

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05520

研究課題名（和文）C4型細胞パターン形成を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding the molecular mechanisms that regulate C4-type cell patterning

研究代表者

宗景 ゆり（Munekage, Yuri）

関西学院大学・生命環境学部・教授

研究者番号：30423247

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではFlaveria属植物C3種とC4種を用いて葉脈パターン形成の比較解析を行うと共に、C4種Flaveriaにおいて維管束鞘細胞特異的に発現するSCARECROW遺伝子の発現パターン解析を行った。その結果、C4型の細胞パターン形成は葉の発達初期に誘導されることが明らかとなった。またオーキシンの極性輸送阻害時のパターンの乱れからオーキシンの局所的な濃度勾配がC4型葉脈パターン形成に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生産性の高い作物として重要視されているC4植物が、共通して有する細胞パターン形成の仕組みの一端を明らかにした。C4型細胞パターン形成は代謝産物の輸送効率を上昇させることができるため、作物のC4化に向けて必要な形質の一つである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a comparative analysis of leaf vein patterning in C3 and C4 species of genus Flaveria, as well as an expression pattern analysis of the SCARECROW gene, which is specifically expressed in bundle sheath cells in C4 species of genus Flaveria. The results showed that C4-type cell pattern formation is induced in the early stage of leaf development. The disruption of the pattern upon inhibition of auxin polar transport revealed that a local auxin concentration gradient is important for the formation of C4-type leaf vein patterns.

研究分野：植物生理学

キーワード：C4光合成 オーキシン 細胞パターン形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

**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が高い。双子葉植物の **C<sub>3</sub>**種と比較して双子葉植物の **C<sub>4</sub>**種では網目状の葉脈が高次に細部まで形成され、葉肉細胞と維管束鞘細胞がおよそ1:1になるように配置されている。葉肉細胞と維管束鞘細胞が隣接することにより効率よく代謝産物を輸送できるため、この細胞配置は、**C<sub>4</sub>**光合成を支える重要な構造である。**C<sub>4</sub>**型光合成は **C<sub>3</sub>**型光合成を営む祖先植物から進化的に獲得されており、被子植物において **19**科 **66**系統が同定されている(Sage 2012)。それらはすべて **C<sub>4</sub>**型細胞パターンを示しており、これは収斂進化形質の一つであると考えられるが、このパターン形成のメカニズムはほとんど明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、**C<sub>4</sub>**型細胞パターン形成の分子メカニズムを解明することを目的とする。**C<sub>3</sub>**型から **C<sub>4</sub>**型への進化は被子植物の様々な科で生じていることから、**C<sub>4</sub>**型細胞パターンは被子植物に普遍的に存在するメカニズムのわずかな変化によって獲得されたと考えられる。植物の維管束形成の誘導には植物ホルモンであるオーキシンが関与する事が知られている。**C<sub>4</sub>**種ではオーキシン合成に関わる遺伝子群や、オーキシン輸送に関わる遺伝子群の発現が上昇していることが報告されているが、それだけでは葉肉細胞と維管束鞘細胞の配置が **1:1**となる **C<sub>4</sub>**型細胞パターン形成を説明できない。そこで、本研究では **C<sub>4</sub>**型細胞パターン形成を説明するためのメカニズムのうち、オーキシンの流れを制御して細部への高次維管束を誘導する仕組みと、葉肉細胞と維管束鞘細胞の配置が **1:1**となる **C<sub>4</sub>**型細胞パターンを維持するための細胞間コミュニケーションシステムの解明を目指した。

### 3. 研究の方法

双子葉植物であるキク科 **Flaveria**属植物には近縁な **C<sub>3</sub>**種 **Flaveria pringlei**と **C<sub>4</sub>**種 **Flaveria bidentis**が存在する。そこでこれらの種の葉の発達に伴う維管束の形成過程を比較することで **C<sub>3</sub>**と **C<sub>4</sub>**の維管束形成パターンを詳細に解析した。また、我々は **Flaveria**属植物の **C<sub>3</sub>**種および **C<sub>4</sub>**種の比較トランスクリプトーム解析により **C<sub>4</sub>**種において発現の高い **SCARECROW (SCR)**転写因子および、**DNA-binding One Zinc Finger (DOF)**型転写因子を同定している。**SCR**転写因子はシロイヌナズナにおいて内皮細胞の分化や細胞パターン形成に関わることが知られており、維管束鞘細胞の分化に関与することが示唆される。また、**DOF**型転写因子はオーキシンに応答して発現する可能性が示唆された。このため、これらの転写因子のプロモーターにレポーター遺伝子として  $\beta$  グルクロニダーゼ遺伝子 (**GUS**)を連結したコンストラクトを導入して可視化することより、**C<sub>4</sub>**型細胞パターン形成を制御する仕組みを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 近縁な **C<sub>3</sub>**種 **F. pringlei**と **C<sub>4</sub>**種 **F. bidentis**の葉脈形成パターンの解析

第一本葉を用いて、葉が展開する際の葉脈密度、葉脈次数と片方が葉脈に接続していないフリーエンド数を解析した。**C<sub>3</sub>**種 **F. pringlei**と **C<sub>4</sub>**種 **F. bidentis**はどちらも葉の先端から順に葉脈が形成され、基部では細胞分裂が進行していた。どちらの種も葉の伸長に伴って葉脈密度は徐々に減少したが、**C<sub>4</sub>**種 **F. bidentis**では葉脈密度は **C<sub>3</sub>**種 **F. pringlei**より高く、3次脈以上の高次脈が多く形成されることで葉脈が密に配置されることが明らかとなった。また、**C<sub>4</sub>**種 **F. bidentis**では片方が葉脈に接続していないフリーエンド数が多く、この形態が葉肉細胞と維管束鞘細胞の配置が **1:1**となる **C<sub>4</sub>**型細胞パターンに必要なことが示唆された。

(2) **C<sub>4</sub>**種 *F. bidentis* SCR ホモログ遺伝子と *Arabidopsis thaliana* SCR 遺伝子の機能保存性  
*F. bidentis* のゲノムにコードされている 2 種の SCARECROW ホモログ遺伝子 **FbSCR1**, **FbSCR2** が *A. thaliana* SCR と同様の機能を有するか調べるため、*A. thaliana* *scr-4* 変異株に、**AtSCR** プロモータ下流で **FbSCR1** または **FbSCR2** を発現させるコンストラクトを導入した。その結果、**FbSCR1** は *scr-4* 変異株で見られる、生育障害、内皮細胞形成異常、重力屈性異常を相補した。**FbSCR2** は、*scr-4* 変異株の表現型を完全には相補しないものの、生育障害が回復した。これらの結果から、*F. bidentis* にコードされる **FbSCR1**, **FbSCR2** は、*A. thaliana* SCR と同等の機能を有することが明らかとなった。

(3) **C<sub>4</sub>**種 *F. bidentis* **FbSCR1** および **FbSCR2** の発現パターン解析

**FbSCR1** および **FbSCR2** の発現パターンを解析するために、**FbSCR1** プロモーターまたは **FbSCR2** プロモーターに **GUS** レポーター遺伝子を連結したコンストラクトを導入した株を用いて、**GUS** 染色を行った。*pFbSCR1::GUS* 発現は、維管束鞘細胞とその前駆体細胞で特異的に観察されており、葉の発達段階での *pFbSCR1::GUS* 発現パターンから、**C<sub>4</sub>** 種では細胞分裂と共に初期の段階において高密度で維管束前駆体であるプロカンビウムの分化誘導、およびそれに隣接した維管束鞘細胞前駆体細胞の分化誘導が起こることが明らかとなった。

(4) 極性オーキシン輸送阻害効果

極性オーキシン輸送阻害剤であるナフチルフタラミン酸を添加した培地で、**C<sub>3</sub>**種 *F. pringlei* と **C<sub>4</sub>**種 *F. bidentis* を育成させ葉の葉脈パターンを解析した。その結果、どちらの植物においても葉脈形成パターンが乱れ、ランダムな葉脈形成が観察された。このことからオーキシン極性輸送が **C<sub>3</sub>** および **C<sub>4</sub>** のどちらの葉脈パターン形成に関わることが明らかになった。また、**C<sub>4</sub>**種 *F. bidentis* においては **C<sub>3</sub>**種 *F. pringlei* 密に維管束が形成されており、極性オーキシン輸送体に依存しない維管束誘導の制御機構を有することが示唆された。

(5) **C<sub>4</sub>**種 *F. bidentis* **FbDOF1A** および **FbDOF1B** の発現パターン解析

*F. bidentis* において **FbDOF1A** および **FbDOF1B** の発現パターンを解析するために、**FbDOF1A** プロモーターまたは **FbDOF1B** プロモーターに **GUS** レポーターを連結したコンストラクトを *F. bidentis* のゲノムに導入した株を用いて **GUS** 染色を行った。6 日間生育した芽生えを人工オーキシンを添加した培地に移植し 6 時間経過した葉では、*FbDOF1A::GUS* の発現は葉全体でみられており、**FbDOF1A** がオーキシンに応答して発現上昇することが示された。**FbDOF1A** の機能を解明するために、**FbDOF1A** 遺伝子に **repression domain (SRDX)** を連結したコンストラクトを導入したが、シュート形成効率が非常に低くなり形質転換株は得られなかった。この結果から **FbDOF1A** はシュート形成に重要な役割を果たすことが示唆された。**FbDOF1A** の機能解明のためには誘導系を使用するなど、さらなる解析が必要である。

以上、本研究から **C<sub>4</sub>** 型の細胞パターン形成は葉の発達初期で誘導されること、またオーキシンの極性輸送が葉脈パターン形成に重要であることが明らかになった。これらの研究成果は、国際学術誌に投稿する予定であり、論文を執筆中である。また、*Flaveria* 属 **C<sub>3</sub>**種、**C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>** 中間種、**C<sub>4</sub>** 様種、**C<sub>4</sub>** 種の比較解析結果から想定される **C<sub>4</sub>** 進化について解説した総説を国際誌に投稿し受理された(Munekage & Taniguchi, 2022)。

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 0件）

1. 著者名 Munekage Yuri N., Taniguchi Yukimi Y.	4. 巻 110
2. 論文標題 A scheme for C4 evolution derived from a comparative analysis of the closely related C3, C3-C4 intermediate, C4-like, and C4 species in the genus <i>Flaveria</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-022-01246-z	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuri N. Munekage
2. 発表標題 Light harvesting and chloroplast electron transport in NADP-malic enzyme type C4 <i>Flaveria bidentis</i> .
3. 学会等名 INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOTOSYNTHESIS AND CHLOROPLAST REGULATION（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuri N. Munekage, Tomoyo Ono, Mei Osawa, Ken Okudono, Yukimi Taniguchi, Tammy L Sage
2. 発表標題 Expression pattern of FbD0F1A transcription factor during leaf development in C4 <i>Flaveria bidentis</i>
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takumi Ito, Hayate Machino, Ryusei Inoue, Tsuyoshi Furumoto, Kenji Nishimura, Yuri N. Munekage
2. 発表標題 RETICULATA RELATED 3 localized to the chloroplast inner envelope is involved in transcription of the chloroplast genome.
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ai Ishizaki, Sayaka Koshi, Ryouichi Tanaka, Atsushi Takabayashi, Kentaro Ifuku, Yuri Munekage
2. 発表標題 Analysis of NPQ7 expression suppressed lines of C4 Flaveria bidentis showing defects in PSII activity
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤匠、町野颯、井上龍星、花田裕昭、古本強、西村健司、宗景ゆり
2. 発表標題 Arabidopsis thalianaにおけるRETICULATA-RELATED 3の機能解析
3. 学会等名 第12回日本光合成学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野 知世、奥殿 健、谷口 幸美、宗景 ゆり
2. 発表標題 C4種Flaveria bidentisの葉脈形成時におけるFbD0F1の発現パターン解析
3. 学会等名 光合成学会
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
---------	---------