

RNA 干渉法を用いた高等植物の光合成機能の改変の試み

Application of the RNA-interference technique on the modification of plant
photosynthetic activity

伊福 健太郎 京都大学大学院生命科学研究科 助教

Assistant Professor, Kentaro Ifuku: Graduate School of Biostudies, Kyoto University

和文要旨

組換え DNA 技術による植物機能の改変は、地球環境問題の解決に有効な手段の一つである。特に植物が行う最も重要な化学反応である光合成は、地球上の主たるエネルギー源であり、その初発段階である水分解-酸素発生反応は機能改変の重要な標的である。本研究で我々は、RNA 干渉法を用いて光合成酸素発生反応に関わる *psbP* 遺伝子の発現抑制植物体を作成し、植物の水分解-酸素発生反応の人為的な改変が可能であることを明らかにした。RNA 干渉法とは二本鎖の RNA 分子を細胞に導入することで、特定の遺伝子の発現を抑制する技術である。さらにこの RNA 干渉法を応用し、水分解-酸素発生反応に関与すると考えられる既知遺伝子、及び、未知遺伝子の発現制御を行い、光合成酸素発生反応調節の分子機構の解明と植物の光合成機能の向上を目指した。

Abstract

Our daily life is dependent on photosynthesis that produces oxygen and assimilates carbon dioxide into organic matter. It determines to a large extent the composition of our atmosphere and provides essential food and fuel. The first step of this process occurs in a multisubunit pigment-protein complex photosystem II using light energy to split water into oxygen and its reducing equivalents. The molecular mechanism of the water-splitting reaction is largely uncharacterized, and intensive studies are needed for the development of this principal energy-conversion reaction. We showed that the water-splitting reaction could be engineered using molecular technique, especially, RNA interference (RNAi) technology, in planta. RNAi is a powerful tool to control the gene expression by introducing double-stranded RNA into plant cells. We further developed RNAi technique to control the water-splitting reaction precisely and to find out novel components that control this reaction.

1. 研究目的

有用植物の開発にあたっては、光合成が生むエネルギーの需給バランスが植物体内で適切であることが重要である。即ち、植物に環境ストレス耐性、耐病性といった新たな機能を付加する、もしくは多収性を付与するといった際には、必ずそれに応じたエネルギー供給を考慮せねばならない。一方で、余剰なエネルギーが消費されない場合には活性酸素種等による酸化ストレスの原因となり、植物の生育に不利を生じることとなる。こうしたエネルギー供給を人為的に調節する戦略として、我々は RNA 干渉法(RNAi)を応用して、水分解-酸素発生反応に直接的、間接的に関わるタンパク質サブユニットを改変し、エネルギー供給量を調整することを考案した。実験には、水分解-酸素発生反応を行う光化学系 II タンパク質複合体において、その調節的役割を担っていると考えられている *psbP* 遺伝子を RNAi の主たる標的とした。さらに *psbP* などの既知遺伝子以外にも、水分解-酸素発生反応の制御に関わる未同定の遺伝子の単離を、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて行った。

2. 研究経過

2—1. Differential RNAi (dRNAi)による *psbP* 遺伝子の選択的発現抑制

材料に用いたタバコ (*Nicotiana tabacum*) には4つの *psbP* 遺伝子が存在し、その全てが機能的なタンパク質を発現している。

そこで、各 *psbP* 遺伝子の3'非翻訳領域を標的とした dsRNA 発現ベクターを用いて、4つの *psbP* 遺伝子に対し差異的な RNAi (Differential RNAi、以下、dRNAi) を行い、蓄積する PsbP タンパク質量が段階的に変化した形質転換植物の作成を行った(図1A)。その結果、光化学系 II の量ではなく、蓄積する PsbP 量と光化学系 II 活性に明らかな正の相関があることが明らかとなった。そこで次に *psbP* 遺伝子を過剰発現させた植物の作成を行った。しかしながら、通常の生育条件下において野生株以上の光合成活性を示す個体は得られなかった。

2—2. dRNAi における機能相補、及び、分子置換

in vitro の実験では、異種植物に由来する PsbP を結合させることで光化学系 II 活性を改変できる可能性が示されている。そこで dRNAi を用いて、異種植物由来の PsbP による内在タバコ PsbP の *in vivo* での分子置換を試みた。具体的には、前述したタバコ *psbP* 遺伝子の3'非翻訳領域を標的とした dsRNA 発現ベクターを導入した形質転換体に、異種植物由来の PsbP を強制発現するコンストラクトを再導入した(図1B)。これによりホウレンソウやキュウリといった異種植物由来の PsbP を主に蓄積する形質転換タバコの作成に成功した。さらにこの過程で、37塩基という非常に短い標的配列で有効な抑制効果を示す、新規 RNAi ベクター系の

開発を行った。

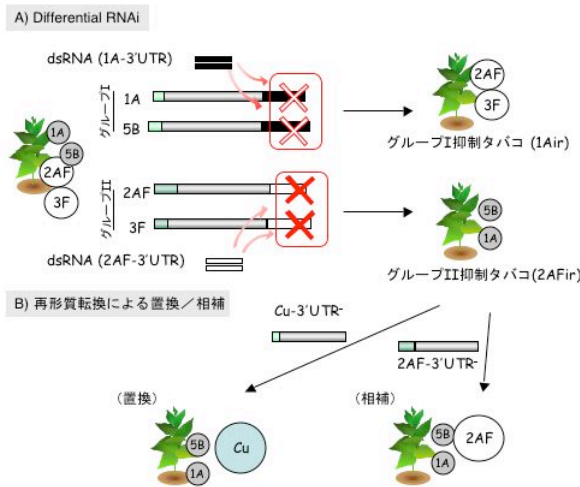


図1：3' UTR を用いた dsRNAi、および入れ戻しによる置換（相補）

タバコの *psbP* 遺伝子ファミリーを形成する、グループ I (1A, 5B) とグループ II (2AF, 3F) 遺伝子に対し、比較的相同性が低い 3' 非翻訳領域を標的とした RNAi を行った。その結果、それぞれの発現ベクターは、グループ特異的な遺伝子発現抑制した。B) さらに、3' 非翻訳領域を除いた強制発現コンストラクトを再導入することにより、内在 *PsbP* をキュウリ (Cu) *PsbP* などで置換する、もしくは、抑制形質をタバコ *PsbP* で相補することが可能であった。

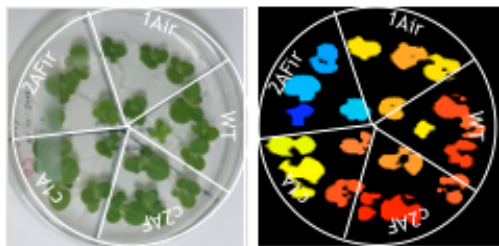


図2：dsRNAi によって作成された形質転換植物の光化学系 II 活性

各形質転換植物の光合成活性（光化学系 II 活性： F_v/F_m 値）をクロロフィル蛍光分析によって分析した。左側は、右側写真の植物を、光化学系 II 活性値で色分けしたものである。赤に近い程活性が高く、青に近い程活性が低いことを示す。このように、*PsbP* の発現量を変えることで、見た目では同じに見えても、様々な光化学系 II 活性を持つ植物を作り出すことが可能であった。

2—3. 新規光化学系 II 制御因子の探索

ゲノム情報が利用できるモデル植物であるシロイヌナズナを材料に、現東京大学の大林武博士らが開発した ATTED-II システムを利用して既存のマイクロアレイデータベースを解析し、水分解-酸素発生反応の制御に関わる因子の単離を試みた。そして選抜された候補遺伝子に関して、RNAi 形質転換体や突然変異体を用いた機能解析を進めた。

3. 研究成果

RNAi を用いて、高等植物の水分解-酸素発生反応における *PsbP* タンパク質の分子機能を明確にした。さらに dsRNAi という手法を植物で初めて応用開発し、*PsbP* 分子の量的（質的）改変による植物の光合成能の改変が *in vivo* で可能であることを示した。その過程で、37bp という極めて短い標的配列を用いる新規 RNAi ベクターの開発も行った。このベクター系により、植物 RNAi ベクター構築がより容易になるとともに、dsRNAi における標的配列の選択の幅が大きく広がることが期待できる。また、シロイヌナズナから光化学系 II 活性の新規な制御因子の候補を同定した（論文投稿中）。

4. 今後の課題と発展

本研究で作成された様々な光合成活性を持つ形質転換体は、様々な環境下における植物体内のエネルギー需給バランス

の実態を解析する上で、非常に良いモデル系となると考えられる。一方で、RNAi、及び、dRNAi によって作り出された形質転換植物の生育パフォーマンスに関しては、これまでのところ野生株を凌駕するものは得られていない。今後、得られた形質転換体に関して、さらに異なる環境条件下における生育比較を行うとともに、まだ解析が十分に進んでいないPsbPを過剰発現する植物、及び、異種植物由来のPsbPを発現する植物に関して、より詳細な解析を進める必要がある。また、シロイヌナズナで見出された新規な光化学系II制御因子の候補に関しては、その分子機能の解明が非常に興味深い。今後もこれらの研究を継続し、植物機能向上における光合成のエネルギー供給能調節の重要性を明らかにしたい。最後に、本研究で行ったRNAiの技術開発に関しては、植物科学の他の多くの分野において、様々な応用が可能であると考えている。

本研究に多大な援助を頂きました日産科学振興財団に感謝致します。

5. 論文発表リスト

(原著論文)

1. Ifuku K, Yamamoto Y, Ono TA, Ishihara S, Sato F. PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant*

*Physiol.***139**, 1175-1184 (2005).

2. Ishihara S, Yamamoto Y, Ifuku K, and Sato F. Functional analysis of four members of the PsbP family in photosystem II in *Nicotiana tabacum* using differential RNA interference. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1885-1893 (2005).
3. Ifuku K, Nakatsu T, Shimamoto R, Yamamoto Y, Ishihara S, Kato H, Sato F. Structure and function of the PsbP protein of photosystem II from higher plants. *Photosynth. Res.* **84**, 251-255 (2005)
4. Murakami, R, Ifuku K, Takabayashi A, Shikanai T, Endo, T, Sato F. Functional dissection of two Arabidopsis PsbO proteins: PsbO1 and PsbO2. *FEBS J.* **272**, 2165-2175 (2005)

(日本語総説等)

5. 伊福健太郎, 佐藤文彦, RNAi を用いた植物の機能開発, バイオサイエンスとインダストリー, **65**(3), 16-19 (2007)
6. 伊福健太郎, 佐藤文彦, RNAi で遺伝子を置換する?!, 生物工学会誌, **83**(9), 447 (2005)
7. 伊福健太郎, 佐藤文彦, RNAi - 植物遺伝子を制御する新たなツール, 月刊バイオインダストリー, **22**(8), 9-15 (2005)