

「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力  
強化と生産物活用のための基盤技術の創出」  
平成23年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告
----------------

田中 歩

北海道大学低温科学研究所・教授

葉緑体機能改変によるステイグリーン植物の創出

## §1. 研究実施体制

### (1) 田中グループ

- ① 研究代表者: 田中 歩 (北海道大学低温科学研究所、教授)
- ② 研究項目
  - ・ステイグリーン株の選抜
  - ・光化学系色素系の改変

### (2) 草場グループ

- ① 主たる共同研究者: 草場 信 (広島大学大学院理学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・シロイヌナズナ CRES-T ライブラリーのスクリーニング
  - ・イネ新規ステイグリーン株の原因遺伝子の解明
  - ・光化学系の改変によるステイグリーン株の作出
  - ・ソルガムステイグリーン系統選抜法の開発

### (3) 坂本グループ

- ① 主たる共同研究者: 坂本 亘 (岡山大学資源植物科学研究所、教授)
- ② 研究項目
  - ・葉緑体機能強化因子の同定とステイグリーンの作出
  - ・ソルガムを研究材料として用いるための材料整備

## §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### 1. これまでの研究の概要

本研究では、強力なステイグリーン株の作製を目的に、1)ステイグリーン変異株とその原因遺伝子の網羅的単離、2)光化学系改変技術の開発とステイグリーンの誘導、3)葉緑体の品質管理と機能強化、4)技術の統合と汎用性・一般性への取り組みを行ってきた。我々は本プロジェクトの開始時から光化学系の改変によるステイグリーン株の作製を試み、変異株のスクリーニングによるステイグリーン株の単離とその原因遺伝子の単離を進めてきた。その結果、幾つかのステイグリーン株の作製に成功した。一方で、作製したステイグリーン株は光傷害を受けやすい形質を持っており、この克服が大きな課題となった。

### 2. 研究進捗状況と研究成果

#### (1)ステイグリーン株の単離と原因遺伝子の同定

ステイグリーン遺伝子の網羅的単離を目指し、シロイヌナズナの EMS 変異株、FOX ライン、CRES-T ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果多数のステイグリーン株を単離でき、その一部については遺伝子の同定などを行った。単離された変異株のうち、イネの *nyc4* と名付けたステイグリーン株の原因遺伝子は、シロイヌナズナ *THF1* のオルソログであった<sup>7)</sup>。この株は、クロロフィルを保持するだけでなく、光化学系 II サブユニットの分解が抑制され、その結果光化学系 II の活性も維持されるステイグリーン株であった。また *nyc4* は圃場条件下で葉の枯れ上がりが遅いこともわかった。その他のステイグリーン株においては遺伝子の同定等を進めている。シロイヌナズナの *nyc1* 変異株の種子発芽における機能解析もおこなった<sup>3)</sup>。



図1 暗所でのクロロフィルの維持

#### (2)形質転換植物の光傷害の原因の究明

光合成の改変はしばしば傷害を引き起こす。この傷害を回避することは、安定なステイグリーン株の作製に必要不可欠である。そこで、形質転換株(CAO を過剰発現させた株)の傷害の原因を探った。その結果、CAO 過剰発現株では、一部のクロロフィルが正常な分解経路を通らず、そのためフェオフォルビドが蓄積し、細胞死を誘導することが解った<sup>4)</sup>。このことは、フェオフォルビドが蓄積しないようにクロロフィル分解経路を制御すれば、さらに強力なステイグリーン株を作製できることを示している。

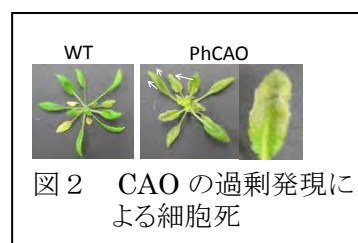


図2 CAO の過剰発現による細胞死

### (3) 葉緑体品質保持と光傷害の克服

近年、葉緑体維持機構が次第に明らかにされ、その役割が想像以上に大きいことがわかってきた。そこで 24 年度は、品質管理因子の機能解析<sup>1, 6)</sup>ステイグリーン株への応用を試みた<sup>2, 5)</sup>。VIPP1 を過剰発現するシロイヌナズナでは、高温処理における葉の光合成活性が野生型と比べて維持されることが明らかとなった。

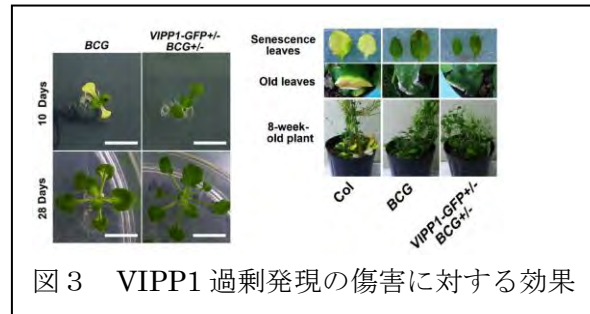


図3 VIPP1 過剰発現の傷害に対する効果

これらの結果から、VIPP1 の包膜の保護作用が葉緑体の機能強化にはたらくことが示唆された。一方、CAO 過剰発現株は、子葉が高い頻度で緑化せず、傷害を受けやすくなる。そこで、調節ドメインを削った CAO (BCG) をシロイヌナズナに導入しクロロフィル *b* を多量に蓄積した株に、さらに VIPP1 を過剰発現させた。その結果、作製した株は、生育初期の黄化が改善されることが明らかとなった。

### (4) ソルガムステイグリーン株の単離に向けた試み

ソルガム (*Sorghum bicolor*) の 2 系統 (NOG 及び BTx623) において、シロイヌナズナで知られているステイグリーン関連遺伝子 *SGR* および *THF1* の塩基配列を決定した。NOG は非ステイグリーン、BTx623 はステイグリーン形質を示すが、両系統間で遺伝子の配列に差は見られなかった。

ステイグリーンに関する新たな遺伝子をソルガムで単離するため、NOG と Btx623 のステイグリーン形質を評価したところ、16 時間日長、27°C で生育させた幼苗の第 2 葉で顕著な差が観察できることがわかった。QTL 解析による遺伝子同定のため、BTx623 と NOG の交配により得た F2 個体 250 系統の組換え近交系をこれまでに試みており、24 年度は F4 の栽培まで進んだ。

### 3. 今後の見通しと課題

様々な変異プールのスクリーニングにおいて、興味深いステイグリーン株がいくつか単離された。まだ同定されていないステイグリーン関連遺伝子は多く存在すると考えている。スクリーニングを進め原因遺伝子の同定をさらに進めることが必要である。また、光合成の改変に伴う傷害を、少なくとも部分的には、回避することができた。これは、品質管理の重要性を示すと同時に、作製した形質転換株の傷害回避が可能であることを示唆している。安定で強力なステイグリーン株の作製には、未知のステイグリーン関連遺伝子の単離と、傷害を防ぐため品質維持機能の強化が必要である。また、他の植物にも応用展開することも重要な課題である。



図4 単離されたステイグリーン株のひとつ (下)。上は WT。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Yusuke Kato, Xuwu Sun, Lixin Zhang, and Wataru Sakamoto, “Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in Arabidopsis”, *Plant Physiology*, vol. 159, pp. 1428-1439, 2012 (DOI: 10.1104/pp.112.199042)
2. Lingang Zhang, Yusuke Kato, Stephanie Otters, Ute C. Vothknecht, and Wataru Sakamoto, “Essential role of VIPP1 in chloroplast envelope maintenance in Arabidopsis”, *Plant Cell*, vol. 24, pp. 3695-3707, 2012 (DOI: 10.1105/tpc.112.103606)
3. Saori Nakajima, Hisashi Ito, Ryouichi Tanaka and Ayumi Tanaka, “Chlorophyll b Reductase Plays an Essential Role in Maturation and Storability of Arabidopsis thaliana Seeds”, *Plant Physiology*, vol. 160, no. 1, pp. 261-273, 2012 (DOI: 10.1104/pp.112.196881)
4. Yousuke Shimoda, Hisashi Ito and Ayumi Tanaka, “Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a precedes magnesium dechelation for protection against necrosis in Arabidopsis”, *Plant Journal*, vol. 72, no. 3, pp. 501-511, 2012 (DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05095.x.)
5. Lingang Zhang and Wataru Sakamoto, “Possible function of VIPP1 in thylakoids. Protection but not formation?”, *Plant Signalling & Behavior*, vol. 8, e22860, 2013 (DOI: 10.4161/psb.22860)
6. Yusuke Kato and Wataru Sakamoto, “Possible compensatory role among chloroplast proteases under excess-light stress condition”, *Plant Signalling & Behavior*, vol. 8, e23198, 2013 (DOI: 10.4161/psb.23198)
7. Hiroshi Yamatani, Yutaka Sato, Yu Masuda, Yusuke Kato, Ryouhei Morita, Kenji Fukunaga, Yoshiaki Nagamura, Minoru Nishimura, Wataru Sakamoto, Ayumi Tanaka, Makoto Kusaba, “NYC4, the rice ortholog of Arabidopsis THF1, is involved in the degradation of chlorophyll-protein complexes during leaf senescence”, *Plant Journal*. (in press)