

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06294

研究課題名（和文）高いCO<sub>2</sub>吸収能力と乾燥耐性の両立を可能とする気孔応答の最適化メカニズム研究課題名（英文）Optimization of stomatal regulation that enables both high CO<sub>2</sub> absorption and drought tolerance

研究代表者

楠見 健介（Kusumi, Kensuke）

九州大学・理学研究院・講師

研究者番号：00304725

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：気孔閉鎖を介したCO<sub>2</sub>吸収と水蒸散のバランス制御機構の解明をめざして、ゲノム編集による気孔閉鎖制御のキー因子であるSLAC1の構造改変を行った。その結果、ジーンターゲティングの手法により、イネの内在のSLAC1上の複数のCO<sub>2</sub>シグナル受信候補部位（Y256/Y473）をピンポイントでアミノ酸置換する事に成功した。完成したSLAC1改変株SLAC1-Y256F\_Y473Fを用いてガス交換測定による気孔応答を調べ、CO<sub>2</sub>応答が低下し、一方ABA応答は正常であることを確認した。このことはSLAC1の構造改変により、気孔のCO<sub>2</sub>応答を特異的にコントロールできることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気孔細胞内で働く因子の構造を直接かつ精密に改変することにより、これまで不明であったCO<sub>2</sub>吸収と水蒸散のバランス制御機構を詳細に調べることが可能となった。また、大気中CO<sub>2</sub>濃度が増加し続ける中、食糧増産の観点から高CO<sub>2</sub>環境における光合成の効率低下が問題となっているが、本研究の成果は、高CO<sub>2</sub>環境下においてもCO<sub>2</sub>を効率的に利用できる植物開発の可能性につながる。本研究で用いた、ゲノム編集やジーンターゲティングなどの内在遺伝子を直接改変する技術により、今後は主要な育種技術の一つとして重要度が増すと考えられ、本研究の成果はそのさきがけとして位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the regulatory mechanism of the balance between CO<sub>2</sub> absorption and water transpiration through stomatal closure, we structurally modified rice SLAC1 protein, a key factor in the regulation of stomatal closure, by homologous recombination-mediated genome editing. We succeeded in introducing two amino acid substitutions (Y256F/Y473F) on the SLAC1 gene that disrupt the candidate CO<sub>2</sub> signal receiving site. Gas exchange measurement exhibited that in the SLAC1-modified plants, elevated CO<sub>2</sub>-induced stomatal closure was significantly reduced. By contrast, ABA-induced stomatal closure remained unaffected. These results indicate that stomatal CO<sub>2</sub> response can be artificially controlled by modification of the SLAC1 structure.

研究分野：植物生理学

キーワード：イネ 気孔 CO<sub>2</sub> 光合成 ジーンターゲティング ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

植物は、空気中の二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) と土壌に含まれる窒素やリンなどの栄養素を栄養源として吸収し成長する。それらの取り込み調節においては葉の表皮組織に存在する気孔の開度調節が重要な役割を果たす。気孔は植物が光合成を活発に行う太陽光下で、光シグナルを感知して開口し CO<sub>2</sub> の取り込みを促進すると同時に、水蒸散を行い、根からの水や栄養成分の取り込みを促す。しかし一方で気孔の開口は水分損失を招き、乾燥ストレスを植物にもたらす。従って、植物は体内の水環境を常に監視し、必要に応じて気孔を閉鎖し水分損失を防ぐ。このように、気孔の開口による CO<sub>2</sub> の取り込みと水蒸散はトレードオフの関係にあり、気孔は水分損失を引き起こさずに最大限に CO<sub>2</sub> を取り込めるように、内外環境の変化に応じて精密な開閉制御を行っていると考えられる。近年、気孔開閉に関わる多くの突然変異株が解析され、気孔制御の分子メカニズムと関連因子が明らかになりつつある。気孔の開閉は、気孔を構成する孔辺細胞の体積の変動を通じて引き起こされ、光による開口では、まず細胞膜上のプロトンポンプが活性化され、細胞膜の過分極とカリウムイオンの取り込みにより、浸透圧が上昇し、孔辺細胞内へ水が取り込まれて体積が増加し、気孔が開く。それに対して、乾燥ストレスなどによる閉口時は、植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) により孔辺細胞の陰イオンチャネル SLAC1 が活性化され、開口と逆に細胞膜の脱分極とカリウムイオンの排出と水の排出により引き起こされることがわかっている。このように、環境シグナルの受信から気孔制御に至る素過程の概要は明らかになりつつある。しかし、植物が個々の環境シグナルを峻別し、CO<sub>2</sub> の取り込みと水蒸散のバランスを最適化し、気孔開度に反映するしくみは不明である。最近、シロイヌナズナの変異体を用いた相補性解析から、閉鎖因子である SLAC1 の活性化に際して、その CO<sub>2</sub> 応答には膜貫通領域 (=チャネル部位)、ABA 応答には N・C 末端領域が主に関わることが分かってきた。これらの領域の構造をアミノ酸置換により改変した場合、気孔の CO<sub>2</sub> 応答、ABA 応答がそれぞれ特異的に損なわれる。このことは異なる環境シグナルを SLAC1 が個別に受信していることを示唆している。また、その受信部位を人為的に改変する事で、気孔開閉の環境応答をコントロールできる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、気孔閉鎖制御因子であり、孔辺細胞に局在する陰イオン輸送タンパク質 SLAC1 が関わる、植物の CO<sub>2</sub> の取り込みと水蒸散のバランス制御メカニズムの解明である。そのために、生育に強い光と多量の水を必要とし、強力なバランス制御を行っていると思われるイネを材料として、SLAC1 内部の環境シグナル受信部位の DNA 配列を直接改変した変異体を作製し、乾燥と CO<sub>2</sub> 濃度に対する生理応答を調べる。また同時にこれらのイネ系統を湿度と CO<sub>2</sub> 濃度を個別に調節した環境で栽培し、気孔制御の改変が環境適応能力の強化につながるかを検証する。

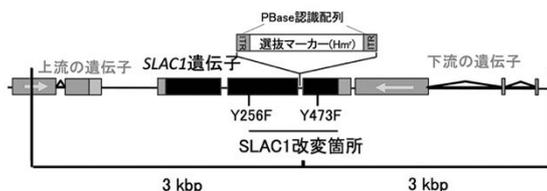


図1. ジーンターゲティングの対象領域と、SLAC1遺伝子上の改変箇所 (Y256, Y473) および選択マーカー挿入位置。

## 3. 研究の方法

本研究では生育に強い光と多量の水を必要とするイネを材料として、気孔閉鎖因子である孔辺細胞膜の陰イオン輸送タンパク質 SLAC1 の環境シグナル伝達受信部位を個々に改変した形質転換体を作製し、その解析を通じて、植物が CO<sub>2</sub> の取り込みと水蒸散のバランスをとりながら最適な気孔開度を保つしくみを明らかにする。また、気孔制御の改変が植物の環境適応能力の強化につながるかを検証する。具体的には (1) 農業生物資源研究所で開発された、ジーンターゲティングを基盤としたゲノム編集技術を用いて、気孔閉鎖制御のキー因子である陰イオンチャネルタンパク質 SLAC1 の 2 箇所の CO<sub>2</sub> シグナル受信部位を改変 (アミノ酸置換) した (図 1)。用いたイネの系統は、当初計画していた台中 65 号では置換系統が得られなかったため、最終的には日本晴を用いて作成に成功した。また、(2) 対照系統として必要な SLAC1 破壊系統については、日本晴バックグラウンドのものを持っていなかったため、CRISPR/CAS9 システムにより新たに作成した。そして (3) これらの系統を用いて、CO<sub>2</sub> および ABA に対する気孔応答を調べた。方法の詳細は以下の通りである。

(1) イネ SLAC1 遺伝子とその上流、下流の領域を含むゲノム領域 6.0 kbp をクローン化し、CO<sub>2</sub> シグナル推定受信部位である 256 番目、473 番目のチロシン (Y256, Y473) の両方をフェニ

ルアラニンに置換した *SLAC1* クローンを作成し、第 2 イントロンに *piggyBac* トランスポゾンの inverted terminal repeat (ITR) で挟み込んだ薬剤耐性遺伝子(選抜マーカー)を挿入した(図 1)。これらを pKOD4 バイナリベクターに組み込んだコンストラクトを作成し(pSLAC1-GT) アグロバクテリウムを介してイネの二次カルスに導入した。その後、薬剤耐性を利用して改変 *SLAC1* が組み込まれたカルスを選抜し、その中からさらに、PCR とサンガーシーケンスにより、標的部位が組み替えを起こしたカルスを再選抜した。選抜されたカルスに、トランスポゾン転移酵素 PBase をコードするヘルパープラスミドを導入した。PCR とサンガーシーケンスにより選抜マーカーの除去を確認後、再分化処理により植物体を得た。自殖後代において、PBase と薬剤耐性遺伝子が除去されたホモ系統を選抜した。

(2) CRISPR/Cas9 システムを用いて *SLAC1* 上の膜貫通領域(チャンネル領域)あるいはその 5' 上流領域に位置する計 3 箇所の PAM 配列を標的としてゲノム編集による機能欠失株を作成した。

(3) 気孔開閉の  $\text{CO}_2$  応答を調べるために、温室で栽培したイネの葉を携帯型蒸散測定装置(GFS-3000, Walz)にセットし、キュベット内の  $\text{CO}_2$  濃度を变化させた時のガス交換を測定した。ABA 応答については、 $\text{CO}_2$  応答を調べたものと同じ植物体から葉を切り出し、終濃度  $10 \mu\text{M}$  の ABA 水溶液に浸し、携帯型蒸散測定装置ポロメーター(AP4, DELTA-T)を用いて気孔コンダクタンスの経時変化を測定した。

#### 4. 研究成果

気孔開閉の環境応答の人為的改変をめざして、イネゲノム上の内在 *SLAC1* 遺伝子上の  $\text{CO}_2$  受信部位をゲノム編集により直接改変し、その影響を調べた。以下のような結果が得られた。

(1) pSLAC1-GT プラスミドを作成後日本晴カルスに導入し、得られた薬剤耐性カルスを用いて相同組み換えを起こしたカルスを選抜した。その結果  $\text{CO}_2$  シグナル推定受信部位である 256 番目、473 番目のチロシン(Y256、Y473)の両方をフェニルアラニンに置換されたカルスと Y473 のみが置換されたカルスを得た。後者は相同組み換えの原理に基づき副次的に得られたものである。引き続きトランスポゾン転移酵素遺伝子 *PBase* を導入し、その結果 Y473 のみが置換されたカルスについては選抜マーカーの除去に成功した。Y256、Y473 の両方が置換されたカルスは選抜マーカーの除去ができなかったため、いったん植物体を再分化させ、後代種子を用いて再度カルス化を行い、*PBase* を導入し、最終的に選抜マーカーの除去に成功した。その後、両カルス共にカルス再分化培地に移し、植物体を再分化させた。自殖後代において、選抜マーカーと *PBase* が除去されたホモ系統を得ることに成功し、それぞれ、*SLAC1-Y256F\_Y473F*、*SLAC1-Y473F* と名付けた。

(2) CRISPR/Cas9 システムにより、*SLAC1* 遺伝子上の標的部位(PAM 配列位置)が異なる 3 系統の変異系統が得られた。いずれも *Cas9* 遺伝子が除去された形質転換後代のホモ個体を選抜する事に成功し、それぞれ、*SLAC1-CC5*、*SLAC1-CC8*、*SLAC1-CC9* と名付けた。いずれも、チャンネル部位あるいはその上流において塩基挿入によりフレームシフトを引き起こすと推定された。

(3) ガス交換測定装置を用いて気孔応答を測定したところ、*SLAC1-CC5*、*SLAC1-CC8*、*SLAC1-CC9* はいずれも以前単離した台中 65 号バックグラウンドの *SLAC1* 機能欠失株と同程度に  $\text{CO}_2$ 、ABA 応答が低下し、*SLAC1* の活性が低下し気孔閉鎖が抑制されていることが示された。*SLAC1-Y473F* の  $\text{CO}_2$  応答は野生株とほとんど変わらなかったが、*SLAC1-Y256F\_Y473F* は *SLAC1-CC5*、*SLAC1-CC8*、*SLAC1-CC9* と同程度に  $\text{CO}_2$  応答が低下した(図 2A)。一方、ABA 応答は維持されており野生株と同程度であった(図 2B)。葉の表面と裏面の気孔密度と気孔サイズはこれらの系統間で差は見られなかった。このことから、*SLAC1-Y256F\_Y473F* で見られた  $\text{CO}_2$  応答の低下は気孔の分化制御が損なわれたことによるものではなく、高  $\text{CO}_2$  における個々の気孔の閉鎖が抑制されたためと考えられる。これらの結果は、*SLAC1* の構造改変により、気孔の  $\text{CO}_2$  応答を特異的にコントロールできることを示しており、気孔開閉の環境応答を人為的に改変するという、本研究課題の主目的は達成できたと考える。現在、これらの成果をまとめた論文の投稿準備中である。また、これらの系統を、 $\text{CO}_2$  濃度をコントロールできる閉鎖系温室で長期育成し、形質と収量に対する影響を調べている。

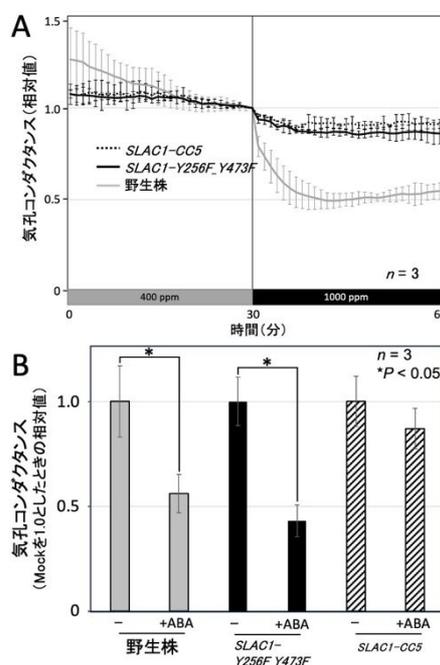


図2. 得られた*SLAC1*改変株では、気孔の  $\text{CO}_2$  応答は抑制されていたが(A), ABA 応答は維持されていた(B)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Kazuhiro, Ito Doshun, Goto Mina, Suzuki Sae, Masuda Shinji, Iba Koh, Kusumi Kensuke	4. 巻 63
2. 論文標題 Regulation of ppGpp Synthesis and Its Impact on Chloroplast Biogenesis During Early Leaf Development in Rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 919 ~ 931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamori Wataru, Kusumi Kensuke, Iba Koh, Terashima Ichiro	4. 巻 43
2. 論文標題 Increased stomatal conductance induces rapid changes to photosynthetic rate in response to naturally fluctuating light conditions in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 1230 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.13725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊藤和洋, 伊藤道俊, 増田真二, 射場厚, 楠見健介
2. 発表標題 緊縮応答因子ppGppはイネの葉の葉緑体分化過程におけるGTPの量的制御に寄与する
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiro Ito, Yuki Hisanaga, Kousuke Hanada, Koh Iba, Kensuke Kusumi
2. 発表標題 An Arabidopsis short ORF, SORFC03, is involved in the regulation of nitrogen-dependent lateral root developmen
3. 学会等名 The International Conference on Arabidopsis Research (ICAR) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤和洋, 伊藤道俊, 増田真二, 射場厚, 楠見健介
2. 発表標題 イネの葉の発生初期におけるppGpp合成を介した葉緑体分化制御
3. 学会等名 日本植物学会 第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤和洋, 伊藤道俊, 増田真二, 射場厚, 楠見健介
2. 発表標題 イネの葉の発生初期ステージにおける葉緑体ppGppの機能
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 和洋, 山本 あゆ, 馬淵 敦士, 花田 耕介, 射場 厚, 楠見 健介
2. 発表標題 窒素栄養環境に応じた側根形成調節に関わるシロイヌナズナshort ORFの解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kensuke Kusumi
2. 発表標題 Contribution of guard cell anion channel SLAC1 to the growth stage-dependent stomatal regulation in rice
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural Meteorology (ISAM2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江原 涼美、田尻 愛絵、射場 厚、楠見 健介
2. 発表標題 高CO2環境に対するイネの生育・収量応答と気孔制御の寄与
3. 学会等名 九州沖縄植物学会（第68回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楠見 健介、江原 涼美、田尻 愛絵、射場 厚
2. 発表標題 イネの成長のCO2応答と気孔制御の寄与
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 大学院理学研究院 生物科学部門 植物多様性ゲノム学研究室 <a href="http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~plantgenomics/">http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~plantgenomics/</a> 九州大学・植物多様性ゲノム学研究室・イネグループ <a href="http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~plantgenomics/kusumi/">http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~plantgenomics/kusumi/</a> 九州大学・植物生理学研究室 <a href="http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~plant/index.html">http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~plant/index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	祢宜 淳太郎  (Negi Juntaro)  (70529099)	九州大学・理学研究院・准教授    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------