

「植物の栄養器官におけるデンプン合成制御メカニズムの解明」

神戸大学大学院農学研究科

深山 浩

1 研究の背景と目的

光合成産物であるデンプンは、植物において基本代謝やエネルギー貯蔵物質として重要である。デンプン合成には多くの酵素や輸送体が関係するが、それらの発現制御メカニズムについては不明であった。我々はイネを用いたトランスクリプトーム解析により、デンプン合成が促進される高 CO₂ 条件で発現が促進される転写因子様タンパク質 *CO₂ Responsive CCT Protein (CRCT)* を特定し、この *CRCT* がデンプン合成のマスター制御因子であることを解明した (Morita et al. *Plant Physiol.* 167: 1321-1331, 2015.)。そして、*CRCT* を高発現させることによって葉鞘や稈といった栄養器官のデンプン含量を飛躍的に増加させることに成功した。*CRCT* オースログはゲノムが解読された全ての植物に存在しており、イネ以外の植物においてもデンプン合成の制御に働いている可能性が高い。本研究では、植物の栄養器官におけるデンプン合成制御メカニズムの解明、ならびに *CRCT* を利用した高デンプン蓄積作物作出法の確立を目的とした。

2 研究方法・研究内容

イネにおいて *CRCT* を構成的に高発現させると、葉鞘・稈のデンプン含量が大幅に増加し、RNAi 法で発現抑制すると減少する。*CRCT* はデンプン合成に必要な複数の酵素や輸送体の発現を調節していることが分かっているが、そのメカニズムの詳細は不明である。本研究では、イネを用いて *CRCT* がデンプン合成を制御するメカニズムの解明を試みた。また、シロイヌナズナ、ジャガイモ、トマトなどイネ以外の植物における *CRCT* の機能の解明を目的として、高発現形質転換体と CRISPR/Cas9 による遺伝子欠損変異体を作成し、生理解析を行った。

① *CRCT* によるデンプン合成制御メカニズム

・ *CRCT* と相互作用するタンパク質の同定

CRCT は CCT ドメインと呼ばれる、他のタンパク質との相互作用や DNA との相互作用に働くドメインを持っている。シロイヌナズナの cDNA ライブラリーが作出済みであったことから、シロイヌナズナ *CRCT* の CCT ドメインと相互作用するタンパク質について、酵母ツーハイブリッド法により cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。また、共発現データベースによる検索結果から *CRCT* との共発現性が高く、かつアノテーションが遺伝子発現調節に関係するタンパク質 SCL, OsMYB, OsTPR について酵母ツーハイブリッド法による相互作用解析を行った。

FLAG タグ付き *CRCT* を高発現する形質転換イネを作成し、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。また、得られたタンパク質を SDS-PAGE で分離し、MS 解析により同定した。さらに、得られた候補タンパク質について酵母ツーハイブリッド解析、BiFC 解析により相互作用を確認した。

・ *CRCT* と相互作用する DNA の同定

CRCT は ADP グルコースピロホスホリラーゼ (*AGPL1*)、デンプン枝作り酵素 (*BE1*)、グルコース 6-リン酸/リン酸輸送体 (*GPT2*) などのデンプン合成関連遺伝子の発現調節に関係していることが予想される。これらの遺伝子のプロモーターと *CRCT* の相互作

用を FLAG 抗体によるクロマチン免疫沈降により解析した。免疫沈降によって得られた DNA 断片を鋳型として、デンブン合成関連遺伝子について qRT-PCR 解析を行った。さらに、得られた DNA 断片について次世代シーケンサーによる塩基配列の網羅的な解析を行う予定にしていたが、得られた DNA 量が少なかったために今回は行わなかった。

・部位特異的 CRCT 高発現の効果

これまでの解析に用いてきた CRCT 高発現形質転換イネは、アクチンプロモーターを利用して CRCT を構成的に発現させた。しかし CRCT は主に維管束で発現しており、デンブンが蓄積されるのはデンブン貯蔵柔細胞であることから、CRCT の発現とデンブンの蓄積場所に違いがある。維管束のみで強く発現する BEI プロモーター、デンブン貯蔵柔細胞で高発現する AGPL1 プロモーターを用いた CRCT 高発現形質転換イネの作出をおこない、デンブン含量などの生理解析を行う予定であったが、作出には至らなかった。本研究については、今後、進める予定である。

②イネ以外の植物における CRCT オーソログの機能

・シロイヌナズナ

シロイヌナズナには CRCT オーソログが 2 つ (*AtCRCT1*, *AtCRCT2*) 存在する。これらの遺伝子を *CaMV35S* プロモーターにより構成的に高発現する形質転換体を作成済みであった。また、CRISPR/Cas9 法により *AtCRCT1* と *AtCRCT2* のそれぞれ単独と両方を同時に欠損した変異体についても作成済みであった。これら形質転換体や欠損変異体についてヨウ素デンブン反応による植物組織の染色、デンブン含量の定量、可溶性糖含量の定量、ならびに基本的な生長解析を行った。

実験計画当初は予定にしていなかったが、*AtCRCT1* と *AtCRCT2* のプロモーター-GUS 形質転換体を作成し、詳細な発現解析を行った。

・ジャガイモ

ジャガイモには CRCT オーソログが 1 つ (*StCRCT*) 存在する。*StCRCT* のコード領域を *CaMV35S* プロモーターに連結させたキメラ遺伝子を含む植物形質転換用プラスミドを作成し、アグロバクテリウム法によりジャガイモ (品種サヤカ) の茎に遺伝子導入した。また、*StCRCT* の欠損変異体を CRISPR/Cas9 法により作出した。得られた高発現体、欠損変異体について生理機能解析を行った。

実験計画当初は予定にしていなかったが、*StCRCT* のプロモーター-GUS 形質転換体を作成し、詳細な発現解析を行った。

・トマト

トマトには CRCT オーソログが 1 つ (*SlCRCT*) 存在する。ジャガイモと同様に高発現形質転換体と CRISPR/Cas9 法により欠損変異体を作成する予定であったが、本年度内での作出には至らなかった。本研究については、今後、進める予定である。

3 研究成果

①CRCT によるデンブン合成制御メカニズム

・CRCT と相互作用するタンパク質の同定

シロイヌナズナ CRCT の CCT ドメインと相互作用するタンパク質について、酵母ツーハイブリッド法により cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、多数の候補遺

伝子を得ることができた。しかし、残念ながらそれらは全て偽陽性であった。CCT ドメインを GAL4 の DNA 結合ドメイン (BD) と融合させたが、活性化ドメイン (AD) と相互作用しなくても転写活性が多少出てしまうためと考えられた。よって、条件を検討して再度行う必要がある。CRCT との共発現性が高い SCL, OsMYB, OsTPR については、CCT ドメインを BD と融合した場合、CRCT 全長を AD と融合した場合のいずれも相互作用は検出できなかった。

FLAG タグ付き CRCT 高発現イネと CRCT 欠損イネの葉鞘から可溶性タンパク質を抽出し、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い SDS-PAGE 解析を行った。CRCT 高発現イネに存在して欠損イネで存在しないバンドが複数得られ、それらのタンパク質を切り出し MS 解析により同定した。複数のタンパク質が候補として得られたが、MS 解析のスコアが高く機能的に CRCT と相互作用する可能性が高いと考えられた 14-3-3 タンパク質 (14-3-3A) に着目することとした。CRCT と 14-3-3A について酵母ツーハイブリッド解析を行ったところ、相互作用が確認できた。さらに予定にしていなかったが、さらなる相互作用の確認と相互作用が起こっている細胞内部位を明らかにするために GFP を用いた BiFC 解析を行った。その結果、CRCT と 14-3-3A は核内で複合体を形成して遺伝子の発現調節を行っていることが示唆された (図 1)。CRCT は約 32 kDa、

14-3-3A は約 30 kDa であり、14-3-3 タンパク質は基本的に二量体で存在していることから分子量を合わせると 94 kDa となる。ゲル濾過解析から CRCT は細胞内で約 270 kDa の複合体を形成していることが示唆されている。よって CRCT は 14-3-3A 以外にも相互作用している可能性が考えられるため、引き続き相互作用因子の探索を行う必要がある。

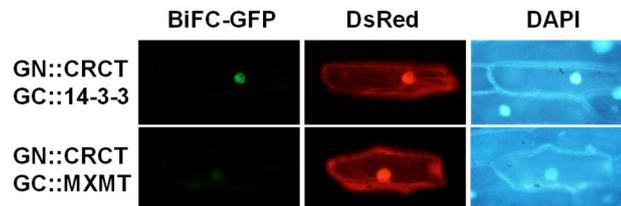


図1. CRCTと14-3-3Aとの相互作用のBiFC解析。
GFPをN末端側(GN)とC末端側(GC)に分割し、GNとCRCT、GCと14-3-3AまたはMXMTの融合遺伝子をパーティクルガン法でタマネギ表皮細胞に導入した。遺伝子導入の確認はDsRedの蛍光により行った。またDAPIにより核の染色を行った。CRCTと14-3-3は核においてGFP蛍光が検出された。一方、GC側をCRCTと相互作用しないMXMTにすると蛍光はほとんど検出できなかった。

・ CRCT と相互作用する DNA の同定

FLAG タグ付き CRCT 高発現イネの葉鞘を用いてクロマチン免疫沈降を行った。免疫沈降によって得られた DNA 断片を鋳型として、デンブンプ合成関連遺伝子について qRT-PCR 解析を行った。rRNA 遺伝子を内部標準として、インプットとクロマチン免疫沈降で得られた DNA を比較したところ、AGPL1 と ADP グルコースピロフォスホリラーゼ小サブユニット (AGPSI) のプロモーターは約 3 倍の DNA が検出された。この結果から、CRCT を含む複合体は AGPL1 と AGPSI のプロモーターに結合して、発現調節を行っていることが示唆された。

②イネ以外の植物における CRCT オーソログの機能

・ シロイヌナズナ

AtCRCT1 と AtCRCT2 のそれぞれを単独で高発現する形質転換体について、ヨウ素デンブンプン反応による植物組織の染色を行った。AtCRCT2 の高発現形質転換体においてはデンブンプ蓄積の増加が認められた。RT-PCR 解析を行ったところ AtCRCT1 と AtCRCT2 のいずれの高発現体においても ADP グルコースピロフォスホリラーゼ (APL3, APL4)、GPT2、テトラトリコペプチドリピート様タンパク質 (TPR-L) の発現が大きく増加していた。AtCRCT1 と AtCRCT2 の欠損変異体については、今年度はホモ系統の選抜を行っ

た。今後、生理解析を進める予定である。

AtCRCT1 と *AtCRCT2* の細胞レベルでの発現解析を行う目的でプロモーター-GUS 形質転換体についても作出した。*AtCRCT1* は葉全体で、*AtCRCT2* は葉柄の維管束で主に発現していた。また、その発現は糖処理により増加することが明らかとなった。

・ジャガイモ

StCRCT のコード領域を *CaMV35S* プロモーターに連結させたキメラ遺伝子を導入した高発現形質転換体を作成した。高発現形質転換体の地上部をヨウ素デンプン反応により染色したところ、葉においてデンプンの蓄積が増加した (図2)。また、*StCRCT* の欠損変異体を CRISPR/Cas9 法により作出した。今後、生理解析を進める予定である。



図2. *StCRCT* 高発現ジャガイモのデンプン蓄積。非形質転換ジャガイモ(○)と*StCRCT* 高発現ジャガイモ(○)の地上部をヨウ素ヨウ化カリウムで染色した。*StCRCT* 高発現ジャガイモの葉で黒色に見える部分が多く、デンプンが多く蓄積していることがわかる。

以上の結果、*CRCT* は核内で *14-3-3A* と複合体を形成し、*AGPL1* や *AGPS1* といったデンプン合成関連遺伝子のプロモーターに作用することでデンプン合成を制御していることが明らかとなった。また、*CRCT* はイネ以外のシロイヌナズナやジャガイモにおいてもデンプン合成の制御因子として働いていることが示唆された。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究により、*CRCT* が関係するデンプン合成制御メカニズムにおける重要な相互作用因子 *14-3-3A* を免疫沈降法により明らかにすることができた。また、ChIP 解析により *CRCT* がデンプン合成関連遺伝子のプロモーターに作用していることも明らかとなった。これらの成果は学術的に大きな進歩であり、高いレベルの学術誌に投稿論文を掲載できると考えている。投稿論文が発表される際はプレスリリースを行い、研究成果を広く発信したいと考えている。

これまでの *CRCT* の研究はイネのみで行ってきた。本研究では、イネ以外のシロイヌナズナとジャガイモにおける *CRCT* オーソログの機能解析に着手した。結果は予備的であるものの、シロイヌナズナやジャガイモにおいても *CRCT* オーソログがデンプン合成の制御因子として働いていることが示唆された。また、*CRCT* 高発現体ではシロイヌナズナやジャガイモにおいてもデンプン含量が増加する傾向が得られた。今のところ、デンプンの蓄積はヨウ素デンプン反応による組織染色しか行っていないが、今後は作出した欠損変異体も含めてデンプンや可溶性糖含量の解析を行う予定である。本研究の結果からおそらくは、シロイヌナズナやジャガイモの高発現体ではデンプン含量が劇的に増加しているはずである。予想通りの結果が得られれば、農作物の収量の増加、商品価値の向上、バイオエタノールの増産など *CRCT* オーソログの農業的な利用価値を強く示すことができる。よって、我々の研究によって農業分野、食品分野、工業分野など様々な研究が活性化されるものと期待している。