

# C<sub>3</sub>植物のC<sub>4</sub>化：Rubiscoだけでも役に立つ？

深山浩

神戸大学大学院 農学研究科 資源植物生産学分野  
〒657-8501 神戸市灘区六甲台町

From C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> photosynthesis: Can the introduction of C<sub>4</sub> Rubisco alone be effective  
for the improvement of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants?

Key words: C<sub>4</sub> photosynthesis; elevated CO<sub>2</sub>; gene engineering; rice (*Oryza sativa*);  
Rubisco; sorghum (*sorghum bicolor*)

Hiroshi Fukayama

Graduate School of Agricultural Sciences, Kobe University  
Kobe, 657-8501, Japan

## 1. C<sub>3</sub>植物のイネへのC<sub>4</sub>光合成回路の導入の試み

C<sub>4</sub>植物はC<sub>3</sub>植物に比べて光合成能力が高く、生長速度も速い。それは、なぜなのだろうか？光合成CO<sub>2</sub>固定の初発反応を触媒するリブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼオキシゲナーゼ(Rubisco)は、触媒反応速度が極端に遅いこと、O<sub>2</sub>をも基質として光呼吸を起こすことから、光合成の主な律速因子となっている。C<sub>4</sub>植物は進化の過程でCO<sub>2</sub>濃縮に働くC<sub>4</sub>光合成回路を獲得し、Rubiscoの触媒部位でのCO<sub>2</sub>濃度を高めて光呼吸を抑制することに成功した。C<sub>4</sub>光合成回路を駆動させるにはATPが余分に必要となるが、光呼吸が促進される高温や強光下では、C<sub>4</sub>植物の方がC<sub>3</sub>植物よりも有利となる。

このようなC<sub>4</sub>植物の光合成システムは、C<sub>3</sub>植物の光合成能力を改良する上で有効と考え、世界中でC<sub>3</sub>植物にC<sub>4</sub>光合成回路を付与する取り組みが行われてきた(Hibberd et al. 2008, Miyao et al. 2011)。私自身も農業生物資源研究所に所属していた際に、C<sub>3</sub>植物のイネにトウモロコシ型のC<sub>4</sub>光合成回路を導入するプロジェクトに参加した。トウモロコシ型C<sub>4</sub>光合成回路を構成する酵素は、基本的にホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC), NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ, NADP-リンゴ酸酵素, ピルビン酸リン酸ジキナーゼ(PPDK)の4つと少ないが、特にPEPCとPPDKはC<sub>4</sub>植物において非常に高発現しており、C<sub>3</sub>植物内で同レベルに高発現させることは困難であった。我々は、プロモーター、エキソン、イントロン、ターミネーターを含めたトウモロコシ由来のPEPC遺伝子とPPDK遺伝子をそのままイネに導入するという手法により、これらの酵素をトウモロコシ以上に高発現させることに成功した(Fukayama et al. 2001, Ku et al. 1999)。そして、C<sub>4</sub>光合成回路に必要な

H. Fukayama-1

4つの酵素全てを高発現する4重形質転換イネを作成した (Taniguchi et al. 2008)。PEPCを単独で高発現させた形質転換イネでは、呼吸が促進されることから光合成速度が低下した (Fukayama et al. 2003)。しかし、4重形質転換イネではPEPCの高発現の効果が打ち消され、光合成速度が非形質転換イネのレベルに回復した (Taniguchi et al. 2008)。この現象がどのようなメカニズムによって起こるのかは明確ではないが、少なくとも4つの酵素を高発現させただけでは、光合成能力を大幅に促進するほどにC<sub>4</sub>光合成回路を駆動することはできないと考えられた。他のグループを含めても、今のところC<sub>4</sub>光合成回路の導入により光合成能力の改良に成功した例はない。

## 2. C<sub>4</sub>植物のRubisco

C<sub>3</sub>植物は全窒素の約30%をRubiscoに投資しているが、C<sub>4</sub>植物は10%以下である (Makino et al. 2003, Sage et al. 1987)。C<sub>4</sub>植物は、なぜ少ないRubiscoで高い光合成能力を達成できるのだろうか？ Rubiscoの欠点として触媒速度が他の酵素に比べて低いことは既に述べたが、触媒速度には種間差があり、C<sub>3</sub>植物では特に低く、CO<sub>2</sub>濃縮回路を持つC<sub>4</sub>植物では2倍ほど高いことが知られている (Sage 2002, Seemann et al. 1984)。C<sub>4</sub>植物は触媒速度の高いRubiscoを獲得することにより、Rubisco含量を減らすことが可能となり、光合成の窒素利用効率を高めていると考えられる (図1)。しかし、Rubiscoの触媒速度とCO<sub>2</sub>親和性の間にトレードオフの関係があり、C<sub>3</sub>植物のRubiscoは触媒速度は遅いがCO<sub>2</sub>に対する親和性 (CO<sub>2</sub>に対するミカエリス定数K<sub>c</sub>は低い) は高い (Tcherkez et al. 2006)。このようなC<sub>3</sub>植物のRubiscoの特性は、産業革命以前の250 ppm程度の低いCO<sub>2</sub>濃度において光呼吸を抑制するように進化・適応した結果といえる。現在の地球環境を見ると、大気CO<sub>2</sub>濃度は増加の一途をたどっており、2050年には600 ppm程度にまで増加すると予想されている。そのような大気条件下では光呼吸はおのずと抑制されることから、今後はC<sub>3</sub>植物もC<sub>4</sub>植物のような高活性型Rubiscoを持ちRubiscoへの窒素の投資を減らすことが、光合成や生産性の高い作物の開発につながると考えられる。

## 3. C<sub>4</sub>植物の高活性型RubiscoのC<sub>3</sub>植物への導入

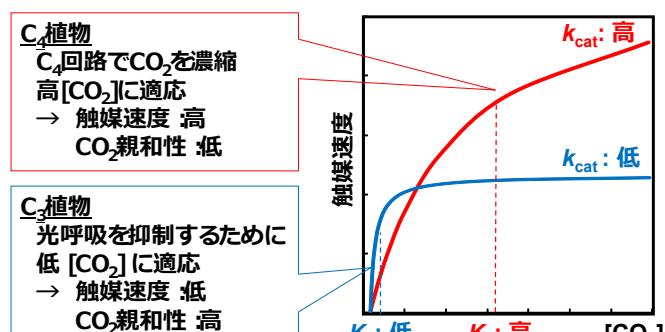


図1 C<sub>3</sub>植物とC<sub>4</sub>植物のRubiscoの酵素特性の比較  
K<sub>cat</sub>：触媒速度；K<sub>c</sub>：CO<sub>2</sub>に対するミカエリス定数。

我々は光合成能力を改良するために、C<sub>3</sub>植物に C<sub>4</sub>植物の高活性型 Rubisco を導入することを試みた。イネ、ムギ類、ジャガイモ、ダイズなど主要な作物の多くは C<sub>3</sub>植物であるが、その中でもイネの Rubisco の触媒速度は低いことがわかつっていた (Sage 2002)。そこで我々は、イネを実験材料とすることに決め、その光合成能力の改良のために適した触媒速度の高い Rubisco を進化的に近いイネ科植物の中で探索した (Ishikawa et al. 2009)。解析したイネ科 C<sub>4</sub>植物の Rubisco の触媒速度は、全てイネよりも高かったが、ソルガムの Rubisco は触媒速度が高く、かつ CO<sub>2</sub>に対する親和性も比較的高いため、イネの光合成の改良に最も有効と考えられた。Rubisco は RbcL と RbcS の 2 種類のタンパク質によって構成されており、触媒作用を示す L<sub>8</sub>S<sub>8</sub> 構造を取るまでに多数の分子シャペロンとの相互作用を受ける必要がある (深山 2013)。よって導入する遺伝子は出来る限りイネの遺伝子と相同性が高いことが望ましい。そこで触媒部位が存在する RbcL のアミノ酸配列についても比較を行ったが、ソルガムを含むイネ科植物内では相同性が非常に高く、どの種の遺伝子を導入しても大差はないものと考えられた (Ishikawa et al. 2009)。RbcL は葉緑体ゲノム、RbcS は核ゲノムに多重遺伝子族として存在する。そこで、RbcL はパーティクルガンを利用した相同組換えによる葉緑体形質転換法、RbcS はアグロバクテリウム法によりイネの核への遺伝子導入を行った (図 2)。イネの葉緑体形質転換は技術的に確立されておらず、我々も RbcL の導入に関しては今のところ成功していない。一方、ソルガム RbcS の高発現には成功し、驚くべきことに、触媒反応においてそれほど重要と考えられていなかつた RbcS を導入するだけで Rubisco の触媒速度が約 50% 高まることが明らかとなつた (Ishikawa et al. 2011)。形質転換イネの Rubisco の触媒速度はソルガムに比べると低いが、イネの光合成能力の改良に十分有効であることが、光合成速度のシミュレーションからわかっている。

#### 4. 形質転換イネにおける Rubisco 含量の最適化

ソルガム RbcS を高発現する形質転換イネでは Rubisco の触媒速度が増加したが、光合成速度にはどのような効果をおよぼすのだろうか？ 残念ながら形質転換イネの光合成速度は高

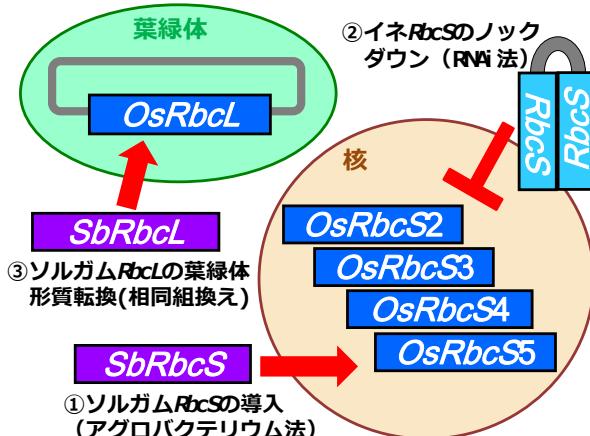


図2 C<sub>4</sub>植物ソルガムが持つ高活性型Rubiscoのイネへの導入

Rubiscoを構成するRbcLは葉緑体ゲノムに、RbcSは各ゲノムの多重遺伝子族によりコードされている。①まず、ソルガムRbcS (SbRbcS)をアグロバクテリウム法によりイネの核に遺伝子導入する。ソルガムRbcSを導入するだけでRubiscoの触媒速度が増加することがわかつている (Ishikawa et al. 2011)。しかし、これだけではRubiscoが過剰となってしまうので光合成速度は増加しない。②そこで、イネRbcS (OsRbcS2-5)に対してRNAi法によるノックダウンを行い、Rubisco含量を適度に減少させる。③イネにおける葉緑体形質転換が可能となれば、ソルガムRbcL (SbRbcL)についても遺伝子導入する。

$\text{CO}_2$  条件で測定した場合も増加することはなかった (Ishikawa et al. 2011)。形質転換イネではイネの *RbcS* を残したままソルガム *RbcS* を導入しているために Rubisco が過剰発現しており、Rubisco 含量が増加していた。高  $\text{CO}_2$  条件では Rubisco が光合成の律速因子ではないので、Rubisco の触媒速度と含量が増加しても光合成速度が変化しないのは当然である。C<sub>4</sub> 植物が行っているように Rubisco 含量を少なくして窒素利用効率を高めることができることが (Sage et al. 1987), 光合成能力の改良につながると考えられる。実際に、高  $\text{CO}_2$  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 (Makino et al. 1997)。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できると予想される。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考えられることから、高  $\text{CO}_2$  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同意識が高い。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'側コード領域をトリガーとした RNAi コンストラクトをソルガム *RbcS* 高発現イネに導入した。この戦略は機能し、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)。2 重形質転換イネで発現する、ソルガム *RbcS* とイネ *RbcL* のハイブリット Rubisco は、親系統で発現するイネ *RbcS* とソルガム *RbcS* のキメラとなった Rubisco に比べて、さらに触媒速度が高くなった。大気条件下での光合成速度は 2 重形質転換イネで低くなつたが、高  $\text{CO}_2$  条件では同程

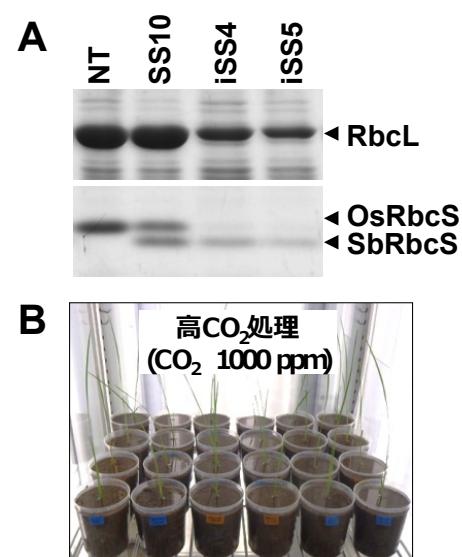


図3 C<sub>4</sub>植物ソルガム*RbcS*を高発現しイネ*RbcS*をノックダウンした2重形質転換イネ  
A. 可溶性タンパク質のSDS-PAGE解析。葉身の可溶性タンパク質をSDS-PAGEで分離してクマシーブリリアントブルーで染色した。RbcLとRbcSを含む領域のみ示した。非形質転換イネ(NT)ではイネ*RbcS*(Os*RbcS*)のみが発現している。ソルガム*RbcS*高発現イネ(SS10)ではOs*RbcS*とソルガム*RbcS*(Sb*RbcS*)の両方が同レベルで発現している。イネ*RbcS*をノックダウンした2重形質転換イネでは、ほぼ全てがSb*RbcS*となり、RbcLのバンドの量からRubisco含量が減少しているのがわかる。  
B. 2重形質転換イネの高CO<sub>2</sub>条件下での生育。現在、2重形質転換イネを異なるCO<sub>2</sub>濃度条件で育成して生育特性、光合成特性を解析している。

度となった。しかし、窒素あたりの光合成で見ると、2重形質転換イネは非形質転換イネよりも高い値を示した。2重形質転換イネの Rubisco 含量は非形質転換イネの 20-35%であり、触媒速度が増加したとはいえ多少含量が少なすぎると考えられる。今後、RNAi のトリガー配列の特異性を高めるなどの改良を行い、Rubisco 含量を非形質転換イネの 40-50%程度に調節することができれば、より明確に光合成能力を改良できると考えている。

## 5. イネが持つ *RbcS* 様遺伝子 *OsRbcS1*

これまでの研究で、*RbcS* が Rubisco の触媒能力の改良における重要なターゲットと成り得ることがわかった。植物において *RbcS* は多重遺伝子族によりコードされている。そこで次に、植物が持つ *RbcS* ホモログに着目することにした。先に述べた通りイネは 5 つの *RbcS* 遺伝子を持ち、そのうちの 1 つ *OsRbcS1* は、主要な光合成器官である葉身で発現していない。さらに *OsRbcS1* は、他の *RbcS* との推定アミノ酸配列の相同性が 55.4%と低い (*OsRbcS2-5* 間は 100%)、葉緑体移行シグナル配列が不明確などの興味深い特徴を持つ。*OsRbcS1* オーソログはトマト、ミヤコグサなどイネ以外の植物においても存在しており、植物において光合成で働く通常の *RbcS* と異なる機能を有していることが予想された。我々は *OsRbcS1* に着目して詳細な発現解析、形質転換体を用いた生理機能解析を行った (Morita et al. 2014)。その結果、*OsRbcS1* は実際に葉緑体（プラスチド）に局在し、*RbcL* と正常に会合して Rubisco のサブユニットとして機能していることがわかった。しかし、*OsRbcS1* は光合成活性のある緑色組織では発現しておらず、葉鞘や稈の維管束周辺で発現していた。*OsRbcS1* を通常発現していない葉身で高発現させ、Rubisco 活性への効果を解析したところ、*OsRbcS1* が組み込まれた Rubisco は触媒速度が増加することがわかった。触媒速度への効果はソルガム *RbcS* と同程度であり、*OsRbcS1* も高 CO<sub>2</sub> 環境下での光合成性能の改良に有効であると考えられた。

現在、*OsRbcS1* の機能を明らかにするために、RNAi ノックダウン形質転換イネを用いたメタボローム解析やトランスクリプトーム解析を進めている。通常の光合成とは異なる Rubisco の代謝機能として、維管束周辺での C<sub>4</sub> 光合成的な CO<sub>2</sub> 固定 (Hibberd and Quick, 2002)、脂質合成で生じた CO<sub>2</sub> の再固定 (Schwender et al, 2004) が報告されている。このような代謝に *OsRbcS1* が関係している可能性も考えられるが、この場合はいずれも広義での光合成に当たり、光エネルギーを利用することで代謝が進行する。緑色組織で発現していない *OsRbcS1* の発現パターンを考えると、*OsRbcS1* は今までに報告のない代謝機能を担っている可能性があると考えている。

## 6. おわりに

$C_3$  植物の  $C_4$  化は、我々光合成研究者の夢である。近年、 $C_4$  化の実現のための最も重大な障壁となっていたクランツ構造の分化に関する分子メカニズムの手がかりが得られている (Slewinski, 2013)。しかし、完全な  $C_4$  化の実現には、まだまだ時間が必要と考えられる。Rubisco の触媒能力の改良も非常に困難であり、長年にわたり実用可能なレベルでの成功例がなかった。我々は  $C_4$  植物の *RbcS* を  $C_3$  植物に導入するという比較的簡単な手法により、Rubisco の触媒特性を高活性型に変換することに成功した。現在、Rubisco 含量の最適化に取り組んでいるが、それが成功すれば必ずや光合成能力の改良につながるものと期待している。ソルガム *RbcS* は遺伝的に遠い双子葉植物には適用できないと予想されるが、 $C_4$  植物は広範囲な植物種において独立して分化しており、双子葉植物において多くの種に  $C_4$  植物が存在する (Sage et al. 2011)。イネ以外にも重要な作物の多くは  $C_3$  植物であり、最適な  $C_4$  植物の *RbcS* を選ぶことによって様々な作物の光合成能力の改良に、今回紹介した戦略が適用できるものと考えている。

本論文のタイトルは「 $C_3$  植物の  $C_4$  化：Rubisco だけでも役に立つ？」であったが、私はさらに「*RbcS* だけでも役に立つ！」と言いたい。

## 引用文献

- 深山浩 2013. 高 CO<sub>2</sub> 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) : 24-32.
- Fukayama, H., Hatch, M.D., Tamai, T., Tsuchida, H., Sudoh, S., Furbank, R.T. & Miyao, M. 2003. Activity regulation and physiological impacts of maize  $C_4$ -specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. *Photosynth. Res.* 77: 227-239.
- Fukayama, H., Tsuchida, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, H., Ono, K., Lee, B.H., Hirose, S., Toki, S., Ku, M.S., Makino, A., Matsuoka, M. & Miyao, M. 2001. Significant accumulation of  $C_4$ -specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a  $C_3$  plant, rice. *Plant Physiol.* 127: 1136-1146.
- Hibberd, J.M. & Quick, W.P. 2002. Characteristics of  $C_4$  photosynthesis in stems and petioles of  $C_3$  flowering plants. *Nature* 415: 451-454.
- Hibberd, J.M., Sheehy, J.E. & Langdale J.A. 2008. Using  $C_4$  photosynthesis to increase the yield of rice—rationale and feasibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 228-231.
- Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S. & Fukayama, H. 2009. Screening of high kcat Rubisco among Poaceae for improvement of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in rice. *Plant Prod. Sci.* 12: 345-350.
- 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 Physiol.* 156: 1603-1611.
- Ku, M.S., Agarie, S., Nomura, M., Fukayama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, H. Fukayama-6

- M. & Matsuoka, M. 1999. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat. Biotechnol.* 17: 76-80.
- Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E. & Mae, T. 2003. Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant Cell Physiol.* 44: 952-956.
- Makino, A., Shimada, T., Takumi, S., Kaneko, K., Matsuoka, M., Shimamoto, K., Nakano, H., Miyao-Tokutomi, M., Mae, T. & 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 CO<sub>2</sub> and light in rice plants? *Plant Physiol.* 114: 483-491.
- Miyao, M., Masumoto, C., Miyazawa, S. & Fukayama, H. 2011. Lessons from engineering a single-cell C<sub>4</sub> photosynthetic pathway into rice. *J. Exp. Bot.* 62: 3021-3029.
- 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 Physiol.* 164: 69-79.
- Sage, R.F. 2002. Variation in the  $k_{cat}$  of Rubisco in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *J. Exp. Bot.* 53: 609-620.
- Sage, R.F., Christin, P.A. & Edwards, E.J. 2011. The C<sub>4</sub> plant lineages of planet Earth. *J. Exp. Bot.* 62: 3155-3169.
- Sage, R.F., Pearcy, R.W. & Seemann, J.R. 1987. The nitrogen use efficiency of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. III. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium Album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiol.* 85: 355-359.
- Seemann, J.R., Badger, M.R. & 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.
- Slewinski, T.L. 2013. Using evolution as a guide to engineer kranz-type C<sub>4</sub> photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 4:212.
- Schwender, J., Goffman, F., Ohlrogge, J.B. & Shachar-Hill, Y. 2004. Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature* 432: 779-782.
- Taniguchi, Y., Ohkawa, H., Masumoto, C., Fukuda, T., Tamai, T., Lee, K., Sudoh, S., Tsuchida, H., Sasaki, H., Fukayama, H. & Miyao, M. 2008. Overproduction of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C<sub>4</sub>-like photosynthetic pathway into rice. *J. Exp. Bot.* 59:1799-1809.
- Tcherkez, G.G., Farquhar, G.D. & 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.