

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 10 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07367

研究課題名（和文）C4型光合成獲得に寄与する制御因子の解明

研究課題名（英文）Investigation of factors that involved in C4 evolution

研究代表者

谷口 幸美（Taniguchi, Yukimi）

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：80756693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：乾燥・高温に強いC4型光合成はC3型光合成を行う祖先種からC3-C4中間種、C4-like種を経て進化したと考えられている。本研究ではC4型光合成を行う*Flaveria bidentis*に対して変異原処理を施し、C4-like型に似た表現型を示す"先祖返り"変異体を取得し、その解析を行った。その結果、原因変異の候補箇所が特定され、C4型光合成をおこなう種で観察されるRuBisCOの維管束鞘細胞への局在化に關与する因子はごく少数であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C4型光合成は乾燥・高温に強く単位面積当たりの生産性が高いことが知られている。現在世界中で栽培される主要穀物のうちイネや小麦などはC3型光合成をおこなう種であり、これらのC3型主要穀物類にC4型光合成を導入することが望まれている。しかし、C4サイクルの酵素類を単純に高発現させるだけではC4型光合成は駆動せず、C4型光合成のC3型種への導入は簡単ではないことが明らかとなっている。本研究によって明らかとなるC4型光合成の獲得に寄与する因子群はC4型への進化に際して変化した鍵因子である可能性が高く、C4型への進化を模した形でC4型光合成のC3型種への導入を可能にすると考えられる。

研究成果の概要（英文）：C4 plants are believed to have evolved from C3 plants through a C3-C4 intermediate and C4-like stage. It is very important that mesophyll- or bundle-sheath-cell specific localization of C4 cycle enzymes and RuBisCO for C4 photosynthesis, but their regulatory mechanisms of localization were unclarified.

In this research, C4 *Flaveria bidentis* seeds were treated with Carbon ion beam and we got some mutants they showed phenotypes similar to C4-like species. Furthermore analysis, many mutations in the mutant genome were cleared. And it was suggested that a few factors were involved in RuBisCO localization to bundle-sheath-cell in C4 species.

研究分野：植物生理

キーワード：C4光合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トウモロコシに代表されるようにC₄種の穀物は、熱帯・亜熱帯・乾燥地域における生産性が高いために世界の穀物の作付面積の約30%を占め、農業上重要な穀物となっている。地球上に生息する約8,000のC₄植物は19科45属にわたって存在しており、それぞれC₃型光合成を行う祖先植物から独立に進化したと考えられている。またC₃植物のゲノムにもCO₂濃縮に必要なC₄代謝酵素がコードされており、それらが低レベルで発現していることがすでに明らかになっている。これらのことから、C₄型光合成はC₃植物がすでに持っているC₄関連遺伝子群の発現制御にかかわる因子のわずかな変化によって比較的容易に獲得された機構であると考えられているが、その変化に関わる制御因子は明らかになっていない。また、C₃型光合成からC₄型光合成への進化はステップ・バイ・ステップで起きており、これらのステップでの変化をもたらした制御因子を明らかにし、進化過程を解明することでC₃植物種にC₄型光合成を持たせる系の確立が可能であると期待される。C₄型光合成ではCO₂は葉肉細胞でC₄化合物へと固定されたのちに維管束鞘細胞へと輸送され、そこで脱炭酸される。このCO₂濃縮機構のためにはC₄回路代謝酵素群がそれぞれにふさわしい細胞でのみ高発現する「局在」が重要であるが、それがどのように制御されているのかはほとんど明らかにされていない。これまでに申請者は、同属の中にC₃型種やC₄型種だけでなくC₃-C₄中間型種やC₄-like型種が存在している *Flaveria* 属(キク科)をもちいて、C₄型光合成の獲得過程において代謝酵素群はmRNAの段階で発現の局在が制御されており、その制御はトランス因子に依るものであることを明らかにした。また、その局在を決める因子の候補として、C₄型種で維管束鞘細胞特異的に発現の高い複数の転写因子をC₄型光合成の獲得過程に関与する制御因子の候補として解析を進めている。しかし、制御因子の同定には至っていない。これは候補遺伝子から解析を開始する逆遺伝学的な解析では、解析が進むまで候補遺伝子が本当にC₄型光合成の獲得過程に関与するかどうかは明らかとならないためである。

そこで、所属研究室においてゲノム情報が整備されており、形質転換が可能であるC₄型種 *Flaveria bidentis* をもちい、変異原処理を施すことによってC₄型光合成の獲得過程に関与する因子を同定するという着想に至った。

2. 研究の目的

C₄植物は、CO₂濃縮を行う特殊化した光合成様式(C₄型光合成)をとるため、C₃型光合成を行う一般の植物より乾燥や高温条件化で高いCO₂固定能を発揮する。C₄植物種はC₃型光合成をおこなう祖先種からC₃-C₄中間種、C₄-like型種そしてC₄種と段階的に進化したと考えられており、C₃種のゲノムにコードされているC₄代謝酵素遺伝子やトランスポーターなどの発現がその制御因子の変異によって変化し徐々にC₃-C₄中間型、C₄-like型そしてC₄型の形質を獲得したと考えられている。本研究ではC₄型種である *Flaveria bidentis* に変異を導入することによりC₄-like型やC₃-C₄中間型の表現型を示す“先祖返り”変異体を取得しその原因遺伝子を特定することによりC₃からC₄への進化の過程で変化があった制御因子を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

本研究ではC₄型種 *Flaveria bidentis* の種子を重粒子線を用いて変異原処理を施し得られた変異体プールから目的変異体をスクリーニングするとともに、原因変異の特定のために次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を行った。

(1) C₄型種 *Flaveria bidentis* の種子を重粒子線を用いて変異原処理したのち次世代(M2世代)を獲得し、M2世代からスターチの蓄積が維管束鞘細胞以外にもみられるようになる個体(Rubiscoの維管束鞘細胞への局在が失われた個体)を、葉のルゴール染色によって選抜し、それらの表現型を解析した。

(2) 次に得られた変異体の原因となった変異を解明するため、変異体のゲノムを次世代シーケンサーを用いて解析し変異の候補を抽出した。

(3) 変異体のゲノムを全ゲノムリシーケンス解析するだけでは、多数の変異箇所が抽出されるため真の変異体の原因遺伝子を突き止めることは困難であることが考えられた。そのため、変異原処理に利用した種子の親世代の *F. bidentis* および *Flaveria* 属のもう一つのC₄型種である *F. trinervia* のRAD-seq解析を行い分子マーカーを探索した。

(4) 変異体の原因変異の候補から真の原因変異を特定するために、変異体と野生型個体との交配(戻し交配)を行い、表現型と相関する分子マーカーの探索を試みた。

4. 研究成果

(1) C₄型種 *Flaveria bidentis* に変異を導入した変異体ライブラリM2種子1840粒(230のM1種子に由来)をスクリーニングした。その結果、Rubiscoの局在が葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方にみられる、C₄-like型のような表現型を示す変異体を2系統取得した。これら2系統はそれぞれ独立の系統であり、表現型には差がみられた。一方は比較的表現型が弱く生育条件によっては表現型が観察されないものであったのに対して、もう一方は生育条件にほとんど依存することなく表現型を示した。後者の生育条件に依存せずにC₄-like型のような

表現型を示す変異体に関して次世代を取得し、その表現型を維持していることを確認した。また、次世代において光合成の酸素阻害を測定したところ、通常C₄型植物では見られない酸素阻害が観察され、その程度はC₄-like型種とほぼ同等であった。変異体においてはRuBisCOの局在がほぼC₄-like型と同等であるという観察結果から、この酸素阻害はRuBisCOが葉肉細胞にも発現するようになったためであると考えられる。

(2) スクリーニングによって得られた変異体のうち、生育環境に依存せずに表現型を示す1系統について全ゲノムリシーケンスを行い、ゲノム上の欠損の位置を特定した。その結果、約1Gbの全ゲノムの中に1bp以上の欠損がある箇所が70,371同定された。この結果は単純計算では、任意の14kbのゲノム領域あたり1か所の割合で1bp以上の欠損がみられるということに相当する。今回、230の独立系統をスクリーニングして明確な表現型を示す系統は1系統しか得られなかったことから、C₄型においてRuBisCOを維管束鞘細胞へと局在化させる因子はごく少数であることが推察された。

(3) 変異体のゲノムを全ゲノムリシーケンス解析するだけでは、多数の変異箇所が抽出されるため真の変異体の原因遺伝子を突き止めることは困難であることが考えられた。そのため、変異体に対して野生型を戻し交配しその子孫を解析することを目指し、戻し交配するための“野生型”の選定およびマーカーの探索をRAD-Seq解析を用いて行った。

*F. bidentis*および*Flaveria*属のもう一つのC₄型種である*F. trinervia*のそれぞれ複数個体を用いてRAD-seq解析を行った。その結果*F. bidentis*と*F. trinervia*では配列が大きく異なる場所が多く利用可能なRADマーカーが少ないため、掛け合わせによって原因変異箇所を特定することは困難であると考えられた。次に、由来を別にする(別系統と考えられる)*F. bidentis*の中でジェノタイプピングに利用可能なRADマーカーの有無を探索した。同一由来(同一系統)の中では遺伝的に均一であると考えていた*F. bidentis*だが、RAD-Seq解析の結果から、一個体のゲノム内でもヘテロな状態のマーカーが多く存在しており系統として純化されていないものであることが明らかとなった。このため、遺伝学的解析に際してRADマーカーを利用することは困難であると考えられた。

(4) 上記の結果より変異体に野生型*F. bidentis*を戻し交配して得られた後代に関して、RADマーカーを利用することが困難であることが明らかとなった。変体の原因変異特定のためには、同様の表現型を示す別系統変異体を取得し同様の解析を行う、もしくは戻し交配を複数回重ねた後代に関して全ゲノムリシーケンス解析を行い欠損・変異箇所を特定する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

(1) YY. Taniguchi (2018) Evolutionary progression from C₃ to C₄ photosynthesis in the *Flaveria*. 光合成研究. Apr;28(1):51-59. (査読あり)

(2) YN. Munekage and YY. Taniguchi (2016) Promotion of Cyclic Electron Transport Around Photosystem I with the Development of C₄ Photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* May;57(5):897-903. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7件)

(1) 岡 美慧、谷口(山本)幸美、宗景(中島)ゆり. キク科*Flaveria*属における遺伝子発現制御系の確立第81回日本植物学会、2017年9月8~10日、千葉

(2) 木下優人、井上史生、谷口(山本)幸美、宗景(中島)ゆり. 遺伝学的手法を用いたクランツ構造とC₄型代謝酵素の発現領域を限定化する形質の相関解析. 第81回日本植物学会、2017年9月8~10日、野田

(3) 谷口(山本)幸美、宗景ゆり. *Flaveria*属におけるC₄型光合成の段階的成立. 第8回日本光合成学会年会 シンポジウム2-変動する光量への光合成機能の調節-, 2017年5月27-28日、大津

(4) Kobayashi Kana, Nakamura Naoya, Morikawa Kaoru, Yokota Akiho, Taniguchi Yukimi Y. and Munekage Yuri N. Contribution of NDH-dependent and PGR5-PGRL1-dependent cyclic electron transport around photosystem I to NADP-ME type C₄ photosynthesis in *Flaveria bidentis*. 第58回日本植物生理学会、2017年3月16-18日、鹿児島

(5) Hanata Hiroaki, Taniguchi Yukimi, Nishimura Kenji, Sakamoto Wataru, Furumoto Tsuyoshi and Munekage Yuri N. Localization of RETICULATA-RELATED 3 in C₄ *Flaveria bidentis*. 第58回日本植物生理学会、2017年3月16-18日、鹿児島

(6) Okudono Ken, Taniguchi Yukimi Y. and Munekage Yuri N. Expression pattern analysis of FbDOF during the leaf development in C₄ *Flaveria bidentis*. 第58回日本植物生理学会、2017年3月16-18日、鹿児島

(7) 岡 美慧、谷口幸美、宗景ゆり. キク科*Flaveria*属形質転換系と遺伝子発現誘導系の確立. 第68回日本生物工学会、2016年9月28-30日、富山

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6．研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。