

**「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」**  
**研究領域 領域活動・評価報告書**  
 ー平成 26 年度終了研究課題ー

研究総括 磯貝 彰

1. 研究領域の概要

本研究領域では、植物の光合成能力の増強を図るとともに、光合成産物としての各種のバイオマスを活用することによって、二酸化炭素を資源として利活用するための基盤技術の創出を目的とします。

具体的には、植物の物質生産能力の基本である光合成の制御機構を光合成産物の代謝や転流、及び窒素同化などとの相互作用も含めて統合的に理解し、それに基づいて光合成能力を向上させる基盤技術についての研究を推進します。また、植物の多様な環境への適応機構の解明に基づいた光合成能力向上や炭素貯留能向上、及び有用バイオマス産生のための基盤技術の創出を目指します。さらには、植物の物質生産能力を最大限に活用するためのバイオマス生成・分解機構の理解とその活用技術の研究を推進します。これらの研究を推進するにあたり、二酸化炭素を資源化する革新的技術の開発までを見据えた、植物科学研究とバイオマス利活用研究の連携や融合にも取り組みます。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：9 件(内、大挑戦型 0 件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「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」領域に設けた選考委員 20 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>)の他、以下の点を重視した。
  - ①光合成・環境適応・バイオマス活用といった切り口から、二酸化炭素排出抑制等の社会的課題を植物の力で解決しようとする意欲的な研究提案
  - ②二酸化炭素の資源化とその有用資源としての活用という本研究領域の目的を実現するために、どのようなブレークスルーが必要で、そのブレークスルーをどのように実現するかについて、理論的な説明がなされた提案

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者 20 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数		
			11件	内 訳	3年型
対象数	121件	25件			

( )内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1)平成 23 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
  - ・上田貴志 研究者、内藤 健 研究者
 研究期間が 5 年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果:  
[http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/midterm\\_h26hyouka.html](http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/midterm_h26hyouka.html))

## 5. 研究実施期間

平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月(3年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議:7回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:研究開始時に、研究総括と技術参事、事務参事が研究現場 11 カ所を訪問し、研究状況の把握と研究環境、設備等の確認、並びに研究者の上司への協力依頼を行うとともに、研究者と今後の進め方について議論を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 26 年 12 月 評価会開催

平成 27 年 3 月 研究総括による事後評価

平成 27 年 3 月 被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

(1)研究課題等の研究目的の達成状況

(2)研究実施体制及び研究費執行状況

(3)研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

※該当する成果がある場合には「世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

## 9. 評価結果

本研究領域は、二酸化炭素資源化に向けて、植物葉緑体による二酸化炭素の固定から植物バイオマスの活用という流れの中で、それぞれの場に焦点をあてた広範囲に亘る研究課題を含んでいる。その中で研究者はそれぞれの研究環境にふさわしい研究体制を構築し、また、研究費を有効に活用して、研究を発展させるために最大限の努力をしてきた。植物を対象とした研究としては、3年間という期間は、成果を見定めるには決して十分な長さとはいえない。本研究で得られた成果も、その意味では、まだ途中段階のものが多いことは事実である。しかし、本年度終了する9課題の多くは、将来の二酸化炭素資源化に向けた技術開発の基盤作りに貢献し得るものであった。その中でも、小林、中道、小田3氏の研究は、特に優れたものとして評価される。それは、研究目標を達成し、基礎研究として新しい知見を数多く得たばかりでなく、将来の二酸化炭素固定・活用への基盤技術に大きく貢献しうる新たな手法を明確に示し得たことによる。それらの詳細については個別の評価の項目に述べることとする。また、本研究領域では、この領域の将来の主導的研究者の育成とそのネットワークの形成をも目指した。その意味では、新たな上級のポストの獲得、学会賞の受賞などが数多く見られ、また、それぞれの研究者が、この研究領域の活動の中で成長してきたなど、多くの成果を得ることができた。

### 1. 岩井 優和 研究者「ライブセルイメージングによる光環境適応機構の実態解明」

植物における二酸化炭素資源化の根源である光合成について、その状況をライブセルイメージングという手法で可視化する方法の確立を目標として研究が進められた。この研究課題では、モデル植物としてヒメツリガネゴケの生きた葉緑体のチラコイド膜のイメージング技術確立し、多くの新知見を得て、優れた論文を数多く発表してきており、この分野の国際的な研究者として認知されている。このように、科学技術上の優れた研究成果、また、研究者としての発展という観点からも、十分にさがけ研究の目的を達成したと判断する。

今後は、本技術を、ルビスコなどの光合成にかかわるタンパク質のイメージング技術や、光環境に対する応答を解析する技術の開発などにつなげ、また、高等植物にこの技術を活用できるよう、研究を発展させて欲しい。それらは今後の光合成反応の分子機構の研究に大きく貢献することとなる。

## 2. 小田 祥久 研究者「細胞内自己組織化制御と生体ナノマシンの開発による新規木質バイオマス素材の創出」

木質細胞壁の壁孔形成などを自在に行いうる技術を開発し、新規木質バイオマス素材を作成することを目的として研究が進められた。その結果、セルロース合成に係わる新たな因子を解明し、それを活用して培養細胞レベルでは、かなり自在に密度やサイズ、形態を変えた壁孔を作ることに成功している。その研究は学術的にきわめて高く評価される。現在、樹木での実験を実施中であり、モデル系だけでなく、実用植物でも、それが可能となれば、将来、目的に応じた樹木の育成に有用な技術につながる可能性を持つ研究として評価される。

現時点ではまだ基礎研究のレベルではあるが、これを一つの契機として、二次細胞壁のパターンと木質成分との関係についてさらに研究を進展させ、木質バイオマスの改変の技術開発につなげて欲しい。

## 3. 笠原 博幸 研究者「オーキシシンによる植物の器官形成制御技術の開発」

これまでに知られていた主要なオーキシシン(インドール酢酸)とは別の、極性輸送されないタイプのオーキシシン(フェニル酢酸)について、その生合成や生理機能を明らかにし、これらの生合成遺伝子の導入により、不良環境耐性、特にオオムギの高温不稔現象を回避する機能を付与しようと研究が進められた。これまでに、フェニル酢酸の生合成系を明らかにするなど、基礎的な研究は進展し、研究者としての高い評価を得、今後のフェニル酢酸の植物ホルモンとしての研究を進展させる駆動力になったといえる。現時点では、フェニル酢酸とインドール酢酸の生合成系の共通性も影響して、両ホルモンの植物における使い分けの機構や、フェニル酢酸の独自の生理機能を明確に示すことはできず、形質転換系の確立の遅れから、形質転換植物が得られたもののオオムギへの高温耐性の付与についての明確な結論も未だ得られていない。目標が明確で期待が大きい研究ではあったので、今後も本研究を継続して目標を達成して欲しい。

これまでに新オーキシシン活用の基盤的な知見は得ているので、今後、研究を継続する中で、新オーキシシン活用による植物の生長制御技術を開発することが期待される。特に、現在進行中のオオムギの形質転換実験の成果は注目に値する。

## 4. 小林 高範 研究者「植物の鉄センシング機構解明による生産力の強化」

鉄イオンを吸収しにくい塩基性土壌などで十分に生育する植物を育成するための方策として、鉄センサータンパク質候補の機能を明らかにし、その活用によって、鉄吸収を可能とする植物を作成することを目的に研究が進められた。この研究によって候補タンパク質が鉄欠乏を負に制御する鉄欠乏反応タンパク質そのものであることを明らかにし、鉄蓄積量が増加した植物を作成することができた。また、このタンパク質が鉄ばかりでなく亜鉛の吸収をも促進する活性を持つという予想外の成果も得た。こうした成果は、学術上も、また、産業への応用という点からも高く評価される。また、我が国で研究が進んでいる本分野の中心的な研究者としても評価されており、本年度終了課題の中で、特に優れた研究の一つである。

今後は、本研究課題で詰め切れなかった鉄センサーを正に制御する因子の機能解明を進めるとともに、亜鉛のように、他の金属のセンシングや吸収の機能を明らかにすることが期待される。

## 5. 中尾 佳亮 研究者「木質系バイオマスを利用する高付加価値多置換芳香族化合物の精密合成手法の創出」

木質バイオマスのリグニン分解物から得られる芳香族化合物を材料として、新たな触媒の開発により、芳香族炭素-炭素結合あるいは炭素-酸素結合を切断する手法を確立し、石油由来の化学品をバイオマス由来のものに変換する手法の確立を目的に研究が進められた。これまでに、パラジウム/銅の金属触媒を開発し、イソフタル酸など工業的に重要な化学品の高効率な合成に成功していることは将来の工業化への道を開くものとして高く評価できる。一方、本研究が多様なリグニン分解物のモデルとしての精製化成品を材料とした化学反応に限定されたことについては、やや残念であった。

木質バイオマス活用研究の今後の一つの大きな課題はリグニンの活用であり、今後触媒化学の立場から、リグニンを材料としたバイオリファイナリー分野の主導的な研究者として、発展し、大成して欲しい。

## 6. 中島 敬二 研究者「植物生産能の高度利用に向けた「植物 iPS 遺伝子」の応用展開」

細胞を初期化できる遺伝子を用いて、なぜ初期化が起きるのかという基礎研究と、この遺伝子を活用することによって、再分化系の構築が困難といわれる植物種の形質転換系確立への応用技術を開発することを目的に研究が進められた。本研究の中で、「植物 iPS 遺伝子」を用いたシロイヌナズナの培養細胞系が確立され、これによって、胚発生過程における遺伝子発現が詳細に検討できるようになり、初期化機構の一部は明

らかになったといえる。また、ポプラについても、この遺伝子による初期化と個体再生について成功している。こうした成果は今後、この方法を用いた形質転換系の確立への道を開いたことになり、科学技術上のインパクトはかなりある。しかし、本技術の汎用性については、まだ初期段階での成果しかなく、今後の実用性は未知数である。

今後、この極めて興味深い遺伝子を用いて、動物でもまだ明らかとなっていないリプログラミング機構の解明という基礎研究について研究が進展することを期待する。さらに、研究課題でいう「植物 iPS 遺伝子」として、多くの植物種でのその実用性について、その有効性と限界を明らかにして欲しい。

#### 7. 中道 範人 研究者「バイオマス生産性の向上を指向した概日時計のシステム生物学」

概日時計関連遺伝子の機能を解析し、その活用によって植物の生長を制御し、バイオマスの増産につなげる基盤技術を開発することを目的に研究が進められた。その結果、時計関連遺伝子の導入によって花成時期を遅延させ、バイオマスの増産を図ることに成功するなど、優れた成果を生み出している。また概日時計は、ストレス耐性にも影響があることなども示し、さらに、概日時計と相互作用する化合物をスクリーニングによって発見するなど、想定されていなかった成果も生み出している。こうした多くの成果は、基礎研究としてもまた、技術開発研究としても極めて高く評価され、本年度終了課題の中でも極めて優れた研究の一つであると判断する。

今後は、本研究課題で得られた成果をいっそう発展させ、概日時計の支配下にある多くの生理現象の解明に努めるなど、基礎研究を進め、その中で、バイオマス増産への基盤技術の開発に努めて欲しい。

#### 8. 三輪 京子 研究者「肥料有効利用型植物の作出基盤」

ホウ素、窒素、リンという肥料の有効利用を図るための新たな方策を確立するため、それらの要素の利用効率を高める変異体を獲得し、その原因遺伝子を特定して、低エネルギー型植物育成技術につなげようと、研究が進められた。ホウ素に関しては、これまでの成果を発展させ、原因遺伝子の機能を特定することに成功し、基礎研究として大きな成果を得た。一方、極めてチャレンジングな課題であり、これが実現すれば将来の植物生産に大きく貢献しうる可能性を秘めた窒素、リンについては、多くの努力にもかかわらず、低窒素、低リン状態で良好に生育する変異株の候補が得られた段階である。今後、その変異株の解析が進めば、本研究で目指したことについて一定の結論が得られるであろう。

今後は、現在得られている、窒素、リンを対象とした変異株の解析を進め、どのような原因遺伝子が関わっているか、またその機能は何かを明らかにしていくことを期待するとともに、本研究課題で採用したスクリーニング法の有効性についても、一定の結論を出して欲しい。

#### 9. 山口 雅利 研究者「転写抑制因子を活用したリグノセルロース低含有植物の作出」

樹木資源、特にセルロースの効率的な利用を図るため、樹木のリグノセルロース含量を低減させる基盤技術を転写因子の活用によって開発しようと研究が進められた。その結果、発見した転写抑制因子によって、モデル植物において、二次細胞壁量の低下が図れるとともに、糖化率の上昇が図れることを明らかにできた。また、この転写因子の機能解析についても一定の成果が得られている。しかし、作物や樹木のレベルでの、低リグノセルロース植物の生育への影響などの解析が遅れ、こうした植物体が栽培可能であり、有用であることを示すことはできなかった。また、当初予定した内容に関し、未解決の問題も残されている。

今後は、本研究課題で得られた成果を基盤に、樹木ばかりでなく草本系のバイオマスなども視野に入れ、研究を発展させて欲しい。

#### 10. 評価者

研究総括 磯貝 彰 奈良先端科学技術大学院大学 名誉教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 27 年 3 月末現在)

坂 志朗 京都大学 大学院エネルギー科学研究科 教授

佐々木 卓治 東京農業大学 総合研究所 教授

佐藤 文彦 京都大学 大学院生命科学研究科 教授

篠崎 一雄 (独)理化学研究所 環境資源科学研究センター センター長

田中 良和 サントリーグローバルイノベーションセンター(株) 研究部 部長

土肥 義治 (公財)高輝度光科学研究センター 理事長



西澤 直子 石川県立大学 生物資源工学研究所 教授  
 長谷 俊治\*1 大阪大学 蛋白質研究所 教授  
 東山 哲也 名古屋大学 WPI トランスフォーマティブ生命分子研究所 教授  
 福田 裕穂 東京大学 大学院理学系研究科 副学長・教授  
 山谷 知行 東北大学 大学院農学研究科 教授  
 横田 明穂\*2 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教授

\*1 平成 24 年 6 月より参画

\*2 平成 24 年 4 月まで参画

(参考)

件数はいずれも、平成 27 年 3 月末現在。

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	3	37	40
口頭	82	38	120
その他	20	1	21
合計	105	76	181

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
2	1	3

(3) 受賞等

- ・小田 祥久  
日本植物生理学会 奨励賞 (H25.3)
- ・笠原 博幸  
第 9 回 (平成 24 年度) 日本学術振興会賞 (H25.3)
- ・中尾 佳亮  
井上科学振興財団 第 4 回 (2012 年度) 井上リサーチアワード (H25.3)
- ・中道 範人  
1<sup>st</sup> ITbM Research Award (H25.11)  
日本植物生理学会 奨励賞 (H26.3)  
第 38 回内藤コンフェレンスポスター発表賞 (H26.10)
- ・三輪 京子  
日本土壌肥料学会 奨励賞 (H25.4)
- ・山口 雅利  
日本植物細胞分子生物学会 奨励賞 (H25.9)

(4) 招待講演

国際 15 件  
 国内 16 件

別紙

「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」領域  
事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現所属・役職(平成27年3月末現在) (応募時所属・役職)	研究費 (百万円)
岩井 優和 (専任)	ライブセルイメージングによる光環境 適応機構の実態解明 (理化学研究所基幹研究所)	JST さきがけ専任研究者 (理化学研究所基幹研究所 特別 研究員)	39
小田 祥久 (兼任)	細胞内自己組織化制御と生体ナノマ シンの開発による新規木質バイオマス 素材の創出 (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 新分野創造セ ンター 准教授 (東京大学大学院理学系研究科 助教)	40
笠原 博幸 (兼任)	オーキシンによる植物の器官形成制 御技術の開発 (理化学研究所環境資源科学研究セ ンター)	理化学研究所環境資源科学研究セ ンター 上級研究員 (理化学研究所植物科学研究セン ター 上級研究員)	40
小林 高範 (専任)	植物の鉄センシング機構解明による生 産力の強化 (石川県立大学生物資源工学研究所)	JST さきがけ専任研究者 (石川県立大学生物資源研究所 特任准教授)	40
中尾 佳亮 (兼任)	木質系バイオマスを利用する高付加 価値多置換芳香族化合物の精密合成 手法の創出 (京都大学桂キャンパス A)	京都大学大学院工学研究科 教授 (京都大学大学院工学研究科 講 師)	40
中島 敬二 (兼任)	植物生産能の高度利用に向けた「植 物 iPS 遺伝子」の応用展開 (奈良先端科学技術大学院大学バイ オサイエンス研究科)	奈良先端科学技術大学院大学バイ オサイエンス研究科 教授 (奈良先端科学技術大学院大学バイ オサイエンス研究科 准教授)	40
中道 範人 (兼任)	バイオマス生産性の向上を指向した概 日時計のシステム生物学 (名古屋大学大学院生命農学研究科)	名古屋大学 WPI トランスフォーマテ ィブ生命分子研究所 特任准教授 (名古屋大学高等研究院 特任助 教)	40
三輪 京子 (兼任)	肥料有効利用型植物の作出基盤 (北海道大学地球環境研究院)	北海道大学地球環境科学研究院 准教授 (北海道大学創成研究機構 特任 助教)	40
山口 雅利 (兼任)	転写制御因子を活用したリグノセルロ ース低含有植物の作出 (埼玉大学理工学研究科)	埼玉大学環境科学研究センター 准教授 (同上)	40

# 研究報告書

## 「ライブセルイメージングによる光環境適応機構の実態解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 岩井 優和

### 1. 研究のねらい

太陽の光エネルギーから化学エネルギーを創り出す光合成反応は、植物の生存において不可欠な化学反応である。一連の光合成反応には複数のタンパク質が密接に関与しており、その多くは相互にコミュニケーションを取り合うように連動し、複雑な物理化学反応を制御していることが近年明らかとなってきた。このことから、植物は光合成反応を積極的に制御し、且つ環境変化に応じて反応効率を適切に調節していると考えられている。

葉緑体チラコイド膜に存在する光化学系(PS)複合体は、光合成反応で最も重要な酵素であり、PSI 複合体と PSII 複合体の2種類がある。PS 複合体が効率良く酵素反応を行うには、同じくチラコイド膜に存在する集光アンテナ(LHC)タンパク質からの励起エネルギーが必要である。LHC タンパク質は、吸収した光エネルギーを PS 複合体へと伝達するのに重要であるが、その一方で、過剰な光エネルギーを吸収した場合、それを熱として消散することで、PS タンパク質の分解を防いでいることも知られている。

これまでの先行研究から、PSII 複合体に結合する LHC(LHCII)タンパク質の機能が最も重要視されている。その制御因子の一つが、チラコイド膜を介したプロトン濃度勾配と密接に関与しており、それに伴う LHCII 内のカロテノイドの修飾とその他のタンパク質間相互作用によって、過剰なエネルギーの熱変換効率を高めていると考えられている。その他に、LHCII がリン酸化修飾されることで PSII 複合体と PSI 複合体との親和性が逆転し、PSII 複合体では制御しきれないエネルギーを PSI 複合体で効率良く消費していることも示唆されている。従って、LHCII の翻訳後修飾による機能変換によって、吸収した光エネルギーの伝達と熱変換の割合が積極的に調節され、各 PS 複合体での光合成反応を制御していると考えられている。しかし、LHCII を含む複数のタンパク質がチラコイド膜内で、どのようにして光合成反応の調節を行っているかは分かっておらず、その分子機構の実態も不明である。

本研究では、葉緑体で働く光合成反応を制御するタンパク質の挙動を生きた植物細胞内で直接観察(ライブセルイメージング)することで、植物がどのようにして光環境の変化に適応しているのかを明らかにすることを目的とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

植物細胞には、さまざまな細胞内器官があるが、そのうちのひとつ葉緑体の中で光合成反応が行われている。葉緑体の長辺は約 5 から 10  $\mu\text{m}$  の大きさで、一つの細胞に 30 から 50 個存在している。電子顕微鏡による解析によって、葉緑体の内部にはチラコイド膜と呼ばれる脂質二重膜があることが分かっており、その膜が幾層にも重なった「グラナ構造」と、膜の重なりを持たない「ストロマラメラ構造」が存在する。また後者は前者同士の間を繋ぐように存在してい

ることも明らかとなっている。なぜチラコイド膜がそのような膜構造を形成しているのかは未だ不明であるが、このような複雑な構造を形成するチラコイド膜に、PS 複合体と LHC タンパク質及び、多くの光合成関連タンパク質が存在している。これまでの研究によって、PS 複合体と LHC タンパク質が関与するタンパク質間相互作用や、タンパク質超複合体の再編成による光環境変化への適応機構が示唆されており、またチラコイド膜の構造との密接な関係も注目されている。上述した電子顕微鏡による解析では、チラコイド膜内のタンパク質や、複雑な膜構造の違いなどの特徴を明らかにすることができるが、そのためには、細胞を化学固定する必要があり、タンパク質の挙動や振る舞いに関する情報を得ることができない。そこで本研究では、生きた植物細胞の葉緑体内で実際に働くタンパク質の動的な挙動の変化を解析するため、以下の項目を行った。

- A) 葉緑体ライブセルイメージング技術の確立
- B) チラコイド膜の構造ダイナミクスの解析
- C) チラコイド膜タンパク質の拡散速度の解析
- D) 超解像顕微鏡によるチラコイド膜の立体構造ライブセルイメージング解析
- E) シロイヌナズナ変異体の単離葉緑体チラコイド膜の立体構造タイムラプス解析
- F) ヒメツリガネゴケ特有の LHC タンパク質の生化学的解析

本研究では、ライブセルイメージング技術に最も適した生物としてヒメツリガネゴケを主に用いている。しかし、ヒメツリガネゴケの光合成機能についてはまだ未解明な点が多く、緑藻型と高等植物型、両方のタンパク質を有していることも最近明らかとなってきていることから、ヒメツリガネゴケは特有の光合成機能を保持していることが考えられる。従って、ヒメツリガネゴケを用いてライブセルイメージング解析を行う場合、光合成関連タンパク質の詳細な解析が必要不可欠であった。そのため項目 F では、ヒメツリガネゴケ特有の LHC タンパク質を詳細に解析するため、ライブセルイメージング解析ではなく、生化学的手法を主軸とした解析を行った。

## (2) 詳細

### A) 葉緑体ライブセルイメージング技術の確立

本研究では、生きた植物細胞を観察し、且つ 10  $\mu\text{m}$  以下の葉緑体内部を鮮明に観察する必要性があり、またチラコイド膜の構造を詳細に解析することが重要である。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ライブセルイメージング解析を行う際、PS 複合体や LHC タンパク質に含まれるクロロフィル(Chl)色素を励起し、約 680 nm をピークに持つ蛍光を観察する。本研究では、研究目的に応じて、様々な観察条件を考慮した。まず汎用されている共焦点レーザー顕微鏡を用いたヒメツリガネゴケの原系体細胞の生育環境と顕微鏡観察時における条件検討を行い、研究項目 B で応用した。次に、チラコイド膜内のタンパク質の拡散速度を測定するため、蛍光相関顕微鏡での観察条件の検討を行い、研究項目 C で応用した。そして、超解像顕微鏡を用いた観察に向けて条件検討し、研究項目 D を達成した。同じく、シロイヌナズナの単離葉緑体を用いた超解像顕微鏡での観察条件を確立し、研究項目 E で活用した。詳細は、各項目で述べる。

## B) チラコイド膜の構造ダイナミクスの解析

汎用されている共焦点レーザー顕微鏡で 10  $\mu\text{m}$  以下の葉緑体内部をライブセルイメージング観察するため、ヒメツリガネゴケの原糸体細胞を用いた。ヒメツリガネゴケは、アンピシリンなどの抗生物質を投与することで、一つの巨大な葉緑体(図 1A)を形成することが知られており、その特徴を利用して観察を行った。また平面画像を縦方向に複数枚取得し、縦方向に広がる蛍光シグナル

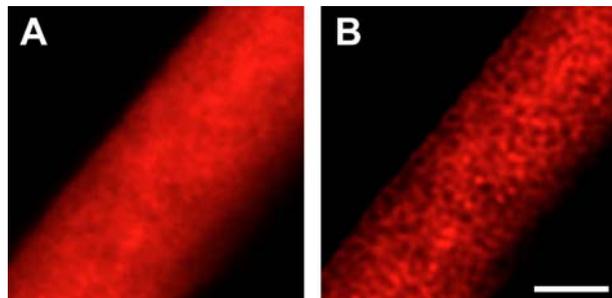


図1. 巨大葉緑体のチラコイド膜構造のライブセルイメージング

ルの非焦点ボケを3次元(3D)デコンボリューション解析することで除去し画像構築することで、葉緑体内部のチラコイド膜の複雑な構造を可視化することができた(図 1B)。これを複数回繰り返し画像取得することで、生きた植物細胞の葉緑体内部のチラコイド膜構造のタイムラプス観察を行った。その結果、グラナは細かく揺れ動く比較的安定した膜構造で、ストロマラメラは約 10 秒間隔で激しく揺れ動く膜構造をしていることが明らかとなった。この結果は、細胞を固定する必要がある電子顕微鏡観察では明らかにすることができない成果であり、初めてチラコイド膜の構造ダイナミクスを可視化した結果である(研究成果リスト3)。

## C) チラコイド膜タンパク質の拡散速度の解析

チラコイド膜には複数の光合成関連タンパク質が存在している。これまでに PS 複合体と LHC タンパク質が関与したタンパク質間相互作用や超複合体の再編成による光環境変化への適応機構が示唆されている。しかし、チラコイド膜内のこれらの光合成関連タンパク質の挙動については不明な点が多い。共焦点レーザー顕微鏡を用いたレーザー

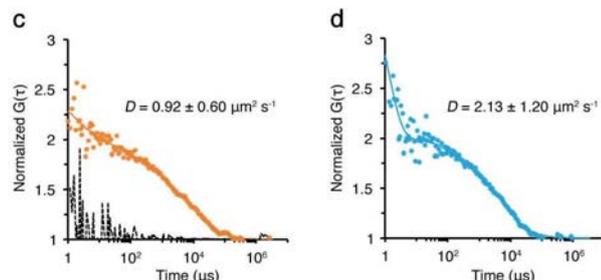


図2. FCS 解析によるリン酸化修飾が及ぼすタンパク質拡散速度の変化

光刺激による蛍光退色後の蛍光回復(FRAP)を解析する先行研究では、チラコイド膜内のタンパク質の挙動はかなり制限されていると示唆されている。しかし FRAP による解析では広範囲の視野を観察し、蛍光強度の強い Chl の場合、退色前後の強度差が大きすぎるため回復レベルが低く見積もられることがあり、退色後の弱い蛍光シグナルを検出するのが難しい。そこで、本研究項目では、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光相関分光法(FCS)を用いて、チラコイド膜内のタンパク質の拡散速度の解析を行った。FCS は、回折限界体積中のタンパク質の拡散を測定することができ、速い速度の計測が可能である。ここでは、チラコイド膜の複雑な構造がタンパク質の拡散速度に影響を及ぼすことを懸念し、緑藻クラミドモナスの葉緑体から精製したチラコイド膜を観察用カバーガラス表面に電荷的に固定し緩衝液中で解析を行った。その結果、FRAP で測定された拡散速度の約100倍の数値を示すタンパク質拡散が

チラコイド膜内に存在していることが分かった。また、LHC タンパク質のリン酸化修飾によって、拡散速度が約2倍速くなることが確認できた(図2)。このことから、チラコイド膜は従来の考えよりも局所的に速く拡散する膜環境であることが示唆された(研究成果リスト1)。

#### D) 超解像顕微鏡によるチラコイド膜の立体構造ライブセルイメージング解析

汎用されている共焦点レーザー顕微鏡では、3D 画像を取得するための平面画像の取得時間と縦方向の移動時間が長く、タイムラプス観察の不連続性が大きい。そのため、葉緑体全体の解析とチラコイド膜の構造ダイナミクスの追跡も困難である。そこで所属チームで開発が進められている超解像ライブイメージング顕微鏡(SCLIM)を用いて解析を行った。SCLIMは、スピニングディスクによる平面画像の高速スキャンとピエゾアクチュエータによる縦方向の高

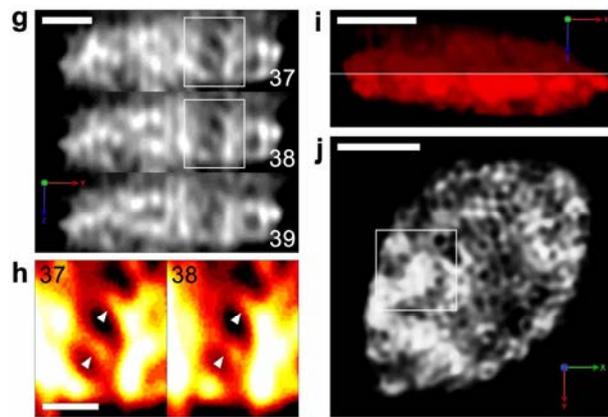


図3. SCLIMによる葉緑体チラコイド膜構造の立体構造ライブセルイメージング

速移動を可能とすることで 3D 画像の取得時間を極限まで短縮することができる。SCLIMによる観察の結果、ヒメツリガネゴケの原糸体細胞を巨大にすることなく、通常の大さの葉緑体全体を網羅し、内部の複雑なチラコイド膜構造を詳細に観察することができた(図3)。また、緑色蛍光タンパク質(GFP)を葉緑体のストロマ領域に発現させ、Chl 蛍光と GFP 蛍光の局在の違いから Chl 蛍光で観察するチラコイド膜構造が真実であることを証明することができた。従って、SCLIMによる生きた細胞の葉緑体内部のチラコイド膜全体像を初めて詳細に可視化することができた。また、SCLIMによるタイムラプス解析の結果、過剰な光エネルギーを熱に変換する際に、グラナ構造が分離している様子を観察することができた。また、ストロマラメラのダイナミックな挙動も明確に観察することができた。これらのことから、光エネルギーを制御する際にチラコイド膜に存在する光合成関連タンパク質の動態だけでなく、膜構造自体のダイナミックな挙動も関連していることが示唆された(原著論文は投稿中)。

#### E) シロイヌナズナ変異体の単離葉緑体チラコイド膜の立体構造タイムラプス解析

これまでの先行研究によって、シロイヌナズナの光エネルギー伝達に関連する変異体の単離が進んでいる。本研究で確立した観察条件を応用し、葉から無傷葉緑体を単離し、SCLIMを用いて直接タイムラプス解析を行った。LHCII タンパク質と PSII 複合体のリン酸化修飾をそれぞれ担う二つのキナーゼ(STN7 と STN8)を欠損した二重変異体(stn7stn8)と LHCII タンパク質の脱リン酸化修飾を担うフォスファターゼ(TAP38)の欠損株(tap38)を観察したところ、前者はグラナ構造が後者に比べて約5倍近く大きくなっていることが分かった。また、タイムラプス解析を行うと、野生型と比べて、両者共にストロマラメラ構造のダイナミクスが少ないことが分かった。これまでの先行研究で、グラナ構造には PSII 複合体が、ストロマラメラ構造には PSI 複合体が別々に局在していることが示唆されており、LHCII が各 PS 複合体間を移動する際、膜構造に何らかの影響を与えていると考えられている。SCLIMによる解析結果から、LHCII

や PSII に働きかけるキナーゼとフォスファターゼのリン酸化修飾の競合に伴ってチラコイド膜構造のダイナミクスが起きていることが示唆される(原著論文は投稿準備中)。

#### F)ヒメツリガネゴケ特有の LHC タンパク質の生化学的解析

ライブセルイメージング技術によって、現象の変化を追跡解析し、またその変化の速度と度合いを三次元的に解析することが可能であるが、生化学的解析による実態に伴った裏付け検証も必要不可欠である。ヒメツリガネゴケのチラコイド膜に存在する光合成関連タンパク質に

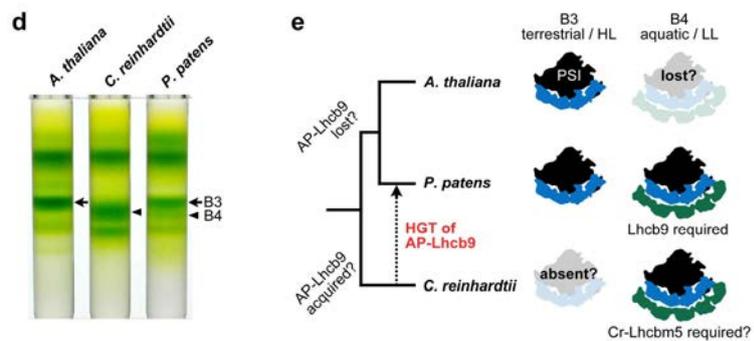


図4. ヒメツリガネゴケ特有 LHC タンパク質(Lhc9)の生化学的解析と系統樹解析

ついてはまだ研究が進んでいなかった。そこで本研究では、欠損株や His タグ変異体を作成し、ヒメツリガネゴケの PS 複合体と LHC タンパク質について詳細な生化学的解析を行った。その結果、ヒメツリガネゴケには、緑藻型と高等植物型の PSI 超複合体が存在していることが明らかとなった(図4)。また、ヒメツリガネゴケ特有の LHC タンパク質(Lhc9)が緑藻型 PSI 超複合体に必須であることも明らかにした。また、LHC の系統樹解析によって、Lhc9 由来の遺伝子が緑藻の祖先から水平伝播によってヒメツリガネゴケの祖先に取り込まれたことが示唆された。そして、光環境の変化に応じて、Lhc9 を含む緑藻型 PSI 超複合体の形成が変化することも分かった。これらの結果から、Lhc9 の獲得によって、緑藻型 PSI 超複合体の形成が可能となり、ヒメツリガネゴケ特有の光環境への適応を成し遂げたと考えられる(研究成果リスト4)。

### 3. 今後の展開

本研究では、葉緑体ライブセルイメージング技術によって、葉緑体内部に存在するチラコイド膜の構造に着目し、その構造ダイナミクスと光環境変化との関連を明らかにすることができた。またシロイヌナズナ変異体の解析から、リン酸化修飾によるタンパク質の状態(電荷的・構造的)変化と構造ダイナミクスが強く関連していることも分かった。しかし、個々のタンパク質のライブイメージング観察にはまだ至っていない。本研究で確立した葉緑体ライブセルイメージング技術を基盤とし、Chl 結合タンパク質の励起方法や蛍光の検出様式を改変することでより複雑なタンパク質の挙動変化を追跡することができると考えられる。例えば、蛍光寿命測定を各ピクセルで連続的に行うことで、Chl 蛍光シグナルを蛍光寿命の違いで識別することができる。本研究で行った超解像顕微鏡レベルで、高速スキャンによる3D 構造を蛍光寿命の違いで識別することができれば、個々のタンパク質を追跡して解析ができ、また光エネルギーの移動方向も知る事が可能となる。そのためには、周波数領域法による蛍光寿命解析が最適な手法であり、スピニングディスクとピエゾアクチュエータによる高速3D スキャンと周波数可変型励起・検出器の連動制御システムの構築が達成の鍵となる。

本研究によって葉緑体ライブセルイメージングの有用性を十分に見出だすことができた。生きた細胞内で起こる現象を追跡解析することの重要性も明らかにすることができた。今後の課題として、本研究で得られた基盤技術をライブプロテインイメージング技術の確立へと発展させ、個々のタンパク質と現象との関連性を解き明かす必要がある。また、光合成反応特有の光エネルギーと熱エネルギーの変換効率を可視化するライブイメージング技術も重要である。それらの技術によって、太陽からの光エネルギーがどのように化学エネルギーへと変換され、植物が創り出す有機資源へと繋がっているのかといった根本的な問題に迫ることができる。そして、その問題解決によって、将来の人工的な有機資源生産の効率化に役立つと考えられる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究によって、葉緑体ライブセルイメージング技術の実用性が確認できたことは非常に大きい。また、複数の光合成関連タンパク質に数多く存在する Chl を、自家蛍光としての蛍光強度の揺らぎの大きさ、そして光合成特有の光エネルギー伝達機構を考慮した蛍光観察において、生きた細胞の葉緑体内部の微細なチラコイド膜構造を、電子顕微鏡レベルの空間分解能に近づく領域まで迫ることができたことも非常に大きな成果である。

本研究では、ヒメツリガネゴケが主なモデル植物であったが、他にもシロイヌナズナとクラミドモナスを用いた解析を行った。ライブセルイメージング技術の応用を目指すためには、さらに多くのモデル植物の解析を推進する必要がある。また、研究対象が植物であるため、生育維持・管理と変異体作成などの研究実施体制の整備を充実させることが研究目標の達成に重要である。

光合成研究分野では、まだ広く普及していないライブセルイメージング技術を本研究で確立できたことは非常にインパクトが大きい。その重要性については、今後の成果発表でさらに広まることが多いに期待できる。百聞は一見に如かずであり、葉緑体内部のチラコイド膜の生きた挙動を実際に目の当たりにするだけで、これまでの常識を考え直すきっかけとなる。また、分子レベルだけでなくタンパク質レベルにおける相互作用やネットワークの存在、そして、それらの動態変化に伴う現象の検証など、分子機構を解き明かすための重要な手掛かりを導きだせる技術である。本研究は、その研究基盤技術をさきがけて確立することができ、今後、タンパク質レベルのライブイメージングの実現に向けて、より一層の研究開発の推進を行いたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

植物における二酸化炭素資源化の根源である光合成について、その状況をライブセルイメージングという手法で可視化する方法の確立を目標として研究が進められた。この研究課題では、モデル植物としてヒメツリガネゴケの生きた葉緑体のチラコイド膜のイメージング技術を確立し、多くの新知見を得て、優れた論文を数多く発表してきており、この分野の国際的な研究者として認知されている。このように、科学技術上の優れた研究成果、また、研究者としての発展という観点からも、十分にさきがけ研究の目的を達成したと判断する。

今後は、本技術を、ルビスコなどの光合成にかかわるタンパク質のイメージング技術や、光環境に対する応答を解析する技術の開発などにつなげ、また、高等植物にこの技術を活用できるように、研究を発展させて欲しい。それらは今後の光合成反応の分子機構の研究に大きく貢献することとなろう。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Iwai, M., Pack, C.-G., Takenaka, Y., Sako, Y., Nakano, A. Photosystem II antenna phosphorylation-dependent protein diffusion determined by fluorescence correlation spectroscopy. *Scientific Reports* 3, 2833; DOI:10.1038/srep02833 (2013).
2. Iwai, M., Imaging chlorophyll fluorescence at multiple spatiotemporal scales, *News Letters of the Japanese Society of Photosynthesis Research*, Vol. 23, Dec. (2013).
3. Iwai, M., Yokono, M., Nakano, A. Visualizing structural dynamics of thylakoid membranes. *Scientific Reports* 4, 3768; DOI:10.1038/srep03768 (2014).
4. Iwai, M., Yokono, M., Kono, M., Noguchi, K., Akimoto, S., Nakano, A. Light-harvesting complex Lhcb9 confers a green alga-type photosystem I supercomplex to the moss *Physcomitrella patens*. *Nature Plants* 1; DOI: 10.1038/NPLANTS.2014.8 (2015).
5. Iwai, M., Yokono, M., Nakano, A. Toward understanding the multiple spatiotemporal dynamics of chlorophyll fluorescence. *Plant Signaling & Behavior*; DOI:10.1080/15592324.2015.1022014 (2015).

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会発表

1. 岩井優和, 葉緑体チラコイド膜構造の超解像ライブイメージング, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16日, 世田谷区.
2. 岩井優和, ライブセルイメージングで葉緑体チラコイド膜についてどこまで理解できるのか, 第17回植物オルガネラワークショップ「オルガネラ機能の最適化メカニズム」, 2015年3月15日, 目黒区. 【招待講演】
3. 岩井優和, “too famous but too unknown”を打破するために必要なことは何か? 第4回光合成学会年会シンポジウム, 2013年5月31日, 名古屋市. 【招待講演】
4. Iwai, M., Live Cell Imaging of Chloroplast Internal Structure Dynamics, Okayama University International Symposium “Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems” 2012年10月22-23日, 岡山市.
5. Iwai, M., Visualizing chloroplast internal activities by using live cell imaging techniques, Japanese-Finnish Seminar 2012 “Photosynthetic research for sustainable energy production” 2012年9月9日, Naantali, Finland.

6. Iwai, M., Visualizing thylakoid membrane structure dynamics, Photosynthesis Gordon Research Conference, 2012年7月8日, NC, USA.
7. Iwai, M., Enlarging the moss chloroplasts to see what happens inside, MOSS 2012, 2012年6月15日, NY, USA.

### プレスリリース

8. 葉緑体内部のダイナミックな構造変化を生きのまま観察, 2014年1月20日.
9. コケ植物の光化学系I複合体の集光アンテナ調節機構を解明, 2015年1月20日.

### メディア記事掲載

10. 日本経済新聞電子版, 2014年1月20日付.
11. 植物葉緑体内部構造変化, 日刊工業新聞, 2014年1月22日付.
12. 葉緑体の構造変化を可視化, 化学工業日報, 2014年1月23日付.
13. Viewing the light harvest in plant cells, Biome, 2014年1月24日付.

### 共同研究

14. 白燦基準教授, Gacheon University of Medicine and Science.
15. 武仲能子主任研究員, 産業技術総合研究所.
16. 横野牧生博士, 北海道大学.
17. 秋本誠志准教授, 神戸大学.
18. 野口航准教授, 東京大学.

### 科学アウトリーチ活動

19. 招待講演, NIC International College in Japan, 2014年7月27日, 新宿区.
20. 招待講義, 清真学園中学校, 2014年7月12日, 鹿嶋市.
21. 招待講演, NIC International College in Japan, 2014年6月17日, 新宿区.
22. 招待講演, NIC International College in Japan, 2014年4月24日, 大阪市.
23. 招待講演, NIC International College in Japan, 2013年7月28日, 新宿区.
24. 科学技術の美パネル展, 2012年4月16—22日, 科学技術振興機構.

# 研究報告書

## 「細胞内自己組織化制御と生体ナノマシンの開発による新規木質バイオマス素材の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 小田 祥久

### 1. 研究のねらい

石油枯渇の危機や温室効果ガス排出による地球温暖化問題の解決策として、バイオマスの有効利用が求められている。限りある石油資源とは異なり、植物バイオマスは持続的な供給が可能であり、カーボンニュートラルな資源である。主要な植物バイオマス資源のひとつである木質バイオマスはリグノセルロースの富んだ木質細胞壁が蓄積した木材である。木質細胞壁は、主に木部繊維および木部道管を構成する細胞が細胞表面にセルロースを主とした二次細胞壁成分を沈着することによって形成されているが、二次細胞壁は微細な壁孔を無数に形成した特徴的なパターンで沈着する。このような壁孔を伴った二次細胞壁の沈着は木部道管において顕著であり、生きた植物では道管液の輸送に、木材では液体浸透性や通気性、強度、その表面積に寄与していると考えられている。壁孔の形態や密度を改変することができれば、化学組成を変えことなく細胞壁の分解性やセルロースの性質を改善し、新規の木質バイオマス素材を創出する技術につながると期待される。近年、木部繊維分化および木部道管分化のマスター因子が単離され、下流で働く様々な遺伝子の解析が可能となった。その中で私は、セルロース合成の足場となる表層微小管の脱重合を促進する因子として MIDD1 を同定し、MIDD1 が壁孔形成に必須であることを突き止めた (Oda et al. 2010 Curr Biol)。本研究課題では、①この MIDD1 を介して二次細胞壁の沈着パターンを制御する基本的な仕組みを明らかにすること、②その仕組みを人為的に操作することにより、二次細胞壁の沈着パターンを自在に改変する基本技術の確立を目指すこと、③改変した二次細胞壁の素材としての評価を目指した。特に、細胞が自発的に形態を作り出す自己組織化、およびエネルギーを使って細胞内の構造を制御する生体ナノマシンに着目し、細胞自体の持つ仕組みを最大限利用しつつ、人為的な操作を加えることにより任意の沈着パターンの実現を狙った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シロイヌナズナ培養細胞の木部細胞分化誘導系を用いたマイクロアレイおよびライブイメージングにより、二次細胞壁の壁孔に局在する因子をスクリーニングし、ROPGEF4, ROPGAP3, 活性型 ROP11 および Kinesin-13A を同定した。これらの遺伝子の詳細な機能解析により、ROPGEF4とROPGAP3の働きによって局所的にROP11が活性化し、細胞膜ドメインを形成することを突き止めた。さらに、活性化したROP11がMIDD1-Kinesin-13A複合体を細胞膜ドメインにリクルートすることにより、局所的に表層微小管の脱重合を促進し、壁孔の形成をもたらすことを明らかにした。一方、表層微小管はその側面において、活性型ROP11の局在を制限していることが判明した。このように活性型ROP11と表層微小管が排他的に相互作用するこ

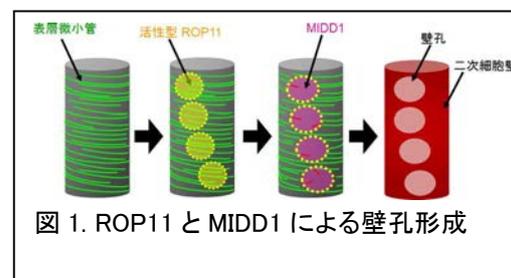
とにより、壁孔の形態が制御されていることが示唆された。そこで、これらの因子の一過的な過剰発現および発現抑制を試み、壁孔のサイズおよび密度、形態を一過的に改変することに成功した。壁孔の形態をより柔軟に改変するために、さらにスクリーニングを行い新規の細胞骨格付随タンパク質を同定した。この発現レベルを制御することにより、螺旋型に近い二次細胞壁パターンを実現した。このように、二次細胞壁の沈着パターンを制御する分子機構を明らかにするとともに、二次細胞壁の沈着パターンを大幅に改変することに成功し、本研究課題の目標の大部分を達成した。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「二次細胞壁微細構造の制御機構の解明」

木部道管において壁孔が形成されるメカニズムを明らかにするために、MIDD1 と共局在するタンパク質を木部道管で強く発現する遺伝子群の中から探索した。私が開発したシロイヌナズナ培養細胞の木部道管分化誘導系 (Oda et al. 2010 Curr Biol) を用い、マイクロアレイ法により木部道管分化において顕著に発現が上昇する遺伝子を同定した。その中からアノテーションを元に候補遺伝子を選び、GFP 融合タンパク質として培養細胞に発現させた。その結果、ROP GTPase の一つである ROP11, ROP GTPase の活性化因子である ROPGEF4, ROP GTPase の不活性化因子である ROPGAP3 が壁孔に局在した。ROP GTPase は GTP に結合した活性型、あるいは GDP と結合した不活性型として存在し、ROPGEF は GDP を GTP と交換することにより ROP を活性型へ、ROPGAP は GTP の GDP への分解を促進し、不活性型へと変換する。活性型 ROP11 および ROPGEF、ROPGAP3 は壁孔の細胞膜近傍に局在しており BiFC および FRET 法により MIDD1 と活性型 ROP11 が直接相互作用することが分った。さらに、壁孔において ROP11 が活性型として存在し、MIDD1 を細胞膜にリクルートする特殊な細胞膜ドメインを形成していることが明らかとなった。恒常的に活性型となる変異を持った ROP11 を過剰発現させると培養細胞および根の道管において壁孔が喪失したことから、局所的な ROP11 の活性化が壁孔の形成に必要であることが示唆された (図1)。

局所的な ROP11 の活性化における ROPGEF4 および ROPGAP3 の役割を明らかにするために、非木部細胞にこれらの遺伝子を同時に発現



させ、ROP11 の局所的な活性化が起こるかどうか検証した。その結果、ROPGEF4 および ROPGAP3 を ROP11 と同時に発現させるだけで ROPGEF4 がスポット状に局在し、局所的に ROP11 を活性化できることが明らかとなった。MIDD1 をこれらの遺伝子に加えて発現させると、ROPGEF4 のスポットの周辺で局所的に表層微小管が失われたことから、この局所的に活性化した ROP11 が MIDD1 を介して局所的に表層微小管の脱重合を引き起こすのに十分であることが分った。ROP11 を恒常的な活性型あるいは不活性型に変異させたものを導入した場合には、このような現象はまったく生じなかったことから、ROP11 が ROPGEF4 および ROPGAP3 によって活性化および不活性化され、GTP および GDP 結合状態をサイクルすることが、この自発的に ROP11 の活性化を引き起こす現象に必要なことが分った (図 2)。

一方、木部道管へ分化している培養細胞において、微小管脱重合阻害剤 taxol を用いて表層微小管を安定化したところ、局所的に活性化した ROP11 の細胞膜ドメインが細長く変形し、通常よりも細長い壁孔が形成された。タバコの葉を用いて局所的な ROP11 の活性化を再現し、表層微小管を可視化したところ、表層微小管が活性型 ROP11 の細胞膜ドメインに沿って局在し、ROP11 の局在を制限していることが分った。以上の結果から、ROP11 と表層微小管との間に排他的な相互作用が存在し、その相互作用によって壁孔の形態が制御されていることが示唆された (Oda and Fukuda, 2012 Science, 図 2)。

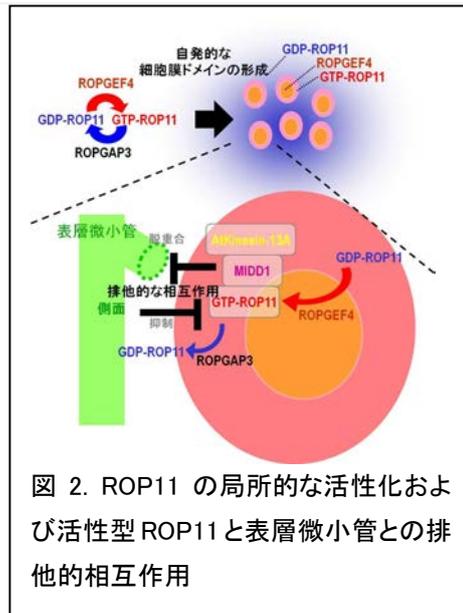


図 2. ROP11 の局所的な活性化および活性型 ROP11 と表層微小管との排他的相互作用

さらに MIDD1 と同様の局在を示す因子として

Kinesin-13A を同定した。詳細なライブイメージングを行った結果、Kinesin-13A は壁孔において脱重合している表層微小管の先端に顕著に局在することが分った。このようなダイナミクスは MIDD1 と類似しており、MIDD1 と共に機能する可能性が示唆された。そこで BiFC 法により木部道管における両者の相互作用を検証した結果、壁孔内の微小管において両者が相互作用していることが示唆された。Kinesin タンパク質は ATP をエネルギー源として微小管上を移動し、小胞等の物体を輸送する生体ナノマシンとして知られているが、その中でも Kinesin-13 は微小管上を移動せず、代わりに微小管の脱重合を促進する特殊な機能を有している。シロイヌナズナの Kinesin-13A はこの Kinesin-13 ファミリーに属しているが、タンパク質としての機能や植物細胞内における役割に関してはほとんど明らかにされていなかった。GST-Kinesin-13A を精製し、*in vitro* において微小管の脱重合アッセイを行った結果、Kinesin-13A は ATP 依存的に微小管を脱重合することが分った。次に、*in vivo* において Kinesin-13A が微小管を脱重合するかどうか調べるために、非木部細胞に GFP-Kinesin-13A を過剰発現させた。しかしながら、Kinesin-13A は微小管に局在せず、微小管の脱重合も起こらなかった。そこで、MIDD1 を Kinesin-13A と共発現させると、Kinesin-13A が表層微小管に局在し、表層微小管を脱重合した。この結果は MIDD1 が Kinesin-13A を微小管にリクルートすることにより、微小管の脱重合を促進していることを示唆している (Oda and Fukuda, 2013 Plant Cell, 図 2)。

以上の解析により、二次細胞壁の壁孔の形成は ROP11-MIDD1-Kinesin-13A 経路によって制御されていること、この経路と表層微小管との排他的な相互作用が壁孔の形態を制御していることが明らかとなった。本研究課題発足時において、二次細胞壁の沈着パターンを制御する分子的なメカニズムはほとんど知られていなかった状況を考えると、本研究課題によってパターン形成から微小管の脱重合、さらには壁孔の形態制御までの一連の過程を分子的に明らかにしたことは大きな進歩であり、この研究テーマの大部分を達成したと言える。

#### 研究テーマ B「二次細胞壁パターン的人為的な改変」

テーマAによって明らかになった遺伝子群を利用し、二次細胞壁の沈着パターンを改変する

ことを試みた。各遺伝子を estrogen による発現誘導により一過的に過剰発現あるいは発現抑制し、根の道管の二次細胞壁への影響を検証した。その結果、Kinesin-13A の過剰発現によって壁孔を大きく、発現抑制によって壁孔を小さくすることに成功した (Oda and Fukuda, 2013)。また、ROPGEF4 の発現抑制あるいは恒常的活性型 ROP11 の過剰発現によって壁孔の密度を低下させることに成功した (Oda and Fukuda, 2012)。上述したとおり、Kiensin-13A は ATP を消費して微小管を脱重合する生体ナノマシンであり、また ROPGEF4 および ROP11 の操作は ROP GTPase による自発的な細胞膜ドメインの形成、すなわち自己組織化作用の操作であることから、本研究課題の戦略に沿って目標を達成したといえる。一方、壁孔の形態、特に縦横比を劇的に変化させることは、これまでに同定した因子では実現することができなかった。新たに構築した計算機シミュレーションの結果、壁孔の形態には微小管の安定性が影響することが示唆された。そこで、木部道管において発現する機能未知の遺伝子の中から、壁孔の形態に影響するものを探索し、新規の微小管付随タンパク質をコードする遺伝子を同定した。このタンパク質は MIDD1 とは異なり、壁孔の外に局在する微小管に主に局在していた。このタンパク質の過剰発現によって顕著に表層微小管が増加し、微小管重合阻害剤の効果に高い耐性を示すようになったことから、このタンパク質は微小管を安定化していると考えられた。さらにこのタンパク質の過剰発現は、非木部細胞において人工的に再構築した活性型 ROP GTPase の細胞膜ドメインの面積を著しく縮小させたことから、このタンパク質は表層微小管による ROP GTPase の制限を促進することにより壁孔の形態に影響している可能性が示唆された。このように、本研究では一過的ではあるものの壁孔の密度、大きさに加えて、形態に関しても改変することに成功しており、木質バイオマスの微細構造を改変する技術を確立するという本研究課題の目的の大部分を達成した。

#### 研究テーマC「改変した二次細胞壁の評価」

二次細胞壁の沈着パターンを改変した木質バイオマスの性質を評価するために、培養系および植物体において恒常的に壁孔の形態や密度を改変した形質転換ラインの作成を行っている。すでに *XCP1*, *MIDD1*, *ATHB8*, *CESA7*, 等、木部道管に特異的に発現する遺伝子のプロモーター下に上述の遺伝子群を連結し、シロイヌナズナ植物および培養細胞に導入している。この中から二次細胞壁の沈着パターンが恒常的に変化し、かつ植物体および細胞の育成に影響の少ないものを選抜し、ラージスケールの培養・細胞を行うことにより、木質バイオマスとしての評価を行う予定である。これまでに、*XCP1* および *CESA7* のプロモーターを用いて二次細胞壁パターンの制御因子を発現させた植物において、恒常的に二次細胞壁が変化していることを確認した。今後、これらの植物体を十分量確保することにより、沈着パターンを改変した二次細胞壁の分解性とセルロースの性質の評価を行う見込みである。

### 3. 今後の展開

今後は今回確立した二次細胞壁微細構造の改変技術を樹木に応用すること、改変した樹木に由来する木質バイオマスの性質を評価することが可能になると考えられる。二次細胞壁の微細構造の改変技術を樹木に適用するために、現在行っているプロモーターの選定を慎重に行い、十分に効果的なプロモーターを選ぶ必要がある。最適なプロモーター下に置いた遺

伝子をポプラ、ユーカリなどのモデル樹木に導入し、二次細胞壁の沈着パターンが変化することを確認した後、その改変樹木を用いて木質バイオマスの評価を行うことを考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

##### **研究目的の達成状況、**

本研究課題の目標である①二次細胞壁パターンの形成機構の解明、②二次細胞壁パターン的人為的な改変、③改変した二次細胞壁の素材としての評価の、うち、①、②に関しては当初の目標を達成するとともに、期待以上の成果を得ており、順次その成果を論文にまとめ投稿する予定である。③細胞壁を評価するための形質転換培養細胞および形質転換シロイヌナズナを作出することに成功しており、今後これらの材料を用いて細胞壁の評価を進める。

##### **研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)**

研究費の執行に関しては研究目標の達成に向け、年度ごとに適切な判断を行い、研究の着実な前進に貢献した。特に2年度における高速高感度の顕微鏡システムに関しては最新のパーツを吟味し、本研究課題に最も適合したシステムを導入することに成功した。実験補助員に関してはスキルの高い人材を獲得し、期待以上の成果につながった。最終年度においては研究室を新たに立ち上げたため、主に物品の購入を行い、これまでと同等の研究環境を整え、計画に沿った研究課題の遂行を実現した。

##### **研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果**

これまで、木質バイオマスの改良はリグニン等の細胞壁組成の改変が主なアプローチであった。本研究課題では植物基礎科学をベースとしたアプローチにより、木質バイオマスの微細構造を改変する技術を新たに開発し、これまでにない視点から木質バイオマスの改良を行う可能性を実現した。現在、植物科学を利用した有用植物の開発が精力的におこなわれており、この技術を高ストレス耐性や高生産をもたらす他の有用技術と組み合わせることにより、植物を用いた研究開発の有用性を社会にアピールし、社会実装への実現へ近づけることが可能になると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

木質細胞壁の壁孔形成などを自在に行いうる技術を開発し、新規木質バイオマス素材を作成することを目的として研究が進められた。その結果、セルロース合成に係わる新たな因子を解明し、それを活用して培養細胞レベルでは、かなり自在に密度やサイズ、形態を変えた壁孔を作ることに成功している。その研究は学術的にきわめて高く評価される。現在、樹木での実験を実施中であり、モデル系だけでなく、実用植物でも、それが可能となれば、将来、目的に応じた樹木の育成に有用な技術につながる可能性を持つ研究として評価される。

現時点ではまだ基礎研究のレベルではあるが、これを一つの契機として、二次細胞壁のパターンと木質成分との関係についてさらに研究を発展させ、木質バイオマスの改変の技術開発につなげて欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表 (著者, 発表論文タイトル, 掲載誌名, 発行年, 巻号, 始頁-終頁, その他)

1. \*Oda Y, \*Fukuda H. Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. **Science (2012)** 337,1333-1336, \*Corresponding author.

2 \*Oda Y, Fukuda H. Rho of plant GTPase signaling regulates the behavior of Arabidopsis kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. **Plant Cell (2013)** 25: 4439-4450. \*Corresponding author.

3. Ohashi-Ito K, Saegusa M, Iwamoto K, Oda Y, Katayama H, Kojima M, Sakakibara H, \*Fukuda H. A bHLH Complex Activates Vascular Cell Division via Cytokinin Action in Root Apical Meristem. **Curr Biol (2014)** 24, 2053-2058.

4. \*Oda Y, Iida Y., Nagashima Y., Sugiyama Y, Fukuda H. Novel Coiled-Coil Proteins Regulate Exocyst Association with Cortical Microtubules in Xylem Cells via the Conserved Oligomeric Golgi-Complex 2 Protein. **Plant Cell Physiol (2015)** 56, 277-286. \*Corresponding author

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会賞

2013年3月 植物生理学会奨励賞受賞

#### 国際学会招待講演

\*Oda Y (2014) Live cell imaging of xylem differentiation: dissecting the molecular basis of secondary cell wall patterning. **International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2014 "Plant Live-Cell Imaging and Microdevices"** Nagoya University, Nagoya Japan, Sep 9<sup>th</sup>

\*Oda Y (2014) Self-organization of cell wall patterns through the Rho GTPase-cortical microtubule interplay. **ESF Conference (Cell polarity and membrane trafficking)**. Polonia Castle (Dom Polonii), Pultusk, Poland, May 12<sup>th</sup>

\*Oda Y, Fukuda H (2012) Secondary cell wall patterning by the microtubule-associated protein MIDD1. **International Congress on Molecular Plant Biology (IMPB)**. Jeju, Korea, , Oct 24<sup>th</sup>

#### プレスリリース

2012年9月6日 東京大学 大学院理学系研究科

植物細胞の“形を決める”遺伝子を発見～350年来の謎を解明

### 研究者としての飛躍

2014 年4月1日に東京大学 大学院理学系研究科 助教から国立遺伝学研究所 新分野創造センター 准教授に昇級した。

# 研究報告書

## 「オーキシンによる植物の器官形成制御技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 笠原 博幸

### 1. 研究のねらい

オーキシンは植物の器官形成を制御する非常に重要な植物ホルモンである。その研究をもとに、これまでに数多くの合成オーキシンが開発され、着果・肥大促進剤、着根剤、除草剤などとして農業で広く利用されてきた。オーキシンを投与する時期や部位、量を適度に調節することにより器官サイズを増加させて作物やバイオマスを増産できることから、二酸化炭素資源化におけるオーキシンの利用価値は高い。近年、オオムギなどの主要作物で温暖化による高温障害(雄性不稔)が大きな問題になっているが、雄蕊の形成初期にオーキシンを散布してその成長を回復させることにより、高温条件下でも高い稔実率を維持できることが報告された。また、綿花の胚の表皮細胞でアグロバクテリウムのオーキシン生合成遺伝子(*iaaM*)を発現させて胚珠成長期にオーキシンの内生量を増加させると、綿花を増産できることが報告された。これらは、様々な器官の形成期にオーキシン生合成量を適度に調節することにより、高温ストレスに強い作物の開発や、作物およびバイオマスの増産が可能であることを示唆している。

植物のオーキシンの生合成経路は60年以上にわたり不明であったが、私たちは天然オーキシンのインドール-3-酢酸(IAA)が主にトリプトファンアミノ基転移酵素(TAA1)とフラビン含有モノオキシゲナーゼ(YUCCA)により合成されていることを明らかにした。また、シロイヌナズナにはシトクローム P450 モノオキシゲナーゼ(CYP79B)により別経路からも IAA が合成されていることを示した。さらに、私たちは天然オーキシンのフェニル酢酸(PAA)が植物においてオーキシン極性輸送とは異なる仕組みで細胞間を移動するユニークな性質をもつことを発見した。本研究では、このユニークな性質をもつ PAA の作用機構と生理的役割を解明し、その機能を器官形成制御に利用することを目指した。さらに、小穂で IAA や PAA の生合成量を制御することにより、高温ストレス下でも雄蕊を形成して高い稔実性を維持できるオオムギの開発に取り組んだ。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

天然オーキシンである PAA の生理機能を明らかにするためその作用機構を解析した。PAA は IAA と同様に非維管束植物を含む様々な植物に存在し、IAA よりオーキシン活性は低いが、シロイヌナズナのほぼ全ての器官で IAA より内生量が多いことが分かった。PAA の生合成には IAA の生合成と同様に YUCCA が、PAA の不活化にも IAA 不活化酵素である GH3 が関与する可能性が高い。また、シロイヌナズナには CYP79A2 の関与する PAA 生合成経路も存在することが示唆された。植物における IAA と PAA の輸送機構は異なり、IAA はオーキシン極性輸送により濃度調節されるが、PAA はこれと異なる機構で制御されていることが判明した。PAA は IAA と同じく TIR1/AFB 経路でオーキシン早期応答遺伝子を制御するが、これら2つのオーキシンが制御する遺伝子には差があり、多くの機能未知遺伝子が PAA 特異

的に誘導されることが明らかになった。これらの結果、PAA は植物界に広く存在するオーキシ  
ンで、IAA と協調的に植物の成長や分化の制御に関与する可能性のあることが示された(論  
文投稿中)。

本研究で新たに同定した PAA 生合成遺伝子や、これまでに植物や微生物から発見された  
IAA 生合成遺伝子を利用し、高温ストレス下でも小穂でこれらの遺伝子を発現誘導すること  
により高い稔実性を維持できるオオムギの開発を進めた。高温ストレスは小穂の IAA 量を著しく  
減少させるが、このとき複数のオーキシン生合成遺伝子の発現が抑制されていた。一方、オ  
ーキシン代謝遺伝子の発現には変化が見られないことから、高温ストレスが原因で生じる  
IAA 量の減少は主として生合成の低下によるものと考えられた。これまでに、異なるオーキシ  
ン生合成経路の2つの遺伝子(YUCCA2、*iaaM*)をそれぞれ導入した遺伝子組換えオオムギ  
の作成に成功しており、今後、これらを使って高温ストレス下でもオーキシン量を増加できる  
生合成遺伝子の選定を進める。また、高温ストレスにより小穂で発現誘導される遺伝子を複  
数同定していることから、これらの遺伝子のプロモーターを使ってオーキシン生合成遺伝子を  
オオムギに発現させて高温障害耐性を試験する予定である。

## (2) 詳細

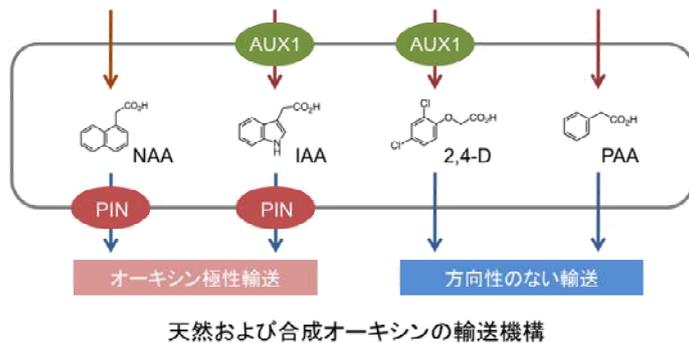
### 研究テーマ①「天然オーキシン PAA の作用機構および生理的役割の解明」

PAA の作用機構や生理的役割を解明するために、まず植物界における PAA の分布を質量  
分析法により調べたところ、非維管束植物を含む様々な植物から検出され、PAA が植物界に  
広く存在する天然オーキシンであることが示された。また、PAA のオーキシン活性はシロイヌ  
ナズナの側根形成促進作用において IAA よりも 10 倍程度低いが、殆どの器官で PAA の方  
が IAA よりも内生量が多いことが分かった。

PAA 生合成経路について解析したところ、IAA 生合成に含まれる数種の YUCCA 遺伝子を  
シロイヌナズナで高発現させると、PAA 量は変化しないが、その代謝物である PAA-アミノ酸  
結合体が顕著に増加した。また、大腸菌で調製した YUCCA6 タンパク質を使って酵素活性を  
調べたところ、フェニルピルビン酸(PPA)から PAA を生成した(Dai & Mashiguchi et al.  
2013)。従って、植物の PAA 生合成には YUCCA が関与していることが強く示唆された。ま  
た、フェニルアセトアルドキシム(PAOx)を生成する CYP79A2 をシロイヌナズナで高発現させ  
ると PAA と PAA-アミノ酸結合体の量が増加したことから、PAOx を介した PAA 生合成経路も  
同植物に存在することが示唆された。IAA から IAA-アミノ酸結合体を生成する GH3 ファミリー  
のひとつ GH3.9 の遺伝子をシロイヌナズナで高発現させると、IAA-グルタミン酸結合体と  
PAA-グルタミン酸結合体の量が著しく増加した。よって、PAA の生合成だけでなく、その不活  
化にも IAA と同じ代謝酵素が関与することが示唆された。

植物の軸器官における IAA の濃度分布はオーキシン輸送阻害剤(NPA)や重力刺激によっ  
て変動する。そこで、NPA や重力刺激が PAA の濃度分布に与える影響をトウモロコシ黄化芽  
生えの幼葉鞘を使って解析した。その結果、先端部への NPA 処理により基部方向へのオー  
キシン極性輸送が阻害されるため、IAA 量は先端部で増加し、反対に基部側で減少したが、  
PAA の濃度分布パターンにはこのような変化が見られなかった。また、横方向から重力刺激  
を与えることによって IAA 量は重力側で急速に増加し、その反対側で減少したが、PAA の濃

度分布パターンには変化がなかった。さらに、オーキシン生合成が低下したために根の形成異常を示すシロイヌナズナの *yucca3,5,7,8,9* 欠損変異体 (*yucQ*) に IAA と PAA をそれぞれ投与すると、IAA は根の形態を回復できるが、PAA は根の重力屈性を回復できないことが明らかになった。これらの結果、植物における IAA と PAA の移動特性は異なり、IAA はオーキシン極性輸送により調節されるが、PAA はこれと異なる方向性のない輸送機構で制御されていると考えられた。興味深いことに、*yucQ* の回復実験において合成オーキシンの 1-ナフトレン酢酸 (NAA) は IAA と同様に根の形態を回復したが、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) は PAA と同じく重力屈性を回復することができなかったことから、強力な除草剤として古くから利用されてきた 2,4-D は IAA ではなく PAA と似た移動特性をもつ合成オーキシンであることが明らかになった(右図)。



PAA のシグナル伝達機構を解析したところ、PAA がシロイヌナズナにおいてオーキシン誘導性プロモーター DR5:GUS の発現を誘導し、またオーキシン受容体 TIR1/AFB の阻害剤である auxinole の共処理によりその発現が抑制されたことから、TIR1/AFB を介してシグナル伝達することが示唆された。酵母ツーハイブリッド系により TIR1/AFB-Aux/IAA 複合体の形成を調べたところ、IAA よりも 10 倍ほど活性は低いが、PAA が様々な組み合わせの複合体の形成を促進することが明らかになった。また、プルダウン法によっても PAA が TIR1/AFB と Aux/IAA の結合を促進することが示された。これらの結果、PAA は IAA と同じ TIR1/AFB 経路でシグナル伝達することが明らかになった。

PAA の生理的役割を明らかにするため、シロイヌナズナの IAA および PAA 早期応答遺伝子をマイクロアレイにて解析した。PAA は IAA と同様に *Aux/IAA* や *GH3* など多くのオーキシン早期応答遺伝子を誘導したが、PAA 特異的に応答する遺伝子も多数存在することが明らかになった。また PAA 特異的に応答する遺伝子には機能未知タンパク質をコードするものが多数含まれていた。以上の結果から、IAA と PAA の2種類のオーキシンが植物界に広く存在し、PAA も植物の成長や分化の制御において重要な役割をもつ可能性を示した(現在投稿中)。現在、PAA の生理的役割を解明するため、PAA 特異的に応答する遺伝子の機能解析を進めている。また、PAA を選択的に不活化して欠損させることのできる代謝酵素を、酵母による代謝活性スクリーニング法 (Tanaka et al. 2014) により探索している。

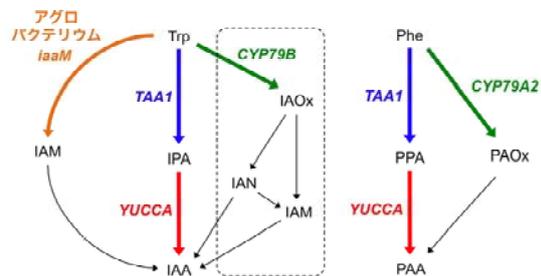
## 研究テーマ②「小穂における高温ストレス誘導的なオーキシン生合成遺伝子の発現制御および高温障害耐性オオムギの開発」

オオムギが雄蕊の形成初期に高温ストレスを受けると、オーキシンが減少して雄性不稔を生じることが高温障害の原因のひとつとして示されている。そこで植物や微生物から発見された IAA および PAA の生合成遺伝子をオオムギに導入し、高温ストレスを受けた時に小穂で高発現させてオーキシン量を維持できるオオムギの作出を目標に研究を進めた。

オオムギ(はるな二条)を使った実験系を確立し、高温ストレスによる小穂のオーキシン量への影響を調べたところ、小穂の IAA 内生量が顕著に減少することが質量分析法により確認された。このとき小穂で発現する主なオーキシン生合成遺伝子の発現量を解析したところ、TAA および YUCCA ファミリーの発現量が著しく減少した。一方、オーキシン不活化酵素をコードする GH3 ファミリーの発現量には有意な差が認められなかった。よって、高温ストレスによる小穂のオーキシンの減少は生合成の低下による影響が大きいことが示唆された。

次に、高温ストレスを受けた時に小穂で高発現する遺伝子をマイクロアレイの解析データをもとに選抜した。高温ストレスで誘導される auxin-repressed protein などの遺伝子を定量 PCR 解析し、小穂で高温により 1.5 倍から 10 倍ほど発現が誘導される9遺伝子を同定した。小穂でオーキシン生合成遺伝子を発現誘導させる時に利用するために、このうち3遺伝子のプロモーター領域のクローニングを進めている。

植物で高発現させることによりオーキシン内生量を増加することができるオーキシン生合成遺伝子は YUCCA、CYP79B2、CYP79A2、*iaaM* の4遺伝子である(右図)。YUCCA はオーキシン生合成主経路の律速酵素であるが、高温ストレスにより上流の TAA1 ホモログの発現が低下することからオーキシンの生合成に必要な中間体(IPA)の量が減少すると予想され、オオムギで高発現させてもオーキシン量を増加できない可能性がある。



シロイヌナズナおよびアグロバクテリウムのオーキシン生合成経路。黒字はオーキシン生合成中間体、黒矢印はオオムギで未同定の酵素反応ステップ。点線内はシロイヌナズナに存在するアブラナ科固有の経路。

一方、CYP79B2、CYP79A2、*iaaM* はそれぞれの生合成経路の第一段階を触媒する酵素であり、オオムギにおいて残りの生合成酵素が機能しているかについてはまだ確認されていない。そこで、エストラジオール誘導型発現系を用いてこれらの生合成遺伝子をオオムギで発現させ、高温ストレス条件下でもオーキシン量を有意に増加させることができる遺伝子を選抜する計画を立てていた。しかし、オオムギの形質転換は当初予想していたよりも非常に難しく、単独では遺伝子の導入に成功できず、研究計画が遅れることとなった。そこで、岡山大学の佐藤和広教授ならびに久野裕博士のご協力を得て、共同研究によりオオムギの形質転換を行って頂いた結果、これまでに YUCCA2 と *iaaM* の遺伝子組換え体を得ることに成功した。今後、これら遺伝子組換えオオムギ系統を使って、高温ストレス条件下でもオーキシンを増加できる生合成遺伝子の選定を進める。また、このオーキシン生合成遺伝子を高温誘導遺伝子のプロモーターを使って小穂で発現させてオオムギの高温障害耐性を調べる。

### 3. 今後の展開

本研究成果は、極性輸送とは異なる機構で調節されるオーキシンの分布、生合成機構、不活化機構、シグナル伝達機構、早期応答遺伝子の解明により、このオーキシンが植物の成長や環境応答の制御に参与する新たな可能性を示した。今後、植物における PAA と IAA の生理的役割の違いを明らかにしたい。さらに、強力な除草剤として古くから用いられてきた合成オーキシン 2,4-D と似た移動特性を PAA がもつことから、PAA の移動の仕組みを分子レベルで解明し、新たな植物成長調整剤などの開発研究に繋げたい。また、オオムギの小穂におけるオーキシン生

合成量を制御することにより、高温ストレス下での生殖器官の形成を正常に保ち、様々な農作物に高温ストレス耐性を獲得させる技術の開発に今後も取り組みたいと考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究の主たる成果は、極性輸送とは異なる機構で調節されるオーキシンの分布、生合成機構、不活化機構、シグナル伝達機構、早期応答遺伝子の解明により、このオーキシンが植物の成長や環境応答の制御に関与する新たな可能性を示したことである。本研究においては、研究費で導入した質量分析装置などの分析機器を駆使して微量の代謝物の同定や定量を行い、オーキシンの新たな生合成・不活化経路を解明した。強力な除草剤として古くから使われてきた合成オーキシンと似た移動特性をもつ天然オーキシンを発見したことは、今後、作物やバイオマスの増産に向けた新たな植物成長調整剤の開発に繋がる可能性が期待できる。一方、当初の計画通りにオオムギの形質転換実験が進まず、研究計画に遅れを生じたことが反省点として挙げられる。このさきがけ期間に学際分野の様々な研究者と交流し、共同研究をする機会を得られたことは、自身にとって非常に大きな価値があった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

これまでに知られていた主要なオーキシン(インドール酢酸)とは別の、極性輸送されないタイプのオーキシン(フェニル酢酸)について、その生合成や生理機能を明らかにし、これらの生合成遺伝子の導入により、不良環境耐性、特にオオムギの高温不稔現象を回避する機能を付与しようと研究が進められた。これまでに、フェニル酢酸の生合成系を明らかにするなど、基礎的な研究は進展し、研究者としての高い評価を得、今後のフェニル酢酸の植物ホルモンとしての研究を進展させる駆動力になったといえる。現時点では、フェニル酢酸とインドール酢酸の生合成系の共通性も影響して、両ホルモンの植物における使い分けの機構や、フェニル酢酸の独自の生理機能を明確に示すことはできず、形質転換系の確立の遅れから、形質転換植物が得られたもののオオムギへの高温耐性の付与についての明確な結論も未だ得られていない。目標が明確で期待が大きい研究ではあったので、今後も本研究を継続して目標を達成して欲しい。

これまでに新オーキシン活用の基盤的な知見は得ているので、今後、研究を継続する中で、新オーキシン活用による植物の生長制御技術を開発することが期待される。特に、現在進行中のオオムギの形質転換実験の成果は注目に値する。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Xinhua Dai, Kiyoshi Mashiguchi, Qingguo Chen, Hiroyuki Kasahara, Yuji Kamiya, Sunil Ojha, Jennifer Dubois, David Ballou, Yunde Zhao. The biochemical

mechanism of auxin biosynthesis by an Arabidopsis YUCCA flavin-containing monooxygenase. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 1448-57.

2. Keita Tanaka, Ken-ichiro Hayashi, Masahiro Natsume, Yuji Kamiya, Hitoshi Sakakibara, Hiroshi Kawaide, Hiroyuki Kasahara. UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.*, 2014, 55: 218-28.

3. Qingguo Chen, Xinhua Dai, Henrique De-Paoli, Youfa Cheng, Yumiko Takebayashi, Hiroyuki Kasahara, Yuji Kamiya, Yunde Zhao. Auxin Overproduction in Shoots Cannot Rescue Auxin Deficiencies in Arabidopsis Roots, *Plant Cell Physiol.*, 2014, 55: 1072-9.

## (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### <招待講演>

1. 笠原 博幸、植物の多様なオーキシン生合成・不活性化機構、第51回植物化学シンポジウム、仙台、2014.
2. Hiroyuki Kasahara. Indole-3-acetic acid and phenylacetic acid are two natural auxins in plants with distinct transport characteristics. Plant Growth Regulation Society of America (PGRSA) and the Japanese Society for the Chemical Regulation of Plants (JSCRPA) joint meeting. San Francisco, USA, 2014.
3. 笠原 博幸、オーキシン生合成とフラビンモノオキシゲナーゼ、日本植物生理学会年会シンポジウム、岡山、2013.
4. Hiroyuki Kasahara. Discovery of a novel nonpolar transport-type auxin in plants. Auxin 2012. Hawaii, USA, 2012.
5. 笠原 博幸、オーキシン：その生合成経路の解明と今後の展開、第27回農薬デザイン研究会(日本農薬学会主催)、東京、2012.
6. Hiroyuki Kasahara. The main auxin biosynthesis pathway in plants. 第53回日本植物生理学会年会シンポジウム、京都、2012.

### <受賞>

笠原 博幸、第9回(平成24年度)日本学術振興会賞「植物におけるオーキシン生合成主経路の解明」

### <TV出演>

笠原 博幸、BSジャパン、咲くシーズン「植物が創り出す未来(笠原博幸)」、2013.

### <新聞記事>

笠原 博幸、読売新聞「駆ける」、2015.

# 研究報告書

## 「植物の鉄センシング機構解明による生産力の強化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 小林 高範

### 1. 研究のねらい

植物が生育し、炭酸固定と物質生産を行うためには鉄が必要である。植物は土壌中から鉄を吸収して利用するが、好気的な環境下では鉄はほとんど溶けていない。世界の土壌のおよそ 30% を占めている石灰質アルカリ土壌では鉄の溶解度がとりわけ低く、植物にとって鉄欠乏が生育の主要な制限要因となる。したがって、より高い植物生産性のためには、植物が鉄を効率的に吸収・利用するメカニズムを理解して応用することが必須である。植物は鉄欠乏に応答して、種々の遺伝子を発現誘導するが、その根本となる鉄欠乏シグナルと鉄センサー分子の実体は未だ不明である。

本研究では、この鉄欠乏シグナルと鉄センサー分子の実体を解明することにより、植物の鉄欠乏応答メカニズムの全貌を概観することを目指した。具体的には、イネの二種類の鉄結合因子に着目して解析を行い、これらが鉄センサー分子である可能性を探索した。

一つ目の因子は、イネの鉄欠乏応答を正に制御する転写因子 IDEF1 である。IDEF1 は二価鉄および他の二価金属と可逆的に結合する。また、鉄欠乏の進行に伴って IDEF1 が制御する標的遺伝子の種類が変化することから、IDEF1 は鉄栄養状態を感知するセンサー分子である可能性が示唆された。

二つ目の因子は、鉄欠乏誘導性 RING-finger タンパク質 HRZ である。HRZ の機能は全く知られていなかったが、HRZ タンパク質は鉄結合ドメインとユビキチン化触媒ドメインを持ち、これは哺乳類の鉄センサー FBXL5 と似たドメイン構造であることから、植物の新規鉄センサー候補分子と考えられた。

本研究ではこれらの因子の鉄感知における役割を解明することにより、鉄の利用性を向上させた植物、とりわけ穀物を創製・適用するための遺伝子工学的技術とその基盤的知見を提示することを狙った。これにより、植物による物質生産性の高効率化、二酸化炭素資源化に貢献することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

- ・ IDEF1 と GFP との融合タンパク質を発現する形質転換イネを作製・解析した。IDEF1-GFP は鉄栄養条件に関わらず常に核に局在した。
- ・ IDEF1 と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法により探索・同定した。これらのうち Bowman-Birk 型トリプシンインヒビターを IBP1 と命名した。IBP1 の発現は IDEF1 依存的に鉄欠乏で誘導された。IDEF1 タンパク質の分解は IBP1 により阻害された。以上の成果を論文発表した(論文2)。

- ・ イネの鉄欠乏誘導性 RING-finger 型ユビキチンリガーゼを2種類同定し、OsHRZ1、OsHRZ2 と命名した。これらが鉄および亜鉛と結合し、ユビキチン化活性を持つことを証明した。これらの発現を低下させたイネは鉄欠乏耐性と鉄蓄積を示し、鉄の吸収・移行を担う鉄欠乏誘導性遺伝子の発現が鉄十分条件で亢進していたことから、これらは鉄欠乏応答を負に制御する因子であり、鉄センサーの候補分子と考えられた。以上の結果から特許を出願し、論文発表・プレスリリースを行った(特許1、論文1、プレスリリース1)。
- ・ 非形質転換イネおよび HRZ の発現を低下させたイネを用いてマイクロアレイ解析とプロテオーム解析を行った。イネ根の鉄欠乏応答には転写制御とタンパク質レベルの制御の両方が重要であることが示唆された。
- ・ 植物の鉄センシングに関する総説(総説1)、イネ根の鉄欠乏応答に関する総説(総説2)を発表した。

## (2) 詳細

### ・研究テーマ1-a 「IDEF1 のイネ体内における動態の解析」

オオムギの鉄欠乏誘導性 *IDS2* 遺伝子のプロモーターおよび、*IDEF1* 遺伝子自身のプロモーターの2種を用いて、完全長の *IDEF1*、または金属結合ドメインを欠失した *IDEF1* と GFP との融合タンパク質を発現する形質転換イネを作製した。コントロールとして、*ccdB* と GFP との融合タンパク質を発現するイネを作製した。これらのイネを様々な鉄栄養条件下で生育させ、GFP 蛍光を観察したところ、*IDEF1*-GFP は常に核に観察された。当初期待していたような鉄栄養条件による細胞内局在の変化は認められなかった。

ウエスタン解析により *IDEF1* タンパク質の発現量(分解制御)を調査した。非形質転換植物では *IDEF1* の発現量が低いため明確な結果が得られなかったが、一過的に遺伝子導入した *IDEF1* は 26S プロテアソーム阻害剤である MG132 により発現量が上昇したことから、*IDEF1* が 26S プロテアソーム系により分解されることが示唆された。

### ・研究テーマ1-b 「IDEF1 と相互作用する分子の探索と解析」

酵母 two-hybrid 法を用いて *IDEF1* と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を33種類同定した。これらのうち鉄の感知に直結するものは見いだされていないが、鉄欠乏誘導性 Bowman-Birk 型トリプシンインヒビターが2種類含まれていた。これらは互いに相同性が高く、*IDEF1*-binding protein 1;1 (*IBP1;1*)、*IBP1;2* と命名した。これらの発現は *IDEF1* によって正に制御されていた。*IBP1;1* についてプルダウン法により *IDEF1* との結合を確認した。*IBP1;1* を過剰発現する形質転換イネを取得した。このイネでは *IDEF1* が制御する鉄・キレーター複合体のトランスポーター遺伝子 *OsYSL2* の発現量が上昇していた。*IBP1;1* が *IDEF1* のタンパク質分解を抑制することが *in vitro* 分解実験および一過的発現系により明らかになった。鉄欠乏により誘導された *IBP1* が、鉄欠乏応答に必要な *IDEF1* の量の確保に貢献していると推察されるが、この現象が鉄の感知に関わるかどうかは不明である。

### ・研究テーマ2 「鉄欠乏誘導性 RING-finger タンパク質の解析」

イネの鉄欠乏誘導性遺伝子の中から鉄結合ドメインとユビキチン化触媒ドメインを持つ2つの遺伝子を見だし、それらを *Oryza sativa* Hemerythrin motif-containing Really Interesting New Gene (RING)- and Zinc-finger protein 1 (*OsHRZ1*)、*OsHRZ2* と命名した。大腸菌で発現

させたりコンビナントタンパク質の解析により、OsHRZ1、OsHRZ2 およびシロイヌナズナのホモログである BRUTUS が鉄および亜鉛と結合し、ユビキチン化活性を持つことを証明した。OsHRZ1、OsHRZ2 の発現は鉄欠乏誘導性であり、IDEF1 により正に制御された。OsHRZ1 と OsHRZ2 の発現を低下させた形質転換イネを作製した。これらのイネは水耕栽培と石灰質土壌における長期的なポット栽培の両方で鉄欠乏耐性を示した。また、これらのイネは栽培時の鉄栄養条件に関わらず非形質転換イネに比べて2~4倍程度の鉄を種子と葉に蓄積した。亜鉛も非形質転換イネよりも多く蓄積した。韓国の隔離圃場における栽培(業者委託)でも種子への鉄・亜鉛の蓄積が認められた。これらのイネの鉄十分条件の根では、鉄の吸収・移行を担う鉄欠乏誘導性遺伝子の発現が亢進していた。以上のことから、HRZ は鉄欠乏応答を負に制御する因子であり、鉄センサーの候補分子と考えられた。

非形質転換イネおよび HRZ の発現を低下させたノックダウンイネを用いて 44K マイクロアレイ解析とプロテオーム解析(業者委託、iTRAQ 法)を行った。これらの結果を比較したところ、イネ根の鉄欠乏応答には転写制御とタンパク質レベルの制御の両方が重要であることが示唆された。また、HRZ ノックダウンイネで発現が上昇しているタンパク質は HRZ がユビキチン化により分解する標的タンパク質の候補と考えられる。

#### まとめ(鉄センシング機構解明に向けて)

細胞内の鉄センサーに関しては明確な定義がない。そこで、鉄センサーの定義を提唱した(総説1)。ある分子が鉄センサーであるためには、(i)鉄または関連分子と結合すること(input)、(ii)それにより機能が変わること(transmission)、(iii)鉄栄養の恒常性を制御すること(output)という3つの条件を満たすことが必要十分であると考えられる。

これらの条件のうち、IDEF1 に関しては(i)と(iii)が本研究以前に明らかになっており、本研究で(ii)の証明を試みたが現在までに達成できていない。一方、HRZ に関しては本研究で(i)と(iii)が明らかになった。(ii)の証明は現在までに達成できていない。

### 3. 今後の展開

IDEF1 と HRZ の双方に関して、鉄センサーであることを証明するための残りの必須条件である「鉄または関連分子との結合により機能が変わること(transmission)」の証明を目指す。特に、IDEF1 の DNA 結合活性とタンパク質安定性、HRZ の細胞内局在とタンパク質安定性が鉄または他の金属との結合に影響を受けるかどうかについて検討を進める。これにより、IDEF1 と HRZ が真の細胞内鉄センサーであることが証明され、これらが結合する鉄または他の金属が鉄欠乏シグナルの実体であることが同時に証明されるものと期待される。

IDEF1 と HRZ による鉄センシング機構の実体が解明されれば、これを応用して、既存のものよりも優れた鉄欠乏耐性植物および鉄・亜鉛富化作物の創製に取り組む。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

IDEF1 に関しては、金属との結合状態が転写因子の機能と直結することを示す証拠は未だ得られていない。仮説の一つであった細胞内局在の変化に関しては否定的な結果が得られた。残りの仮説である DNA 結合活性、転写活性、分解に関しては、実験系の構築や

予備実験に時間がかかったため本格的な実験は始まったばかりである。IDEF1 と相互作用する因子の探索と解析に関しては、IDEF1 タンパク質の分解を抑制する因子 IBP1 を同定することができたが、鉄センシング機構に直結する結果は得られなかった。また、IDEF1 を利用した新規鉄欠乏耐性植物を創製することはできなかった。以上のように、IDEF1 に関して当初の目的は達成できなかったが、今後この目的を達成するための基盤作りはある程度達成できたものとする。

HRZ に関しては、当初の期待通り、鉄結合タンパク質であることと、鉄欠乏応答を制御する因子であることが証明できた。また、HRZ は予想に反して鉄だけでなく亜鉛も結合することが明らかになり、鉄栄養制御と他の金属との関連性を解く鍵が見いだされた。HRZ の発現を低下させたイネは鉄欠乏に耐性を示し、本領域の目的である二酸化炭素資源化に貢献できる可能性が見いだされたが、このイネの耐性は既存のものとは比べて高いものではなく、今後さらなる改良が必要である。一方、このイネは鉄栄養条件に関わらず茎葉と種子に顕著な鉄の蓄積を示した。この形質は、鉄欠乏性貧血を予防するための鉄富化作物の創製に貢献するものである。以上の結果から特許を出願し、論文・学会発表・プレスリリースを行うことができた。

HRZ が鉄センサーであることを証明するための様々な実験を現在遂行中であり、興味深い予備の結果を得ている。また、HRZ の持つドメイン構造は、哺乳類の鉄センサー分子および種々の植物ホルモン受容体と類似していることから、植物の鉄センシング機構と他の分子認識機構との間の共通性と特異性を解き明かすための基盤的知見が整ってきたものとする。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

鉄イオンを吸収しにくい塩基性土壌などで十分に生育する植物を育成するための方策として、鉄センサータンパク質候補の機能を明らかにし、その活用によって、鉄吸収を可能とする植物を作成することを目的に研究が進められた。この研究によって候補タンパク質が鉄欠乏を負に制御する鉄欠乏反応タンパク質そのものであることを明らかにし、鉄蓄積量が増加した植物を作成することができた。また、このタンパク質が鉄ばかりでなく亜鉛の吸収をも促進する活性を持つという予想外の成果も得た。こうした成果は、学術上も、また、産業への応用という点からも高く評価される。また、我が国で研究が進んでいる本分野の中心的な研究者としても評価されており、本年度終了課題の中で、特に優れた研究の一つである。

今後は、本研究課題で詰め切れなかった鉄センサーを正に制御する因子の機能解明を進めるとともに、亜鉛のように、他の金属のセンシングや吸収の機能を明らかにすることが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kobayashi, T., Nagasaka, S., Senoura, T., Itai, R.N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K.



Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat. Commun.* (2013) 4, 2792.

2. Zhang, L., Itai, R.N., Yamakawa, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., Kobayashi, T. The Bowman-Birk trypsin inhibitor IBP1 interacts with and prevents degradation of IDEF1 in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* (2014) 32, 841-851.

## (2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発明者: 小林高範、西澤直子

発明の名称: 新規鉄・亜鉛結合性制御因子と、その発現調節による植物の鉄欠乏耐性向上及び可食部への鉄・亜鉛蓄積の促進技術

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 2012/7/26

出願番号: 特願2012-166233

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### ・総説発表

1. Kobayashi, T., Nishizawa, N.K. Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Sci.* (2014) 224, 36-43.

2. Kobayashi, T., Itai, R.N., Nishizawa, N.K. Iron deficiency responses in rice roots. *Rice* (2014) 7, 27.

3. Kobayashi, T., Nishizawa, N.K., Intracellular iron sensing by the direct binding of iron to regulators, *Front. Plant Sci.* (2015) doi: 10.3389/fpls.2015.00155

### ・学会発表

1. Kobayashi, T., Nagasaka, S., Senoura, T., Itai, R.N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. "Regulation of plant iron response and accumulation by iron-binding regulators." Fifth Congress of the International BioIron Society (IBIS), Biennial World Meeting (2013; London, UK)

2. 小林高範 「植物の鉄欠乏応答と鉄センシング」 日本土壌肥料学会 2014年度東京大会 シンポジウム講演

他 10 件(国際学会 4 件、国内学会 6 件)

### ・プレスリリース

1. 「少ない鉄でもよく育ち、鉄を効率的に貯めるイネ」 2013/11/14 科学技術振興機構・石川県立大学 6紙に記事掲載(2013/11/21 北國新聞 35面、2013/11/22 日刊工業新聞 21面、2013/11/26 北陸中日新聞 1面、2013/11/26 日経産業新聞 10面、2013/12/11 日本経済新聞 35面(北陸経済面)、2014/1/1 科学新聞 4面)

# 研究報告書

## 「木質系バイオマスを利用する高付加価値多置換芳香族化合物の精密合成手法の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 中尾 佳亮

### 1. 研究のねらい

芳香族化合物は、医薬、農薬、液晶材料、発光材料など人類の豊かな現代生活を支える多くの有用物質の機能の中心を担う基本化学構造である。現在その供給源は、石油や石炭などの化石資源であることは言うまでもない。このような有用物質の生産、開発をさらに進め、健康的かつ便利な現代生活を維持し、さらに発展させながら、同時に持続可能社会を実現するためには、化石資源に依存しない芳香族化合物の全く新しい供給方法の確立が急務である。

非可食バイオマス、特に木質バイオマスの細胞壁構成成分のうち、約 25-30%を占めるリグニンは、パルプ工場における熱源として利用され、化学修飾を経て得られる代替プラスチック材料も開発されつつあるが、小分子化学製品の原料としての有効な利用法の開発は、未解決である。リグニンは、ベンゼン環を多数含んでいる点が他のバイオマスにはない特長である。したがってリグニンは、芳香族化合物、特に置換ベンゼンの供給源として極めて有望である。しかしながら、既存の化学分解の研究例は、置換フェノールの回収に主眼が置かれている。有用な芳香族物質は、ベンゼン環上の置換基が非常に多様であるため、置換フェノールがそのまま有用物質として利用できる例は限られており、置換フェノールを自在に変換する手法、あるいは、リグニンから多様な置換ベンゼンを直接合成する手法を確立しなければ、リグニンが芳香族化合物の真に優れた供給源とはなり得ない。一方、微生物を利用したリグニン分解も研究されており、ごく最近の研究では、分解生成物を 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸(PDC)に集約して、これを大量合成することも可能になりつつある。しかしながら、PDC 利用の報告例は、二つのカルボン酸を縮合反応に利用した高分子合成に限られており、その合成中間体としての潜在的な有用性、特に置換ベンゼンの合成前駆体としての活用は、全く未踏の領域である。

このような背景から本研究では、木質バイオマスから多置換芳香族化合物を精密合成するための基盤技術の確立を目指した。具体的には、リグニン分解物の芳香族炭素-酸素結合あるいは芳香族炭素-炭素結合を均一系遷移金属触媒によって切断・変換する一般的手法の確立し、リグニンに含まれるベンゼン環を直接利用した医薬品や農薬、液晶材料、発光材料およびこれらの合成中間体など高付加価値化合物を得る有機合成プロセスの開拓を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

第一の成果として、リグニン分解生成物の Ar-O 結合を活性化して、有機ケイ素反応剤とクロスカップリング反応によって任意の有機基を導入する手法を開発した。これを実現する鍵と



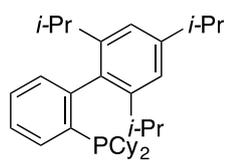
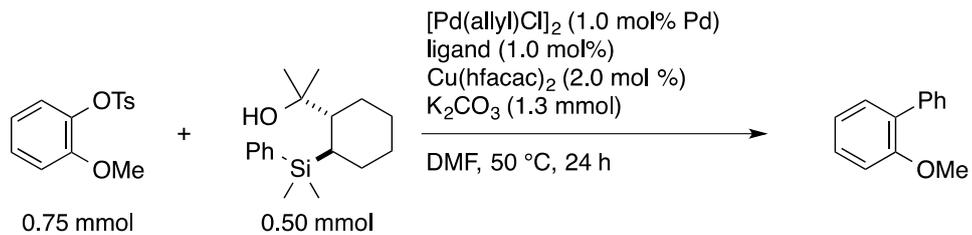
して、リンと窒素を配位部位とする PN 型二座配位子を有するパラジウム触媒と、銅触媒を組み合わせる協働触媒系がきわめて有効であることを見出した。リグニン分解生成物に必須のオルト位にメキシ基を有するフェノール誘導体のクロスカップリング反応は、従来知られているパラジウム単独の触媒では効率が悪かったが、本研究で開発した Pd/Cu 協働触媒系によって、同反応が収率よく進行するようになった。このクロスカップリング反応を利用して、高血圧剤として米国メルク社から市販されているロサルタン(日本での商品名:ニューロタン)の合成中間体を、バニリンから合成することにも成功し、リグニンから医薬品を得る合成経路を提示した。

第二の成果として、リグニン分解生成物を微生物分解して得られる 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸(PDC)から多置換ベンゼンを精密合成する手法を確立した[論文発表(1)]。具体的には、PDC と酢酸ビニルとの脱 CO<sub>2</sub>を伴う環化付加反応、続く酢酸の脱離反応によるイソフタル酸合成、および PDC ジエステルと二置換アセチレンとの脱 CO<sub>2</sub>を伴う環化付加反応による二置換イソフタル酸ジエステルの位置選択的の合成手法を開発した。前者の反応によって、機能性樹脂や繊維材料の原料となる汎用基礎化学品を、後者の反応によって、高付加価値製品への応用が期待できる多様な多置換ベンゼンの合成中間体を、それぞれリグニンから間接的に得る合成経路を提示できた。後者のアルキンとの環化付加反応においては、ルテニウム触媒の添加の有無によって、生成物の置換パターンを制御できる可能性も見いだした。

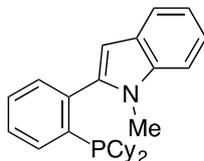
## (2) 詳細

### 研究テーマ A「リグニン分解生成物の Ar-O 結合の活性化・変換のための反応開発」

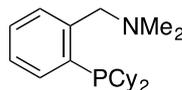
リグニン分解生成物の Ar-O 結合を活性化して、任意の置換基を導入するための基盤技術の開発を目指して、フェノール類から一段階で簡単に合成できるアリアルエステルと有機ケイ素反応剤とのクロスカップリング反応を検討した。様々な反応条件を探索した結果、リンと窒素を配位部位とする PN 型二座配位子を有するパラジウム触媒と、銅触媒を組み合わせる協働触媒系がきわめて有効であることを見出した(下式)。アリアルスルホン酸エステルを求電子剤とするクロスカップリング反応は、これまで多数報告されているが、リグニン分解生成物を基質として用いる例はほとんどなかった。それらの反応においては、嵩高いリン配位子を有するパラジウムを単独触媒として用いる条件が最適であると報告されている。リグニン分解生成物由来の基質に必須のオルト位メキシ基を有するアリアルスルホン酸エステルをモデル化合物として用いた場合、この既知のパラジウム触媒単独では活性が低く、今回開発した Pd-PN/Cu 協働触媒系の顕著な活性が、リグニン由来基質の変換にきわめて重要であることがわかった。



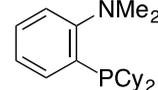
XPhos  
31%



CM-Phos  
28%

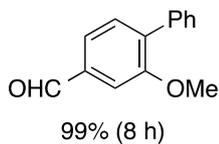
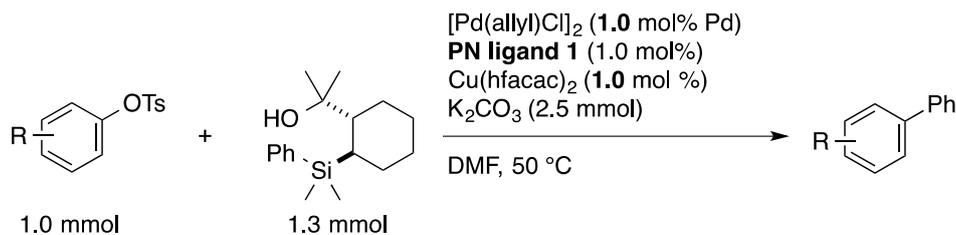


PN ligand 1  
98%

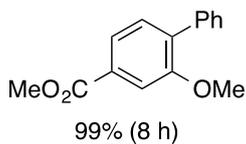


PN ligand 2  
98%

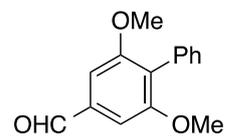
このPd/Cu協働触媒系によって、バニリンやバニリン酸、シリンガアルデヒドの水酸基を、二段階で収率よくフェニル基に変換できることを明らかにした(下式)。



99% (8 h)

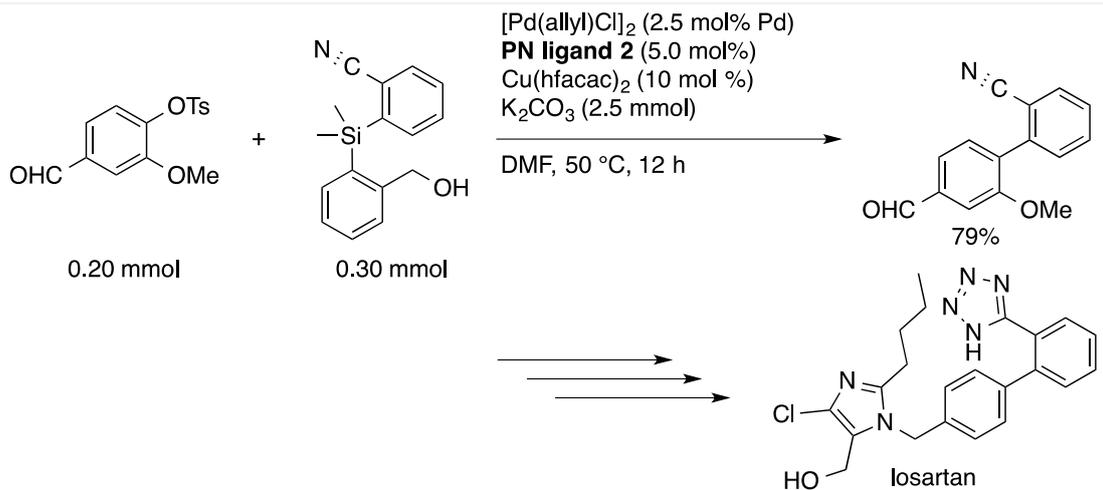


99% (8 h)

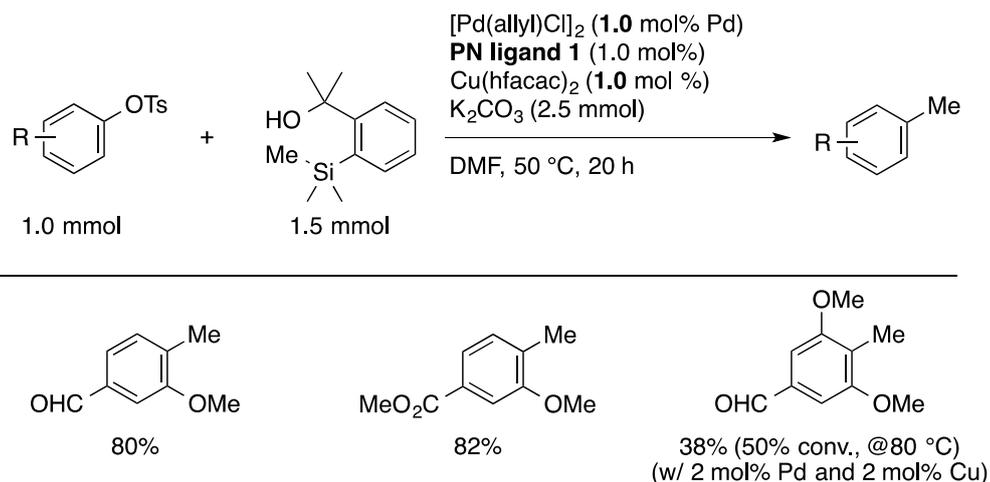


91% (23 h@80 °C)  
(w/ 3 mol% Pd and 2 mol% Cu)

バニリン由来の基質と2-シアノフェニルシラン反応剤とのクロスカップリング反応も、同様の反応条件下、収率よく進行した(下式)。得られた生成物は、Ar-OMe 部位を還元した後(現在、検討中)、ホルミル基とシアノ基をそれぞれ既知の反応を利用して変換することによって、高血圧剤として米国メルク社より市販されているロサルタン(日本での商品名:ニューロタン)へと導くことが可能である(下式)。したがって、リグニン由来物質を、年間数千~数万トンの規模で工業生産されている医薬品へと誘導できる可能性を提示することができた。



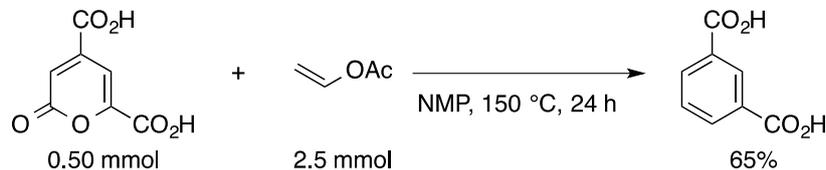
本クロスカップリング反応は、フェニル基や置換フェニル基の導入だけでなく、アルキル基の導入にも展開することができた。具体例として、バニリンやバニリン酸、シリングアルデヒドの水酸基をメチル基に変換した例を示す(下式)。



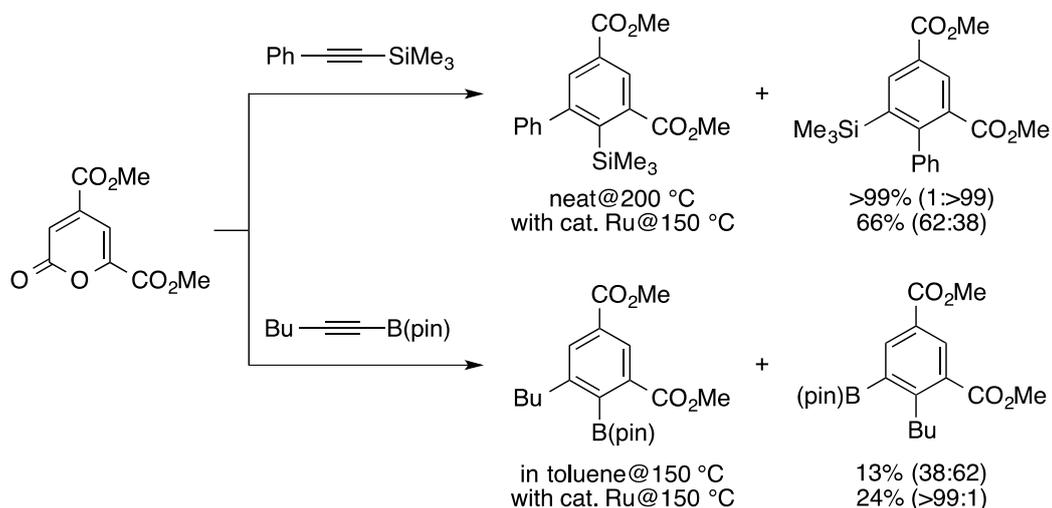
#### 研究テーマ B「PDC 変換による多置換芳香族化合物の合成反応開発」[論文発表(1)]

アルカリ性条件下でのリグニンの酸化的分解や、水熱分解によって得られる低分子の置換ベンゼンリグニン分解生成物は、一般に多様な構造を有する多置換ベンゼンの混合物であるため、構造が明確な低分子化合物を精密合成する際には、これをまず分離しなければならない点が問題となる。一方で、これらをさらに微生物分解することによって、得られる多置換ベンゼンの混合物を、2-ピロン-4,6-ジカルボン酸(PDC)に集約できることが知られている。これを大量合成することも可能になりつつある。したがって、PDC を出発原料として多置換ベンゼンを合成する手法を確立できれば、リグニンから単一構造を有する多置換ベンゼンを精密合成できるようになる。本研究では、PDC およびそのジエステルと、いろいろな酢酸アルケニルとの脱 CO<sub>2</sub>を伴う環化付加反応と、続く酢酸の脱離反応によって、多置換イソフタル酸誘導体を得る手法を確立した。例えば、PDC と、基礎化学品の一つとして工業的に多量生産されている酢

酸ビニルとの反応によって、イソフタル酸を直接得ることに成功した(下式)。イソフタル酸は、機能性の樹脂や繊維材料の出発原料(モノマー)として、年間数十万トン規模で世界中で生産されている。したがって本研究成果は、石油化学由来の汎用基礎化学品を、リグニンから得る経路を提示したものと見える。



PDC ジエステルとアルキンとの反応は、二置換イソフタル酸ジエステルの合成手法として有効であることも見いだした。例えば、フェニル(シリル)アセチレンとの反応は、きわめて高い位置選択性で進行する(下式, 上段)。研究テーマ A で示したように、ケイ素はクロスカップリング反応によって任意の有機基に変換することができるため、本反応は、高付加価値製品の合成中間体となる多様な多置換ベンゼンを精密合成する手法に応用可能であると期待できる。一方、ケイ素と同様に様々な有機基に変換可能なホウ素を有するアルキンとの反応は、低収率で位置選択性も高くない(下式, 下段)。このような場合、ルテニウム触媒を用いると、若干の収率向上と、きわめて高いレベルでの位置選択性の逆転を実現できることを見いだした。同様の位置選択性の逆転は、ケイ素置換アルキンとの反応でも観測された。現状、これらの位置選択性と収率には改善の余地が大きいですが、目的生成物に応じて、触媒の添加の有無によってその構造を制御できる可能性を提示できた。



### 3. 今後の展開

従来とは異なる形式で木質系バイオマスを分解・変換できる均一系金属触媒の可能性は、大いに期待できるものである。本研究では、リグニン分解生成物に特有の化合物構造に特化した検討によって、高活性触媒とこれを利用した有機合成反応、また有用物質への合成経路の提示まで行い、その一端を示せたと考えている。しかしながら、この研究成果は、通常の有機合成反

応をリグニン由来の低分子化合物に適用しただけであり、巨大分子であるリグニン、ましてや木粉を直接分解できる段階にはほど遠い。真のブレークスルーは、有機合成化学あるいは有機金属化学における研究者がこれまで対象としてこなかったこれらの構造および組成的にきわめて複雑な高分子混合物を活性化できる触媒を開発して、はじめて達成できるものである。このゴールへの取り組みは、従来の活性を遥かに凌駕する高活性触媒の探求以外には考えられない。したがって、まずは低分子化合物が対象であっても、真に新しい触媒を開発して、不活性な炭素-酸素および炭素-炭素結合をきわめて高効率にかつ自由自在に活性化できる手法を確立しなければならない。有機合成化学を指向した有機金属化学分野では、このような「真に新しい触媒」の開発が滞っており、既知の触媒が通用する反応基質の探索に陥りがちである。同分野の研究者がこの傾向に迎合せず、チャレンジングな新触媒の開発に真摯に取り組むことによるのみ、将来、この複雑高分子の真に実用的な分解・変換が可能になり、石油化学プロセス由来の経路と相補的なものとして、木質バイオマスからの有用物質合成プロセスが本当に実現できるものと考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

まず、研究目的の達成度に関して、リグニン由来の低分子化合物の変換手法の開発については、当初の想定通りの成果をある程度挙げる事ができたとして自己評価している。実用レベルにはほど遠いが、リグニン由来バイオマスを、医薬品の合成中間体や汎用基礎化学品に短工程で変換できる経路を提示した点は、木質バイオマスの高付加価値物質への変換プロセス確立のための第一歩として、評価に値する成果であると考えている。本研究で見いだした協働金属触媒系は、バイオマス変換への利用にとどまらず、広く有機合成化学一般に適用可能であり、その提案がCREST「新機能創出を目指した分子技術の構築」領域への参画につながった。一方で、リグニンそのものを用いた分解については、実験的な検討にすら至らなかった。低分子のリグニンモデル化合物を用いた検討を現在も行っているが、バニリンなど最小のリグニン由来低分子に対して最適化した触媒が、わずかに官能基が増え、構造が複雑化しているリグニンモデルに対しては必ずしも同じようには作用しないことがわかってきた。したがって、次の段階としてまず、リグニンモデルに特化した触媒開発が必要であり、これに時間がかかっている。この検討は、一見回り道のように思えるが、触媒の構造活性相関とリグニンモデルの分解形式を精密に理解することなく、格段に複雑なリグニンそのものでの検討において成果を挙げることは、きわめて難しいであろう。「3. 今後の展開」でも述べたように、地道ではあるが、このような触媒開発を一步ずつ進めることによるのみ、複雑な高分子混合物の分解に真のブレークスルーがもたらされるものと考えている。CREST 研究では、そのような真に新しい触媒の開発に継続して取り組むことを計画の一部としている。

一方、本領域への参画によって、木質バイオマスの利活用研究に関してそれ以前には知り得なかった情報や見解を得ることができ、真に求められる技術について勉強する機会を得た。特に、本領域の化学系のさきがけ研究者を中心に発足した「木質系バイオマスの利活用に関する研究会」によって、木質系バイオマスの有用物質への変換手法を、それぞれ

異なる化学的アプローチによって開発する研究者との継続的な情報交換の場が得られたので、さきがけ研究終了後も継続して本分野に関する情報収集に役立てたい。また、植物科学分野の研究者との交流が得られた点も、本領域参画の特筆すべき成果の一つである。化合物提供や構造活性相関研究を通じた共同研究の提案に至りつつある交流も得られ、現状例の少ない有機合成化学および有機金属化学の植物科学への貢献も今後大いに期待できると考えている。

研究費に関しては、研究室を主宰し始めるタイミングで本さきがけ研究に採択されたため、核磁気共鳴装置をはじめとする基幹研究設備の拡充に大いに役立てることができ、配属学生の少ない時期に研究補助員の雇用もできたことから、きわめて有効的に執行できたと考えている。

以上のように、本領域の掲げる戦略目標達成の観点からは、限定的ではあるものの、その趣旨に合致しつつ、今後のキャリアにおいて大きな飛躍のきっかけとなる CREST 研究につながった学術的な研究成果を挙げることができた。また、今後の研究の幅を大きく広げる知識と人間関係を得られた点で、さきがけ事業を最大限に有効活用できたと評価している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

木質バイオマスのリグニン分解物から得られる芳香族化合物を材料として、新たな触媒の開発により、芳香族炭素-炭素結合あるいは炭素-酸素結合を切断する手法を確立し、石油由来の化学品をバイオマス由来のものに変換する手法の確立を目的に研究が進められた。これまでに、パラジウム/銅の金属触媒を開発し、イソフタル酸など工業的に重要な化学品の高効率な合成に成功していることは将来の工業化への道を開くものとして高く評価できる。一方、本研究が多様なリグニン分解物のモデルとしての精製化成品を材料とした化学反応に限定されたことについては、やや残念であった。

木質バイオマス活用研究の今後の一つの大きな課題はリグニンの活用であり、今後触媒化学の立場から、リグニンを材料としたバイオリファイナリーの分野の主導的な研究者として、発展し、大成して欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Keisho Okura, Ryuichi Tamura, Kiyotaka Shigehara, Eiji Masai, Masaya Nakamura, Yuichiro Otsuka, Yoshihiro Katayama, Yoshiaki Nakao, Synthesis of Polysubstituted Benzenes from 2-Pyrone-4,6-dicarboxylic Acid. Chemistry Letters, 2014, 43, 1349-1351

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な招待講演

中尾佳亮, 協働金属触媒による炭素—炭素結合形成反応, 第47回有機金属若手の会夏の学校, 休暇村大久野島, 2014/9/3.

中尾佳亮, 触媒を複合利用して新反応をみつける, 有機合成夏期セミナー「明日の有機合成化学」, 大阪科学技術センター, 2014/8/28.

Yoshiaki Nakao, C–C Bond Forming Reactions by Cooperative Metal Catalysis, ICOMC2014 Post-Symposium in Okayama, Okayama, 2014/ 7/ 20.

Yoshiaki Nakao, C–C Bond Forming Reactions by Cooperative Metal Catalysis (Keynote lecture), The 19th International Symposium on Homogeneous Catalysis (ISHC-19), Ottawa, 2014/7/9.

中尾佳亮, 協働金属触媒による炭素—炭素結合形成付加反応, 近畿化学協会 有機金属部会 平成 25 年度第 3 回例会, 北海道大学, 2013/11/19.

中尾佳亮, 協働金属触媒による分子活性化:触媒の複合利用によってはじめて達成できる有機合成反応の開発を目指して, 日本化学会第93春季年会 特別企画 分子活性化:生命化学から有機合成化学へのメッセージ, 立命館大学, 2013/3/25.

#### 主要な学会発表

Akito Ohgi, Kazuhiko Semba, Yoshiaki Nakao, Tamejiro Hiyama, Cross-coupling Reaction of Organosilicon Reagents with Aryl Sulfonates through Intramolecular Activation, The 2nd International Conference on Organometallics and Catalysis, PP-81, Nara, 2014/ 10/ 27.

Akito Ohgi, Kazuhiko Semba, Yoshiaki Nakao, Tamejiro Hiyama, Cross-coupling Reaction of Organosilicon Reagents with Aryl Sulfonates through Intramolecular Activation, The 26th International Conference on Organometallic Chemistry, 1P121, Sapporo, 2014/ 7/ 14.

大木暁登, 仙波一彦, 中尾佳亮, 檜山爲次郎, 分子内活性化を利用したケイ素反応剤とスルホン酸アリールとの交差カップリング反応, JACI/GSC シンポジウム, A-73, 東京, 2014/5/23.

大木暁登, 仙波一彦, 中尾佳亮, 檜山爲次郎, 分子内活性化を利用したケイ素反応剤とスルホン酸アリールとの交差カップリング反応, 第 60 回有機金属化学討論会, P3A-31, 東京, 2013/ 9/ 14.

大木暁登, 中尾佳亮, 檜山爲次郎, 分子内活性化を利用したケイ素反応剤とスルホン酸アリールとの交差カップリング反応, 日本化学会第 93 春季年会, 3F4-42, 滋賀, 2013/ 3/ 24.

Akito Ohgi, Shi Tang, Masahide Takeda, Yoshiaki Nakao, Tamejiro Hiyama, Nickel-catalyzed Cross-Coupling Reactions of Tetraorganosilanes with Aryl Tosylates, The Twelfth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, PA-063, Kyoto, 2012/ 11/ 13.

#### 受賞

第4回井上リサーチアワード

#### 著作物

中尾佳亮, 均一系金属触媒を用いたリグニン分解, リグニン利用の最新動向, 坂志朗編, CMC, 2013.

#### その他の特記事項

平成23年10月に京都大学大学院工学研究科准教授に, 平成26年4月に同教授に昇任した。

平成26年10月より, 戦略的創造研究推進事業 CREST「新機能創出を目指した分子技術の構築」の研究代表者として採択された(研究課題名「多元素協働触媒による分子変換手法の創出」)。本さきがけ研究で見いだした Pd/Cu 協働触媒系を, バイオマスの変換だけでなく, 一般的な有機合成手法として発展させていく研究計画が大きな柱の一つとなっている。したがって, さきがけ研究の成果が部分的に認められて, CREST へのステップアップにつながったものと考えている。

# 研究報告書

## 「植物生産能の高度利用に向けた「植物 iPS 遺伝子」の応用展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 中島 敬二

### 1. 研究のねらい

本研究では、植物細胞を初期化する能力をもつ *RKD4* 遺伝子(植物 iPS 遺伝子)について、初期化メカニズムを解明する学術研究と実用に向けたモデル実験を行い、この遺伝子を植物生産力の活用に用いるための知識と技術基盤を構築する。

再生可能エネルギーの生産手段として、植物の炭酸同化能が不可欠なのは言うまでもない。現在、その原料として用いられているサトウキビなどは、元来、食糧として品種化されたものが使われているが、今後はバイオ燃料用途に特化した品種改良や分子育種が必要になる。また農地外で栽培できる非食糧性の植物(樹木など)で新たな品種を開発する必要が生じる。さらには有用機能を発現する細胞を分化誘導し、これらを純粋培養する技術も期待される。このような技術を実用化するためには、有用植物を効率的に繁殖させたり、高い生産性をもつ細胞を分化誘導して培養する技術が必須である。

シロイヌナズナの *RKD4* 遺伝子は、RWP-RK という保存されたアミノ酸配列モチーフを持つ推定転写因子をコードし、その相同遺伝子は様々な植物のゲノムに広く見出される。*RKD4* は配偶子や初期胚のみで発現する遺伝子であるが、葉や根などの体細胞で強制発現させると初期胚の性質をもつ細胞塊(以下、初期化細胞塊と呼ぶ)を誘導することができる。その後 *RKD4* の過剰発現を停止させることにより、初期化細胞塊から大量の胚を誘導し、さらに個体にまで再生することができる(Waki et al. *Current Biology*, 2011)。*RKD4* が持つ体細胞リプログラミング機能は iPS 細胞における山中ファクターに類似しており、メディアは我々の成果を「植物 iPS 遺伝子の発見」と報じた。本研究では、*RKD4* によるリプログラミングの分子機構を解明するとともに、機能オルソログ遺伝子を様々な植物から単離しその初期化能を検証する。また *RKD4* の初期化能を強化するための改変を試みる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

まずシロイヌナズナにおいて *RKD* の過剰発現による初期化方法を最適化した。シロイヌナズナの5つの *RKD* 遺伝子 (*RKD1-RKD5*)について、各 100ライン以上の誘導型過剰発現体を作製して解析した結果、*RKD5* 以外の4つの *RKD* 遺伝子に同等の初期化能があることが明らかとなった。次に *RKD4* を用いて導入遺伝子の構造を検討し、高発現株を得るための鍵となる情報が得られた。また *RKD4* の弱い転写活性化能を VP16 由来の転写活性化ドメインで強化することを試みたが、予想に反して初期化能が消失した。*RKD4* による初期化が、単なる標的遺伝子の転写活性化によるものではないことが示唆される。また誘導剤を含む液体培地で直接発芽させて振とう培養することで、高い増殖能をもつ初期化細胞懸濁培養株を簡便に取得する方法を考案した。この系を用いた解析により、初期化に伴うヒストン修飾の変化が明らか

となり、*RKD* による体細胞の初期化にエピジェネティックな制御が関与していることが示唆された。

*RKD* による体細胞の初期化を他の植物種に応用するため、様々な植物ゲノムで *RKD* 遺伝子を検索したところ、進化系統樹上でコケ植物以降の植物種には、例外なく *RKD* 遺伝子が存在することが明らかとなった。また、維管束植物の *RKD* は3系統に分けることができ、シロイヌナズナでは *RKD1-3*, *RKD4*, *RKD5* がそれぞれ別系統に属していた。シロイヌナズナの *RKD5* は成熟器官でも発現しており、初期化能も示さないことから異なる機能をもつと考えられる。

次にポプラの *RKD* 遺伝子を用いて初期化能を検討した。ポプラゲノムには3つの *RKD* 遺伝子が存在し、うち2つはシロイヌナズナの *RKD4* と同系統(*PtRKD4a*, *PtRKD4b* と命名)、他の1つは *RKD5* と同系統であった。*PtRKD4a* と *PtRKD4b* をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、少数ながら初期化するラインが見られ、*RKD* が植物種を越えた初期化能をもつことが明らかとなった。また *PtRKD4a* と *PtRKD4b* をポプラで過剰発現させることで、根の外植片から効率良く個体を再生できることを示す予備的な結果が得られた。

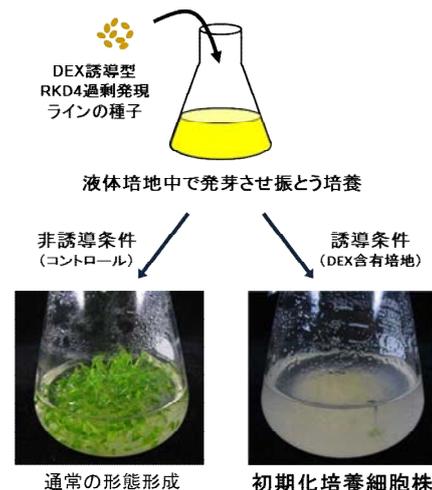
## (2) 詳細

### 研究テーマ A「胚性培養細胞株の樹立と性格付け」

人工ステロイドホルモンであるデキサメタゾン(DEX)の添加により *RKD4* を誘導的に過剰発現するシロイヌナズナ植物を確立した。この植物は DEX を含まない寒天培地では正常に生育し、DEX を含む培地に移すと根や葉から初期胚の性質をもつ細胞塊(初期化細胞塊)を生じる。この細胞塊は DEX を含む培地では初期化状態のまま増殖を続け、DEX を除くことで無数の胚を生じる。この操作を単純化し、滅菌した誘導型過剰発現株の種子を DEX を含む液体培地中で発芽させて振とう培養することで、均質な初期化懸濁培養細胞を誘導することに成功した(右図)。この細胞を DEX を含まない寒天培地上に展開すると胚発生が開始された。この懸濁培養細胞は、少なくとも6か月の継代培養では増殖能を失わないことが明らかとなった。

*RKD4* を過剰発現させたシロイヌナズナは初期胚特異的な遺伝子群を発現しており、これが初期化の遺伝的実体であると考えられる。しかし *RKD4* が初期胚特異的な遺伝子発現を活性化する機構は不明である。一般に細胞の初期化にはヒストン修飾を介したクロマチン構造の変化が関与していると考えられているため、*RKD4* の過剰発現で得られた初期化細胞に対し、修飾ヒストンに対する11種類の抗体を用いてウェスタン解析を行った。その結果、いくつかのヒストン修飾が大きく変化していることが明らかとなった。

シロイヌナズナゲノムには *RKD1-RKD5* の5つの *RKD* 遺伝子が存在する。*RKD4* 以外の *RKD* 遺伝子が体細胞の初期化能をもつかを確認するため、それぞれの DEX 誘導型過剰発現体を作製した。101-498個の独立な形質転換ラインの根を DEX 誘導した結果、*RKD1-RKD4*



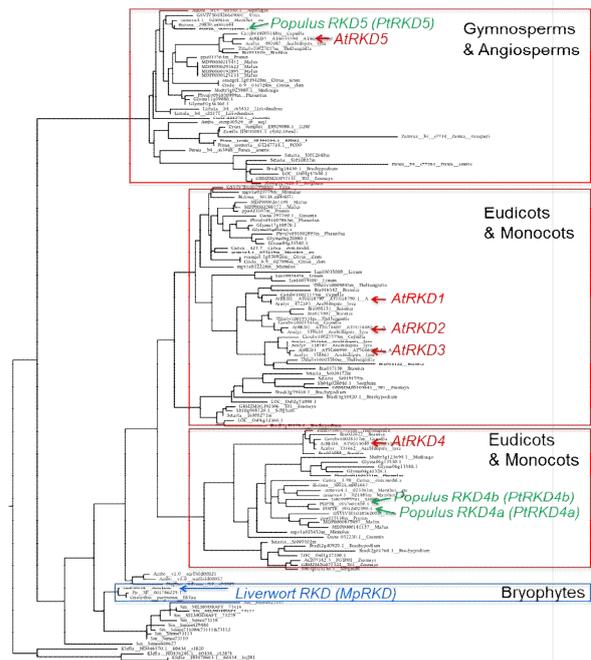
の4遺伝子が同等の初期化能を発現したのに対し、*RKD5*は初期化能を示さなかった。*RKD1*と*RKD2*についてはゲノム上の遺伝子を過剰発現した場合でも同様の結果が得られた(Waki et al. 2013)。*RDK1-RKD4*が卵細胞や初期胚で特異的に発現しているのに対し、*RKD5*は胚発生後の器官においても発現している。以上の結果は、*RKD1-RKD4*が冗長的あるいは協調的に卵細胞の形成や初期胚発生の制御に機能していることを示唆している。

### 研究テーマ B「*RKD4* タンパク質の高活性化と安定化」

*RKD4*タンパク質は核に局在し、アミノ末端ドメインに弱い転写活性化能があることが分かっている。そこで*RKD4*のN末端にVP16タンパク質由来の強力な転写活性化ドメインを融合させ、初期化能の強化を試みた。VP16-*RKD4*融合タンパク質をDEX誘導的に過剰発現する植物を80ライン作製したが、期待に反していずれのラインでもDEX添加による初期化がおこらなかった。この結果は*RKD4*が単純な転写活性化因子ではなく、エピジェネティック制御を含めた複雑な制御により細胞の初期化に機能していることを示唆する。また*RKD4*による初期化効率に導入遺伝子の構造が果たす役割を検討し、高発現株を得るための鍵となる情報が得られた。

### 研究テーマ C「*RKD4* 機能オルソログの単離と初期化能および個体再生能の解析」

緑藻、コケ、シダ、小葉類、種子植物のゲノム配列から*RKD4*の相同遺伝子を探索したところ、コケ植物以降のすべての種において*RKD*遺伝子の存在が確認された(右図)。これらの配列をもとに系統樹を作製したところ、シロイヌナズナの*RKD5*とその相同遺伝子群が進化の早い段階で派生したことが示唆された。また*RKD1-RKD3*の3遺伝子とその相同遺伝子群が比較的最近になって重複したことが示唆された。*RKD4*は*RKD1-RKD3*とは独立した系統に位置しており、機能分化が示唆される。これはシロイヌナズナの初期胚や配偶子で特異的に発現している*RKD1-RKD4*のうち、*RKD4*の変異体のみが表現型を示すことと一致する。



バイオマス植物としての利用が期待されるポプラ(*Populus trichocarpa*)のゲノムには、3つの*RKD*遺伝子が存在し、うち2つはシロイヌナズナの*RKD4*と相同性が高く、他の1つは*RKD5*と相同性が高い。そこでこれらの遺伝子をそれぞれ、*PtRkD4a*、*PtRkD4b*、*PtRkD5*と命名した。*RKD5*はシロイヌナズナにおいて体細胞の初期化能を示さないことから*PtRkD4a*と*PtRkD4b*の2つの遺伝子について機能解析を行うことにした。まず、*PtRkD4a*と*PtRkD4b*を誘導的に過剰発現するシロイヌナズナ植物を作製した。125 または 204 個の独立したラインの根で過剰発現を誘導したところ、*PtRkD4a*では1.6%、*PtRkD4b*では12.7%のラインで初期化が見られた。こ

のことからポプラの *RKD4* 遺伝子は種を越えて初期化能を示すことが明らかとなった。

#### 研究テーマ D「ジーンターゲティングへの応用」

種子植物においても、ごく低頻度ながら相同組換えによる T-DNA 挿入が起こる。*RKD4* による初期化細胞を利用すれば大量の細胞を形質転換して個体再生できるため、相同組換えによるジーンターゲティングに応用できる可能性がある。低頻度に得られる相同組換え体を効率的に選抜するため、Terada らの方法(Terada et al. 2002, *Nature Biotechnol.* 20: 1030-1034)を参考にして、ジフテリア毒素の A フラグメントを用いたターゲティングベクターを作製した。また *RKD4* の過剰発現により得られたシロイヌナズナの初期化細胞株が、アグロバクテリウムで形質転換されるかを確かめるため、イントロイン GUS レポーターを発現するベクターを用いて初期化液体培養細胞の形質転換を試みた。しかし複数回の実験にもかかわらず、期待に反して抗生物質耐性をもつ形質転換体が得られなかった。今後は異なるアグロバクテリウム株や抗生物質耐性マーカーを試す必要がある。

### 3. 今後の展開

上記の研究成果により、*RKD* 遺伝子が植物ゲノムに普遍的に存在し、種を越えて共通した機能を担っていることが示唆される。このことは *RKD* 遺伝子の過剰発現による体細胞の初期化技術を様々な植物に応用できることを意味する。例えばシロイヌナズナの *RKD4* を進化系統の異なる異種植物の初期化に用いることも可能であろう。ただしポプラとシロイヌナズナの間に見られたように異種植物間での初期化効率は決して高くない。同種(または近縁種)の *RKD* 遺伝子をクローニングして用いるのが得策であろう。多くの作物種でゲノム配列が明らかになっている現状にあっては、各植物種の *RKD* 遺伝子を PCR でクローニングすることは容易であり、過剰発現の手段さえあれば様々な植物種において応用展開が可能である。

初期化細胞を用いたジーンターゲティングは、初期化細胞がアグロバクテリウムにより形質転換されない、という予想外の問題により実現していない。また本研究期間の間に CRISPR/Cas9 を用いたゲノムエディット技術が急速に普及したため、相同組換えによるターゲティングの重要性は相対的に低下している。しかし相同組換えにはゲノム上の遺伝子に正確にタグ配列を挿入したり、正確な塩基置換を導入できるなどの利点がある。初期化細胞を形質転換する試みは今後も継続する必要がある。

初期化機構を解明する研究では、ヒストン修飾の変化を介したエピジェネティックな制御が関与している可能性が示唆された。今後はどの遺伝子座のヒストン修飾制御が初期化に関与しているのかを明らかにする必要がある。また *RKD* タンパク質は核に局在するものの、その分子機能は単なる転写活性化ではなく、より複雑なものである可能性が示唆された。*RKD* タンパク質の機能が明らかになれば、分子機能を強化するための戦略を立てることができ、初期化への応用がさらに容易になる。そのためには、まず *RKD* と相互作用するタンパク質やゲノム DNA 上の結合領域を明らかにする必要がある。*RKD* タンパク質は非常に不安定であり、植物細胞を用いたタンパク質機能の解析は長らく困難であった。本研究により *RKD* を高発現させる戦略が明らかになり、この方法を用いることで GFP タグを付加した *RKD4* を安定的に過剰発現する植物が得られた。今後はこの植物を用いた免疫沈降により、標的ゲノム領域や相互作用タンパク質の解明が進むことが期待される。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究課題では植物生産能の高度利用に貢献するための技術開発を目的として、*RKD* 遺伝子(植物 iPS 遺伝子)の初期化能を植物の効率的な繁殖や分化誘導に利用するための研究を行った。*RKD* 遺伝子は植物ゲノムに普遍的に存在するにもかかわらず、その機能はこれまで全くと言って良いほど不明であった。本研究において、*RKD* 遺伝子が植物の初期発生過程において進化的に保存された普遍的な機能を持つことが明らかとなった。また1つの *RKD* タンパク質に植物種を越えた初期化能があることや、バイオマス植物の効率的な繁殖に有用であるという結果が得られたことから、当初の目的は概ね達成されたと評価する。*RKD* による初期化は原理的に他の植物種にも応用可能であることから、その社会実装は個別の作物種の形質転換系や誘導的強制発現系の有無に左右される。これらのノウハウをもつ種苗会社などと共同研究を進めることで植物生産能の利用に向けた応用が可能であろう。ただし本技術に限らず遺伝子組換え作物に対する社会的な寛容度が低い我が国にあっては、政策的なバックアップが必要である。まずは培養細胞系を使った有用物質生産や、バイオ燃料・花卉などの非食用作物に応用するのが容易であろう。

初期化細胞株の利用、特にジーンターゲットングについては、CRISPR/Cas9 系が世界的に普及して技術開発の優先順位が低下したことや、初期化細胞の形質転換が当初の想定よりも遥かに難しいことから、当初の目的を達成できなかった。もともと非常にチャレンジングな計画であり、3年の研究期間では難しかったと思われる。相同組換えによるゲノムエディティングは高度な変異導入が可能であり、実現した場合の利用価値は今でも十分に高い。今後も別予算を得て継続的に挑戦してゆく必要がある。

*RKD* による初期化機構を解明するための基礎研究では、エピジェネティックな制御系の関与が示唆された。しかし *RKD* タンパク質とエピジェネティック制御系の分子リンクは未解明のままである。動物細胞の初期化においてもヒストン修飾やDNAメチル化を介したエピジェネティック制御が重要であると言われており、動植物に共通の機構が存在するのかもしれない。世界中で研究されている iPS 細胞ですらその生成機構は解明されておらず、細胞の初期化という高度な生命現象を明らかにするには、今後も継続した研究が必要である。

*RKD* による初期化の分子機構を解明するためには、*RKD* タンパク質の側から分子的なリンクを辿るのが早道と思われる。これまで *RKD* タンパク質の不安定性が研究を進める上で大きな障害になっていたが、本研究を通じて *RKD4*-GFP を高レベルで安定的に発現させる系が樹立できた。これにより、ChIP-seq 解析による標的ゲノム領域の探索や、免疫沈降による植物細胞内での相互作用因子の同定が可能となったことは大きな成果である。既に理化学研究所や奈良先端大植物グローバルとの共同研究を開始しており、近い将来に重要な手がかりが得られることが期待される。

また、本研究を通じて国内外の様々な研究者と共同研究を開始することができた。我が国発の新しいモデル植物であるゼニゴケを利用した共同研究で大きな成果が得られつつあることや、学内シンポジウムの開催を通じての世界の著名な胚発生研究者とのネットワーク作りが出来たこと、バイオマスの利用を目指す生物工学研究者との接点を得られたことは、

研究者にとって本さきがけ研究で得られた大きな成果の1つである。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

細胞を初期化できる遺伝子を用いて、なぜ初期化が起きるのかという基礎研究と、この遺伝子を活用することによって、再分化系の構築が困難といわれる植物種の形質転換系確立への応用技術を開発することを目的に研究が進められた。本研究の中で、「植物 iPS 遺伝子」を用いたシロイヌナズナの培養細胞系が確立され、これによって、胚発生過程における遺伝子発現が詳細に検討できるようになり、初期化機構の一部は明らかになったといえる。また、ポプラについても、この遺伝子による初期化と個体再生について成功している。こうした成果は今後、この方法を用いた形質転換系の確立への道を開いたことになり、科学技術上のインパクトはかなりある。しかし、本技術の汎用性については、まだ初期段階での成果しかなく、今後の実用性は未知数である。

今後、この極めて興味深い遺伝子を用いて、動物でもまだ明らかとなっていないリプログラミング機構の解明という基礎研究について研究が進展することを期待する。さらに、研究課題でいう「植物 iPS 遺伝子」として、多くの植物種でのその実用性について、その有効性と限界を明らかにして欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Waki T., Miyashima, S., Nakanishi, M., Ikeda, Y., Hashimoto, T. and Nakajima, K. "A GAL4-based targeted activation tagging system in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J.* 2013, 73(3), 357-367.
2. Miyashima, S., Honda, M., Hashimoto, K., Tatematsu, K., Hashimoto, T., Sato-Nara, K., Okada, K., and Nakajima, K. "A Comprehensive Expression Analysis of the Arabidopsis MICRORNA165/6 Gene Family during Embryogenesis Reveals a Conserved Role in Meristem Specification and a Non-cell-autonomous Function." *Plant Cell Physiol.*, 2013, 54(3), 375-384.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

- ・ Satoshi Koi, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi and Keiji Nakajima, "Evolutionarily conserved role of *RKD* gene family in land plant reproduction," *Marchatia IV*, 2013. 12
- ・ 厚井聡, 中島 敬二, "モデル苔類ゼニゴケを用いた初期胚発生に関わる遺伝子の機能解析," 日本蘚苔類学会第42回大会, 2013. 8

- ・ 厚井聡, 石崎公庸, 橋本隆, 河内孝之, 中島敬二, “初期胚発生に関わる *RKD4* 遺伝子の祖先的機能の解析,” 日本植物分類学会第 12 回大会, 2013. 3
- ・ Satoshi Koi, Kimitsune Ishizaki, Takashi Hashimoto, Takayuki Kohchi, Keiji Nakajima, “Evolutionary insights into the *RKD* gene function in the development of land plants,” 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013. 3
- ・ Takamitsu Waki, Takeshi Hiki, Ryouhei Watanabe, Tatsuya Ishida, Takashi Hashimoto and Keiji Nakajima, “The Arabidopsis RWP-RK transcription factor *RKD4* regulates embryonic pattern formation upstream of the auxin-dependent organogenesis,” 日本植物生理学会, 2012. 3

#### 著作物

- ・ Hisanaga, T, Miyashima, S. and Nakajima, K., “Small RNAs as positional signal for pattern formation.” *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 37-42 (2014).
- ・ 中島敬二 「植物細胞を初期化する *RKD* 遺伝子の発見—発生研究による鍵遺伝子の同定と応用展開の可能性」 *化学と生物* 51, 789-791 (2013)

#### 講演

- ・ “Dissecting the maturation and detachment process of Arabidopsis root cap cells” 国際シンポジウム「Front Lines of Plant Cell Wall Research」で講演 2015.3.20 奈良
- ・ “Mechanisms regulating pluripotency and pattern formation in plants” 京都大学大学院 生命科学研究科で講演 2015.1.13 京都
- ・ “Comparative studies of female gametogenesis in land plants” Marchantia Workshop 2014 で招待講演 2014.12.9 神戸
- ・ 奈良先端科学技術大学院大学 公開講座 2014 「植物が創る模様のはなし:美しいパターンを作る精巧なメカニズム」 一般市民(参加 355 名)向け講演 2014.10.11 奈良
- ・ 「植物の生殖と胚発生における *RKD* 遺伝子ファミリーの機能」 動植物アロ認証班会議で招待講演 H2013.6.2 松江
- ・ “An evolutionarily conserved role of *RKD* gene family in plant embryogenesis and gametogenesis” 2013.12.10 米国デューク大で講演
- ・ “Genetic networks in cell fate specification and differentiation control in the Arabidopsis root” 2013.12. 9 米国ジョージア大で講演
- ・ “Cell signaling in plant tissue patterning” 2013.12. 6 米国カリフォルニア大学デービス校で招待講演

#### 研究者としての飛躍につながった成果

- ・ 科学研究費補助金 新学術領域研究「植物発生ロジックの多元的開拓」(代表、塚谷裕一)に計画研究班員として応募し採択された。(2013. 6)
- ・ 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科の独立准教授に応募し採用された。(2013.4.1 付)
- ・ 同上の教授公募に応募し採用された。(2014.4.1 付)

- ・ 奈良先端大未来開拓コロキウム「A New Generation of Plant Embryo Research」の主催（日米欧の著名な研究者を招聘し、植物胚発生をテーマとした国際シンポジウムを開催した。2012. 10. 29）

#### 共同研究

- ・ 河内 孝之 教授（京都大学大学院）
- ・ 石崎 公庸 准教授（神戸大学大学院）
- ・ 嶋村 正樹 准教授（広島大学大学院）
- ・ 金 鍾明 博士、関 原明 博士（理化学研究所）
- ・ 深尾 陽一郎 准教授（奈良先端科学技術大学院大学）
- ・ Dr. Wolfgang Lukowitz (Univ. Georgia, USA)
- ・ Dr. Raju Datla (Plant Biotechnology Institute, Canada)
- ・ Dr. Jose Gutierrez-Marcos (Univ. Warwick, UK)

# 研究報告書

## 「バイオマス生産性の向上を指向した概日時計のシステム生物学」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 中道 範人

### 1. 研究のねらい

高等植物において普遍的にみられる環境応答システムの一環である「概日時計」を解析することで、環境に応答したバイオマス生産性の制御の理解とその人工制御を目標とする。研究目標は、おおまかに2つに区分される。(1)植物の概日時間を規定する転写ネットワークを明らかとするために、モデル植物のシロイヌナズナの概日時計をシステム生物学の最新手法によって解析する。さらにこの転写ネットワークによるバイオマス生産性の制御の包括的な理解をめざす。(2)概日時間を規定する転写ネットワークをシロイヌナズナにおいて人工制御(デザイン)して、バイオマス生産性の向上を図る。さらに、この知見を他の植物種例えばイネに展開し、従来の育種や遺伝学で得られてきたバイオマス生産性に比肩しうる、さらにはそれを凌駕する植物を創り出すことを目標とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シロイヌナズナの概日時計機構に関わる転写抑制因子である PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5(PRR5)の分子機能解析を進め、PRR5 タンパク質内に、DNA 領域との相互作用に必要なタンパク質ドメインを明らかにした。さらに PRR5 が相互作用するゲノム DNA 領域を明らかにするために、クロマチン免疫沈降-高速 DNA シークエンシング(ChIPseq)を行い、PRR5 に直接制御される約 60 個の遺伝子を見いだした。この中には、光周性花成、組織の伸長、そして低温ストレス応答の鍵として働く転写因子をコードしている遺伝子(CDF family, PIF family, DREB1 family)が見いだされた。また PRR5、PRR7、PRR9 によるこれら遺伝子の抑制は、日周的パターンの形成に必須であることが分かった。以上の解析により、時計機構から時計出力への時間情報の伝達の仕組みの一部が具体的に明らかになった(Nakamichi et al., PNAS, 2012)。

三重変異体 *prp9 prp7 prp5* は実験室内ではリズムの異常、開花遅延、組織伸長、乾燥ストレス耐性、そしてバイオマス生産性の向上などを示すが、これらの形質は上記の ChIPseq の解析から明らかになった分子ネットワーク構造からも十分にサポートされる。PRR は維管束植物に高度に保存されているため、PRR を機能欠損されることで上記のような有用形質を他の植物においても付与できる可能性が指摘された。しかし、シロイヌナズナの PRR9、PRR7、PRR5 は重複した機能を持ち、多くの植物においても PRR 遺伝子はゲノム中に複数存在する。したがってあらゆる植物種で有用形質を出すためには、複数の PRR 遺伝子群を一挙に機能喪失させることが必要だと予想された。そこで優性機能喪失型の PRR の作製を試みた。ウイルス由来の強制的な転写活性化ドメイン VP16 を PRR5 にタンデムに融合させることで、転写活性化型 PRR を作製することが出来た。この PRR5-VP を恒常活性プロモーターである 35S の支

配下で発現させ、バイオマス生産性の向上させることができた。一方、*PRR5* をイネにおいて過剰発現させると、バイオマス生産性が向上した。植物種によってバイオマス生産性を向上させる *PRR* の利用法が明らかとなった。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「時計支配下の遺伝子ネットワークの解析」

シロイヌナズナの概日時計機構に関わる転写抑制因子である PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5(*PRR5*)の分子機能解析を進めた。ドメイン内に変異をもつ *PRR5* を一過的に発現させた実験および、変異型 *PRR5* を用いたクロマチン免疫沈降実験により、DNA 領域との相互作用に必要なドメイン CCT(for CONSTANS, CONSTANS-LIKE1, TIMING OF CAB EXPRESSION1)を *PRR5* タンパク質内に発見した。

この知見を背景にして、*PRR5* が直接的に制御する遺伝子の取得を試みた。クロマチン免疫沈降-高速 DNA シークエンシング(ChIPseq)を行い、生体内において *PRR5* は約 500 のゲノム DNA 領域と相互作用することを見いだした (A 遺伝子群)。この中には、*PRR5* の直接的ターゲット遺伝子が含まれることが期待された。しかし ChIPseq は、技術的に擬陽性となる DNA 配列を含む可能性がある。そこで別の方法によって、*PRR5* の直接的ターゲット遺伝子を同定することを試みた。*PRR5* にウイルス由来の強力な転写活性ドメイン VP16 をタンデムに融合させると、既知の *PRR5* ターゲットの *CCA1* 遺伝子に対して転写活性化因子として機能する (*PRR5*-VP)。 *PRR5*-VP 過剰発現株において、発現量が上昇する遺伝子群を取得した (B 遺伝子群)。この中には、*PRR5* の直接的ターゲットと間接的ターゲット遺伝子が含まれることが期待された。A 遺伝子群と B 遺伝子群に共通して含まれる遺伝子 64 個を「*PRR5* の直接ターゲット」とした。

これらの遺伝子の多くは、*PRR5* だけでなく *PRR7* と *PRR9* にもターゲットされていることが、ChIPqPCR 解析により分かった。ターゲット遺伝子の発現抑制の時間帯は昼から夜半であり、この時間帯は 3 つの *PRR* が機能する時間と同じであった。従って *PRR* はターゲット遺伝子の発現の時間を決定する主要因子として振舞うことが考えられる。さらに *PRR* のターゲット遺伝子には、花成の時期の決定、組織の伸長、そして低温ストレスへの応答の鍵となる転写因子タンパク質をコードしているものがあり、概日時計からこれら生理現象への制御経路が具体的に明らかとなった。特定の時間に機能する *PRR* の転写ネットワーク構造により、植物は上記の生理現象を一日のうちで適切な時間に発現させることを可能にしているのであろう。実際に、*PRR* 遺伝子群を遺伝子操作 (変異体、過剰発現体、また機能改変型 *PRR* の発現体)し、*PRR* の転写ネットワーク構造を改変すると、花成の時期の決定、胚軸組織の伸長、低温ストレスへの応答能力、そして一次代謝物の蓄積をコントロールできる。このように *PRR* タンパク質群による転写ネットワーク構造を統合的に理解することで、概日時計を利用した植物の生存戦略の一端が明らかとなった。(図 1, Nakamichi et al., PNAS, 2012)。

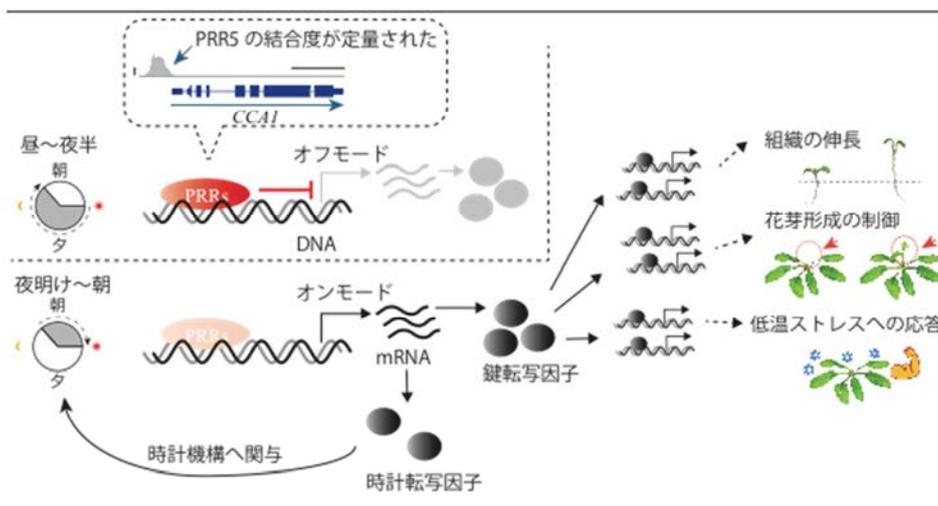


図 1. PRR による概日時計出力系の制御

昼から夜半にかけて PRR9、PRR7、PRR5 タンパク質は連続的に発現し、直接的なターゲット遺伝子の発現を抑制する(オフモード、図上)。またターゲット遺伝子座への PRR5 の結合も定量化された。夜明けから朝は PRR タンパク質が存在しないため、PRR の直接的ターゲット遺伝子の発現は解除され、誘導をうける(オンモード、図下)。直接的ターゲット遺伝子の中には、組織の伸長、花成時期の制御、低温ストレス応答の鍵となる転写因子が濃縮されている。PRR によるゲノムワイドな転写調節機構により、植物は特定の生命現象を特定の時刻に発現することが可能となる(生命現象の時間的な分業)。

#### 研究テーマ B「バイオマス生産性の向上を目的とした人工時計遺伝子の作出」

シロイヌナズナの三重変異体 *prp9 prp7 prp5* は実験室内ではリズムの異常、開花遅延、組織伸長、乾燥ストレス耐性、そしてバイオマス生産性の向上などを示すが、これらの形質は上記の ChIPseq の解析から明らかになった分子ネットワーク構造からも十分にサポートされる。PRR 遺伝子群は維管束植物に高度に保存されているため、PRR を機能欠損されることで、上記のような有用形質を他の植物においても付与できる可能性が指摘された。

しかし、シロイヌナズナの PRR9、PRR7、PRR5 は重複した機能を持ち、多くの植物においても PRR 遺伝子はゲノム中に複数存在する。したがってあらゆる植物種で有用形質を出すためには、複数の PRR 遺伝子群を一挙に機能喪失させることが必要だと予想された。そこで優性機能喪失型の PRR の作製を試みた。研究テーマ A で述べた通り、ウイルス由来の強制的な転写活性化ドメイン VP16 を PRR5 にタンデムに融合させることで、転写活性化型 PRR を作製することが出来た。この PRR5-VP を恒常活性プロモーターである *35S* の支配下で発現させると、バイオマス生産性の向上させることができた。概日時計は、光合成活性の日周制御に関わることが指摘されていたため、PRR5-VP 株の光合成活性を測定したところ、PRR5-VP は野生型とほぼ同等の光合成活性を示した。生育曲線および開花時期の解析から、PRR5-VP のバイオマス生産性向上は、発芽から開花時までの日数が延びることに起因することが示唆された。移管植物において、PRR5 が含まれる PRR ファミリーは、PRR7/3 サブファミリー、PRR5/9 サブファミリー、そして *TOC1* サブファミリーに分けられる。PRR5/9 以外のサブファミ

リー遺伝子を利用して開花時期の遅延ができるか確認するために、*PRR7/3*と*TOC1*サブファミリーの代表として、シロイヌナズナの*PRR7*および*TOC1*にVPを融合させてシロイヌナズナにおいて過剰発現させた。*PRR7*-VP 過剰発現株は花成時期遅延を導いたが、*TOC1*-VPはわずかな遅延を示した。このように *PRR5/9*サブファミリー以外の*PRR*とVPの融合タンパク質を発現させることで、長日植物に属すシロイヌナズナの開花時期を遅延させることができた。なお、オオムギやサトウダイコンといった長日植物でも*PRR*遺伝子の機能喪失によって開花時期の遅延およびバイオマス生産性の向上が報告されている (Tuner et al., Science, 2005, Pin et al., Curr. Biol., 2012)。

一方、短日植物種のイネやソルガムでは、*PRR* 遺伝子の機能喪失によって逆に開花時期が早まることが知られている (Murphy et al., PNAS, 2011, Koo et al., Mol. Plant, 2013)。本研究において、*PRR5*-VPをイネにおいて発現させると形質展開当代において矮小化した形質を示した。つまりイネに*PRR5*-VPを導入するとバイオマス生産性の向上は見込めないことが示された。次にシロイヌナズナの*PRR5*とFLAGタグ融合タンパク質をイネに発現させた。この*PRR5*-FLAG発現イネは、対照イネと比べて、「葉と稈」と「根」の乾燥重要および「稔実率」が向上していた。この研究は、短日植物種において*PRR*の機能を増強させてバイオマス生産性を向上させた初めての例となった (Nakamichi et al., in revision)。



図 2. PRR によるバイオマス生産性の制御

シロイヌナズナに *PRR5*-VP を導入すると、花成時期の遅延およびバイオマス生産性の向上が観察された。一方イネに *PRR5* を導入すると、バイオマス生産性の向上が観察された。長日植物では *PRR* の機能を低下させることで、短日植物では *PRR* の機能を増強することで、バイオマス生産性の向上が期待される。

### 3. 今後の展開

時計に関連する転写因子の解析を進めることで、特定の時刻に発現を誘導する遺伝子発現制御システムが明らかになると期待される。この知見を利用すれば、任意の時刻で任意の遺伝子を発現させる技術が達成できる。また時計の制御下にある遺伝子の解析を進め、あらたな時計制御下の現象を見いだす。

また本研究で作製された *PRR*-VP コンストラクトおよび *PRR* を、多様な植物種に形質転換によって導入し、開花時期の変化およびバイオマス生産性の向上が達成されるか、解析を進める。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

###### (研究者)

当初掲げた概日時計に関わる転写因子の制御する転写ネットワークの解析は、まだ途上であるが、この研究期間内に、昼から夜半にかけて発現する PRR9, PRR7, PRR5 が、転写抑制因子として機能すること、およびこれらのターゲット遺伝子群を明らかにし、PRR による転写制御システムを提案した(Nakamichi et al., PNAS 2012)。この研究の中で、植物の転写調節因子の ChIPseq 解析の技術を確かなものにした。本研究は、主にさきがけ研究でサポートされた研究実施体制および研究費によって遂行されたが、理化学研究所環境資源科学研究センターの榊原均博士、木羽隆俊博士と名古屋大学ITbMの東山哲也博士、鈴木孝征博士から技術的サポートをうけた共同研究である。本研究は、時計システム全体の転写制御ネットワークの理解へむけた先駆的な研究になったと考えている。またさきがけ研究予算でハイスループット概日リズム検出系を立ち上げ、概日時計のさらなる理解へ向けて研究を進めている。

時計関連遺伝子と光周性花成関連遺伝子の変異が、穀物の栽培地域拡大と関連していることを体系化した。この知見をふまえて、シロイヌナズナの時計関連遺伝子 *PRR5* とその優性抑圧型 *PRR5-VP* を、イネおよびシロイヌナズナに導入することで開花時期の変更およびバイオマス生産性の向上を達成した (in revision)。当初掲げた目標の、育種で取られたバイオマス生産性向上株を凌駕するまでには到達していない。本研究で利用された *PRR* の発現量をより高めたり、発現する細胞を適宜に選択したりすることで、よりバイオマス生産性の向上が期待される。この研究は主にさきがけ研究でサポートされた研究実施体制および研究費によって遂行されたが、イネの解析は理化学研究所環境資源科学研究センターの榊原均博士との共同研究である。

##### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

###### (研究総括)

概日時計関連遺伝子の機能を解析し、その活用によって植物の生長を制御し、バイオマスの増産につなげる基盤技術を開発することを目的に研究が進められた。その結果、時計関連遺伝子の導入によって花成時期を遅延させ、バイオマスの増産を図ることに成功するなど、優れた成果を生み出している。また概日時計は、ストレス耐性にも影響があることなども示し、さらに、概日時計と相互作用する化合物をスクリーニングによって発見するなど、想定されていなかった成果も生み出している。こうした多くの成果は、基礎研究としてもまた、技術開発研究としても極めて高く評価され、本年度終了課題の中でも極めて優れた研究の一つであると判断する。

今後は、本研究課題で得られた成果をいっそう発展させ、概日時計の支配下にある多くの生理現象の解明に努めるなど、基礎研究を進め、その中で、バイオマス増産への基盤技術の開発に努めて欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Nakamichi N., Kiba T., Kamioka M., Suzuki T., Yamashino T., Higashiyama T., Sakakibara H., Mizuno T. Transcriptional Repressor PRR5 Directly Regulates Clock-Output Pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. 109: 17123-17128.
2. Nomoto Y., Kubozono S., Miyachi M., Yamashino T., Nakamichi N., Mizuno T. A circadian clock- and PIF4-mediated double coincidence mechanism is implicated in the thermosensitive photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2012. 53:1965-1973
3. Nomoto Y., Kubozono S., Yamashino T., Nakamichi N., Mizuno T. Circadian clock- and PIF4-controlled plant growth: a coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2012. 53:1950-1964.
4. Nakamichi N. Adaptation to the local environment by modification of the photoperiod response in crops. *Plant Cell Physiol.* 2014. *In press*, PMID: 25432974.
5. Kimura Y., Aoki S., Ando E., Kitatsuji A., Watanabe A., Ohnishi M., Takahashi K., Inoue SI., Nakamichi N., Tamada Y., Kinoshita T. A flowering integrator, SOC1, affects stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 2015. *In press*, PMID: 25588388.

### (2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表

- 「植物の概日リズム現象」第14回オルガネラワークショップ、京都、2012年3月15日(招待講演)
- 「Repressors for the morning time in *Arabidopsis* circadian clock」第53回日本植物生理学会年会、京都、2012年3月17日(招待講演)
- 「Transcriptional repressor PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5 directly regulates clock output pathways」23rd International Conference on *Arabidopsis* Research, Vienna Austria, 2012年7月3-7日(ポスター)
- 「ChIP-seq法による植物時計の出力系の遺伝子ネットワーク構造の解析」第19回日本時間生物学会年会、札幌、2012年9月16日(指名口頭)
- 「概日時間情報はPRRタンパク質を介して出力系現象に伝達する」第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月22日(口頭)
- 「概日リズムに関わる転写制御ネットワークの発見」第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月19日(招待講演)
- 「Synthetic molecules controlling plant circadian rhythms」2<sup>nd</sup> International ITbM Symposium, Nagoya, 2014年5月12日(招待講演)
- 「Systematic approaches to understand *Arabidopsis* circadian clock」第38回内藤コンフ

アレンス生命システムの物質的基盤、札幌、2014年10月9日（指名口頭、およびポスター）

「Genetic architecture of Arabidopsis circadian clock system」第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月26日（招待講演）

#### 受賞

1<sup>st</sup> ITbM Research Award 2013年11月

第21回（2014年）植物生理学会奨励賞 2014年3月19日

第38回内藤コンファレンスポスター発表賞 2014年10月10日

#### プレスリリース

「植物の時間情報を制御」科学新聞 2012年10月19日

「植物眠らせるタンパク質特定」中日新聞 2012年10月3日

「遺伝子60種 概日リズムに関与」日刊工業新聞 2012年10月2日

WPIプログラム Institute of Transformative Bio-molecules Nagoya University (ITbM) に特任准教授として採用された(2013年5月1日)。研究所内で共同研究を開始し、新たなリズム調整化合物群を発見した。この成果は、ITbM Research Award および ITbM symposium の招待講演につながった。生物と化学という異なる分野の融合的な研究を進めて、植物科学界へ研究ツールの提供及び、新たな研究分野の創出につなげたい。

また研究所内において、動物細胞の概日時計に関する研究も共同して進めている。植物と動物を比較することで植物の概日時計システム(主に転写制御ネットワーク)の特異性および植物と動物の概日時計システムの普遍性を探求していきたい。

バイオマスイノベーション若手の会を立ち上げ、2回の研究会を催した。植物科学発の応用研究へむけて若手研究者のネットワーク作りを進めている。またこの枠組みで、植物科学学術分野と産業界との連携も図っている。

# 研究報告書

## 「肥料有効利用型植物の作出基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 三輪 京子

### 1. 研究のねらい

世界的な人口増加による食糧需要の増加、都市化による優良農地の減少に対して、今後の植物バイオマス生産は、食糧生産と競合しないこと、低エネルギー投入で高生産することが必須である。この実現には、食糧生産には適さない肥沃度の低い不良な土壌環境において、少ない肥料の投入で高い生産性を持つ植物の開発がひとつの有用な方策である。本研究では、このような植物の作出に利用できる遺伝子として「植物の必須ミネラルの体内利用効率を上昇させる遺伝子」を同定・解析することを目標とした。

植物には窒素やリンを含む 17 種類の必須元素がある。これらの必須ミネラルの欠乏は植物生産を制限する主要因であり、現代の作物生産では窒素やリンを含む化学肥料の施用は不可欠である。現代の高い作物生産性は化石燃料や天然ガスに由来するエネルギー消費に依存しており、その必要なエネルギーの 3 分 1 以上は窒素やリンを中心とした化学肥料の生産・輸送・施用にかかるものと計算されている。ゆえに、植物生産にかかる化学肥料の使用量を低下させなければ、植物バイオマスを活用した「真の二酸化炭素資源化・二酸化炭素排出削減」にはならない。

これまでの研究で低ミネラル栄養環境耐性を付与する遺伝子が、窒素・リン・ホウ素などの必須元素に対して報告されている。しかしながら、これらの低栄養環境での生育改善はいずれの場合も環境中からのミネラル栄養の取り込みの増加を伴うものであり、土壌からの栄養の収奪には変わりがない。肥沃度の低い不良な環境で持続的に高い生産を得るためには、ミネラル吸収効率の上昇による低ミネラル栄養耐性の向上だけでなく、植物生産量あたりの必要な栄養量を低下させた「体内ミネラル利用効率の上昇」が重要である。

そこで、本研究では窒素とリン、ホウ素を対象のミネラルとして「必須ミネラルの体内利用効率を向上させる新規遺伝子」の同定を目指した。具体的には、ミネラル濃度が減少し生育が悪い変異株に変異を導入し、「地上部ミネラル濃度は低いままであるが、バイオマス量が回復した」ミネラル利用効率が向上したシロイヌナズナ変異株を単離し、原因遺伝子を同定・解析した。ミネラル利用効率を上昇させる新たな遺伝子資源の発掘を通じ、化学肥料低減・省エネルギーで安定的なバイオマス生産とミネラル資源循環の効率化を推進する技術の基盤の構築を目指した。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

これまで、品種間の QTL 解析等が行われてきたが、体内のミネラル利用効率を制御する遺伝子の同定には至っていなかった。本研究では、体内のミネラル利用効率を上昇させる遺伝子を同定するため、全く新規の戦略として、輸送機能欠損株を出発材料とした「体内利用効率が増したシロイヌナズナ変異株」の探索に取り組んだ。その結果、窒素・リン・ホウ素の変異株候補の単離に成功した。さらにホウ素では吸収増加によらない欠乏耐性付与に成功し、世界で初めて必須ミネラル要求量を低下させる遺伝子変異の同定に成功した。

ミネラル輸送機能の欠損変異株は、低ミネラル栄養環境下で地上部のミネラル濃度／含量が減少し、それに伴って生育量が低下する。この株に EMS 処理によって第二の変異を導入し、「地上部の元素濃度は低下したままであるが、地上部生育量が回復した」変異株を単離する。この二重変異株は、親株の輸送機能欠損株や野生型と比較して、成長に必要なミネラル量が低下した「体内ミネラル利用効率が増した株」であると期待される。窒素・リン・ホウ素を対象として、本手法により変異株を探索した。

窒素では、根への硝酸の取り込みに働く硝酸輸送体 NRT2.1/NRT2.2 の機能欠損株を親株として確立した。M2 種子 1 万 5,000 をロックウール水耕栽培し、葉の展開抑制の緩和が観察された一株の単離に成功した。リンでは、根から地上部へのリン移行を担う PHO1 の機能欠損株を親株として用いた。1 万 6,000 の M2 種子を低リン濃度条件の固形培地で栽培した結果、生育回復が観察された 9 株の単離に成功した。ホウ素では、根から地上部へのホウ素輸送を担うホウ素輸送体 BOR1 の機能欠損株を用い、11 株の変異株の単離に成功した。原因遺伝子変異のひとつはガラクトシロン酸転移酵素遺伝子 (GAUT) のアミノ酸置換を伴う一塩基置換であった。さらに、GAUT の点変異および遺伝子破壊のみで低ホウ素条件下での成長および稔実性が改善されることを明らかにした。他の原因遺伝子もホウ素の結合部位であるペクチン多糖 RG-II の合成に関与する遺伝子に集約され、RG-II の変化がホウ素要求量低下の機構であることを見出した。

本研究の結果は、体内のミネラル利用効率の上昇が実現可能であることを示す成果であり、ミネラル利用効率を上昇させる遺伝子資源を同定する新たな方法論を提唱する成果となった。

### (2) 詳細

#### 研究テーマ A「窒素・リン・ホウ素の利用効率が増した変異株の探索」

QTL 解析などの先行研究ではミネラル利用効率を制御する遺伝子の同定には至っていない。本研究では、ミネラル体内利用効率を上昇させる遺伝子を同定するため、全く新規の戦略として、輸送機能欠損株を出発材料とした「体内利用効率が増したシロイヌナズナ変異株」の探索に取り組んだ。

ミネラル輸送機能の欠損変異株は、低ミネラル栄養環境下で地上部のミネラル濃度／含量が減少し、それに伴って生育量が低下する。この株に EMS 処理によって第二の変異を導入し、「地上部の元素濃度は低下したままであるが、地上部生育量が回復した」変異株を単離する。この二重変異株は、親株の輸送機能欠損株や野生型と比較して、成長に必要なミネラル

量が低下した「体内ミネラル利用効率」が上昇した株であると期待される(右図)。窒素・リン・ホウ素を対象元素として変異株探索を行った。窒素・リンは多量元素として植物生産の制限の主要因となる元素である。また、ホウ素は微量必須元素のひとつであり、日本を含む世界中で欠乏症が発生している元素である。

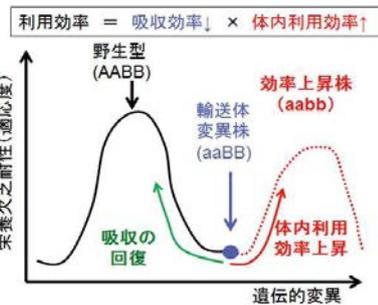
窒素栄養を対象とした変異株探索では、高親和性硝酸輸送体 NRT2.1/NRT2.2 機能欠損株を親株として用いた。

NRT2.1/NRT2.2 は環境から根への硝酸取り込みに関わる輸送体である。窒素栄養依存的な生育パターンは光条件など他環境条件の影響を大きく受けるため、様々な環境条件での栽培試験を実施し、条件設定を行った。最終的に、ロックウール水耕栽培での培地硝酸濃度 2.5 mM および 1 mM において、機能欠損株は地上部全窒素含量の低下および地上部生育量の低下が顕著に認められることを確認し、培地硝酸濃度 2.5 mM のロックウール水耕栽培で変異株探索を行った。EMS 処理をした M2 種子 1 万 5,000 を対象とする一次選抜を行った。選抜された 56 株の M3 種子の栽培試験の結果、親株と比較して葉の展開抑制の緩和傾向が観察された株一株の獲得に成功した。さらに、本二重変異株から NRT2.1/NRT2.2 機能欠損変異を除いた一重変異株候補においても野生型 Col-0 と比較して地上部生育向上が期待された。

リン栄養を対象とした変異株探索では、リンの根から地上部への移行に関わる PHO1 の機能欠損株 *pho1-2* を親株として用いた。1 万 6,000 の M2 種子を用いて低リン濃度条件 (35 μM) 固形培地での一次選抜を行い、244 株の候補株を得た。四段階の培地リン濃度 (17.5 μM、35 μM、87.5 μM、1.75 mM) で二次選抜を行い、生育回復が観察された株 9 株の単離に成功した。特に 2 株 (No.69, No.91) では親株 *pho1-2* に対して顕著な生育回復が認められ、低リン条件での生育回復が認められた。

ホウ素栄養を対象とした変異株探索では、根から地上部へのホウ素輸送を担うホウ素輸送体 BOR1 の機能欠損株 *bor1-1* を用いた。先行研究で単離された一株に加え、さらに M2 を追加栽培し、計 11 株の変異株の単離に成功した。なお、単離された複数の二重変異株において、親株 *bor1-1* と同様に地上部ホウ素濃度が低下していること、他の元素 (Mg,K,Ca,Mn,Fe,Cu,Zn,Na,Co,P,Mo) の有意な変化がないことを確認した。

### ミネラル含量が低下した変異株をもとに体内の利用効率が向上した株を単離する



## 研究テーマ B「変異株の原因遺伝子の同定」

上記で単離した窒素・リン・ホウ素の変異株の原因遺伝子同定のため、異なるシロイヌナズナのアクセッションとの交配によるラフマッピングと次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行った。窒素・リンの変異株は解析を進めている段階であり、ホウ素変異株では原因遺伝子変異の同定に成功した。

ホウ素の変異株では、原因遺伝子変異のひとつはガラクトuron酸転移酵素遺伝子 (*GAUT*) 群に属する一遺伝子内のアミノ酸置換を伴う一塩基置換であることを、相補試験および T-DNA 挿入株の表現型より遺伝学的に明らかにした。さらに、単離された二重変異株より輸送機能欠損変異を戻し交雑によって除いた *GAUT* の点変異のみをもつ株を作出した。*GAUT* の点変異および T-DNA 挿入による遺伝子破壊が起こった一重変異株において、低ホウ素条件下において野生型株 Col-0 と比較して地上部生育および稔実性の改善が認められた。これは、二重変異株の第二の変異のみで、体内ホウ素利用率の上昇／要求量の低下が起こることを示しており、吸収増加によらないホウ素欠乏耐性植物の作出に世界で初めて成功した。これらの *GAUT* 変異株ではホウ素欠乏耐性獲得のトレードオフとして、通常条件やストレス条件下での生育抑制が懸念されたが、野生型株と比較して生育や形態の明らかな違いは認められず、本遺伝子変異の有用性が示された。

ホウ素の生理機能は一次細胞壁ペクチン質多糖ラムノガラクトuron II (RG-II) の架橋である。*GAUT* はペクチン主鎖ホモガラクトuron を合成する酵素遺伝子群に属している。*GAUT* 変異株においてホウ素十分・欠乏条件双方での細胞壁ホウ素濃度の低下が認められ、さらに RG-II 抗体での免疫蛍光染色の検出強度の著しい低下が起こっていた。これより、*GAUT* 変異によってペクチン主鎖もしくは RG-II の合成が低下し、細胞壁へのホウ素結合容量の減少が起こった結果、ホウ素要求量の低下が引き起こされたと考察された。さらに、他の独立な変異株の原因遺伝子の候補として、既知の RG-II 合成酵素遺伝子群と共発現している、ガラクトuron酸転移酵素の他メンバー、複数の独立な糖転移酵素を見出した。ホウ素の体内利用率が上昇した／要求量が低下した変異株の原因変異は RG-II 合成に関与する酵素群へ集約されたことが考察され、ホウ素の結合部位である RG-II の変化がホウ素要求量の低下の機構であることが見出された。

本研究では、輸送機能欠損株を出発材料として「体内のミネラル利用率が上昇した変異株」を探索した。窒素・リンにおいて変異株候補の単離に成功し、ホウ素では原因遺伝子変異の同定に成功した。これらの変異株の存在は、現在の野生型植物に対して、体内のミネラル利用率の上昇／要求量の低下が実現可能であることを示すものである。さらに、ホウ素の変異株で同定された遺伝子変異は単独で体内のミネラル利用率上昇を引き起こし、世界で初めて必須ミネラル要求量を低下させることに成功した。本結果は、ミネラル利用率を上昇させる遺伝子資源を同定する新たな方法論を提唱するものであり、肥料投入低減に向けた新たなミネラル栄養欠乏耐性の付与技術の基盤となる成果である。

### 3. 今後の展開

窒素・リンでは体内の利用効率が上昇した変異株候補を単離した。これらの変異株に対しては、様々な硝酸およびリン濃度条件下での地上部生育量および元素濃度を確定した上で、変異の原因遺伝子の同定を進める。体内のミネラル利用効率が上昇する機構として、A)分配の最適化、B)作用点の構造変化、C)生育抑制応答の解除、を予想している。変異株の生理解析(生育・元素濃度・代謝産物解析など)と原因遺伝子の機能解析を合わせ、表現型を説明する分子機構を明らかにする。さらに、輸送機能欠損変異を戻し交雑によって除いたとき、第二の変異のみでミネラル利用効率の上昇が起こるかを明らかにし、輸送変異と共存したときに起こる野生型株では起こりえない定常状態を持っているのか、単一の変異で利用効率上昇を引き起こせるかを検証する。単一の変異で利用効率上昇を引き起こす場合には、トレードオフとして通常条件やストレス条件下での悪影響の有無を検証し、同定された遺伝子変異の有用性を検討する。

ハウ素の変異株では、ガラクトuron酸転移酵素を含め、ハウ素の作用点である細胞壁ペクチン質多糖 RG-II の合成遺伝子に変異が集約されていることが考察された。RG-II はガラクトuron酸が連なったペクチン主鎖に対して4種類の側鎖(A-D)が連結した構造体であり、広く植物一般に存在している。RG-II は12種類の単糖による20種類の連結により構成され、細胞壁多糖の中で最も複雑な構造をもつが、その構造は植物種間で高度に保存されている。これまでRG-II合成酵素として、10程度の単糖合成酵素や糖転移酵素の機能解析の報告がされているが、その複雑な多糖の合成過程の全体像は全く明らかにされていない。これまで、ペクチンやRG-II合成酵素の変異株は多くが致死や矮化を示し、本研究での「ハウ素欠乏条件下で生育抑制が緩和する」という改善が見られる変異株は極めてまれであり、貴重な変異株材料と考えられる。今回単離された変異株を対象として、細胞壁の生化学的な解析(細胞壁ハウ素濃度、細胞壁糖組成分析、糖連結解析、RG-II架橋率測定)を行い、これら酵素遺伝子変異が及ぼす細胞壁への影響を明らかにし、野生型株におけるRG-II合成経路での機能を網羅的に解明する。加えて、遺伝子がコードする酵素活性の検定を行う。これらの結果をもとに、植物におけるハウ素要求量を決定する分子機構を明らかにし、要求量低下に伴うトレードオフを少なくした、より有用な遺伝子変異を提案する。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

#### ① 研究達成状況及び得られた研究成果

本研究課題の目標は植物の体内ミネラル利用効率を上昇させる遺伝子を同定することであった。ハウ素については提案した方法論によって変異株を単離し、体内利用効率を上昇させる／要求量を低下させる原因遺伝子変異の同定に成功した。加えて、この遺伝子変異のみでハウ素欠乏耐性を付与することを示し、不良環境耐性を付与する遺伝子資源の新たな方法論を提唱する成果となった。窒素・リンに対しては、栽培条件検討や親株となる輸送機能欠損株の確立に長時間を要したことが、変異株探索の開始までに長期の時間を必要とする原因となった。そのため、遺伝子変異同定までには至らなかったものの、極めて困難と予想された窒素・リンの変異株候補の単離を達成しており、本手法の汎用性を示す成

果となった。

外部発表では、主にホウ素の変異株の成果について、学会発表を国際学会発表 7 件（うち招待講演3件）、国内学会発表 5 件を行った。また、研究課題に関連した論文を、国際誌に第一著者として2報、Last authorとして1報、いずれも責任著者として発表した。

### ② 研究成果の戦略目標、社会・経済・科学技術への貢献

作物生産における化学肥料の低減は、エネルギー・資源消費および環境保全の双方の観点から世界的な課題となっている。低窒素・低リン耐性の植物の開発は世界中での研究課題であるが、これまでの低ミネラル耐性の成功例はいずれも吸収効率を強化したものであり、体内の利用効率を上昇させるという「真のミネラル栄養欠乏耐性」を実現したものはなかった。本研究のホウ素利用効率を上昇させる遺伝子変異の同定は世界初の成功例であり、植物の必須ミネラル要求量を低下させた初めての成果である。

シロイヌナズナと同じアブラナ科のナタネはホウ素要求量が高く、ホウ素欠乏による減収が中国では実際の問題となり、育種課題となっている。本研究で同定された遺伝子変異をナタネへ導入することは、ホウ素要求量の低いホウ素欠乏耐性ナタネ品種の開発に直結すると期待される。なお、今回の利用効率を上昇させる変異は特定の遺伝子の点変異（一塩基置換）のため、実用植物への遺伝子変異の導入株は、EMS による塩基置換誘発株または様々な変異をもつ品種を対象として、TILLING 法での選抜が可能である。そのため、形質転換による遺伝子導入の過程は必要ではなく、実用化が形質転換体と比較すると容易であることが期待される。

また、窒素やリンの変異株より、体内利用効率を上昇させる遺伝子変異を同定することができれば、あらゆる作物への導入により窒素やリンの要求量が低い作物品種の開発に結びつくことが期待される。これが実現されれば、化学肥料の低減による省エネルギー・省資源の持続的な植物生産システムの基盤技術として活用されることが期待される。

### ③ 成果の展開の方向

本研究課題の基礎研究としての展開は(1)複数の遺伝子変異の組み合わせによる大きな定常状態の変化の理解と(2)植物のミネラル栄養要求量の決定の分子機構の解明である。ミネラル栄養は植物の体をつくる必須な材料であり、その必要量は必然として一定量が決まっていると想定されてきた。本研究ではホウ素でその要求量が遺伝的に制御されていることを明らかにした。この結果は、植物種間や品種間で異なる栄養要求量の多様性を説明する分子機構の解明の第一歩となる。また、今回単離されたホウ素の変異株の原因変異がペクチン質多糖 RG-II の合成遺伝子群の変異に集約されていることが考察され、これまで全く明らかにされていない細胞壁多糖 RG-II の合成経路を明らかにできると期待される。

また、本領域の CREST 課題では、低ミネラル栄養耐性向上を対象とした研究課題はない。CREST 課題で、光合成能力を強化した植物や乾燥ストレス耐性を強化した植物の開発が達成されたとき、体内のミネラル栄養が生育の制限要因となる可能性がある。複数の環境ストレス耐性強化のひとつとして本研究課題で同定された遺伝子変異の導入により、さらなる高い生産性をもつ植物の開発に貢献できると期待される。

#### ④ 研究実施体制

研究補助者の雇用により大規模な変異株スクリーニングの実験(条件の検討、大量の変異原処理をした種子の播種および後代の種子の獲得、数万の変異株探索)の実施が可能となった。また、人工気象器を新規で2台購入し、均一な環境条件でのロックウール水耕栽培による大規模な変異株スクリーニングを行うことができ、機器が有効に活用された。

2012年12月にはミネラル輸送および代謝研究を行う外国人研究者を招待し、国際シンポジウムを北海道大学で主催し、招待講演者とのネットワーク形成をした。また、細胞壁分析を専門とする研究者を訪ね、実験手法への助言を得た。

#### ⑤ 特記事項

本研究課題の成果の評価を含め、2013年4月に日本土壌肥料学会奨励賞を受賞した。また、2014年4月に北海道大学創成研究機構特任助教より北海道大学大学院地球環境科学研究院准教授に昇進した。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ホウ素、窒素、リンという肥料の有効利用を図るための新たな方策を確立するため、それらの要素の利用効率を高める変異体を獲得し、その原因遺伝子を特定して、低エネルギー型植物育成技術につなげようと、研究が進められた。ホウ素に関しては、これまでの成果を発展させ、原因遺伝子の機能を特定することに成功し、基礎研究として大きな成果を得た。一方、極めてチャレンジングな課題であり、これが実現すれば将来の植物生産に大きく貢献しうる可能性を秘めた窒素、リンについては、多くの努力にもかかわらず、低窒素、低リン状態で良好に生育する変異株の候補が得られた段階である。今後、その変異株の解析が進めば、本研究で目指したことについて一定の結論が得られるであろう。

今後は、現在得られている、窒素、リンを対象とした変異株の解析を進め、どのような原因遺伝子が関わっているか、またその機能は何かを明らかにしていくことを期待するとともに、本研究課題で採用したスクリーニング法の有効性についても、一定の結論を出して欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Aibara, I, **Miwa, K.\*** “Strategies for optimization of mineral nutrient transport in plants: multi-level regulation of nutrient-dependent dynamics of root architecture and transporter activity.” *Plant and Cell Physiology* (2014) 55, 2027–2036.
2. **Miwa, K.\***, Aibara, I., Fujiwara T. “*Arabidopsis thaliana* BOR4 is upregulated under high boron conditions and confers tolerance to high boron.” *Soil Science and Plant Nutrition*

(2014) 60, 349–355.

3. **Miwa, K.\***, Wakuta, S., Takada, S., Ide, K., Takano, J., Naito, S., Omori, H., Matsunaga, T., Fujiwara, T. “Roles of BOR2, an efflux-type boron transporter, in crosslinking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis thaliana*.” *Plant Physiology* (2013) 163, 4, 1699–1709.
4. Fukuma, K., Fujiwara, T., **Miwa, K.** “A novel strategy for identification of genes to improve boron use efficiency in *Arabidopsis thaliana*.” XVII. International Plant Nutrition Colloquium and Boron Satellite Meeting Proceedings Book, (2013) pp 51–52, Sabanci University, Istanbul. ISBN 978-605-4348-62-6.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会賞受賞】

2013年4月「トランスポーターを用いた栄養欠乏および過剰耐性植物の作出」で日本土壤肥料学会奨励賞を受賞

【国際シンポジウムの開催】

“International Workshop for Plant Response to Mineral”を2012年12月7日に北海道大学で主催した。4名の外国人研究者を招待し、60名の参加を得た。

【国際シンポジウムでの招待講演】

**Miwa, K.** “Generation of nutrient-stress tolerant plants ~through identification of novel genes to improve nutrient efficiency in *Arabidopsis thaliana*~ Joint symposium on Environmental Science 2013 –Bridging Finland and Japan–, Helsinki, Finland, 2013年11月27日

**Miwa, K.** “Formation of pectic networks by borate – identification of novel genes to regulate boron demand and supply for plant cell walls.” International Symposium on Cell Wall Integrity, Tokyo, 2013年10月30日

【国際学会での講演】

Fukuma, K., Fujiwara, T., **Miwa, K.** “A novel strategy for identification of genes to improve boron use efficiency in *Arabidopsis thaliana*.” XVII. International Plant Nutrition Colloquium, Istanbul, Turkey, 2013年8月19–22日

Fukuma, K., Fujiwara, T., **Miwa, K.** “Identification of a novel gene to reduce boron requirement in *Arabidopsis thaliana*.” BORON2013, Istanbul, Turkey, 2013年8月17–18日

【アウトリーチ活動(一般向け講演)】

**三輪京子**「ミネラルを運ぶ分子を研究して、やせた土地にも農業を興す」日本植物学会第77回(札幌)大会 公開シンポジウム「植物科学の最前線—植物がひらく私たちの未来—」2013年9月15日

# 研究報告書

## 「転写抑制因子を活用したリグノセルロース低含有植物の作出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 山口 雅利

### 1. 研究のねらい

植物細胞壁はセルロースやヘミセルロースなどの多糖やリグニンなど、いわゆるリグノセルロースと呼ばれる超高分子により構成されており、持続的で再生可能なバイオマスとして期待されている。中でも、道管要素や繊維細胞などの木部を構成する木質細胞は肥厚した二次細胞壁を形成しており、リグノセルロースバイオマスの主要な資源となっている。二次細胞壁形成には、非常に多くの遺伝子が関与しており、リグノセルロースバイオマスの量的な改変を行うためには、二次細胞壁各構成因子の生合成遺伝子全体を統合するマスター因子を標的とすることが有効であると考えられる。私はこれまでに、道管分化マスター因子として機能する転写活性化因子 VND ファミリーを同定した。また、VND ファミリーと結合する因子として 3 つの NAC ドメイン転写因子 VNI1、VNI2、ANAC103 を同定した(Yamaguchi et al. 2010, Plant Cell; 文献1)。中でも、VNI2 は VND7 ファミリーの機能を抑えることを明らかにした。また、他のグループにより、VND ファミリーと隣のクレードに属する NST ファミリーが繊維細胞のマスター因子として機能することが報告されている。リグノセルロースバイオマスの利活用を考えると、二次細胞壁の量を向上させることについてはバイオマスの増産につながる一方で、飼料や樹木のリグノセルロース量を抑えることで、それぞれ家畜の消化率やパルプ作出のための糖化率を高めることが知られている。そこで本研究では、転写抑制因子を活用することで、成長性を損なうことなく二次細胞壁量を抑えた植物の創出を目的とする。

また、NAC ドメイン転写因子は木質細胞分化だけでなく、メリステムの維持、ストレス応答、免疫応答など、植物の成長に重要な制御機構に重要な役割を果たしている。申請者は VNI2 と相互作用する因子を探索したところ、VND 以外の NAC ドメイン転写因子を単離した。そこで、NAC-NAC 複合体の生物学的役割について明らかにする。さらに、VNI2 相互作用因子としてユビキチン E3 ライゲースを単離した。これらの相互作用因子の作用機構を詳細に解析し、新しいバイオマス改変技術の可能性を追求する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、まずリグノセルロース含有量が低下した双子葉、および単子葉植物の作出に向けて、二次細胞壁形成を負に制御する転写抑制因子に着目し、双子葉植物のモデルとしてシロイヌナズナを、単子葉植物としてイネを材料に解析を行った。また、イネのリグノセルロースバイオマスが低下したカマイラズ変異体の原因遺伝子の探索を行ったところ、原因遺伝子が未だ同定されていない変異体について、マッピングで絞り込んだ領域に存在する機能未

知遺伝子に塩基置換が生じていることを見出した。

これまでに NAC ドメイン転写因子 VNI2 は積極的なタンパク質分解制御を受けていることを見出しており、また VNI2 との相互作用因子としてユビキチン E3 ライゲースとして機能する BPM3 を単離していた。本研究では、BPM3 はタンパク質分解の標的配列として知られる、PEST モチーフを含む VNI2 の C 末端 40 アミノ酸の領域を介して結合することを明らかとした。また、BPM を介したユビキチン E3 ライゲース活性を低下させた変異体を観察したところ、子葉において道管の途切れが観察された。このことは、VNI2 タンパク質の制御は正常な道管分化制御に重要であることを示している。さらに、VNI2 はその発現パターンより、道管形成以外の制御にも関与していることが示唆されている。VNI2 と相互作用する因子の探索を新たに行ったところ、30 もの NAC ドメイン転写因子が単離された。

## (2) 詳細

研究テーマ「相互作用因子による VNI2 の機能、および制御機構の解明」

前述の通り、VNI2 は積極的なタンパク質分解制御を受けていることが知られていた。また、VNI2 と相互作用する因子を探索したところ、BPM3 が単離された。この BPM 遺伝子はシロイヌナズナに6つ存在し、CUL3、RBX1 と複合体を形成することで、ユビキチン E3 ライゲースとして機能することが知られている。そこで、BPM-CUL3-RBX1 複合体が VNI2 タンパク質の安定性を制御しているか検証を行った。その結果、酵母 Two-hybrid 法により、BPM3 は VNI2 の PEST モチーフを含む C 末端領域に結合することが明らかとなった。また、CUL3 はシロイヌナズナゲノム中に *CUL3a* と *CUL3b* の 2 つの遺伝子が存在する。そこで、ユビキチン E3 ライゲース活性が低下した植物体として *cul3ab* 二重変異体を作成した。野生型、および *cul3ab* 変異体に、VNI2 プロモーター制御下で VNI2-GUS 融合タンパク質を発現させる形質転換体を作成した。その結果、野生型と比較して *cul3ab* 変異体背景の形質転換体の根の伸長領域において、多くの GUS による染色された核が観察された。このことから、BPM3 は VNI2 タンパク質安定性を促進する働きを持つことが示唆された。さらに、*cul3ab* 変異体を観察したところ、子葉において道管形成の阻害が観察された(図1)。BPM3 は VNI2 以外の転写因子とも相互作用することが報告されており、*vni2* 変異体と掛け合わせた三重変異体を作成し、表現型を比較したところ、子葉における道管の途切れの頻度は低下した。これらの結果は、VNI2 タンパク質の制御は正常な道管形成に重要であることが示している。

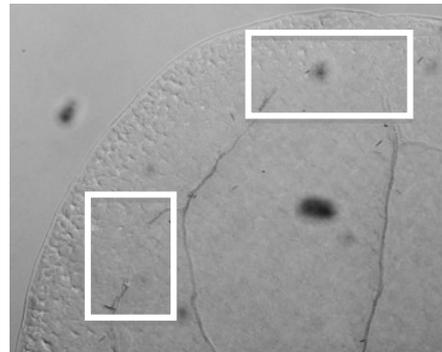


図1 *cul3ab* 二重変異体の子葉。白樫の領域で道管が途切れている。

また、VNI2 との相互作用因子として、VND ファミリー以外の NAC ドメイン転写因子が単離されていた。そこで、産業技術総合研究所の光田博士らが開発した 1,500 以上の転写因子 cDNA を含んだ酵母 Two-hybrid 解析用ライブラリーを用いて更なる VNI2 相互作用因子を探索したところ、30 もの NAC ドメイン転写因子が単離された。得られた、転写因子の中には、ストレス応答に関与することが知られているものが複数存在していた。現在、VNI2 の新たな

VNI2 タンパク質制御の生物学的役割を理解するためにこれらの相互作用機構についても解析を行っている。

### 3. 今後の展開

VNI2 と相互作用する因子の解析より、VNI2 のタンパク質制御の分子機構が明らかになりつつある。成果をまとめるためには、BPM3 が実際に VNI2 タンパク質安定性を制御しているか変異体等を用いて評価を行う必要がある。さらに、VNI2 と相互作用する NAC ドメイン転写因子については、この作用機構を解明することで、VNI2 の生物学的役割を明らかにしたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

##### ・研究目的の達成状況

当初本研究を行うにあたって前提として考えていた、転写抑制因子 VNI2 を繊維細胞で働かせることで、二次細胞壁形成を抑制することについては、大筋で実証できたと考えられる。今後の展開でも示したように、樹木への展開や、新たなリグノセルロースバイオマスの量的・もしくは質的形質を改変する多型の取得などに展開するうえで重要な成果であると考えている。その一方で、成果としてまとめるためのデータの取得には、当初の見立てよりも時間を要しているのも事実である。

##### ・研究の進め方

イメージングプレートやリニアスライサー、サーマルサイクラーなど本研究を進めるうえで必要な設備を購入することができた。研究者自身が現職に赴任する前と研究に向き合える時間や環境が大きく変わってしまったものの、技術補佐員を雇用することで、効率的に研究を進めることができたと考えている。また国内外の学会等に出席することで、最新の知見や人的ネットワークを構築できた。

##### ・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究で行ったリグノセロースバイオマス改変技術の知見を通じて、実際に用いる植物や樹木に展開できる道筋はつけられたと考えている。さらに、花茎の自立を指標としたシロイヌナズナサプレッサー変異体のスクリーニングを行うことで、新たなリグノセルロースバイオマスの改変に寄与する遺伝子が多数得られると期待している。近年、ポプラなどの有用植物種を用いたゲノムワイド関連解析が世界中で行われている。このようなゲノム情報基盤と本研究の知見を利用することで、リグノセルロースバイオマス利活用にも有用な多型を持つ個体を容易に見つけ出すことが可能となることが期待される。

また、VNI2 タンパク質制御機構、や VNI2 と相互作用する様々な NAC ドメイン転写因子の制御とその役割、イネ *bc4* 変異体の同定とその機能解析等、本研究を通じて学術的な成果をまとめられると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

樹木資源、特にセルロースの効率的な利用を図るため、樹木のリグノセルロース含量を低減させる基盤技術を転写因子の活用によって開発しようと研究が進められた。その結果、発見した転写抑制因子によって、モデル植物において、二次細胞壁量の低下が図れるとともに、糖化率の上昇が図れることを明らかにできた。また、この転写因子の機能解析についても一定の成果が得られている。しかし、作物や樹木のレベルでの、低リグノセルロース植物の生育への影響などの解析が遅れ、こうした植物体が栽培可能であり、有用であることを示すことはできなかった。また、当初予定した内容に関し、未解決の問題も残されている。

今後は、本研究課題で得られた成果を基盤に、樹木ばかりでなく草本系のバイオマスなども視野に入れ、研究を発展させて欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yamaguchi M, Nagahage ISP, Ohtani M, Ishikawa T, Uchimiya H, Kawai-Yamada M, Demura T “Arabidopsis NAC domain protein VND-INTERACTING1 and ANAC103 interacts with multiple NAC domain proteins” Plant Biotechnol. 2015, in press
2. Endo H, Yamaguchi M, Tamura T, Nakano Y, Nishikubo N, Yoneda A, Kato K, Kubo M, Kajita S, Katayama Y, Ohtani M, Demura T “Multiple classes of transcription factors regulate the expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a master switch of xylem vessel differentiation” Plant Cell Physiol. 2014, in press
3. Xu B, Ohtani M, Yamaguchi M, Toyooka K, Wakazaki M, Sato M, Kubo M, Nakano Y, Sano R, Hiwatashi Y, Murata T, Kurata T, Yoneda A, Kato K, Hasebe M, Demura T “Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land” Science 2014, 343, 1505-1508

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・Masatoshi Yamaguchi, Ami Sato, Mami Yoshimura, Tetsuya Kurata, Maki Kawai-Yamada, Shinji Kawasaki, Yoich Tsumuraya, Toshihisa Kotake “Brittle culm4 mutant decreases in secondary cell wall formation in rice” The 5<sup>th</sup> International Conference on Plant Cell Wall Biology 2014 July (Palm Cove, Australia)

・Masatoshi Yamaguchi “Transcriptional regulation in secondary wall formation” UK-Japan joint meeting on Plant Cell Biology 2013 July (Cambridge UK)

・山口雅利、松田浩平、加藤晃、出村拓「VNI2 と相互作用する RING フィンガータンパク質」第 54 回植物生理学会 2013 年 3 月 (岡山)

・ Masatoshi Yamaguchi, Kohei Matsuda, Ko Kato, Taku Demura “Isolation and

characterization of interacting factors with VND-INTERACTING PROTEIN2” International  
Conference on Arabidopsis Research 2012 July (Wien, Austria)

・日本植物細胞分生物学会奨励賞 2014年