

**「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**
—平成28年度終了研究課題—

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： 11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/info986/sankou2.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5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	124件	22件			

()内は大挑戦型としての採択数。

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考:

- 1)平成25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。

・岩本政雄研究者

研究を中止したため。

2) 加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。

- ・上田貴志研究者（平成23年度採択）
研究期間が5年で、今年度終了するため。

5. 研究実施期間

平成25年10月～平成29年3月(3年型)
平成23年12月～平成29年3月(5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、海外で研究実施中の1名を除き、国内の10名全員について研究現場を訪問し、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28年12月	評価会開催
平成29年 2月	研究総括による事後評価
平成29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、本さきがけ研究が、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

本年度は、さきがけ研究11課題が終了した。内1課題は5年型の課題である。本領域は、光合成という二酸化炭素資源化の根本である分野から、バイオマスの増産、バイオマスの利活用に至る広範な領域をカバーしている。本年度終了課題にはこれらの分野の課題がバランス良く含まれている。これらの研究課題は、いずれも、この研究課題に研究者が一定の実績があり、それを基盤に更に発展させ、二酸化炭素の資源化に貢献する基盤技術への道を切り開く、挑戦的な個人研究というさきがけ研究に相応しいものとして採択された。それらの中で、大部分の課題は、さきがけ研究の目的を達成する研究成果をあげた。また、当初目標に対して十分な成果が得られなかった課題についても、それぞれの研究者が目標達成のため、最大限の努力をし、今後の発展が期待される新たな知見を数多く得ている。また、さきがけ研究の目的が、この分野の将来の主導的研究者の養成でもあることを考えると、それぞれが、研究者ネットワークを作り上げるなど、領域の活性化に貢献し、また新たな上級ポストの獲得、学会賞の受賞などが数多く見られ、本研究期間中に研究者として成長してきたと考えている。

こうした中で本年度終了課題の内、橘、西條、矢守 3氏の研究は特に優れたものとして評価される。橘熊野氏の「フルフラールを出発原料とする汎用高分子モノマーライブラリの構築」では、バイオマスの利活用の観点で非食用バイオマス由来のフルフラールに注目し、多くのバイオマス由来分子を作成した。特にこれらをライブラリ化して効率的なバイオベース高分子の合成デザインに活用できる道筋をつけたことは、この分野の発展に重要な役割を果たすと考えられる。また、バイオマスの増産に関して、西條雄介氏の「パターン受容体ネットワークによる高精度・持続型の植物防御システムの開発」では、植物の免疫センサーネットワークを明らかにし、病原菌感染に伴い植物が産生するダメージシグナルを利用することで耐病性や耐塩性を向

上させることに成功した。これらの知見は、共生も含め植物と微生物の相互作用研究に新たな局面を開くものと期待される。更に光合成の分野では、矢守航氏の「変動する光環境下における光合成制御メカニズムの解明と応用展開」において、光の強度が刻々と変化する野外の生育環境下で光合成効率を上昇させる要因を明らかにした。矢守氏は、複合領域の特長を活かしさがけ研究者ばかりでなく CREST の光合成研究チームとの共同研究を積極的に進め、野外の栽培でも二酸化炭素資源化効率を上げられる道筋を示した。これら3課題の詳細については、以下個別課題の評価の項目で述べる。

1. 安達 俊輔 研究者「葉内 CO₂ 拡散を促進する葉肉組織形態の改良を通じたイネ光合成能力の飛躍的向上」

高い光合成能力を持つ C₄ 植物のシステムを導入せずに、C₃ 植物であるイネの光合成能力を飛躍的に向上させることを目指し、安達氏は本研究で特に葉の内部の CO₂ 拡散に着目して研究を進めた。その結果、C₄ 植物であるトウモロコシに匹敵する高い光合成速度をもたらす遺伝子座(QTL)を5か所特定し、DNA マーカー選抜により高い光合成能力を持つイネを再構築することに成功した。しかし、当初目的である葉肉組織形態の遺伝的制御機構については十分な解明に至っていない。QTL 内に存在する原因遺伝子の特定にはまだしばらく時間がかかりそうだが、ぜひ突き止めてもらいたい。そのためには、葉肉細胞の形態、光合成の生理学などに優れた研究者との多方面の共同研究がきわめて有効であり、さがけ研究終了後も本テーマの完成に向けて努力されることを期待する。

2. 梅澤 泰史 研究者「アブシジン酸シグナル伝達の中核ネットワークを標的とした次世代型環境ストレス耐性植物の創成」

主要な植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)による環境応答には SnRK2 と呼ばれる一群のタンパク質リン酸化酵素が必須である。梅澤氏は、劣悪環境下での植物の成長を向上させるため、この SnRK2 によるシグナル伝達を人為的に制御して植物の乾燥耐性や耐塩性を改良することを目指した。その結果、SnRK2 の標的分子を解明し、その機能改変や SnRK2 の活性を制御する化合物を見出すなどの成果を上げた。特に SnRK2 と相互作用する因子として、新規の MAPKKK を発見し、その ABA シグナルにおける関与を明らかにしたことは、今後の基礎研究としての発展に重要である。更に、研究の過程で様々な新たな手法を導入し、研究を進めたことも評価できる。今後は、成果をモデル植物ばかりでなく作物にも応用し、次世代型環境ストレス耐性植物の作出に発展させていってほしい。

3. 笠原竜四郎 研究者「イネ生殖分子機構の解明と操作を基盤としたアポミクシスへの挑戦」

笠原氏は、バイオマス生産性の高い系統の増殖を可能にするため、受精を伴わずに種子などの繁殖体を生産するアポミクシス形質をイネに導入することを、本研究の目的とした。研究の過程では、まずシロイヌナズナを用い、受精不成立変異体の選抜と遺伝子の同定を進め、また受精せずに胚および胚乳が分化する変異体の選抜も行い、重要な変異体の獲得に成功した。しかしながら、まだ原因遺伝子の特定には至っておらず、現象論の段階にとどまっていることは残念である。最終目標のイネアポミクシス系統の育成にはまだ遠く、まずはシロイヌナズナに集中した基礎研究に注力し、植物の胚珠発生の制御機構の分子基盤の解明につなげてほしい。

4. 草野 都 研究者「低窒素で持続可能な二酸化炭素資源化のための中心代謝バランス制御機構の解明」

草野氏は、本研究において、窒素欠乏下での生育抑制が植物の中心代謝内の代謝物群のバランス(C/N バランス)で制御される仕組みを解明し、貧栄養の土地でも健全な成長を行う品種の選抜に応用できる基盤技術の開発を目的とした。その結果、C/N バランスの観点から特定のグルタミン合成酵素に研究のターゲットを絞り込むことができた。しかし、それが C/N バランスの制御に重要な関与をして、その制御機構の理解を通して、低窒素環境下でも無機物同化機能を十分に発揮できる植物体を開発する具体的な戦略が未だ見えていない。メタボローム研究者として、これまで培ってきた協力関係をさらに発展させ、二酸化炭素資源化に貢献できる研究成果を期待したい。

5. 西條 雄介 研究者「パターン受容体ネットワークによる高精度・持続型の植物防御システムの開発」

西條氏は、本研究において、植物免疫に重要な役割を果たしているパターン受容体ネットワークの仕組みを解明し、持続的で物質生産とも調和のとれた耐病性植物の作出を目指した。その結果、病原菌感染に由来するダメージシグナルに対する植物体の応答現象の分子実態の解明に成功し、また、ネットワーク構成要

素の一つ PEPR の過剰発現体で、防御応答性や耐塩性が増強していることを明らかにし、特許も出願している。これらの成果は高く評価されるもので、植物とそれを取り巻く微生物との複雑な相互作用の今後の解明に大いに期待したい。

6. 橋 熊野 研究者「フルフラールを出発原料とする汎用高分子モノマーライブラリの構築」

橋氏は、本研究において、非可食性バイオマス資源から工業的に生産されているフラン誘導体を原料として得られる化合物群のライブラリ化とライブラリを利用した機能性バイオベース高分子の創出を目的とした。その結果、フルフラールから由来する汎用高分子モノマーの多様な合成に成功し、しかもそれらをライブラリ化して効率的な機能性バイオベース高分子の合成デザインに活用できる道筋をつけたことは高く評価できる。これらの成果は、一般社会にも発信されており、新規技術の開発など、産業化に向けて多方面との共同研究につながっている。橋氏は、さきがけ研究の成果を基盤に、ALCA の要素技術課題として採択されている。本さきがけの研究成果をさらに発展させ、イノベーションに直結する今後の応用展開に大いに期待したい。

7. 豊田 正嗣 研究者「植物の全身性クロストークを支える長距離・高速カルシウムシグナルの解明と応用」

豊田氏は、本研究において、全身性長距離・高速カルシウムシグナルの伝達機構及び全身獲得抵抗性を解明し、ケミカルスクリーニング法の開発を目的とした。研究の過程で、豊田氏はカルシウムシグナルの長距離伝播を可視化する技術を開発し、またケミカルスクリーニングシステムも開発した。更に、これらを利用して、グルタミン酸受容体が関与する膜電位反応がカルシウムシグナリングの初発となることを発見し、そのシグナルが篩部を通じて伝播することを明らかにした。この成果は植物における長距離情報シグナル伝達研究に大きなインパクトをもたらすと評価される。一方、そのメカニズムの詳細な解明は今後に残されており、病害虫による被害の解決につながる大きな成果に発展することを期待したい。

8. 松下 智直 研究者「光環境に応じた光呼吸の新規適応機構の解明とその改変による植物生産性の向上」

光合成による二酸化炭素固定速度を低下させる光呼吸について、松下氏が自ら発見した光環境変化に対する新たな適応機構を解明し、その改変により植物生産性を向上させることを目的に研究がすすめられた。その結果、フィトクロームシグナルに由来する一連の遺伝子群の選択的転写開始点制御現象を見出し、光呼吸経路のキー酵素であるグリセリン酸キナーゼの細胞内局在が変化することを明らかにした。また領域内のネットワークを活かし、多くの共同研究により研究を推進した点も評価できる。今後、グリセリン酸キナーゼの葉緑体と細胞質の二重局在性の現象とその生理的意義の解明という、本研究の骨子の部分についてさらに研究を発展させ、早急に論文として取りまとめしていくことを期待する。

9. 山口 有朋 研究者「木質バイオマスの全炭素成分有効利用を目指した触媒化学変換技術の開拓」

山口氏は、固体触媒を用いた化学変換により、木質バイオマスの全炭素成分をプラスチック原料などの有用化学物質へと変換する技術の開発を目指して、研究を進めた。その結果、セルロース、ヘミセルロース、リグニンのすべてを2段階の触媒反応プロセスで有用化合物に変換する新しい触媒と反応技術を開発したことは、評価できる。今後は、省エネルギー化、低コスト化に関する開発研究を企業とともに進め、LCA を考慮しても成り立つ合理的な技術としていくことを期待したい。

10. 矢守 航 研究者「変動する光環境下における光合成制御メカニズムの解明と応用展開」

矢守氏は、光環境が大きく変動する自然条件下における光合成反応の仕組みを解明し、その成果に基づき、変動光環境下でも高い光合成機能を持つ植物の創出を目指した。その結果、サイクリック電子伝達経路、気孔開口、Rubisco の活性化の寄与を解析することで、変動光環境下での光合成効率を上昇させる要因として Rubisco アクチベースの発現上昇や気孔開度の上昇を見出した。またこれらインパクトのある成果を積極的に論文として公表し、高い引用数を得ており、高く評価される。今後は、さきがけ研究で獲得した多くの変異体を用い、人工気象器内ではなく、野外での実際の光変動下での光合成活性の上昇に向けた研究の加速を期待したい。

11. 上田 貴志 研究者「膜交通の機能改変による高機能植物の開発」(5年型)

植物細胞内の細胞小器官を結ぶ膜交通の仕組みは、各種ストレス応答においても重要な役割を果たしている。上田氏は、自ら発見した上記現象において、膜交通の構成要素である ARA6 の役割を解明し、膜交通

経路を最適化することで塩ストレスや病気に強い植物の作出を目指した。その結果、植物特有の ARA6 がエンドソームから細胞膜への膜交通に寄与する仕組みの解析から、塩ストレスや浸透圧ストレスの耐性発揮に必要であること、及びうどんこ病の吸器嚢膜の形成に関わることを証明し、ARA6 の改変や制御によりストレス耐性や病原菌抵抗性を付与できることを提案した。また、ARA6 が QQS 遺伝子の発現制御にも関わり、デンプン代謝の制御経路にも重要な役割をしていることも見出した。これら免疫応答や非生物的応答と膜交通の関係を示す多くの成果を得、発表してきたことは、基礎研究として高く評価できる。しかしながら、中間評価でも指摘されたように、本研究領域の目的に合った有用植物の開発に繋げるには、未だ距離がある。今後は、膜交通が植物の多様な機能に関わることを更に解析し、植物の二酸化炭素資源化能力増強の新たな分子戦略の提案に繋がることを期待したい。

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29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 上席研究員

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 特任教授

長谷 俊治*1 大阪大学 海外拠点本部 特任教授

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 教授

山谷 知行 東北大学 研究推進本部 特任教授

横田 明穂*2 奈良先端科学技術大学院大学 名誉教授

*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29年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	2	71	73
口頭	126	67	193
その他	27	28	55
合計	155	166	321

(2)特許出願件数

国内	国際	計
3	1	4

(3)受賞等

・安達 俊輔

日本作物学会 研究奨励賞(H27.3)

日本作物学会 論文賞(H26.3)

・橘 熊野

繊維学会 若手優秀発表賞(H26.6)

・豊田 正嗣

Keystone Symposia Future of Science Fund Scholarship(H26.2)

第 38 回内藤コンフェレンス ベストポスター賞(H26.10)

日本生物物理学会 若手奨励賞(H27.9)

・松下 智直

Asia and Oceania Society for Photobiology Award for Young Scientist(H27.11)

・山口 有朋

新化学技術推進協会 新化学技術研究奨励賞ステップアップ賞(H28.5)

・矢守 航

日本農学会 日本農学進歩賞(H25.11)

(4)招待講演

国際 36件

国内 30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)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
安達 俊輔 (兼任)	葉内CO ₂ 拡散を促進する葉肉組織 形態の改良を通じたイネ光合成能力 の飛躍的向上 (東京農工大学グローバル イノベーション研究院)	東京農工大学グローバルイ ノベーション研究院 特任助教 (農業生物資源研究所 日本学術振興会特別研究員)	41
梅澤 泰史 (兼任)	アブジジン酸シグナル伝達の中樞 ネットワークを標的とした次世代型 環境ストレス耐性植物の創成 (東京農工大学大学院 生物システム応用科学府)	東京農工大学大学院生物システム 応用科学府 准教授 (東京農工大学農学研究院 准教授)	45
笠原竜四郎 (専任)	イネ生殖分子機構の解明と操作を 基盤としたアポミクシスへの挑戦 (名古屋大学トランスフォーメティブ 生命分子研究所)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (名古屋大学大学院理学研究科 研究員)	40
草野 都 (兼任)	低窒素で持続可能な二酸化炭素 資源化のための中心代謝バランス 制御機構の解明 (理化学研究所 環境資源科学研究センター)	筑波大学生命環境科学研究科 教授 (理化学研究所環境資源科学研究 センター 上級研究員)	34
西條 雄介 (兼任)	パターン受容体ネットワークによる 高精度・持続型の植物防御システムの 開発 (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 准教授 (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)	51
橋 熊野 (兼任)	フルフラールを出発原料とする汎用高 分子モノマーライブラリの構築 (群馬大学大学院理工学府)	群馬大学大学院理工学府 助教 (群馬大学理工学研究院 助教)	46
豊田 正嗣 (専任/兼任)	植物の全身性クロストークを支える 長距離・高速カルシウムシグナルの 解明と応用 (ウイスコンシン大学(マディソン校) 植物学部)	埼玉大学大学院理工学研究科 准 教授 (ウイスコンシン大学 日本学術振興会海外特別研究員)	41
松下 智直 (兼任)	光環境に応じた光呼吸の新規適応 機構の解明とその改変による植物 生産性の向上 (九州大学大学院農学研究院)	九州大学大学院農学研究院 准教授 (九州大学大学院農学研究院 准教授)	53
山口 有朋 (兼任)	木質バイオマスの全炭素成分有効 利用を目指した触媒化学変換技術の 開拓 (産業技術総合研究所 化学プロセス研究部門)	産業技術総合研究所化学プロセス 研究部門 研究グループ長 (産業技術総合研究所コンパクト 化学システム研究センター 主任研究員)	41

矢守 航 (兼任)	変動する光環境下における光合成 制御メカニズムの解明と応用展開 (東京大学大学院理学系研究科)	東京大学大学院理学系研究科 准教授 (千葉大学環境健康フィールド科学 センター 助教)	45
--------------	---	--	----

(5年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
上田 貴志 (兼任)	膜交通の機能変化による高機能植物 の開発 (基礎生物学研究所 細胞動態研究部門)	基礎生物学研究所 細胞動態研究部門 教授 (東京大学大学院理学系研究科 准教授)	99

研究報告書

「膜交通の機能改変による高機能植物の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年12月～平成29年3月

研究者: 上田 貴志

1. 研究のねらい

植物は、様々な環境に適応して生育している一方で、様々な生物学的および非生物学的ストレスに常にさらされている。そのため、生育環境によっては植物が本来持つ能力を十分に発揮できず、本来の生産能力を下回ることがしばしば起こることになる。

小胞体、ゴルジ体、多胞体、液胞／リソソームなどの単膜系細胞小器官は、小胞または小管を介した物質輸送機構、“膜交通”により結ばれている。この膜交通経路の多様化と進化が、さらなる機能的に分化した細胞小器官を生み出す原動力となったと考えられている。また、進化の過程でそれぞれの生物が特異的に獲得した膜交通経路が、各生物において重要かつ特徴的な生命現象の基盤として機能していることも徐々に明らかとなりつつある。そのような例として我々は、植物が進化の過程で独自に獲得した RAB GTPase (ARA6 グループ) を見だし、これがエンドソームから細胞膜への輸送経路で機能することを突き止めた。ARA6 の明確なホモログは植物以外には存在しないことから、ARA6 が機能する輸送経路は植物において独自に開拓されたものであると考えられる。この ARA6 の生理的役割を調べる過程で我々は、1) ARA6 の機能が低下した *ara6* 変異体の塩ストレスや浸透圧ストレスに対する耐性が低下すること、2) うどんこ病菌の吸器を取り囲む吸器嚢膜に ARA6 がリクルートされること、を見いだした。これらの結果は、植物独自の膜交通経路が、環境ストレスに対する応答や病原菌との戦いにおいて重要な役割を担っていることを示唆している。そこで、本さきがけ研究においては、外部環境と植物細胞のインターフェイスとして機能する植物特異的な膜交通経路の、非生物学的および生物学的ストレス応答への関与の仕組みを分子レベルで明らかにすることを目指した。さらに、得られた発見をもとに膜交通の仕組みを改変・最適化することにより、植物に生物学的及び非生物学的ストレスに対する抵抗性を付与し、植物の生育に適さない環境下における植物由来バイオマスの増産や、植物病害による生産性の低下の抑止、それに伴う大気中二酸化炭素の資源化効率の上昇に貢献するための基盤技術の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

植物特異的な膜交通経路の生理的機能を明らかにするとともに、その最適化と機能強化により、植物にストレスや病原菌に対する抵抗性を付与することを目指して研究を進めた。その結果、植物特異的 Rab GTPase である ARA6 が、*Qua-Quine Starch (QQS)* 遺伝子の発現制御を介してデンプンの代謝に関わっていることを見いだした。また、*ara6* 変異体において病原性細菌に対する抵抗性が上昇している原因も突き止めた。*QQS* の発現調節を担う転写因子候補の同定にも成功しており、現在その解析を進めている。

病原性糸状菌および卵菌の感染と膜交通経路の関連についても解析を進めた。うどんこ病

菌およびべと病菌が宿主の細胞内に形成する吸器嚢膜に、ARA6 と保存型 RAB5 である ARA7 が局在すること、それらの活性化因子である VPS9a やエンドソームに局在する膜融合実行因子がうどんこ病菌の吸器嚢膜から排除されていることを見だし、吸器嚢膜が非常にユニークな性質を有する膜であることを突き止めた。さらに、ARA6 の人為的活性化がうどんこ病菌の増殖を抑制すること、これが吸器嚢膜を取り囲むエンケースメントの形成促進に起因することも明らかにした。一方、半寄生性の炭疽病菌が形成する侵入菌糸嚢膜には、うどんこ病菌が形成する吸器嚢膜とは全く異なるタンパク質が局在していることを明らかにした。このことから、病原性糸状菌の感染機構の多様性の一端が明らかとなった。

ARA6 および ARA7 の相互作用因子群の解析も進めるとともに、基部陸上植物ゼニゴケにおけるその機能の保存性についても解析した。その結果、陸上植物でエンドソーム輸送の仕組みが多様化していることを突き止めた。以上の成果に加え、膜交通が花成の制御に関わること、植物の液胞輸送経路が、動物のリソソーム輸送経路と共通の制御因子を用いつつ、はるかに複雑化していること、ゼニゴケが有用物質産生のための有力なプラットフォームとなりうることなども明らかにした。

(2) 詳細

(A) ARA6 経路はいかにして耐塩性などの環境ストレスに関わるのか

塩ストレスや浸透圧ストレスに対する応答の変化は、転写をはじめとする植物の生理応答現象の総和として引き起こされると考えられる。そこで、マイクロアレイ解析により、シロイヌナズナの野生型と *ara6* 変異体における遺伝子転写レベルの網羅的な比較を行った。その結果、QQS 遺伝子の発現が、*ara6* 変異体において顕著に上昇していることが明らかになった。さらに、*ara6* 変異体におけるデンプンとグルコース量を測定したところ、野生型と比較してデンプン量が有意に減少するとともに、グルコース量が増加していることも見いだした。デンプンと糖の転換は細胞内の浸透圧の調節に寄与していることから、ARA6 の塩ストレスや浸透圧ストレスへの関与は、このデンプン・糖代謝を介したものであると考えられる。糖濃度の上昇に起因する病原性細菌に対する抵抗性の向上の結果(下述)と併せ、この成果を原著論文として発表した(Tsutsui *et al.*, 2015)。さらに、QQS の発現を制御している転写因子の候補を同定することにも成功した。また、最近 QQS が NF-YC4 サブユニットと相互作用することで細胞質から核に局在を変え、NF-YC4 が NF-YA と NF-YB のサブユニットと相互作用することで転写因子として機能し、内生のデンプン量やタンパク量を変化させることが報告された。この結果を検証しつつ、QQS の転写制御に関わる転写因子の解析を現在進めている。さらに、ARA6 の機能が他の植物で保存されているかを調べるため、イネの *ara6* 変異体も確立した。

(B) ARA6 経路は病原菌の感染と増殖にどのように関わるのか

(1) うどんこ病菌、べと病菌、炭疽病菌

うどんこ病菌の吸器嚢膜がどのような性質を持つのかは長らく謎であったが、我々は ARA6 が吸器嚢膜に局在することを、GFP と融合した ARA6 の生細胞内での詳細な観察と免疫電子顕微鏡観察により証明した。このことは、吸器嚢膜が少なくとも部分的にはエンドソ-

ムの性質を有することを示している。そこで、他のエンドソームタンパク質が吸器嚢膜に局在するかを調べたところ、動物の RAB5 のオルソログである ARA7 が吸器嚢膜に局在する一方で、ARA6 と ARA7 の共通の活性化因子である VPS9a は吸器嚢膜に局在しないことが明らかとなった。これらの結果から、吸器嚢膜上において ARA6 や ARA7 の活性化がうどんこ病菌により抑制されている可能性が強く示唆された(Inada et al., 2016 として発表)。この成果は、掲載誌の表紙に採用されるとともに、Editor-in-Chief's Choice に選ばれた。続いて、恒常活性型 ARA6 の過剰発現により ARA6 の人為的活性化の影響を調べたところ、ARA6 の活性化により吸器嚢膜を取り囲むように形成されるエンケースメントの形成が促進され、うどんこ病菌の増殖が抑制されることが明らかとなった。一方、液胞に局在する RAB GTPase である RAB7 や膜融合因子(SNARE)である SYP22 は、吸器嚢膜には局在しなかった。これらの結果から、うどんこ病菌が吸器嚢膜に部分的なエンドソームとしての性質を付与して異物として認識されることを防ぐとともに、ARA6 や ARA7 の活性化を防ぐことにより、後期エンドソームへの成熟や液胞と融合することを防ぎ、寄生関係を確立していることが強く示唆された。

炭疽病菌感染時に形成される侵入菌糸嚢膜についても、ARA6 をはじめとする膜交通関連因子との関連を調べた。侵入菌糸嚢膜への ARA6 の明確な局在が見られなかったため、他の様々な因子について局在解析を進め、ホスファチジルイノシトールリン酸の興味深い挙動を発見した。ホスファチジルイノシトールリン酸は生体膜の構成成分のひとつであり、膜交通にも深くかかわっている。我々は、アブラナ科野菜類炭疽病菌の侵入菌糸嚢膜に、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸[PtdIns(4,5)P₂]が極めて大量に蓄積していることを見いだした。また、PtdIns(4,5)P₂ の合成酵素である PIP5 キナーゼも、侵入菌糸嚢膜に集積していた。侵入菌糸嚢膜は細胞膜とつながった膜であるが、細胞膜に局在する SNARE (SYP121, SYP132) やアクアポリン(PIP2)は、侵入菌糸嚢膜に集積していなかった。これらの結果から、侵入菌糸嚢膜は細胞膜とは異なる特殊な性質を有していることが明らかとなった。現在、ホスファチジルイノシトールリン酸の生合成の変化が感染にどのような影響ををもたらすかを解析中である。

炭疽病菌以外の病原体感染時におけるホスファチジルイノシトールリン酸の局在についても観察を行った。べと病菌 (*Hyaloperospora arabidopsidis*) の吸器嚢膜には、PtdIns(4,5)P₂ は局在するものの、顕著な集積は見られなかった。対して、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PtdIns4P) が、べと病菌の吸器嚢膜の付け根に多く存在していた。さらに、うどんこ病菌の吸器嚢膜におけるホスファチジルイノシトールリン酸の集積も解析し、炭疽病菌やべと病菌とは異なる集積パターンを示すことを見いだした。これらの結果から、病原体ごとに、ホスファチジルイノシトールリン酸の集積メカニズムが異なることが示された。

(2) トマト班葉細菌病菌

ara6 変異体の生物的ストレスに対する応答を調べるため、トマト班葉細菌病菌 (*Pst* DC3000) を *ara6* 変異体に接種し、その増殖を調べた。その結果、*ara6* 変異体中で *Pst* DC3000 の増殖が抑制されることが明らかとなった。シロイヌナズナをグルコースで処理すると、PR2(β-1,3-グルカナーゼ)の発現が上昇することが報告されている。*ara6* 変異体中では

グルコース濃度が上昇していることから、この *Pst* DC3000 の増殖抑制は、変異体における糖濃度の上昇に起因している可能性がある。そこで、*ara6* 変異体における *PR2* の発現量を調べたところ、有意な発現の上昇が認められた。また、*ara6* 変異体をさらにグルコースで処理しても、*PR2* の発現のさらなる上昇は観察されなかった。また、グルコース処理を施した *ara6* 変異体における *Pst* DC3000 の増殖は、グルコース処理していない *ara6* 変異体やグルコース処理を施した野生型植物とほぼ同程度であった。これらの結果から、*ara6* 変異体における *Pst* DC3000 の増殖抑制は、内生の糖濃度の上昇に起因しているものと結論づけた (Tsuetsui *et al.*, 2015)。以上のことから、ARA6 は膜交通における機能に加え、QQS を介して糖代謝と病原性細菌に対する抵抗性にも関与していることが示唆された。今後 ARA6 の機能改変により、植物体内の糖濃度の調節や、病原性細菌に対する抵抗性の付与が期待される。

(C) ARA6 の機能発現機構の解析

ARA6 の機能発現機構をさらに明らかにするために、活性型 (GTP 結合型) ARA6 と特異的に相互作用する分子を単離し、その解析を進めた。これまでに複数のエフェクターを単離しているが、その中でも特に PLANT-UNIQUE RAB5 EFFECTOR 2 (PUF2) の機能解析を重点的に進めた。その結果、ARA6 が PUF2 の機能を介して保存型 RAB5 が関与するエンドソームから液胞への輸送を負に制御しているという驚くべき結果が得られた (投稿準備中)。さらに、保存型 RAB5 のエフェクターを同定し、種子における貯蔵タンパク質の輸送の仕組みの一端を解明した (Sakurai *et al.*, 2016)。さらに、VPS9a の根の形態形成における役割を明らかにするために、VPS9a の機能が低下した *vps9a-2* 変異体の詳細な解析を行い、VPS9a が制御する膜交通経路が根端分裂組織の活性や放射軸形成に必須の役割を担っていることも明らかにした。また、VPS9a が機能する液胞輸送経路が、動物のリソソームへの輸送経路と比較し独自の多様化を果たしていることを明らかにし (Ebine *et al.*, 2014)、植物が進化の過程で独自の膜交通経路網を獲得してきたことを明らかにした。

(D) 研究の進展に伴って得られたその他の成果

(1) ARA6 以外の RAB も非生物的ストレスおよび生物的ストレスにおいて機能する

ARA6 以外の RAB GTPase について、塩ストレスや病原菌応答における役割を明らかにするため、陸上植物で特徴的な多様化を果たしている RAB11/RABA グループについても解析を進めた。シロイヌナズナゲノムには 57 個の RAB GTPase がコードされており、その中の 26 個がこのグループに属している。それらはさらに 6 つのサブグループ (RABA1- RABA6) に分類されており、それぞれのサブグループ間で機能分化が進んでいると考えられていたが、具体的な機能についてはあまり明らかにされていなかった。そこで、病原性細菌の認識を担う flagellin レセプター、FLS2 の輸送に、RAB11/RABA の 6 つのサブグループメンバーがどのように関与するのかをタバコの葉における一過的発現系を用いて解析した。その結果、RABA1 は FLS2 の細胞膜への輸送を制御していること、RABA4 と RABA6 が、FLS2 のリガンド依存的エンドサイトーシスの異なるステップを制御していることが明らかとなった (Choi *et al.*, 2013)。さらに、RABA1 の機能欠失変異体の解析から、このサブグループが塩ストレス耐性に必要で

あることも明らかとなった。その他、クラスリン依存性エンドサイトーシスが FLS2 を介した抵抗性の惹起に必須であることも、独国 Silke Robatzek 博士との共同研究により明らかにした (Mbengue et al., 2016 PNAS)。

(E) ARA6 経路の役割は陸上植物に普遍的なものか

シロイヌナズナで見いだした ARA6 の機能が陸上植物で保存されているかどうかを明らかにすることを目的とし、陸上植物の最も基部で分岐したタイ類ゼニゴケにおける ARA6 の機能解析を進めた。さらに、苔類に特異的なオルガネラであり、抗癌作用や抗インフルエンザウイルス活性など、多くの有用な活性を有することが報告されている化合物を含む油体の由来を突き止めるとともに、ゼニゴケ内で油体を人為的に増加させる方法を見いだした。

3. 今後の展開

(A) ARA6 経路はいかにして耐塩性などの環境ストレスに関わるのか

これまでの研究により、ARA6 がデンプンと糖の代謝制御に関わる結果を得た。*ara6* 変異体の塩ストレスや浸透圧ストレスに対する高感受性は、この機能の異常に起因している可能性が高い。そこで、ARA6 がデンプンと糖の代謝にどのように関わるのかをさらに明らかにするべく研究を展開する。*ara6* 変異体におけるデンプンの減少の原因として、現在以下の2つの可能性を考えている。

(1) アミラーゼの発現上昇がデンプン量の減少の直接的な原因となっている可能性

我々の研究により、 β アミラーゼの発現上昇が、*ara6* 変異体におけるデンプンの減少と糖濃度の上昇の原因である可能性が示された。この可能性を検証するために、アミラーゼを過剰に発現した形質転換体を作製して内生のデンプン量やグルコース量を測定する。また、*ara6-1* 変異体のマイクロアレイ解析では検出することができなかった遺伝子の発現変動が RNA-seq 解析で明らかになったことから、RNA-seq 解析で得られた高精度な遺伝子発現プロファイルを用いて、*ara6-1* 変異体における遺伝子発現パターンの変動のメカニズムを明らかにする。

(2) ARA6 が葉緑体機能に関わっている可能性

ゼニゴケにおける ARA6 の機能解析から、ゼニゴケ ARA6 が葉緑体への輸送に関わる可能性が示唆されている。シロイヌナズナにおいても、ARA6 がデンプンの代謝に必要なタンパク質の葉緑体への輸送に関わっている可能性があるため、この検証を行う。ゴルジ体経由で葉緑体へ輸送されるという報告のあるタンパク質を積み荷の候補とし、*ara6* 変異体における局在を調べるとともに、野生型と *ara6* 変異体で単離葉緑体のプロテオーム解析を行い、葉緑体を構成するタンパク質の組成に違いがあるかを精査する。

これらの解析を通して、ARA6 のシロイヌナズナにおける新奇機能を明らかにするとともに、その改変によるデンプンと糖の含量の人為的な改変が可能かを検証する。

(B) 病原菌の感染と増殖に膜交通はどのように関わるのか

現在までに、炭疽病菌の侵入菌糸嚢膜に PtdIns(4,5)P2 と PIP5 kinase が局在することが明らかになっている。ここで機能するさらなる因子の探索のため、PIP5 kinase の相互作用因子の同定を目指す。PIP5K3-GFP を発現する植物を用いて共免疫沈降実験を行い、候補因子を質量分析により同定する。その後候補因子の侵入菌糸嚢膜への局在を観察し、新たな侵入菌糸嚢膜

に集積する因子の同定を行う。

本研究の結果から、炭疽病菌は、PtdIns(4,5)P2 を多く含む侵入菌糸嚢膜を植物に作らせることにより、植物組織内への侵入を成功させていると推測される。このことから、逆に細胞膜における PtdIns(4,5)P2 の量を減らすことにより、菌糸の侵入を阻止できるのではないかと考えている。PtdIns(4,5)P2 を PtdIns4P に代謝する酵素である phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase を過剰発現させる植物の作出し、炭疽病菌の感染に対し抵抗性を持つかどうかを検証する。

べと病菌の吸器嚢膜には、PtdIns4P が付け根の部分にしか局在しないことが判明した。このことから、べと病菌は感染のために、PtdIns4P を吸器嚢膜から積極的に排除している可能性がある。PtdIns4P は phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase (PI4P phosphatase) により分解されることから、べと病菌の吸器嚢膜には PI4P phosphatase が集積し、PtdIns4P を排除しているのではないかと考えられる。この仮説を証明するために、べと病菌の吸器嚢膜における PI4P phosphatase の局在を調べる。さらに、PI4P phosphatase の変異により、べと病菌に対する抵抗性が上昇するかを確かめる。この結果をもとに、べと病菌感染に強い植物を作り出すことを試みる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究は総じて順調に進行した。植物特異的な膜交通制御因子である ARA6 が、塩ストレス及び浸透圧ストレス応答にいかに関わるのかについて、マイクロアレイ解析をきっかけにデンプン・糖代謝との関連を見だし、そこで機能する転写因子の同定とその解析が現在進行中である。今後この転写因子の発現をデザインすることにより、デンプン代謝の人為的改変が可能となると期待される。細胞内の糖濃度の上昇が植物免疫の活性化を促すという我々が見いだした結果についても、今後耐病性が向上した植物の作出に応用できるものと期待している。病原体感染と植物の膜交通経路の関連についても、うどんこ病菌、べと病菌、炭疽病菌を用いて様々な実験を行った結果、その感染機構の多様性が浮き彫りとなった。今後は得られた知見を活用し、それぞれの病原菌に応じた抵抗性増強方法を開発し、植物の高機能化につながる結果をさらに集積する予定である。植物特異的な膜交通経路の進化細胞生物学的研究も順調に進んでおり、ARA6 機能の陸上植物における多様性ととも、ゼニゴケを有用物質の生産工場として用いる可能性が浮上してきた。これらの成果の一部はすでに原著論文として発表し、掲載誌の表紙を飾るとともに Editor-in-Chief's choice に選出される等、高い評価を得ている。イネ *ara6* 変異体の確立などは進めつつも、モデル植物以外の植物に研究を展開するまでには至らなかった点に忸怩たる思いはあるが、本研究で得られた知見をさらに発展させるべく、今後も研究に邁進する所存である。

(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)

植物細胞内の細胞小器官を結ぶ膜交通の仕組みは、各種ストレス応答においても重要な役

割を果たしている。上田氏は、自ら発見した上記現象において、膜交通の構成要素であるARA6の役割を解明し、膜交通経路を最適化することで塩ストレスや病気に強い植物の作出を目指した。その結果、植物特有のARA6がエンドソームから細胞膜への膜交通に寄与する仕組みの解析から、塩ストレスや浸透圧ストレスの耐性発揮に必要であること、及びうどんこ病の吸器嚢膜の形成に関わることを証明し、ARA6の改変や制御によりストレス耐性や病原菌抵抗性を付与できることを提案した。また、ARA6がQQS遺伝子の発現制御にも関わり、デンプン代謝の制御経路にも重要な役割をしていることも見出した。これら免疫応答や非生物的応答と膜交通の関係を示す多くの成果を得、発表してきたことは、基礎研究として高く評価できる。しかしながら、中間評価でも指摘されたように、本研究領域の目的に合った有用植物の開発に繋げるには、未だ距離がある。今後は、膜交通が植物の多様な機能に関わることを更に解析し、植物の二酸化炭素資源化能力増強の新たな分子戦略の提案に繋がることを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sakurai, H., Inoue, T., Nakano, A. and Ueda, T. (2016) ENDOSOMAL RAB EFFECTOR WITH PX-DOMAIN, an Interacting Partner of RAB5 GTPases, Regulates Membrane Trafficking to Protein Storage Vacuoles in Arabidopsis. *Plant Cell*, 28, 1490–1503, doi: 10.1105/tpc.16.00326
2. Inada, N., Betsuyaku, S., Shimada, T., Ebine, K., Ito, E., Kutsuna, N., Hasezawa, S., Takano, Y., Fukuda, H., Nakano, A., and Ueda, T. (2016) Modulation of plant RAB GTPase-mediated membrane trafficking pathway at the interface between plants and obligate biotrophic pathogens. *Plant Cell Phys.*, 57, 1854–1864, doi: 10.1093/pcp/pcw107
3. Tsutsui T, Nakano A, Ueda T. (2015) The plant-specific RAB5 GTPase ARA6 is required for starch and sugar homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Phys.* 56: 1073–1083, doi: 10.1093/pcp/pcv029
4. Ebine K, Inoue T, Ito J, Ito E, Uemura T, Goh T, Abe A, Sato K, Nakano A, Ueda T (2014) Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways. *Curr. Biol.*, 24: 1375–1382, doi: 10.1016/j.cub.2014.05.004
5. Choi S, Tamaki T, Ebine K, Uemura T, Ueda T (corresponding author), Nakano A (2013) RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the FLAGELLIN SENSING 2 receptor. *Plant Cell*, 25; 1174–1187, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.108803

(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)

英文総説

1. Ebine, K. and Ueda, T. (2015) Roles of membrane trafficking in plant cell wall dynamics. *Front. Plant Sci.*, doi: 10.3389/fpls.2015.00878

2. Uemura, T. and Ueda, T. (2014) Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22: 116–121
3. Ueda, T. (2014) Cellulase in Cellulose Synthase: A Cat among the Pigeons? *Plant Physiol.* 165: 1397–1398
4. Inada, N. and Ueda, T. (2014) Membrane Trafficking Pathways and their Roles in Plant–Microbe Interactions. *Plant Cell Phys.* 55: 672–686
5. Fujimoto, M. and Ueda, T. (2012) Conserved and plant–unique mechanisms regulating plant post–Golgi traffic. *Front. Plant Sci.* 3: 197.

和文総説

1. 海老根一生, 上田貴志 (2015) 細胞壁の構築・維持と膜交通システム. 植物の生長調節. Vol.50: 43–49
2. 藤本優, 上田貴志 (2014) 膜交通経路の多様性獲得機構から見た植物のポストゴルジ輸送網. 植物科学の最前線(BSJ–Review) Vol. 5: 3–20
3. 藤本優, 上田貴志 (2012) 細胞壁資材の細胞内輸送–植物の膜交通と細胞壁–. 遺伝. Vol. 66: 47–52, エヌ・ティー・エス

著書

1. Ueda, T., Sato, M.H., and Uemura, T. *Endocytosis in Plants* (2012) The role of Rab GTPases and SNARE proteins in plant endocytosis and post–Golgi trafficking. Edited by Jozef Samaj, Springer, 201–216
2. DOJIN BIOSCIENCEシリーズ メンブレントラフィック 福田光則, 吉森保編(分担執筆) (2016) 化学同人 ISBN978–4–7598–1723–2
3. 植物細胞壁実験法 石井忠, 石水毅, 梅澤俊明, 加藤陽治, 岸本崇生, 小西照子, 松永俊朗編(分担執筆)(2016) 弘前大学出版会 ISBN 978–4–907192–21–1
4. 植物細胞壁 –基礎と応用– 西谷和彦, 梅澤俊明編(分担執筆)(2013)講談社 ISBN 978–4–06–153818–4

主な学会発表および国内招待講演

1. 上田貴志 比べて分かる～植物に学ぶ膜交通の保存性と多様性～ 第66回日本細胞生物学会大会 2014年6月12日, 奈良, シンポジウム「比べてみよう:細胞ダイナミクスの共通性と独自性」, co-organizer
2. 上田貴志 細胞内の交通網～植物に学ぶその多様化と進化～ 生命科学シンポジウム 2013年7月8日, 東京
3. 上田貴志 植物における膜交通経路の機能と多様性 シンポジウム「明日の植物科学を探る –ゲノムから細胞機能の統合を目指して–」, 2012年11月7日, 奈良
4. 上田貴志 植物の膜交通:分子機構と高次機能,そして進化. 公開シンポジウム「タンパク質の細胞内交通整理」, 2012年9月10日, 東京
5. 上田貴志 植物におけるポストゴルジ輸送経路の多様化と進化. 日本植物学会第76回大会, 2012年9月16日, 姫路, シンポジウム「植物科学が拓く進化細胞生物学」, co-organizer

海外招待講演

1. Takashi Ueda (invited speaker) (2016) Diversification of membrane trafficking pathways –lessons from the liverwort–. EMBO workshop “New model systems for early land plant evolution” 22st–24th June. Vienna, Austria
2. Takashi Ueda (invited speaker) (2016) Diversification of membrane trafficking pathways during land plant evolution. 1st CRC 1101 symposium, Molecular Encoding of Specificity in Plant Processes 4th–6th April. Tübingen, Germany
3. Takashi Ueda (Invited speaker) (2014) Diversification of membrane trafficking pathways –lessons from plants–. The first International Conference on Organelle Biogenesis and Function in Hong Kong. 4th–6th December. Chinese University of Hong Kong, Hong Kong
4. Takashi Ueda (Invited speaker) (2014) Expected and unexpected roles of membrane traffic in stress response. Gordon Research Conference on Salt & Water Stress in Plants. 5th August. Newry, USA
5. Takashi Ueda (Invited speaker) (2013) Diversification of membrane trafficking pathways ~lessons from plants~. UK–Japan joint meeting on Plant Cell Biology. 16 July. Hopkins building, Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK

国際学会での講演

1. Takashi Ueda (invited speaker) (2016) Twins or Convergence? ~two plant–unique cellular structures acquired during evolution~. International Symposium “Front Lines of Plant Cell Wall Research and Beyond” 4th–5th October. Atami, Japan
2. Takashi Ueda (invited speaker) (2015) Diversification of membrane trafficking pathways during land plant evolution. Front Lines of Plant Cell Wall Research. 21st March. Nara, Japan
3. Takashi Ueda (Invited speaker) (2014) Conserved and unique aspects of membrane trafficking in *Marchantia polymorpha*. Marchantia workshop 2014. 8th–10th December. Kobe, Japan
4. Takashi Ueda (Selected speaker) (2014) Diversification of membrane trafficking pathways ~lessons from plants~. The 38th NAITO Conference on Molecule–based biological systems. 9th October. Sapporo, Japan
5. Takashi Ueda (Invited speaker) (2013) Mechanism and function of plant–unique membrane trafficking pathways. International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, 27 March. Kurashiki, Japan

プレスリリース

道はひとつじゃない～植物の液胞にタンパク質を運ぶ3つの経路を発見～ 5月30日

海外セミナー講師

1. 福建農林大学, 福州, 23th December, 2016

2. Technical University of Munich, Munich, Germany, 7th April, 2016
3. University of Toronto, Toronto, Canada, 7 July, 2014
4. 中国科学院 上海植物逆境生物学研究中心, 上海, 中国, 24 September, 2013
5. Umeå Plant Science Center, Umeå, Sweden, 23 August 2012

国内セミナー講師

山形大学 (2012), 埼玉大学 (2012), 奈良先端科学技術大学院大学 (2012), 京都大学 (2013), 岩手大学 (2013), 埼玉大学 (2014), 九州大学 (2014 年), 明治大学 (2014), 国立感染症研究所 (2014), 奈良先端科学技術大学院大学 (2014), 山口大学 (2014), 山形大 (2015), 早稲田大 (2016), 東京農工大 (2016)

学会活動

2011 - 2012	日本植物学会 評議員
2012 - 2015	日本細胞生物学会 評議員
2012 - 2014	日本植物生理学会 国際委員
2014 - 2017	日本植物生理学会 代議員
2014 - 2015	日本植物生理学会 国際委員長
2015 - present	日本細胞生物学会 代議員

編集委員等

2014 - 2015	Advisory Editorial board (編集委員), Plant & Cell Physiology
2016 - present	Editor (編集実行委員), Plant & Cell Physiology

昇任

東京大学理学系研究科准教授より基礎生物学研究所教授に昇任

研究報告書

「葉内 CO₂ 拡散を促進する葉肉組織形態の改良を通じたイネ光合成能力の飛躍的向上」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 安達 俊輔

1. 研究のねらい

世界人口の増加により将来の食料需給が逼迫することが危惧されている。これを緩和するために世界人口の半数が主食とするコメの生産力増加は重要な研究課題とされる。育種家の不断の努力によりこの半世紀の間コメの単位面積当たり収量(以下収量)は飛躍的に増加したが、近年その伸びは鈍化している。従来の育種では光合成産物の収穫部位への分配割合を増加させてきたが、この収量増加率の鈍化はその育種戦略が限界に近づいていることを示している。そのため光合成産物分配の最適化だけでなく、葉における光合成能力を向上させ、光合成産物量そのものを高める育種戦略の構築が強く求められている。

多収性インド型品種タカナリはイネ品種のなかでは最も高い葉の光合成速度($\sim 30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)を示すことがこれまで知られてきた。しかし研究者は、タカナリに比べて光合成速度の低い日本型品種コシヒカリとタカナリの交雑後代の中に、タカナリを大きく上回り($\sim 40 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、C₄植物のトウモロコシに匹敵する高い光合成速度を有するイネ(HP 系統)を見出した。またタカナリは葉の窒素含量と気孔伝導度が高いことでコシヒカリに比して高い光合成速度を示すが、HP 系統はこれらの性質に加え、タカナリに由来する葉の厚い性質とコシヒカリに由来するサイズが小さく突起の発達した細胞形態を併せ持ち、細胞間隙から葉緑体に至る CO₂ の拡散効率すなわち葉肉伝導度が高いことよって高い光合成能力を有していることがわかった。HP 系統の高い光合成能力に関わる遺伝要因やその機能を解明できれば、世界のあらゆるイネの光合成能力の改良に役立つだけでなく、イネ以外の作物の光合成能力および生産性の向上に貢献できる可能性がある。このことは求められる CO₂ の資源化を促進し、地球環境の劇的変化を緩和することにも貢献する。

本研究は、イネの葉の光合成能力の向上に資するため、HP 系統の著しく高い光合成能力を発揮する基礎となる量的形質遺伝子座(QTL)やその原因遺伝子を網羅的に解明する。加え各遺伝子が有する形態的、生理的機能を明らかにする。そして見出した QTL セットを再びタカナリに集積し、HP 系統の高い光合成能力を再構築して本研究手法の有用性を示す。

2. 研究成果

(1) 概要

コシヒカリ/タカナリ由来の解析集団を用いて、光合成速度(葉面積あたり CO₂ 固定速度)を表現型指標とする QTL 解析を行い、HP 系統の高い光合成速度に関与すると考えられるコシヒカリ遺伝子座を計5カ所特定した。さらに5QTL すべての候補領域の絞り込みを進め、0.09～1.80 Mb の区間まで大きく絞り込み、うち1領域は候補遺伝子を15個まで絞り込んだ。これに加え、コシヒカリの光合成速度を高めるインド型遺伝子 *CAR8* を同定し、機能証

明を行った。

コシヒカリ対立遺伝子が光合成速度を高める5つのQTLが有する作用機構を、葉身窒素含量(LNC)、気孔伝導度(g_s)、葉肉伝導度(g_m)に着目して解析した。その結果、各QTLが有する生理作用はみな同じではなく、各々異なる生理作用を有することが明らかとなった。また一部の系統ではタカナリに比較して葉面積当たり総細胞表面積が大きくなった。

5000以上の個体に対してDNAマーカー選抜を実施し、コシヒカリ型5QTLをタカナリ遺伝背景に集積させた系統のセットを育成した。葉の光合成速度はQTLを積み上げるほど大きくなり、全て集積させた系統ではHP系統とほぼ等しくなった。さらにバイオマス、収量性の評価を通じ、光合成能力と同時にこれら性質を同時に高めることのできる鍵となるQTLがあることを見出した。

(2) 詳細

1. HP系統の高い光合成速度を実現するQTLの網羅的同定

HP系統の高い光合成速度に関わるQTLを網羅的に同定するため、大気・光飽和条件における葉面積当たりCO₂同化速度を指標とし、戻し交雑自殖系統群(BILs)計179系統ならびに染色体断片置換系統群(CSSLs)80系統を用いてQTL解析を行った。そしてタカナリに対してコシヒカリ型対立遺伝子が光合成速度を高めるQTLをゲノム上に全5カ所(*qHP1a*, *qHP1b*, *qHP3*, *qHP7a*, *qHP7b*)見出した。一方で有意な遺伝子間相互作用は検出されなかった。これはHP系統の高い光合成速度が、主に各遺伝子の相加的効果によって発揮されていることを示している。各QTLに対してそれぞれ組換え固定系統群を作出して領域の絞り込みを進め、最終的に1.3 Mb (*qHP1a*)、1.8 Mb (*qHP1b*)、0.09 Mb (*qHP3*)、0.9 Mb (*qHP7a*)、1.0 Mb (*qHP7b*)の区間まで遺伝子存在領域を絞り込むことに成功した(図1)。このうち候補領域が最も狭くなった*qHP3*については、その原因候補遺伝子を15個とした。その他のQTL領域についても、一層の絞り込みを行うための組換え固定系統群を作出したところである。

コシヒカリの光合成速度を高めるインド型品種由来の遺伝子、*CAR8*の遺伝子マッピングを終了し、相補性試験を通じて遺伝子機能を証明した。本遺伝子は転写因子HAPサブユニットのひとつOsHAP3をコードしており、さらにイネの開花期に関わる遺伝子*DTH8*と同遺伝子であることが明らかになった。このインド型アレルは126番アミノ酸に終止コドンが挿入されており、不完全なタンパク質が光合成速度の上昇に影響していたと考えられた。

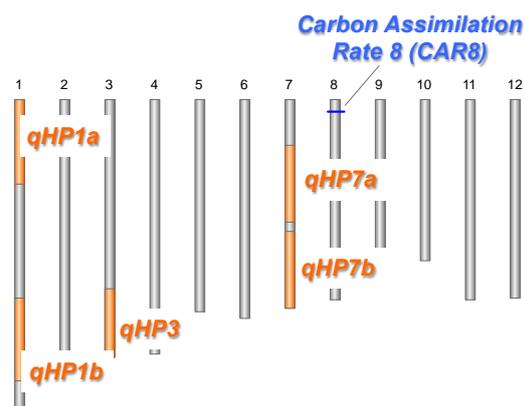


図1 本研究で見出した光合成速度に関わるQTL及び原因遺伝子のゲノム上の位置

2. 各QTLが光合成能力を高める機構の解明

コシヒカリ対立遺伝子が光合成速度を高める5つのQTLについて、光合成速度の向上に関わる生理要因の解析を行った。その結果、各QTLの光合成関連形質に与える作用は皆同一ではなく、*qHP1a*は*gs*と*gm*、*qHP1b*と*qHP3*はLNC、*qHP7a*は*gm*、*qHP7b*はLNCと*gs*をそれぞれ高める効果があることがわかった。Farquhar & von Cammerer (1980)のモデルに基づく解析を通じ、各QTLの効果はそれほど大きくないが、これらのQTLを全て集積することで、HP系統並の光合成速度を発揮出来る可能性を示した。また*qHP7b*は葉の内部の細胞形態に影響を与えないが、*qHP1a*は細胞当たり表面積と葉面積当たり細胞数をわずかに高めることによって、葉面積当たり総細胞表面積を増加することが明らかとなった(図2)。

光合成速度と植物体の発達との関係を調べるため、HP系統と両親品種を水耕栽培して成長解析を実施した。その結果、タカナリやHP系統は根への乾物分配速度が大きいこと、HP系統はタカナリに比べて生育の後半に葉の厚さが大きくなること、バイオマスのさらなる増加には葉への乾物分配速度を高める必要があることなどが明らかになった。

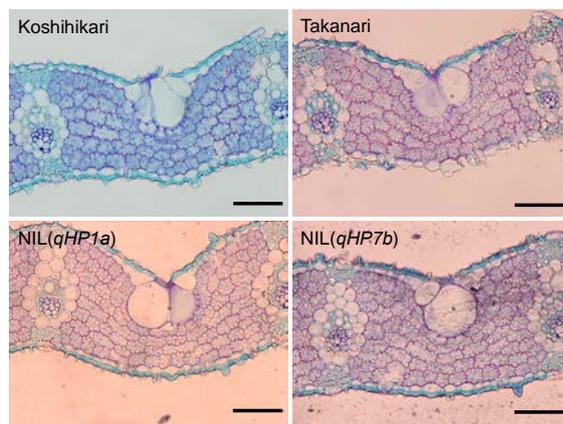


図2 コシヒカリ、タカナリ、準同質系統(NIL)の止葉横断切片の光学顕微鏡写真。写真中のスケールは100 μ mを示す。これらの細胞数、細胞表面積を画像解析ソフトWinRoof(ser. 6.0, Mitani)で計測した。

単離した光合成関連遺伝子 *CAR8* の詳細な生理解析を行った。本遺伝子の光合成上昇効果は生育の後期に時期特異的に現れること、LNCと

*gs*の両方を高める作用を有することを明らかにし、さらに水分生理実験を通じてこの高い*gs*には高い根の吸水能力が関与することを示した。

3. 光合成QTLの集積を通じたHP系統に匹敵する高い光合成能力を示すイネの再構築

各QTLを有するCSSLsの相互交配ならびに5000を超える個体のDNAマーカータイピングを実施し、タカナリを遺伝背景としてコシヒカリ対立遺伝子が光合成速度を高めるQTLを2~5カ所組み合わせ合わせた集積系統セットを作り上げた。表現型調査の結果、QTLの集積数が多くなるほど光合成速度が上昇し、4~5QTLを集積させた系統ではその光合成速度がHP系統とほぼ等しくなった(図3)。なお相加・相互作用モデル解析による各QTLの光合成速度への相加効果の大きさは、*qHP7b*>*qHP1a*>*qHP1b*=*qHP3*=*qHP7a*の順であった。一方有意に高まる遺伝子間相互作用は認められなかった。以上の結果は、本遺伝子セットを用いることでイネの光合成速度を飛躍的に高められることを示している。さらに育成系統すべてについてバイオマス生産解析、収量解析を2年間実施した。子実収量については、5つのQTLのすべてが収量を高める訳では無かったが、*qHP1a*、*qHP7b*を有する系統は子実収量がタカナリに比較して有意に大きくなり、*qHP1a*+*qHP7b*の集積系統では一層大きくなることを示した。そのためこの2つのQTLは、光合成速度と収量を同時に高める鍵因子であると考えられた。

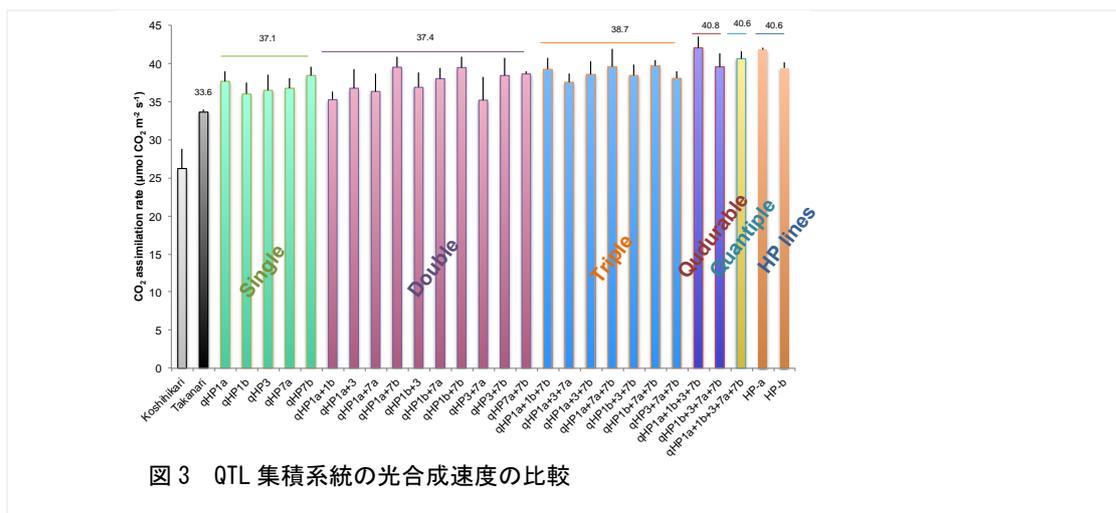


図3 QTL 集積システムの光合成速度の比較

3. 今後の展開

本さきがけ研究を通じてイネ光合成速度を飛躍的に改良するための QTL セットを明らかにすることができた。マッピング解析と突然変異体、組換え体、網羅的遺伝子発現解析などを通じ、近い将来これらすべての原因遺伝子を特定する予定である。さらに原因遺伝子が引き起こす分子的、生理的機作を遺伝子ごとに丁寧に解析して明らかにしたいと考えている。この際、本研究で明らかにした各 QTL の生理的解析の知見が役立つ。

光合成 QTL のうち qHP1a、qHP7b は、最終目標である収量性の向上に寄与する可能性が示唆された。そのためこの2つの QTL は特に重要性の高いターゲット領域であり、その特定に優先して取り組むことになる。qHP1a と qHP7b を集積させた系統ではタカナリに比較して高い収量を示しており、品種育成試験を経た上で実用品種化できるものと考えている。

本研究成果は具体的品種育成という直接的応用だけでなく、原因遺伝子の解明を通じてイネ光合成速度の自然変異制御機構の理解、光合成システムの制御機構など、育種学、植物生理学に対して新たな知見を提供できる。そして得られた遺伝子情報はイネやその他作物の生産性向上を目指した育種戦略構築の足がかりになる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さきがけ研究に対する支援によって、光合成測定評価装置や研究に遂行な消耗品類の購入ならびに研究支援者を雇用することができた。これにより多数個体の DNA マーカー解析や表現型調査等、時間、労力、資金を要する実験を、短期間の間に一気に進めることができた。その結果、イネ光合成速度の飛躍的向上に関わる重要な遺伝領域を網羅的に同定し、一部の原因遺伝子の特定、それら生理的メカニズムや生産性への寄与を明らかにすることができた。一方、当初注目していた葉の内部細胞形態の遺伝的制御機構の解明は、安定的スクリーニング手法の開発に至らず、その実態に十分迫ることができなかった。今後の課題と考えている。本研究で見出したイネ光合成速度の飛躍的改良につながる遺伝領域は、近いうちに原因遺伝子が特定され、将来的な作物育種戦略の構築に重要な役割を果たす。また、本研究で育成した生産性を増加させるイネは、実用品種として登録できるものと考えている。

(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)

高い光合成能力を持つC4植物のシステムを導入せずに、C3植物であるイネの光合成能力を飛躍的に向上させることを目指し、安達氏は本研究で特に葉の内部のCO₂拡散に着目して研究を進めた。その結果、C4植物であるトウモロコシに匹敵する高い光合成速度をもたらす遺伝子座(QTL)を5か所特定し、DNAマーカー選抜により高い光合成能力を持つイネを再構築することに成功した。しかし、当初目的である葉肉組織形態の遺伝的制御機構については十分な解明に至っていない。QTL内に存在する原因遺伝子の特定にはまだしばらく時間がかかりそうだが、ぜひ突き止めてもらいたい。そのためには、葉肉細胞の形態、光合成の生理学などに優れた研究者との多方面の共同研究がきわめて有効であり、さきがけ研究終了後も本テーマの完成に向けて努力されることを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Adachi S, Baptista LZ, Sueyoshi T, Murata K, Yamamoto T, Ebitani T, Ookawa T, Hirasawa T. (2014). Introgression of two chromosome regions for leaf photosynthesis from an *indica* rice into the genetic background of a *japonica* rice. *Journal of Experimental Botany*, 65(8): 2049–2056.
2. Adachi S, Yoshikawa K, Yamanouchi U, Tanabata T, Sun J, Ookawa T, Yamamoto T, Sage RF, Hirasawa T, Yonemaru J. Fine mapping and physiological aspects of *Carbon Assimilation Rate 8*, a quantitative trait locus for rate of flag leaf photosynthesis in rice. *Frontiers in Plant Science* 8:60.

(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)

受賞

- ・日本作物学会第19回研究奨励賞受賞「水稻の個葉光合成速度の品種間差に関わる形質のゲノム解析」2015年3月
- ・日本作物学会第13回論文賞 Tanaka Y, Kumagai E, Tazoe Y, Adachi S, Homma K. (2014) Leaf photosynthesis and its genetic improvement from the perspective of energy flow and CO₂ diffusion. *Plant. Prod. Sci.* 17(2): 111–123.

主要学会発表

- ・Adachi S, Yamanouchi U, Tanabata T, Sun J, Hirasawa T, Yamamoto T, Yonemaru J. 「CARBON ASSIMILATION RATE 8, a gene identical to *DTH8/Ghd8* responsible for heading date, pleiotropically increases the rate of leaf photosynthesis in rice」『11th

International Symposium on Rice Functional Genomics』p.43, New Delhi, India (2013/11/22) .

- Adachi S, Kondo K, Tanabata T, Yamamoto T. 「Does increased stomatal density enhance the rate of leaf photosynthesis in rice? 」『Gordon Research Conference, CO2 Assimilation in Plants: Genome to Biome』(June 2014)
- Adachi S, Ochiai T, Ao R, Takai T, Kondo M, Yamamoto T, Hirasawa T. 「Research to dramatically improve rice leaf photosynthesis with marker assisted selection International」『Plant & Animal Genome XXIII 』 January 10–14, 2015 – San Diego, CA, USA P0497
- Adachi S, Yoshikawa K, Yamanouchi U, Tanabata T, Sun J, Yamamoto T, Sage R, Hirasawa T, Yonemaru J: Map-based cloning of Carbon Assimilation Rate 8 that increases CO2 assimilation rate in rice . European Networks Conference on Algal and Plant Photosynthesis 2016, 26th April – 29th April 2016, Qawra, Malta
- Adachi S, Ao R, Nakanishi A, Kojima Y, Ookawa T, Hirasawa T, Sage R: Improving Rice Photosynthesis by QTL Screening: Developmental Aspects. 37th New Phytologist Symposium, Plant developmental evolution, Beijing, China 15 – 19 May 2016
- Adachi S, Furukawa K, Ootsuka C, Ao R, Nakanishi A, Kojima Y, Ookawa T, Takai T, Hirasawa T. Evaluation of photosynthetic properties of NIL(*GPS*) under the different nitrogen application rates in rice, 14th International Symposium of Rice Functional Genomics, Montpellier, France, 26–29 September

学会活動等

- The 2015 Tokyo Whole Plant Photosynthesis Workshop 「Genetic analysis for leaf photosynthesis in rice」を主催 (2015年5月東京農工大学)
- 日本作物学会若手・男女共同参画ワーキンググループ委員として学会における若手や女性の研究活動の活発化への取り組みを実施し、さらに第241回日本作物学会講演会においてミニシンポジウム「水稻の多収育種について考えるー1.5t/10a超の多収実現のためにー」を主催(2016年3月茨城大学)

招待講演

- 瀋陽農業大学(中国)2013年12月. Genetic improvement of leaf photosynthesis by utilizing the natural genetic variation in rice.
- 国際農林水産業研究センター 作物・土壌勉強会. 2014年9月. 自然変異を活用したイネ光合成速度の遺伝的改良
- 岩手生物工学研究所 公開セミナー 2015年8月. イネ個葉光合成能力に関わる遺伝・生理的要因の解明
- 中国科学アカデミー 植物科学研究所(中国) 2016年5月. Rice photosynthesis
- 東北大学植物栄養学研究室非公開セミナー 2016年5月. Rice photosynthesis

公募研究事業への応募

- 戦略的イノベーション創造プログラム (次世代農林水産業創造技術)(2)画期的な商品の提供を実現する新たな育種・植物保護技術 ①新たな育種体系の確立 iii) ゲノム編集技術等を用いた画期的な農水産物の開発 2014年12月～2019年3月
- 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)(若手研究(B)) イネ光合成改良に向け

た光合成窒素利用効率のイネ科変異の解明 2016年4月～2019年3月 4,290,000円
・科学技術振興機構 CREST「野外環境と超並列高度制御環境の統合モデリングによる頑
健性限界の解明と応用（代表 永野惇）」齊藤チーム研究協力者 2015年12月～2021
年3月

著書

- ・安達俊輔・山本敏央 2014 光合成研究と産業応用最前線 第1編 光合成の基礎研究
第6章第2節 作物の光合成速度を向上させる自然変異遺伝子の解明 191-202 NTS
Inc. 2014/12/15
- ・Yamori W, Irving LJ, Adachi S, Busch FA. 2016. Strategies for optimizing photosynthesis
with biotechnology to improve crop yield. 797-815. Pessarakli M. ed. *Handbook of
Photosynthesis, Third Edition*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- ・Sage R, Adachi S, Hirasawa. T. Improving photosynthesis in rice: from small steps to giant
leaps. Sasaki T. ed. *Achieving Sustainable Cultivation of Rice*. Burleigh Dodds Science
Publishing. In press.

研究報告書

「アブシジン酸シグナル伝達の中核ネットワークを標的とした次世代型環境ストレス耐性植物の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 梅澤 泰史

1. 研究のねらい

近年、地球温暖化や干ばつの増加等の環境変化が農業生産に与える影響が深刻化している。植物が乾燥ストレスや塩ストレスを受けると、植物の光合成力や炭素貯留能が大幅に低下し、生育が抑制される。このような植物の環境ストレス応答において、SnRK2 プロテインキナーゼ群は、シグナル伝達の中核で働く重要な分子である。そこで本研究では、(A) SnRK2 のリン酸化標的分子の活性制御技術、および(B) SnRK2 を分子標的としたリード化合物の探索、の2つの大課題を設定した。SnRK2 によるシグナル伝達機構を解明し、その知見を利用して光合成能力やストレス耐性を高めた環境ストレス耐性植物を作出することを目指した。

テーマ A では、ABA シグナル伝達におけるタンパク質リン酸化ネットワークを明らかにするために、複数の植物種においてリン酸化プロテオーム解析を行うとともに(実験①)、すでに同定したリン酸化タンパク質のリン酸化部位を改変して、タンパク質の機能改変による植物のストレス耐性の向上を目指した(実験②)。実験①については、ヒメツリガネゴケやオオムギ等の植物を用いてリン酸化プロテオーム解析を行い、多数のリン酸化タンパク質を同定することに成功し、ABA によるリン酸化シグナルを植物主観で比較することが可能となった。一方、実験②についてはリン酸化部位を改変したタンパク質の機能発現が安定せず、当初見込んだようなストレス耐性への影響は認められなかった。そのため、新たに実験③として、リン酸化プロテオーム解析に基づいた SnRK2 相互作用因子の探索を大規模に行った。その結果、新規な相互作用因子を複数同定することに成功した。今後、これらの因子が植物の環境ストレス耐性の向上に応用可能かどうか調べる予定である。

テーマ B では、SnRK2 の活性に影響を及ぼす化合物を大規模に探索した。まず、SnRK2 のキナーゼ活性を指標としたハイスループットスクリーニング系の開発に取り組んだ。SnRK2 の活性を安定して測定する実験系の開発に時間を要したが、ようやく系ができあがり、すでに第一回目のスクリーニングを完了した。再現性や濃度依存性を確認した結果、合計 8 種の候補化合物の選抜に成功した。それらについて、SnRK2 に対する特異性を検討するとともに、実際に植物細胞内における活性の評価を行う予定である。

2. 研究成果

(1) 概要

乾燥や塩、低温などの環境ストレスは、植物の光合成力や炭素貯留能に重大な影響を与える要因の一つである。植物の環境ストレス応答において、SnRK2 プロテインキナーゼ群は、気孔の閉鎖や浸透圧応答を直接的に制御する重要な分子である。そこで本研究では、(A) SnRK2 のリン酸化標的分子の活性制御技術、および(B) SnRK2 を分子標的としたリード化合

物の探索、の2つの大課題を設定した。これによって、SnRK2 によるシグナル伝達経路を利用して光合成能力やストレス耐性を高めた次世代型環境ストレス耐性植物を作出することを目指した。

テーマ A では、先行研究において「SnRK2 の基質群をリン酸化プロテオーム解析の手法で同定した成果を踏まえ、① さらにリン酸化プロテオーム解析の対象とする植物種を拡大し、さらに候補タンパク質の数を増やすこと、および② 同定したリン酸化タンパク質のリン酸化部位を改変して、タンパク質の機能を変化させて植物のストレス耐性を改変することを目指していた。①については、ヒメツリガネゴケやオオムギ等の植物を用いてリン酸化プロテオーム解析を行い、多数のリン酸化タンパク質を同定することに成功した。しかし、②については改変したタンパク質の機能発現が安定せず、当初見込んだようなストレス耐性への影響も見られないという結果となった。

テーマ B では、SnRK2 の活性調節剤を見つけることを目標に、化合物ライブラリーのハイスクリーン（HTS）系を開発した。HTS には精度が求められるため、SnRK2 の活性を安定して測定する系の開発に時間を要したが、ようやく系ができあがり、すでに第一回のスクリーニングは終え、合計 8 種の候補化合物を選抜し、それらについて植物における活性評価を行う段階である。

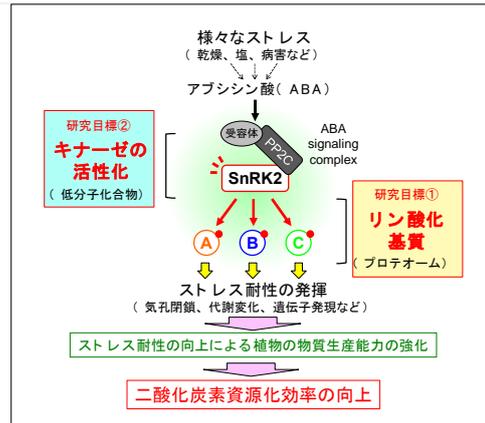


図1 本研究課題の概要

(2) 詳細

研究テーマ A 「SnRK2 のリン酸化標的分子の活性制御技術」

先行研究において、シロイヌナズナを用いたリン酸化プロテオーム解析によって、ABA によって制御される多数のリン酸化タンパク質を同定することに成功した。また、野生型と SnRK2 三重変異体を比較することによって、SnRK2 の基質候補を見いだした。本研究では、さらにリン酸化プロテオーム解析を進めてより多くのリン酸化タンパク質の情報を得ることを実験①とした。また、すでに同定された基質候補には、それぞれリン酸化部位の情報が紐付けられている。一般に、セリンまたはスレオニンのリン酸化の場合、アスパラギン酸またはグルタミン酸への置換による疑似リン酸化型、あるいはアラニンへの置換による非リン酸化型が作成可能である。本研究では、これらの変異タンパク質を用いて、植物の環境ストレス耐性を改変することを実験②とした。

実験① リン酸化プロテオーム解析による新規リン酸化タンパク質情報の取得

まず、リン酸化プロテオーム解析の実験系を自前で立ち上げることが最初の難関であった。サンプル調製から質量分析、データ解析に至る一連のパイプラインを全て構築するには多くのノウハウが必要であり、これらをつなぎ合わせるのに時間を要した。現在ではパイプラインの構築はほぼ完了しており、リン酸化プロテオーム解析をスムーズに行える体制となっている。現在までにヒメツリガネゴケおよびオオムギの解析を終了した。ヒメツリガネゴケにおい

では、シロイヌナズナとの比較から ABA シグナル伝達系に相当部分の相違があるという興味深い結果を得ており、コケ植物が独自の脱水耐性を持つ事実を指示するものではないかと考えている。この結果に関しては、現在論文投稿中である。

実験② リン酸化タンパク質の変異導入が植物のストレス耐性へ及ぼす影響

一方、実験②では、まず改変する標的タンパク質として AREB1 および SNS1 を選んだ。AREB1 は、ABA 応答における中心的な転写因子であり、SNS1 はリン酸化プロテオーム解析で新規に見つけた SnRK2 の基質である。これらのリン酸化部位に変異を導入して、Ser を Asp または Ala に置換した。得られた形質転換植物を用いて表現型を観察したところ、AREB1 および SNS1 のいずれの遺伝子においても、非リン酸化型と疑似リン酸化型で顕著な表現型の差は認められなかった。したがって、当初考えたリン酸化部位の改変による植物の乾燥耐性強化は難しいことがわかった。少なくともシロイヌナズナで明確な表現型が認められないと、作物での研究には進めないため、研究の方向性の転換を迫られた。そこで、新たに実験③を立案した。

実験③ リン酸化プロテオームデータに基づいた SnRK2 相互作用因子の探索

原点に戻ってリン酸化プロテオームデータを見直し、有用な情報を引き出すことを試みた。その結果、MAP キナーゼ (MAPK) の一つである AtMPK1 が SnRK2 三重変異体で顕著にリン酸化が減少していることに着目した。MAPK は、通常 MAPKKK→MAPKK→MAPK からなる MAPK カスケードによって制御される。そこで、SnRK2 が何らかの MAPKKK を制御しているのではないかと考え、SnRK2 と相互作用する MAPKKK を網羅的に調べた。MAPKKK はシロイヌナズナに約 80 種あるため、タンパク質の合成には簡便なコムギ胚芽抽出液をもちいた *in vitro* 翻訳系を用い、相互作用は Alpha screen 法で検出した。その結果、3 つの MAPKKK が SnRK2 との相互作用因子として同定された。いずれも機能未知の MAPKKK であったため、遺伝子破壊株を単離して解析したところ、二つの変異体で ABA 高感受性の表現型を認めた。さらに、この MAPKKK の近縁遺伝子についても調査を進め、新たに ABA シグナルに関わるものを複数見出した。これらの MAPKKK 遺伝子群は機能的に冗長であると考えられ、ABA シグナル伝達において重要な役

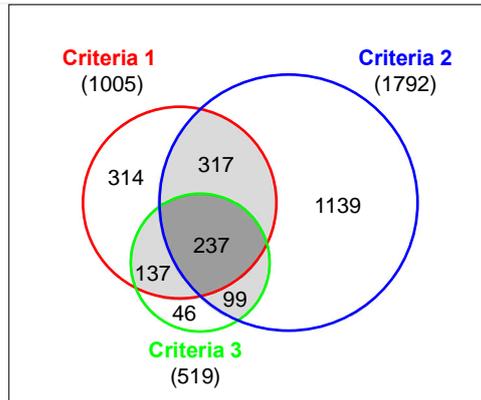


図2 ヒメツリガネゴケのリン酸化プロテオーム解析
Criteria 1: 野生型でABA応答あり、Criteria 2: *ppab1a/b* 二重変異体 (ABA高感受性) で上方制御、Criteria 3: AR7変異体 (ABA非感受性) で下方制御

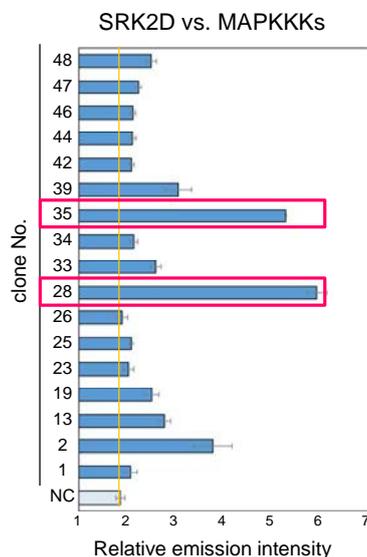


図3 SnRK2とMAPKKK群の相互作用解析
SnRK2とMAPKKKをコムギ胚芽抽出液の*in vitro*翻訳系で合成し、Alpha screen法で相互作用を検出した。

割を担っている可能性がある。また、当初これらの MAPKKK は SnRK2 の下流と考えていたが、SnRK2 の上流で機能している可能性もあり、詳細な解析を進めているところである。

研究テーマ B 「SnRK2 を分子標的としたリード化合物の探索」

これまでの研究から、SnRK2 プロテインキナーゼが植物の環境ストレス応答の中核で機能していることがわかってきた。SnRK2 はストレスに応じて活性化するプロテインキナーゼであることから、SnRK2 の活性を人為的に制御できれば、植物の環境ストレス応答を改変できるはずである。そこで、本研究の二つ目の課題として、SnRK2 の活性を直接制御できる化合物を同定することを目的とした。そのために、SnRK2 の活性を指標として化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニング (HTS) を行った。

まず、HTS の実験系を確立した。この実験では、SnRK2 の活性を簡便に、しかも精度よく測定する必要がある。そのために、蛍光基質を用いたキナーゼアッセイ系を SnRK2 に最適化した。そして、この測定系を用いて、東京大学創薬機構から提供を受けた化合物ライブラリーをスクリーニングした。約 2 万種の化合物をスクリーニングし、合計 78 個の化合物が陽性と判定された。続いて、二次スクリーニングとして再現性検定を行い、11 個の化合物が陽性として残

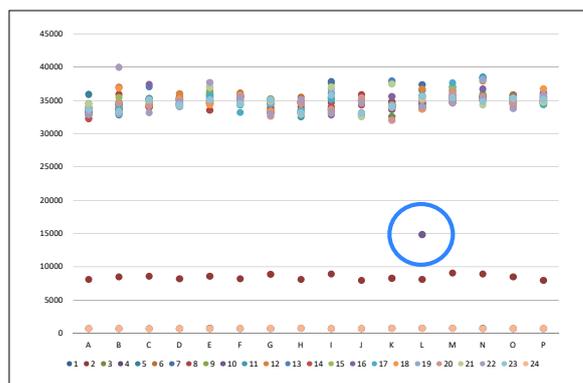


図4 SnRK2 活性を指標とした化合物スクリーニング

った。さらに、濃度検定や阻害率などの測定を行った結果、6 つの化合物が最終候補として残り、いずれも未報告の化合物であった。現在、これらの化合物をシロイヌナズナ培養細胞に処理して SnRK2 の活性を測定する準備を進めている。これまでに、SnRK2 の過剰発現培養細胞株が 5 ライン得られた。現在、これらの培養細胞に実際に化合物を処理して SnRK2 の活性変化を解析中である。

3. 今後の展開

本研究課題では、ABA シグナル伝達におけるタンパク質リン酸化ネットワークを複数の植物種で明らかにすることができた。先行研究において、他のオミクス技術では見つからないものがリン酸化プロテオーム解析によって同定されていることから、このアプローチの有効性は明らかである。今後も引き続き様々な植物種のリン酸化プロテオーム解析を進めて、植物種間で保存されている ABA 応答のリン酸化シグナルネットワークを明らかにしていきたいと考えている。ABA シグナル伝達で重要な役割も持つリン酸化タンパク質を選抜し、それを利用したストレス耐性植物の開発に引き続き取り組んでいきたいと考えている。

また、本研究では SnRK2 の活性を阻害する化合物をスクリーニングすることにも成功した。詳細な解析はこれからであるが、もし SnRK2 の特異的阻害剤を見つけることができれば、モデル植物以外の植物種における ABA シグナル伝達研究にとって、有用な研究ツールとなることが期待される。また、植物の環境ストレス耐性を向上させるためには、SnRK2 を活性化するような化合物が有用であると考えられる。将来的には、SnRK2 の活性化剤のスクリーニングに取り組んでいく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

本研究では、大きく分けて二つの課題を設定した。研究課題 A では、リン酸化プロテオーム解析で大量の情報を取得し、その情報を利用して環境ストレス耐性植物を生み出そうという試みであった。リン酸化プロテオーム解析は順調に進んでおり、ヒメツリガネゴケとオオムギの解析が終了したので、ある程度目標は達成したと考える。一方、環境ストレス耐性植物の作出については、最初に対象とした遺伝子においてリン酸化部位の改変によるストレス耐性の変化が見られなかったことから、この点においては目標達成が困難となった。一方、研究課題 B においては、目標とした SnRK2 の活性に影響を及ぼす化合物の同定に成功したので、達成率は 80%程度と考える。また、課題 A においては研究の方針を転換し、新規な SnRK2 の相互作用タンパク質の同定を試みた結果、新規な MAPKKK ファミリーを発見した。これらはいずれも未報告のものであり、学術上の意義は高いと言える。

・研究の進め方および研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

申請者は本研究課題を遂行するに当たり、リン酸化プロテオーム解析と化合物スクリーニングという二つの未知の課題に取り組んだ。時間はかかってしまったが、リン酸化プロテオーム解析のパイプライン構築、および化合物ライブラリーのスクリーニング系を立ち上げ、それらを研究室内で日常的に行うことができるようになったのは大きな収穫である。今後は、本研究で構築した解析技術を武器として植物の ABA シグナル伝達系の解明にさらに取り組み、将来的には次世代型の作物開発につなげていきたいと考えている。また、それらの解析技術を利用した様々な共同研究が走り始めているので、ABA シグナル伝達に限らず様々な分野に挑戦していきたいと考えている。

(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)

主要な植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)による環境応答には SnRK2 と呼ばれる一群のタンパク質リン酸化酵素が必須である。梅澤氏は、劣悪環境下での植物の成長を向上させるため、この SnRK2 によるシグナル伝達を人為的に制御して植物の乾燥耐性や耐塩性を改良することを目指した。その結果、SnRK2 の標的分子を解明し、その機能改変や SnRK2 の活性を制御する化合物を見出すなどの成果を上げた。特に SnRK2 と相互作用する因子として、新規の MAPKKK を発見し、その ABA シグナルにおける関与を明らかにしたことは、今後の基礎研究としての発展に重要である。更に、研究の過程で様々な新たな手法を導入し、研究を進めたことも評価できる。今後は、成果をモデル植物ばかりでなく作物にも応用し、次世代型環境ストレス耐性植物の作出に発展させていってほしい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Honda, Y., Sugiyama, N., Kuwamura, M., Amagai, A., Ishihama, Y., Takezawa, D., Sakata, Y., Shinozaki, K., Umezawa, T. "Phosphoproteomic profiling of *Physcomitrella patens* reveals the diversity of abscisic acid signaling in land plants." *Plant Physiol.* (投稿中)
2. Saruhashi, M., Kumar-Ghosh, T., Arai, K., Ishizaki, Y., Hagiwara, K., Komatsu, K., Shiwa, Y., Umezawa, T., Sakata, Y. and Takezawa, D. (2015) "Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 12(46): E6388-96.
3. Umezawa, T. (2015) "Screening of kinase substrates using kinase-knockout mutants." *Methods in Molecular Biology* 1306: 59-69
4. Ito, T., Kondoh, Y., Yoshida, K., Umezawa, T., Shimizu, T., Shinozaki, K. and Osada, H. (2015) "Novel abscisic acid antagonists identified with chemical array screening." *ChemBioChem* 16(17): 2471-2478.
5. Umezawa, T., Takahashi, F. and Shinozaki, K. (2014) "Phosphorylation Networks in the Abscisic Acid Signaling Pathway." *The Enzymes* 35: 27-56.

(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)

主な学会発表の中で、招待講演のみ以下に記載する。そのほか、台湾中央研究院、国立台湾大学、フランス CNRS、九州大学、名古屋大学、ワシントン州立大学およびオレゴン州立大学等で研究セミナーを行った。また、名古屋大学、九州大学およびオーストラリア CSIRO と新たに共同研究を開始した。

(招待講演)

1. **Umezawa, T.** "A Phosphoproteomic Approach to Understand the Evolution of ABA Signaling Pathway in Land Plants" The 7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, the 2nd AOAPO conference, Jungwon University, Korea, Sep. 23, 2015. (Invited)
2. **Umezawa, T.** "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants" The 6th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, the 1st AOAPO conference, & the 5th Plant Proteomics Conference in China, Harbin, China, June 25, 2014. (Invited)
3. **Umezawa, T.** "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants." Taiwan National University, Taipei, Feb. 12,

2014. (Invited)

4. **Umezawa, T.** "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants." IPMB seminar series, Academia Sinica, Taipei, Feb. 12, 2014. (Invited)
5. **Umezawa, T.** "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants." Indo-Japan Joint Workshop on "Signal sensing and transduction in photosynthetic organisms - from cyanobacteria to land plants", University of Hyderabad, India, December 16-18, 2013. (Invited)
6. **梅澤泰史・杉山直幸・高橋史憲・Jeffery Anderson・坂田洋一・竹澤大輔・石濱泰・Scott Peck・篠崎一雄**: 遺伝学とリン酸化プロテオミクスの融合によるアブシシン酸シグナル伝達系の包括的な解析、第86日本生化学会大会シンポジウム 2S09a「多様なアプローチから解明が進む植物シグナル伝達研究」、横浜、9月11日～13日(2013)

研究報告書

「イネ生殖分子機構の解明と操作を基盤としたアポミクシスへの挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 笠原 竜四郎

1. 研究のねらい

日本人は古くからイネを主食とし、植物育種家は多収性、耐病性、耐虫性をもつイネを目指して交雑育種を繰り返し、現在までに優良品種を多数作り上げてきた。受精によって胚と胚乳を形成した結果生じるイネの種子は人類にとって貴重な食糧となる。これまで、イネの場合は受精を経ずに単為発生するアポミクシス現象が未だに確認されておらず、イネの種子形成は受精に依存していると考えられている。このため、仮に冷夏或いは豪雨が続くなど花粉にとって極めて厳しい気象条件下や、植物体が害虫、病気にさらされている状態では、花粉管を介した受精効率が下がり、稔実率低下につながることがわかっている。ここで私は、イネにおいて受精を経ずに胚や胚乳が形成される、アポミクシスを達成出来れば、厳しい条件下でも常に稔性を100%にすることが出来ると考えた。このために、自らが見出した花粉管依存的胚珠肥大 (POEM: Pollen tube-dependent Ovule Enlargement Morphology) (Kasahara *et al.*, *Science Advances*, 2016) 現象から着想を得た、ハイスループットなスクリーニングを用いて卵細胞の単為発生を引き起こす遺伝子など、本研究で新たに同定されることが期待されるシロイヌナズナの遺伝子に加え、すでにシロイヌナズナで同定されている非減数性の胚嚢形成を引き起こす遺伝子や、受精せずに胚乳形成が起こる遺伝子も含めてノックアウトする。イネのアポミクシスが成功すれば、一代雑種の有用な遺伝子型をそのまま維持した種子を即座に固定でき、育種年限を大幅に短縮できるなど農業的に極めて有益である。また、冷夏のようなイネにとっての悪条件下でも100%の種子稔性が期待できるなど、地球レベルでの食糧増産にも貢献することができる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、イネのアポミクシスの達成を最終目標とし、まずシロイヌナズナでアポミクシスに必要な因子を見つけるべく、花粉管依存的胚珠肥大 (POEM) 現象を用いたスクリーニングを行ってきた。アポミクシスを達成するには3つの関門がある。まず、受精をしてはいけないので、①受精に失敗する因子を見つける事である。次に、②受精をせずとも胚および胚乳が生じる因子を見つける事である。そして最後に、③シロイヌナズナで獲得できた遺伝子がイネでも応用できる事である。そこでまず、①受精に失敗する変異体を獲得するスクリーニングを行ってきた。このスクリーニングは非常に効率が良く、新奇であると考えられる 2 つの変異体を単離することができた。今後はその他の変異体も含め新規因子の同定に努めていく予定である。

また、②受精せずとも自動的に胚や胚乳を形成する変異体に関しては2次スクリーニングが完了し、その候補数を絞り込むことができた。ある程度の数まで絞り込めたので、受精に失敗

する変異体同様、原因遺伝子の同定作業を進行中である。

最後に、③イネのアポミクシス化に関する研究であるが、まず受精に失敗することでよく知られているシロイヌナズナの *GCS1* 遺伝子のホモログをイネで検索したところ、*tos17* のラインで水イネ表現型が多数確認できた。また、イネ *GCS1* 遺伝子を CRISPR でゲノム編集した個体からも POEM 表現型を確認することができた。このことから、POEM 現象はシロイヌナズナだけでなく、イネにも存在する単子葉、双子葉共通の現象であると証明することができた。

(2) 詳細

計画 1 受精に失敗する変異体の獲得

まず、アポミクシス達成に必要であると考えられる受精に失敗する変異体であるが、総スクリーニング数 13698 個体に対して配偶体が受精に失敗する変異体が 23 株獲得できている(図 1)。これらの変異体は現在次世代シーケンサーとエコタイプマッピングの併用による原因遺伝子の同定作業中である。これらのうち、雌性配偶体の変異体である *4f2028* 株の原因遺伝子は 4 番染色体下腕に坐乗しており、1.3Mbps の領域内、21 個の候補遺伝子に絞ることができた(図 2)。この変異体は図 2 のように精細胞が受精できずにとどまっている受精異常の変異体であった(図 2)。また、もう一つの雌性配偶体変異体である *tri2407* 株の原因遺伝子も 5 番染色体上腕に坐乗していることがわかった。これら 2 つの領域内には既知の受精因子が存在しないため、これら 2 つの変異体は新規の受精因子であり、新規因子の同定を達成することができそうである。今後はその他の変異体も含め新規因子の同定に努めていく予定である。

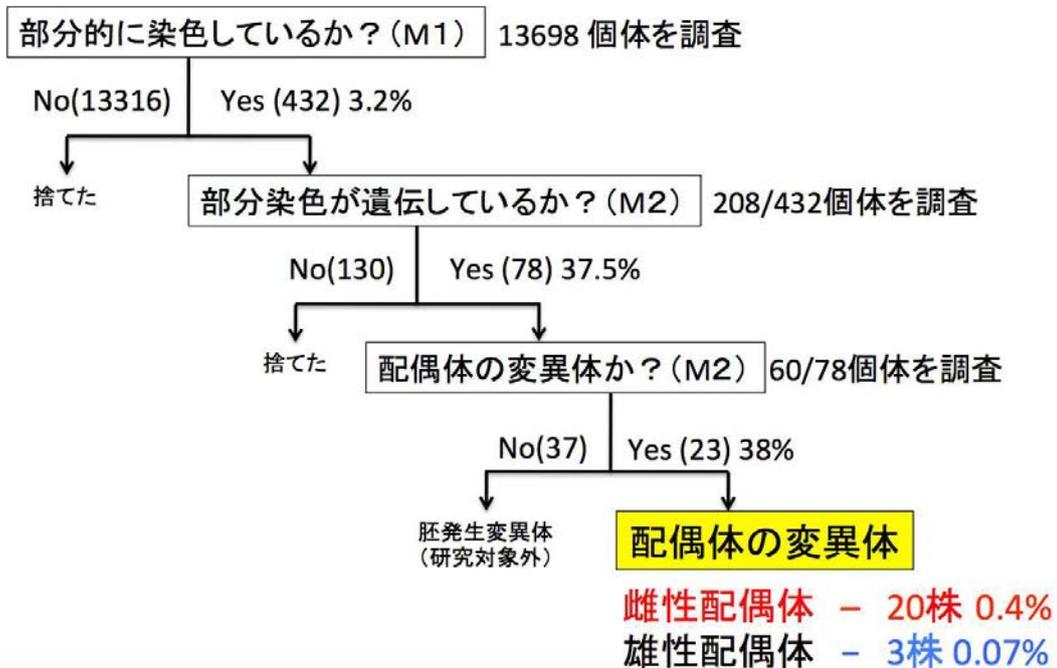


図 1. 計画 1 のスクリーニングのフローチャート

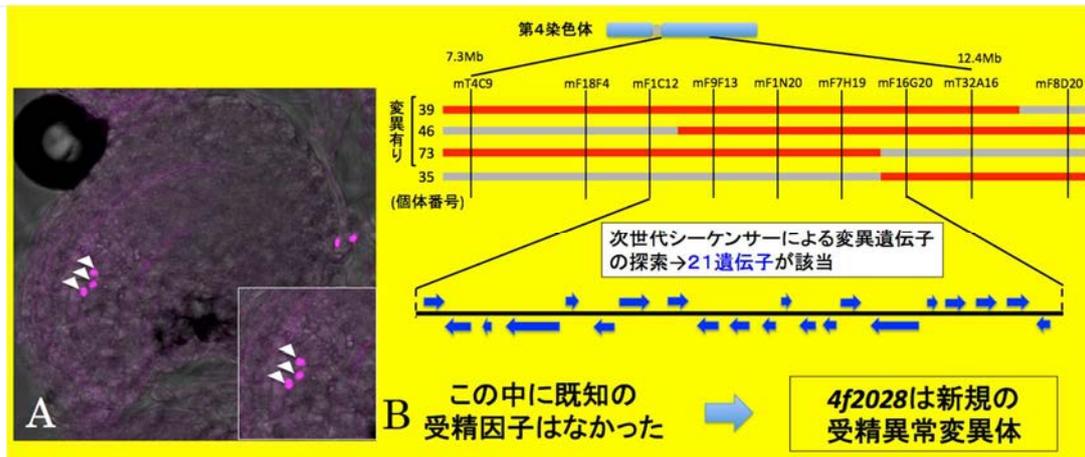


図 2. スクリーニングにより同定された新規変異体 4f2028 の解析

(A) 胚珠内の表現型。花粉管から放出された2つの精細胞と1つの栄養核が3つの輝点として発現している。2つの精細胞が受精できずに留まっており、4f2028 は受精に失敗する変異体であることが示唆された。

(B) 遺伝子マッピングの結果、原因遺伝子は第4染色体中程、7.3Mb～12.4Mb に位置していることがわかった。この位置に既知の受精因子はなく、4f2028 は新規受精因子であった。

計画2 胚、胚乳単為発生変異体の獲得

受精せずとも自動的に胚や胚乳を形成する変異体に関しては総スクリーニング数 8986 個体に対して一次スクリーニングを通過した個体が 342 個体獲得できている。これらの植物は現在遺伝性の確認などの2次スクリーニングが完了し、その候補数を 105 個まで絞り込むことができたので、現在受精に失敗する変異体同様、原因遺伝子の同定作業に入る予定である(図 3)。

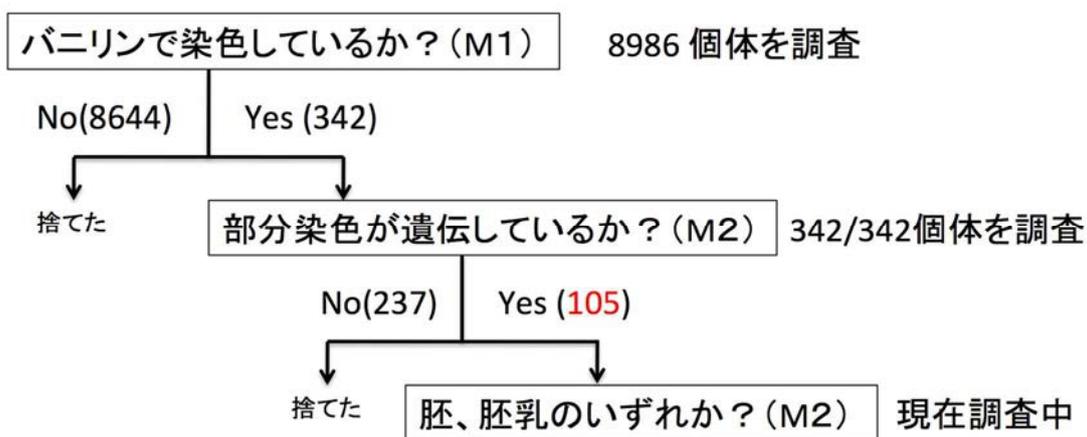


図 3. 計画1のスクリーニングのフローチャート

計画3 イネアポミクシス遺伝子の改変

最後にイネのアポミクシス化に関する研究であるが、まず受精に失敗することでよく知られているシロイヌナズナの *GCS1* 遺伝子のホモログをイネで検索したところ、興味深いことにホモログが2つ見つかったため、これら2つの遺伝子 *GCS1A* (第9染色体)、*GCS1B* (第5染色体) をターゲットとした CRISPR のコンストラクトを作成し、イネへのトランスフォーメーションを行った。*gcs1B* に関してはホモ個体が獲得できた。また、*tos17* のラインを取り寄せ *gcs1A* に変異の入っていた個体を育成した結果、非常に興味深いことに、*gcs1A*、*gcs1B* それぞれの種子の籾殻を取り除いた後観察すると中途半端に肥大した受精に失敗した POEM 表現型が多数確認できた。このことから、POEM 現象はシロイヌナズナだけではなく、イネにも存在する単子葉、双子葉共通の現象であると証明することができた。

また、さきがけ期間中に POEM 現象を論文にまとめることができた (Kasahara *et al.*, *Science Advances*, 2016)。その内容は以下の通りである。シロイヌナズナの胚珠内の胚のうは花粉管を受け入れて、2つの精細胞が卵細胞と中央細胞に受精し種子形成する。一方、2つの精細胞に受精能のない変異体、例えば *gcs1* を用いた場合、花粉管は胚のうに進入するが、放出された精細胞は受精出来ないため、この胚珠は種子形成出来ない。しかしながら、非常に興味深いことに受精に失敗した胚珠は花粉管進入前の胚珠に比べて明らかに肥大していた。また、花粉管の破裂が胚珠を肥大させていることから、花粉管内容物がこの現象の引き金となっていることも示唆された。また花粉管内容物は胚乳自動発生の変異体の胚乳形成率を大幅に高めていることも示唆された。POEM 研究のほとんどはさきがけ研究期間中に実施した。

3. 今後の展開

研究計画1で受精が不全であると考えられる変異体を獲得したので、新規因子が獲得出来る可能性は高い。このことから、今後はその原因遺伝子の同定を進めていき、分子生物学的な植物受精の基盤を確立する。現在までに植物の受精の段階で直接働く因子は非常に少ないため、これらと共同して働く因子が同定されれば、それだけで当該分野の進展に貢献出来る。研究計画2では胚乳単為発生因子である *MEA* や *FIS2* などが過去に同定されているものの、胚乳単為発生因子は未だに同定されていない。今回のスクリーニング法は非常に効率的であるので、このような因子が数多く獲得できる可能性は高い。この様に、植物受精の分子生物学的な基盤が整い、単為発生因子が獲得出来れば、いよいよその因子を活用してイネのアポミクシス化に取り組む。イネのアポミクシスが達成できれば、花粉機能に影響の出る冷害などの悪天候でも100%の種子稔性が期待できる体制が整うという意味で、その貢献は莫大なものとなる。更に、イネの優良系統同士を掛けあわせして新品種を作る場合に、アポミクシス系統が確立していれば掛け合わせ可能であればいかなる優良形質もF2の分離で失われることがなく、優良品種の維持や大量生産に大きく貢献できる。

4. 評価

- (1) 自己評価
(研究者)

研究計画 1 においては、有力な受精変異体を2つ獲得できた。遺伝子同定はまだ時間がかかるとはいえ、今までほんの少ししか受精に直接関わる変異体は同定されていなかったため、遺伝子が同定されればようやく植物の受精の分子生物学的なネットワークが構築されることとなり、今後大いに期待がかかる分野となる。研究計画2については、有力な胚あるいは胚乳自動発生因子がシロイヌナズナで獲得されつつあるので、もしこれがイネで応用できれば生物学的にも、農学的にも応用が期待できる分野となる。また、研究計画3については POEM 現象がイネでも見出されたことから今後はイネでの POEM 現象を生かして、受精をしなくても胚乳を形成するイネの作成に期待できる。また、これら3つの結果を合わせて、イネのアポミクシスが達成できれば、人類の食へ直接繋がる技術となり、その効果は絶大である。

(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)

笠原氏は、バイオマス生産性の高い系統の増殖を可能にするため、受精を伴わずに種子などの繁殖体を生産するアポミクシス形質をイネに導入することを、本研究の目的とした。研究の過程では、まずシロイヌナズナを用い、受精不成立変異体の選抜と遺伝子の同定を進め、また受精せずに胚および胚乳が分化する変異体の選抜も行い、重要な変異体の獲得に成功した。しかしながら、まだ原因遺伝子の特定には至っておらず、現象論の段階にとどまっていることは残念である。最終目標のイネアポミクシス系統の育成にはまだ遠く、まずはシロイヌナズナに集中した基礎研究に注力し、植物の胚珠発生の制御機構の分子基盤の解明につなげてほしい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ryushiro D. Kasahara, Michitaka Notaguchi, Shiori Nagahara, Takamasa Suzuki, Daichi Susaki, Yujiro Honma, Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama. Pollen tube contents initiate ovule enlargement and enhance seed coat development without fertilization. *Science Advances* 2: e1600554 (2016)

(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)

1. 笠原 竜四郎, Discovery and Application of the POEM Phenomenon, シンガポール テマセク 研究所 招待講演, 2014 年 2 月 12 日

2. 笠原 竜四郎・木下 佳裕・東山 哲也, イネ生殖分子機構の解明と操作を基盤としたアポミクシスへの挑戦, 第 55 回日本植物生理学会 年会, 2014 年 3 月 18 日

3. 笠原竜四郎, Challenging to establish the rice apomixis system by analyzing and manipulating mechanisms of rice reproductive molecules, 23rd International Congress On Sexual Plant Reproduction, 2014/7/12
4. 笠原 竜四郎、植物の受精学、静岡大学理学部 集中講義、2014/10/17(招待講演)
5. 笠原 竜四郎、Discovery and Application of the POEM Phenomenon, University of Utah, 2015/2/18(招待講演)
6. 笠原 竜四郎、Female (female Gametophyte) and Male (pollen tube) interaction in plants, Colorado State University, 2015/2/23(招待講演)
7. 笠原 竜四郎、Imaginary Pregnancy in Plants, University of Montreal, 2015/2/27 (招待講演)
8. 笠原 竜四郎、POEM 現象は花粉管内容物によって引き起こされる植物の新現象である。第 55 回日本植物生理学会年会、2015/3/18
9. 笠原 竜四郎、花粉管誘引と重複受精の間にある、植物の生殖に重要な POEM 現象の発見-動物と植物の受精現象の共通点に迫る-
日本動物学会 シンポジウム 受精から生殖システムの進化を考える 2015/9/18(招待講演)
10. 笠原 竜四郎、Discovery of POEM Phenomenon Induced by Pollen Tube Contents. 24th International Congress on Sexual Plant Reproduction, USA 2016/3/21(招待講演)

研究報告書

「低窒素で持続可能な二酸化炭素資源化のための中心代謝バランス制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 草野 都

1. 研究のねらい

【着眼点】

本研究は、二酸化炭素の効率的資源化のための技術開発を目指し、低窒素条件下での植物の生育抑制に着目する。植物の生育は、炭素代謝と窒素代謝の相互作用(CN バランス)により制御されることが知られているが、その分子機構は不明な点が多い。地球温暖化回避のための二酸化炭素削減に加え、低投入持続型の植物生産が求められている中、土壌が低窒素状態にあっても植物の生育を維持し、二酸化炭素資源化の促進を目指すには、上記の抑制機構の解明が急務である。

【研究目標の再設定および将来への展望】

本研究では、光合成および窒素同化能の強化による二酸化炭素資源化促進を目指すのではなく、CN バランスを介した植物の生育抑制の仕組みを解明する。研究開始時には中心代謝物において、花形成時のシグナル分子として同定されたトレハロース 6 リン酸(T6P)に焦点を当て、T6P がいかに CN バランス制御に寄与するのかという仮説に基づき研究を進めた。栄養成長期に発現するサイトゾル型グルタミン生合成酵素(GS1)をコードする遺伝子 3 種類のうちの 1 つである *OsGS1;1* 欠損変異イネは窒素十分条件下では葉の生長が抑制され、*OsGS1;2* 欠損変異イネでは抑制が見られないことが再現性よく確認できた。しかし T6P の物性が不安定であり、ごく微量しか存在しないこと、本研究で行った転写物プロファイリングにおいて T6P 合成酵素遺伝子群の増加が検出されなかったことから、当初の仮説に疑問を抱いた。意外なことに、*OsGS1;1* 欠損変異イネの根の転写物プロファイリングの結果から、光合成関連遺伝子群の発現に有意な上昇が認められた。通常、根では光照射条件下において成熟した葉緑体分化は誘導されない。このことから *OsGS1;1* によって同化される窒素同化産物もしくはその代謝物(群)が未知のしくみを介して代謝ネットワークを変化させ、光合成関連遺伝子群発現量を制御するのではという新たな仮説構築に至った。よって、本研究では本制御機構を明らかにするとともに、*GS1;1* が関与する未知の制御機構解明の解明を行う。当初の目的であった低窒素条件下での健全な植物生育のための鍵因子を特定する。本研究支援で得た知見を応用展開に繋げるため、様々なイネ栽培種の低窒素応答と生長の関係性についても解析する。これにより、窒素肥料過多によって支えられている従来型の農業形態を低窒素施肥でも高収量を確保できる革新的な食糧生産技術の創出へと変換する技術開発に利用する。

2. 研究成果

(1) 概要

栄養成長期における低窒素条件下でのイネ生長抑制機構の解明に向けて、(1)アンモニウ

ム態窒素同化酵素のひとつである GS1 が担う中心代謝を介した健全なイネ生長調節のための鍵因子の同定、および(2)世界で栽培されている代表的イネ品種についてオミックス解析による窒素応答に関する研究を行った。

研究項目1では、GS1 をコードする3種類の遺伝子のうち、栄養成長期に発現する *OsGS1;1* および *OsGS1;2* に着目した。両者の組織発現部位は異なっており、*OsGS1;1* はイネの全体の部位で発現が認められるのに対し、*OsGS1;2* は主に根に発現が認められた。次に、イネレトロトランスポゾン *Tos17* によって誘発されたイネ変異体 *Osgs1;1* および *Osgs1;2* を用いて代謝物プロファイリングによる解析を行った。その結果、両変異体の根において *Osgs1;1* では糖類の過剰蓄積が認められたのに対し、*Osgs1;2* ではアミノ酸類の減少といった窒素欠乏時に見られる代謝物群の量的変化が認められた。次に、*Osgs1;1* の根における糖類の過剰蓄積に関する知見を得るため、転写物プロファイリングを行った結果、予期せぬことに、葉緑体タンパク質をコードする遺伝子を含む光合成関連遺伝子群の発現に有意な上昇が認められた。通常野生型のイネの根では少量の光照射による葉緑体分化は起こらない。この原因を探るべく、異なる葉令期時系列のサンプルに対する高解像度転写物プロファイリングにより解析を進めた。本解析により、幼苗の従属栄養から独立栄養期への移行期に葉緑体関連遺伝子群の発現量が増加することを明らかにした。研究項目1で使用した栽培種が日本晴であり、他の系統では栄養成長期における低窒素環境に対してどのような応答を示すのかに興味を持たれた。よって、研究項目2では、極少数の品種で遺伝的多様性をカバーする代表的栽培品種および対照区となる2品種(日本晴およびカサラス)の合計69品種について、窒素濃度がダイナミックに変化する際のそれぞれの品種の生育スピードを指標とした観測システムを構築し、低濃度の窒素条件下でも生育抑制を起こさず生長可能なイネ品種の選抜を行った。その結果、窒素濃度の変化に対する応答性が高い5品種を選抜した。この中の1品種に対し、RNA-seq 解析を行った。本品種は日本晴を対照区とした場合、窒素十分条件から低窒素濃度への変化に応じて転写物群が顕著に変化するのに対し、日本晴ではこのような変化は認められなかった。故に日本晴が有する応答とは異なる、比較的短期の窒素濃度変化に素早く応答するメカニズムの存在が示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A, B 「窒素十分条件下での有機態窒素代謝の中心代謝へのインパクト解明」

本テーマは2つのサブテーマにより構成される。一つ目は、対照区であり今回用いている変異体と同じ遺伝背景を持つ野生型イネにおける異なる窒素条件下での葉身伸長抑制・回復に対する予備知見を得るための解析である。イネの栄養生長期の中で、発芽から分けつが認められる前までの主幹生長時期では、(1)種子からのイネ生長に必要なエネルギー源の供給(従属栄養)、(2)生長したイネ葉身での光合成によるエネルギー源の供給(独立栄養)がその生長を支えている。(1)は有機態窒素(アミノ酸等)、有機態炭素(糖类等)および根からの無機態窒素を含む無機栄養分の吸収により起こるが、第何葉令期までが従属栄養により生長するか不明であった。そのため、対照区である日本晴を発芽時から第6葉令期まで生育させ、種子、根、地上部のバイオマス測定したところ、第3葉令から第4葉令にかけて種子内容物が消費され、その後根および地上部のバイオマスが大幅に増加した。次に、日本晴およびインディカの対照区として用いられるカサラスを第3葉令期まで窒素欠乏条件、その後段階的に窒素濃度を上昇させて生育させ、各葉身の生長度を新鮮重量により評価した。その結果、従属栄養後期に

窒素供給が行われない場合、葉身生長は抑制され、この効果はのちに無機窒素が供給された場合でも十分に回復しなかった。よって、サブテーマ二つ目で着目した第3葉令期から第4葉令期における窒素有効利用がバイオマス増大に重要な生育時期であると推測した。続いて、イネ変異体 *Osgs1;1* に対し、これらの時期における根、基部および未幼籾の時系列オミックス解析を行った。通常根においては葉緑体形成がおこらないが、本組織に対するガスクロマトグラフ質量分析計を用いた代謝物およびマイクロアレイによる転写物プロファイリングで得た結果から、糖類の蓄積、光合成関連遺伝子群発現の有意な上昇が認められた。また、糖類トランスポーター遺伝子群の発現量が有意に減少すること、光合成関連遺伝子群以外にも、*Osgs1;1* の根では植物の生育に必須の無機物の取り込みに関わる遺伝子群の発現量も有意に減少した。本結果は、*OsGS1;1* が単純に有機態窒素供給としての役割を担うだけでなく、何等かの制御機構の一因子として、代謝恒常性の維持ひいては光合成関連遺伝子群発現等、広範囲にわたる遺伝子群の制御に関わることを初めて見いだした。

研究テーマC「窒素欠乏条件でのイネ葉の生長抑制機構の解明」

イネは窒素十分条件では生長を続けるが、低窒素条件では生長を一時的に抑制することが知られている。本研究では、多様な品種が示す窒素栄養応答を解析するため、RFLP マーカーを元に選抜された世界のイネコレクション 67 品種に対照区となる 2 品種を加えた 69 品種を対象とし、アンモニウム態窒素十分条件、超低窒素条件および低窒素条件の 3 種類の窒素濃度をダイナミックに変化させた時のイネ地上部の生長変化について、本研究内で開発したデジタルフェノタイピング技術により解析した。低窒素条件で最も早く生長が回復する品種1種類の選抜を行い、本品種を研究テーマD、Eの実験に供した。

研究テーマD、E「低窒素生長耐性品種の選抜と低窒素下での植物の継続的生長のための代謝物マーカー候補の決定」

研究テーマCで選抜したイネコアコレクション1種類について、窒素十分条件、超低窒素条件および低窒素条件における地下部の中でも、特に基部に着目し、これらの遺伝子発現パターン変化を捉えるため、RNA-seqにより解析を行った。本データを用い、多変量解析を行った結果、選抜した品種は遺伝子発現レベルで窒素濃度の変化に素早く応答することを明らかにした(研究テーマD)。本実験により、これらの遺伝子群を低窒素下での植物の継続的生長のためのマーカー候補として抽出することに成功した(研究テーマE)。

3. 今後の展開

さきがけ研究では、低窒素条件下で持続的に生育可能な事象を明らかにするため、イネの窒素同化鍵酵素の変異体に対し、オミックス解析を駆使した基礎研究を行った。その結果、全く予期しなかった窒素が光合成、すなわち炭素同化と密接にかかわることを代謝物変化および遺伝子発現変化を捉えることで見出した。平行して、基礎研究を応用研究につなぐため、多様なイネ品種について低窒素条件で地上部の生育が抑制されない品種を選抜することに成功している。今後は、本研究で得た新たな知見を通じ、窒素同化によって制御される鍵因子を同定するとともに、窒素応答遺伝子マーカーをアフリカ等の低窒素土壌において生育可能な品種選抜技術として応用する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

植物が低窒素条件でも生育抑制を受けず生育可能なしくみを解明するために、本研究では有機態炭素による CN バランスの恒常性に着目した。加えて、最終的に土壤貧栄養条件でも健やかに生長する植物を作出する技術開発に資する知見を得ることを目指した。本研究目標を達成するために、これまでに明らかにされてきた常識を覆すような CN バランス機構の解明と、応用研究に繋がるような低窒素応答性を有する植物種の選抜に利用可能なマーカーの発見を平行して行った。

先行研究により、*OsGS1;1* が栄養生長期に地上部の葉身伸長制御に密接にかかわることが示唆されていた。また、本研究を開始する前に得ていた結果では、有機態 CN 代謝物のバランス維持に重要であることを見出していた。しかし、*OsGS1* のホモログ遺伝子である *OsGS1;2* で代謝物群の量的制御にどのように関わるか、*OsGS1;1* および *OsGS1;2* の機能分化については未解明であった。よって、両者の代謝物群および転写物群の変化を包括的に解析可能な統合オミックス解析を行うことにより、*OsGS1;2* で同化されたグルタミンがアミノ酸類量を調整する働きを担うのに対し、*OsGS1;1* では中心代謝の炭素同化およびその代謝調節に関わることを明らかにした。

低窒素条件下で比較的短期間で応答するマーカー候補の探索では、生長の様子を charge coupled device (CCD) カメラで追跡し、高解像度デジタルデータとして得る手法を開発した。本手法により選抜した品種の遺伝子発現変化を他の品種と比較解析し、最小限の窒素応答マーカー候補の組み合わせを見出す予定である。

オミックス解析は包括的データ解析から仮説を構築し、それを証明する手法のひとつである。しかしながら、オミックス解析により得たデータは、従来法の「スクリーニング」に用いられる傾向にあった。本さきがけ研究では、明らかにしたい事象に対し、最適化した実験デザインを構築し、環境条件、個体変動から生じるノイズを様々な統計解析を適用することで区別し、有意に変化する要因を客観的に抽出することができた。このようなアプローチを、今後の研究スタイルの一つとして発信していきたいと考えている。

(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)

草野氏は、本研究において、窒素欠乏下での生育抑制が植物の中心代謝内の代謝物群のバランス(C/Nバランス)で制御される仕組みを解明し、貧栄養の土地でも健全な成長を行う品種の選抜に応用できる基盤技術の開発を目的とした。その結果、C/Nバランスの観点から特定のグルタミン合成酵素に研究のターゲットを絞り込むことができた。しかし、それがC/Nバランスの制御に重要な関与をして、その制御機構の理解を通して、低窒素環境下でも無機物同化機能を十分に発揮できる植物体を開発する具体的な戦略が未だ見えていない。メタボローム研究者として、これまで培ってきた協力関係をさらに発展させ、二酸化炭素資源化に貢献できる研究成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ohashi, M., Ishiyama, K., Kusano, M., Fukushima, A., Kojima, S., Hanada, A., Kanno, K., Hayakawa, T., Seto, Y., Kyojuka, J., Yamaguchi, S., and Yamaya, T. Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 in vascular tissues of axillary buds caused severe reduction in their outgrowth and disorder of metabolic balance in rice seedlings. *The Plant Journal*. 2015, 81, 347–356.
2. Kusano, M., Baxter, I., Fukushima, A., Oikawa, A., Okazaki, Y., Nakabayashi, R., Bouvrette, D., Achard, F., Jakubowski, A., Ballam, J., Phillips, J., Culler, A., Saito, K., and Harrigan, G. Assessing metabolomic and chemical diversity of a soybean lineage representing 35 years of breeding. *Metabolomics*. 2014, 11, 261–270.
3. Kusano, M.*, Yang, Z.G., Okazaki, Y., Nakabayashi, R., Fukushima, A., and Saito, K. Using Metabolomic Approaches to Explore Chemical Diversity in Rice. *Molecular Plant*. 2015, 8, 58–67.
4. Yamaya, T., and Kusano, M. Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH–glutamate synthases in rice. *Journal of Experimental Botany*. 2014, 65, 5519–5525.
5. Fukushima, A., and Kusano, M.* A network perspective on nitrogen metabolism from model to crop plants using integrated ‘omics’ approaches. *Journal of Experimental Botany*. 2014, 65, 5619–5630.

(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)

国際学会招待講演

Kusano, M.: Cytosolic glutamine synthetase 1;1 involves plastid differentiation via metabolic homeostasis in rice. The Third International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants (Nitrogen 2016), Montpellier, France, 22–26 August (2016).

国内学会発表

草野都、福島敦史、舟山和宏、小林(田淵)真由美、西澤具子、小林誠、佐藤繭子、若崎眞由美、豊岡公德、近藤久益子、内海好規、関原明、小島創一、斉藤和季、山谷智行. イネサイトゾル型 GS1;1 による代謝とオルガネラの恒常性の維持に対する役割. 第 34 回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会, 上田, 9 月 1–3 日(2016).

大橋美和, 石山敬貴, 草野都, 福島敦史, 小島創一, 山谷知行, 早川俊彦: Lack of



cytosolic glutamine synthetase1;2 reduced the availability of glutamine and sucrose for axillary bud outgrowth in the rice seedling. 第 57 回日本植物生理学会年会, 盛岡, 岩手, 3 月 18—20 日 (2016).

研究報告書

「パターン受容体ネットワークによる高精度・持続型の植物防御システムの開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 西條 雄介

1. 研究のねらい

地球規模で植物の生存や生育を制約する主要な律速要因の一つは病害であり、持続的な耐病性を強化することが安定した植物生産の確保につながると期待される。従来の耐病性育種では、病害を引き起こす特定の病原体系統に有効な抵抗性遺伝子に依存した方法が主に利用されてきた。しかし、この方法では、対象となる病原体の種類が限定されてしまうことや病原体の急速な進化による抵抗性の打破等の問題点がある。一方、微生物全般を抑えるような抗菌性物質の利用も、植物に共生して生育・物質生産を補佐する良性の微生物に悪影響を与える懸念がある。

そこで本研究では、自らの細胞異常や破砕成分などのダメージシグナル(DAMPsと総称)を感知する免疫センサーと、微生物特有の成分(MAMPsと総称)を感知する免疫センサー同士が織りなす相互作用ネットワークに着目する。植物免疫シグナル系の最上流で司令塔として働くこれらの免疫センサー(パターン認識受容体)は、それぞれ制御様式やシグナル系の律速ステップが異なり、それらが連動して働くことで互いの機能を相補し、植物免疫の頑健性を高めている。また生育に負の影響を与えてしまう防御応答の規模がDAMPシグナルの量に応じて調節されるという仮説も提唱されている。したがって、パターン受容体の機能性ネットワークの解明を進めることで、様々な病原体の感染拡大を抑止し、その効果も持続的で、かつ植物の生育や微生物共生への負荷を抑えた生体防御システムの開発が可能になると考えられる。

具体的には、PEPRを介したDAMPシグナル系をモデルとして、まずシロイヌナズナにおいてDAMPリガンド活性化・受容体複合体形成・シグナル伝達の分子メカニズムの解明を進める。さらに、PEPR高発現イネを作出して耐病性・耐虫性等に関する性状解析を行うことで高等植物に広く保存されたPEPRシグナル系の応用に向けて役立つ情報を得る。パターン受容体の機能性ネットワークを有効に利用することにより、汎用性や持続性が高く、かつ生育とも調和が取れた耐病性の育種が実現できると考えている。Proof of Concept(概念実証)を得るに留まらず、PEPRシグナル系の強化による影響を重要作物(イネ)において検証することで、食糧作物やエネルギー生産植物への応用展開にも弾みをつけたい。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究領域等によって創出された「二酸化炭素の資源化技術」に実効性を持たせるためには、植物バイオマスの増産と同時にそれを病虫害や環境ストレスから保護する高持続性の技術の開発が極めて重要である。本プロジェクトは、まさにこの点における貢献を目的とするもので、植物が持つ様々な免疫システムの中でも、病原性微生物の認識ひいては防御応答(コスト)の規模の調節に働くと考えられる DAMPs-MAMPs 受容体のシグナルネットワークに着目した。シロイヌナズナの Pep ペプチドとその受容体 PEPR を介したシグナル系

が MAMPs シグナルの増幅に働くことを示した先行研究(Tintor 2013 PNAS)に続き、本プロジェクト期間中に PEPR シグナル系が病原菌の侵入部位で機能して全身抵抗性を誘導することを報告した(Ross 2014 EMBOJ)。

DAMPs 受容体の活用に向けて、シロイヌナズナ PEPR シグナル系の分子制御機構に関してさらに解明を進めた。Pep ペプチド前駆体の一つ PROPEP3 の放出が感染細菌の病原性や宿主の細胞死に依存して亢進されることを突き止め、DAMP として働くことを証明した。また、PEPR による防御応答・細胞死の誘導が共受容体 BAK1 の非存在下で強まることを発見した上、重大植物病原菌の一つ炭疽病菌が BAK1 除去を通じて感染すること並びに同条件で機能を発揮する PEPR シグナル系が炭疽病抵抗性に重要であることも見出した(Yamada 2016 EMBOJ)。以上の知見を基盤として、Pep 感受性が低下した *alps* 変異体の独立システムを複数単離し、性状解析や原因遺伝子の機能解析を進めている。さらに、PEPR 相互作用タンパク質として細胞膜局在性アクアポリンを同定し、それが細菌抵抗性に必要であることも示した。これらの研究成果は、植物 DAMPs 研究を世界的にも牽引するものであり学術的に高い評価を得ている。

加えて、PEPR の高発現によりシロイヌナズナにおいて植物成長を保持(有意に増加)しながら MAMPs 誘導性の防御応答並びに耐塩性も強化できることを示した。PEPR 相同遺伝子の発現を強化した形質転換イネも作出しており、現在、耐病性・耐虫性や耐塩性等に関する表現型解析を進めている。このようなアプローチからも「植物成長と調和した新しい生体防御技術」の開発に密接に貢献する知見も得られつつある。

(2) 詳細

各研究テーマにおける達成状況は次の通りである。

研究テーマ A 「シロイヌナズナ PEPR シグナル系の分子制御機構の解析(1)病原菌感染に応じた Pep リガンドの産生・放出機序の解明」

PROPEP3-Venus 発現植物に病原性細菌 *Pseudomonas syringae* の野生株から弱毒株までさまざまな系統を接種して、PROPEP3 およびその低分子型の発現誘導に続く細胞外への放出が病原細菌の病原性や宿主の細胞死に依存して高まることを見出し、PROPEP3 が病原体の認識に関わる DAMP であることを実証した(Yamada et al, EMBOJ 2016)。この結果は、PEPR シグナル系が病原菌の侵入・感染組織において機能することが全身抵抗性の獲得に重要であることを示した研究成果(Ross et al, EMBOJ 2014)とも合致する。

研究テーマ B 「シロイヌナズナ PEPR シグナル系の分子制御機構の解析(2)PEPR 複合体の構成因子の同定と機能解析」

PEPR1 または PEPR2 の GFP 融合タンパク質をそれぞれの内生のプロモーターDNA 配列の制御下で発現する形質転換シロイヌナズナにおいて、Pep ペプチド処理の有り無しの条件下で、受容体複合体をアフィニティ精製法により回収し、構成因子の候補タンパク質を質量分析法によりリスト化した。そのいくつかについては現在、機能解析を進めている。また、単糖輸送

体 STP13 に関しては、山田晃嗣博士(京都大学、現徳島大学)との共同研究により機能解析を進めた。その結果、MAMPs 依存的に BAK1 によるリン酸化を受けて単糖吸収活性が増大し、細胞間隙の糖濃度の上昇を防ぐことで細菌の栄養源を枯渇させ、細菌抵抗性に寄与することを突き止めた。植物免疫による感染生物の栄養制御という全く新規の生体防御戦略を発見したことが高く評価された(Yamada et al, Science 2016)。

研究テーマ C 「*Colletotrichum* 属炭疽病糸状菌の感染戦略(BAK1 除去)の発見、並びに BAK1 除去時の基礎抵抗性における PEPR シグナル系の役割の解明」

病原菌 *Colletotrichum higginsianum*(*Ch*)が感染した葉において、BAK1 タンパク質の蓄積が特異的に低下する現象を発見した。*bak1* 変異体植物において *Ch* 感染が増すことから、*Ch* が BAK1 の除去を介して宿主植物の抵抗性を打破する仕組みを持つことが明らかになった。このような感染戦略に対して、BAK1 非存在下でも PEPR シグナル系が働くことで *Ch* に対する基礎抵抗性が維持されていることも示した(Yamada et al, EMBOJ 2016)。

研究テーマ D 「シロイヌナズナ PEPR シグナル系の分子制御機構の解析(3)Pep 低感受性変異体の分子遺伝学的解析」

Pep 投与による根の伸長抑制が *bak1* 欠損変異体では顕著に起こることを利用して、その変異体背景で Pep 感受性が軽減した復帰突然変異体 *altered Pep sensitivity* (*alps*) 変異体のコレクションを単離した(既知の PEPR シグナル系の制御因子に変異を持たず、新規制御因子の同定が期待される変異体を7ライン以上含む)。Pep 応答(ROS バースト・MAPK 活性化・マーカー遺伝子発現・細胞死・耐病性)に関する表現型解析を行った。さらにトランスクリプトーム解析による *alps* 変異体コレクションの分類と簡単な性状解析も行った。その結果、各 *alps* アリルで損なわれている PEPR シグナル機能(防御応答経路)が判別できた。現在、ALPS 原因遺伝子の同定並びに機能解析を進めている。

研究テーマ E 「シロイヌナズナにおける PEPR 高発現植物の性状解析」

PEPR1 や PEPR2 の高発現植物は、Pep 応答のみならず MAMP 誘導性の防御応答や耐塩性も増強されていることを見出した。特に PEPR2 高発現植物は、温室条件下において土植えて栽培すると生育も良くなっており、PEPR シグナル系の強化により植物の生育を維持しながらストレス耐性が増強できることを確かめた。

研究テーマ F 「イネにおける OsPEPR 高発現植物の作出と性状解析」

OsPEPR1 または OsPEPR2 を高発現する形質転換イネをそれぞれ複数系統作出した。現在、高発現ラインを選定して Pep 応答に加えて MAMP 応答、耐病性、耐虫性等の性状解析を進めている。

3. 今後の展開

シロイヌナズナにおいて ALPS 遺伝子の同定・機能解析や PEPR 相互作用タンパク質に関する機能解析を進めて PEPR シグナル系の制御機構を明らかにしていくことで、植物の MAMPs-DAMPs 受容体のシグナルネットワークの分子制御メカニズムに関する理解を深める。

その際、互いに近縁でありながら病原菌から共生菌までを含む *Colletotrichum* 属糸状菌リソースを活用することで、植物による病原菌・非病原菌の識別に MAMPs-DAMPs 受容体ネットワークが果たす役割を明らかにする。また、シロイヌナズナの PEPR 高発現植物はさまざまな MAMPs に対する感受性も高まっており、これをレポーターとして活用することで、新規の MAMPs や DAMPs の同定に役立てる。このような研究路線を継承することで基礎研究としてのさらなる発展が期待される。

イネの PEPR 相同遺伝子 OsPEPR1 または OsPEPR2 の高発現イネについて、植物生理学・植物病理学の観点から詳細な表現型解析を実施して、植物成長や菌根菌など微生物共生と調和する形で耐病性・耐虫性・耐塩性などが増強しているかどうかに関して精査する。これらの研究成果をベースに応用展開を図る。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

植物の物質生産力の強化・安定化に向けて、病虫害の克服は喫緊の課題である。本プロジェクトでは、耐病性育種技術に関して従来の主流とは異なる切り口から、「植物成長と調和する新しい生体防御技術」の開発基盤となる知見の習得を目指した。

具体的には、植物免疫において重要な役割を担いながらあまり研究が進んでいない DAMPs シグナル研究並びに MAMPs-DAMPs(パターン)受容体のシグナルネットワークに着目して、モデル植物シロイヌナズナのアドバンテージを活かしながらその生理意義や分子制御メカニズムの解明を進めることが出来た。中でも、MAMPs 受容体・DAMPs 受容体に加えて、他の重要な生理応答の制御に関わる多くの膜受容体にとって共通の共受容体として働く BAK1 を標的とする病原菌の感染戦略と、それに対抗する植物の生体防御戦略として PEPR を介した DAMPs シグナル系が果たす重要性を明らかにした研究成果は、国内外で学術的に高く評価されている(Tang and Zhou, EMBOJ 2016 News & Views)。また、パターン受容体シグナル系の活性化が耐病性のみならず、耐塩性の誘導にも促進的に働くことの発見(特許出願済み、現在論文準備中)は、学術的にも応用的にも新規性・進歩性が高い成果である。ドイツ・マックスプランク研究所から主宰研究室を奈良先端科学技術大学院大学に移し、本プロジェクトの研究費を有効活用して上記の研究成果を上げるとともに、将来に渡って先駆的に研究を進められる研究実施体制(大学院生や技術補佐員の育成も含む)を全くの新地から確立することが出来た。本学における形質転換植物実験停止措置の影響で、最終年度に遅れが生じたものの、追加支援を得られたこともあり現在急ピッチで解析を進めており、今年度末までには挽回が十分可能であると考えている。

応用的な観点からは、イネにおいても PEPR シグナル系が植物の成長促進機能を持つことを見出した点が評価できる。現在進行中の OsPEPR 高発現イネの表現型解析からも「植物成長と調和する新しい生体防御技術」の開発に向けて PEPR シグナル系の活用の有望性を裏付ける知見が得られるものと期待される。少なくとも本プロジェクト終了1年以内には一通りの解析を終えて、実効性を評価できる見通しである。これまでの進捗状況から判断して農学的な波及効果が大きく期待される成果が得られるものと予想しており、むしろ野外圃場実験など実用

化に向けて達成すべき課題点を明確にしたいと考えている。

結論として、本研究課題の目標に対する達成度は、基礎研究としては当初の想定を超えた PEPR シグナル系の新機能の発見も含めて非常に高いと評価できる。研究成果の外部発表や応用展開に関しては現在進行中の研究や投稿論文を合わせて一定の評価が妥当である。研究体制や研究マネジメントに関しては、ドイツから帰国直後、国内の研究環境に慣れ、研究室環境を確立するのに一定の期間を要したものの、産学連携を含む研究者ネットワークも形成することが出来、最終的には今後につながる生産性の高い体制が構築できたと考えている。

(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)

西條氏は、本研究において、植物免疫に重要な役割を果たしているパターン受容体ネットワークの仕組みを解明し、持続的で物質生産とも調和がとれた耐病性植物の作出を目指した。その結果、病原菌感染に由来するダメージシグナルに対する植物体の応答現象の分子実態の解明に成功し、また、ネットワーク構成要素の一つPEPRの過剰発現体で、防御応答性や耐塩性が増強していることを明らかにし、特許も出願している。これらの成果は高く評価されるもので、植物とそれを取り巻く微生物との複雑な相互作用の今後の解明に大いに期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ross A., Yamada K., Hiruma K., Yamashita-Yamada M., Lu X., Takano Y., Tsuda K., Saijo Y.*
The Arabidopsis PEPR pathway couples local and systemic plant immunity, EMBO J., (2014) 33, 62-75.
2. Tintor N., Saijo Y.* ER-mediated control for abundance, quality, and signaling of transmembrane immune receptors in plants, Front. Plant Sci. (2014) 5, 65.
3. Yamada, K., Yamashita-Yamada, M., Hirase, T., Fujiwara, T., Tsuda, K., Hiruma, K. and Saijo, Y.* Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK1. EMBO J. (2016) 35(1): 46-61.
4. Espinas, NA., Saze, H. and Saijo Y.* Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. Front. Plant Sci., (2016) 7, 1201.
5. Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H. and Takano, Y. Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. Science (2016) 354, 1427.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発 明 者：西條 雄介

発明の名称：植物の耐病性及び耐塩性を向上させる方法並びにその利用

出 願 人：奈良先端科学技術大学院大学

出 願 日：2015/3/10

出 願 番 号：特願 2015-047699

(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)

日本植物生理学会年会シンポジウム(国際、英語)の主宰

「Learning Plant Physiology on Plant-Pathogen Interactions」(H27 年3月)。

「Molecular Basis for Extended Phenotypes in Plant/Animal-Microbe Interactions」(H29 年3月)。

日本植物生理学会 国際委員長に着任(H28-29 年)。

The Global Plant Council Executive Board に選出。

<http://globalplantcouncil.org/about-us/executive-board>

プレスリリース

奈良先端科学技術大学院大学(H27. 11 月)

「植物は細胞異常を感知するセンサーによって病原菌侵入を察知していた

～病原菌による攻撃を受けた細胞が放出するシグナル因子を認識して植物が免疫応答を強化する仕組みを解明、耐病性と増収を兼ね備えた作物に期待～」

京都大学および奈良先端科学技術大学院大学(H28. 11 月)

「植物は侵入してきた病原菌を兵糧攻めにして撃退する一植物の新規防御メカニズムの発見と解明」

公募研究事業

三菱財団研究助成採択(H28 年)

「植物免疫受容体と微生物のクロストークによる共生の場の構築メカニズムの解明」

研究報告書

「フルフラールを出発原料とする汎用高分子モノマーライブラリの構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 橘 熊野

1. 研究のねらい

「二酸化炭素資源化」のためには入り口である植物生産力強化と、出口であるバイオマス由来有機材料(バイオベース高分子)の利活用の双方が重要である。本さがけ研究では、非可食バイオマスから工業的に生産されているフラン誘導体を原料として汎用高分子モノマーを合成し、その合成ルートから得られる化合物群をライブラリ化し、そのライブラリを利用して機能性バイオベース高分子を創出することを目指す。

【フラン誘導体を利用するねらい】

バイオマスとして、食糧問題との競合を避けるために非可食バイオマスの利用が望まれている。フラン誘導体は非可食バイオマスであるセルロースやヘミセルロースから工業的に大量生産されているバイオベース化合物であり、高効率合成を目指した研究も進められている。そのため、二酸化炭素資源化のためにフラン誘導体の新規用途開発が望まれている。一方、フラン誘導体は、ヘテロ芳香環、アルデヒド基、水酸基、カルボキシル基、アミノ基など多彩な官能基を有している。それらの官能基を利用すれば、多種多様な化合物群へと化学変換が可能である。すなわち、現在は化石資源由来である化合物を、フラン誘導体から化学変換によって合成されることが期待できる。本さがけ研究では特に、利用用途が限定されているヘミセルロースから製造されているフルフラールを出発原料として用いることにした。

【汎用高分子モノマーをバイオマスで合成するねらい】

バイオベース高分子によって二酸化炭素資源化を達成するには、大量生産を伴う産業化が求められる。バイオマスから高分子材料を生産するには、既存の汎用高分子をバイオマスから生産する手法の確立、もしくは、新規のバイオベース高分子の創出が考えられる。本さがけ研究では、既に用途や加工方法が確立していて、工業的に成立する生産方法さえ確立すれば即座にバイオマスから生産可能な「汎用高分子のバイオマス化」を先に進める。

【ライブラリ構築のねらい】

フルフラールから汎用高分子モノマーを合成する途中で多種多様なバイオベース化合物が合成されることになり、それをデータベース化することで「フルフラールからの化合物ライブラリ」が構築される。その化合物ライブラリを利用することで新規機能性バイオベース高分子を創出するアイデアが生まれ、バイオマス科学の分野に新たな研究領域が生まれると期待する。

2. 研究成果

(1) 概要

本さがけ研究の目標として、「1. フルフラールを原料とする汎用高分子のバイオマス化」、「2. フルフラール由来化合物ライブラリの構築」、「3. ライブラリを用いた新規機能性高分子の創出」を掲げている。

ポリエチレンテレフタレート(PET)は容器包装材料や繊維材料などの身近なところに使用されているために、多くの民間企業がバイオベース PET 生産を検討している。現在のところ、原料の一部のエチレングリコールのみがバイオマス化されて、Bio-PET として市販されている。もう一つの原料であるテレフタル酸(TPA)をバイオマスから合成する報告例は多いが、決定的なプロセスは開発されていない。本さがけ研究では、フルフラールを原料として TPA を合成する方法を開発し、合成した TPA が 100%バイオマスから生産されたことを証明した。

バイオベース高分子は環境調和型材料として注目されているが、環境中の微生物によって分解される生分解性高分子も重要な環境調和型材料である。フルフラールから合成可能な化合物としてライブラリに登録したオキサビシクロ酸無水物(OBCA)を用いて、生分解性高分子を創出した。OBCA、1,4-ブタンジオール(BD)とコハク酸無水物からなるポリ(ブチレンサクシネート-co-オキサビシクレート)(PBSO)は既存の生分解性高分子よりも優れた力学特性を示しつつ、生分解性を有していた。

エポキシ樹脂は電子部材から建築資材まで幅広い分野で利用されている。エポキシ主剤のバイオマス化は植物油を原料として検討されているが、エポキシ硬化剤、特に酸無水物のバイオマス化は報告例が少ない。エポキシ樹脂硬化剤として OBCA を用いて硬化されたエポキシ樹脂は類縁構造を有する石油由来エポキシ硬化剤よりも耐熱性を向上していた。

不飽和ポリエステルは船舶や建築資材などの構造材や、衣服のボタンなどに使われている。フルフラールから不飽和ポリエステルの原料である無水マレイン酸、無水フタル酸、ジオールを合成し、そこからプレポリマーを重合した。フルフラールから合成した 2-ビニルフランを架橋剤として熱硬化を行ったところ、スチレンを硬化剤に使用した時に比べて強度が向上していた。

以上の研究成果で得られたフルフラール由来の化合物や既存のフルフラール由来化合物をデータベース化しライブラリを構築した。構築したライブラリを利用して新規機能性バイオベース高分子を創出した。

(2) 詳細

【バイオベース PET に向けたバイオベース TPA の合成】

[(1)論文(原著論文)発表の2]

TPA とエチレングリコールから生産される PET はペットボトルや繊維、電子部材として日本国内においても年間 60 万トン近くも大量消費されている高分子である。原料の一つであるエチレングリコールは化石資源から生産するだけでなく、バイオエタノールを原料とする生産が進められており、それを用いた部分バイオベース PET が製品化されている。本さがけ研究では、もう一つの原料である TPA をバイオマスから生産することで、完全バイオベース PET の合成を検討した。

TPA の合成は図 1 に示すルートに従って行った。フルフラールを酸化することでフマル酸とマレイン酸の混合物を得た。混合物の脱水反応で定量的に無水マレイン酸を得た。フランは石油

由来のフタジエンもしくはバイオマス由来のフルフラールから生産されているが、使用したフランが 100%バイオマス由来であることを確認したため、市販のフランをその後の合成の原料に用いた。無水マレイン酸とフランとの Diels-Alder (DA) 反応によって DA 付加物が得られた。DA 付加物の脱水反応による芳香族化で無水フタル酸を得た。KOH 水溶液で加水分解後、CdI 触媒存在下、高温での転移反応を行うことによって、TPA を得た。フルフラールから TPA を合成する本手法は、簡便な反応と精製のみで行なわれているため工業的生産への転換も容易である。特に無水フタル酸からテレフタル酸の合成は数十年前には TPA の合成に利用されていた Henkel 法であり、工業化が容易である。

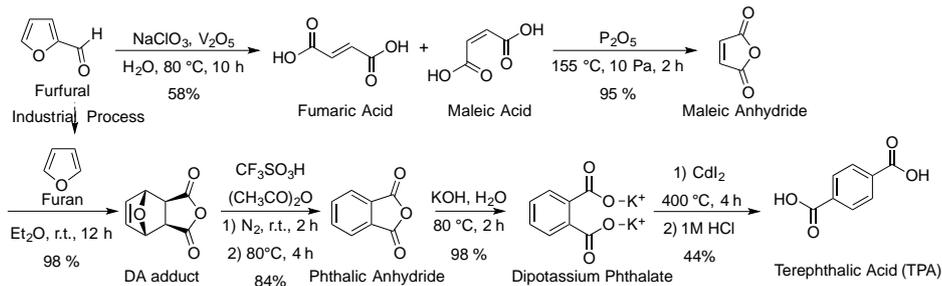


図1. フルフラールからテレフタル酸の合成スキーム

【バイオベース生分解性高分子】

[(3)その他の成果の【主要な学会発表】にて一部発表、【受賞】の発表内容]

微生物によって水と二酸化炭素などの無機物にまで分解される生分解性高分子は環境調和型材料として注目され、農業用資材をはじめ様々な用途への利用が進んできている。そして、生分解性高分子のさらなる環境低負荷化のために、原料のバイオマス化が進められている。

フルフラールから5段階で OBCA を合成し、OBCA とジオールとの重縮合で透明で柔軟性なポリエステルであるポリオキサビシクレート(POBC)の合成を報告していた(図2a) (Tachibana Y. et al., *Green Chem.*, **2013**, *15*, 1318)。また、BD もフルフラールから合成しており(Tachibana Y. et al., *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 2760)、OBCA と BD からなる POBC は完全バイオベース高分子となる。本さきがけ研究では当該 POBC の生分解性を詳細に評価したところ優れた生分解性を有していることが明らかとなった。すなわち、当該 POBC は完全バイオマス由来の生分解性高分子であった。次に、フルフラールから合成できる OBCA、BD とコハク酸無水物を共重合化することで PBSO を合成した(図2b)。PBSO は柔軟性と強度を併せ持ちながら、生分解性を有しており、既存の生分解性高分子の性能を凌駕する完全バイオベース生分解性高分子となる。

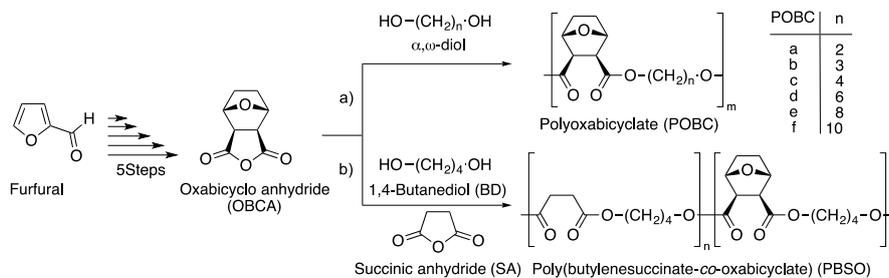


図2. フルフラールから生分解性高分子の合成スキーム

【バイオベースエポキシ硬化剤】

[(1)論文(原著論文)発表の1]

建築資材や電子部材として利用されているエポキシ樹脂は、エポキシ主剤を酸無水物などの硬化剤で架橋することで硬化させている。主剤中のエポキシ基をバイオマス由来のグリセリンから合成する手法や、スペーサーユニットとして多価アルコールを用いる研究が進められている。本さきがけ研究では、先に述べた OBCA をエポキシ樹脂用硬化剤として利用した(図3)。

2,2-ビス(4-グリシジルオキシフェニル)プロパンの硬化剤として OBCA を、触媒としてテトラフェニルホスフォニウムブロミドを加えて硬化させたところ、バイオベースエポキシ樹脂 1 を得た。比較対照としてオキサビシクロ骨格を有しないシクロヘキサンジカルボン酸無水物を硬化剤として用いることで市販エポキシ樹脂 2 を得た。1 のガラス転移温度は 119℃であり、2 のガラス転移温度である 69℃から大幅に向上していた。引っ張り試験の結果、引っ張り強度と破断伸びはほぼ同じであるのに対し、ヤング率は 2 倍に向上していた。以上のことから、非可食バイオマス由来の OBCA はエポキシ樹脂の硬化剤として優れた特性を有しており、特にエポキシ樹脂の耐熱性を高めることに繋がった。

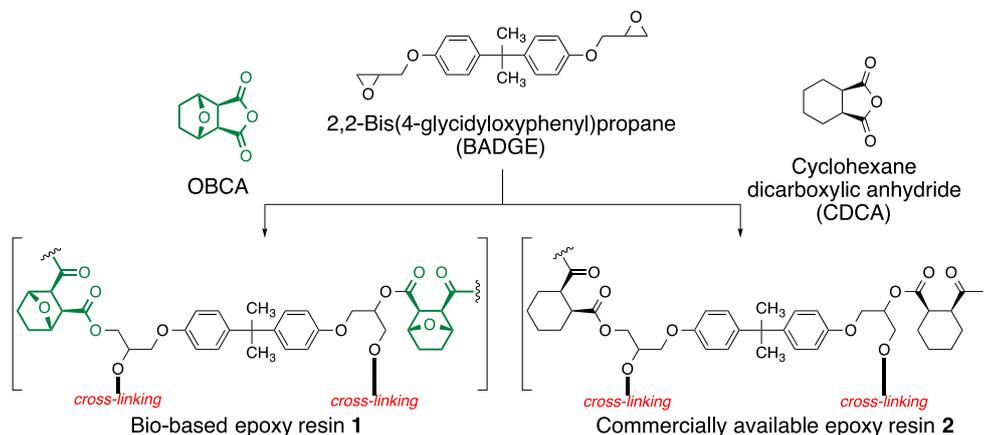


図3. バイオマス由来 OBCA によるエポキシ樹脂の硬化

【バイオベース不飽和ポリエステル】

不飽和ポリエステルは無水フタル酸、無水マレイン酸、ジオールからなるポリエステル(プレポリマー)をスチレンなどのビニルモノマーで硬化させることで得られる熱硬化性樹脂である。漁船や建築資材などの大型構造材だけでなく、衣服のボタンや日用品などの家庭用品にも利用されている。これまで述べてきたように、無水フタル酸、無水マレイン酸、BD はフルフラールから合成可能であるために、これらからバイオベースプレポリマーを合成し、フルフラールから合成した2-ビニルフランを架橋剤として用いることで、完全バイオベース不飽和ポリエステル樹脂の硬化反応を検討した。スチレンを架橋剤として用いた場合と比較して、硬化完了時間は伸びたが、貯蔵弾性率が向上していた。これは、フラン部位同士が Diels-Alder 反応によって架橋構造間で結合を形成し、強固なネットワークを形成したものと考えられる。

【フルフラール由来化合物ライブラリの構築】

以上の結果を利用して、フルフラール由来化合物ライブラリを構築した。さらに、フルフラールから合成が報告されている化合物のうち、合成効率が高く有用性がある化合物群をライブラリに導入した。構築したライブラリを利用して、新規バイオベース高分子の創出に用いた。

3. 今後の展開

低炭素社会実現には、非可食バイオマスから生産したバイオベース高分子を社会に蓄積することで大気中の炭素(二酸化炭素)を減少させる“カーボンマイナス”の概念が効率的である。全世界で1年間に生産されるバイオマスは 1000 億トン以上であり、単純に 20%がヘミセルロースであるとしても 200 億トンのヘミセルロースが光合成によって生産されている。食料の廃棄部分やパルプ廃液など廃棄物から生産できるフルフラールをバイオマス原料として使用することは食糧問題や自然破壊につながらない。すなわち、フルフラールからバイオベース汎用高分子やバイオベース機能性高分子を創出し、その利用拡大を進めることは、非可食バイオマスの利用につながり、低炭素社会実現に大きく貢献することになる。

本さがけ研究では非可食バイオマスの主成分の一つであるヘミセルロースから工業生産されているフルフラールを出発原料とし、汎用高分子モノマーの合成とそれらを用いたフルフラール由来化合物ライブラリを作成した。汎用高分子である PET をフルフラールから生産することは、実用化した際の二酸化炭素削減効果も大きい。一方で、化石資源から生産されている PET と性能が全く同じであるために、「コスト競争に勝たなければ利用拡大につながらない」という困難な課題が立ちだかる。そこで今後は、化学工学的手法を取り入れて合成プロセスの簡易化や省力化によるコスト削減を進める。

一方、既存の化石資源由来高分子とのコスト競争を避けるためには、バイオベース化合物の構造特性を活かした機能性高分子の開発が考えられる。フルフラールの構造的特徴であるフラン環は化石資源から構築したのではコスト的に合わない。すなわち、フルフラールを出発原料とし、そのフラン環を利用して高機能性高分子材料を創出すれば、化石資源由来高分子材料と競合せずに実用化につながると期待できる。構築したフルフラール由来化合物ライブラリを利用することで、フラン環の構造的特徴を利用した機能高分子創出の可能性が見出されたため、今後はライブラリを利用したバイオベース機能性高分子の創出を加速させる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

【研究目標の達成状況】

当初の研究目標として、(1)フルフラールを原料とする汎用高分子のバイオマス化、(2)フルフラール由来化合物ライブラリの構築、(3)ライブラリを用いた新規機能性高分子の創出を掲げていた。

(1)の汎用高分子の PET、不飽和ポリエステルエポキシ樹脂の開発は達成しており、目標としたほとんどの汎用高分子のバイオマス化を達成した。エンジニアリングプラスチックに分類される一部の汎用高分子の開発は途中である。これは、本さがけ研究開始後に合成ルートを設定した他の汎用高分子の方が大量生産されているため、途中からその開発に注力した結果である。当初の目標からは細かな点では完全に達成したとは言えないが、全体的な成果としては当初目標を達成したと考える。

(2)のフルフラール由来化合物ライブラリの構築は、当初目標は合成した化合物のデータベース化を主眼としていたが、本さがけ研究領域において分野の異なる研究者との交流を通じて、

データベースとしての内容を発展的に変更した。現状では、新規化合物だけではなく既存のフルフラール由来化合物もデータベース化しており、十分な成果を達成したと考える。一方で、現状でも権利関連の課題から一般公開ができておらず、科学技術成果の発信という点では今後は身長かつ重点的に検討すべき目標であると考え。

(3)の機能性高分子としては、高力学特性の生分解性高分子の創出や、ライブラリを利用した機能性バイオベース高分子の創出が達成されており、その成果の一部を発展させて新たな研究開発をスタートしており、研究目標は達成していると考え。

【研究の進め方】

(研究体制)

研究期間全般を通じて、さきがけ研究者の橘と研究補助員1名、学生2名が実験を行う体制を構築した。幸いにも第1年次に優秀な研究補助員を雇用できたために、初年度から論文発表につながる成果を出すことができた。また、学生2名は毎年入れ替わったが、橘の指導の下で高い実験技術を身につけてくれ、研究の推進に大きく貢献してくれた。さきがけ研究では、アドバイザーの先生と領域事務部門からの丁寧なフォローと支援を受ける事ができたために、大学での教育義務である学生の成長を促しながら研究を進めることができた。

(予算執行の有効性)

群馬大学では微生物学・遺伝学が専門の粕谷教授と研究を進めていたために、有機合成や物性評価に関する実験設備が不足していたが、本さきがけ研究で局所排気装置やグローブボックス、高温高圧リアクターなどの合成に必須の装置、熱物性評価関連の装置を導入することができた。現在では、それらの装置を駆使し、様々な条件での合成検討が可能になり、高分子物性評価も自前で行うことが可能になったために、急速に研究内容を深化させることができています。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

外部発表として、国際学会7件(うち3件の招待講演)、国内学会11件、シンポジウムなどでの招待講演5件、記事執筆5件、投稿論文2件、また、TV出演が1件、新聞などの記事として取り上げられた回数12回であり、研究成果の社会への波及は十分に果たしたと考える。

本さきがけ研究の成果を発展させるには、ALCA「ホワイトバイオテクノロジー」において引き続きフルフラール由来の機能性高分子材料の開発を続ける。また、外部機関と協議しながら、バイオベース化合物ライブラリの一般公開と将来的な拡張に向けて成果普及を続ける。

【その他】

本さきがけ領域で、多様な研究的背景を有するさきがけ研究者たちと同じ目標に向けて研究を進める機会を得ることで、私自身の研究の幅が広がった。具体的には、植物科学を基盤とする研究者との意見交換や共同研究によって、植物研究の実験タイムスパンや統計誤差に関する概念、植物成長促進・阻害因子などを学ぶことができ、化学工学を基盤とする研究者との意見交換や共同研究によって、新たな化学合成手法を得ることができた。特にインフォマティクス分野の研究者との意見交換は本さきがけ研究の目標をより高いところに設定することになった。当初目標のフルフラール由来化合物ライブラリに最新のケモインファマティクスの研究を導入することで、さらなる発展に繋がるのがわかり、インフォマティクス分野への展開を進めるきっかけとなった。

(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)

橘氏は、本研究において、非可食性バイオマス資源から工業的に生産されているフラン誘導体を原料として得られる化合物群のライブラリ化とライブラリを利用した機能性バイオベース高分子の創出を目的とした。その結果、フルフラールから由来する汎用高分子モノマーの多様な合成に成功し、しかもそれらをライブラリ化して効率的な機能性バイオベース高分子の合成デザインに活用できる道筋をつけたことは高く評価できる。これらの成果は、一般社会にも発信されており、新規技術の開発など、産業化に向けて多方面との共同研究につながっている。橘氏は、さきがけ研究の成果を基盤に、ALCAの要素技術課題として採択されている。本さきがけの研究成果をさらに発展させ、イノベーションに直結する今後の応用展開に大いに期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Y. Tachibana, J. Torii, K. Kasuya, M. Funabashi, and M. Kunioka, Hardening Process and Properties of an Epoxy Resin with Bio-based Hardener Derived from Furfural, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 55723-55731, DOI: 10.1039/C4RA11636D
2. Y. Tachibana, S. Kimura, and K. Kasuya, Synthesis and Verification of Biobased Terephthalic Acid from Furfural, *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 8249, DOI:10.1038/srep08249
3. 橘 熊野, 林 千里, 粕谷健一, 有機合成化学者のための化合物データベース ~バイオベース化合物データベース構築に向けて~, *CICSJ Bulletin*, **2017**, 35(1), 127-132

(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)

【主要な学会発表】

(国際会議招待講演)

1. Y. Tachibana, Synthesis of biobased polymers from furfural, *EMN Biomaterials Meeting 2016*, Phuket, Thailand, Apr. (2016).
2. Y. Tachibana, Furfural-based polymers, *The 2nd World Congress on Materials Science, Polymer Engineering, and Microtechnologies*, Abu Dhabi, UAE, Nov. (2016).
3. Y. Tachibana, M. Yamahata, K. Saori, J. Torii, K. Kasuya, Bio-Based Polymers from Furfural, *6th International Conference on Bio-based Polymers (ICBP2017)*, Taoyuan, Taiwan, May (2017).

(国際会議一般講演)

4. Y. Tachibana, M. Yamahata, S. Kimura, K. Nagayama, H. Ichihara, J. Torii, and K. Kasuya, Bio-based Polymers Derived from Furfural, *The 22nd Annual Meeting of BioEnvironmental Polymer Society*, Kansas City, USA, Oct. (2014).

5. Y. Tachibana, M. Yamahata, S. Kimura, N. Nagayama, and K. Kasuya, Development of Furfural-based Polymers, The 23rd Annual Meeting of BioEnvironmental Polymer Society, Karlsruhe, Germany, Oct. (2015).

(国内招待講演等)

6. 橘 熊野, フルフラールからのバイオベースポリマーの開発 ～トウモロコシの芯からプラスチックへ～, 第74回 有機化学研究会(白鷺セミナー), 堺市, 2015年10月26日

【受賞】

1. 2014年6月 平成26年度繊維学会年次大会 若手優秀発表賞、発表題目「フルフラール由来新規生分解性高分子材料の創成」、授与団体:一般社団法人 繊維学会

【著作物】

1. 橘 熊野, トウモロコシの芯からポリエステルへ, 繊維学会誌, 72 (10), 468-469 (2016)
2. 橘 熊野, 粕谷健一, 非食用廃棄バイオマス由来であるフルフラールからのプラスチック, ペトロテック, 39(2), 103-108 (2016)
3. Y. Tachibana, K. Kasuya, Chemical Synthesis of Terephthalic Acid From Inedible Biomass: Towards Fully Biobased PET, *Convertech e-Pring*, 5(5), 78-81 (2015)
4. 橘 熊野, 粕谷健一, バイオマス資源をプラスチック原料に! —植物を通じたCO₂の資源化を目指して—, *月刊化学*, (8), 12-15, (2015)

【プレスリリース】

1. JST・群馬大学共同プレスリリース, 2015年2月4日「PET樹脂の原料を食用に適さないバイオマス資源から作る方法を開発」(論文発表2に関するプレスリリース)

【記事掲載・テレビ出演など】

1. TBS テレビ「未来の起源」(2015年3月22日)に出演
<http://www.tbs.co.jp/program/mirainokigen.html>
2. Nature Japan おすすめのコンテンツ(2016年2月4日ネット配信)
<http://www.natureasia.com/ja-jp/srep/abstracts/62090>
3. 日本経済新聞(2015年2月5日夕刊14面)
http://www.nikkei.com/article/DGXLASDG04H5U_V00C15A2CR0000/
4. Chemical Engineering(2016年4月号 P7)
5. <http://www.chemengonline.com/making-bio-based-pet-monomer-furfural/?printmode=1>
6. 月刊 Business i. ENECO(2016年5月号 P34-37)

【共同研究】

1. 国岡 正雄 博士(国立研究開発法人 産業技術総合研究所)

2. 船橋 正弘 博士(国立研究開発法人産業技術総合研究所)
3. 笠原 竜四郎 博士(JST さきがけ研究者)

【その他】

1. 2016年11月からJST-戦略的創造研究推進事業 先端的低炭素技術開発(ALCA)「ホワイトバイオテクノロジー」を研究代表者として実施する(研究課題名「フラン類の構造特性を利用した高機能性高分子材料の創出」。本さきがけ研究の成果である「汎用高分子モノマーライブラリ」を利用して創出したフルフラール由来化合物から新規機能性バイオベース高分子を創出して、産業化へと発展させることが目標である。本さきがけ研究で目指していた「汎用高分子ライブラリ」を用いた新規バイオベース高分子開発の有用性が認められたと考える。

研究報告書

「植物の全身性クロストークを支える長距離・高速カルシウムシグナルの解明と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 豊田 正嗣

1. 研究のねらい

近年、地球温暖化や化石燃料の過剰消費の問題から、バイオマス(光合成産物)の利活用が重要視されている。しかし、世界の栽培面積の 90%が塩害・乾燥・病虫害などの劣悪な栽培環境条件であると言われており、バイオマスの増産には環境耐性強化植物体の創出が求められる。また、全世界で 1 年間に病虫害防除として数千億円以上の予算が投じられているにもかかわらず、穀物の 26-40%が病原菌、害虫、雑草、ウイルスなどにより失われている。これは甚大なバイオマスの損失を意味するだけでなく、有効な病虫害対策が無いことも意味する。これまで主に病虫害対策は化学合成農薬に依存してきたが、人畜毒性や薬剤耐性菌の出現などの様々な問題を抱えており、バイオマスを確保するためには環境低負荷型の新規病害制御剤の開発が必要である。

植物には、動物の神経細胞のような情報伝達に特化した細胞は無いが、器官・組織・細胞間といった様々なスケールで相互シグナル伝達(クロストーク)が行われている。例えば、局所的な CO₂ 濃度や光環境変化が遠く離れた葉の気孔を開閉させたり、光合成速度を変化させたりすることが知られている。しかし、これらのクロストークを担うシグナル分子は明らかになっておらず、CO₂ 資源化およびバイオマス生産能向上ためには、全身性の CO₂ 変化受容/クロストーク機構を理解することが重要である。

本研究では、低倍率(個体レベル)から高倍率(細胞レベル)イメージングを可能にする超高感度 Ca²⁺ バイオセンサーおよび生物物理学的手法を駆使して、全身性の長距離・高速シグナル伝達機構の解明を目指す。この研究により、遠く離れた器官の局所的な情報を目的の器官へと伝える植物特有のシステムが明らかになるだけでなく、植物の耐病虫害応答としての全身獲得抵抗性のメカニズムが見えてくる。また、ここで得られた植物のクロストークに関する知見および最新のイメージング法を駆使して、光合成反応の初期受容過程である CO₂ 応答機構を個体(全身)レベルで研究する。更に、長距離・高速 Ca²⁺ シグナルを指標にした高感度・リアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法を開発し、環境耐性強化植物体および新規病害制御剤の創出を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本プロジェクトは、(1)植物の耐病虫害応答の 1 つである全身獲得抵抗性および全身性クロストークを支える長距離・高速 Ca²⁺ シグナルの研究からスタートした。この研究によって、「植物がどのように傷害を受けたことを感受し、その情報を全身に高速伝搬させるのか」が明らか

になった。これらの結果は、環境耐性植物体や新規病害制御剤の創出の足掛かりになるだけでなく、神経を持たない植物の新しい細胞・器官間コミュニケーションシステムの発見へと繋がった。また、ここで得られた基礎データを指標にして、(2)リアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法を開発し、全身性 Ca^{2+} シグナルを制御する化合物のスクリーニングを行った。その結果、ウィスコンシン大学(マディソン校)が所有する大規模ケミカルライブラリー(約 51000 種類)の中から、いくつかの有力低分子化合物を単離した。そして、最終年度には「植物がどのようにして大気中の CO_2 濃度変化を感受して、応答するのか」を明らかにするために(3) CO_2 依存性 Ca^{2+} 応答機構の研究を行った。独自に開発したガス交換チャンバーを高視野蛍光顕微鏡に組み合わせることで、個体レベルでの Ca^{2+} シグナルの可視化に成功した。以上の研究により、 Ca^{2+} シグナルが全身性の傷害抵抗性反応や CO_2 応答において重要な役割を果たすことが明らかになり、この全身性クロストーク機構を理解し、制御することで二酸化炭素資源化/バイオマスの確保につながると考えられる。

(2) 詳細

(1) 全身抵抗性

目標

細胞や組織が傷つけられるという傷害は、植物にとって深刻なストレスであり、その傷害を修復したり抵抗性を上げたりする耐ストレス応答は、生命維持に必須であると共に、光合成産物(バイオマス)を収穫する上でも重要である。植物は昆虫や病原菌による傷害を受けた際、遠く離れた健康な器官でも抵抗性植物ホルモン(ジャスモン酸: JA)を合成させるなど、全身獲得抵抗性の防御機構を活性化させる。例えば、シロイヌナズナの葉に傷害を与えた時、90 秒程度で数 cm 離れた健康な葉で JA 合成が始まる。このような全身獲得抵抗性反応には、局所的なストレス情報を他の器官へと伝える長距離・全身性(システミック)・高速シグナルが関与しているはずだが、その分子実体は明らかになっていない。

本研究は、最近開発された顕微鏡法および超高感度 Ca^{2+} バイオセンサーを用いて、プロジェクトの根幹を成す Ca^{2+} シグナルを介した植物特有の長距離・高速相互シグナル伝達(クロストーク)機構を明らかにする。具体的には、 Ca^{2+} シグナルが、傷害後の全身性 JA 合成をトリガーする分子実体、すなわち局所的な情報を全身へ伝える長距離・高速シグナル分子であるという仮説に立ち、植物の耐病虫害応答としての全身獲得抵抗性の全体像の解明を目指す。

結果

高視野蛍光顕微鏡および高感度 Ca^{2+} バイオセンサーを用いて、傷害応答性 Ca^{2+} シグナルのイメージングを試みたところ、傷害を受けた葉から傷害を受けていない葉に向かって Ca^{2+} シグナルが高速伝播することが分かった。この Ca^{2+} シグナルは、維管束の連結パターンに従って特定の葉に伝播し、 Ca^{2+} シグナルが伝播した葉では、JA 合成や抵抗性遺伝子が発現していることが分かった。維管束師部特異的プロモーターを用いた師管内の Ca^{2+} イメージングを行ったところ、この Ca^{2+} シグナルは師管を伝播していることがわかった。さらに、プラズモデスマータに異常がある変異体の Ca^{2+} シグナルを解析したところ、伝播速度が遅くなることから、 Ca^{2+} シグナルはプラズモデスマータを介して細胞—細胞間を伝播することが示唆された。次に、植物がどのように自分が傷つけられたことを感受するのかを調べた。グルタミン酸受容体を欠

損じた変異体では、傷害応答性・長距離・高速 Ca^{2+} シグナルが起こらないことがわかった。さらに、野生型の葉に、細胞外からグルタミン酸を投与すると長距離・高速 Ca^{2+} シグナルを引きこせることから、シロイヌナズナにおいて、グルタミン酸が葉の傷害シグナルであり、グルタミン酸受容体が傷害ストレスを Ca^{2+} シグナルに変換する分子実態、すなわち傷害センサーであることが示唆された。

(2)ケミカルスクリーニング

目標

抵抗性誘導剤とは、植物に備わっている防御応答機構を活性化させることで抵抗性を上げる薬剤であり、病害虫に作用しない。そのため耐性菌などを生じるリスクは殆ど無く、環境への負荷が少ない。しかし、従来のスクリーニング法では効果試験に数ヶ月要するなど、日本では数種類しか認可されていない。

これまでの研究結果から、 Ca^{2+} が全身獲得抵抗性に重要であることが明らかになっている。つまり、 Ca^{2+} シグナルを指標にしたケミカルスクリーニング法を開発できれば、 Ca^{2+} シグナルを制御する化合物、すなわち新しい抵抗性誘導剤が単離できる可能性がある。本研究では、高感度 Ca^{2+} バイオセンサーおよびマイクロプレートリーダーを用いたリアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法を構築し、新規抵抗性誘導剤の開発に挑む。

結果

高感度 Ca^{2+} バイオセンサーおよび全自動蛍光マイクロプレートリーダーを用いてリアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法を開発した。96穴プレート内に Ca^{2+} バイオセンサーを発現させたシロイヌナズナを栽培し、自動ピペットシステムで化合物を投与しながら、 Ca^{2+} シグナルを同時測定する。1時間に96種類の化合物をスクリーニングできることから、従来の表現型を観察するスクリーニング法に比べて、飛躍的に高速化できたとと言える。

ウイスコンシン大学(マディソン校)が所有している低分子化合物ライブラリー(約51000化合物)を用いて大規模スクリーニングを行ったところ、 Ca^{2+} シグナルを制御する数十種類の化合物が単離された。その内、数種類はイオンチャネルやトランスポーターに作用する薬剤に類似したものが含まれていることから、細胞膜のイオン性シグナルに関与する因子を標的としたスクリーニングが成功していると言える。最終的なヒット率は0.1%以下であったことから、良好なスクリーニング法が確立できたと考えている。

(1)の研究結果から、細胞外から投与したグルタミン酸が全身性の長距離・高速 Ca^{2+} シグナルを引き起こし、その後、葉の抵抗性を上昇させることが明らかになっている。しかし、グルタミン酸は葉の表面からの透過率が低いため、そのままの形では投与しづらい。そこで、ケミカルスクリーニングと平行してグルタミン酸を鑄型にしたスクリーニングも行っている。メチル基やベンジル基などを付加したグルタミン酸の生理活性を調べたところ、残念ながら現段階でグルタミン酸よりも活性が高い化合物は見つかっていない。アミノ酸型の抵抗性誘導剤の開発には受容体との結合力と透過性のバランスを考慮する必要がある。

(3)CO₂応答

目標

植物は大気中の CO₂ 濃度変化を感受し、気孔を開閉させるなどの様々な生理学的反応を示す。しかし、どの組織や細胞が CO₂ 濃度を感受し、どのようなシグナルに変換するのか明らかになっていない。本研究は、Ca²⁺が CO₂ 応答の主要シグナル分子であるという仮説に立ち、CO₂ 応答性 Ca²⁺シグナルを個体(全身)レベルで研究する。

結果

顕微鏡対物レンズ下でガス交換ができる特殊なチャンバーを、3D プリンターおよびガスを透過しない樹脂を用いて作製した。この特殊チャンバーと高視野蛍光顕微鏡を用いて CO₂ 応答性 Ca²⁺シグナルを可視化したところ、CO₂ 濃度が上昇していくと共に葉(主に孔辺細胞)の Ca²⁺ 上昇が起こることがわかった。これまでに、孔辺細胞内の Ca²⁺ 上昇が気孔の閉合運動に関与することが示唆されていることから、CO₂ の初期応答を観察している可能性が高い。CO₂ 濃度が上昇した時に、孔辺細胞内の Ca²⁺ 濃度が上昇することで気孔を閉じ、過剰な取り込みを防いでいるのかもしれない。

3. 今後の展開

(1)全身抵抗性

長距離・高速 Ca²⁺シグナルの発生・伝播メカニズムは明らかになりつつあるが、この Ca²⁺シグナルがどのように抵抗性を上げるのかは明らかになっていない。Ca²⁺シグナルのターゲット因子として Ca²⁺依存性酵素や転写因子を探索し、全身獲得抵抗性の全体像を解明する。

(2)ケミカルスクリーニング

リアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法で単離された候補化合物が、生理学的にどのような役割を持つのかを、マーカー遺伝子の発現やホルモンの合成量を調べることで明らかにしたい。これらの結果に基づき、さらに候補を絞り込み、それをリード化合物として活性を上げるような化合物を合成したいと考えている。

(3)CO₂ 応答

局所的な CO₂ 濃度変化が、遠く離れた器官の生理学的反応(気孔の開閉や気孔の密度)を変化させることが知られている。現在、個体レベルでの CO₂ 応答を観察しているが、局所的な CO₂ 濃度変化に対してどのような全身性 Ca²⁺ 応答を見せるのか明らかにしたい。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

本プロジェクトは 3 つの大きな研究テーマによって構成されている。以下、それぞれの項目に対して自己評価を記載する。

(1)全身抵抗性

研究としては予想以上に進展したと考えている。特に、全身獲得抵抗性の初期応答である傷害感受機構に関しては、植物の傷害シグナルおよび傷害センサーの同定できたことから、最も主要な部分は解明できたと思われる。今後は、Ca²⁺シグナルがどのように遠方の器官で抵抗性を上げるのか、そのターゲット因子を確定させていきたいと考えている。研究費の執行に関しても、本研究に必要不可欠であった高視野蛍光顕微鏡を 1~2 年目に導入し、この装置を用いてほぼすべてのデータを取得したことから、適切であったと言える。また、塩ストレス応

答ではあるが、長距離 Ca^{2+} シグナルに関して PNAS に発表できたことは評価できると思う。しかし、本プロジェクトの本体である傷害応答性・長距離・高速 Ca^{2+} シグナルの論文が、未だに受理されていないので、一刻も早く論文として形にしなくてはならないと考えている。

(2)ケミカルスクリーニング

このケミカルスクリーニング法は、大量の化合物をリアルタイムかつ高速に単離できるシステムとして、本プロジェクト期間内に開発されたものである。 Ca^{2+} シグナルを指標にすることで、従来の表現型を観察するスクリーニング法に比べて、格段に短時間で化合物をスクリーニングできるようになった。このような新しいスクリーニング法が確立できたことは評価に値する。また、ウィスコンシン大学のケミカルライブラリーから数十種類の候補化合物を単離できたことも重要な結果である。これらの候補化合物の中には、構造がイオンチャンネルに作用するような薬剤に類似しているものを含まれることから、研究としては期待通りの方向へと向かっていると考えられる。しかし、当初の目的であった植物本来の抵抗性を上昇させる環境低負荷型・新規制御剤の開発には至っておらず、今後の更なる研究が必要である。

(3)CO₂ 応答

二酸化炭素資源化を目指す上で、植物がどのように CO_2 の濃度変化に応答するのかを明らかにする必要があると考え、3 年目から本研究をスタートさせた。本研究の難所は、顕微鏡下でいかに正確に気体濃度を制御するのか、ということであり、チャンバー作りに時間が割かれた。最終的には 3D プリンターや特殊な樹脂を使うことで、チャンバーを完成させ、 CO_2 濃度依存的な Ca^{2+} シグナルの可視化に成功した。全身性の Ca^{2+} シグナルを捉えたことは評価に値するが、サイエンティフィックにはデータが未熟であり、今後は二酸化炭素を取り込む孔辺細胞でのイメージングや、変異体の解析などが必要である。

総評

全体としては概ね順調に研究は進んだと思われる。しかし、最終年度は 2 回の人事異動があり、アメリカからの機器の移動や新しい研究室の立ち上げなどで、研究に使える時間が殆ど確保できなかった。そのため、追いつけの大切な時期に研究を加速できなかったことが、上記の課題が残った原因の 1 つだと考えている。3 月末までの期間を有効に使い、少しでも目標達成に近づけるように努力したい。

(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)

豊田氏は、本研究において、全身性長距離・高速カルシウムシグナルの伝達機構及び全身獲得抵抗性を解明し、ケミカルスクリーニング法の開発を目的とした。研究の過程で、豊田氏はカルシウムシグナルの長距離伝播を可視化する技術を開発し、またケミカルスクリーニングシステムも開発した。更に、これらを利用して、グルタミン酸受容体が関与する膜電位反応がカルシウムシグナリングの初発となることを発見し、そのシグナルが篩部を通じて伝播することを明らかにした。この成果は植物における長距離情報シグナル伝達研究に大きなインパクトをもたらすと評価される。一方、そのメカニズムの詳細な解明は今後に残されており、病害虫による被害の解決につながる大きな成果に発展することを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

論文

1. Nakamura M, **Toyota M**, Tasaka M, Morita MT (2015) Live cell imaging of cytoskeletal and organelle dynamics in gravity-sensing cells in plant gravitropism. *Methods in Molecular Biology* 1309:57-69.
2. **Toyota M**, Ikeda N, Tasaka M, Morita MT (2014) Centrifuge microscopy to analyze the sedimentary movements of amyloplasts. *Bio-protocol* 4:e1229.
3. Tatsumi H, **Toyota M**, Furuichi T, Sokabe M (2014) Calcium mobilizations in response to changes in the gravity vector in Arabidopsis seedlings: Possible cellular mechanisms. *Plant Signaling & Behavior* 9:e29099.
4. Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi WG, **Toyota M**, Devireddy AR, Mittler R (2014) A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science* 19:623-630.
5. Choi WG, **Toyota M**, Kim SH, Hilleary R, Gilroy S (2014) Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:6497-6502.

(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)

主要な学会発表(シンポジウム、招待講演のみ)

1. **Toyota M**, Gilroy S (2016) Molecular mechanisms underlying wound-induced rapid systemic calcium signaling. *Plant Biology 2016 (American Society of Plant Biologist)*:July 12, Austin, TX, USA.
2. **Toyota M**, Gilroy S (2015) Mechanical wounding/insect attack-induced, long-distance, rapid calcium signal transduction in plants. *The 53rd Biophysical Society of Japan Annual Meeting*:Sep 13, Kanazawa, Japan.
3. **Toyota M**, Gilroy S (2015) Visualization of plant-wide rapid calcium signals underlying systemic resistance responses *The 56th Japanese Society of Plant Physiologists Annual Meeting* March 16-18, Tokyo, Japan.
4. **Toyota M**, Gilroy S (2014) Mechanical wounding/herbivore attack-induced, long-distance, rapid Ca²⁺ signal transduction via the phloem. *The 38th Naito Conference "Molecule-based biological systems"*:Oct 7-10, Sapporo, Japan.
5. **Toyota M**, Gilroy S (2014) Wound-induced rapid systemic Ca²⁺ transmission through the phloem. *Keystone Symposia "Plant Signaling: Dynamic Properties"*:Feb 6, Breckenridge, CO, USA.

受賞

1. 2014年2月 Keystone Symposia Future of Science Fund Scholarship (USA)
2. 2014年10月 第38回内藤コンファレンス・ベストポスター賞 (Japan)
3. 2015年9月 日本生物物理学会若手奨励賞 (Japan)

著書

1. **豊田正嗣 (2015)** 第10章「重力感知のメカノバイオロジーⅢ:植物細胞」. メカノバイオロジー: 細胞が力を感じ応答する仕組み (DOJIN BIOSCIENCE SERIES) (曾我部正博編) 化学同人:pp. 125-139.
2. Kato T, **Toyota M**, Tasaka M, Morita MT (2014) Chapter 1: Mini-History of Map-Based Cloning in Arabidopsis. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology, ed Shavrukov Y (*Nova Science Publishers, Inc., New York, USA*), pp 1-20.

採用

1. 2016年6月 名古屋大学高等研究院 S-YLC 特任助教
2. 2016年10月 埼玉大学理工学研究科テニュアトラック准教授

研究報告書

「光環境に応じた光呼吸の新規適応機構の解明とその改変による植物生産性の向上」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 松下 智直

1. 研究のねらい

光呼吸は、Rubisco のオキシゲナーゼ活性により生じた 2-ホスホグリコール酸(2PG)などの有害な産物を代謝し、その炭素をカルビン回路へと戻すための経路として、大気条件下での植物の生存に不可欠な反応である。しかしこの反応にはエネルギーと還元力の消費が伴うため、様々な環境の変化に応じて厳密にコントロールされる必要があるが、その制御機構の多くは不明である。

グリセリン酸キナーゼ(GLYK)は、光呼吸の最終ステップである、グリセリン酸(Glycerate)から 3-ホスホグリセリン酸(3PGA)への変換を触媒する、光呼吸に必須の酵素であり、その欠損株では光呼吸回路が完全に停止し、有毒な 2PG が蓄積するなどして致死となる。

これまで、GLYK の細胞内局在は葉緑体内のみに限られると考えられてきたが、我々はこれまでの研究により、シロイヌナズナにおいて、暗所や日陰など条件において、GLYK が細胞質にも現れることを発見した。

本研究では、光呼吸における細胞質局在型 GLYK の生理機能、ならびに、それが日陰などの光環境で発現することの生理学的意義を解析することで、GLYK の細胞内局在制御を介した光呼吸の新規適応機構を明らかにする。そして、その改変により、光呼吸経路を人為的に制御し、光呼吸による二酸化炭素固定速度の低下を防ぐことで、植物生産性の向上をねらう。

2. 研究成果

(1) 概要

我々はこれまでに、シロイヌナズナを用いた順遺伝学的解析から、フィトクロムのシグナル伝達におけるポジティブレギュレーターとして、新奇の選択的スプライシング制御因子である RRC1 を同定していた。この結果から、フィトクロムが、RRC1 を介して光シグナル依存的に選択的スプライシング制御を行うことで、光応答を引き起こしているという可能性が示唆された。そこで我々は mRNA-seq 解析を行い、その結果、フィトクロムが転写制御に加えて、それとほぼ同じ規模でゲノムワイドに選択的スプライシング制御も行うことで、光シグナルを伝達することを明らかにした(Shikata et al., PNAS 2014)。そして、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子の1つであるグリセリン酸キナーゼ(GLYK)は、光呼吸に必須の酵素であり、これまででもっぱら葉緑体のみに局在し、光呼吸の最終ステップであるグリセリン酸から 3-ホスホグリセリン酸への変換を触媒すると考えられてきた。しかしながら我々は、フィトクロム活性が低下する日陰の条件において、GLYK が細胞質にも現れ、それが光呼吸の細胞質

バイパス経路を構成することで、変動光条件における光阻害を低減させることを明らかにした。他の植物の日陰では、木漏れ日による変動光に晒される危険性が高まると考えられるため、植物は、日陰条件をフィトクロムにより感知し、GLYK の選択的スプライシングパターンを制御して細胞質型 GLYK を発現することで、変動光による光阻害に備えていると考えられる。以上のように、本研究の結果我々は、GLYK の細胞内局在制御を介した光呼吸の新規適応機構を明らかにすることに成功した。

(2) 詳細

フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子をシロイヌナズナのゲノム内で網羅的に同定する目的で、次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq を行い、フィトクロムシグナル依存的にスプライシングパターンを変化させる遺伝子をゲノムワイドに解析した。その結果、シロイヌナズナゲノム内にて、1000 を超える遺伝子が、定常状態での mRNA 量を変化させることなく、その選択的スプライシングパターンを、フィトクロム依存的に、赤色光に応じて 1 時間以内に素早く変化させることが明らかとなった。さらに、Gene Ontology 解析を行った結果、フィトクロムによる転写制御の主な早期標的遺伝子が、過去の報告通り転写因子であるのに対して、フィトクロムによる選択的スプライシング制御を赤色光照射後 1 時間以内に受ける主な遺伝子は RNA スプライシング関連遺伝子であることが明らかとなった。これらの結果から、フィトクロムは、赤色光受容後 1 時間以内に、転写因子遺伝子に対して転写制御を、そして RNA スプライシング関連因子遺伝子に対して選択的スプライシング制御を、それぞれ別々に行うことで、赤色光に応じた転写カスケードと選択的スプライシングカスケードをゲノムワイドに誘導するというモデルが示唆された(Shikata et al., PNAS 2014)。そしてこの研究の結果、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子の1つとして、グリセリン酸キナーゼ(GLYK)が同定された。

GLYK は、光呼吸に必須の酵素であり、これまでもっぱら葉緑体のみに局在し、光呼吸の最終ステップであるグリセリン酸から 3-ホスホグリセリン酸への変換を触媒すると考えられてきた。しかしながら我々は、フィトクロム活性が低下する日陰の条件において、GLYK 遺伝子の選択的スプライシングパターンが変化することで、N 末端のプラスチド移行シグナルを失った細胞質局在型の GLYK が発現することを明らかにした。

次に、細胞質局在型 GLYK の機能を調べるために、GLYK のプロモーター領域とコーディング領域のいずれをも含むゲノム DNA 断片の 3' 末端に、GFP 遺伝子を融合させ、それを *glyk* 変異体に導入した gGLYK-GFP 形質転換植物を作製した。さらに、gGLYK-GFP 形質転換植物と同様に *glyk* 変異体背景で、葉緑体局在型 GLYK(以後 ptGLYK)もしくは細胞質局在型 GLYK(以後 cytGLYK)のみを発現する ptGLYK-GFP 形質転換植物もしくは cytGLYK-GFP 形質転換植物も作製し、それらの表現型を詳細に観察した。その結果、日陰条件で発現する cytGLYK が、光呼吸回路における細胞質バイパス経路を構成することで、変動光条件における光阻害を低減させることを明らかにした。他の植物の日陰では、木漏れ日による変動光に晒される危険性が高まると考えられるため、植物は、日陰条件をフィトクロムにより感知し、GLYK の選択的スプライシングパターンを制御して cytGLYK を発現することで、変動光による光阻害に備えているのではないかと考えられた。

以上のように、本研究の結果我々は、GLYK の細胞内局在制御を介した、光呼吸の光環境に応じた新規適応機構を明らかにすることに成功した。

3. 今後の展開

本研究で発見した事実は、植物のみならず、ありとあらゆる真核生物において普遍的に存在する機構である可能性が高く、今後この分子機構の詳細を解明することで、自然科学における一分野を新たに開拓することが可能になると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究の目的は、タイトルにある通り、「光環境に応じた光呼吸の新規適応機構を解明し、その改変によって植物生産性の向上を図る」ことであった。そのうちの前半部分に関しては、目標を達成することができたと思う。しかしそれを達成する過程で、思いがけない大きな発見に恵まれ、その内容を解明し論文として報告するために、残りの研究期間が費やされてしまった。そのため、本来の目的の後半分は達成することができなかったが、この判断は正しかったと考えており、総じて、予想を遥かに上回る成果が得られたものと評価する。

平成 24 年 10 月に現研究機関にてテニュアを獲得し、学生の指導教官となる資格を得た。しかしながら、現在に至るまで、学部学生に対して教育する権利が与えられておらず、今後も学生の配属は全く期待できない。従って、マンパワーの面で十分な国際的競争力を得るためには、実験補助員の雇用が不可欠であり、そのために、本研究費の大部分が人件費として有効に利用された。そしてその結果、学生の全くいない状況にもかかわらず、実験補助員 2 名と私の合計 3 名体制で研究を進め、これだけの成果を挙げられたことに関しては、極めて高いコストパフォーマンスを発揮できたものとする。またその際には、本さきがけ研究領域内において、素晴らしい共同研究者の数々に恵まれたことが、成功の大きな要因であった。ここで築き上げた共同研究者との絆は、今後の研究生涯に渡っての最大の財産になるものと確信する。

本研究で発見した事実は、植物のみならず、ありとあらゆる真核生物において普遍的に存在する機構である可能性が高く、今後この分子機構の詳細を解明することで、あらゆる事象の生物反応の人為的制御に繋がるという応用面での波及効果にとどまらず、科学における一分野を新たに開拓し、さらにその成果は科学的啓蒙という観点からも社会・国民に広く還元されるべきものと考えられる。

(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)

光合成による二酸化炭素固定速度を低下させる光呼吸について、松下氏が自ら発見した光環境変化に対する新たな適応機構を解明し、その改変により植物生産性を向上させることを目的に研究がすすめられた。その結果、フィトクロームシグナルに由来する一連の遺伝子群の選択的転写開始点制御現象を見出し、光呼吸経路のキー酵素であるグリセリン酸キナーゼの細胞内局在が変化することを明らかにした。また領域内のネットワークを活かし、多く

の共同研究により研究を推進した点も評価できる。今後、グリセリン酸キナーゼの葉緑体と細胞質の二重局在性の現象とその生理的意義の解明という、本研究の骨子の部分についてさらに研究を発展させ、早急に論文として取りまとめていくことを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shikata, H., Hanada, K., Ushijima, T., Nakashima, M., Suzuki, Y. and Matsushita, T. (2014)
Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 18781–18786.

(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)

<国際学会での招待講演>

1. Tomonao Matsushita

“Light-dependent control of gene expression by phytochrome”

2016 Plant Science Annual Meeting and Symposium, Taiwan Society of Plant Biologists (Taichung, Taiwan, November 2016)

2. Tomonao Matsushita

“Molecular mechanism of phytochrome signal transduction in higher plants”

7th Asia and Oceania Conference on Photobiology (Taipei, Taiwan, November 2015)

3. Tomonao Matsushita

“Light-dependent dual regulation of gene expression by phytochrome”

2015 International Symposium on Plant Sciences & the Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists (Daejeon, Korea, November 2015)

4. Tomonao Matsushita

“Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*”

The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing (Tokyo, Japan, March 2015)

5. Tomonao Matsushita

“Phytochrome controls alternative splicing in *Arabidopsis*”

Academia Sinica Institutional Seminar (Taipei, Taiwan, February 2014)

6. Tomonao Matsushita

“Phytochrome regulates alternative splicing in *Arabidopsis*”

Korean Society of Photoscience, Plant Photobiology Colloquium 2013 (KAIST, Daejeon, Korea, November 2013)

7. Tomonao Matsushita

“Phytochrome regulates alternative splicing in Arabidopsis”

The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology (Sydney, Australia, November 2013)

<国際学会での受賞>

1. Tomonao Matsushita

“Molecular mechanism of phytochrome signal transduction in higher plants”

Asia and Oceania Society for Photobiology (AOSP) Award for Young Scientist (2015)

<プレスリリース等>

1. 松下智直

毎日新聞(朝)2014年12月16日「植物光応答遺伝子1505個」

研究報告書

「木質バイオマスの全炭素成分有効利用を目指した触媒化学変換技術の開拓」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 山口 有朋

1. 研究のねらい

二酸化炭素排出量削減や化石資源の枯渇・価格の高騰に対応した循環型社会構築のために、再生可能資源から有用物質の製造が世界的に求められている。特にバイオマスは炭素資源であり、現在化石資源から作られているプラスチックの代替化学品を製造可能なことからバイオマスの利活用技術の開発が求められている。また、食物との競合を避けるために非可食性バイオマスであるリグノセルロース(木質バイオマス)から有用物質に変換する技術開発が重要である。リグノセルロースは、セルロース・ヘミセルロース・リグニンから成り立ち、それぞれを全く変性させずに分離することは困難である。本研究では、木質バイオマスを反応物として利用し、セルロース・ヘミセルロース・リグニンのすべての炭素成分からプラスチックや医薬品の原料を製造する触媒化学変換技術の確立を目指した。木質バイオマスの全炭素成分をバイオプラスチック原料へと変換可能になり、植物が成長の際取り込んだすべての二酸化炭素を資源化することが可能となる。

セルロース・ヘミセルロースは、多糖類であり、加水分解(糖化)による糖を経由した有用化学物質への変換反応が報告されている。一方、リグニンは芳香族化合物がランダムに重合した高分子であるが、分解による有用化合物製造は現状では非常に難度が高い。本研究では木質バイオマスの成分を分離する前処理過程を省き、固体触媒を用い木質バイオマスを反応物として反応条件を逐次的に変えて変換反応を行い、すべての炭素成分を有用物質へ変換することを目指した。セルロース・ヘミセルロースから糖アルコール、さらにリグニンから芳香族化合物への変換反応を多段階の反応条件で行い、木質バイオマスを有用物質へ変換する触媒反応技術の開発を検討した。さらにリグニン分解反応後には、固体触媒のみを固体として回収し、触媒の再利用を検討した。

2. 研究成果

(1) 概要

木質バイオマスを反応物として、まず木質バイオマスに含まれるセルロースおよびヘミセルロースを糖アルコールに変換することを検討した。スギに炭素担持白金触媒(Pt/C)と水素を加え、反応温度 190 °Cで反応させることにより、ソルビトールやキシリトールなどの糖アルコールに変換可能であることを明らかにした(論文1)。固体残渣として、担持金属触媒とリグニンが残存した。本反応系は、ユーカリやバガスにも適用できることを見出した(論文3)。得られたソルビトールやマンニトールは、高温にすることにより、酸を添加せずに、機能性高分子原料となるイソソルビドやイソマンニドへ変換可能であることを明らかにした(論文2、論文4)。

リグニンのモデル化合物としてジフェニルエーテルやベンジルフェニルエーテルを利用して、

担持金属触媒を用い 400 °Cで反応させることによりエーテル結合の水素化分解反応による切断が可能であることを見出した。

スギに含まれるセルロースおよびヘミセルロースを糖アルコールに変換後の固体残渣(主に担持金属触媒とリグニン)を 400 °Cで処理することにより、リグニンの分解反応が進行し、ベンゼン、フェノール、トルエン、エチルベンゼンなどが得られた(特許1)。固体として担持金属触媒のみが残存し、この触媒は、再び木質バイオマスの変換反応に同等の活性を示し、再利用可能であることが分かった。

以上の結果をまとめると、担持金属触媒を利用し、木質バイオマスに含まれるセルロース・ヘミセルロースは糖アルコールに変換し、リグニンは芳香族化合物に変換可能であることを見出した。

(2) 詳細

・テーマ A 「セルロース・ヘミセルロースの水素化分解反応」

本研究の最終目標である、木質バイオマスそのものを反応物としてセルロース・ヘミセルロース・リグニンのすべてを逐次的に有用化学物質に変換する(図 1)ために、まず、テーマ A として多糖類であるセルロース・ヘミセルロースの水素化分解反応による糖アルコール生成を検討した(図 1 Step 1)。

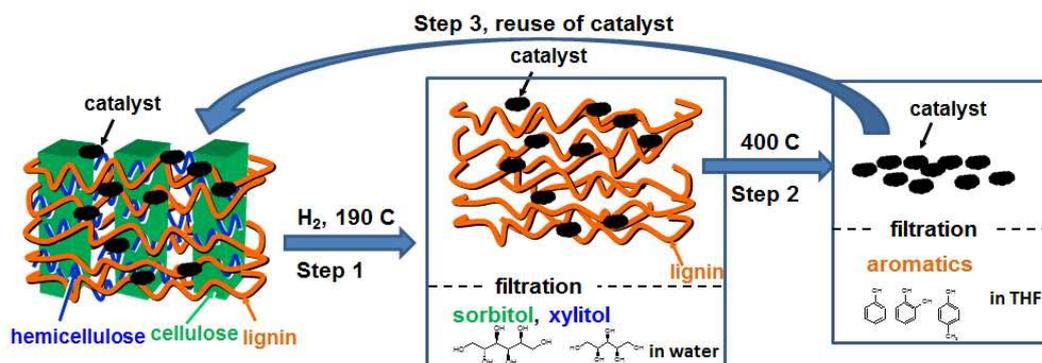


図1 木質バイオマスの全炭素成分有効利用

従来、セルロースを反応物として、水素化分解反応によるソルビトール生成が報告されているが、本研究では、スギ(針葉樹)を反応物として、スギに含まれるセルロースおよびヘミセルロースを糖アルコールに変換することを検討した。反応温度 190 °Cで炭素担持白金触媒(Pt/C)と水素を用いることにより、収率62%でソルビトールやキシリトールなどの糖アルコールに変換可能であることを明らかにした(収率は元のバイオマスに含まれている糖を基準に計算)(論文1)。ユーカリ(広葉樹)、バガス(草本)を反応物としても、同様に糖アルコールへの変換反応が可能であることを明らかにした(論文3)。本反応後の固体残渣には、担持金属触媒とリグニンが残存することを見出した。

また、得られた糖アルコールをより高付加価値な有用化学物質へ変換するために、ソルビトールやマンニトールの糖アルコールの脱水反応を行った。糖アルコールの水溶液を250 °C程度の高温にすることにより、酸を添加せずに、機能性高分子原料となるイソソルビドやイソマ

ンニドへ変換可能であることを明らかにした(論文2、論文4)。

・テーマ B 「リグニンの分解反応」

リグニンは、芳香族化合物がランダムに重合した高分子である。リグニンの分解反応を実現するために、ジフェニルエーテルやベンジルフェニルエーテルをリグニンのモデル化合物として選定し、その分解反応を検討した。最終目標である木質バイオマスの全炭素成分有効利用を実現するために、リグニン分解反応の触媒として、セルロース・ヘミセルロースの水素化分解反応にも活性を示す Pt/C などの担持金属触媒を用いた。水を反応溶媒として、ジフェニルエーテル、担持金属触媒を 400 °C で処理すると、水素ガスを添加していないにもかかわらず、エーテル結合で水素化分解反応が起こり、フェノールとベンゼンの生成が進行することを見出した。水素ガスを利用して、均一系触媒あるいは不均一系触媒でリグニンモデル化合物中のエーテル結合の水素化分解反応による切断は報告されているが、本研究では水素ガスを導入しない水素化分解反応であり応用面でも興味深い。用いる担持金属触媒の金属種により生成物の分布が異なることが分かり、リグニン分解反応へ応用できる可能性を提示した。

・テーマ C 「木質バイオマスの全炭素成分変換反応」

スギを反応物として、スギに含まれるセルロースおよびヘミセルロースを糖アルコールに変換(テーマ A、図 1 Step 1)した後の固体残渣として、担持金属触媒とリグニンが残存する。また、テーマ B においてリグニンモデル化合物と担持金属触媒を用いて、リグニンモデル化合物の分解が進行する反応条件を見出した。そこで、テーマ A の固体残渣(担持金属触媒とリグニンを)、テーマ B で見出した反応条件(400 °C)で処理することにより、リグニンの分解反応を検討した(図 1 Step 2)。反応後の反応容器内物を有機溶媒で回収・ろ過すると、固体として担持金属触媒のみが残存することが分かった。つまり、リグニンの分解反応が進行し、有機溶媒にほぼすべて溶解した。有機溶媒中のリグニンからの生成物として、ベンゼン、フェノール、トルエン、エチルベンゼンなどが得られた(特許1)。スギに含まれるセルロース・ヘミセルロースは糖アルコールに変換し、リグニンは芳香族化合物に変換可能であることを見出した。

リグニン分解反応後に回収した担持金属触媒が再利用可能であるか検討した(図 1 Step 3)。回収した担持金属触媒に新たにスギを導入して、再び 190 °C でセルロース・ヘミセルロースの水素化分解反応を行い、触媒が再利用可能であることが分かった。

3. 今後の展開

本研究により、担持金属触媒を用いて、木質バイオマスのセルロース・ヘミセルロースから糖アルコール、さらにリグニンから芳香族化合物への変換反応を多段階で実現できることを見出した。さらに担持金属触媒は再利用可能であることが分かった。本研究で実施した実験室レベルの反応系では非常に興味深い結果が得られたが、非常に小スケール(グラム単位)で実施したものである。本技術を社会実装に結び付けるためには、生成物の単価と製造コストを考慮した上で、どのようなプロセスでスケールアップが可能であることを明確にする必要がある。また、本研究では、木質バイオマスの前処理としてボールミルを使用した。より低コストで大量のバイオマスの前処理が実現できる手法の開発も必須である。

汎用基礎化学品より高付加価値な機能性高分子原料が製造可能となれば、バイオマスを利用した新化学産業創出の実現が近づく。高分子合成の専門家と連携して、木質バイオマスから製造可能な化学物質を選定し、その化学物質製造の選択性・収率向上へ向けた取り組みが必要である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

木質バイオマスの全炭素成分を有用化学物質に変換することを目的に研究を開始し、本研究では、セルロース・ヘミセルロースから糖アルコール、さらにリグニンから芳香族化合物への変換反応を逐次的に実施できることを明らかにした。さらに触媒の再利用も可能であり、当初の目的はおおむね達成したと考えている。セルロース・ヘミセルロースの水素化分解反応においては、様々なバイオマスで収率 70%を超える糖アルコールの生成に成功した。リグニンの分解反応においては、リグニンのモデル化合物を用いた分解反応を実施し、水素を添加していないにもかかわらず、水素化分解反応が進行するという科学的にも興味深い現象を見出し、リグニン分解反応に最適な条件を明らかにした。木質バイオマスの全炭素成分変換反応においては、木質バイオマスに含まれるセルロース・ヘミセルロースは糖アルコールに変換し、その残渣中のリグニンは芳香族化合物に変換可能であることを見出し、特許出願を行った。木質バイオマスから、よりフェノール類を選択的に製造する方法も見出し、民間企業との共同研究を開始するに至った。研究レベルでは非常に意義のある結果が得られたと考えるが、今後この研究を実用的な技術として磨く必要がある。

研究実施体制は、学生がいない研究環境の中、研究補助員の雇用により実験がスムーズに進行し、予算がきわめて効率的に利用できた。本さがけ予算で購入した装置は、研究進捗に大いに役に立った。

JST さきがけ SciFoS (Science For Society) 活動に参加する機会をいただき、複数の企業に訪問を行い、自身の研究の社会的な価値を見直すいい機会となった。

本さがけ研究を実施する中で、民間企業との共同研究に至った。新たな木質バイオマスの全炭素成分変換の技術を開発するとともに、社会実装へ向けて全体のプロセス設計を遂行していきたい。

(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)

山口氏は、固体触媒を用いた化学変換により、木質バイオマスの全炭素成分をプラスチック原料などの有用化学物質へと変換する技術の開発を目指して、研究を進めた。その結果、セルロース、ヘミセルロース、リグニンのすべてを2段階の触媒反応プロセスで有用化合物に変換する新しい触媒と反応技術を開発したことは、評価できる。今後は、省エネルギー化、低コスト化に関する開発研究を企業とともに進め、LCAを考慮しても成り立つ合理的な技術としてゆくことを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. A. Yamaguchi, O. Sato, N. Mimura, Y. Hirosaki, H. Kobayashi, A. Fukuoka, M. Shirai, Direct Production of Sugar Alcohols from Wood Chips using Supported Platinum Catalysts in Water, *Catalysis Communications*, 2014, 54, 22–26.
2. A. Yamaguchi, O. Sato, N. Mimura, M. Shirai, Intramolecular Dehydration of Mannitol in High-Temperature Liquid Water without Acid Catalysts, *RSC Advances*, 2014, 4, 45575–45578.
3. A. Yamaguchi, O. Sato, N. Mimura, M. Shirai, Catalytic production of sugar alcohols from lignocellulosic biomass, *Catalysis Today*, 2016, 265, 199–202.
4. A. Yamaguchi, N. Muramatsu, N. Mimura, M. Shirai and O. Sato, Intramolecular dehydration of biomass-derived sugar alcohols in high-temperature water, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19, 2714–2722.
5. A. Yamaguchi, N. Mimura, M. Shirai and O. Sato, Bond Cleavage of Lignin Model Compounds into Aromatic Monomers in Supercritical Water using Supported Metal Catalysts, *Scientific Reports*(受理済)

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発明者: 山口有朋、三村直樹、白井誠之、佐藤 修

発明の名称: 芳香族化合物の製造方法

出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

出願日: 2015/9/8

出願番号: 特願 2015-177078

(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】

山口有朋、木粉から機能性化学品原料を合成する触媒反応、第4回 CSJ 化学フェスタ(東京都江戸川区)、2014年10月15日

山口有朋、植物から有用化学物質への変換反応、触媒学会若手会第26回フレッシュマンゼミナール(東京都新宿区)、2015年5月9日

A. Yamaguchi、Synthesis of Valuable Chemicals from Nonedible Plant、Summer Catalysis Symposia (Toronto, Canada)、2015年6月22日

山口有朋、超臨界水および高温高圧水と触媒の利用による植物から有用化学物質への変換、触媒学会宇都宮地区講演会(栃木県宇都宮市)、2016年1月22日

A.Yamaguchi, Production of valuable chemicals from cellulose, hemicellulose, and lignin in biomass, JPI-KSIEC Joint Symposium in the meeting of Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry (Yeosu, Korea), 2016 年 5 月 3 日

【主要な学会発表】

山口有朋、三村直樹、佐藤 修、日吉範人、白井誠之、高温水反応場と担持金属触媒を利用した木粉の有用化学物質への変換、第 43 回石油・石油化学討論会(福岡県北九州市)、2013 年 11 月 15 日

A. Yamaguchi, O. Sato, N. Mimura, M. Shirai, Production of valuable chemicals from wood chips in high-temperature liquid water, 248th ACS National Meeting (San Francisco, USA), 2014 年 8 月 12 日

A. Yamaguchi, O. Sato, N. Mimura, M. Shirai, Production of Valuable Chemicals from Wood Chips in High-Temperature Liquid Water using Supported Metal Catalysts, 24th North American Catalysis Society Meeting (Pittsburgh, USA), 2015 年 6 月 19 日

山口有朋、三村直樹、白井誠之、佐藤修、木質バイオマスの全成分有効利用、石油学会第 65 回研究発表会(東京都江戸川区)、2016 年 5 月 24 日

A. Yamaguchi, N. Mimura, M. Shirai, O. Sato, Catalytic conversion of nonedible biomass into valuable chemicals using supported metal catalysts, 16th International Congress on Catalysis (ICC 16) (Beijing, China), 2016 年 7 月 4 日

【受賞】

山口有朋、2016 新化学技術研究奨励賞ステップアップ賞(公益社団法人新化学技術推進協会)、2016 年 5 月 27 日

【解説・総説】

山口有朋、植物バイオマスの有用化学物質への変換反応、触媒, 2016, 58, 242-245.

【その他】

石油学会における発表が、注目発表に選出される。

山口有朋、三村直樹、白井誠之、佐藤修、木質バイオマスの全成分有効利用、石油学会第 65 回研究発表会(東京都江戸川区)、2016 年 5 月 24 日

触媒学会誌において優秀論文に選出される。

山口有朋、植物バイオマスの有用化学物質への変換反応、触媒, 2016, 58, 242-245.

植物バイオマスから芳香族化合物合成の研究テーマにおいて、民間企業との共同研究を開始する。(2016年7月から)

掲載論文が、Inside Back Cover に選出される。

A. Yamaguchi, N. Muramatsu, N. Mimura, M. Shirai and O. Sato, Intramolecular dehydration of biomass-derived sugar alcohols in high-temperature water, Physical Chemistry Chemical Physics, 2017, 19, 2714–2722.

研究報告書

「変動する光環境下における光合成制御メカニズムの解明と応用展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 矢守 航

1. 研究のねらい

光合成は植物のバイオマスを決定する非常に重要な代謝である。しかし、地球上で光合成能力が十分に発揮される環境は限られており、様々な環境ストレスが植物の生産性を低下させている。強光下では、過剰な光エネルギーが蓄積して、光阻害が生じる。一方で、弱光下では、光強度が光合成反応を律速する。さらに、植物の受ける光強度は一日を通して常に変動している。個々の葉が置かれた光環境は、晴れ／曇りという天候の影響を直接受ける、また、晴れの日であっても雲の存在や、上部の植物体の葉や茎による相互被陰によって大きく変化する。定常状態下では、光強度と光合成速度との間に一定の関係がある。しかし、葉は光強度の突然変化に応じて、すぐに光合成速度の定常状態に到達することがなく、変動光環境下では、定常状態下での光強度と光合成速度の関係から推定した光合成速度と比べ、光合成速度が著しく低下する。光環境が大きく変動する自然環境を考えると、「変動する光環境下における光合成能力の強化」は、食糧とエネルギー不足および大気 CO₂ 削減などの非常に重要な問題と直結している。

弱光から強光に移したときの光合成速度は、1-2 分の間に急速に上昇し、その後、時間と共にゆっくり光合成速度が上昇する(これを光合成誘導反応と言う)。この際に、1) 電子伝達速度、2) 炭酸固定反応の光活性化、3) 気孔開口の 3 つの要因が光合成を律速すると提案されていたが、その詳細な分子メカニズムについては未解明な点が多かった。そこで本研究課題では、全ての三項目に着目し、変動する光条件下における光合成応答機構を解明すること、また、4) 変動光を利用したハイスループットスクリーニングによって、変動光環境下において光合成制御に働く新奇遺伝子を特定して、自然環境下において植物の光合成効率や生産性を向上するための分子基盤を解明することを研究目的とした。

2. 研究成果

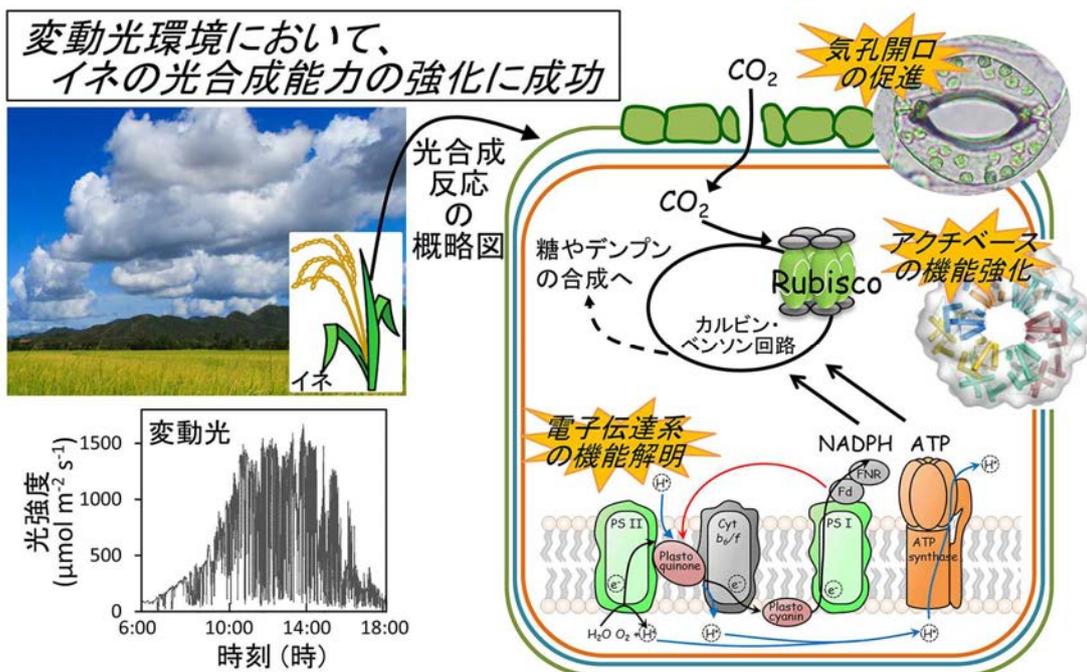
(1) 概要

光合成電子伝達に関わる形質転換体を用いた解析結果から、個葉の光合成能力を強化することによって、植物成長および収量を増加させることが可能であることを示した(原著論文 4)。そこで、光環境が大きく変動する自然環境下における光合成能力の強化を目指し研究を行った。光が葉に照射されると、第一に電子伝達系が駆動してチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配 (ΔpH) が形成され、その際にサイクリック電子伝達経路が ΔpH の形成に重要であることを示した(原著論文 3)。高等植物におけるサイクリック電子伝達には、PGR5 タンパク質と NDH 複合体が関与することが報告されているが、これら二つのサイクリック電子伝達経路が長期的な変動光環境下において重要な役割を果たすことを明らかにし(原著論文 3, 6)、自然環境下における光合成の環境適応能力の強化に向けた分子基盤となった(原著論文 2, 5)。

光照射後の光合成誘導時に電子伝達系が活性化した後、炭酸固定反応を触媒する鍵酵素「Rubisco」の活性化状態が光合成速度を律速することを示した(原著論文 3)。Rubisco 活性化の調節を担うのがアクチベースであると報告されている。そこで、イネにおいてアクチベースの過剰発現体を作製した。アクチベースの過剰発現によって、近未来に予想される高 CO₂ 濃度環境において、変動する光環境下における光合成能力の強化に成功し、最終的に 15%の植物成長の促進につながることを明らかにした(論文投稿準備中)。

さらに、光合成誘導時に気孔が十分に開口していない場合には、炭酸固定が始まると、瞬時に葉内 CO₂ 濃度が減少し、CO₂ 濃度が炭酸固定の大きな律速要因になることを示した(原著論文 3)。また、気孔が開口し続ける *slac1*(sow anion channel1) 欠損変異体イネでは、野生株に比べて、光強度が常に変動する野外環境において、一日を通して高い光合成活性を維持することを明らかにした(論文投稿中)。同様に、気孔が開口し続ける各種シロイヌナズナ変異体/形質転換体を用いた解析結果から、長期的な変動光環境下では、野生株に比べて植物成長が 13~18%促進されることを明らかにした(論文投稿準備中)。

これらの研究成果は、原著論文として国際誌で発表された他、プレスリリースや新聞報道などによっても、一般社会に公開された。

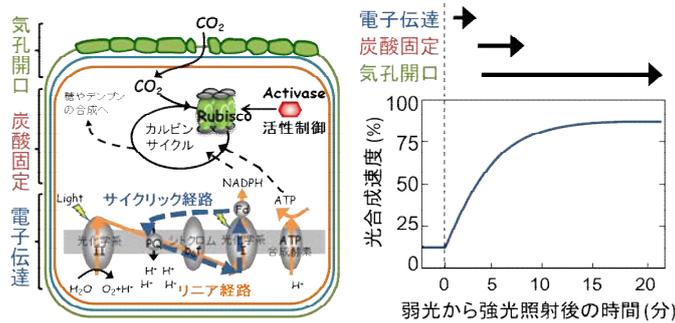


本研究の概要: 変動する光環境下における光合成効率の改善

(2) 詳細

光照射後の光合成誘導には、1) 電子伝達反応、2) 炭酸固定反応(特にRubisco)の活性化、3) 気孔開口、の3つの要因が関わっていることを明らかにしてきた(原著論文 5)。本研究課題では、それぞれの項目において、変動する光環境下における光合成能力の強化を目指した。また、4) 変動光を利用したハイスループットスクリーニングによって、変動光応答に関連する新奇遺伝子を単離し、自然環境下において植物の光合成効率や生産性を向上するための

分子基盤を解明することも研究目標とした。

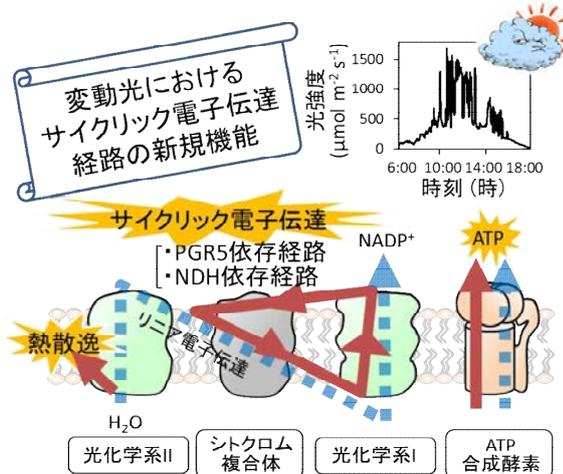


光合成反応の概略図

弱光から強光に移したとき、1) 電子伝達、2) 炭酸固定反応の光活性化、3) 気孔開口の3つの要因が光合成を律速する。

研究テーマ1「電子伝達系の強化による光合成促進」

光合成における電子伝達系はリニア電子伝達系とサイクリック電子伝達系に大別される。特に、サイクリック経路はチラコイド膜内外の ΔH の形成を介して、ATPの供給や過剰エネルギーの熱放散過程を活性化すると報告されている。高等植物では、PGR5タンパク質とNDH複合体の二つがサイクリック電子伝達に関与する(原著論文 2)。本研究課題では、NDH依存経路とPGR5依存経路の発現抑制体イネを用いることによって、二つのサイクリック経路が光照射後の光合成誘導のスターターとして機能し、長期的な変動光環境下においては、過剰エネルギーの散逸によって光障害を軽減する役割があることを明らかにした(原著論文 3)。さらに、弱光と強光を繰り返す変動光環境において、PGR5依存経路は強光下において、また、NDH依存経路は弱光下において重要な役割を果たすことが明らかになり、二つのサイクリック電子伝達において機能が異なる可能性を提案した(原著論文 3, 6)。本研究成果によって、サイクリック経路は変動光環境において光合成制御の中核とも言える役割を果たすことを明らかにし、自然環境下における光合成の環境適応能力の強化に向けた分子基盤となった(原著論文 2, 5)。



研究テーマ2「アクチベースの機能強化による光合成促進」

Rubiscoはカルビン-ベンソン回路において炭酸固定反応を触媒する鍵酵素であり、現在の大气CO₂濃度において光合成を律速すると考えられている。Rubiscoの活性化は、アクチベースという別のタンパク質によって制御されている。先行研究によって、アクチベース量を減少させたタバコやイネの形質転換体では、野生体に比べて、光照射後の光合成誘導時間は遅いことが報告された(Hammond et al. 1998, The Plant Journal; Yamori et al. 2012 The Plant Journal)。そこで、アクチベース量を増加させた形質転換体イネを作製して解析を行ったところ、アクチベース量の増加と共に光照射後の光合成誘導が促進されることを見出した。さらに、アクチベースの過剰発現によって、近未来に予想される高CO₂濃度環境下において、変

動光環境下における光合成能力の促進に成功し、最終的に 15%の植物成長の促進につながることを明らかにした(論文投稿準備中)。

研究テーマ 3「気孔開度の向上による光合成促進」

気孔開度が定常状態における光合成速度および植物成長における制限因子であることは多くの先行研究において示されてきた。しかしながら、気孔開度が変動光環境下における光合成に及ぼす影響については不明瞭な点が多い。近年、気孔分化に関わる因子(たとえば、気孔の数や密度の決定因子である Stomagen; Sugano et al. 2009, Nature)や、気孔開閉を制御するタンパク質(SLAC1; Negi et al. 2008, Nature、PATROL1; Hashimoto-Sugimoto et al. 2013, Nature Communications)が報告されている。そこで、気孔開閉に関与する変異体イネを用いて、気孔開口が変動光環境下における光合成応答に及ぼす影響について解析した。気孔が開口し続ける *slac1*(sow anion channel)欠損変異体イネでは、野生株に比べて、光照射後の光合成誘導が著しく促進されることを見出した。また、*slac1* 欠損変異体イネは野生株に比べて、光強度が常に変動する野外環境において一日を通して高い光合成活性を維持することを示した(論文投稿中)。

さらに、気孔開閉に関連するシロイヌナズナの各種変異体/形質転換体を用いて実験を行った。具体的には、CO₂ や ABA などの気孔閉鎖シグナルに応答せず、常に気孔を開いたままの表現型を示す *slac1* 欠損変異体と *ost1*(open stomata 1)欠損変異体、また、気孔開口に重要な H⁺-ATPase の局在を決定する *patrol1*(proton ATPase translocation control 1)過剰発現体シロイヌナズナを用いた。その結果、気孔開口の改善によって、変動光環境下において光合成能力が強化され、長期的な変動光環境下において、植物成長が 13~18%促進されることを示した(論文投稿準備中)。

研究テーマ 4「変動する光環境下において光合成制御に働く新奇遺伝子の単離」

変動光環境に対する植物の応答機構を分子レベルで解明し、変動する光環境下における光合成能力を増強する目的で、シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異系統集団から大規模な変異体スクリーニングを行った。複数個体の光合成能力を一度に可視化できるイメージング PAM 装置を駆使し、これまでにシロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体の種子 50,000 粒以上のスクリーニングを終え、変動光に感受性を示す個体と耐性を示す変異体を 50 系統以上単離した。候補遺伝子の同定を進めることによって、植物の変動光環境に対する新奇応答機構の解明が可能となる。さらに、それらを基に、光強度が変動する自然環境下において、植物の光合成効率をさらに向上させる技術の開発に着実に貢献できるものと考えられる。

3. 今後の展開

アクチベースの過剰発現や気孔開度の向上によって、変動する光環境下における光合成能力や植物成長の促進に成功した。また、シロイヌナズナにおいては、気孔開口を促進することによって、変動光環境下における光合成能力と植物成長の促進に成功した。これまでの本さきがけ研究では、変動する光合成応答機構の解明を第一の目標にしているため、人工的に作り出した変動光環境において解析を行ってきた。今後は、光強度が常に変動する野外環境

において、これらの植物が高い光合成能力を有するのか、さらには、成長促進につながるのか、明らかにしていきたい。

シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異系統集団から大規模な変異体スクリーニングをおこなうことによって、変動する光環境下において光合成能力が異なる複数の候補株を単離することができた。今後、候補遺伝子の同定を行うことで、変動光環境下における植物の光合成効率を向上させるための分子基盤になると期待できる。また、シロイヌナズナで得られた知見を基に、イネのミュータントパネルから目的遺伝子が破壊された変異体を用いたり、機能強化のために過剰発現することによって、イネにおいて、変動光環境下において高い光合成機能を持つ植物の創出に挑みたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

変動する光環境下における光合成制御メカニズムについては不明な点が多かった。本さがけ研究成果によって、光照射後の光合成誘導には、(1)サイクリック電子伝達による電子伝達系の駆動、(2)アクチベースによる Rubisco 活性化、(3)気孔開口による CO₂ の取り込みのそれぞれが関与することを明らかにすることができた。これらの基盤研究の成果に基づき、変動する光環境下における光合成能力の強化を目指した結果、アクチベースの過剰発現や気孔開度の向上によって、変動する光環境における光合成能力と植物成長の促進に成功した。現在投稿中の論文を除いても、6 報の論文を国際誌に筆頭著者として発表することができた。このように、変動光に対する光合成応答メカニズムの理解に基づいて、光合成や植物成長を促進できたため、本研究課題の当初の目標を達成できたと考えている。

また、シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異系統集団から大規模な変異体スクリーニングを行った結果、変動光環境下において重要な役割を果たす候補遺伝子を複数単離することができた。今後、変動する光環境下における光合成応答メカニズムの全貌解明に向けて更なる研究の発展が期待できると考えている。

(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)

矢守氏は、光環境が大きく変動する自然条件下における光合成反応の仕組みを解明し、その成果に基づき、変動光環境下でも高い光合成機能を持つ植物の創出を目指した。その結果、サイクリック電子伝達経路、気孔開口、Rubisco の活性化の寄与を解析することで、変動光環境下での光合成効率を上昇させる要因として Rubisco アクチベースの発現上昇や気孔開度の上昇を見出した。またこれらインパクトのある成果を積極的に論文として公表し、高い引用数を得ており、高く評価される。今後は、さがけ研究で獲得した多くの変異体を用い、人工気象器内ではなく、野外での実際の光変動下での光合成活性の上昇に向けた研究の加速を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kono M*, <u>Yamori W</u> , Suzuki Y, Terashima I. Photoprotection of PSI by Far-Red Light Against the Fluctuating Light-Induced Photoinhibition in Arabidopsis thaliana and Field-Grown Plants. Plant & Cell Physiology 2016: 58: 35-45.
2. <u>Yamori W*</u> , Shikanai T. Physiological Functions of Cyclic Electron Transport Around Photosystem I in Sustaining Photosynthesis and Plant Growth. Annual Review of Plant Biology 2016: 67: 81-106. Plant & Animal Science 部門で引用数上位 1%(トムソン・ロイター社)
3. <u>Yamori W*</u> , Makino A, Shikanai T. A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. Scientific Reports 2016: 6: 20147. Plant & Animal Science 部門で引用数上位 1%(トムソン・ロイター社)
4. <u>Yamori W*</u> , Kondo E, Sugiura D, Suzuki Y, Terashima I, Suzuki Y, Makino A. Enhanced leaf photosynthesis as a target to increase grain yield: Insights from transgenic rice lines with variable Rieske FeS protein content in the Cytochrome b6/f complex. Plant, Cell & Environment 2016: 39: 80-87. Plant & Animal Science 部門で引用数上位 1%(トムソン・ロイター社)
5. <u>Yamori W*</u> . Photosynthetic response to fluctuating environments and photoprotective strategies under abiotic stress. Journal of Plant Research 2016: 129: 379-395.
6. <u>Yamori W*</u> , Shikanai T, Makino A. Photosystem I cyclic electron flow via chloroplast NADH dehydrogenase-like complex performs a physiological role for photosynthesis at low light. Scientific Reports 2015: 5: 13908.

他主要論文4編

(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)

◎主要な学会発表

- | |
|---|
| 1. 木村遼希, 橋本(杉本)美海, 射場厚, 寺島一郎, <u>矢守航</u> . 気孔開度の上昇は光合成誘導反応を短縮する、日本植物生理学会、2017年3月17日 |
| 2. 河野優, <u>矢守航</u> , 鈴木祥弘, 寺島一郎. 遠赤色光による変動光障害に対する PSI 保護機構、日本植物生理学会、2017年3月17日 |
| 3. <u>矢守航</u> . 変動する光環境下における光合成制御機構の解明と応用展開、日本植物学会、2015年9月6日(招待講演) |
| 4. <u>矢守航</u> . 光合成能力の強化に基づくバイオマス生産性の向上に向けた取り組み、静岡生命科学若手フォーラム、2015年9月11日(招待講演) |

5. Chihiro K. Watanabe, Wataru Yamori, Shunichi Takahashi, Ichiro Terashima, Ko Noguchi. Roles of the respiratory system in alleviation of photoinhibition via the photorespiratory system 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (Poland), 2015 年 5 月 17 日～22 日
6. Wataru Yamori. The regulation of photosynthesis under fluctuating light conditions, The 2015 Tokyo Whole Plant Photosynthesis Workshop, 2015 年 5 月 15 日(招待講演)
7. Wataru Yamori, Eri Kondo, Yuji Suzuki, Amane Makino, The close relationship between leaf photosynthesis and crop yield: Analysis of transgenic rice with reduced content of cytochrome b6/f complex, 日本植物生理学会, 2015 年 3 月 18 日
8. Wataru Yamori, Regulation of CO₂ assimilation under a fluctuating light environment, 日本植物学会, 2014 年 9 月 12 日(招待講演)

◎受賞

- ・第 12 回日本農学進歩賞 (2013/11/25)

◎プレスリリース

- ・2015.09.11 「光合成で働くサイクリック電子伝達経路の新たな生理機能を解明～二酸化炭素濃度の削減や食料増産に期待～」(Yamori et al. 2015 Scientific Reports 論文について)
- ・2016.02.02 「変動する光環境から身を守る植物のメカニズムを解明～植物の生産性を向上させる技術開発に貢献～」(Yamori et al. 2016 Scientific Reports 論文について)

◎その他

- ・平成 28 年度 新学術領域研究 (研究領域提案型)の採択
「新光合成: 光エネルギー変換システムの再最適化」
領域代表者: 皆川 純 教授、研究期間: 2016.06.30～2021.03.31