

## 平成 28 年度 研究経過報告書

### 研究者名

田茂井 政宏

### 研究課題名

ラン藻のカルビン回路調節因子 CP12 導入による光酸化的ストレス耐性植物の分子育種

### 研究目的・内容

本研究課題では、ラン藻由来 CP12 遺伝子をタバコ葉緑体ゲノムに導入することにより、光酸化的ストレス感受性への影響を生育、光合成機能、カルビン回路酵素活性などを比較することにより明らかにする。さらに、ラン藻 CP12 欠損株を用いて、様々な光条件下における生育および光合成機能、を野生株と比較し、光酸化的ストレス防御機能に対する CP12 欠損の影響を明らかにする。

### 研究の経過

#### 1 ラン藻 CP12 を葉緑体で発現させた形質転換植物の作出

CP12 遺伝子をタバコ由来の psbA プロモーターに連結し、スペクチノマイシン耐性遺伝子と共にタバコ葉緑体ゲノム由来 RbcL と accD 配列間に挿入した葉緑体形質転換用ベクターを構築した。パーティクルガンによりタバコ葉へ導入した後、スペクチノマイシンを含む培地で選抜し、薬剤耐性を示すカルスから植物体に再生させた。野生株および薬剤耐性株からゲノムを抽出し、ラン藻 CP12 に特異的なプライマーを用いて PCR を行ったところ、予想される大きさの DNA の増幅が見られた。しかし、RbcL と accD 配列に特異的なプライマーを用いた PCR では、想定される大きさではなく野生株と同じ大きさの DNA のみが確認された。これらより、1 細胞当たり数千コピー存在する葉緑体ゲノムの一部にのみ CP12 遺伝子が導入されていると考えられる。現在、導入株の葉からの再分化を繰り返し、葉緑体ゲノムを全て組換えゲノムに置き換えた株を作出している。

#### 2 ラン藻 CP12 欠損株のストレス感受性評価

ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 CP12 欠損株は、弱光下 (25  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) では野生株と同等の生育を示すが、明暗条件下では GAPDH および PRK 活性が制御できず、炭素代謝異常の結果として生育遅延を示した。また、強光条件下 (50  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) では、CP12 欠損株は野生株と比較して有意に生育遅延を示した。

次に、弱光下で対数増殖期まで培養した細胞を用いて、強光ストレスおよびパラコートストレスに対する感受性試験を行った。その結果、500  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  の強光照射により CP12 欠損株のクロロフィル量は野生株と比較して有意に減少する速度が速く、また 300  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  の強光照射時の光合成活性は、野生株と比較して CP12 欠損株において有意に阻害されていた。さらに、弱光下で対数増殖期まで培養した細胞を用いて、活性酸素発生剤であるパラコート処理による影響を比較したところ、CP12 欠損株では野生株と比較して低濃度のパラコートによって著しいクロロシスが認められた。これらの結果は、CP12 の欠損により明らかに光酸化的ストレスに対する耐性が低下していることを示している。

さらに、同細胞を用いてクロロフィル蛍光を測定し、CP12 欠損による電子伝達系への影響を検討した。その結果、野生株と CP12 欠損株の間で最大量子収率や photochemical quenching パラメーターに有意差は認められなかったが、Fv/Fm および non-photochemical quenching のパラメーターが異なる傾向が認められた。これらは、CP12 が NADPH 代謝および余剰エネルギー散逸など、光化学系に何らかの関与をしていることを示唆している。

#### **本研究と関連した今後の研究計画**

葉緑体ゲノムに CP12 遺伝子を導入した形質転換植物を用いて、種々のストレス条件下での生育、光合成特性、電子伝達活性の比較を行い、ストレス防御における CP12 の機能を明らかにする。さらに、収量増大が見込まれる光合成強化遺伝子 (FBP/SBPase 遺伝子など) と組み合わせて導入した植物を作出し、種々のストレス条件下での生産性評価を行う。

(平成 29 年 3 月 31 日現在)