

C4光合成酵素を高発現するC3植物の作出

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	徳富, 光恵
巻/号	21巻3号
掲載ページ	p. 24-28
発行年月	1998年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



C 4 光合成酵素を高発現する C 3 植物の作出

— C 3 植物の光合成機能改良に新たな展望 —

徳富 光恵

農業上重要な植物は、その光合成炭酸固定様式から C 3 植物と C 4 植物とに分類される。C 4 植物は C 3 植物から進化した植物であり、独自の光合成回路 (C 4 光合成回路) の働きで C 3 植物の約 2 倍の光合成能力を発揮する。C 3 植物に C 4 光合成回路を付与することによって、C 3 植物の光合成能が大きく改良されるものと期待されている。C 3 植物であるイネに C 4 植物であるトウモロコシの炭酸固定酵素 (PEPC) の遺伝子を導入したところ、イネ内で PEPC をトウモロコシ以上に高発現させることに成功した。同様の方法で他の C 4 光合成酵素を高発現させることにも成功しており、C 3 植物への C 4 光合成回路の付与が実現可能になりつつある。

1. はじめに

植物の光合成能・物質生産能の改良は、従来より農業上の重要課題の一つであったが、近い将来に世界規模での人口爆発・食料危機が予測される現時点において、緊急に解決すべき最重要課題の一つとして新たに着目されている。

昨今の遺伝子導入技術の飛躍的進歩により、バイオテクノロジーによる光合成機能の改良が現実のものとなりつつあるが、否定的な考え方も未だ根強い。すなわち、単一の酵素や機能蛋白質を改変あるいは過剰発現させても、複雑に絡み合った光合成系全体には顕著な変化は現れない、という主張である。我々は、複数の遺伝子を導入して新たな代謝系を付与することによって、具体的には C 3 植物であるイネに光合成

的に進化した C 4 植物の光合成回路を付与することによって、イネの光合成能を改良する可能性を検討している。

2. C 3 植物と C 4 植物

地球上の植物は、その光合成炭酸固定の様式から、C 3 植物、C 4 植物、及び多肉植物型光合成 (CAM) 植物とに分類される。イネ、ムギ、ダイズ、イモ等農業上有用な植物を含む陸上植物の 90 % 以上は C 3 植物に属している。C 4 植物には熱帯・亜熱帯原産のイネ科植物が多く含まれ、トウモロコシ、サトウキビ等がこれに属す。CAM 植物はベンケイソウで発見された有機酸代謝回路で光合成を行うグループであり、サボテン、パイナップル等の多肉植物がこれに分類される。C 4 植物と CAM 植物はともに、地球上の環境変動にもなつて C 3 植物から進化してきたと考えられている。C 4 植物は C 3 植物の約 2 倍の高い光合成能力を発揮する。一方 CAM 植物は、砂漠等の極端な乾燥

Mitsue TOKUTOMI : High-level expression of C 4 photosynthesis enzymes in a C 3 plant — Possible improvement of photosynthetic efficiency of C 3 plants —

地帯に適応した植物であり、その光合成能はかなり低い。

C3植物は、C3光合成回路（カルビン回路）で大気中の二酸化炭素を固定して炭水化物へと変換する。大気中の二酸化炭素はまずRubisco（リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ）で固定されるが、Rubiscoの触媒部位が二酸化炭素よりも酸素に対して高い親和性をもつため（オキシゲナーゼ反応）、炭酸固定反応が酸素で阻害を受ける。これが光合成の酸素阻害であり、低二酸化炭素・高酸素という現在の大気組成の下ではC3植物の光合成は恒常的に抑制されている。一方、C4植物は、光合成の酸素阻害を克服すべく進化した植物である。C4植物においても、二酸化炭素の炭水化物への変換はカルビン回路を介して行われるが、カルビン回路に加えてC4植物に特徴的な光合成回路（C4光合成回路）を併せもつ（図1）。C4光合成回路は葉肉細胞と維管束鞘細胞にまたがる代謝回路で、葉肉細胞で取り込んだ二酸化炭素をRubiscoを含む

カルビン回路酵素の存在する維管束鞘細胞で放出する「CO₂ポンプ」として働き、Rubisco近傍の二酸化炭素濃度を高めて酸素との反応を抑制する¹⁾。

C4光合成回路は、二酸化炭素を放出する炭酸酵素の種類から3つのサブタイプ、すなわち、NADPリンゴ酸酵素型、NADリンゴ酸酵素型、PEPカルボキシキナーゼ型に分類される。トウモロコシやサトウキビに代表されるNADPリンゴ酸酵素型C4光合成回路では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）、NADPリンゴ酸酵素（NADP-ME）、ピルビン酸、Piジキナーゼ（PPDK）がC4光合成回路の構成に必要な主要酵素である（図1）。PEPCは光合成の基質である二酸化炭素の固定反応に、NADP-MEは、カルビン回路酵素の存在する維管束鞘細胞葉緑体内での二酸化炭素の放出に、PPDKはC4光合成回路の基質再合成に携わっている。

C4光合成回路を構成する酵素はC3植物にも存在するが、その酵素活性は非常に低い。イネとトウモロコシを比べると、イネのPEPC活性はトウモロコシの活性の1/20-40、NADP-ME活性は1/25-40、PPDK活性にいたっては1/80-100である。しかしながら、C4光合成酵素の遺伝子（C4光合成遺伝子）の構造は、C3植物とC4植物とで極めて類似している²⁾。よく似た遺伝子がなぜC4植物内で高発現しC3植物内では発現が抑えられているのかは、プロモーター解析により既に明らかにされている^{3),4)}。トウモロコシのPPDK遺伝子のプロモーターにリポーター遺伝子として大腸菌のβ-グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子を連結したキメラ遺伝子をイネに導入したところ、葉身、葉鞘、稈等葉緑体のある細胞すべてでGUSの発現が観察された³⁾。逆に、イネのPPDK遺伝子のプロモーターにリポーター遺伝子（ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したキメラ遺伝子をトウモロコシに導入しても、リポーター遺伝子は発現しなかった。PEPC遺伝子のプロモ-

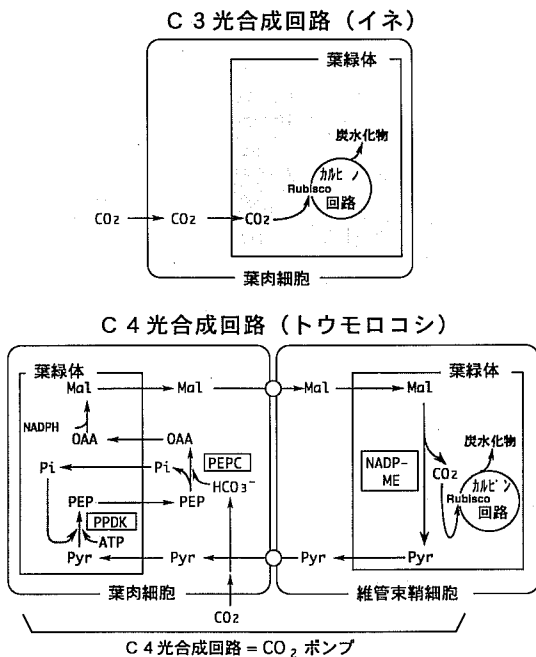


図1 C3植物とC4植物の光合成回路

ターの場合にも同じ結果が得られている⁴⁾。これらの結果は、C4植物のC4光合成遺伝子の発現に必要な転写調節システムはC3植物にも存在すること、一方、C3植物のC4光合成類似遺伝子は、この転写調節システムを利用できないことを示している。このことは、C4植物のインタクトなC4光合成遺伝子を導入すれば、C3植物の葉肉細胞内でC4光合成酵素が発現する可能性を示唆している。

3. C3植物へのC4光合成遺伝子の導入

我々は、C3植物であるイネの葉肉細胞にトウモロコシのC4光合成回路を付与するプロジェクトを行っている。閉じたC4光合成回路を駆動させるためには、PEPC, PPK, NADP-MEの最低3種類の酵素を導入する必要がある(図2)。トウモロコシの遺伝子を導入したイネの葉肉細胞では、PPDKとNADP-MEは葉緑体内に移行し、PEPCは細胞質内にとどまる、というトウモロコシと同様の存在形式をとると予想される(図1参照)。これら3種類の酵素以外の反応系はイネの酵素がそのまま利用でき、閉じたC4光合成回路が構築されると期待される(図2)。

C3植物にC4植物の光合成遺伝子を導入して光合成能を増大させる試みは、植物への遺伝子導入が可能となって以来多くの研究者によって行われてきた。しかしながら、これまでのところ、C3植物のC4光合成酵素の活性をC4植物並みに高めることには成功していなかった。

形質転換植物のC4光合成酵素の活性は、増大したとしても非形質転換体の活性のせいぜい数倍程度であった。これまでの試みの多くは、C4光合成酵素のcDNAにC3植物の葉肉細胞内で高発現可能なプロモーター(CaMV35Sプロモーター、Cabプロモーター等)を連結したキメラ遺伝子をC3植物に導入するというものであった。我々は、上述のプロモーター解析の結果を踏まえ、C4植物のインタクトなC4光合成遺伝子をそのままイネに導入することにした。以下に、PEPC遺伝子導入イネについて紹介する⁵⁾。

導入した遺伝子はトウモロコシのPEPC遺

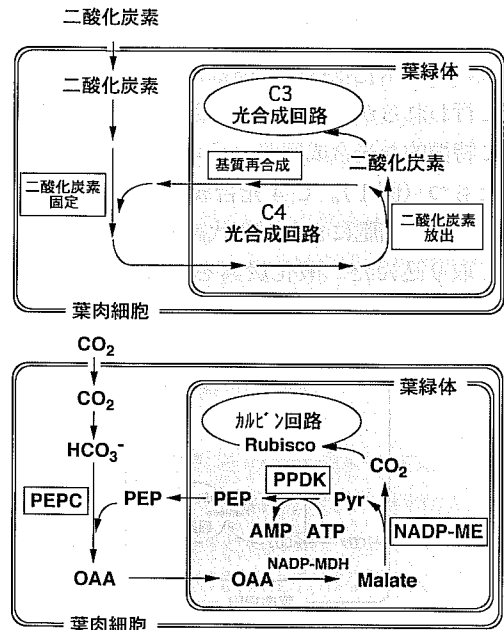


図2 C3植物へのトウモロコシ型C4光合成回路の付与

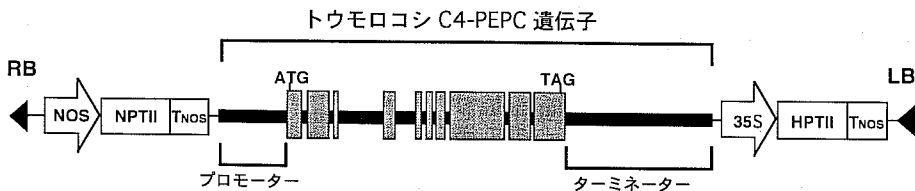


図3 トウモロコシ炭酸固定酵素(PEPC)遺伝子導入用プラスミド

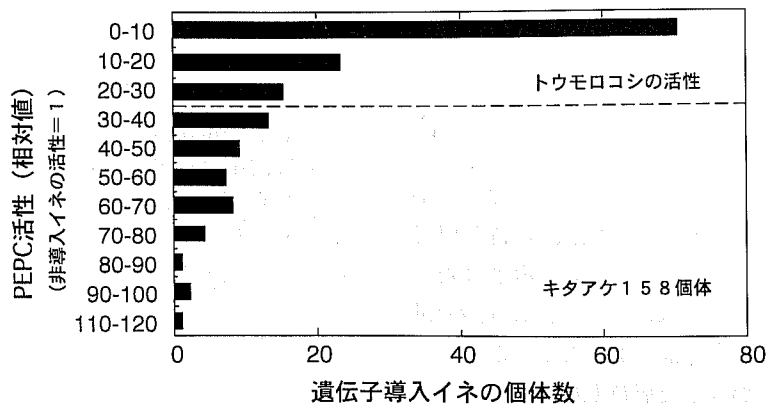


図4 トウモロコシ炭酸固定酵素 (PEPC) 遺伝子導入イネ (T1 世代) の PEPC 活性

伝子で、約 1.2 kb のプロモーター領域、エキソンとイントロンを含む全翻訳領域、約 2.5 kb のターミネーター領域を含む、全長 8.8 kb の遺伝子断片である (図 3)。これをアグロバクテリウムを介する方法でイネ (品種はキタアケ) の胚盤由来のカルスに導入し⁶⁾、その再分化当代 (T1 世代) について PEPC 活性を測定した。形質転換イネ 158 個体のうち、32 個体が非形質転換イネの 40 倍から 120 倍に相当する高い PEPC 活性を示した (図 4)。トウモロコシの PEPC 活性は非形質転換イネの 20-40 倍であることから、インタクトな遺伝子の導入で C4 植物であるトウモロコシより高い PEPC 活性を示す形質転換イネを作出できることがわかった。形質転換イネの PEPC 蛋白質含量は、最高で緑葉の全水溶性蛋白質の約 15% にまで達することがわかった。また、PEPC 蛋白質含量にともなって PEPC 活性が増大したことから、イネ内で発現したトウモロコシ PEPC 蛋白質はすべて活性型で存在することがわかった。

PEPC 遺伝子導入イネ (T2 世代) の光合成特性を検討したところ、PEPC 活性の増大にともなって、C3 植物に特徴的な光合成酸素阻害率が約 30% から最大 10% 以下にまで低下することがわかった。この結果は、導入したトウモロコシ PEPC が形質転換イネの炭酸固定反応に関与していることを示している。また、予

備的な実験結果ではあるが、PEPC を高発現する形質転換イネでは、生長が有意に促進されることがわかった。

インタクト遺伝子導入の有効性を確認する目的で、PPDK については Cab プロモーターを連結した cDNA とインタクト遺伝子とをそれぞれイネに導入し、T1 世代の PPDK 活性を比較した。cDNA を導入した形質転換イネでは、最高でも非形質転換イネの数倍程度の活性上昇を示しただけであった。一方、インタクト遺伝子を導入した形質転換イネでは、最高で非形質転換イネの約 60 倍、すなわち、トウモロコシの活性の約 2/3 に相当する高い PPDK 活性を示した。これらの結果は、PPDK においてもインタクト遺伝子の導入が C4 光合成酵素の高発現に有効であることを示している。

C4 植物内では、PEPC と PPDK はともに葉肉細胞に局在している (図 1 参照)。上記の結果から、C4 植物の葉肉細胞に局在する C4 光合成酵素を C3 植物の葉肉細胞で高発現させるためには、C4 植物のインタクト遺伝子の導入が有効であることが明らかにされた。

4. おわりに

我々は当初、単一の C4 光合成酵素を導入しただけでは C3 植物の光合成特性は何ら変化せ

ず、最低3種類の酵素を導入して初めて変化が現れるものと予想していた。この予想に反し、PEPCを単独で高発現させただけでイネの光合成特性が変化することがわかった。このことは、単一酵素の過剰発現で植物の代謝バランスを改変しうることを示している。さらに、予備的な実験結果ではあるが、PEPCの高発現でイネの生長が促進される可能性が示された。我々の研究の最終目標は、C4光合成回路の付与によるイネの光合成能の改良であるが、単一の酵素遺伝子を導入した形質転換イネの解析を通して、光合成系を含む代謝経路の制御機構に関する新たな知見が得られるものと期待している。

(農業生物資源研究所生理機能部

光合成研究室 主任研究官)

参 考 文 献

- 1) Edwards, G.E. and D.A. Walker (1983) C3, C4: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation, of Photosynthesis, Blackwell, London, pp. 540
- 2) Ku, M.S.B. *et al.* (1996) *Plant Physiol.*, 111: 949-957
- 3) Matsuoka, M. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 9586-9590
- 4) Matsuoka, M. *et al.* (1994) *Plant J.*, 6: 311-319
- 5) Ku, M.S.B. *et al.*, submitted
- 6) Toki, S. (1997) *Plant Mol. Biol. Reporter*, 15: 16-21