

二国間交流事業 共同研究報告書

平成23年4月2日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 広島大学・大学院理学研究科

職・氏名 ^(ふりがな) 准教授・^(ふるもと つよし) 古本 強

1. 事業名 相手国（オーストラリア）との共同研究 振興会対応機関（ARC）

2. 研究課題名 C4光合成新規因子の生理機能を逆遺伝子学的に評価する

3. 全採用期間

平成21年4月1日～平成23年3月31日（2年 ヶ月）

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5,000千円

初年度経費2,500千円、 2年度経費2,500千円、 3年度経費 0千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 0千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
ふるもと つよし 古本 強	広島大学・大学院理学研究科・准教授	C4 光合成新規因子の生理機能を逆遺伝子学的に評価する（研究全般）
おがわたけと 小川 岳人	広島大学・大学院理学研究科・博士課程後期3年	C4 光合成新規因子の生理機能を逆遺伝子学的に評価する（プラスミド構築）
しゅうあやこ 珠光 綾子	広島大学・大学院理学研究科・博士課程後期2年	C4 光合成新規因子の生理機能を逆遺伝子学的に評価する（植物育成・管理・成長調査）

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 Australian National University・Professor・Susanne von Caemmerer

(3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
○ Susanne von Caemmerer	Australian National University・Research School of Biological Science	Production of transgenic Flaveria plants for the research of BASS2 function.

6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

我々は C4 植物という分化した光合成代謝経路の研究から、新規な代謝構成因子および代謝調節機構を見出すこと、そしてその生化学的意義や生理的意義を検討することを目的に研究を行ってきた。申請以前の段階で、フラベリア属の C3 種と C4 種間での異種生物間におけるトランスクリプトーム解析を行い、着目すべき 2 つの遺伝子を単離していた。一つは CP12 類似タンパク質遺伝子 (*CP12L*) で、もうひとつは BASS2 と名づけた葉緑体局在を示す新規輸送体タンパク質遺伝子 (*FtBASS2*) である。新規遺伝子 *CP12L* のコードするタンパク質は、その一次配列から、近年論じられているカルビン回路代謝酵素間の複合体形成の鍵因子と推定された。*CP12L* を介して PRK と GAPDH が *in vitro* において NADP 依存的に結合するという新規知見を得ている。このように C4 光合成植物に特有の光量変化にすばやく応答する環境調律機構の一端を担うと推定される *CP12L* 因子の単離に成功し、また代謝上未知であったピルビン酸輸送体候補の単離に成功していた。

本事業では、こうした分子生物学的解析に引き続いて、生化学的証明および生理重要性を検討することを目的とした。生化学的証明は日本で行い、生理学的解析にはフラベリア属の C4 種の一つ *F. bidentis* において確立されている形質転換技術を用い、機能抑制植物を作出することでアプローチすることにした。この技術は世界でただ一人オーストラリア国立大学の Sussann von Caemmerer 博士によって管理・維持されている。この手法を用いれば、逆遺伝学的解析から、ピルビン酸輸送体機能や *CP12L* 複合体形成機能の C4 光合成における生理的重要性を示すことが可能となる。そこで、当研究では、オーストラリア国立大学の Sussann von Caemmerer 博士と共同で、RNAi 法にもとづいて（1）ピルビン酸輸送体機能破壊株および（2）*CP12L* 機能破壊株を作出することとした。作出できた形質転換植物は、これらの植物の光環境応答性がどのように欠如するのか光合成活性測定を通して検討するための材料とし、上記 2 因子の C4 光合成へ生理・生態学的意義を明らかにする実験の基礎材料となる。

生化学的解析には大腸菌組換え体を用い、放射標識ピルビン酸の取り込み活性の上昇を確認した。

また、日本において、上記遺伝子の形質転換用のプラスミドの構築を行い、pHellsgate 系のプラスミド中に RNAi コンストラクトとして組込んだプラスミドを用意した。これらをもって、オーストラリア国立大学に赴き、そこでアグロバクテリアへの形質転換とフラベリア胚軸への共培養・カルス化操作を行った。現在、カナマイシン耐性を示す再生シュートの生育を確認している段階にある。それぞれのプラスミドコンストラクトについて、耐性シュートが複数得られているので、形質転換には成功したと考えられる。今後は、これらの植物における *CP12L* と BASS2 レベルの発現レベルを抗原抗体法によって確認し、発現抑制株の選抜を行う予定である。これらは、引き続いての光合成活性測定の対象植物となり、各種光合成生理活性への異常を調査することになる。

当初の目的の最低限の目的である、生化学的証明を終え、そして形質転換の実施と形質転換植物の作出に成功した。これにより、今後これら二つの因子の C4 光合成への寄与度を検討するための基礎は確立できた。なお、BASS2 の機能解析をシロイヌナズナの遺伝子破壊株を用いて行っている別の解析から、C3 植物においてはプラスチドで機能するイソプレノイド代謝に寄与するという新事実が判明した。この知見を発展させ、シロイヌナズナと同様に冬期栽培性を示すコムギへの応用性を検討することもできた。