C₃/C₄光合成型相互転換植物 *Eleocharis vivipara* を用いた

C₄光合成を成立させる遺伝子の網羅的探索

原田大士朗¹,坂本智昭²,倉田哲也²,大和勝幸¹,泉井桂³,秋田 求¹ ¹近畿大学大学院・生物理工学研究科,〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930 ²奈良先端大・バイオ・植物グローバル,〒630-0192 奈良県生駒市 高山町 8916-5 ³近畿大学・先端技術総合研究所,〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

Search of the C₄ photosynthesis establishment genes using the C₃/C₄ photosynthesis interconversion plant *Eleocharis vivipara*

Key words: Eleocharis vivipara, next generation sequencer, transcriptome analysis

Daijiro Harada¹, Toshiaki Sakamoto², Tetsuya Kurata², Katsuyuki Yamato¹, Katsura Izui³, Motomu Akita¹

¹Kinki University, Dept. Biotech. Sci. 930, Nishimitani, Kinokawa 649-6493, Japan

²Plant Global Education Project, Nara Institute of Science and Technology. 8916-5, Takayama, Ikoma 630-0192, Japan

³Kinki University, Institute of Advanced Technology Department of Biotechnological Science. 14-1 Akasaka, Kainan 642-0017, Japan

1. はじめに

陸上植物種の9割以上はC₃光合成をおこなうC₃植物であるが、これに対し、約3%程度が C₄光合成をおこなうC₄植物種である。一方で、C₄植物は、陸上植物全体のバイオマス生産 量の約25%を占めると考えられている(Langdale 2011)。C₄植物の炭酸同化能はC₃植物より 個葉レベルで1.5~2倍、栽培面積あたりの生産性でも2~3倍と高く、また水の利用効率も 高い(Black 1973)。これはC₄植物が二酸化炭素(CO₂)を捕集・濃縮し、カルビン・ベンソ ン回路にCO₂を供給するC₄代謝経路をもつことと、種類の異なる細胞(葉肉細胞と維管束鞘 細胞)が機能を分担していることに基づいている。特にこの発達した維管束鞘細胞の周りを 葉肉細胞が取り囲んだ葉内の組織構造は*Kranz*構造と呼ばれ、C₄植物に特徴的である。

 C_3 植物に C_4 光合成代謝経路を獲得させ高い光合成活性を付与させる (C_4 化する) ことで, 作物収量を増加し将来的な食糧危機への打開策にすることが期待されている。この発想を現 実的に進めるために,たとえば C_3 植物のイネにこれまでに同定された C_4 光合成関連酵素の 遺伝子を単独または複数の組み合わせでイネに導入する試みがなされたが, C_4 光合成は駆動 されず収量も増加しなかった (Ku *et al.* 1999, Taniguchi *et al.* 2008)。 C_3 植物を C_4 化するため には主要な C_4 光合成関連酵素の遺伝子を高発現させるだけでなく, C_4 光合成を成立させる全

ての遺伝子を C₃植物で適切に発現させる必要があるのかもしれない。トウモロコシの葉にお いて SCARECROW が *Kranz* 構造の形成に関係しているという報告がなされた (Slewinski *et al.* 2012)。また, *Kranz* 構造の形成には SCARECROW の他に SHORTROOT が関係しており, 複 数の転写因子の制御を受けている可能性が示唆されている (Wang *et al.* 2013)。しかし, SCARECROW や SHORTROOT はシロイヌナズナなどの C₃植物にも存在しており, 転写制御 機構も完全には解明されていない。C₄光合成の成立に必須である遺伝子群の全容はいまだ解 明されているとは言えず, 例えば C₄植物の葉の細胞分化を誘導する遺伝子も完全には解明さ れていない。

すでにゲノムが解明されている C₄植物のトウモロコシやソルガムと C3 植物のイネやシロ イヌナズナなどの遺伝子発現プロファイルを比較することができればよいが,各々の種に特 異的な配列をもつ遺伝子が多く存在するため,C₄特異的遺伝子のみを特定することは困難で ある。この問題を回避するために,C₃光合成とC₄光合成を行う同属の異なる2つの種を用い, 遺伝子の発現パターンを比較するなどの研究が行われてきた。実際,*Flaveria*属の *F. trinervia* や *F. bidentis* (C₄) と *F. pringlei* (C₃) 間や, *Cleome*属の *Tarenaya hassleriana* (C₃) と *Gynandropsis gynandra* (C₄) 間でも遺伝子発現比較解析が行われている (Udo *et al.* 2011, Canan *et al.* 2014)。 しかし,これら種間の比較においてもまだ種固有の遺伝子を排除しきれず,C₄光合成を成立 させる全遺伝子を絞り込むためには課題が残されている。

2. C₃/C₄光合成切り替え植物 Eleocharis vivipara

単子葉植物のカヤツリグサ科には、C₃植物とC₄植物が混在している。この科に属するハリ イ属 (*Eleocharis*) は約200種の湿生植物からなるグループで、数種類のC₄植物を含んでいる。 *E. vivipara* は北米フロリダ州南東部の湿原地帯に自生している。フロリダでの自生植物の採 集と生態調査から、クリークや池の水際に陸生状態、半水生を経て、水深約50 cmの水中に 没した状態まで連続して生育していることが確認された(Ueno *et al.* 1988)。

陸生型は固い直立した葉身(葉肉は退化しており,厳密には稈にあたる)をもっているが, 水生型では糸状の柔らかい葉身をもち,外見的にも大きく異なる。陸生型の葉は,葉緑体や ミトコンドリアを大量に含んだ大型の維管束鞘細胞をもち,その外側を放射状に配列した葉 肉細胞が取り囲む Kranz 構造を示す。これは C4植物に特徴的な葉構造である。一方,水生型 の葉では陸生型と大きく異なり,表皮の内側に大型の発達した葉肉細胞をもち,また維管束 鞘細胞は著しく小型となり,これにはわずかな小型の葉緑体やミトコンドリアしか含まれな い。水生型の葉は典型的な C3植物の葉の構造的特徴を示す。そして E. vivipara は,陸生型に おいては NAD 依存性リンゴ酸酵素 (NAD-ME)型の C4光合成を行い,水生型においては C3 光合成を行うことが見出された (Ueno et al. 1988)。この陸生型と水生型の相互転換には植物 ホルモンが関わっており,水生型の植物にアブシジン酸(ABA)を与えると C4型の葉構造の, 陸生型の植物にジベレリン (GA)を与えると C3型の葉構造の特徴を示すようになる (Ueno 2001)。

Eleocharis 種には *E. vivipara* と同様に水生条件と陸生条件とで形態や生化学的特徴が変化 するものがある。例えば *E. baldwinii* や *E. retroflexa* の環境変化に対する環境応答を観ると,

発現の仕方はそれぞれに異なる。*E. baldwinii* の場合,陸生条件では*E. vivipara* と同じく*Kranz* 構造を形成し、 C_4 光合成を活発に行う。しかし、水生のときは、クランツ構造はとらないも のの維管束鞘細胞には様々なオルガネラが存在する。また、陸生型のときと比べると NAD-ME 活性は減るものの、NADP 依存性リンゴ酸酵素(NADP-ME)活性はわずかながら に増える。実際に¹⁴C pulse-¹²C chase パターンを調査すると水生型のときは C_4 代謝と C_3 代謝 の中間体である事が分かった(Ueno 2001)。このことにより、*E. baldwinii* は水生型のときで も一部 C4 代謝を行っていると考えられる。*E. retroflexa* の場合では、さらに *E. vivipara* とは 発現の仕方が異なり、水中型では、維管束鞘細胞のオルガネラの数は減るものの、クランツ 様構造をとり、 C_4 代謝を行っている。¹⁴C pulse-¹²C chase パターンからも、 C_4 代謝を行ってい た(Ueno 2001)。

このように Eleocharis 種のなかでも C_3 代謝と C_4 代謝の移り変わりの程度が種により異な り、生化学的特徴だけでなく構造的特徴まで C_3/C_4 光合成の相互転換が可能な植物は *E. vivipara* を除いて報告されていない。すなわち *E. vivipara* では、同一ゲノムから生育環境に応 じて C_3 および C_4 光合成の遺伝子が発現するので、両光合成を行っているときの遺伝子発現 を調査する際に「種の違い」を考慮する必要が無く、 C_4 光合成を成立させる遺伝子の網羅的 な解析を行うには格好の材料であると考えた。このことから *E. vivipara* を用いて、 C_3 光合成 から C_4 光合成への代謝変化の過程を調べ、分子機構により切り換わり、その切り換わりに何 が必要とされるかを明らかにするうえで、重要な研究試料となりうると考えられる。

3. E. vivipara を用いた C₄ 光合成成立遺伝子の探索

3-1. 本研究の目的と *E. vivipara* の研究状況

本研究は植物の C_4 化に必要な要件を分子レベルから明らかにしようと考えて始められた。 C_4 光合成に直接関係するもの以外にも C_4 光合成を成立させるために必要な遺伝子があると 考えられる。我々は究極的には, *Kranz* 構造の形成なども含めた C_4 光合成の成立に必要な全 ての遺伝子を C_3 植物に導入することで C_4 化がなされるのではないかと考えている。

現状では C₄光合成の成立に必要な遺伝子の種類や数は完全には解明されていない。これら を見出すためには、示差的な方法による時系列的、網羅的なスクリーニングが必要である。 しかし、極めて興味深い特性を持っているにもかかわらず、*E. vivipara*のゲノム配列情報や 遺伝子発現プロファイルはまだ十分には解明されていない。

以前に E. vivipara の陸生型と水生型における遺伝子発現をサブトラクション解析で調査し たという報告がなされた (Chen et al. 2011)。しかし、この際 E. vivipara とされた植物は、形 態が酷似している E. baldwinii であることが判明し、後に訂正された (Chen et al. 2012)。その 後、次世代シーケンサーを用いた E. baldwinii の陸生型 (C₄) と水生型 (C₃-C₄中間)のトラ ンスクリプトーム解析がなされた (Chen et al. 2014)。しかし、前述のとおり E. baldwinii の C₃/C₄光合成切り替えは不完全であり C₄光合成成立遺伝子の探索に十分であるとは言えない。

3-2. In vitro条件での材料作成

E. vivipara は、農業生物資源研究所の上野修氏 (現・九州大学農学研究院)より、陸生型のものを 供与していただいた。これをプランターに植えて、 通常のガラス温室、自然光下で維持した(図 1)。 また、同温室に透明アクリル水槽を設置し、24 時 間流水下で水生型を栽培維持した。

我々は E. vivipara の稈先端部のメリステムを出 発材料として無菌培養系を確立し、増殖とカルス 誘導に最適な植物ホルモン条件を確定すること から始めた。さらに、in vitro 条件下で沈水するこ とで陸生型(C_4)を水生型(C_3)に形態と生理学



図1 陸生型 Eleocharis vivipara

的特性を含めて切り替えできることを証明した。また, in vitro 条件下で ABA 処理すること により沈水条件下でも維管束鞘細胞が発達した陸生型の形態をとる植物 (ABA 型) となるこ とを明らかにした。

しかし, *in vitro* 条件下で誘導させた ABA 型において C₄光合成の重要な酵素である PEPC の活性が水生型より低下し,陸生型でみられる PEPC のリン酸化が ABA 型では見られない一方, RubisCO 活性は水生型と同様に上昇している事を発見した。これは, ABA 型では葉の組織形態のみが陸生型に変化している可能性を示す。

3-3. De novo参照配列の作成

陸生型,水生型全稈からそれぞれ cDNA ライブラリーを作成し,次世代シ ークエンサー(Illumina Hiseq2000)の解 析に供し,トランスクリプトームデータ を得た。国立遺伝学研究所が提供する DDBJ Read Annotation Pipeline の Preprocessing プログラムを用いて,トラ ンスクリプトームデータから低クオリテ ィのリードを除去した。その後,ショー トリードアセンブラーTrinityを用いてア センブリングをおこない, *de novo*参照配 列を作成した(図 2)。Trinity はアルゴリ



図 2 De novo 参照配列の作成スキーム

ズムに de Bruijn Graph を使用しておりアセンブリングの際に複数の配列候補が算出される。 そこで、クラスタリングソフトの CD-HIT を用いて類似した配列を除去し transcript candidate を選出した。データベース EBI Uniref 100 に対して BlastX で相同配列を検索しアノテーショ ン付けをおこなった。結果、29,727 本の重複のない遺伝子配列(unigne)が決定できた。こ れらのうち約 38.1%が機能がすでに明らかにされている既知の遺伝子と、約 27.3%がデータ ベース上に記載があるものの機能未知の遺伝子と類似しており、残り 34.6%がデータベース

上に記載がなかった。

3-4. 遺伝子発現量解析

in vitro 培養の陸生型,水生型, ABA 型の全稈から作成した cDNA ライブラリーと,先端部成長点を 含む未分化な細胞のみから作成し た cDNA ライブラリーを次世代シ ークエンサー(Illumina GaIIX)に より配列解析し,それぞれのデー タを上記で作成した *de novo* 参照 配列へマッピングソフト Bowtie を



図3 遺伝子発現プロファイルの比較

用いてマッピングした。マッピング結果は,解析ソフト「R」の統計解析パッケージである De seq で正規化された(図 3)。

これらの一連の解析の結果,水生型と比べて,陸生型と ABA 型で共に 2 倍以上高発現していた遺伝子数は 1,195 個,共に低発現していた遺伝子数は 2,642 個だった。高発現していた 遺伝子の中には *Kranz* 構造の形成に関わるとされている SCARECROW や SHORTROOT の遺 伝子も含まれていた。しかし,に PEPC や PPDK などの葉肉細胞で働く C₄光合成酵素の遺伝 子は,陸生型のみで高発現し,ABA 型では発現していなかった。このことは,前述したとお り,我々が以前に ABA 型における PEPC 活性を調査した結果と一致していた。一方で維管束 鞘細胞で働く NAD 依存性リンゴ酸脱水素酵素 (NAD-MDH) や NAD-MDH などの C₄光合成 酵素の遺伝子は陸生型,ABA 型で共に高発現していた。

陸生型と ABA 型で共に高発現していた遺伝子について以前に発表された Flaveria (Udo et al. 2011) と Cleome (Canan et al. 2014) の遺伝子発現プロファイルと比較したところ,陸生型と ABA 型,さらに F. bidentis (C₄) と Gynandropsis gynandra (C₄) で共通に高発現している遺伝子を約 100 個,共通して低発現している遺伝子を約 20 個,絞り込むことが出来た。高発現している遺伝子のなかには,約 40 個の機能未知の遺伝子が含まれていた。また,C₄ 光合成に関係があると報告されている遺伝子や,細胞構築や細胞壁の分化に関係する遺伝が複数含まれていた。我々は,これらの絞り込んだ遺伝子の中に C₄構造に関わる遺伝子が含まれているす能性があると考えている。

4. 今後の展望

現在, 我々は E. vivipara の遺伝子組換え植物の作成実験系の確立を試みている。これを利 用して, 現在までに絞り込んだ, 細胞の分化に関わると予想される遺伝子群について, 陸生 型(C₄)でノックダウンまたはノックアウトさせ, 植物体の成長速度, 光合成組織の構造, 遺伝子発現, 各種光合成酵素の活性を調べる予定である。予想通りであれば光合成細胞の分 化が抑制されるはずであり, 今まで全容が解明されていなかった C₄光合成の構造分化機構の 解明が大きく進むと期待される。

5. 謝辞

貴重な植物体を供与していただきました上野修教授(九州大学農学研究院)に厚く御礼申し上 げる。本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究費(No.10-I-3)の助成を受けた。次世代シー ケンサーの解析については NAIST バイオサイエンス研究科植物グローバル教育プロジェクトの 支援を受けた。

6. 引用文献

- Black, C.C.Jr. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to Net CO₂ Uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 253-286.
- Chen, T., Ye, R., Fan, X., LI, X., Lin, Y., 2011. Identification of C₄ photosynthesis metabolism and regulatory-associated genes in *Eleocharis vivipara* by SSH. *Photosyn.Res.* 108: 157-70.
- Chen, T., Zhu, X.G., Lin, Y., 2014. Major alterations in transcript profiles between C₃-C₄ and C4 photosynthesis of an amphibious species *Eleocharis baldwinii*. *Plant Mol Biol.* 86: 93-110.
- Gowik, U., Braütigam, A., Weber, K.L., Weber, A.P.M., Westhoff, P., 2011. Evolution of C₄ photosynthesis in the genus *Flaveria*: How many and which genes does it take to make C₄? *Plant Cell.* 23: 2087-105.
- Ku, S.B.M., Agarie, S., Nomura, M., Fukuyama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, M., Matsuoka, M., 1999. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotech*. 17: 76-80.
- Külahoglu, C., Denton, K.A., Sommer, M., Maß, J., Schliesky, S., Wrobel, T.J., Berckmans, B., Gongora-Castillo, E., Buell, C.R., Simon, R., Veylder, L.D., Brautigam, A., Weber, A.P.M., 2014. Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two Cleomaceae C₃ and C₄ plant species. *Plant Cell*. 26: 3243-60.
- Langdale, J.A. 2011. C4 cycles: past, present, and future research on C4 photosynthesis. *Plant Cell.* 23: 3879-92.
- Slewinski, T.L., Anderson, A.A., Zhang, C., Turgeon, R., 2012. Scarecrow Plays a Role in Establishing Kranz Anatomy in Maize Leaves. *Plant and Cell Physiol.* 53: 2030-2037
- Taniguchi, Y., Ohkawa, H., Masumoto, C., Fukuda, T., Tamai, T., Lee, K., Sudoh, S., Tsuchida,
 H., Sasaki, H., Fukayama, H., Miyao, M., 2008. Overproduction of C₄ photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C4-like photosynthetic pathway into rice. J. Exp. Bot. 59: 1799–1809
- Ueno, O. 1988. Induction of kranz anatomy and C4-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid. *Plant cell*. 10: 571-84.
- Ueno, O., Samejima, M., Muto, S., Miyachi, S., 1988. Photosynthetic characteristics of an amphibious plant, *Eleocharis vivipara*: Expression of C₄ and C₃ modes in contrasting environments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 6733-7.

D. Harada, T Sakamoto, T Kurata, K. Yamato, K. Izui, M. Akita-6

- Ueno, O. 2001. Environmental regulation of C₃ and C₄ differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant Physiol*. 127: 1524-32.
- Wang, P., Kelly, S., Fouracre, P.J., Langdale, J.A., 2013. Genome-wide transcript analysis of early maize leaf development reveals gene cohorts associated with the differentiation of C₄ Kranz anatomy. *The Plant Journal*. 75: 656–670