



イネ葉の光合成活性化におけるRubisco activaseの働きに関する研究

深山, 浩

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Date of Publication)

2007-10-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1831

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3141174>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001831>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	ふか やま ひろし 深 山 浩	(兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(学術)	
学位記番号	博い第280号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成10年3月31日	
学位論文題目	イネ葉の光合成活性化におけるRubisco activaseの働きに関する研究	

審査委員	主査 教授 安田 武司	
	教授 上島 脩志	教授 王子 善清
	助教授 内田 直次	

論文内容の要旨

Rubisco は光合成におけるCO₂同化の初発反応を触媒する酵素である。この酵素は、イネ葉内の可溶性タンパクの約50%を占めているにも関わらず、飽和光下での光合成の律速要因となる。Rubiscoは複雑な活性化機構を持ち、その活性化にはRubisco activaseというタンパクの働きが必要である。弱光下でRubiscoはRuBPと不活性型に結合する。Rubisco activaseの基本的な働きは、その不活性型複合体からRuBPを解離させることによりRubiscoを活性型に導くことである。その後、Rubiscoは活性中心にあるリジン残基(触媒サイト)へのCO₂の付加反応(カルバミル化)、Mg²⁺による安定化を経て活性型となる。イネ葉においては、このタンパクが光合成速度にどの程度関与しているのかは全く不明である。そのため本研究ではRubisco activaseに着目し、主に加齢過程における光合成速度ならびにRubisco activaseとRubiscoの含量の変化から、両タンパクと光合成速度との関係を検討した。全ての実験において、自然環境下で育成した日本型イネの日本晴を供試材料とした。なお、本論文は次の4つの章から構成されている。

一章では、定常状態の光合成速度とRubisco activaseの関係を明らかにすることを目的として、最大酸素放出速度および炭素同化効率とRubisco activase含量との関係を検討した。まず、加齢過程や生育環境の違いによるRubisco activaseとRubisco含量への影響について調査した。イネ葉の発育段階においてRubiscoはRubisco activaseよりも早く蓄積された。また、Rubisco activaseの含量は、生育中の光強度に影響されず、吸収窒素量に比例して増加した。それに対して、Rubisco含量は遮光区において、若干低くなった。すなわち、加齢過程や生育した光強度の違いによりRubiscoとRubisco activase含量のバランスが変わること、そして特に、若い葉ではRubiscoに対するRubisco activase含量の割合が低くなることが明らかとなった。最大酸素放出速度は、Rubisco含量が3 gm⁻²以上になると、その含量に対して飽和したが、Rubisco activase含量との間には全ての範囲で高い正の相関が認められた。さらに、Rubiscoに対するRubisco activaseの含量比が高まると、見かけの*in vivo*のRubisco活性は高くなった。また、活性化されたRubisco量を表す指標である炭素同化効率を、CO₂ガス交換法によって測定した結果、Rubisco activase含量との間には直

線的な関係が認められるのに対し、Rubiscoでは、含量が 3 gm^{-2} 以上になると、炭素同化効率は飽和する傾向を示した。以上の結果から、Rubisco activase含量はイネ葉の定常状態の光合成速度と密接に関わっており、特に葉が若くRubiscoが過剰にある場合、Rubisco活性がRubisco activaseによる量的な制限を受けている可能性が考えられた。

二章では、非定常状態の光合成速度におけるRubisco activaseの働きを明らかにする目的で、葉が受けている光強度を弱光から飽和光まで急に増加させた場合の光合成速度の変化を緩和時間により評価し、その加齢に伴う変化とRubisco activaseとの関連性を検討した。緩和時間は、光強度を増加させてから新たな光合成の定常状態に移行するまでに要する時間の指標である。緩和時間は、前照射の光量子束密度(PFD)の増加に伴って短くなり、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下で急速に短縮され、それ以上では緩やかとなった。そこで、 $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (弱光)と $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (強光)を選び、加齢に伴う緩和時間の変化を調査した。強光からの緩和時間は加齢に影響されないが、弱光での緩和時間は、加齢に伴い短縮された。つまり、弱光からの光合成の活性化速度は加齢の進行に伴い上昇したと言える。Activase/Rubisco比は若い葉で低く、加齢に伴い上昇し、弱光からの緩和時間と高い負の相関を示した。さらに、 CO_2 ガス交換速度から推定した弱光からのRubiscoの活性化における初速度は、Rubisco activase含量と正の相関を示した。一方、強光からの緩和時間は、Activase/Rubisco比との関係は認められなかった。強光における緩和時間は、細胞間隙 CO_2 分圧の上昇により短縮されるが、弱光の場合は影響が小さかった。以上の結果から、ある程度強い光からの活性化にはRubiscoの活性化反応の中でも、非酵素的に進行する CO_2 の付加反応であるカルバミル化が関与しているため加齢に影響されないが、比較的弱い光からの光合成の活性化はRubisco activaseが関与し、Rubisco activaseとRubisco含量のバランスによって決定されるため、加齢の進行に伴い速度が増すものと考えられた。

三章では、イネ葉におけるRubiscoの活性化がどの部分で調節されているのかを明らかにするために、 $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みによるRubisco活性と $^{14}\text{CABP}$ の結合による活性サイト数の光量子束密度(PFD)に対する応答を調査した。そして次にActivase/Rubisco比が低い若い葉で、実際にRubiscoの活性化状態が低下しているのか、また、大気条件と CO_2 飽和条件で違いがあるのかを検討した。*In vivo*のRubisco活性に近いイニシャル活性とRubisco活性サイト数は、PFDの増加に伴って上昇した。しかし、活性サイト数の変化は小さく、この値のみではイニシャル活性を説明できなかった。そこで、*In vivo*における活性サイトの回転速度(*in situ Kcat*)に着目すると、弱光域においてPFDの増加に伴い急速に上昇した。これらの結果から、イネ葉におけるRubiscoの活性調節は、Rubisco活性サイト数と*in situ Kcat*によって行われているものと考えられた。次に、大気 CO_2 濃度条件において、加齢に伴う弱光($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、強光($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、飽和光($1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)下でのRubisco活性化状態の変化を調査した。強光と飽和光におけるイニシャル活性は、加齢と共に上昇する傾向を示した。それに対して、弱光では変化が少なかった。強光と飽和光におけるRubisco活性サイト数は加齢の進行に伴って上昇するが、*in situ Kcat*は加齢に影響されなかった。この活性サイト数とActivase/Rubisco比との間には、ほぼ直線的な関係が認められた。以上の結果から、大気 CO_2 濃度で比較的PFDが高い条件では、実際のRubisco活性は葉の若い時期に低下し、それはActivase/Rubisco比によってRubisco活性サイト数が決まるためであると結論づけた。次に、 CO_2 と光飽和におけるRubisco活性化状態を、加齢過程を通じて調査した。イニシャル活性は、この条件においても葉の若い時期に低く、加齢に伴い上昇した。しかし、大気条件とは異なり、イニシャルカルバミル化サイト数の増加は伴っていなかった。*In situ Kcat*は葉の

発育段階に上昇し、その後、緩やかに低下した。これらの結果、飽和CO₂濃度下においてもRubisco活性は若い時期に低いが、それはRubisco活性サイト数によるものではなく、活性化されたサイトにおける回転速度の違いが関与しているものと考えられた。

四章では、この2つのタンパク含量の変化過程の違いがどのようにして生じているのかを明らかにするために、分解機構に着目して調査した。本実験では、短期間で老化を進行させるために、主にABAにより老化を促進させた葉切片を材料とした。主稈第9章を材料として葉切片を作成し、25°C、60 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下で、10 μM ABA、10 μM BA（ベンジルアデニン）の溶液に浮かべ、Rubisco含量、Rubisco activase含量、この2つ以外の可溶性タンパク含量の経時的変化を調査した。Rubisco含量、Rubisco activase含量の低下はABAにより促進され、BAにより抑制された。しかし、この2つ以外の可溶性タンパク含量は老化の進行によらず一定であった。つまり、この2つのタンパクに対する特異的な分解機構の発現が、ABAにより促進されたことが示唆される。そのため、この分解機構に関与するプロテアーゼを特定するために、ゼラチンを基質としたPAGEによる活性染色法を適用した。まず、葉緑体内に近い弱アルカリ性条件（pH7.5）で様々なプロテアーゼのエフェクターを添加し、活性の検出を試みた。しかし、活性が確認できたのはSDSを添加した時のみであった。このSDSに依存したプロテアーゼ活性は、約50kDa（RLP50）と約60kDa（RLP60）の2つが顕著であり、両者共に酸性で高く、弱アルカリ条件では低かった。SDSを添加しない場合は、いずれのpHにおいても活性は検出できなかった。RLP50はABAにより活性の発現が促進され、BAにより抑制された。また、着生葉では葉切片の場合に比べて著しく活性が低かった。それに対して、RLP60は着生葉においても強く発現していた。シクロヘキシミドによるRubiscoとRubisco activase含量の低下の抑制は、これらのプロテアーゼの発現阻害により説明できた。また、Rubisco含量とPLP50活性との間には高い負の相関が認められた。RubiscoとRubisco activaseの分解活性をイムノブロッティングにより分析したところ、RLP50活性の高かったSDSを含む酸性条件では、約55kDaのRubisco大サブユニットは、非常によく分解されたが、SDSを含まない弱アルカリ性条件では、ほとんど分解されなかった。それに対してRubisco activaseは、いずれの条件においても分解された。以上の結果から、Rubiscoの分解におけるRLP50の関与が強く示唆された。それに対して、Rubisco activaseはRubiscoと異なる場で、弱アルカリ性条件において働く活性の低いプロテアーゼによっても分解され得ると考えられた。つまり、このような異なった分解特性が、加齢過程における含量の変化過程に違いを生じている可能性がある結論づけた。

論文審査の結果の要旨

光合成における炭酸同化の初期反応を触媒する酵素Rubisco (ribulose-1, 5-bisphosphate carbonylase/oxygenase) は葉内の可溶性タンパクの約半分を占めるが、その酵素的性質の悪さから光合成の律速要因となっている。この酵素の活性化調節にはRubisco activaseが関係するとされ、イネ葉において申請者が初めてこのタンパクを精製したが、光合成速度への関与は不明であった。本研究は、Rubisco activaseに着目し、イネ(*Oryza sativa*)日本晴の葉の加齢過程における光合成速度、Rubisco activaseとRubiscoの含量の変化と生体内におけるRubiscoの活性化に関与する要因を検討し、光合成活性化の機構解明を目的としている。なお、本論文は次の4つの章から構成されている。

一章では、最大酵素放出速度および炭素同化効率とRubisco activase含量との関係を検討してい

る。イネ葉の発育段階においてRubisco はRubisco activaseよりも早く蓄積され、Rubisco activase は、生育中の光強度に影響されず、吸収窒素量に比例して増加した。Rubisco 含量は遮光区で若干低くなり、加齢過程や生育の光強度により、葉内でのRubisco とRubisco activase含量のバランスが変わり、特に若い葉ではRubisco に対するRubisco activaseの含量が低くなることを明らかにした。

最大酸素放出速度は、Rubisco 含量が 3gm^{-2} 以上になると飽和するが、Rubisco activase含量との間には高い正の相関が認められ、Rubiscoに対するRubisco activaseの含量比が高まると、Rubiscoあたりの活性が増加した。また、 CO_2 ガス交換法による炭素同化効率はRubisco activase含量とに直線的な関係が認められ、Rubisco activase含量はイネ葉の定常状態の光合成速度と密接に関わり、特に葉が若くRubiscoが過剰にある場合、Rubisco活性がRubisco activaseによる制限を受けているものと考察した。

二章では、非定常状態の光合成におけるRubisco activaseの働きを調べるため、弱光から急に飽和光まで増加させた場合の光合成速度の変化とRubisco activaseの関連を検討している。光強度の増加による新たな光合成の定常状態に移行するまでに要する時間の指標である緩和時間は、前照射の光量子束密度 (PFD) の増加に伴って短くなり、 $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ 以下で急速に短縮され、それ以上では緩やかとなった。そこで、 $60\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (弱光) と $500\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (強光) を選び、加齢に伴う緩和時間の変化を調査した。弱光からの緩和時間は加齢に伴い短縮され、光合成の活性化速度は加齢の進行に伴い上昇した。Activase/Rubisco比は若い葉で低く、加齢に伴い上昇し、弱光からの緩和時間と高い負の相関を示した。さらに、 CO_2 ガス交換速度から推定した弱光からのRubiscoの活性化における初速度は、Rubisco activase含量と正の相関を示した。それに対して、強光からの緩和時間は、Activase/Rubisco比との関係は認められず、細胞間隙 CO_2 分圧の上昇により低下した。ある程度強い光からの光合成の活性化には、比酵素的に進行するカルバミル化が関与しているため加齢に影響されないが、比較的弱い光からの光合成の活性化はRubisco activaseが関与し、Rubisco activaseとRubisco含量のバランスによって決定され、加齢の進行に伴い速度が増すものと考察した。

三章では、Rubisco activaseによるRubiscoの活性化がどの部分で調節されているのかを明らかにするため、 $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みによるRubisco活性と $^{14}\text{CABP}$ の結合による活性サイト数の光量子束密度 (PFD) に対する応答を調査した。*In vivo*のRubisco 活性に近いイニシャル活性とRubiscoの活性サイト数は、PFDの増加に伴って上昇したが、活性サイト数の変化は少なく、この値のみではイニシャル活性を説明できなかった。*In vivo*における活性サイトの回転数 (*in situ* Kcat) は、弱光域においてPFD の増加に伴い急速に上昇した。イネ葉におけるRubiscoの活性調節は、Rubisco活性サイト数とその回転数によって行われているものと考察した。次に、大気 CO_2 濃度条件での強光と飽和光におけるイニシャル活性は加齢と共に上昇したが弱光では変化が少なく、強光と飽和光におけるRubisco活性サイト数は加齢の進行に伴って上昇するが、*in situ* Kcat は加齢に影響されなかった。この活性サイト数とActivase/Rubisco比には、ほぼ直線的な関係が認められた。大気 CO_2 濃度で比較的PFD が高い条件での葉の若い時期はActivase/Rubisco比によってRubisco活性サイト数が決まると結論している。一方、 CO_2 と光の飽和条件でのイニシャル活性は、葉の若い時期に低く加齢に伴い上昇したが、イニシャルカルバミル化サイト数の増加は伴っていなかった。*in situ* Kcat は葉の発育段階に上昇し、その後、緩やかに低下した。これらの結果、飽和 CO_2 濃度条件においてもRubisco活性は若い時期に低い、これはRubiscoの活性サイト数によるものではなく、活性

化されたサイトにおける回転数の違いが関与しているものと考察した。

四章では、主稈第9葉の切片を、光照射下で、 $10\ \mu\text{M}$ ABA、 $10\ \mu\text{M}$ BAの溶液に浮かべ、Rubisco含量、Rubisco activase含量、それら以外の可溶性タンパク含量の経時的变化と分解に関与するプロテアーゼについて調べている。Rubisco含量、Rubisco activase含量の低下はABAにより促進され、BAにより抑制された。また、両タンパクの分解に関与するSDS依存の約50kDa (RLP50) と約60kDa (RLP60) の2つのプロテアーゼを確認した。RLP50活性の高いSDSを含む酸性条件ではRubiscoは分解されたがSDSのない弱アルカリ条件ではほとんど分解されなかった。一方、Rubisco activaseはいずれの条件においても分解され、両タンパクの異なった分解特性が、加齢過程における含量の変化の違いを生じていると結論している。

以上のように、本研究は、イネ葉の光合成活性化におけるRubisco activaseの役割を調べ、葉の加齢過程での葉のガス代謝とRubisco活性化の要因を詳細に検討し、Rubisco activaseによる光合成活性の調節機構を明らかにし、作物生産の基本である光合成の機構解明に重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。

よって、本研究者は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。