

「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

H23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
 - ・シロイヌナズナスステイグリーン変異株の網羅的単離
 - ・色素系改変によるステイグリーン誘導

(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
 - ・CRES-T ライブラリーのスクリーニング
 - ・イネステイグリーン突然変異原因遺伝子の高精度マッピング

(3) 坂本グループ

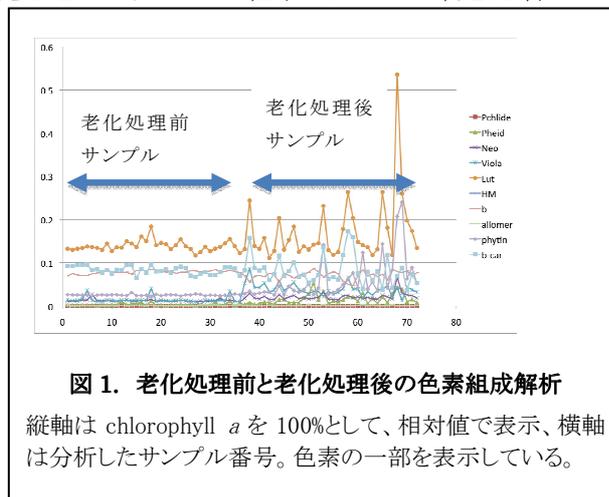
- ① 主たる共同研究者: 坂本 亘 (岡山大学資源植物科学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・葉緑体の機能強化
 - ・ソルガムステイグリーン株の作製

§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)

・シロイヌナズナスティグリーン変異株の網羅的単離

田中グループは、理化学研究所より提供された、葉緑体移行タンパク質のタグライン約 50 株と ethylmethanesulfonate (EMS) 処理をしたシロイヌナズナ種子のプールの約 200 株について HPLC による色素分析を行い、スティグリーン変異体の単離を試みた。植物個体ごとのばらつきを考慮して、一つのラインについて、少なくとも5個体の色素組成を分析した。また、すべての個体について老化処理(播種後4週目の個体を6日間暗所で生育し、老化を誘導する)を行い、老化処理前、老化処理後の色素組成を比較した(図1)。23年度は、スティグリーンの個体を得ることはできなかったが、引き続きスクリーニングを続けている。

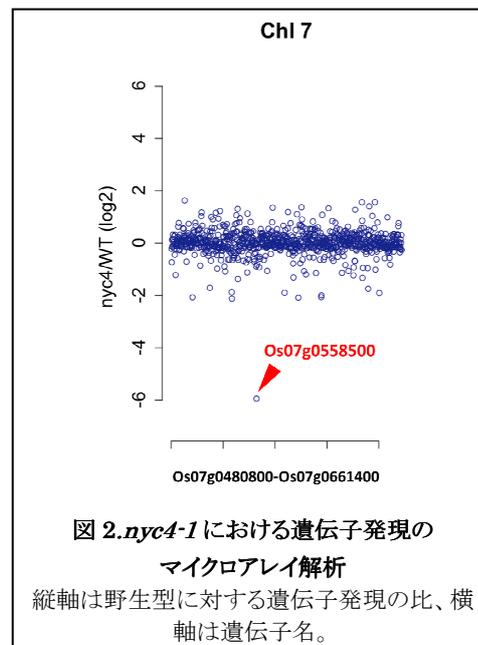


・色素系改変によるスティグリーン誘導

クロロフィルb合成酵素(CAO)は触媒ドメインと制御ドメインを持っている。制御ドメインも幾つかのサブドメインに分かれ、更に分解誘導配列(デグロン)を持っている。田中グループは、制御ドメインの構造予測などを参考に、更に4つのサブドメインに分類した。それらのサブドメインを欠損する CAO を発現させるためのベクターの構築を行った。さらに、これらの遺伝子を用い形質転換を行った。生理解析のため、現在形質転換株の単離中である(論文リスト1)。

・CRES-Tライブラリーのスクリーニング

草場グループは、産業技術総合研究所より提供された CRES-T ライブラリーのスクリーニングを行った。1 転写因子あたり平均5ライン得られるような規模(1バルクあたり200個)で切除葉の暗黒処理によりスティグリーン表現型のスクリーニングを行った。再現性を確かめるため、ひとつの個体につき3反復を行った。その結果、AP2/ERFファミリー遺伝子 *FSG1* の CRES-T 形質転換体が強いスティグリーン表現型を示した。現在、T-DNA 挿入系統の表現型を観察しているが、現在までのところスティグリーン表現型を示していないことから、機能重複遺伝子の存在を考え、二重突然変異体の作成を試みている。今後引き続きスクリーニングを続ける。



・イネスティグリーン突然変異原因遺伝子の高精度マッピング

草場グループは、イネの新規スティグリーン突然変異体 *nyc4-1* の原因遺伝子の高精度マッ

ピングを行った。*nyc4-1*は non-functional 突然変異体であり、ラフマッピングの結果、染色体 3 番と 7 番の二か所にマッピングされることがわかっている。また突然変異体の稔性は低くないにも関わらず、野生型との F₁ の稔性が 2 割程度と低かったことから、相互転座により遺伝子が破壊されている可能性が考えられた。そこで相互転座により遺伝子が破壊されている可能性を考え、マイクロアレイ解析を行った(図2)。するとマッピングされた領域のうちのひとつに非常に発現が低下している遺伝子 Os07g0558500 が見出された。Inverse PCR の結果この遺伝子を破壊する形で相互転座様の染色体変異が起きていることが確かめられた。

・葉緑体の機能強化

坂本グループは、葉緑体の品質管理因子として FtsH に着目し、それらの機能解析を進めた。FtsH はチラコイド膜に局在する膜プロテアーゼであり、光化学系 II の修復サイクルと光保護作用に働く主要な因子であるとともに、チラコイド形成にも関与する。本年度は、FtsH の機能をシロイヌナズナ以外の植物でも調べるために FtsH をノックダウンしたタバコを作製した。FtsH が 50%ノックダウンしたタバコ個体では葉に斑入りが生じ(図3)チラコイド維持に異常が生じており、光化学系 II の反応中心 D1 タンパク質の分解にも遅延が生じた。以上の結果から、葉緑体機能強化因子としての FtsH の重要性が再認識された。

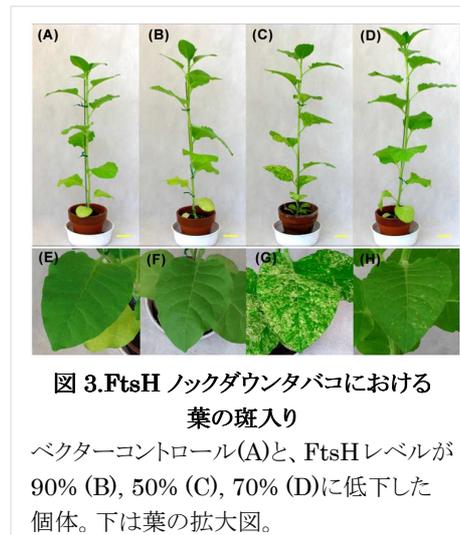


図 3.FtsH ノックダウンタバコにおける葉の斑入り

ベクターコントロール(A)と、FtsHレベルが90% (B)、50% (C)、70% (D)に低下した個体。下は葉の拡大図。

また、VIPP1 はチラコイド膜形成に重要であると考えられているが、その機能について不明の点が多い。本年度は VIPP1 タンパク質が従来まで考えられているチラコイド形成だけでなく、包膜の維持に必須の機能を示唆するデータを得た(論文発表準備中)。

・ソルガムステイグリーン株の作製

坂本グループは、ソルガムでのステイグリーン形質を解析するため、グレイン系統である BTx623 および日本在来系統「たかきび」を栽培し、相互交雑で F₁ 種子を得た。ステイグリーンについて、BTx623 はやや強く、たかきびはやや弱い形質を示すので、24年度以降に F₂ 系統を得て遺伝的に解析を試みる。

ステイグリーンに関わる遺伝子として *SGR* と *THF1* に着目し、それらの変異によるステイグリーン株の作製を目指すため、23年度は EMS による変異系統(ミュータントパネル)作製のための準備を行った。24年度末までにミュータントパネルを作出する予定であり、ステイグリーン選抜法を確立してスクリーニングを試みる。

・その他の進展

田中グループは、光化学系の改変をさらに進めるため、CAO の導入株にクロロフィル *b* 分解系の変異を導入した。この株の光化学系の特徴を、BN-PAGE と Native green gel によって調べた。また、坂本グループは、FtsH と VIPP1 を過剰発現するシロイヌナズナを作製した。FtsH はヘテロマーとして機能するため、FtsH2 および FtsH5 の両方を発現する個体を作製した。来年度はそれらの個体における葉緑体機能強化とステイグリーン形質について解析する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Sakuraba Y, Balazadeh S, Tanaka R, Mueller-Roeber B and Tanaka A.
“Overproduction of chlorophyll b retards senescence through transcriptional re-programming in Arabidopsis”, *Plant and Cell Physiology*. Vol. 53, No. 5, pp 505-517, 2012 (doi: 10.1093/pcp/pcs006)