のタバコやシロイヌナズナに導入することも興味深い。また、我々はイネを用いた研究で寒地型の植物が持つ高活性の*Rubisco*の*RbcS*の導入など、C₄植物の*Rubisco*とは異なるタイプの高活性型*Rubisco*の*RbcS*の効果を検証し、イネの光合成の改良に最適な*RbcS*の探索も進めている。

将来的な実用化に向けた問題点として、我々は手法的に遺伝子組換えを用いていることから、屋外における栽培実験が現状では困難であることが挙げられる。したがって、FACE実験についても当然できないことから、高CO₂環境における効果を圃場レベルで詳細に検証することは難しい。遺伝子組換え作物に対する国民の理解を得ることも重要であり、世界が*Rubisco*律速から解放されるような高CO₂環境になるまでに、解決しなければならない問題は多い。

謝辞

今回紹介させていただいたソルガムの高活性型*Rubisco*をイネに導入する研究は、神戸大学大学院農学研究科において行われたものであり、担当して下さった学生の皆さんに感謝申し上げます。また、イネの葉緑体形質転換に関しては農業生物資源研究所の市川裕章博士、田部井豊博士のご協力を頂きました。

Received March 13 2013, Accepted March 19, 2013,
Published April 30, 2013

参考文献

1. Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Madgwick, P. J., and Keys, A. J. (2003) Manipulation of *Rubisco*: the amount, activity, function and regulation, *J. Exp. Bot.* 54, 1321-1333.
2. von Caemmerer, S., and Quick, W. P. (2000) *Rubisco*: physiology in vivo, in *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (Leegood, R. C., Sharkey, T. D., and von Caemmerer, S., Eds.) pp 85-113, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
3. Evans, J. R. (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants, *Oecologia* 78, 9-19.
4. Makino, A., Sakashita, H., Hidema, J., Mae, T., Ojima, K., and Osmond, C. B. (1992) Distinctive responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to CO₂-transfer resistance, *Plant Physiol.* 100, 1737-1743.

5. von Caemmerer, S., and Farquhar, G. D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves, *Planta* 153, 376-387.
6. Lefebvre, S., Lawson, T., Zakhleniuk, O. V., Lloyd, J. C., and Raines, C. A. (2005) Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development, *Plant Physiol.* 138, 451-60.
7. Uematsu, K., Suzuki, N., Iwamae, T., Inui, M., and Yukawa, H. (2012) Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants, *J. Exp. Bot.* 63, 3001-3009.
8. Makino, A., Shimada, T., Takumi, S., Kaneko, K., Matsuoka, M., Shimamoto, K., Nakano, H., Miyao-Tokutomi, M., Mae, T., and Yamamoto, N. (1997) Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense *RbcS* lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO₂ and light in rice plants? *Plant Physiol.* 114, 483-491.
9. Ghannoum, O., Evans, J. R., Chow, W. S., Andrews, T. J., Conroy, J.P., and von Caemmerer, S. (2005) Faster Rubisco is the key to superior nitrogen-use efficiency in NADP-malic enzyme relative to NAD-malic enzyme C₄ grasses, *Plant Physiol.* 137, 638-650.
10. Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E., and Mae, T. (2003) Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation, *Plant Cell Physiol.* 44, 952-956.
11. Whitney, S. M., Houtz, R. L., and Alonso, H. (2011) Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco, *Plant Physiol.* 155, 27-35.
12. Andersson, I., and Backlund, A. (2008) Structure and function of Rubisco, *Plant Physiol. Biochem.* 46, 275-291.
13. Kitano, K., and Maeda, N., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2001) Crystal structure of a novel-type archaeal rubisco with pentagonal symmetry, *Structure* 9, 473-481.
14. Ashida, H., Saito, Y., Kojima, C., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Yokota, A. (2003) A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO, *Science* 302, 286-290.
15. Whitney, S. M., Baldet, P., Hudson, G. S., and Andrews, T. J. (2001) Form I Rubiscos from non-green algae are expressed abundantly but not assembled in tobacco chloroplasts, *Plant J.* 26, 535-547.
16. Seemann, J. R., Badger, M. R., and Berry, J. A. (1984) Variations in the specific activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase between species utilizing differing photosynthetic pathways, *Plant Physiol.* 74, 791-794.
17. Sage, R. F. (2002) Variation in the k_{cat} of Rubisco in C₃ and C₄ plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature, *J. Exp. Bot.* 53, 609-620.
18. Tcherkez, G. G., Farquhar, G. D., and Andrews, T. J. (2006) Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 7246-7251.
19. Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S., and Fukayama, H. (2009) Screening of high k_{cat} Rubisco among Poaceae for improvement of photosynthetic CO₂ assimilation in rice, *Plant Prod. Sci.* 12, 345-350.
20. Johnson, X., Wostrikoff, K., Finazzi, G., Kuras, R., Schwarz, C., Bujaldon, S., Nickelsen, J., Stern, D. B., Wollman, F. A., and Vallon, O. (2010) MRL1, a conserved pentatricopeptide repeat protein, is required for stabilization of *rbcL* mRNA in *Chlamydomonas* and *Arabidopsis*, *Plant Cell* 22, 234-248.
21. Wostrikoff, K., and Stern, D. (2007) Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104, 6466-6471.
22. Houtz, R. L., Magnani, R., Nayak, N. R., and Dirk, L. M. (2008) Co- and post-translational modifications in Rubisco: unanswered questions, *J. Exp. Bot.* 59, 1635-1645.
23. Nishimura, K., Ogawa, T., Ashida, H., and Yokota, A. (2008) Molecular mechanisms of RuBisCO biosynthesis in higher plants, *Plant Biotechnol.* 25, 285-290.
24. Liu, C., Young, A. L., Starling-Windhof, A., Bracher, A., Saschenbrecker, S., Rao, B. V., Rao, K. V., Berninghausen, O., Mielke, T., Hartl, F. U., Beckmann, R., and Hayer-Hartl, M. (2010) Coupled chaperone action in folding and assembly of hexadecameric Rubisco. *Nature* 463, 197-202.
25. Portis, A. R. Jr., Li, C., Wang, D., and Salvucci, M. E. (2008) Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco, *J. Exp. Bot.* 59, 1597-1604.
26. Wang, Z. Y., Snyder, G. W., Esau, B. D., Portis, A. R., and Ogren, W. L. (1992) Species-dependent variation in the interaction of substrate-bound ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) and rubisco activase, *Plant Physiol.* 100, 1858-1862.
27. Feiz, L., Williams-Carrier, R., Wostrikoff, K., Belcher, S., Barkan, A., and Stern, D. B. (2012) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase accumulation factor1 is required for holoenzyme assembly in maize, *Plant Cell* 24, 3435-3446.
28. Andralojc, P. J., Madgwick, P. J., Tao, Y., Keys, A., Ward, J. L., Beale, M. H., Loveland, J. E., Jackson, P. J., Willis, A. C., Gutteridge, S., and Parry, M. A. (2012) 2-Carboxy-D-arabinitol 1-phosphate (CA1P) phosphatase: evidence for a wider role in plant Rubisco regulation, *Biochem. J.* 442, 733-742.
29. Spreitzer, R. J. (2003) Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Arch. Biochem. Biophys.* 414, 141-149.

30. Evans, J. R., and Austin, R. B. (1986) The specific activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in relation to genotype, *Planta* 167, 344-350.
31. Li, L. R., Sisson, V. A., and Kung, S. D. (1983) Relationship between the kinetic properties and the small subunit composition of *Nicotiana* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, *Plant Physiol.* 71, 404-408.
32. Whitney, S. M., Sharwood, R. E., Orr, D., White, S. J., Alonso, H., and Galmés, J. (2011) Isoleucine 309 acts as a C₄ catalytic switch that increases ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) carboxylation rate in *Flaveria*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14688-14693.
33. Wang, Y. L., Zhou, J. H., Wang, Y. F., Bao, J. S., and Chen, H. B. (2001) Properties of hybrid enzymes between *Synechococcus* large subunits and higher plant small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.* 396, 35-42.
34. Genkov, T., Meyer, M., Griffiths, H., and Spreitzer, R. J. (2010) Functional hybrid rubisco enzymes with plant small subunits and algal large subunits: engineered *rbcS* cDNA for expression in *chlamydomonas*, *J. Biol. Chem.* 285, 19833-19841.
35. Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S., Miyake, C., and Fukayama, H. (2011) Functional incorporation of sorghum small subunit increases the catalytic turnover rate of Rubisco in transgenic rice, *Plant Physiol.* 156, 1603-1611.
36. Whitney, S. M., and Andrews, T. J. (2001) Plastome-encoded bacterial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) supports photosynthesis and growth in tobacco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 14738-14743.
37. Alonso, H., Blayney, M. J., Beck, J. L., and Whitney, S. M. (2009) Substrate-induced assembly of *Methanococcoides burtonii* D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase dimers into decamers, *J. Biol. Chem.* 284, 33876-33882.
38. Parry, M. A., Andralojc, P. J., Scales, J. C., Salvucci, M. E., Carmo-Silva, A. E., Alonso, H., and Whitney, S. M. (2013) Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement, *J. Exp. Bot.* 64, 717-730.
39. Kanevski, I., Maliga, P., Rhoades, D. F., and Gutteridge, S. (1999) Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid, *Plant Physiol.* 119, 133-142.
40. Sharwood, R. E., von Caemmerer, S., Maliga, P., and Whitney, S. M. (2008) The catalytic properties of hybrid Rubisco comprising tobacco small and sunflower large subunits mirror the kinetically equivalent source Rubiscos and can support tobacco growth, *Plant Physiol.* 146, 83-96.
41. Zhang, X. H., Webb, J., Huang, Y. H., Lin, L., Tang, R. S., and Liu, A. (2011) Hybrid Rubisco of tomato large subunits and tobacco small subunits is functional in tobacco plants, *Plant Sci.* 180, 480-488.
42. Getzoff, T. P., Zhu, G., Bohnert, H. J., and Jensen, R. G. (1998) Chimeric *Arabidopsis thaliana* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase containing a pea small subunit protein is compromised in carbamylation, *Plant Physiol.* 116, 695-702.
43. Parikh, M. R., Greene, D. N., Woods, K. K., and Matsumura, I. (2006) Directed evolution of RuBisCO hypermorphs through genetic selection in engineered *E.coli*, *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 113-119.
44. Greene, D. N., Whitney, S. M., and Matsumura, I. (2007) Artificially evolved *Synechococcus* PCC6301 Rubisco variants exhibit improvements in folding and catalytic efficiency, *Biochem. J.* 404, 517-524.
45. Smith, S. A., and Tabita, F. R. (2003) Positive and negative selection of mutant forms of prokaryotic (cyanobacterial) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *J. Mol. Biol.* 331, 557-569.

Introduction of Rubisco with High Catalytic Turnover Rate into Rice toward the Improvement of Photosynthesis under Elevated CO₂

Hiroshi Fukayama*

Laboratory of Crop Science, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University