

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	C <sub>4</sub> 型作物の分子育種へ向けたC <sub>4</sub> 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

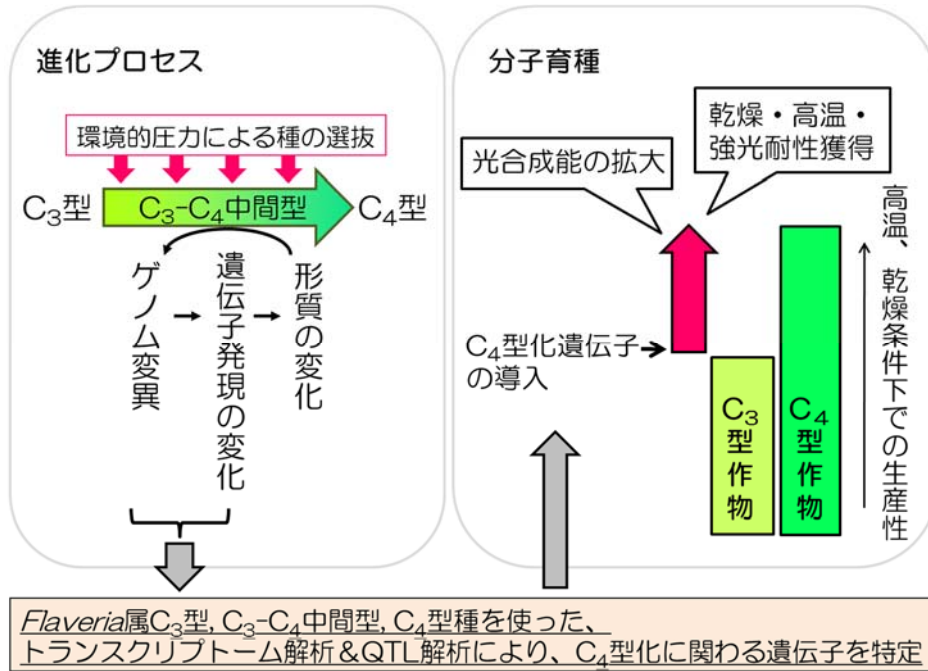
## 【研究目的】

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、C<sub>4</sub>型光合成と呼ばれる特殊化した光合成様式をとるC<sub>4</sub>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C<sub>3</sub>型光合成を営むが、それらにC<sub>4</sub>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C<sub>4</sub>型植物が存在することから、C<sub>3</sub>型からC<sub>4</sub>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C<sub>3</sub>型の植物ゲノムにもC<sub>4</sub>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、C<sub>4</sub>型光合成は、C<sub>3</sub>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、C<sub>4</sub>型光合成代謝経路が詳しく解明され、C<sub>3</sub>型植物にC<sub>4</sub>型光合成機能を付加させるために、C<sub>4</sub>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、高い光合成能を獲得した植物の育種には至っていない。この原因として、C<sub>4</sub>型光合成を構築するには、C<sub>4</sub>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。C<sub>4</sub>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、C<sub>3</sub>型からC<sub>4</sub>型への進化プロセスの解明を行うことで、C<sub>4</sub>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C<sub>4</sub>型作物の分子育種を目指すことができる。C<sub>4</sub>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、C<sub>3</sub>型やC<sub>4</sub>型の種だけでなく、C<sub>3</sub>型

とC<sub>4</sub>型の間接型の光合成様式をもつC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>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C<sub>4</sub>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* C<sub>3</sub>種、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種、C<sub>4</sub>様種およびC<sub>4</sub>種を用いて段階的なC<sub>4</sub>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、C<sub>4</sub>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、C<sub>4</sub>型化に関わる遺伝子を明らかにする。

【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】	
① 総合所見	
トウモロコシのようなC <sub>4</sub> 型光合成作物は、C <sub>3</sub> 型光合成植物に比べて乾燥・高温・強光条件下で高い光合成能を発揮し、生産性が非常に高い。イネ・コムギやその他の重要作物はC <sub>3</sub> 型光合成をしめす植物種が多い。これらの作物にC <sub>4</sub> 型光合成機能を付与できれば、その社会的・経済的効果は極めて大きいことは広く認識され、高い光合成能を持つC <sub>4</sub> 型の形質をC <sub>3</sub> 型に付加させようと試みは、これまでも行われてきた。その多くはC <sub>3</sub> 型植物に主要なC <sub>4</sub> 型光合成炭素代謝酵素を高発現させてC <sub>4</sub> 化試みたものであるが、未だに、高い光合成能を持つ植物の育種には至っていない。	

C<sub>4</sub>型光合成の獲得には、複合的な植物機能の付与が必要となり、多くのハードルを越えなければならない。本研究課題は、C<sub>4</sub>型代謝経路の人工的付加というこれまでの概念と異なり、C<sub>4</sub>進化プロセスを解明し、これを模倣しようという挑戦的な研究課題である。

研究目的に掲げた3つの達成目標を掲げて研究を展開し、(1)段階的なC<sub>4</sub>型化プロセスと各種の遺伝子発現プロファイルの解析については、C<sub>4</sub>化に伴って発現上昇する遺伝子群の同定など、一定の成果を得た。(2)のQTL解析においては、C<sub>4</sub>様型に必要なQTLは3ヵ所以上であること、C<sub>4</sub>代謝酵素の発現領域と発現量は異なるトランス因子によって決定されることなどの知見を得たものの、QTLの同定には至っていない。(3)のC<sub>4</sub>型化にかかわる遺伝子を明らかにする課題では、循環的電子伝達で働く、PGR5 または PGRL1 の遺伝子発現抑制体を作製し、C<sub>4</sub>型光合成において強光下でのエネルギー生産に PGR5/PGRL1依存の循環的電子伝達活性が重要であることが明らかにするなど、一部の遺伝子の機能を明らかにしている。C<sub>4</sub>化のキーファクターの可能性が期待される転写因子 SCR については、発現抑制株が作成され、T<sub>0</sub>世代の解析が終わっているが、詳細は後代を得た解析をまたなければならない状況にある。

現段階では、達成目標の一部についての成果しか得られておらず、成果として公表された論文は1件にとどまり、投稿準備中のものが3件という状況にある。本研究課題はイネやシロイヌナズナといったモデル植物ではなく、ゲノム情報も完備していない植物材料を用いた挑戦であることなどから、やむを得ない一面もある。また、本研究で得られつつある成果は、C<sub>3</sub>型植物のC<sub>4</sub>型化という大きな課題における新たな切り口を拓く可能性もある。これまでに得られた成果、また、現在進行中で、これから得られる成果は、挑戦的萌芽研究「量的遺伝子座(QTL)解析によるC<sub>4</sub>化ゲノム変異の同定」に引き継がれることになっているとこのことであり、今後のこの領域の研究の発展に少なからず寄与するものと期待される。

## ② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

(1) *Flaveria* C<sub>3</sub>種、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種、C<sub>4</sub>様種およびC<sub>4</sub>種を用いた段階的なC<sub>4</sub>型化プロセスと各種の遺伝子発現プロファイルの解析

当初の研究計画どおり、まず次世代高速シーケンス解析により、C<sub>4</sub>型*Flaveria bidentis*のmRNAシーケンスを行い、C<sub>4</sub>型*F. bidentis*で発現している約2万個の遺伝子群の配列を同定した。また、C<sub>4</sub>化に伴って発現量が変化する遺伝子群を同定するとともに、C<sub>4</sub>代謝に関連する遺伝子発現の細胞局在性等を明らかにした。さらに、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、本課題担当者らが得たC<sub>3</sub>型*Flaveria robusta*およびC<sub>4</sub>型*F. bidentis*のドラフトゲノム配列をベースに、mRNA配列情報をマップし*Flaveria*

情報基盤を整備し、現在公開に向けて準備を進めており、おおむね目標を達成した。

#### (2) 交配可能な *Flaveria* 属植物種間の QTL(量的形質遺伝子座)解析

中間型 *Flaveria floridana* と C<sub>4</sub> 様型 *Flaveria brownii* の交配を行い、F<sub>1</sub> 植物の作成し、さらに次世代 F<sub>2</sub> 集団を獲得に成功した。しかし、40 個体の F<sub>2</sub> 集団の後代の F<sub>3</sub> 種子はすべて発芽しなかった(親株自身がおもつ自家不和合性に起因すると考えられた)ため、F<sub>2</sub> 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い、C<sub>4</sub> 様型に必要な QTL は3カ所以上であること、C<sub>4</sub> 代謝酵素の発現領域と発現量は異なるトランス因子によって決定されることなどの新知見を得たが、QTL の同定には至らず、目標の達成には至っていない。

#### (3) 遺伝子の機能解析のための C<sub>4</sub> 型 *Flaveria* の形質転換体の作出

C<sub>4</sub> 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。この形質転換法を使って、循環的電子伝達で働く、PGR5 または PGRL1 の遺伝子発現抑制体を作成し、その解析を行った。また、C<sub>4</sub> 型 *F. bidentis* における SCR プロモーター・レポーター導入株、SCR 発現抑制株の作成し、T<sub>0</sub> 世代の SCR 発現抑制株において光合成活性の低下が観察されたが、今後 T<sub>1</sub> 世代において同様の結果が得られるか確認する必要がある。よって、おおむね目標を達成した。

目標を達成できなかった課題については、対応策が示されている。今後、研究を継続することにより、成果が得られることを期待したい。

### ③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が  
(  ある ・  ない )

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が  
(  創出された ・  創出されなかった )

・当初の目的の他に得られた成果が (  ある ・  ない )

(1) *Flaveria* C<sub>3</sub>種、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種、C<sub>4</sub>様種およびC<sub>4</sub>種を用いて段階的なC<sub>4</sub>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 C<sub>4</sub>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、500Mb から 1.6Gb に及ぶことが明らかになった。

また、段階的なC<sub>4</sub>型化プロセスの解析を行い、C<sub>4</sub>代謝に関連する遺伝子発現の細胞局在性は、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型から C<sub>4</sub> 様型への進化過程で獲得されることが明らかになった。この結果は現在投稿準備中である。また、8種の *Flaveria* 属植物を用いて葉緑体電子伝達系を解析した結果、C<sub>4</sub>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および GRADIENT REGULATION (PGR)5、PGR5-LIKE1(PGRL1)の発現上昇と、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

C<sub>4</sub>型 *F. bidentis* の mRNA シーケンスにより C<sub>4</sub>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、C<sub>4</sub>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。このうち転写因子をコードする SCARECROW (SCR) の発現が大きく上昇することを見出した。転写因子は複数の遺伝子発現を制御するため、C<sub>4</sub>化において重要な遺伝子である可能性が考えられる。

また、次世代高速シーケンス解析によって獲得した C<sub>3</sub> 型 *F. robusta* および C<sub>4</sub> 型 *F. bidentis* のドラフトゲノム配列をベースに、mRNA 配列情報をマップし *Flaveria* 情報基盤を整備した。現在公開に向けて準備を進めている。

## (2) *Flaveria* 属植物種間の QTL(量的形質遺伝子座)解析

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型 *F. floridana* と C<sub>4</sub>様 *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。これらのゲノム配列をもとに、F<sub>2</sub> 集団を用いた一代の植物での表現型と遺伝子型の連鎖解析を行った (F<sub>3</sub> 種子はすべて発芽しなかったため)。C<sub>4</sub>型代謝に関わる遺伝子は、発現量とそれをコードする遺伝子の型が一致しないことから、C<sub>4</sub>型代謝酵素の発現量は、それらをコードする遺伝子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、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型から C<sub>4</sub>様型への進化過程において3つ以上の遺伝子変異が必要であることを明らかにした。さらに発現領域を決定する因子は発現量を決定する因子とは異なることが明らかとなった。現在これらの結果は現在投稿準備中である。

一方、QTL の同定には至らなかった。

## (3) 特定した遺伝子の機能解析

### ① C<sub>4</sub>型光合成における循環型電子伝達の機能評価

循環型電子伝達関わる PGR5 又は PGRL1 をコードする遺伝子の発現抑制体を作製し表現型解を行った。その結果、C<sub>4</sub>型光合成において、強光下では 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。

### ② C<sub>4</sub>型光合成における SCR の機能解析

C<sub>4</sub>化に伴って SCR の発現量は成熟葉において著しく上昇していた。ゲノムデータベースより SCR は、*Flaveria* 属植物において2種 (*SCR1*, *SCR2*) 存在することが明らかになった。シロイヌナズナ *scr* 変異株へ *F. bidentis* 由来の *FbSCR1* または *FbSCR2* を導入した結果、どちらも *scr* 変異株の表現型を相補することから、*FbSCR1*、*FbSCR2* はシロイヌナズナ SCR と同様の機能を持つことが示された。C<sub>4</sub>型 *F. bidentis* への *FbSCR1* または *FbSCR2* プロモーター-レポーター遺伝子導入により、*FbSCR1*、*FbSCR2* はどちらも維管束鞘細胞で発現することが明らかになった。現在次世代の T<sub>1</sub> 世代での解析をおこなっており、これらの解析結果に

より、この転写因子が C<sub>4</sub>化に関わるかどうかを明らかにできる。

#### 新規性・優位性

本研究ではマイクロアレイ解析により、C<sub>4</sub>化に伴って発現量が顕著に上昇する転写因子の一つとして SCARECROW (SCR) を同定した。これまで国内外の研究で C<sub>4</sub>型の進化プロセスに着目し、C<sub>4</sub>化に関わる転写因子を解析した例は無く、新規性が高い。

ブレイクと呼べる成果は現時点では得られていない。

発現抑制株を用いた SCR の詳細な機能解析により、SCR が C<sub>4</sub>型光合成においてどのような役割を果たすのか、また C<sub>4</sub>化のどのステップで働くのか明らかにすることができると期待される。SCR が C<sub>4</sub>型進化へのカギ遺伝子であることが明らかにされれば、ブレイクスルーと言える成果であると言えよう。

#### ④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

高い光合成能を持つ C<sub>4</sub>型の形質を C<sub>3</sub>型に付加させようと試みは、これまでも行われてきたが、その多くは C<sub>3</sub>型植物に主要な C<sub>4</sub>型光合成炭素代謝酵素を高発現させることで、C<sub>4</sub>化を狙ったものであり、この方法では逆に代謝の攪乱を招き、高い光合成能を持つ植物の育種には至っていない。現在、国際イネ研究所では国際コンソーシアムを形成し、世界の C<sub>4</sub>型光合成研究者が参画して、C<sub>3</sub>型のイネを C<sub>4</sub>化させる「C<sub>4</sub> rice プロジェクト」が進められている。しかしながら、このプロジェクト内でも導入遺伝子のプロモーターの改良等に取り組まれているものの C<sub>4</sub>型代謝経路の人工的付加という概念から脱却しておらず、C<sub>4</sub>化分子育種への道筋が見えていない。

本研究課題担当者らは、世界に先駆けて、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間種と C<sub>4</sub>様種という種を越えた他種間での QTL 解析を試みた。交雑第二世代の表現型の分離解析の結果、C<sub>4</sub>代謝酵素の発現量や発現領域を決定する QTL がそれぞれ異なり、C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型から C<sub>4</sub>様型への進化過程において劣性変異であれば3つ、優性変異であればそれ以上の遺伝子変異が必要であることが示された。C<sub>4</sub>化において C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型から C<sub>4</sub>様型への過程では、機能的な C<sub>4</sub>代謝経路が獲得される過程であるが、これらの結果は当初の予想を超え、C<sub>4</sub>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いる。本研究で得られた結果は、世界の C<sub>4</sub>型光合成研究者が参画する「C<sub>4</sub> rice」国際プロジェクトにおいて進められている、イネの C<sub>4</sub>化の手法を再考案すべきであることを示している。キク科 *Flaveria* 属での知見は、他の植物システムでの研究に大いに参考になり、この分野の進展に大いに貢献するものと思われる。

一方、C<sub>3</sub>型植物への C<sub>4</sub>型光合成能の付与に至る道筋は依然として見えてこない状況であり、社会的・経済的波及効果について評する段階にはない。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (■行われた ・ □行われなかった)

本研究課題では、C<sub>4</sub>型光合成への進化プロセス解明の研究材料として、C<sub>3</sub>型やC<sub>4</sub>型の種だけでなく、C<sub>3</sub>型とC<sub>4</sub>型の間中型の光合成様式をもつ C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中間種が数多く存在する *Flaveria* 属 (キク科) をもちいている。これらの種はゲノム背景が近く、段階的に起こった C<sub>4</sub>型化への進化プロセスを解析するのに適していることによる。ゲノム情報の整備されたモデル植物ではないことから、当初から困難に遭遇することは想定されていたと言える。課題担当者は、困難な課題や指摘事項に適切に対応している。また、状況に応じて研究体制を整えるとともに、外部機関への委託分析に切り替えるなど、マネジメントは適切に行われている。

助成金の活用も適切に行われている。

成果の公表については、下記のとおりであり、いずれの項目においても低調であると言わざるを得ない。

雑誌論文：合計 1件 (査読あり) (他に投稿準備中 3件)

会議発表：合計 11件 (内、国際シンポジウム 1件、いずれも専門家向け)

知的財産権出願：0件

国民との科学技術対話：合計 4件

また、ホームページでの研究紹介を行っている。