

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05019

研究課題名（和文）イネ科作物の柔組織における大規模なプログラム細胞死の制御機構と生理的役割の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms and physiological roles of programmed cell death in pith parenchyma of Gramineae crops

研究代表者

藤本 優 (Fujimoto, Masaru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：60554475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,100,000円

研究成果の概要（和文）：世界五大穀物の一つであるソルガムは、エネルギー作物としても大きなポテンシャルを高い潜在能力を有しています。このソルガムの茎搾汁液からのエタノール生産効率を左右する形質の一つに乾汁性がありますが、乾性品種と比較して、汁性品種の茎組織には多量の糖液が含まれるため、後者の方が優れた生産効率を示します。本研究では、まず、ソルガムの乾汁性を決定する遺伝子を世界に先駆けて単離することに成功しました。さらに、その乾汁性決定遺伝子がコードするタンパク質が、マスター転写因子として機能することで、茎柔組織に大規模なプログラム細胞死が誘導され、茎水分含量の低下が起こることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

製糖・エネルギー作物における茎水分含量の増大は、糖やエタノール生産の原料に用いる茎搾汁液の生産量や生産効率の向上につながります。本研究の成果は、乾汁性決定遺伝子機能の調節を標的とした、糖やエタノール生産用作物の効率的な品種改良や、新たな資源作物開発への道を拓くものとして期待されます。また、茎柔組織の大規模なプログラム細胞死は、イネ科作物のみならず、広範の植物種で観察される現象であり、本研究の成果は、未だ不明な点の多い、その生理的意義や制御機構の理解に大きく貢献するものです。

研究成果の概要（英文）：Pith parenchyma cells store water in many plants. These cells are important for producing sugar and ethanol from the sugar juice of grass stems. In this study, we identified a gene, long referred to as D, in a promising energy grass, Sorghum bicolor, that is responsible for reducing stem water content. Sorghum varieties with functional D had stems enriched with dry, dead pith parenchyma cells, whereas those with non-functional D had stems enriched with juicy, living pith parenchyma cells. D encodes a NAC transcription factor, which activates the autolytic enzymes involved in programmed cell death of plants. These results suggest that D is the master transcriptional switch for executing programmed death of pith parenchyma cells in sorghum stems. Thus, identifying D will provide a new approach to breeding crops for sugar and ethanol production.

研究分野：栽培学

キーワード：イネ科作物 ソルガム 茎柔組織 プログラム細胞死 マスター転写因子

1. 研究開始当初の背景

世界五大穀物の一つに数えられるソルガムは、モロコシ、タカキビ、コーリヤンなどと称される熱帯アフリカ原産のイネ科一年草です。中には、サトウキビと同様に、茎に多量の糖液を蓄積する品種が存在し、糖・エタノール生産用作物としても高い潜在能力を有しています。その原料となるソルガム茎搾汁液の収量や生産効率を左右する形質の一つに、茎の水分含量で規定される乾汁性が知られています。乾性品種と比較し、汁性品種の茎の柔組織においては、気体で満たされた死細胞化（髓化）が進まず、水分が多く保持されたまま残るため、後者の方が優れた特性を示します（図1）。一方、品種改良の効率化には、対象となる形質の決定に関わる原因遺伝子が判明していることが重要です。しかし、ソルガムの乾汁性は、乾性を優性、汁性を劣性とした単一遺伝子 *D* に由来する対立形質であることが、約100年前から指摘されていたものの、その同定には至っておらず、茎柔組織における大規模な細胞死発生のメカニズムも不明なままでした。

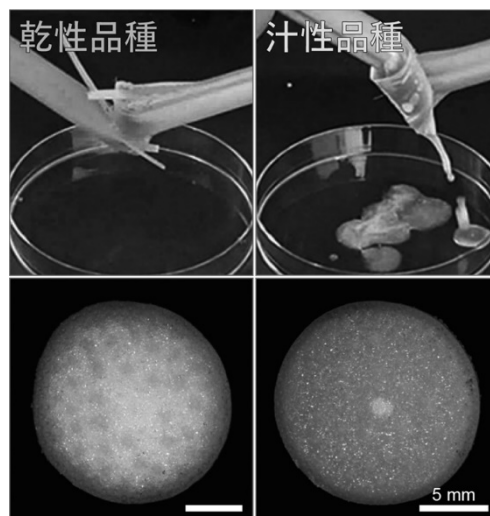


図1 乾性品種と汁性品種の茎の特徴
上段：茎からの搾汁の様子 下段：茎の断面像

2. 研究の目的

上述のソルガムにおける茎柔組織の顕著な髓化、すなわち、茎柔組織における大規模な細胞死は、ソルガムだけでなく、広範の草本性被子植物において観察される現象であり、器官成長や乾燥・栄養欠乏ストレスに応答した養水分転流、また、地下部への酸素供給組織の形成に伴って発生することが報告されています。しかし、この茎柔組織髓化の分子メカニズムについては、永らくプログラム細胞死の一種であると考えられてきたものの、前述した *D* 遺伝子の実体が不明であることを含め、研究開始当初の段階で、得られている知見は非常に限られていました。そこで本研究では、イネ科作物の茎柔組織における大規模なプログラム細胞死の制御機構や生理的意義を解明するため、まず、*D* 遺伝子の特定や機能の解明に取り組みました。さらに、その植物における共通性や多様性を検証するため、シロイヌナズナを始めとした他の植物種における *D* 遺伝子ホモログの機能を精査しました。

3. 研究の方法

(1) ソルガム *D* 遺伝子のクローニング

乾性品種「千斤白」と汁性品種「那系 MS-3B」の交雑から得られた F_2 集団を対象に、茎の搾汁効率や茎柔組織髓化の程度を指標とした遺伝解析を行い、*D* 遺伝子の染色体上の位置の絞り込みを行いました。

(2) ソルガム *D* 遺伝子やシロイヌナズナ・イネ *D* 遺伝子ホモログの機能解析

まず、ソルガム *D* 遺伝子がコードするタンパク質の分子系統解析から、シロイヌナズナやイネにおける *D* 遺伝子のホモログを特定しました。また、ソルガムやシロイヌナズナ、イネの各器官における、*D* 遺伝子やそのホモログの発現量を定量化し、それらの発現パターンを調査しました。さらに、シロイヌナズナの培養細胞を用い、薬剤処理による外来遺伝子の発現誘導が可能な細胞株を作成し、*D* 遺伝子やそのホモログの高発現が、遺伝子発現のプロファイルや細胞構造に及ぼす影響を精査しました。また、シロイヌナズナやイネにおいて *D* 遺伝子ホモログの機能が欠損した系統を確立し、その表現型の有無を探索するとともに、酵母やシロイヌナズナ培養細胞を利用したレポーターアッセイ系を用いて、それらの遺伝子産物の機能を検証しました。

4. 研究成果

(1) ソルガム *D* 遺伝子の同定

前述の遺伝解析から、第6染色体長腕に、植物に特徴的な NAC (NAM/ATAF/CUC) 型の DNA 結合性ドメインを持つタンパク質をコードするであろう、単一の遺伝子のみを包含する領域を特定しました。また、遺伝解析に用いた F_2 集団の親品種である「千斤白」や「那系 MS-3B」を含む世界各地から収集した様々な品種について、この遺伝子の配列を解析したところ、全ての汁

性品種は、機能欠失型変異を伴う六つの対立遺伝子のいずれかを有することが判明しました。この結果は、過去に報告されたソルガムにおける乾汁性決定の遺伝様式と合致するものであったことから、この遺伝子を、乾汁性決定遺伝子 *D* として結論付けました。

また、ソルガムにおける汁性品種の起源を探るため、アジアやアフリカの在来種を対象として、それらの地理的分布や *D* 遺伝子の配列に関する調査を実施しました。その結果、前述の機能欠失型変異のうち二つについては、ソルガムの原産地とされるスーダンからナイジェリアにかけてのアフリカ中央部一帯で採集された在来の汁性品種にも存在することが判明しました。これらの結果は、紀元前 4000 年から紀元前 3000 年ごろにかけて、アフリカやアジアで発生したとされるソルガムの栽培化や、以降の伝播の過程において、*D* 遺伝子の機能欠失変異が異なる場所、時期で複数回発生し、汁性という有用形質を指標とした人為選抜が、独立になされた可能性を示唆しています。

(2) 茎柔組織の大規模なプログラム細胞死の発生に果たす *D* 遺伝子の役割の解明

茎柔組織の大規模なプログラム細胞死の発生に果たす *D* 遺伝子の役割を特定するため、「*D* 遺伝子の時空間的な発現量の変化」と「茎水分含量の低下を招く柔組織の髓化」との関連を調査しました。その結果、乾性品種「長品 232」の成熟した茎の節間では、広範の柔組織で髓化が発生し、その進行に伴って *D* 遺伝子の発現量が大幅に上昇すること、特に、気体を内包した死細胞へ転換する直前の柔組織の細胞において、*D* 遺伝子の転写産物が多量に蓄積することが判明しました。一方、柔組織の髓化が完了した茎の節間では、*D* 遺伝子の転写産物がほとんど検出されませんでした。また、汁性品種「SIL-05」ゲノムの *d* 領域断片（この断片には、*D* 遺伝子のタンパク質コード領域の一部を含むゲノム欠失変異が存在）を、連続戻し交雑により「長品 232」へ導入した準同質遺伝子系統「*d*-NIL」を作成し、茎の表現型を精査しました。その結果、*D* 遺伝子の発現が消失した「*d*-NIL」の成熟した茎は、「長品 232」の茎とは異なり、典型的な汁性形質であり、柔組織の髓化もほとんど認められませんでした。これらの結果は、ソルガムにおける茎柔組織の広範に渡る髓、つまり大規模な細胞死の発生に、*D* 遺伝子が必須の役割を果たす可能性を示しています。

(3) *D* 遺伝子の発現が細胞の構造や生存能に及ぼす影響の解明

D 遺伝子の具体的な機能を明らかにするため、その発現が細胞の構造や生存能に及ぼす影響を解析しました。この解析の開始にあたり、まず、シロイヌナズナを用いて、エストラジオールの添加により、*D* 遺伝子の発現誘導が可能な培養細胞株を確立しました。このシステムを用いて、*D* 遺伝子の発現を誘導すると、核や色素体を始めた細胞小器官が分解されて細胞が空洞化し、その生存能の消失を確認しました（図 2）。同様の現象は、維管束植物の通水組織を形成する、道管や仮道管の分化に必要なプログラム細胞死の過程でも発生することが知られています。一方、そのような道管や仮道管分化の際に、細胞死と並行して起こる二次細胞壁の形成は、*D* 遺伝子を発現したシロイヌナズナ培養細胞では観察されませんでした。このような *D* 遺伝子の発現が引き起こす現象は、ソルガムの髓化した茎柔組織を構成する死細胞の特徴とよく一致しています。そのため、*D* 遺伝子の発現は、茎柔組織の大規模なプログラム細胞死の発生を誘導するものと考えられました。

薬剤(エストラジオール)の添加によって *D* の発現が誘導可能なシロイヌナズナ培養細胞

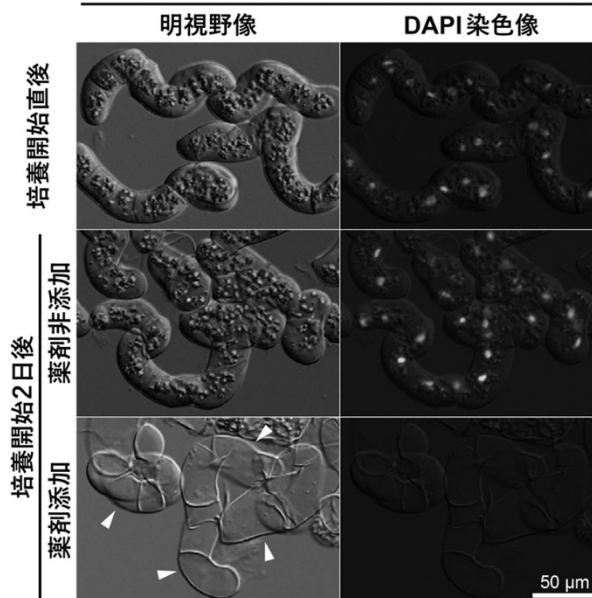


図 2 *D* 遺伝子の発現が細胞の構造に及ぼす影響

左列：シロイヌナズナ培養細胞の明視野像（矢尻は空洞化した細胞構造を示している）

右列：DAPI 染色した細胞核の蛍光像

(4) *D* 遺伝子産物の分子機能の解明

D 遺伝子がコードするタンパク質（以下、*D* タンパク質）の特性を明らかにすべく、まず、その分子系統解析を行いました。その結果、*D* タンパク質は、前述の NAC ドメインを有する転写因子ファミリーに属することが判明しました。しかし一方で、*D* タンパク質やシロイヌナズナや広範の被子植物に保存されている、それらのホモログは、側根形成への関与が報告されているクレードと、比較的近縁ながらも、転写調節活性の有無を含めて、機能未知のクレードを独立に形成することも分かりました。そこで、酵母の GAL4 DNA 結合ドメインを用いたレポーター遺伝子アッセイにより、*D* タンパク質の転写活性化能の有無を検証し、その C 末端領域に、転写活性

化ドメインの存在することを突き止めました。

また、D タンパク質による転写の標的となる下流遺伝子を同定するため、前述のシロイヌナズナ培養細胞を用いて、D 遺伝子の発現誘導が、遺伝子の発現プロファイルに及ぼす影響を調査しました。その結果、タンパク質や核酸の分解など、プログラム細胞死の各過程を担う遺伝子群の発現が、D 遺伝子の発現により、特異的に上昇することが判明しました。これら遺伝子群の発現上昇は、前述の乾性品種「長品 232」の成熟した茎においても、柔組織の髓化に伴って確認されたものの、D 遺伝子が機能欠失した「d-NIL」の茎では検出されませんでした。この結果は、プログラム細胞死における各過程の実行に関わる遺伝子群が、D タンパク質による転写の標的である可能性を示唆してしています。さらに、酵母やシロイヌナズナ培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイを行い、上述の標的遺伝子群のプロモーター領域に対する D タンパク質の結合活性を調査したところ、少なくともそのうちの一つに結合することを確認しました。これらの結果は、D 遺伝子が、茎柔組織の大規模なプログラム細胞死を誘導するためのスイッチ役となる転写因子をコードする、いわば、マスター遺伝子として機能することを示しています。

(5) シロイヌナズナやイネにおける D 遺伝子ホモログ機能の検証

前述の分子系統解析の結果、シロイヌナズナにおいては、ANAC074 と呼ばれる D 遺伝子のホモログが、1つ存在することが判明しました。しかし、ANAC074 遺伝子の機能は不明であったため、まず、その発現部位や変異体における表現型の有無について調査を進めました。その結果、ANAC074 遺伝子は、花や成熟した胚軸、老化した花茎において比較的高い発現を示しており、その発現が欠失した変異体では、老化した花茎の柔組織で発生する細胞死が抑圧される傾向が認められました。また、酵母やシロイヌナズナ培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイから、ANAC074 遺伝子がコードするタンパク質は、D タンパク質と類似の特性を示すことも明らかとなりました。これらの結果は、シロイヌナズナ ANAC074 遺伝子が、D 遺伝子と同様に、柔組織の大規模な細胞死に関与する可能性が高いことを示しています。

一方、イネにおいては、前出の分子系統解析から、5つの D 遺伝子ホモログの存在が示唆されましたが、いずれの遺伝子についても、その機能に関する知見はありませんでした。そこで、これらイネ D 遺伝子ホモログの機能を解明するため、まず、栽培品種「日本晴」の各器官における5つの遺伝子それぞれの発現量を解析し、発現パターンの特性を試みしました。その結果、4つの D 遺伝子ホモログについては、根で高い発現を示すことが判明しました。今後は、これら遺伝子の多重変異体を作成し、その表現型を精査する予定です。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトと今後の展望

ソルガムやサトウキビを始めとした、製糖・エネルギー作物における茎水分含量の増大は、糖やエタノール生産の原料に用いる茎搾汁液の搾汁効率や収穫量の向上に重要であることが報告されています。一方で、茎水分含量の低減は、それらを原料とした飼料や燃料用木質ペレットの生産性改善に有利であると考えられています。本研究の成果は、D 遺伝子やそのホモログの機能欠失や機能強化を介した、茎水分含量の最適化による糖・エタノールあるいは飼料・木質ペレット生産用作物の品種改良効率化に役立つものと期待されます。さらに、外来遺伝子の導入を伴わないゲノム編集技術などによる D 遺伝子やそのホモログの人為的かつ安全な機能調節が実現すれば、これまで糖・エタノール生産や飼料・木質ペレット生産には不向きであった植物を、革新的な資源作物へと転換することが可能となるかもしれません。

また、本研究では、ソルガムにおける乾汁性決定遺伝子の同定と機能解析を通じ、植物における茎柔組織の細胞死を誘導するマスター遺伝子の存在を、世界に先駆けて報告することができました。一方で、シロイヌナズナやイネにおける D 遺伝子のホモログは、茎柔組織以外の花や胚軸、根といった器官でも、比較的高い発現を示すことが判明しました。このことは、D 遺伝子やそのホモログによって誘導される細胞死が、個体の発生や環境応答において、茎柔組織の髓化だけでなく、多面的な役割を担っている可能性を示唆しているものと考えられます。今後、その生理的意義の全容や多様化プロセスの解明に向け、様々な植物種における D 遺伝子ホモログの機能の検証を進める予定です。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8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 藤本優, 米丸淳一, 堤伸浩 | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 ソルガムにおける茎柔組織髓化の分子メカニズム | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 植物の生長調節 | 6. 最初と最後の頁 66-70 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18978/jsrnp.54.1_66 | 査読の有無 無 |
| 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 Fujimoto M, Sazuka T, Oda Y, Kawahigashi H, Wu J, Takanashi H, Ohnishi T, Yoneda JI, Ishimori M, Kajiya-Kanegae H, Hibara KI, Ishizuna F, Ebine K, Ueda T, Tokunaga T, Iwata H, Matsumoto T, Kasuga S, Yonemaru JI, Tsutsumi N. | 4. 巻 115 |
| 2. 論文標題 Transcriptional switch for programmed cell death in pith parenchyma of sorghum stems | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. | 6. 最初と最後の頁 E8783 ~ E8792 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1807501115 | 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 藤本 優, 佐塚隆志, 米丸淳一, 堤 伸浩 | 4. 巻 77 |
| 2. 論文標題 ソルガムの茎糖液含量を規定する遺伝子 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー | 6. 最初と最後の頁 112 ~ 115 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ソルガムにおける乾汁性決定遺伝子の発見～糖やエタノールの生産性向上に関わる100年来の謎を解明～
<https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2018/20180828-1.html>

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|