

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07456

研究課題名(和文) C4型光合成の進化過程でクランツ構造を誘導したゲノム変異の同定と解析

研究課題名(英文) Determination of genome mutation inducing Kranz anatomy during the C4 evolution

研究代表者

宗景 ゆり (Munekage, Yuri)

関西学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：30423247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Flaveria属植物(キク科)の近縁種であるC3-C4中間Flaveria floridanaとC4様種Flaveria browniiを交配して得られた第二世代の集団を用いて、C4植物に特徴的なクランツ構造発達に関わる遺伝子座の解析をゲノム解析とあわせて行った。クランツ構造の指標として柵状組織細胞層数を解析し、この細胞層数制御に関わる因子は一遺伝子座に大きく依存することが明らかになったが、両種のゲノムは大きく異な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

C3型の作物をC4化させることができれば、高温や乾燥に強い植物を得ることができるため、C4化分子育種は第二の緑の革命を起こす技術として求められている。本研究ではキク科Flaveria属のC3-C4中間種とC4様種の交雑種の遺伝学的解析手法を用いて、C4種に特徴的な細胞構造に関わるゲノム変異とその遺伝子の特定を試みた。遺伝子の同定に至っていないが、細胞構造のC4化は一つのゲノム変異によって引き起こせる可能性が高いことが明らかになっており、今後さらにゲノム解析を進めることで遺伝子の同定に成功すれば、C4化分子育種への道が開けると期待できる。

研究成果の概要(英文)：To investigate factors regulating Kranz anatomy and palisade cell layer, we analyzed F2 progeny of C4-like Flaveria brownii crossed with C3-C4 intermediate Flaveria floridana. Association of phenotype and genotype based on genome analysis showed that regulation of palisade layer number was strongly depend on 1 locus on Flaveria genome; however, genome background of both species was different each other, therefore it is needed improve the method.

研究分野：植物生理

キーワード：光合成 細胞構造 ゲノム解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

トウモロコシやソルガムなどの C<sub>4</sub> 型光合成を営む作物は、高温・乾燥に強く生育が速いため、生産性の高い重要な作物となっている。作物のほとんどは C<sub>3</sub> 型であるが、それらに C<sub>4</sub> 型の形質を付加することができれば、世界の作物生産性を飛躍的に向上させることができる。国際イネ研究所を中心に国際コンソーシアムが形成され、C<sub>3</sub> 型のイネを C<sub>4</sub> 化させる「C<sub>4</sub> rice プロジェクト」が進められている。しかしながら、C<sub>4</sub> 型代謝酵素を高発現させるだけでは、C<sub>3</sub> 型植物を C<sub>4</sub> 化させることができないことが明らかとなっており、C<sub>4</sub> 化の道筋は見えていない。世界の C<sub>4</sub> 光合成研究者が C<sub>4</sub> 化の鍵として最も着目している事象は、濃縮した CO<sub>2</sub> を細胞内に留めておくためのクランツ構造の発達過程である。クランツ構造とは、維管束の周りを維管束鞘細胞が、さらにその外側を一層の葉肉細胞が取り囲む構造で、単子葉類、双子葉類を問わず C<sub>4</sub> 光合成を営む植物に共通の組織構造である。これまでに様々な科において、C<sub>3</sub> 種と C<sub>4</sub> 種の比較トランスクリプトーム解析が行われ、維管束や維管束鞘細胞の分化に関わる遺伝子の発現が変化していることが指摘されている。しかし、これらの発現変化を引き起こした要因が何であるかを、トランスクリプトーム解析から推測することは難しく、クランツ構造の発達過程メカニズムは依然として不明である。細胞分化に関わる遺伝子を上流で制御する遺伝子や、クランツ構造の発達の分子機構を明らかにするためには、進化の過程で生じたゲノム変異を同定できる量的遺伝子座 (QTL) 解析が最も有効である。

### 2. 研究の目的

C<sub>4</sub> 型光合成は、亜熱帯や半乾燥地域の草原に生息する植物が進化的に獲得した機構であり、高温・乾燥条件下でも高い CO<sub>2</sub> 固定効率を維持することができる。*Flaveria* 属植物 (キク科) の C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub> 様種の F<sub>2</sub> 交雑集団を用いた表現型解析を行った結果、C<sub>4</sub> 植物に特徴的なクランツ構造発達誘導が、一遺伝子座に由来するゲノム変異によって引き起こされることが推定されている。本研究ではこのゲノム変異を同定しクランツ構造の発達メカニズムを解明することを目的とする。濃縮した CO<sub>2</sub> を細胞内にとどめておくためのクランツ構造を発達させることは、C<sub>3</sub> 植物を C<sub>4</sub> 化するための重要な鍵となる。

### 3. 研究の方法

*Flaveria* 属植物 (キク科) には、同属内に C<sub>3</sub> 種や C<sub>4</sub> 種だけでなく、C<sub>3</sub> 型から C<sub>4</sub> 型への進化の途中に位置する C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間型の種が数多く現存し、これらを用いた解析から C<sub>4</sub> 化の途中段階の過程が明らかとなっている。これらのうち、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種 *Flaveria floridana* と C<sub>4</sub> 型に近い C<sub>4</sub> 様種 *Flaveria brownii* は交配することができる。C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種 *F. floridana* と C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* の F<sub>2</sub> 交雑集団を用いて、QTL 解析により、クランツ構造の発達と連鎖するゲノム変異の同定を行う。

#### 1) C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub> 様種の表現型の指標の決定

C<sub>4</sub> 植物では、葉肉細胞 (M) と維管束鞘細胞 (BS) が 1 : 1 に配置される。双子葉植物では、葉は網状脈を形成するため、BS-M-M-BS 細胞形成パターン解析を葉の横断切片を使って水平方向で評価することは難しい。また、C<sub>4</sub> 様種は C<sub>4</sub> よりもクランツ構造が未完成で M 細胞が小さいため、必ずしも BS-M-M-BS 細胞形成パターンを取らない箇所が存在する(次ページ 図 1)。一方、双子葉 C<sub>4</sub> 種では、水平方向に加え、光軸方向の細胞配置パターンも 1 : 1 となる。C<sub>3</sub> 種、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 種では削除組織は二層の細胞層で構成されるが、C<sub>4</sub> 種では一層である。そこで、柵状組織細胞層の数を指標に C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub> 様種の表現型を数値化した。また、柵状組織細胞の縦方向の長さや幅を測定し、細胞の形を縦横比として算出して比較した。

#### 2) Rad-seq による SNPs の検出

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 種 *F. floridana* と C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* の染色体ゲノム領域で相違のある箇所を網羅的に調べるために、両種の Restriction Site Associated DNA Sequence (Rad-seq) 解析を行った。両種のゲノムを制限酵素 (BglI、EcoRI) で処理し、次世代シーケンス解析により制限酵素サイトから読み取られる配列データを取得した。出力されたリードを *F. floridana* ゲノム又は *F. brownii* ゲノムに対してマッピングした。Stacks 解析により *F. floridana* と *F. brownii* の同じ遺伝子座 (RAD-locus) の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) s を検出した。次世代ゲノムシーケンスおよび Stacks 解析は龍谷大学の永野博士らの共同利用事業により行った。

#### 3) 表現型および遺伝子型の相関解析

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 種 *F. floridana* と C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* の交雑 F<sub>2</sub> 集団 139 個体について、同様に Rad-seq 解析を行った。同時に切片の観察により柵状組織細胞層の数を数値化した。解析した F<sub>2</sub> 集団のうち、細胞層が一層になる *F. brownii* 型の表現型の個体について遺伝子型との表現型解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種と C<sub>4</sub> 様種の表現型の指標の決定

図1のように C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 種 *F. floridana* はと柵状組織が二層の細胞層で構成されており、それら二層の細胞は縦方向が幅より長くシリンダー構造をとっている。これに対し、C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* では柵状細胞層はおおむね一層で有り、二層目の細胞は典型的な柵状細胞の様なシリンダー構造を取っていない。二層目の細胞の形を length/width 比として算出した結果、*F. brownii* の二層目の length/width 比は *F. floridana* の半分程度であり、一層目の length/width 比の *F. brownii* は *F. floridana* より低い値であった(図2)。*F. brownii* の二層目の細胞層は、柵状組織形成とは異なる細胞分化により形成された可能性が考えられた。

また、細胞数を指標に二層目細胞数/一層目細胞数を算出したところ、*F. floridana* では 1.02 であるのに対し、*F. brownii* では 0.27 と顕著な違いが見られた(図3)。そこでこの値を指標に、F<sub>1</sub> 個体および F<sub>2</sub> 集団の表現型をグループ分けした。F<sub>1</sub> 個体は 1.07 であり、*F. floridana* と同等の値を示したことからこの二層目の細胞形成を促す因子は劣性であることが示された。F<sub>2</sub> 集団は 0.9 から 1.6 までの値を示した個体が 114 個体あり、0 から 0.3 までの値を示した個体は 21 個体で、残りの 4 個体は中間的な値を示した。これらの結果から、クランツ構造形成に關与する細胞層を制御する因子は劣性であり、1 遺伝子座に大きく依存することが示唆された。

##### 2) Rad-seq による SNPs の検出

Rad-seq 解析により、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 種 *F. floridana* ゲノムでは 55,660 の tag、C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* ゲノムでは 51,595 の tag が検出された。双方のゲノムから共通して検出された配列は 18,600 tag であり、このうち *F. floridana* と *F. brownii* 間の 1 塩基多型 (SNP) が検出されたのは 4,143 tag であった。この結果から、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 種 *F. floridana* と C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* は交配可能な近縁種であるが、両者のゲノム配列は大きく異なることが明らかになった。

##### 3) 表現型および遺伝子型の相関解析

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 種 *F. floridana* と C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* の交雑 F<sub>2</sub> 集団 139 個のうち、細胞層が一層になる *F. brownii* 型の表現型の 18 個体について遺伝子型との表現型解析を行った。F<sub>2</sub> の 18 個体及び親株に共通して検出されてかつ遺伝子型判別が可能な SNPs は 1,295 tag であった。1,295 tag の中で遺伝子型が *F. brownii* 型であった配列は 69 tag であった。しかしながら、同定した 69 tag について表現型が *F. floridana* となる、つまり柵状細胞層が二層であった F<sub>2</sub> 個体の遺伝子型を調べたところ、*F. brownii* 型を示す個体が多く、これらの tag は *F. floridana* 遺伝子型を検出できていないことが判明した。この結果から F<sub>2</sub> 世代で対合していない染色体領域が多く存在することが示唆された。*F. brownii* 遺伝子型と *F. floridana* 遺伝子型の双方が F<sub>2</sub> 個体で検出される tag を用いて再解析を進める。また、今後は Kranz 構造を示した K120 と *F. floridana* を戻し交配させた F<sub>1</sub> とその次世代の F<sub>2</sub> 集団を使って解析を進める予定である。

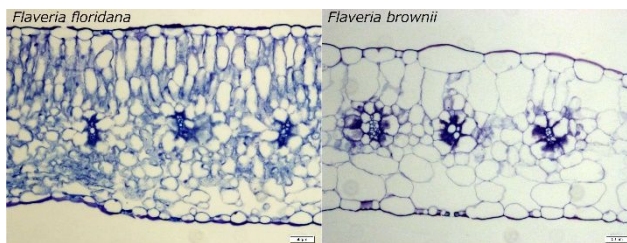


図1 C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>種 *F. floridana* 及び C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* の横断切片

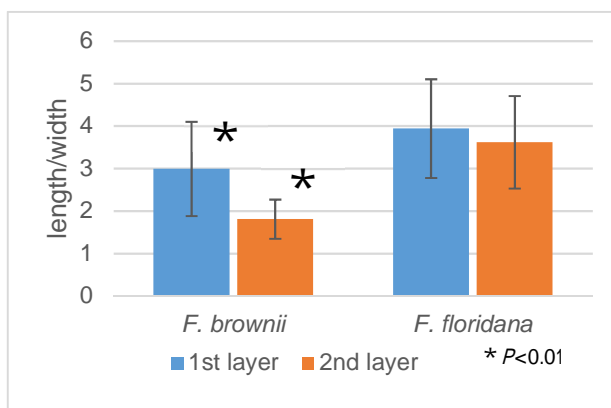


図2 C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>種 *F. floridana* 及び C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* の柵状細胞の長さ/幅の比較

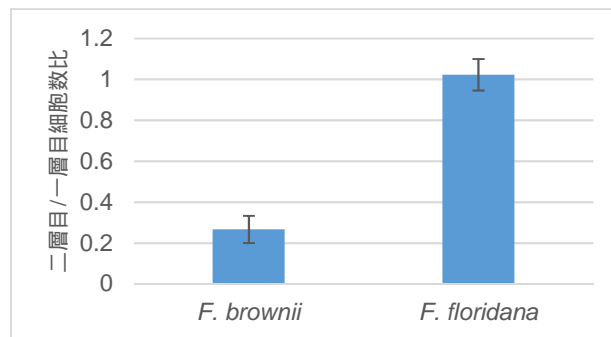


図3 C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>種 *F. floridana* 及び C<sub>4</sub> 様種 *F. brownii* の柵状細胞の一層目と二層目の細胞数比の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yukimi Y. Taniguchi, Yuri N. Munekage
2. 発表標題 C4-photosynthetic characters in F2 hybrids between <i>Flaveria floridana</i> (C3-C4) and <i>Flaveria brownii</i> (C4-like)
3. 学会等名 Japan-Finland Seminar 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木下 優人, 井上 史生, 谷口 幸美, 宗景 ゆり
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第81回日本植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大澤 芽依, 谷口 幸美, Tammy Sage, 宗景 ゆり
2. 発表標題 C4 <i>Flaveria bidentis</i> におけるオーキシン極性輸送阻害剤存在下での葉脈パターン形成
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	永野 敦  (Nagano Atsushi)  (00619877)	龍谷大学・農学部・准教授    (34316)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	谷口 幸美 (Taniguchi Yukimi)  (80756693)	関西学院大学・理工学部・助教    (34504)	