

## 要約

大気中の CO<sub>2</sub> 削減には、植物の持つ光合成能力の強化がもっとも直接的な手法である。光合成能力の強化の結果、CO<sub>2</sub> 固定能力が個体あたり 2 倍の植物が創製できれば緑化面積に対して効果的な CO<sub>2</sub> 削減を期待できる。カルビン回路に代表される光合成ソース機能が植物の光合成能力を律速するため、光合成能力の強化には、このような律速を解除することが重要である。こうした観点から、申請者らはこれまでカルビン回路の構成する酵素の一つであるルビスコに注目し、酵素的性質の優れたガルディエリアルビスコの発見に至った。このガルディエリアルビスコの機能を高等植物に付与すれば、光合成能力の律速解除が期待できるが、実際、遺伝子を介した機能付与の試みは、遺伝子発現系の異種生物間の障壁のため現状ではうまくいっていない。一方、ガルディエリアルビスコの酵素的性質に匹敵する別の優良ルビスコが最近今中らにより発見された。申請者らの予備実験からこのルビスコの場合、遺伝子発現系の異種生物間障壁は見られないことが明らかとなっている。そこで、本プロジェクトにおいては、このルビスコに注目し光合成ソース機能改良による CO<sub>2</sub> 固定能力増強植物の創製を目的とした。本年度は、*Pyrococcus kodakaraensis* 由来の優良ルビスコおよびその改良ルビスコの作製をめざし、その結晶解析から観察される Glu-63, Arg-66, Asp-69 を中心としたイオン結合ネットワークに関して、これら 3 つのアミノ酸を一つずつ Ser に置換した変異体 (E63S, R66S, D69S)、3 つを同時に置換した変異体 (E63S-R66S-D69S) を作製し、精製を行った。その結果、D69S は野生型と同じ 10 量体、E63S, R66S は 10 量体と 2 量体の混合物、E63S-R66S-D69S は 2 量体となることが明らかとなった。また、変異体の熱変性温度は、野生型のものより低温側にシフトすることが判明した。また、光合成速度の上昇した植物のために必要な  $\delta_f$  の改善された RuBisCO の創製を最終目標とし、loop6 ラッチに関与するアミノ酸残基を含む  $\delta_f$  に影響を与えると思われる *G. partita* 特有のアミノ酸残基を  $\delta_f$  の低い藍藻の RuBisCO に導入し、CO<sub>2</sub> 親和性への影響を調べた。その結果、H386Q の変異は  $\delta_f$  への効果を及ぼすと結論することはできないが、CO<sub>2</sub> 親和性が上昇し、このアミノ酸残基が CO<sub>2</sub> 認識に関与することが強く示唆された。Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PCK) (EC 4.1.1.49) は、オキザロ酢酸をフォスホエノールピルビン酸に変換する酵素であるが、この酵素の作用を用い葉緑体内の二酸化炭素濃度を上昇させることによる光合成能力の強化を目指し、この PCK の葉緑体への導入を試みた。この結果、PCK は光合成能力を強化する可能性が示された。さらに核ゲノムと色素体ゲノムに重複してコードされている遺伝子の中で、光合成のカルビンサイクルに関与すると考えられる機能未知タンパク質の遺伝子 *cfxQ* に注目して、二種類の *cfxQ* を用いた系統解析を行った。今回の研究で *C. merolae* の色素体と核にコードされている *cfxQ* について系統的に異なり、発現調節も異なっていることが明らかになった。

## Summary

The direct way for atmospheric CO<sub>2</sub> diminution is reinforcement of the photosynthetic potential power which plant has. If the CO<sub>2</sub> fixation competence of individual plant increased two times higher, an effective CO<sub>2</sub> diminution for replanting area. It is important to remove such a rate-limiting in reinforcement of photosynthetic potential force so that rate-limiting does photosynthetic potential power of plant functioning a photosynthesis source represented by Calvin cycle. From such a point of view, we paid attention to rubisco, the enzyme which Calvin cycle constituted and discovered the superior rubisco in *Galdieria* in terms of enzymic property. The trial of providing this superior property to the model plant, tobacco do not succeed because of the barrier between hetero-organism of gene expression line. On the other hand, another excellent rubisco equal to enzymic property of *Galdieria* rubisco was discovered recently by Imanaka. The preliminary experiment reveals that such barrier is not seen. Therefore we paid attention to this rubisco. This year we constructed mutants which substituted of Glu-63, Arg-66, Asp-69 to Ser. As a result, it was recognized that thermal denaturation temperature of variant shifted to the cooling temperature side than that of wild type. In addition, I aimed for construction of improved Sr of RuBisCO for the increase of photosynthetic rate. As a result, CO<sub>2</sub> affinity increased and this amino acid residue participated in CO<sub>2</sub> recognition was strongly suggested.

Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PCK) (EC 4.1.1.49) was introduced into chloroplast for reinforcement of photosynthetic potential force by raising carbon dioxide concentration in chloroplast with action of this enzyme. As a result, PCK may increase the photosynthetic activity.