

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580016

研究課題名（和文） CAM型光合成における概日リズム制御の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of circadian regulation in CAM

研究代表者

東江 栄（AGARIE SAKAE）

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：50304879

研究成果の概要（和文）：

CAMの概日リズム制御機構を分子レベルで明らかにするために、3種CAM植物（セイロンベンケイソウ、ハナガサベンケイソウ、アイズプラント）からCAM関連遺伝子（*ppcD*, *Ppck*, *Ppc1*, *McPpck1*, *Mod1*）のプロモーターを単離した。これらプロモーターは、アブシジン酸、エチレン、水ストレス、塩ストレス応答、及びMyb結合領域、光応答因子Dof結合領域、時計遺伝子発現調節領域を含んでいた。レポーター遺伝子を用いた一過性発現解析を行い、*McPpck1*の転写調節部位が転写開始コドン上流-1600bp～-1100bpにあることを明らかにした。遺伝子の機能解析のために*in planta*法による形質転換法を確立した。成長点、脇芽、種子にアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入した。形質転換効率はそれぞれ、約20%、90%、及び70%であった。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate molecular mechanisms for circadian regulation of CAM, the 5' flanking region of CAM-related genes (*ppcD*, *Ppck*, *Ppc1*, *McPpck1*, *Mod1*) were isolated from CAM plants such as *Mesembryanthemum crystallinum*, *Kalanchoe pinnata*, *K. fedtschenkoi*. In the regions of these plants, cis-regulatory elements responsible for ABA, ethylene, drought and salt stresses and circadian regulate and the binding sites of Myb and Dof were found. Transient-expression assays indicated that the sequence -1600 to -1100 of *McPpck* of *M. crystallinum* was sufficient to drive the expression of the reporter gene. We applied *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation procedure to *M. crystallinum*. Transformation rates using cotyledons, side shoots and seeds were 20%, 90% and 70%, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学，作物学・雑草学

キーワード：CAM植物，概日リズム，光合成，生物時計

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

CAM (Crassulacean Acid Metabolism: ベンケイソウ酸代謝) を行う植物は、夜間に気孔を開いて CO₂ を吸収し、昼間に気孔を閉じるという概日リズムを示す。昼間の気孔閉鎖は乾燥耐性を顕著に増加させる。また有機酸の脱炭酸によって、葉内 CO₂ 濃度が増加し、酸化ストレスが抑えられる。CAM は C₃ 植物から進化したと考えられている。また、CAM の CO₂ 固定にみられる概日リズムは概日（生物）時計によって制御されていると考えられているが、いずれも分子レベルの解析はほとんど行われていない。

これまで C₃ 植物に C₄ 回路を付与する試みは多くなされてきたが、炭酸固定能を有意に高めるまでには至っていない。一因として、C₄ 光合成が葉肉細胞と維管束鞘細胞の二つの細胞の分業により成り立っており、C₃ 回路よりも複雑な制御機構を必要とするためと考えられる。CAM は C₃ 回路と同様、葉肉細胞のみで行われる。したがって、関連する酵素蛋白質を高発現させ、活性に概日リズムを持たせれば、炭酸固定能を変換させることができると期待される。

我々がこれまで行った C₃ 植物のイネに C₄ 光合成回路を付与する研究では (Ku et al., 1999), イネに C₄ 光合成蛋白質をこれまでにない高いレベルで発現させることに成功している。これは C₄ 植物 (トウモロコシ) と C₃ 植物 (イネ) の構造や転写調節因子の解析をもとに、C₄ 光合成遺伝子のゲノム遺伝子 (プロモーター領域、全翻訳領域及びターミネーター領域を含む) を導入することで達成された (Matsuoka et al., 1998)。CAM を制御する転写調節因子を C₃ 植物との比較から明らかにし、C₃ 植物に導入することができれば、CAM 関連遺伝子を高発現させ、概日リズムをもたせることができると期待される。

2. 研究の目的

概日リズムを示す植物の反応は、その多くが生物時計によって制御されている。概日リズムを発生させるシステムは、①約 24 時間の振動を発生させる概日（生物）時計、②環境要因の変動を感知して修正する入力系、③概日リズムとして観察される出力系の 3 つに分けられ、時計遺伝子による出力系の発現制御は転写調節因子を介して行われる。本研究では、CAM の概日リズム発生機構を生物時計と出力系 (CAM の日変化)、及び両者を関連させるものに分け、それぞれの制御因子を同定し、CAM の CO₂ 固定にみられる概日リズムの制御機構を分子レベルで明ら

かにすることを目標とする。その端緒として数種 CAM 植物の CAM 関連遺伝子のプロモーター領域を単離し、構造と活性を調査した。

単離した遺伝子の機能解析には、その遺伝子の発現量を改変した組み換え体を作成する方法が有効であるが、アイスプラントでは形質転換法が確立されていない。本研究では、を用いる *in planta* 法をアイスプラントに適用し、組み換え体を作成する方法を検討した。

3. 研究の方法

材料は通性 CAM 植物アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*)、セイロンベンケイソウ (*Kalanchoe pinnata*)、ハナガサベンケイソウ (*K. fedtschenkoi*) である。アイスプラントはホーグランド溶液で水耕栽培し、ベンケイソウは Vuthy ら (2007) の方法で土耕栽培した。アイスプラントは 400mM NaCl を与え CAM を誘導した。ゲノム DNA は CTAB 法で抽出した。転写開始上流域は TAIL-PCR 法を用いて単離した。単離したプロモーターをレポーター遺伝子 (RLUC) に連結したディリュションクローンを作成し、プロトプラストにおける一過的発現量を測定した。プロトプラストは、Struve ら (1984) の方法を一部改変して単離した。

形質転換法の確立には、アイスプラントの野生型を供試材料とした。種子は、MS 寒天培地に無菌的に播種し、室温で発芽させた。アグロバクテリウムは、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、及び緑色蛍光タンパク質発現遺伝子を連結したバイナリーベクター (pBI) を持つ、EHA101 株を用いた。胚軸外植体は、播種後 7 日間生育させたアイスプラント幼苗の葉身の一部と根を切除して得た。播種後 10 日間生育したアイスプラント幼苗の生長点に針で傷をつけアグロバクテリウムを感染させた。腋芽への感染は第 4~5 葉齢まで栽培した個体の主茎を切除しその切り口にアグロバクテリウムを感染させた。また、種子への感染は、種子の表面をサンドペーパーで削り、アグロバクテリウム懸濁液に浸漬し感染させた。導入遺伝子の確認は、PCR 法で行った。ゲノム DNA は葉身から CTAB 法で抽出した。

4. 研究成果

セイロンベンケイソウのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) をコードする遺伝子 *ppcD* のプロモーターには転写因子 Myb の結合領域が確認された。ハナガサベンケイソウの PEPC キナーゼ (PPCK) をコードする遺伝子 *Ppck* のプロモーターには、

水ストレス及びアブシジン酸応答に関わるシス領域が確認された。アイスプラントからは PEPC, PEPC キナーゼ及び NADP リンゴ酸酵素をコードする遺伝子, すなわち *Ppc1*, *McPpck1* 及び *Mod1* のプロモーターを単離した。*Ppc1* には 5 箇所塩ストレス応答に関与するシス領域が確認された。*McPpck1* にはエチレン及び塩ストレス応答に関わるシス領域が, *Mod1* には時計遺伝子の発現に関わるシス領域が確認された。また, いずれのプロモーターにもトウモロコシの光応答遺伝子の転写促進に関与するタンパク質 (Dof) の結合サイトが認められた。

表 1. 単離した遺伝子の転写開始点上流シス配列。

植物種と遺伝子	位置	配列	機能
<i>K. pinnata</i> PEPC(<i>ppc1</i>)	-2028~-2025	TAAAG	Dof結合
	-724~-728	TAAAG	Dof結合
	-978~-973	TAACTG	Myb結合
	-661~-658	TAACTG	Myb結合
	-949~-945	ACGTG	ABA誘導
	-900~-898	ACGTG	ABA誘導
<i>K. fedtschenkoi</i> PPCK(<i>Ppck1</i>)	-1189~-1183	TATTAG	サイトカニン反応
	-1080~-1055	CATGTG	水ストレス反応
	-194~-190	TAAAG	Dof認識
	-157~-153	ACGTG	ABA誘導
<i>M. crystallinum</i> PEPC(<i>Ppc1</i>)	-1334~-1329	GAAAAA	塩ストレス誘導
	-1218~-1213	GAAAAA	塩ストレス誘導
	-1107~-1102	GAAAAA	塩ストレス誘導
	-974~-969	GAAAAA	塩ストレス誘導
	-513~-508	GAAAAA	塩ストレス誘導
	-388~-382	GGTATGA	乾燥ストレス
	-1328~-1323	AAAQ	Dof結合
<i>M. crystallinum</i> PPCK(<i>McPpck1</i>)	-2708~-2702	GAAAAAG	QT-1 box
	-2642~-2646	GCCAT	光調節
	-1994~-1987	TAAAATAT	エチレン誘導
	-808~-803	CAGATG	ABA誘導
	-2298~-2295	AAAQ	Dof結合
<i>M. crystallinum</i> NADP(<i>Mod1</i>)	-952~-947	GCCACTG	光応答
	-830~-824	GCCACTG	光応答
	-799~-794	GAAAAA	塩ストレス誘導
	-809~-800	GATGGTGT	概日リズム制御
	-28~-21	GAAAAA	塩ストレス誘導
	-1405~-1402	AAAQ	Dof結合
	*他3箇所		

アイスプラントの PEPC キナーゼ遺伝子 *McPpck1* の発現にみられる概日リズムを制御する分子メカニズムを明らかにするために, 本研究で単離した *McPpck1* のプロモーターを任意の長さに分断し (図 1), レポーター遺伝子に連結したディリュージョンクローンを作成し, 一過的発現解析を行なった (図 2)。



図 1. アイスプラント *Ppck1* の転写開始点上流断片のディリュージョンクローン。数字は転写開始点からの位置

を示す。

その結果, 転写開始コドン上流-1600bp から-1100bp までの配列が *McPpck1* の転写調節に関与することが示唆された。

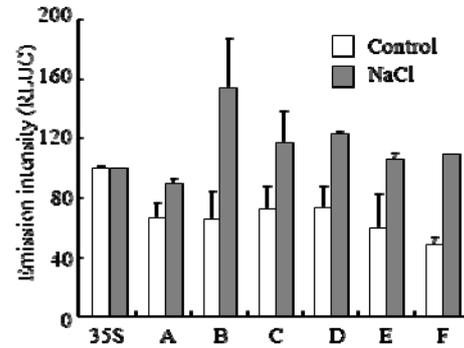


図 2. アイスプラント *McPpck1* 転写開始点上流配列のプロモーター活性. A:1890bp; B:1600bp; C:1100bp; D:750bp; E:500bp; F:250bp; 35S:CaMV35S.

胚軸外植体に感染させた 549 個体のうち, 選抜培養の初期段階で 58 個体が生存していたが, 途中で枯死し形質転換体は得られなかった。生長点から感染させた個体では 32 個体のうち 25 個体で外来遺伝子の導入が確認された。

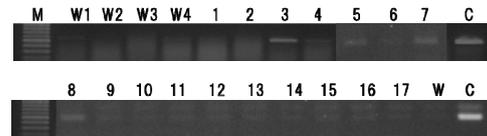


図 3. 生長点にアグロバクテリウムを感染させた形質転換体における導入遺伝子(ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 HPT)の確認。M:サイズマーカー; W, W1-W4:野生種; 1-17:形質転換体; C:コントロール (導入バクテリア)。

腋芽へ感染させた個体では 18 個体のうち 9 個体でゲノムを抽出することができ, そのうち 8 個体で外来遺伝子の導入が確認された。

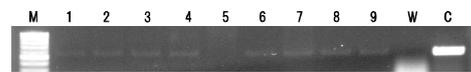


図 4. 腋芽にアグロバクテリウムを感染させた形質転換体における導入遺伝子(ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 HPT)の確認。M:サイズマーカー; W:野生種; 1-9:形質転換体; C:コントロール (導入バクテリア)。

また, 種子に感染させた個体では 36 個体のうち 25 個体で外来遺伝子の導入が確認された。形質転換効率は腋芽に感染させた場合に最も高く, 88%であった。

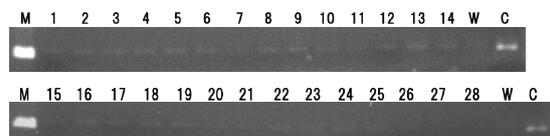


図 5. 種子にアグロバクテリウムを感染させた形質転換体における導入遺伝子(ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 HPT)の確認. M: サイズマーカー; W: 野生種; 1-28: 形質転換体; C: コントロール (導入ベクター).

以上の結果から、アイスプラントの形質転換は、操作の簡便さなどを考慮して腋芽への感染が最も適していると考えられた。

このように、アイスプラントで初めて完全な個体としての形質転換体を得ることができた。より安定的に形質転換体を得るためには、生長点へアグロバクテリウム処理法、処理する植物体の生育段階、種子の処理法、共存培地の種類等をさらに検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

H. Sunagawa, J. C. Cushman, S. Agarie. 2010. Crassulacean acid metabolism may alleviate production of reactive oxygen species in a facultative CAM plant, the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Production Science*. 13:256-260.

[学会発表] (計 4 件)

砂川春樹・John C. Cushman・東江栄. アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) における活性酸素の発生制御からみた CAM 型光合成の生理的意義.

日本作物学会第 230 回講演会. 北海道大学農学部. 2010 年 9 月 4・5 日. 日本作物学会紀事第 79 巻別号 1 : 388-389.

東江栄・永井輝孝. アイスプラント葉身から単離された二種の液胞の膜タンパク質発現プロファイル.

日本作物学会第 233 回講演会. 東京農工大学農学部. 2012 年 3 月 29-3 月 30 日. 日本作物学会紀事第 81 巻別号 1 : 110-111.

東江栄・副島健太郎・John C. Cushman. アイスプラントブラッダー細胞関連遺伝子の単離と発現解析.

日本作物学会第 233 回講演会. 東京農工大学農学部. 2012 年 3 月 29-3 月 30 日. 日本作物学会紀事第 81 巻別号 1 : 112-113.

東江栄, 出瑤子, 川本紗規子, 山口修平, 砂川春樹. CAM 概日リズム制御関連遺伝子プロモーターの単離と解析.

日本作物学会第 233 回講演会. 東京農工大学農学部. 2012 年 3 月 29-3 月 30 日. 日本作物

学会紀事第 81 巻別号 1 : 308-309.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 2 件)

名称 : 形質転換アイスプラントの作出方法
発明者 : 東江栄, 野瀬昭博, 穴井豊昭
権利者 : 佐賀大学
種類 : 特許
番号 : 2005330877
取得年月日 : 平成 23 年 4 月 7 日
国内外の別 : 国外 (オーストラリア)

名称 : 形質転換アイスプラントの作出方法
発明者 : 東江栄, 野瀬昭博, 穴井豊昭
権利者 : 佐賀大学
種類 : 特許
番号 : 8101824
取得年月日 : 平成 24 年 4 月 15 日
国内外の別 : 国外 (アメリカ合衆国)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/agarie/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東江 栄 (AGARIE SAKAE)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号 : 50304879

(2) 連携研究者

()

研究者番号 :