

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	光合成電子伝達の最適化による植物バイオマス増進の技術基盤研究
研究機関・部局・職名	埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
氏名	川合 真紀

【研究目的】

近年、大気中の二酸化炭素濃度の上昇が地球規模の問題として取り上げられ、二酸化炭素を吸収して物質生産を行う植物の光合成機能が注目を集めている。植物は、光エネルギーを化学エネルギーに変換し、これを利用して無機物質である二酸化炭素を有機物に変換することができる。この過程が光合成である。植物は適当な光、水分、温度などの条件が整っていれば、光合成電子伝達により無制限のエネルギーを生み出し、これを物質生産に利用することが理論的には可能である。しかしながら、実際に無尽蔵に植物の物質生産能力を増大させることは難しい。そこにはいくつかの律速要因が存在し、植物のバイオマス増大のブレーキとなっている。そうした律速要因の1つと考えられているのが、光エネルギーを化学エネルギーに変換する光合成電子伝達系である。

植物が光合成によって二酸化炭素を固定する反応は、光のエネルギーによって生物エネルギー(ATP)と還元力(NADPH)を生成する過程(光リン酸化)と、二酸化炭素をエネルギーと還元力によって有機物に変換する過程(炭酸固定)とに大きく分けることができる。前者ではまず、光合成電子伝達系において光エネルギーを用いて電子を励起し、NADPHを得ると共に、チラコイド膜の内外で生じるプロトン勾配を用いてATPを合成する。生物反応ではATPがエネルギー源として使われる。一方、還元力として用いられる分子がNADPHである。NADPHは自らが酸化してNADPとなる過程で、相手を還元することができる。また、光合成において光エネルギーを化学エネルギーへと変換する過程で、余剰となったエネルギーは熱として放出される。光合成電子伝達の場合は、光合成の構成要素を破壊してしまうかもしれない高エネルギー化合物をやり取りする場であり、余剰の電子の発生は非常に危険である。実際、植物には強光ストレスと呼ばれる環境ストレスが存在し、その際には光合成電子伝達系の構成要素が活性酸素によりダメージを受け、植物の成長は著しく阻害される。

本補助事業担当者らは、本研究課題を実施する数年前より活性酸素種に対する植物の応答に注目して研究をおこなってきた。酸化ストレスを受けた植物細胞はプログラム細胞死を引き起こし、生存可能な部位へ細胞の構成要素を回収し再利用するという個体としての生存戦略を有している。こうした研究の過程で、細胞内の酸化還元カプラーを構成するNAD(P)(H)の代謝系を改変し、化学エネルギーとして植物が利用可能な物質質量を変化させることによって、植物の環境適応性が変化することを見いだした。さらには、近年の代謝物解析ツールの革新にともない、代謝改変植物における主

要物質生産系の変化を植物体レベルで統合して検出することが可能となり、葉緑体の還元力プールの増大が植物の光合成能力充進の鍵となっているという確証を得た。

本研究では、

(1) 葉緑体の代謝改変による光合成電子伝達系の最適化により、植物の二酸化炭素吸収能力の増大を試みる。

(2) 固定された二酸化炭素が植物バイオマス増進に結びつくことによる、可食部、非食部への炭素分配についても迫る。

(3) 葉緑体還元力プールのさらなる増進を目指した代謝改変研究も試みる。加えて、熱放散を制御する因子の同定を試みる。

を達成目標に掲げ、高二酸化炭素吸収・高バイオマス生産能力を有する植物の分子育種のための分子基盤を築くことを目指した。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

植物のバイオマス生産の増大に光合成機能は本質的な役割を果たす。また、光合成機能の増幅は、植物科学における大きなテーマである。本研究課題は明反応の生成物である ATP と NADPH のうち、NADPH の産生の増量と還元力維持により光合成機能の改良、ひいてはバイオマスの増産に結び付けようとする挑戦的研究テーマであり、基礎的研究としてばかりでなく、応用的展開においても重要であり、興味深い。

本研究において、NADPH を増加させる NADK2 遺伝子機能とそれに波及する代謝経路の生化学的・細胞学的解析は詳細に行われており、評価できる。

代謝改変の手法として葉緑体形質転換法を使えなかったことが当初の研究計画とは異なったが、ルビスコアクチベースの葉緑体移行シグナルを代謝酵素に連結した形で遺伝子を組込む事で、3 遺伝子 (NMNAT、NADS、NADK2) の同時導入システムを期間内に確立している。これらの詳細な解析と、細胞質で NADP 量を増加させたシステムとの比較から、葉緑体内の NADP 量を増加させることが電子伝達の効率やカルビン回路の活性化に大事であることを示した。また、カルビン回路の律速となっている主要酵素の活性化状態が、葉緑体内酸化還元補酵素代謝の改変個体では変化している事を明らかにし、NADPH 量が増加することによる還元力の高まりが、酵素遺伝子の発現レベルの変化を介さずに直接タンパク質の活性化によってもたらされていることも明らかにした。これらの発見は、学術的にも意義が大きい。

また、葉緑体内で発生する余剰な電子を熱として放出する熱放散にも着目し、その制御因子である PsbS についても研究を進めた。本因子を過剰発現させたイネでは熱放散の数値が増加すること、一方、NAD キナーゼを高発現させたシステムでは熱放散の数値が低下することを示した。これらの結果から、光合成電子伝達の高効率化と作物の分子育種のために、葉緑体内で扱える電子総量の制御の観点に立って、こうした因子

を複合的に扱って行くことが、さらなる有用であると提言している。

上記のように、学術的に重要な知見を得ているが、植物の光合成能力の増大とバイオマス増産という視点からは、さらに複雑なシステムが関与していると考えられる。

「固定された二酸化炭素が植物バイオマス増進に結びつくことによる、可食部、非食部への炭素分配についても迫る」とした点については、十分な追究が行われたとは言い難い。さらなる研究の深化を期待したい。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本研究は、代謝工学的手法により、葉緑体内の酸化還元補酵素プールの大きさを改変し、植物の光合成能力、物質生産能力を増強する事を目的として掲げて展開された。また、その分子メカニズムを科学的に解明し、更なる代謝改変の手だてを新たに考案する事も含め、具体的には、下記の3項目を掲げている。

(1) 葉緑体の代謝改変による光合成電子伝達系の最適化により、植物の二酸化炭素吸収能力の増大を試みる。

(2) 固定された二酸化炭素が植物バイオマス増進に結びつくことによる、可食部、非食部への炭素分配についても迫る。

(3) 葉緑体還元力プールのさらなる増進を目指した代謝改変研究も試みる。加えて、熱放散を制御する因子の同定を試みる。

(1) については、代謝改変の手法として葉緑体形質転換法を使えなかったことが当初の研究計画とは異なったが、別法として想定していた葉緑体移行シグナルを利用した方法により、代謝改変個体を得るという目標は達成している。当初、葉緑体内の代謝改変の手法として、葉緑体ゲノムに遺伝子を組込む葉緑体遺伝子組換えにも挑む計画を立てていたが、研究開始後、数年たった現在においても、葉緑体形質転換系は限られた植物種でのみ可能な実験技術であるとの状況は変わらず、イネでの利用は不可能であった。葉緑体電子伝達改変個体の作出のため、これに代わる手法として、ルビスコアクチベースの葉緑体移行シグナルを代謝酵素に連結した形で遺伝子を組込む事とし、結果として、3遺伝子 (NMNAT、NADS、NADK2) の同時導入システムを期間内に確立している。詳細な生育調査については、後代で遺伝的に固定されたシステムを用いて数年かけて行っていく事が必要となるが、光合成パラメーターの上から変化を示すシステムが得られており、葉緑体の酸化還元補酵素プールの新規な改変個体の作出については、その目標を達成している。(1) と (2) にかかわる課題として、葉緑体内の酸化還元補酵素量が変化する事が、電子伝達の効率やカルビン回路の活性化に結びつく分子メカニズムを明らかにする事も大きな目標の一つであった。細胞質において、NADP を増加させるような代謝改変個体のメタボローム解析から、そうした個体では逆に呼吸が増加し、黄化現象が早くみられることから、細胞質ではなく、葉緑体内の NADP 量を増加させることが大事であることが明らかとなった。さらに、カルビン回路の律速となっている主要酵素はチオレドキシンを介したレドックス制御を受ける事が既に知られていたが、これらの酵素の活性化状態が、葉緑体内酸化還元補酵素代謝の改変個体では変化している事を明らかにすることができた。この結果は、NADPH 量が増加することによる還元力の高まりが、酵素遺伝

子の発現レベルの変化を介さずに直接タンパク質の活性化によってもたらされている事を示すものであり、学術的にも大変意義がある発見である。

(3) については、シロイヌナズナでは光化学系 II を構成するタンパク質の一つである PsbS が熱放散を制御する因子として知られていることから、イネで PsbS を過剰発現させると、熱放散が増加することを明らかにした。一方、NAD キナーゼ高発現系統では、この熱放散の数値が低下しており、その分、利用可能な光エネルギーが増大していると考えられる結果をえた。このことから、これらの因子を複合的に扱う事が植物のバイオマス生産性を最大限に引き出す為には必要であると推察している。

当初掲げた課題のうち、本研究課題の重心となる達成目標 (1) と (3) にかかわる「葉緑体電子伝達の改変個体の作出」「葉緑体酸化還元補酵素の代謝改変が物質代謝亢進をもたらすメカニズムの解明」について、想定された成果を得たものと言える。一方、(2) については、十分に目標を達成し得たとは言えない段階にある。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

NAD キナーゼ高発現シロイヌナズナ系統 (カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターに AtNADK2 遺伝子を連結)、および高発現イネ系統 (ユビキチンプロモーターにより AtNADK2 を発現) を対象とした研究から、葉緑体内の NADP(H) 量を増やす代謝改変が、植物の光合成能力、物質生産能力に正の効果を有する事を示してきた。この分子メカニズムを解明するため、さらに葉緑体内の NADP(H) 量を増加させる代謝改変に取り組むとともに、それらの代謝比較を行う事によって、細胞質の NAD 合成系の活性化が、呼吸を介した物質分解によるエネルギー獲得の方向に向く事を発見した。また、これまでほとんど解析が行われてこなかったイネの内生の NAD キナーゼ遺伝子の発現解析を行い、本遺伝子が本来は夜間に発現量が増加する日周変動性を示す事を明らかにした。一方、NADK2 高発現体ではユビキチンプロモータを用いている事から、外来遺伝子は、細胞内のストレス状況に応じて発現量を上昇させる発現パターンを示していると考えた。そこで、リアルタイム PCR により外来の AtNADK 遺伝子の発現量を調べた結果、昼間から夕方にかけて、導入遺伝子の発現量が増加していることが明らかとなった。本来の内生遺伝子の発現量が低い昼間に、葉緑体内の NAD レドックスが変化することが本系統における代謝増進の一因となっていることが強く示唆された。イネでは午後になると光合成活性が低下する「昼寝」と呼ばれる現象が知られている。本形質転換体では、まさにこの「昼寝」の時間帯の代謝変化により、成長が増進した可能性が考えられる。また、光合成のカルビンサイクルの酵素の中にはレドックス制御を受けることが知られている酵素が複数知られている。これらの酵素の活性化状態を、抽出液中の還元剤の有無によって比較した結果、代謝亢進が見られた葉緑体局在性 NAD キナーゼ高発現系統では、細胞内の酸化還元状態の変化により、酵素の活性化状態が高いことが明らかとなり、発現制御の変化を介さず、鍵酵素のレドックス制御により、NAD キナーゼ高

発現系統の代謝増進がもたらされている事が強く示唆された。すなわち、葉緑体内の NADP(H) プールを増大させることが光合成機能の増強のために効果的であることを改めて示す結果となった。

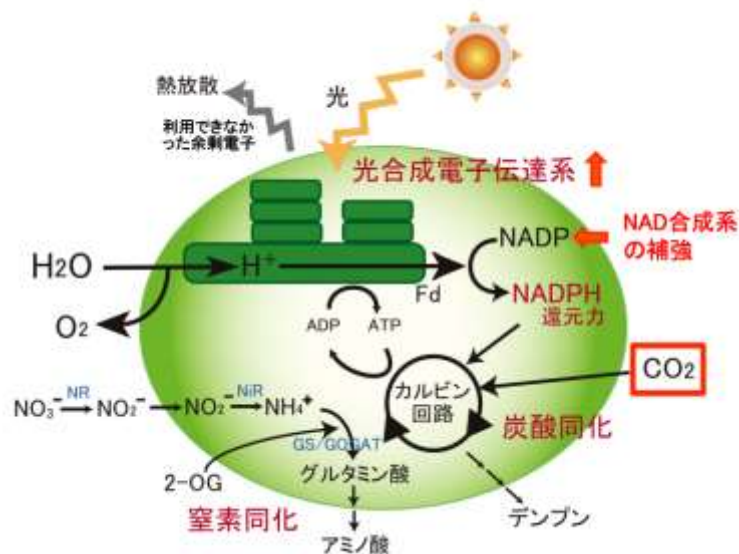
また、NAD キナーゼ高発現系統では、植物が利用できる光エネルギーの量が増加していることが既に明らかになっている。低温ストレス下で強い光が植物にあたると、植物は余分な光エネルギーが光合成装置に障害を与えないよう、余剰エネルギーを熱として排出する熱放散の機構を有している。シロイヌナズナでは光化学系 II を構成するタンパク質の一つである PsbS が熱放散を制御する因子として知られている。そこで、イネで PsbS を過剰発現させた結果、熱放散が増加することが明らかとなった。一方、NAD キナーゼ高発現系統では、

この熱放散の数値が低下しており、その分、利用可能な光エネルギーが増大していると考えられた。今後、これらの因子を複合的に扱う事が植物のバイオマス生産性を最大限に引き出す為には必要であると考えられる。

また、さらなる NAD 代謝改変の試みとして、NAD 合成の上流の 2 つの酵素(NADS および NMNAT) に葉緑体移行配列を付加して高発現した系統の作出とその解析をおこなった。

ef1 プロモーター (恒常的に高発現)、および Cab プロモーター (光依存的に高発現) で NAD 合成遺伝子群を発現させた両系統 (イネ、シロイヌナズナ) とも、植物体は正常に生育し、著しい形態異常や不稔性などは見られなかった。形質転換イネ系統を用いた光合成パラメーターの測定では、Fv/Fm 値は約 0.8 と変化していなかったが、余剰なエネルギーを廃棄する熱放散の数値 (NPQ) が、コントロールで 1.7~1.8 に対し、ef1 プロモーター系統では 1.8~2.0 と若干上昇していた。光化学系 II を通る電子伝達の実行量子収率 (Φ_{II}) については、ef1 系統では低下している個体が多かった一方で、Cab プロモーター系統では、増加しているものが複数得られ、光依存的に NAD 合成経路を働かせることにより、光合成電子伝達系での電子の利用効率が上昇している可能性が示された。NAD 合成経路を発現させるタイミングの違いがこれらの差異を生み出したと考えられる。今後、成長・収量調査を含め解析を進めて行く必要がある。

また、NAD キナーゼの高発現による代謝増進の分子機構を明らかにするため、NAD キナーゼ高発現シロイヌナズナ系統のマイクロアレイ解析を行った結果、硫黄欠乏時に発現上昇する機能未知の遺伝子の発現量の増加が明らかとなった。そこで、NAD キナーゼ高発現系統を、硫酸を添加した培地で育成した結果、コントロール系統よりも



図：本研究で取り組んだ植物代謝の改変の概要。葉緑体内で NADP 量を増やす代謝改変により、光から受ける還元力 (NADPH) と ATP 量が増加し、二酸化固定に関わる炭酸同化と、これと連動する窒素同化を向上させる。

生育が向上した。また、NADK2 過剰発現系統は高濃度硫酸耐性を示した。また、硫黄代謝産物のひとつであるグルタチオンの内生量が増加していることも示された。これらの結果から、NADK キナーゼの高発現体では、炭素および窒素の代謝に加えて硫黄代謝も同時に活性化されていることが明らかとなった。これらの生育条件を考慮することにより、NADK2 高発現系統の生育をさらに亢進させることができることがわかった。

以上の研究を通して、植物の物質生産性、成長を向上させるためには、葉緑体内の酸化還元補酵素代謝の改変が有効であることを明らかにした。NADP(H) プールが増大した植物では、光合成電子伝達で利用できる光エネルギー量が増大したと考えられ、その結果、増加した ATP、NADPH がカルビン回路の駆動に寄与し、さらには窒素や硫黄といった主要代謝物全体のフローを増加させたと考えられる。また、本研究では、葉緑体内で発生する余剰な電子を熱として放出する熱放散にも着目し、その制御因子である PsbS についても研究をおこなった。本因子を過剰発現させたイネでは熱放散の数値が増加することを示した。一方 NAD キナーゼを高発現させた系統では熱放散の数値が低下することから、葉緑体内で扱える電子総量の制御の観点から、こうした因子を複合的に扱って行くことが、さらなる光合成電子伝達の高効率化と作物の分子育種のために有用であると考えられる。本研究の成果は、今後の作物への展開に向けた分子育種の基盤となるものであり、得られた新規代謝改変植物の詳細な解析も含め、今後、さらなる研究の推進が必要である。

先進性・優位性等

本研究で得られた成果は、NADP(H) 量増加による光合成能力向上は、以前から研究代表者のグループが提唱している仮説を実証したもので、学術的には高く評価されるものの、格段の先進性、優位性のある技術が開発されたとは言い難い。また、植物による物質生産という面からも改良の可能性を示してはいるが、現在得られている成果がブレークスルーを果たしたとは言えない。

当初の目的外の成果

NADK2 過剰発現系統は高濃度硫酸耐性を示すこと、硫黄代謝産物のひとつであるグルタチオンの内生量が増加していることを示し、NADK キナーゼを高発現体させることにより、炭素および窒素の代謝に加えて硫黄代謝も同時に活性化されていることを明らかにしたことは、予期しなかった成果と言える。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

波及効果

一連の補酵素生合成系の酵素を、いっきに3つ、葉緑体移行シグナルを連結して植物に導入した例は稀である。遺伝子の安定性の評価や、遺伝子組換えを使用せずにこのような代謝改変を実現するか、などは今後の課題であるが、そのような代謝改変植物系統を作出できた点で、代謝研究の分野で新たな研究の方向性を示す事ができたと考えている。また、今後、転写因子の利用等も含め、代謝系全体をどのように制御するかという視点が研究の主流になって行くと考えられる。そうした中で、本研究は、

先見性のあるインパクトのある研究であると言える。

社会的・経済的課題解決への貢献

地球規模の問題とされている二酸化炭素濃度の増加現象に対し、植物の二酸化炭素を吸収する能力を増加させる手法は注目される技術である。植物が吸収した二酸化炭素は有機物に固定され、植物バイオマスとして、我々が利用できる物質となる。本研究により、植物の二酸化炭素吸収能力を増加させる技術的基盤が作られた事により、将来、これを作物の育種の方面から利用していくことが考えられ、次世代の作物育種の分野に貢献できるという期待はある。しかし、大気中の二酸化炭素吸収にかかわる技術の開発は多くの面から進められており、本課題で得られた成果が社会的・経済的課題解決にどの程度貢献するかは、現段階では計ることは難しい。現在得られている成果を以てしても、見込まれるとは言い難い。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

研究マネジメントについては、妥当な範囲内である。しかし、植物の光合成能力の最適化をどうとらえるか、難しい点であるが、総合的に関連する代謝経路を最適化する（当初の研究計画のごとく）とすると、さらに多くの要因についての検討が必要であると考えられる。一方、容易に結果が得られない、困難な局面が多い大きな研究課題であることも事実であり、着実に研究を進めきていることなど、総合的にはマネジメントは適切であったと言えよう。

助成金の活用については、適切に活用されている。

成果の公表については、下記の通り積極的に取り組んでいる。ただ、雑誌論文では代表者が責任著者として発表された論文は必ずしも多いとは言えず、本研究課題がacknowledgeされているものの、本研究課題に直接関わる成果であるか否か、判断しがたいものも多い印象を受ける。

国民との科学・技術対話など一般社会への発信についても、所属機関との連携を含めて積極的に取り組んでいる。

雑誌論文：合計 23 件（掲載済、査読有 21 件、未掲載、査読有 2 件）

会議発表：合計 61 件（専門家向け 47 件、一般向け 14 件）

図書：合計 2 件

新聞：合計 3 件

知的財産権の出願：1 件

国民との科学・技術対話：合計 14 件

その他の発信：研究室ホームページへの研究内容の掲載に加え、大学ホームページ内に、最先端・次世代研究開発支援プログラムでの取り組みを掲載している。大学による新聞上での教員の研究紹介のコーナーを、研究成果紹介の場として利用させていただいた。また、高校生を対象とした大学案内や、地域住民への大学の取り組み紹介の場等も積極的に利用した。