

## 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 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380206

研究課題名（和文） ジャガイモの根器官発達促進による生産機能拡大の分子基盤

研究課題名（英文）

Molecular basis of productivity improvement through sink development of potato

研究代表者 横田 明穂 (YOKOTA AKIHO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：40118005

研究成果の概要（和文）：

根の発達促進遺伝子を単位面積当たりの生産性が作物中ほぼ最大値を持つジャガイモに導入したとき観察されるソース葉光合成と塊茎デンプン蓄積の昂進の機構を、この遺伝子の発現解析等を通して解明することを目的に研究を行った。この遺伝子は RanGTPase ファミリーに属するタンパク質である。ジャガイモ外植片を使った腋芽からのストロン誘導系を確立し、ストロンへの分化の過程での内生 RanGTPase の発現解析を行い、ストロン誘導機のごく初期に、ジャガイモに存在する 2 種の RanGTPase の内の一方が特異的に発現してくることを見出した。

（英文）：

This study was done to clarify the mechanism of promotion of photosynthesis in the source organ and accumulation of starch in the sink organ in potato plants. The gene was a member of the RanGTPase family. We established the in vitro stolon induction system using potato explants with axillary buds to analyze the expression of two RanGTPase genes. The results showed clearly that one of the two endogenous genes was exclusively induced in the initial phase of the stolon induction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：光合成、生産性、ジャガイモ、シンク・ソース、ストロン、RanGTPase

1. 研究開始当初の背景

2000 年 12 月のシロイヌナズナ全ゲノム配

列解読完了を受けて、イネ、ミヤコグサ、ポプラなどのモデル植物のゲノム解読へと進

んだ。さらには最近ブドウゲノム解読が完了し、現在は各種作物のゲノム解読へとつき進んでいる。このような動きを受けて、米国科学アカデミーはその 2008 年のレポートで、このような国際的な流れの先に、“Translation to Plant Improvement” 研究の重要性を強く謳っている。同様な研究の方向は、欧米や中国、韓国でもすでに着手されている。一方、我が国では農水省の植物基盤基礎研究と新たな実用技術開発事業などが進行しているが、GM 作物も視野に入れた日本の食料自給率向上を目指した研究は基盤基礎研究に限られているのが現状である。

本申請者はこの 20 年来、植物の生産性に直結する光合成酵素ルビスコの反応機構とその機能改良研究、それに加えてこの 10 年間は光合成の環境応答に関する研究を行ってきた。光合成研究においてはルビスコの *in vivo* での活性化機構とカルビン回路での代謝制御研究、葉緑体遺伝子工学研究、ルビスコの分子進化研究を通してその機能改良研究に取り組んでいる。また、光合成の環境応答機構研究では、強光と乾燥という光合成にとっては大敵である環境ストレスに対して高度な適応能力を持つ野生種スイカの分子生理機構を解明しつつある。その過程で、野生種スイカは適合溶質シトルリンを高濃度に蓄積して活性酸素ヒドロキシルラジカルを分解し、細胞膜にシトクロム *b 561* を誘導して余剰還元力を細胞外で安全に消去し、土壌の乾燥に伴い根を急速に発達させて水を確保するための分子機構を持つことなど、重要な知見を得つつある。これらの遺伝子はモデル植物や作物にも存在しているが、1 万年にもわたる栽培化の過程等で生産増に特化されたためか使い方を忘れてしまったようである。これらの成果は 2 編の総説に詳しい。

これらの遺伝子の内、野生種スイカが土壌乾燥時に機能させる根発達促進遺伝子

*RANGTPase1* をジャガイモに導入すると、ソース葉の光合成  $\text{CO}_2$  固定活性が 30% 向上し、塊茎の収量が 2 倍以上になることを見出した。本研究は野生種スイカ由来の *RANGTPase1* が示すこのようなジャガイモ生産性拡大を担うソース葉能力向上と塊茎デンプン蓄積の分子機構に、分子生物学と生理学の両面から迫ろうとするものである。

## 2. 研究の目的

本申請研究は、世界的に重要な作物であるジャガイモの染色体に野生種スイカ由来の根の発達促進遺伝子 *RANGTPase1* を導入し、この導入がソース葉の光合成の促進、ひいては塊茎の発達、言い換えれば生産性にどのような影響を及ぼすのか、分子レベルおよび代謝生理レベルで明らかにしたい。*Farquhar* の光合成モデルやこの 20 年来のアンチセンス法による特定の遺伝子発現の抑制研究によって、植物光合成は一義的に炭酸ガス固定化酵素ルビスコによって律速されていることが世界的に受け入れられている。したがって、*RANGTPase1* 導入によってその情報がどのようにソース葉に伝達され、ルビスコの機能昂進が生じたのか、さらにはその昂進がどのような機構で 2 倍以上もの塊茎デンプン蓄積を引き起こしたのか、非常に興味ある重要な課題である。これらの点に集中して研究する。

## 3. 研究の方法

(1) これまでと同様にしてジャガイモの形質転換を行い、これまで 1 ラインであった形質転換体を 3 ラインに増やした。これまでの解析の結果、遺伝子導入株を生育させ、塊茎の芽から植物体を再生させ、安定的な形質として導入遺伝子を根で高発現している株を選

別した。これらの複数系統を用い、筑波大学遺伝子実験センターとの共同で野外隔離圃場試験に向けた準備に入る。

(2)この研究プロジェクトを開始前後に、ジャガイモのストロン発達から塊茎形成に至る過程でジャガイモの RANGTPase1 が発現することが議論され始めた。また、2011年夏にはジャガイモのゲノム配列が報告され、これまでの予測通り、ストロンから塊茎の発達段階で RANGTPase1 が発現することがはっきりしてきた。そこで本研究では、ジャガイモの腋芽を含む外植片を *in vitro* 培養する系を立ち上げ、ストロンの発達と RAN1 発現との関連を解析した。

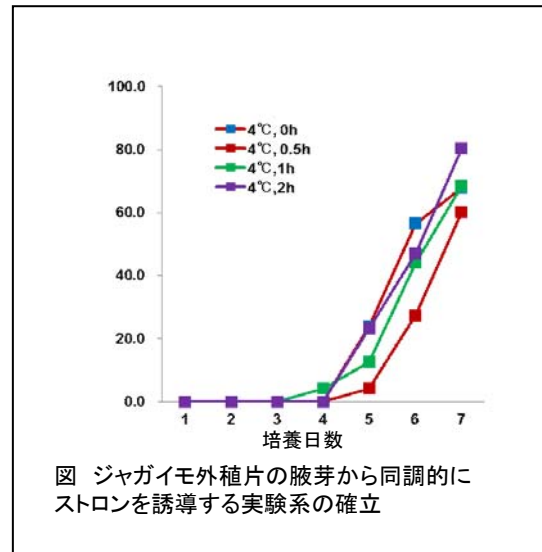
#### 4. 研究成果

(1) 高発現株の導入遺伝子コピー数と発育中ならびに塊茎形成中の RANGTPase1 遺伝子のジャガイモ各組織での発現量をリアルタイム PCR によって定量した。また発現蛋白質量はすでに作成済みの特異抗体を用いたウエスタンブロッティングによって定量した。これらの解析で得られた FBP/SBPase が 1 コピー、RANGTPase1 遺伝子が 2 コピー、ゲノム中に存在する株を 2 系統、RANGTPase1 遺伝子単独導入株で 1 コピーのみ持つ株を 3 株、2 コピー持つものを 3 株同定した。さらにこれらの株を筑波大学に送り、合同で特定網室試験を実施し、来年度からの隔離圃場での第一種試験に向けた安全性試験を実施した。

安全性試験は予定通り進行し、土壌微生物相への影響など、非組換え体と何ら有意差は認められなかった。

しかし、この研究では自然光下で 5 リッター鉢での栽培を実施したが、18 時間明/6 時間暗という人工気象器での成果が安定的に再現できなかった。今後、さらに安定的に表

現型が再現できるような組換え体の作成と栽培法の改良が必要となった。現在、この点



を集中して研究している。

(2) ジャガイモ外植片を使った腋芽からのストロン誘導系を確立し、ストロンへの分化の過程での内生 RANGTPase1 の発現解析を行った。その結果、ストロン誘導機のごく初期に、ジャガイモに存在する 2 種の RANGTPase1 の内の一方が特異的に発現してくることを見出した。今後、この時期の同組織での高発現プロモーターを探索し、その制御下で内生 RANGTPase1 を高発現する。

#### 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 19 件)

- ① Matsumura H, Mizohata E, Ishida H, Kogami A, Ueno T, Makino A, Inoue T, Yokota A, Mae T, Kai Y. Crystal Structure of Rice Rubisco and Implications for Activation Induced by Positive Effectors NADPH and

6-Phosphogluconate. J Mol Biol. In press (2012) 査読有

- ② Sanda S, Yoshida K, Kuwano M, Kawamura T, Munekage YN, Akashi K, Yokota A. Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiol Plant*.142(3):247-264. (2011) 査読有
- ③ Lim S, Ashida H, Watanabe R, Inai K, Kim YS, Mukougawa K, Fukuda H, Tomizawa K, Ushiyama K, Asao H, Tamoi M, Masutani H, Shigeoka S, Yodoi J, Yokota A. Production of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce chloroplasts. *Plant Mol Biol*. 2011 Jul;76(3-5):335-344 (2011) 査読有
- ④ Akashi K, Yoshida K, Kuwano M, Kajikawa M, Yoshimura K, Hoshiyasu S, Inagaki N, Yokota A. Dynamic changes in the leaf proteome of a C3 xerophyte, *Citrullus lanatus* (wild watermelon), in response to water deficit. *Planta*. 233(5):947-960. (2011). 査読有
- ⑤ Nishimura K, Ashida H, Ogawa T, Yokota A. A DEAD box protein is required for formation of a hidden break in *Arabidopsis* chloroplast 23S rRNA. *Plant J*. 63(5):766-777 (2010). 査読有

[学会発表] (計 27 件)

- ① Yokota, A. RuBisCO and its challenges. International Conference of Photosynthesis Research for Sustainability (招待講演) 2011.

7.28. Baku, Azerbaijan

- ② Nakamura, N. Enhancement of cyclic electron flow around PS1 during evolution from C3 to C4 photosynthesis in *Flaveria* species. Godon Research Conferences: CO2 Assimilation in Plants: Genome to Biome.2011.6.1-2. Les Diablerets, Switzerland
- ③ Kono, T. The molecular evolution of phosphoribulokinase for completion of the Calvin cycle. Godon Research Conferences: CO2 Assimilation in Plants: Genome to Biome.2011.5.30-31. Les Diablerets, Switzerland

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 塊茎生産能または葡萄枝形成能野生株に比して向上している葡萄枝形成植物の作製方法、当該方法によって作製された葡萄枝形成植物

発明者 : 蘆田弘樹、横田明穂、明石欣也、牛山敬一、重岡成

権利者 : 奈良先端科学技術大学院大学長磯貝彰

種類 : 特願

番号 : 2009-126641

出願年月日 : 2009 年 5 月 26 日

国内外の別 : 国内 (2010年4月13日JST国際出願支援決定)

○取得状況 (計 1 件)

名称 : Plant having enhanced root elongation and method for production thereof

発明者 : Akashi, K、Yokota, A、Yoshimura,

K.

権利者：Nara Institute of Science and Technology

種類：国司特許

番号：ZL 200780007312.3

取得年月日：2012年2月22日

国内外の別：中国

研究者番号：30423247

[その他]

ホームページ等：

<http://bsw3.naist.jp/yokota/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 明穂 (YOKOTA AKIHO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：40118005

### (2) 研究分担者

明石 欣也 (AKASHI KINYA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：20314544

### (3) 連携研究者

蘆田 弘樹 (ASHIDA HIROKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50362851

### (4) 連携研究者

宗景 ゆり (MUNEKAGE YURI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教