

# 研究報告書

## 「光合成老化の環境適合を可能にする分子デザインの創出」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 2016年10月～2020年3月

研究者： 泉 正範

### 1. 研究のねらい

光合成によるCO<sub>2</sub>同化、その最終産物である炭水化物生産は、作物のバイオマス、収量、品質を直接規定する、作物生産における特に重要な反応である。しかしながら、数十日に及ぶ植物の葉の一生の間で、光合成の最大能力が発揮されるのは葉が若いうちの短期間であり、その後は葉緑体の光合成タンパク質(CO<sub>2</sub>固定酵素 Rubisco など)が分解されることで減衰していく。この光合成活性の減衰現象を本研究では「光合成老化」と定義している。葉緑体の分解による光合成老化を人為的に遅らせることができれば、光合成の最大活性は変わらずとも正味の光合成産物を増やせる可能性がある。

ただし、「老化」という現象そのものは、不要となった器官の葉緑体タンパク質を分解し、その栄養成分を回収、再利用するための成長戦略の一つでもある。例えば、イネのような群落栽培では、相互遮蔽で光が届かなくなる下部の葉では葉緑体を積極的に分解し、栄養の回収、上位葉への転流・再利用を促進する必要がある。よって真に作物生産現場で有効となる老化改変は、「受光できる期間に合わせて光合成老化を10%遅らせることで光合成効率を最適化する」「日照が得られる段階は光合成老化を抑制するが、光が遮られるステージでは速やかに葉緑体を分解する」といった、フィールド環境、受光環境に合わせた光合成老化の最適推移を実現することである。本研究のねらいは、そのような微細かつ定量的な制御により、光合成老化を環境適合させるための基盤技術を構築することである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

葉緑体分解に関わる基本的な仕組みを理解し、その関連遺伝子群を網羅的に同定するテーマA、同定した遺伝子機能をイネで改変し光合成老化の変化を実調査するテーマB、遺伝情報の改変を経ずに光合成老化を改変する手法として、化合物スクリーニングを行ったテーマC、そしてこれらの成果をフィールドに発展させる上で必要な情報を得るため、水田で起こるイネの老化現象を特徴づけたテーマDを行った。

本研究の開始時点で、細胞内自己分解システム「オートファジー」が葉緑体分解に関わることを見出していた。先に発見していた葉緑体を部分的に分解するオートファジー(RCB経路)に加え、葉緑体を丸ごと分解するオートファジー(クロロファジー)の2経路が存在することを同定し、両者が異なる仕組みで作動している証拠も得たため、それぞれの経路に特異的に関わる遺伝子群を網羅的に探索した。そして主に遺伝学的手法により、2つの葉緑体オートファジーそれぞれに関わる複数の候補遺伝子を同定した。また、オートファジー非依存的に葉緑体分解に関与する遺伝子も同定した。それらをまとめて「光合成老化関連遺伝子」と定義した。

この成果をイネに発展させた。RCB 経路に必要なオートファジー関連遺伝子をゲノム編集したイネ、オートファジー非依存的に葉緑体分解に関わるサリチル酸シグナルの鍵遺伝子を発現抑制したイネの2種を温室で栽培し光合成老化の実験を行った結果、最上位の葉（止め葉）の老化が遅れ光合成活性が高く推移することを確認した。よって、本研究で広く整備した光合成老化関連遺伝子の情報は、作物の光合成老化の制御を実践するうえで有用な基盤情報となることが示された。

また水田で栽培したイネの老化を多角的に調査し、フィールドで起きる老化現象を評価する基盤情報を得た。特に、止め葉と下位葉では、老化の進行様式が異なること、止め葉は光が当たり続ける中で老化が進行するため、その老化抑制は光合成産物の増加に直接結びつく可能性が高いことが見出された。上述したように、実験温室のデータではあるが、遺伝情報の改変により止め葉の光合成老化を遅らせることに成功しているため、本研究が目指す技術は実際にフィールドでも効果を発揮するものとなることを期待できる。そして本研究では、葉緑体のオートファジーを抑制する化合物をスクリーニングから得ることに成功したため、遺伝情報を改変せずに光合成老化を制御する手法への足掛かりまで得たと言える。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「光合成老化関連遺伝子群の同定」

先だって、細胞内自己分解システム「オートファジー」が葉緑体分解に関わることを見出していたが、先に発見していた葉緑体を部分的に分解するオートファジー（RCB 経路）が、新生二重膜小胞であるオートファゴソームとして、葉緑体の一部をくぶり切って液胞に運ぶマクロオートファジーと呼ばれる経路であり、主にアミノ酸の再利用を促進することを確認した（Hirota, Izumi et al., 2018）。一方、本経路に加えて、葉緑体を丸ごと分解するクロロファジーが、上記部分分解とは異なるタイミングで起こることを発見した（Izumi et al., 2017）。このクロロファジーは、液胞膜が分解物を直接隔離するマイクロオートファジーと呼ばれる経路であることを確認した（Nakamura et al., 2018）。

以上の成果から、2 種の葉緑体オートファジーが異なる仕組みで作動していることが確認されたため、それぞれの経路に特異的に関わる遺伝子群の情報を、逆遺伝学、順遺伝学により整備した。具体的には、部分分解に関わる遺伝子候補 3 種、全分解に関わる遺伝子候補 8 種の情報を得た。

また、オートファジー非依存的に葉緑体分解に関わる遺伝子を同定するため、老化時の葉緑体タンパク質分解が遅れる変異株を解析し、その原因遺伝子 4 種の情報を得た。これらの遺伝子群を、光合成老化を制御する上で着目する遺伝子として、光合成老化関連遺伝子群とした。本研究テーマでは、葉緑体分解に関わる多数の遺伝子を、光合成老化を制御するための基盤情報として整備することが目的であったため、その目的は概ね達成できたと言える。

### 研究テーマ B 「光合成老化関連変異株の定量評価」

テーマ A の成果をもとに実際に光合成老化を改変するため、まずいくつかの遺伝子についてシロイヌナズナ変異株を用いて実試験を行った。部分分解に必要なオートファジー関

連遺伝子及びオートファジー非依存的に光合成老化に関わる植物ホルモン・サリチル酸関連遺伝子の 2 系統の変異株で、光合成老化が抑制され光合成活性が高く推移することを確認した。

そこで、当該オートファジー関連遺伝子のイネオーソログのゲノム編集イネ及びサリチル酸シグナル因子を発現抑制したイネを、実験温室で栽培し、最上位葉(止め葉)の光合成老化を実測した。その結果、両系統とも、光合成老化が一定程度抑制され、光合成活性が高く推移する傾向が見られた。よって、テーマ A で整備した遺伝子情報を基に作物イネの遺伝情報を改変することで、実際に光合成老化を変動させることが可能であることが示された。

### 研究テーマ C 「光合成老化に作用する化合物スクリーニング」

葉緑体オートファジーの細胞内現象を指標に、その抑制化合物をライブラリーから単離する試みを行った。実際に、部分分解だけを抑制する化合物、全分解だけを抑制する化合物を、複数単離することに成功した。これらは、ゲノム情報を改変せず光合成老化を制御するアプローチの足掛かりになることが期待される。

### 研究テーマ D 「フィールドで起こる老化現象の実体評価」

宮城県大崎市鹿島台の実験用水田で栽培したイネ(品種ササニシキ)を用いて、栄養成長期から登熟期(7 月から 10 月)の期間における葉の老化過程を評価する解析を 3 年間(2017-2019)にわたり行った。光合成活性と老化関連パラメータの時間推移と、RNA-seq により転写産物の網羅的な情報を得た。

まず、登熟期に最も光合成産物を同化するとされている止め葉に着目すると、光が当たり続けていても 8 月後半から葉緑体成分の分解に伴って光合成活性が低下することが確認された。テーマ B で、遺伝情報の操作により止め葉の老化を遅らせることができることが示されており、この成果は、実際に生産現場で光合成産物を増加させる技術になる可能性を示している。関連して、テーマ A、B で具体的に着目した細胞内現象であるオートファジー関連遺伝子群が、水田イネの老化に伴い発現上昇することも確認でき、本研究の着眼点がフィールドの現象制御につながるものであることも示された。

一方、上位葉から下部の葉の老化現象を比較したところ、止め葉では葉緑体タンパク質の分解と緑色色素(クロロフィル)の減少が同時に起こるのに対し、下位の葉では、葉緑体タンパク質の分解が緑色の減衰に先んじて起こることが見出された。これは同じイネの葉でも部位によって異なる老化現象が起きていることを示唆している。今後その実体に迫ることができれば、イネの老化をより微細に制御するための方策を打ち出すことにつながると期待できる。

## 3. 今後の展開

本研究では、実験温室での解析で、光合成老化が遅れ光合成能力が高く推移するイネを作出することに成功した。今後その再現性を慎重に評価すると共に、ゲノム編集イネを中心にフィールド環境での試験に発展させていくことで、作物栽培現場における有効性を評価する。水田でも光合成が効率化され、収量や品質にプラスの効果が得られれば、本研究がデザインした作物およびデザインの戦略が社会実装に近づくことと期待される。すでに光合成老化関連遺

伝子を多数同定しており、遺伝子操作によって光合成に対するプラス効果が期待される遺伝子を優先にゲノム編集イネを順次作出していくことで、より有用な系統を作出することにも取り組む。

また水田イネで得た遺伝子発現量の時間変化に関する網羅的データをより深く掘り下げていくことで、光合成老化を改変するための新たな遺伝子ターゲットが浮かび上がってくることも期待される。葉緑体オートファジーの抑制化合物候補のターゲットを具体的に明らかにすることで、より高活性な化合物を開発し、遺伝情報を改変せず化合物の施与により老化を制御する戦略も想定できる。このように、本研究のデザイン技術を、多数の遺伝子や異なるアプローチを駆使して作物を改良しようとするより高度な研究領域に発展させていく。

#### 4. 自己評価

作物生産における葉緑体分解の重要性は古くから着目されていたが、その経路の実体は長らく未解明であった。我々は本研究に先立ちその実態に迫る成果を得て、本研究の遂行により、オートファジーによる葉緑体分解経路の全容を示すに至った。

そして本さがけ研究の主たるねらいは、基礎研究の域にあった葉緑体分解機構の研究を、「光合成の効率化」という、実際に農業生産に役立つ技術にまで発展し得るかを実評価することでもあった。結果として、モデル植物で得た成果をベースに作物イネの光合成を改変するに至ったことから、本研究の一つの目的は達成されたと言える。この主目的の成果と言える部分については学術論文としてのデータ公表に至っていないため、今後早急にデータをまとめて公表につなげる必要がある。

今後、本研究で得た成果を社会実装させていくためには、イネの老化制御の収量・品質への影響や、フィールド環境での有効性を検証していく必要がある。その検証を進める上では、本研究テーマDで集めたフィールド試験のデータを一つの指標とすることができるが、大規模データ解析に関する技術不足と時間的な制約から、データの深い考察や最終年度のサンプル解析が突き詰められていない現状があり、この点は研究期間早期に適切な共同研究者を見つけるなどして解決する必要があった。現在は、CREST植物頑健性領域、及び同じさがけ領域の研究者と、互いの研究プロジェクトの成果形成に役立つ形でのデータ解析を共同で進めている。また、本研究では作物としてイネを用いたが、異なる作物でも老化制御の有効性を検証することで、より高い波及効果につながると考えている。

本研究の推進に当たる一つの特筆すべき点は、当初は計画していなかった研究計画が、本さがけ研究を通じて得られた人脈により次々と生まれた点である。光合成老化を抑制する化合物のスクリーニング、ゲノム編集技術の提供、サリチル酸シグナル抑制イネの解析、水田イネのオミクス解析、などは、本研究の成果の中核をなす解析ではあるが、全てさがけ開始後の共同研究(大部分がさがけ研究者との共同研究)として開始したものである。多くの先駆的な若手研究者と切磋琢磨できるさがけ研究に身を置き、その環境を活用することで新しい解析に次々と挑戦できたことは、極めて重要な経験となったと自己評価している。

#### 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表



1. Izumi M\*, Ishida H, Nakamura S, Hidema J (2017) Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *The Plant Cell* 29: 377–394, \*Corresponding
2. Hirota T<sup>1</sup>, Izumi M<sup>1</sup>, Wada S, Makino A, Ishida H (2018) Vacuolar protein degradation via autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 59: 1363–1376, <sup>1</sup>Co-first
3. Nakamura S, Hidema J, Sakamoto W, Ishida H, Izumi M\* (2018) Selective elimination of membrane-damaged chloroplasts via microautophagy, *Plant Physiology* 177: 1007–1026, \*Corresponding

(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)

1. 「植物の新たなオートファジー経路—壊れた葉緑体を取り除くオートファジー経路「クロロファジー」の発見—」、2017年1月30日、プレスリリース
2. 「環境に応じた葉緑体分解を担う2種のオートファジー経路」  
日本農芸化学会 2018年度大会、名古屋・名城大学、2018年3月16–18日、招待講演
3. “How chlorophagy is executed: Induction and intracellular events”  
Gordon Research Conference on Mitochondria & Chloroplasts, イタリア, 2018年7月8–13日、招待講演
4. 「故障した葉緑体を取り除く植物オートファジーの駆動プロセスを解明」  
2018年5月31日、プレスリリース
5. 「体内窒素利用と光合成活性のバランスは改変し得るか？」  
日本光合成学会、仙台・東北大学、2018年5月26–27日、招待講演