

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292006

研究課題名(和文)ポストハーベストステイグリーンの分子基盤と新しい育種利用

研究課題名(英文)Molecular basis of postharvest stay-green and its application to breeding

研究代表者

草場 信 (Kusaba, Makoto)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：20370653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：ブロッコリなど葉菜類では輸送・貯蔵中の黄変・鮮度低下が生産・流通コストの面から大きな問題となっている。品種改良等による解決には老化処理をしても緑色を維持するステイグリーン突然変異体の原因遺伝子を単離し、その遺伝子の機能を解析することが有用と考えられる。本課題ではダイズcytG、シロイヌナズナのpif5、イネのdye1の3つの異なるステイグリーン突然変異体の原因遺伝子を単離し、それぞれの機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In leaf vegetables including broccoli, postharvest yellowing is a major issue in terms of distribution cost. It will be useful to isolate and analyze stay-green genes, which prevent yellowing under senescence-inducing conditions, for resolution of the issue by genetic improvement. Here we isolated three stay-green genes, cytG in soybean, pif5 in Arabidopsis, and dye1 in rice, and analyzed their molecular functions.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：老化 クロロフィル分解 光受容体

## 1. 研究開始当初の背景

葉菜類においては収穫後の黄変は大きな問題である。ブロッコリでは、その原因は輸送中の暗黒条件下における老化誘導であることが指摘されていた。暗黒誘導性の老化についてはシロイヌナズナを中心に解析が進んでいたものの、そのシグナル伝達系については十分な知見はなかった。また、いくつかの緑色維持(ステイグリーン)突然変異体の原因遺伝子の報告はあったものの、その数は多くはなかった。植物においても核ゲノムのゲノム編集は始まりつつあったが、核以外のオルガネラにおいてはゲノム編集による突然変異導入の成功例はなかった。

## 2. 研究の目的

ブロッコリなど葉菜類では輸送・貯蔵中の黄変・鮮度低下が生産・流通コストの面から大きな問題となっている。このような「老化」は植物が積極的に引き起こすものであり、老化シグナル伝達の阻害等により緑色維持が可能である。輸送中の老化の主因は暗黒条件に置かれることであるが、暗黒誘導性老化の分子メカニズムは未解明な点が多い。そこで暗黒条件下で誘導される黄変を抑制する突然変異体(ステイグリーン突然変異体)の原因遺伝子の単離と機能解析を通して、収穫後の黄変を遺伝的に抑制するための基礎的知見を得る。また葉緑体ゲノム改変など新奇なゲノム編集技術によるステイグリーン作物の作成も試みる。

## 3. 研究の方法

収穫後の黄変を遺伝的に抑制するための基礎的知見を得ることを目的として主に3つのステイグリーン突然変異体の遺伝子単離と機能解析を行った。ダイズ細胞質遺伝ステイグリーン突然変異体 *cytG* の原因遺伝子については既に候補を見出している。本課題ではその証明を行うとともに、*cytG* のステイグリーン誘

導における作用機構について解析する。また、葉緑体ゲノム編集技術を開発し、*cytG* 遺伝子のノックアウト個体を作製する。暗黒誘導性老化のシグナル伝達系に関する突然変異体を解析するとともに、その際のエチレンの役割について解析を行う。イネステイグリーン突然変異体 *dye1* の原因遺伝子をマップベースクローニング法により単離するとともに機能解析を行う。

## 4. 研究成果

暗黒下で葉の黄変を遺伝的に抑制するにはステイグリーン突然変異体の原因遺伝子単離・機能解析が有用と考えられる。bHLH型転写因子Phytochrome Interacting Factor5 (PIF5) のloss-of-function突然変異体は暗黒条件下での老化が遅延することから、PIF5は暗黒誘導性老化の促進因子と考えられた。PIF5は明条件下で赤色光受容体のPhyBにより分解されることが知られており、明条件下では赤色光成分がPIF5分解を促進することで老化を抑制しているものと考えられた。PIF5で直接発現が制御される遺伝子のうち老化で誘導される遺伝子を探索したところ、*AtHB2*を見出した。そこで*AtHB2*の過剰発現体を作成したところ過剰発現体は早期老化を示したことから、PIF5は*AtHB2*の発現制御により老化を促進するものと考えられた。暗黒処理は老化促進ホルモンであるエチレンの合成を誘導することが判明したことから、赤色光はPIF5分解を介してエチレン合成を抑制している可能性が考えられた。しかしながら、様々な波長光の老化抑制効果を検討したところ、赤色以外にも青色光にも老化抑制効果があることが分かった。今後、青色光による老化抑制機構についての解析も進めていくつもりである。

葉緑体ゲノム塩基配列の解析からダイズ細胞質ステイグリーン突然変異体 *cytG* の原因遺伝子は光化学系IIの小サブユニットのひとつPsbMをコードしていることが予想された。そこ

で葉緑体形質転換法によりタバコPsbMのノックアウト形質転換体を作製したところ、形質転換体はステイグリーン表現型を示したことから、*cytG*の原因遺伝子は*psbM*であることが証明された。また、*cytG*では暗黒芽生えのクロロフィル*b*リダクターゼ活性は野生型に比べて低下していたことから、クロロフィル*b*分解活性の低下が*cytG*のステイグリーン形質をもたらしていると考えられた。一方、他の光化学系II小サブユニット*psbI*のノックアウト形質転換体のクロロフィル*b*リダクターゼ活性は正常であった。このことから、PsbMは光化学系IIの機能を介してではなく、特異的にクロロフィル*b*リダクターゼ活性を制御している可能性が考えられた。

さらにイネのステイグリーン突然変異体*dye1*の原因遺伝子単離も試みた。マップベースクローニングの結果、光化学系Iのアンテナ複合体LHCIのサブユニットのひとつLhca4にアミノ酸置換を伴う変異があることが分かった。野生型ゲノムクローンの形質転換により相補実験を行ったところ、表現型が回復したため、この遺伝子の変異がステイグリーンの原因であることが証明された。*dye1*では老化が進行する以前からクロロフィル含量が高く、そのことがステイグリーン表現型を示す原因のひとつと考えられた。老化前の健全葉では光化学系Iのコアタンパク質量がやや増加しているほか、光化学系IIのアンテナタンパク質であるLHCIIのタンパク質量が顕著に増加していた。したがって、これらのタンパク質量が増えることがステイグリーン表現型の原因になっていると考えられた。

これらのステイグリーン遺伝子はブロッコリをはじめとした葉菜類に共通に存在するものであり、それらの遺伝子破壊等により葉菜類にステイグリーン形質を与えることができると考えられる。ただし、TALENによる葉緑体ゲノム編集は成功しなかったため、葉緑体コードの遺伝子である*psbM*の突然変異体を得ることは現時点では難しいと考えられる。

## 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 3 件)

Hiroshi Yamatani, Kaori Kohzuma, Michiharu Nakano, Tsuneaki Takami, Yusuke Kato, Yoriko Hayashi, Yuki Monden, Yutaka Okumoto, Tomoko Abe Toshihiro Kumamaru, Ayumi Tanaka, Wataru Sakamoto, Makoto Kusaba (2018)

Impairment of Lhca4, a subunit of LHCI, causes high accumulation of chlorophyll and the stay-green phenotype in rice Journal of Experimental Botany, 5, 2018, 1027-1035  
査読あり

DOI: 10.1093/jxb/erx468

Kohzuma, K., Sato, Y., Ito, H., Okuzaki, A., Watanabe, M., Kobayashi, H., Nakano, M., Yamatani, H., Masuda, Y., Nagashima, Y., Fukuoka, H., Yamada, T., Kanazawa, A., Kitamura, K., Tabei, Y., Ikeuchi, M., Sakamoto, W., Tanaka, A., and Kusaba, M.,

The non-Mendelian green cotyledon gene in soybean encodes a small subunit of photosystem II. Plant Physiology, 173, 2017, 2138-2147 査読あり

DOI: 10.1104/pp.16.01589

Ueda, H., Kusaba, M., Strigolactone regulates leaf senescence in concert with ethylene in Arabidopsis. Plant Physiology, 55, 2015, 1763-1771 査読あり

DOI: 10.1104/pp.15.00325

(学会発表) (計 10 件)

山谷 浩史, 上妻 馨梨, 中野 道治, 高見 常明, 田中 歩, 坂本 亘, 草場 信 イネ LHCIサブユニット 機能低下により導かれるクロロフィル高蓄積機構の解析 第133回日本育種学会 2018年

Hiroshi Yamatani, Kaori Kohzuma, Michiharu Nakano, Yoriko Hayashi, Tsuneaki Takami, Yusuke Kato, Wataru

Sakamoto, Tomoko, Abe, Makoto Kusaba  
Molecular genetic analysis of the rice  
stay-green mutant dcd1 Plant Biology 2017  
(国際学会)2017年  
山谷浩史, 上妻馨梨, 中野道治, 林依子,  
高見常明, 門田有希, 奥本裕, 坂本亘, 阿  
部知子, 草場信 イネstay-green遺伝子  
*DCD1*の単離と機能解析 日本育種学会第  
131回講演会 2017年03月29日 ~ 2017年03  
月30日 名古屋大学, 名古屋  
Makoto Kusaba A cytoplasmic stay-green  
gene in soybean, 8th International  
Symposium on Plant Senescence(招待講演)  
(国際学会) 2016年11月01日 ~ 2016年11  
月01日 Jeju, Korea  
小塚俊明, 下野起将, 井上良平, 草場信  
光環境応答による葉老化制御機構の生理  
学的解析 第57回日本植物生理学会年会  
2016年03月18日 ~ 2016年03月20日 岩手  
大学(盛岡)  
上妻馨梨, 伊藤寿, 渡辺麻衣, 池内昌彦,  
坂本亘, 田中歩, 草場信 葉老化時におけ  
るLHCII分解への光化学系II小サブユニット  
の関与 第57回日本植物生理学会年会  
2016年03月18日 ~ 2016年03月20日 岩手  
大学(盛岡)  
Makoto Kusaba Nuclear and cytoplasmic  
stay-green genes in legume. International  
Symposium on Dynamics and Regulation of  
Photosynthesis(招待講演)(国際学会)  
2015年10月29日 ~ 2015年10月31日 奈良  
春日野国際フォーラム(奈良)  
上田浩晶・草場信 エチレン合成とストリゴラ  
クトン合成の二段階制御を介した葉老化促  
進 日本育種学会 2015年03月21日 ~ 2015  
年03月22日 東京(玉川大学)  
井上良平・宮田麗華・山谷浩史・高木優・草  
場信 Phytochrome Interacting Factor 4・5  
による葉老化制御機構の解析 日本植物生  
理学会 2015年03月16日 ~ 2015 年03月18

日 東京(東京農業大学)  
上田浩晶・草場信 ストリゴラクトンを介した  
葉老化制御の解析 日本植物生理学会  
2015年03月16日 ~ 2015年03月18日 東京  
(東京農業大学)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
草場 信 (KUSABA, Makoto)  
広島大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号:20370653

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者

坂本 浩司 (SAKAMOTO, Koji)