

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	C ₄ 型作物の分子育種へ向けたC ₄ 型光合成誘導システムの解明
研究機関・ 部局・職名	奈良先端科学技術大学院大学・ バイオサイエンス研究科・助教
氏名	宗景 ゆり

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	117,000,000	117,000,000	19,969	117,019,969	117,019,969	0	0
間接経費	35,100,000	35,100,000	0	35,100,000	35,100,000	0	0
合計	152,100,000	152,100,000	19,969	152,119,969	152,119,969	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	100,000	21,295,272	12,027,233	17,390,727	50,813,232
旅費	0	300,213	282,720	1,898,374	2,481,307
謝金・人件費等	0	8,723,910	19,523,470	19,574,665	47,822,045
その他	0	5,844,240	5,710,424	4,348,721	15,903,385
直接経費計	100,000	36,163,635	37,543,847	43,212,487	117,019,969
間接経費計	30,000	12,270,000	12,025,500	10,774,500	35,100,000
合計	130,000	48,433,635	49,569,347	53,986,987	152,119,969

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
グリーンベンチ	三洋電機(株)製 MCV-131BNS	1	963,900	963,900	2011/5/24	奈良先端科学技術大学院大学
極微量分光光度計	サーモフィッシャーサイエ ンティフィック社製 NanoDrop2000c	1	1,937,250	1,937,250	2011/5/20	奈良先端科学技術大学院大学
人工気象器	日本医化機器製 作所製 LH-240S	1	954,975	954,975	2011/6/13	奈良先端科学技術大学院大学
オートクレーブ	トミー精工社製 ES-315	1	544,425	544,425	2011/9/6	奈良先端科学技術大学院大学
高照度人工気象器	ファームテック(株)製 FT-1500NSX	1	7,854,000	7,854,000	2011/10/11	奈良先端科学技術大学院大学
コンパ外多機能遠心機	ベックマン・コールスター 社製 Allegra X- 30R	1	934,500	934,500	2012/3/7	奈良先端科学技術大学院大学
ミキサーミル本体	(株)レッチェ製 NM400 100-240V 50/60Hz	1	831,600	831,600	2012/10/23	奈良先端科学技術大学院大学
リアルタイムPCR装置	独国防シュ・ダイアグ スティックス社製 LightCycler 96 system	1	3,670,800	3,670,800	2013/1/17	奈良先端科学技術大学院大学
DP73カメラヘッド	オリンパス(株)製 DP73-CU	1	888,300	888,300	2013/6/17	奈良先端科学技術大学院大学
専用コントローラ	オリンパス(株)製 DP- PC-S	1	576,450	576,450	2013/6/17	奈良先端科学技術大学院大学
レボコ超低温槽-86℃	米国サーモフィッシャー サイエティフィック社製 UXF40086K型	1	2,110,500	2,110,500	2013/7/3	奈良先端科学技術大学院大学
Milli-Q Reference	メルカミリア(株)製 タ ンク水位表示ケーブ ルを含む	1	903,514	903,514	2013/11/6	奈良先端科学技術大学院大学
Elix Essential UV 3	メルカミリア(株)製 ASM付タンク(30L) を含む	1	596,295	596,295	2013/11/6	奈良先端科学技術大学院大学

様式20

バイオエーカー	タイテック株製 BR-23FP・MR	1	604,800	604,800	2014/1/14	奈良先端科学技術大学院大学
微量高速冷却遠心機	株式会社精工製 MX-307	1	767,550	767,550	2014/2/21	奈良先端科学技術大学院大学
バイオクリーンベンチ	ハナソニックヘルスケア株製 MCV-B91S	1	823,200	823,200	2014/2/20	奈良先端科学技術大学院大学

5. 研究成果の概要

C₄型光合成様式をとるC₄型植物は、乾燥・高温条件下での生産性が非常に高い。本研究では、比較的最近進化を遂げたキク科フラベリア属植物を用いて、遺伝子レベルでの解析を行うことで、C₄型進化システムの解明を試みた。解析の結果、C₄型進化過程で発現量に変化する複数の遺伝子発現制御因子を同定した。また、C₄型光合成の最適化には、循環型電子伝達によるエネルギー生産が必要であることが明らかになった。本研究で得られた遺伝子情報を用いることで、C₃型作物にC₄型光合成機能を付加させる国際プロジェクトに貢献できる。この国際プロジェクトが成功すれば世界の作物生産を向上させることが期待できる。

課題番号	GS019
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	C ₄ 型作物の分子育種へ向けたC ₄ 型光合成誘導システムの解明
	Elucidation of molecular mechanism of C ₄ evolution aim at engineering C ₄ crop
研究機関・部局・職名 (下段英語表記)	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
	Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology・Assistant professor
氏名 (下段英語表記)	宗景 ゆり
	Yuri Munekage

研究成果の概要

(和文):

CO₂濃縮による高い水分・窒素利用効率を発揮するC₄型光合成を行う作物は、高温や乾燥環境下での生産性が非常に高い。本研究では、進化過程を模倣した遺伝子改変によるC₄化分子育種を目指すために、C₃型やC₄型、中間型の種が数多く存在する *Flaveria* 属の遺伝子発現プロファイル解析を行った。その結果、C₄化のキーファクター候補となる遺伝子発現制御因子を同定した。また、量的形質遺伝子座の同定を目指した連鎖解析を行い、C₄化には複数の段階的な遺伝子変異が必要であることを明らかにした。これらの遺伝子情報は、国際プロジェクトとして動いているイネのC₄化等の生産性の高い作物の分子育種法の開発に貢献できる。

(英文):

C₄ crop exhibit high nutrient and water use efficiency by CO₂ concentrating system, therefore it has high productivity under the dry and high temperature conditions compare to the C₃ crop. In this project, we analyzed gene expression profile of genus *Flaveria* containing C₃, C₄, C₃-C₄ intermediate and C₄-like species. We identified transcription factors expected to be key factors for C₄ engineering. We also performed co-segregation analysis between phenotype and genotype

of F₂ progenies of hybrids between C₃-C₄ intermediate *Flaveria* and C₄-like *Flaveria* to identify quantitative trait loci of C₄ phenotype. This study contributes for C₄ engineering of crop including international project of C₄ rice engineering.

1. 執行金額 152, 119, 969円

(うち、直接経費 117, 019, 969円、 間接経費 35, 100, 000円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

作物の生産性や環境耐性の強化は、第二の「緑の革命」を起こす技術として強く求められている。トウモロコシに代表されるように、C₄型光合成と呼ばれる特殊化した光合成様式をとるC₄型作物は、乾燥・高温・強光条件下で高い光合成能を発揮するため生産性が非常に高い。地球上のほとんどの作物は高温・乾燥耐性を持たないC₃型光合成を営むが、それらにC₄型光合成機能を付加できれば、高温、乾燥地帯や灌漑が難しい地域においても様々な作物の生産が可能となり、世界の作物生産量を飛躍的に上昇させることができる。地球上には複数の科にわたってC₄型植物が存在することから、C₃型からC₄型への進化は植物の打つ進化上、少なくとも独立に60回起きていると報告されている。また、最近の研究ではC₃型の植物ゲノムにもC₄型光合成に必要な遺伝子があり、それらが低レベルで発現していることが報告されている。これらのことから、C₄型光合成は、C₃型植物が既に持っているシステムを利用して、獲得された機構であると考えられている。

世界の研究者により、C₄型光合成代謝経路が詳しく解明され、C₃型植物にC₄型光合成機能を付加させるために、C₄型光合成代謝経路で働く酵素を発現させる試みが行われてきた。しかし、高い光合成能の獲得した植物の育種には至っていない。この原因として、C₄型光合成を構築するには、C₄型代謝酵素の発現だけでなく、細胞構造の変化、代謝酵素群の細胞特異的な発現や代謝を駆動するエネルギー生産調整が必要であったことが考えられる。C₄型への進化過程では、遺伝子や転写制御領域等のゲノム変異をきっかけとし、様々な遺伝子発現変化が追従して誘導され、複合的な形質変化をもたらせたと考えられる。

本研究では、C₃型からC₄型への進化プロセスの解明を行うことで、C₄型への進化を誘導した遺伝子またはゲノム変異を特定する。これらの遺伝子またはゲノム変異の導入により、進化過程を模倣したC₄型作物の分子育種を目指すことができる。C₄型光合成への進化プロセス解明の研究材料として*Flaveria*属(キク科)を用いる。*Flaveria*属には、C₃型やC₄型の種だけでなく、C₃型とC₄型の間接型の光合成様式をもつC₃-C₄中間種が数多く存在する。これらの種はゲノム背景が近く、段階的に起こったC₄型化への進化プロセスを解析するのに適している。そこで、(1) *Flaveria* C₃種、C₃-C₄中間種、C₄様種およびC₄種を用いた段階的なC₄型化プロセスと各種の遺伝子発現プロファイルの解析、また(2)交配可能な*Flaveria*属植物種間の量的形質遺伝子座(QTL)解析を行う。さらに、(3)特定した遺伝子の機能を明らかにするために、C₄型*Flaveria*の形質転換系を確

立し、遺伝子発現抑制株の解析を行う。これらの解析から、C₄型化に関わる遺伝子を明らかにする。

4. 研究計画・方法

(1) *Flaveria* C₃種、C₃-C₄中間種、C₄様種およびC₄種を用いた段階的なC₄型化プロセスと各種の遺伝子発現プロファイルの解析

① C₄型化への進化プロセスの解析

11種の*Flaveria*属植物のゲノムサイズをフローサイトメトリーにより解析した。C₃種、C₃-C₄中間種、C₄様種およびC₄種の*Flaveria*属植物を用いて、C₄代謝経路で働く酵素の発現量と発現領域の解析を行った。また、代謝を支えるエネルギーを生産するための電子伝達系が、代謝と共にどのように変化するか、解析を行った。

② 遺伝子発現プロファイルの解析

次世代高速シーケンス解析により、C₄型*Flaveria bidentis*の mRNA シーケンスを行い、C₄型*F. bidentis*で発現している遺伝子群の配列を同定した。これらの遺伝子配列情報を使って、C₃種、C₃-C₄中間種、C₄様種およびC₄種の*Flaveria*属植物を用いてマイクロアレイ解析を行い、C₄化に伴って発現量が変化する遺伝子群を同定した。

(2) *Flaveria*属植物種間の QTL(量的形質遺伝子座)解析

11種の*Flaveria*属植物のうちゲノムサイズの近い種間で交配を行い、第二世代が得られるかどうか調べた。この中で第二世代が得られた、C₃-C₄中間型*Flaveria floridana*とC₄様*Flaveria brownii*についてゲノム解析を行った。また、*F. floridana*と*F. brownii*の交雑第二世代の表現型と遺伝子型の解析を行った。

(3) 特定した遺伝子の機能解析

C₄型*F. bidentis*にアグロバクテリウムを介した形質転換による遺伝子導入技術を確立した。

(1)-①によりC₄型で重要な役割を果たすことが明らかになった、循環的電子伝達系で働く遺伝子の発現抑制株を作製し、この電子伝達系の機能解析を行った。

また、(1)-②により明らかになった遺伝子発現を制御する遺伝子について、解析を行った。

5. 研究成果・波及効果

(1) *Flaveria* C₃種、C₃-C₄中間種、C₄様種およびC₄種を用いた段階的なC₄型化プロセスと各種の遺伝子発現プロファイルの解析

① C₄型化への進化プロセスの解析

11種の*Flaveria*属植物のゲノムサイズを調べた結果、C₃種と比較してC₃-C₄中間種、C₄様種およびC₄種はゲノムサイズが大きく、その値は1Gbから1.5Gbに及ぶことが明らかになった。

*Flaveria*属植物ではC₃型からC₄型への進化過程において、C₄代謝経路で働く酵素は mRNA

レベルで段階的に発現量が上昇することが、明らかになった。また、発現領域の解析により、C₃-C₄ 中間種およびC₄ 様種では、C₄ 代謝酵素が発現しているものの、その酵素が細胞特異的に局在していないために、C₄ 回路がうまく機能していないことが予想された。これらの結果は現在投稿準備中である。

代謝を支えるエネルギーを生産するための電子伝達系を解析した結果、C₄ 型化の後期において、循環型電子伝達活性が大きく上昇することを見出した。この活性上昇過程には、葉緑体 NADPH デヒドロゲナーゼ複合体の量の 10 倍以上への上昇、また GRADIENT REGULATION (PGR)5 と PGR5-LIKE1(PGRL1)の 3 倍への上昇と、さらに維管束鞘細胞の葉緑体チラコイド膜構造のダイナミックな変化が関与することを明らかにした。この研究論文は国際誌 *New phytologist* に掲載が受理された。

②遺伝子発現プロファイルの解析

C₄ 型 *F. bidentis* の mRNA シーケンスによりC₄ 型 *F. bidentis* の葉で発現している約 2 万個の遺伝子群の配列を同定した。これらの遺伝子配列情報を使ったマイクロアレイ解析を行い、C₄ 化に伴って発現量が変化する遺伝子群の同定に成功した。これによりC₄ 化に伴って発現量が増加する遺伝子発現を制御する転写因子が明らかになった。また、次世代高速シーケンス解析によりC₃ 型 *Flaveria robusta* およびC₄ 型 *F. bidentis* のドラフトゲノムシーケンスを得ており、ゲノムレベルでの比較が可能となった。ドイツのハインリッヒハイネ大学の Westhoff 教授との共同研究により、遺伝子情報の公開に向けて、この 2 種の遺伝子情報基盤を整備中である。

(2) *Flaveria* 属植物種間の QTL(量的形質遺伝子座)解析

C₃-C₄ 中間型 *F. floridana* とC₄ 様 *F. brownii* で交雑第二世代が獲得でき、これらを用いた QTL 解析が可能であることが明らかになった。*F. floridana* と *F. brownii* について次世代シーケンス解析によりドラフトゲノム配列を獲得した。*F. floridana* のドラフトゲノム配列は、新学術領域研究ゲノム支援により、ゲノムリードのアセンブルを行い、取得することができた。これらのゲノム配列をもとに、2 種の遺伝子型を見分けるための分子マーカーを作成した。QTL 解析は形質の安定した F₄ 集団を用いる予定であったが、交雑第二世代集団の後代の F₃ 種子はすべて発芽しなかったため、すべて F₂ 集団を使って一代の植物で表現型と遺伝子型の連鎖解析を行った。C₃-C₄ 中間型 *F. floridana* と比較してC₄ 様 *F. brownii* で発現量の高い遺伝子について、遺伝子型解析を行ったところ、これらのC₄ 型代謝に関わる遺伝子では発現量と遺伝子型が一致しないことが明らかになった。この結果から、遺伝子発現量は、自身のプロモーター配列ではなくトランス因子の変化によって制御されることが明らかになった。また、交雑第二世代の表現型の分離解析の結果、C₃-C₄ 中間型からC₄ 様型への進化過程において複数の遺伝子変異が必要であることを明らかにした。これらの結果は、C₄ 代謝経路の獲得に複雑な変異が必要であることを示しており、国際プロジェクトにおいて進められているイネのC₄ 化の手法を再考案すべきであることを示唆している。

(3) 特定した遺伝子の機能解析

C₄型 *Flaveria bidentis* の形質転換効率は、国内外の研究機関において、これまで 0.5%未満であったが、本研究において手法の改良により 7%まで上昇させることに成功した。本手法によって、効率のいい遺伝子導入が期待できる。

(1)-①により明らかになったC₄型での循環型電子伝達の機能を評価するために循環型電子伝達に関わる遺伝子(PGR5 又は PGRL1)の発現抑制体を作製し、解析した。その結果、強光下のC₄型光合成において、PGR5/PGRL1 が関与する循環型電子伝達による ATP 生産が必要であることが明らかになった。これらの結果は現在投稿準備中である。

(1)-②により明らかになった、C₄化に伴って発現量が増加する転写因子の解析をC₄型 *F. bidentis* への遺伝子導入により行った。プロモーター・レポーター遺伝子の遺伝子導入により、この転写因子の発現領域を明らかにした。また現在、遺伝子発現抑制体の表現型解析を行っている。これらの解析結果により、この転写因子がC₄化のキーファクターの一つであるかどうかを明らかにできる。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 1 件</p>	<p>Naoya Nakamura, Megumi Iwano, Michel Havaux, Akiho Yokota and Yuri Nakajima Munekage. Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type C_4 photosynthesis in the genus <i>Flaveria</i>. <i>New phytologist</i>. 2013. 199, 832-842 (掲載済み一査読有り) 計 1 件 (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 11 件</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 中村有哉、宗景(中島)ゆり、岩野恵、横田明穂、Enhancement of cyclic electron flow around PS1 during evolution from C_3 to C_4 photosynthesis in <i>Flaveria</i> species、Les Diablerets Conference Center, Switzerland、2011.5.29-6.3、Godon Research Conferences: CO₂ Assimilation in Plants:Genome to Biome 2. 中村有哉、宗景(中島)ゆり、岩野恵、横田明穂、<i>Flaveria</i> 属の C_4 光合成進化過程における光化学系 I 循環型電子伝達系の発達プロセスの解明、京都産業大学、2012.3.16-3.18、第 53 回日本植物生理学会年会 3. 宗景(中島)ゆり、Enhancement of cyclic electron flow around PSI during evolution from C_3 to C_4 photosynthesis in genus <i>Flaveria</i>、Heinrich-Heine-Universitaet, Germany 2011.5.27 特別セミナー 4. 宗景(中島)ゆり、吉村純、岸崎理紗、横田明穂、<i>Flaveria</i> C_3-C_4 中間種と <i>Flaveria</i> C_4 様種の交雑 F_2 個体における PEPC 発現量と PEPC 遺伝子型の分離解析、岡山大学、2013.3.21-23、第 54 回日本植物生理学会年会 5. 谷口(山本)幸美、岸崎理紗、横田明穂、宗景(中島)ゆり、<i>Flaveria</i> 属 C_3 種、C_3-C_4 中間種、C_4 様種、C_4 種におけるトランスクリプトーム解析、岡山大学、2013.3.21-23、第 54 回日本植物生理学会年会 6. Yuri Nakajima Munekage, Jun Yoshimura, Shio Inoue, Risa Kishizaki, Akiho Yokota, Analysis of F_2 progenies of hybrids between C_3-C_4 intermediate <i>Flaveria floridana</i> and C_4-like <i>Flaveria brownii</i> University of Illinois, 2013.8.6-9, The 2013 International Symposium on C_4 and CAM Plant Biology.および St. Louis, USA 2013.8.11-16, The 16th International Congress on Photosynthesis. 7. Yukimi Y. Taniguchi, Risa Kishizaki, Akiho Yokota, Yuri Nakajima Munekage, Transcriptome analysis of C_3, C_4, C_3-C_4 intermediate and C_4-like species of the genus <i>Flaveria</i> University of Illinois, USA, 2013.8.6-9, The 2013 International Symposium on C_4 and CAM Plant Biology 8. Naoya Nakamura, Megumi Iwano, Michel Havaux, Akiho Yokota, Yuri Nakajima Munekage, Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme type C_4 photosynthesis in the genus <i>Flaveria</i>. University of Illinois, 2013.8.6-9, The 2013 International Symposium on C_4 and CAM Plant Biology.および St. Louis, USA 2013.8.11-16, The 16th International Congress on Photosynthesis. 9. <u>C_4 光合成研究の現状と将来を議論するための国際シンポジウムを企画開催した</u> Yuri Nakajima Munekage, Naoya Nakamura, Akiho Yokota, Promotion of cyclic electron transport during the evolution of C_4 photosynthesis, Future research of C_4 plant biology, 富山大学、2014.3.18-20、第 55 回日本植物生理学会年会, PCP sponsored symposium 10. Yukimi Y. Taniguchi, Risa Kishizaki, Akiho Yokota, Yuri Nakajima Munekage, Pattern formation in C_4 species of the genus <i>Flaveria</i> leaf development. 富山大学、2014.3.18-20、第 55 回日本植物生理学会年会 11. Naoya Nakamura, Kaoru Morikawa, Akiho Yokota, Yuri Nakajima Munekage PGR5/PGL1-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the CO₂ assimilation on C_4 photosynthesis in <i>Flaveria bidentis</i>. 富山大学、2014.3.18-20、第 55 回日

	<p>本植物生理学会年会</p> <p>専門家向け 計11件 一般向け 計0件</p>
<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得 状況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>C₄型作物の分子育種へ向けたC₄型光合成誘導システムの解明(宗景) (独)日本学術振興会 最先端・次世代研究開発支援プログラム(平成22年度～平成25年度) http://bsw3.naist.jp/yokota/images/saisentan_jisedai.pdf</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> <p>高校生を対象とした特別授業</p> <p>題:「植物好きの研究者より理系を目指す卵たちへ」</p> <p>実施日:2011年12月26日</p> <p>場所:学校法人奈良育英学園育英西中学高等学校</p> <p>対象者:立命館コース高校2年生 人数:36名</p> <p>内容:最先端・次世代研究開発支援プログラムの研究内容を中心に植物科学の研究について紹介し、体験談を通して理系を目指す高校生が進路選択やキャリア形成を考えるための授業を行った。</p> <p>オープンキャンパス高山サイエンスフェスティバルでの展示パネルおよびブースによる研究紹介</p> <p>題:CO₂を濃縮する植物たち</p> <p>実施日:2012年11月10日</p> <p>場所:奈良先端科学技術大学院大学</p> <p>対象者:一般、大学生、高校生、中学生、小学生</p> <p>人数:30名程度</p> <p>内容:展示パネルにおいて、研究紹介を行い、ブースを使って植物に触れる体験型の展示を行った。</p> <p>「女子中高生のための関西科学塾」での講演</p> <p>題:「乾燥や高温環境に順化したC₄型植物」</p> <p>実施日:2012年11月10日</p> <p>場所:奈良先端科学技術大学院大学</p> <p>対象者:高校生、中学生、保護者、引率教員</p> <p>人数:20名程度</p> <p>内容:地球温暖化の危機とそれに対する植物科学の知識を用いた取り組み</p>

様式21

	<p>4. オープンキャンパス高山サイエンスフェスティバルでの展示パネルおよびブースによる研究紹介</p> <p>題:進化してCO₂を濃縮できるようになったC₄型植物たち</p> <p>実施日:2013年11月10日</p> <p>場所:奈良先端科学技術大学院大学</p> <p>対象者:一般、大学生、高校生、中学生、小学生</p> <p>人数:30名程度</p> <p>内容:展示パネルにおいて、研究紹介を行い、ブースを使って光合成活性を体験できる展示を行った。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計0件</p>	
<p>その他</p>	

7. その他特記事項

特になし