

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05769

研究課題名(和文) 生育表現型の回復した光合成因子欠損株のゲノム変異とその光合成機構の解析

研究課題名(英文) Study of Arabidopsis lines with identical mutation in PGR5 gene but with different growth phenotypes

研究代表者

和田 慎也 (Wada, Shinya)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：80637942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、シロイヌナズナのPGR5遺伝子に対し、同一の変異を持つにも関わらず異なる生育表現型や光合成能力を示す2つの変異株(pgr5-1, pgr5hope1)を材料に、その違いの原因を遺伝子レベルで解明した。当初、既知の変異株pgr5-1株に対し光合成CO₂固定速度が高いpgr5hope1株に光合成能力の回復変異が存在することが予想された。しかし、解析の結果、pgr5-1株側に光合成を低下させる第2変異(ptp1と命名)が存在することが明らかとなった。また、ptp1変異はPGR5欠損下において、PSIの酸化傷害を助長することで、CO₂固定速度の低下を引き起こしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、主に光合成循環的電子伝達の解析材料としてシロイヌナズナPGR5欠損体pgr5-1株は世界中で利用されてきた。しかし観察されてきた一部のデータ、特に光合成CO₂固定速度の変化はptp1変異による影響が強く、単純なPGR5欠損の影響ではないことが明らかとなった。この結果は、PGR5を基盤とした既存の循環的電子伝達の分子モデルやその役割に関し、議論の余地があることを示したものとなった。また、ptp1変異は植物にとって致命的となる光化学系Iの酸化障害を助長するものであることが明らかとなり、PSIの保護や回復など未だ知られていない分子機構の解明につながる知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Arabidopsis mutant, pgr5-1, has been used in many studies, mainly for the analysis of cyclic electron transport in photosynthesis. We newly identified pgr5 mutant line, pgr5hope1, by our original selection. Although pgr5hope1 had the same point mutations as pgr5-1, it exhibited a different growth phenotype and photosynthetic ability than pgr5-1. In this study, we revealed the genetic factors responsible for the differences between these two pgr5-deficient mutants and analyzed how the differences in photosynthetic ability occur.

We revealed that the phenotypic difference between these mutants was caused by a mutation (designated ptp1) present in the pgr5-1. The ptp1 mutation had no effect on photosynthetic ability in the wild-type background, but increased PSI susceptibility to oxidative damage in the absence of pgr5. As a result, it was indicated that the decreased CO₂ fixation rate observed in pgr5-1 was due to the oxidative damage of PSI enhanced by the ptp1 mutation.

研究分野：植物栄養学

キーワード：光合成 電子伝達 シロイヌナズナ 循環的電子伝達 光ストレス

1. 研究開始当初の背景

光化学系 I(PSI)循環的電子伝達は、光合成に必須な反応電子伝達とともに、光合成の反応に必要となる ATP を補足し、効率的な光合成を行うために機能するというモデルが提唱されている。PGR5 は、PSI 循環的電子伝達の主要な関連因子として報告され、そのシロイヌナズナ欠損株 *pgr5-1* は、これまで世界中の研究者に利用されてきた。しかしながら、PGR5 の分子機能は未だ不明であり、PSI 循環的電子伝達の関連因子であるのか不明であり、また直接的な測定法の確立されていない PSI 循環的電子伝達の存在そのものが現在まで議論が続いている状況にある。申請者は、本申請に先立ち EMS 突然変異集団より PGR5 欠損変異体を独自に単離した(*pgr5^{hope1}* 株)。新たに単離した *pgr5^{hope1}* 株は、*pgr5-1* 株で報告されていたような CO₂ 固定速度の低下等の表現型が見られず、PGR5 の欠損に対して光合成能を回復するような内生変異が存在することが期待された。そこでこれらの変異体の生育や光合成能力の違いを生み出す遺伝的要因及び、光合成能力の違いを詳細に解析し、PSI 循環的電子伝達について再考察することを考えた。

2. 研究の目的

我々はクロロフィル蛍光を利用した独自のシロイヌナズナ変異体選抜により、新たに PGR5 欠損変異株(*pgr5^{hope1}*)を単離した。*pgr5^{hope1}* 株は、これまで世界中で利用されてきた *pgr5-1* 株と同一の 1 塩基置換による PGR5 欠損変異体であるにもかかわらず、両者は生育の表現型が異なり、*pgr5^{hope1}* 株は光合成 CO₂ 固定能力が *pgr5-1* 株よりも高いことが分かった。そこで、両者の生育表現型の違いの原因となる遺伝的要因を明らかにし、光合成能力の差を生じさせるメカニズムについて解析することを目的とした。また、その原因因子が、PGR5 欠損による光合成能力の低下を回復させる機能をもったものであった場合は、イネ等他の有用作物へその変異を導入し、光合成能を強化した遺伝子組換え体を作成することを計画した。

3. 研究の方法

今回独自に単離した *pgr5^{hope1}* 株と、*pgr5-1* 株の生育表現型に起因する遺伝的要因に関しては、両株間の全ゲノム解析比較を行い、第 2 染色体に座する PGR5 遺伝子の近傍に存在する等の推測を基に、候補変異を抽出した。その後、候補変異が座する遺伝子の欠損変異体を取り寄せ、表現型の比較解析を行った。最終的には遺伝子相補株、多重変異体を作成することにより、原因変異 *ptp1* の同定に至った。

また、*pgr5-1* 株と *pgr5^{hope1}* 株の光合成能力の違いを、着生葉で測定可能な CO₂ 固定速度、クロロフィル蛍光および吸光同時測定システムにより比較解析した。光合成能力を測定後のサンプル葉は、葉内窒素量、クロロフィル量、および光合成関連タンパク質の定量解析を行うことで、光合成の生理活性の違いを、作用分子の定量解析から評価した。

4. 研究成果

(1) *pgr5-1* 株と *pgr5^{hope1}* 株の生育表現型の違いとその違いの原因について

pgr5-1 株、および *pgr5^{hope1}* 株を人工気象室内で栽培し、生育の比較を行った(図 1)。

pgr5^{hope1} 株の生育は野生株と有意な差はなく、これまで *pgr5-1* 株で報告されてきたような生育の低下は見られなかった。また、両者の交配 F₁ 世代では、*pgr5^{hope1}* 型の表現型を、さらに F₂ 世代では、生育表現型の分離比が *pgr5^{hope1}:pgr5-1* = 3:1 となることから、両株間の生育表現型の違いは1つの遺伝的要因に起因していることが示唆された。そこで、*pgr5-1* 株と *pgr5^{hope1}* 両者の全ゲノム解析を行い、変異リストを作成し、推定される条件等により絞り込みを行った。最終的に 10 の変異が選抜され、それらの変異が座上する遺伝子の T-DNA 挿入変異体を取り寄せ、表現型の解析を行ったところ、*pgr5-1* 株に類似した葉緑素が薄くなるものが存在した(*salk_133989* 株)。*salk_133989* 株は、*pgr5-1* 株においてのみ見られた変異(*ptp1* と命名)が座上した PTP1 遺伝子の欠損変異体であった。そこで、*pgr5^{hope1}* 株と *salk_133989* 株を交配すると、*pgr5-1* 株の生育表現型が再現できること、また *pgr5-1* 株に PTP1 遺伝子を導入すると、生育が回復した。これらの結果を受け、我々はこれら 2 株の PGR5 欠損変異体の生育表現型の違いの原因因子は、*pgr5-1* 株に存在した *ptp1* 変異であると結論した。

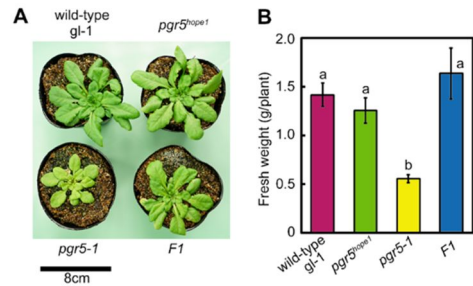


図 1: *pgr5^{hope1}* 株の生育表現型

(2) *pgr5-1* 株と *pgr5^{hope1}* 株の光合成能力の違いについて

pgr5-1 株と *pgr5^{hope1}* 株の光合成能力に関して、詳細な解析を行った結果、*pgr5-1* 株では CO₂ 固定速度が顕著に低下するのに対し、*pgr5^{hope1}* 株では野生体とほぼ変わらない結果となった(図 2)。また、この時 *pgr5-1* 株と *pgr5^{hope1}* 株の電子伝達能力には、大きな違いは見られなかった。これらの結果は、*pgr5-1* 株で見られる CO₂ 固定速度の低下は、PGR5 遺伝子の欠損による影響ではなく、*ptp1* 変異の影響によるものであることを示している。同時に、野生型と同レベルの CO₂ 固定反応を行うために PGR5 は必要ではないことを示している。このことは、既存の PSI 循環的電子伝達の機能モデルに反するものである。さらに、我々は *pgr5-1* 株における特異的な CO₂ 固定速度の低下の原因を葉内成分の定量結果より考察した。その結果、*pgr5-1* 株は PSI 複合体のタンパク質量が特異的に減少しており、PSI の酸化障害が生じていることが示唆された。*pgr5-1* 株の性質として、PSI のアクセプター側への電子の蓄積が起こりやすく、そこから生じた活性酸素により PSI の酸化障害が起こりやすいことがこれまでに報告されていた。そこで、*pgr5-1* 株と *pgr5^{hope1}* 株を強光(900 μmol-E m⁻² s⁻¹)条件に曝し、光ストレスによる PSI の酸化障害の起こりやすさを比較したところ、*pgr5-1* 株では、*pgr5^{hope1}* 株よりも PSI の酸化障害を受けやすくなっていた。*pgr5-1* 株で見られた CO₂ 固定速度の低下は、PSI の酸化障害によるものであることが考えられた。また、*ptp1* 変異は、PGR5 欠損下において、PSI の酸化障害を助長するものであることが示唆された。今後は、*ptp1* 変異がどのようなメカニズムで PSI の酸化障害を助長するかについて明らかにすることが必要となる。

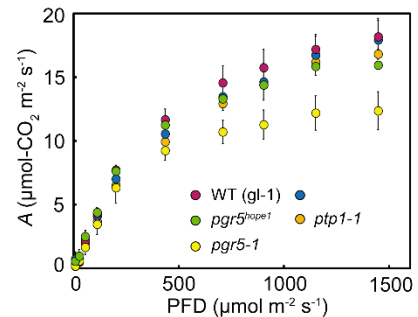


図 2: 各変異体の光に対する CO₂ 固定速度の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada Shinya, Amako Katsumi, Miyake Chikahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of a Novel Mutation Exacerbated the PSI Photoinhibition in pgr5/pgr11 Mutants; Caution for Overestimation of the Phenotypes in Arabidopsis pgr5-1 Mutant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2884 ~ 2884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10112884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田慎也、古谷史侑、大西美帆、森悠樹、三宅親弘
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける栄養欠乏下での クロロフィル蛍光・吸光パラメーターの応答
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 シロイヌナズナ光呼吸変異体glu1/gln2における光合成及びP700酸化への影響の解析
2. 発表標題 和田慎也、丸田隆典、三宅親弘
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田慎也、大西美穂、三宅親弘
2. 発表標題 シロイヌナズナPGR5欠損変異体Hope1株の生育表現型と光合成能力の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田慎也、大西美穂、三宅親弘
2. 発表標題 シロイヌナズナのPSI光保護に関与するPTP1変異の同定
3. 学会等名 日本土壌肥料学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田慎也、尼子克己、三宅親弘
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるPSIの光阻害に関与するptp1変異の同定
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021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

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