

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6344773号
(P6344773)

(45) 発行日 平成30年6月20日(2018.6.20)

(24) 登録日 平成30年6月1日(2018.6.1)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z N A Z
C 1 2 N	15/29	(2006.01)	C 1 2 N	15/29	
A O 1 H	1/00	(2006.01)	A O 1 H	1/00	A
A O 1 H	5/00	(2018.01)	A O 1 H	5/00	A

請求項の数 26 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2015-505613 (P2015-505613)	(73) 特許権者	504139662
(86) (22) 出願日	平成26年3月11日 (2014.3.11)		国立大学法人名古屋大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/057021		愛知県名古屋市千種区不老町1番
(87) 国際公開番号	W02014/142334	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成29年3月7日 (2017.3.7)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	61/777,655		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成25年3月12日 (2013.3.12)	(74) 代理人	100170221
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小瀬村 暁子
		(74) 代理人	100188271
			弁理士 塚原 優子
(出願人による申告) 平成24年~平成26年度、国立研究開発法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発 (ALCA) 「気孔開度制御による植物の光合成活性と生産量の促進」における成果、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(72) 発明者	木下 俊則
			愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物の光合成および生産量を増加させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーターの制御下で植物由来のAHA2遺伝子を過剰発現し、気孔を閉じる能力を有するトランスジェニック植物。

【請求項2】

双子葉植物である、請求項1に記載のトランスジェニック植物。

【請求項3】

アブラナ科に属する、請求項2に記載のトランスジェニック植物。

【請求項4】

Arabidopsis属またはBrassica属に属する、請求項3に記載のトランスジェニック植物

10

【請求項5】

シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)、セイヨウアブラナ (Brassica napus)、アブラナ (Brassica rapa var. nippo-oleifera)、キャベツ (Brassica oleracea var. capitata)、ブロッコリー (Brassica oleracea var. italica)、カリフラワー (Brassica oleracea var. botrytis) およびハクサイ (Brassica rapa var. pekinensis) からなる群から選択される、請求項3に記載のトランスジェニック植物。

【請求項6】

単子葉植物である、請求項1に記載のトランスジェニック植物。

【請求項7】

20

イネ科に属する、請求項 6 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 8】

Oryza属、Zea属、Saccharum属またはSorghum属に属する、請求項 7 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 9】

モロコシ (Sorghum bicolor)、イネ (Oryza sativa)、アフリカイネ (Oryza glaberrima)、サトウキビ (Saccharum officinarum)、トウモロコシ (Zea mays)、オオムギ (Hordeum vulgare) およびコムギ (Triticum aestivum) からなる群から選択される、請求項 7 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 10】

前記プロモーターが、GC1プロモーターである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 11】

前記プロモーターが、配列番号2の塩基配列又は配列番号2の塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列からなるプロモーターである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 12】

前記AHA2遺伝子が、配列番号1の塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列からなる遺伝子である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 13】

前記AHA2遺伝子が、配列番号1の塩基配列からなる遺伝子又はそのオルソログである、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 14】

植物の生産量を増大させる方法であって、該植物に、孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーターの制御下にある、植物由来のAHA2遺伝子を導入することにより、前記AHA2遺伝子を過剰発現し、かつ気孔を閉じる能力を有するトランスジェニック植物を作製することを含む、前記方法。

【請求項 15】

植物が双子葉植物である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

植物がアブラナ科に属する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

植物がArabidopsis属またはBrassica属に属する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

植物がシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)、セイヨウアブラナ (Brassica napus)、アブラナ (Brassica rapa var. nippo-oleifera)、キャベツ (Brassica oleracea var. capitata)、ブロッコリー (Brassica oleracea var. italica)、カリフラワー (Brassica oleracea var. botrytis) およびハクサイ (Brassica rapa var. pekinensis) からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

植物が単子葉植物である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

植物がイネ科に属する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

植物がOryza属、Zea属、Saccharum属またはSorghum属に属する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

植物がモロコシ (Sorghum bicolor)、イネ (Oryza sativa)、アフリカイネ (Oryza glaberrima)、サトウキビ (Saccharum officinarum)、トウモロコシ (Zea mays)、オオムギ (Hordeum vulgare) およびコムギ (Triticum aestivum) からなる群から選択される

10

20

30

40

50

、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記プロモーターが、GC1プロモーターである、請求項 14 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記プロモーターが、配列番号2の塩基配列又は配列番号2の塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列からなるプロモーターである、請求項 14 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記AHA2遺伝子が、配列番号1の塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列からなる遺伝子である、請求項 14 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 26】

前記AHA2遺伝子が、配列番号1の塩基配列からなる遺伝子又はそのオルソログである、請求項 14 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物の光合成および生産量/成長を増加させる方法、ならびに該方法に使用する形質転換植物に関する。

【背景技術】

20

【0002】

地球規模の気候変動および食糧不足の危機が生じている現代においては、陸上植物によるCO₂の取り込みを向上させる方法を見出すことは益々重要な課題である。CO₂の取り込みにおける主要器官である気孔は、表皮にある2つの特殊な細胞（孔辺細胞と呼ばれている）に囲まれた微細な孔であり、主に陸上植物においてその葉面上に見出される。葉面は空気および水を殆ど通さないの、周辺大気と葉の内部との間のCO₂、O₂および水蒸気の拡散のための主要経路を気孔が提供する。気孔開口によるガス交換の促進は、植物の光合成および蒸散における最も不可欠な過程のうちの1つである（1、2）。近年の研究により、気孔蒸散がイネにおける光合成の制限要因であること（3）、および蒸散の減少が作物（例えばコムギ）の養分吸収の低下をもたらすこと（4）が示された。従って、気孔の開口/蒸散の増加は光合成を促進し、またそれによって植物成長を増加させると予想される。しかし、本発明者らの知る限り、植物成長の増加に関して気孔開度を操作する研究の成功例は報告されていない。考えられる理由の1つは、気孔は水門の役割も果たしている（5）ため、その気孔を介して水蒸気を失うと同時にCO₂を取り込むというジレンマのバランスを取るの難しいということである。

30

光は気孔開口を刺激する主な因子の1つであり、また様々な機構が種々の光波長に応答した気孔開口の根底にある（6~8）。赤色光は、葉肉および孔辺細胞葉緑体における光合成を介した気孔開口、ならびに細胞間隙CO₂濃度（C_i）の低下を引き起こすと考えられている（5、9、10）。しかし、赤色光に対する気孔応答の詳細な機構については議論中である（11、12）。対照的に、青色光はシグナルとして働き、気孔開口に対して最も顕著な効果を発揮する。青色光受容体フォトロピン（phot1およびphot2）は、カルボキシル末端から2番目のスレオニンのリン酸化とその後のリン酸化スレオニンへの14-3-3タンパク質の結合を介して細胞膜H⁺-ATPaseを活性化する（13~15）。青色光により活性化された細胞膜H⁺-ATPaseは細胞膜の過分極を引き起こし、それによって内向き整流性K⁺チャネル（細胞膜K⁺_{in}チャネル）を介したK⁺の取り込みが可能となる（16~20）。K⁺の蓄積は孔辺細胞の膨張および気孔開口を引き起こす。従って、これらの3つの因子（フォトロピン、細胞膜H⁺-ATPaseおよび細胞膜K⁺_{in}チャネル）は、青色光による気孔開口において重要な役割を果たしている。これらの因子に加えて、FLOWERING LOCUS T (FT) が気孔開口の正の調節因子であることが示唆されている（21）。

40

50

【発明の概要】

【0003】

植物表皮内の一对の孔辺細胞に囲まれた気孔の孔は、光、CO₂、および植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) に応答して植物と大気との間のガス交換を調節している。光による気孔開口は、少なくとも3つの主要因子：青色光受容体フォトトロピン、細胞膜H⁺-ATPaseおよび細胞膜K⁺_{in}チャンネルにより仲介される。気孔抵抗が植物に上るCO₂取り込みの主な制限因子と考えられるにもかかわらず、光合成および植物成長の増加を目標として気孔開口を増大させる試みは殆ど為されていない。

ここで、本発明者らは、孔辺細胞プロモーター、すなわち孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーター (GC1プロモーター) を使用して細胞膜H⁺-ATPase (AHA2) を過剰発現する *Arabidopsis* 属の形質転換植物が光による気孔開口、光合成および植物成長 (植物の生産量) の増大を示すことを明らかにした。該形質転換植物は、生育開始25日目には、野生型より大きくかつ増加した数のロゼット葉を生じ、その生重量および乾燥重量は約42~63%大きかった。播種後45日目の形質転換植物の、種子、長角果および花を含む全花茎の乾燥重量は、野生型の全花茎の乾燥重量より約36~41%大きかった。加えて、該形質転換植物の気孔は暗黒条件およびアブシジン酸に応答して正常に閉じた。対照的に、孔辺細胞におけるフォトトロピンまたは細胞膜K⁺_{in}チャンネルの過剰発現はこれらの表現型に影響を与えなかった。これらの結果は、気孔開度が光合成および植物成長における制限因子であること、また孔辺細胞において細胞膜H⁺-ATPaseを過剰発現させることによる気孔開口の操作が植物成長の促進に非常に有用であることを証明するものである。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

- [1] AHA2 遺伝子を過剰発現するトランスジェニック植物。
- [2] 孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーター、好ましくはGC1プロモーターによってAHA2 遺伝子を過剰発現する、[1]に記載のトランスジェニック植物。
- [3] 双子葉植物である、[1]に記載のトランスジェニック植物。
- [4] アブラナ科に属する、[3]に記載のトランスジェニック植物。
- [5] *Arabidopsis* 属または *Brassica* 属に属する、[4]に記載のトランスジェニック植物。
- [6] シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、アブラナ (*Brassica rapa* var. *nippo-oleifera*)、キャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*)、ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*)、カリフラワー (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) およびハクサイ (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) からなる群から選択される、[4]に記載のトランスジェニック植物。
- [7] 単子葉植物である、[1]に記載のトランスジェニック植物。
- [8] イネ科に属する、[7]に記載のトランスジェニック植物。
- [9] *Oryza* 属、*Zea* 属、*Saccharum* 属または *Sorghum* 属に属する、[8]に記載のトランスジェニック植物。
- [10] モロコシ (*Sorghum bicolor*)、イネ (*Oryza sativa*)、アフリカイネ (*Oryza glaberrima*)、サトウキビ (*Saccharum officinarum*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*) およびコムギ (*Triticum aestivum*) からなる群から選択される、[8]に記載のトランスジェニック植物。
- [11] 植物の生産量を増大させる方法であって、該植物に、AHA2 遺伝子を過剰発現させるための遺伝子改変を導入することを含む、前記方法。
- [12] 植物における光合成を増大させる方法であって、該植物に、AHA2 遺伝子を過剰発現させるための遺伝子改変を導入することを含む、前記方法。
- [13] AHA2 遺伝子が孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーター、好ましく

10

20

30

40

50

はGC1プロモーターの制御下にある、[11]または[12]に記載の方法。

[14]植物が双子葉植物である、[11]または[12]に記載の方法。

[15]植物がアブラナ科に属する、[14]に記載の方法。

[16]植物が *Arabidopsis* 属または *Brassica* 属に属する、[15]に記載の方法。

[17]植物がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、アブラナ (*Brassica rapa* var. *nippo-oleifera*)、キャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*)、ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*)、カリフラワー (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) およびハクサイ (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) からなる群から選択される、[15]に記載の方法。

10

[18]植物が単子葉植物である、[11]または[12]に記載の方法。

[19]植物がイネ科に属する、[18]に記載の方法。

[20]植物が *Oryza* 属、*Zea* 属、*Saccharum* 属または *Sorghum* 属に属する、[19]に記載の方法。

[21]植物がモロコシ (*Sorghum bicolor*)、イネ (*Oryza sativa*)、アフリカイネ (*Oryza glaberrima*)、サトウキビ (*Saccharum officinarum*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*) およびコムギ (*Triticum aestivum*) からなる群から選択される、[19]に記載の方法。

20

本明細書は、本願の優先権の基礎である米国仮出願第61/777,655号の明細書、特許請求の範囲および図面に記載された内容を参照により組み込むものとする。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、GC1プロモーターを利用したAHA2の過剰発現 (GC1::AHA2) は気孔開口を促進させることを示す。GC1::AHA#1及びGC1::AHA#2はそれぞれ独立して得られた形質転換植物を意味する。(A) *Arabidopsis* 属植物の表皮における孔辺細胞 $H^+ - ATPase$ の免疫組織化学的検出の典型的な蛍光画像 (免疫組織化学的条件の詳細については、材料および方法の項を参照されたい)。(B) 野生型 (WT) およびGC1::AHA2におけるAHA2およびTUB2のRT-PCR解析。TUB2 (TUBULIN BETA CHAIN2) を対照遺伝子として使用した。(C) 2.5時間の暗黒下、2.5時間の光照射 ($50 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ の赤色光および $10 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ の青色光) 下または2.5時間の光照射下かつ $20 \mu M$ ABAの存在下での気孔開度。(D) 青色光を30分間照射した表皮における典型的な気孔。光条件は(C)と同じであった。(E) 暗黒下または30分間の光処理後の気孔開度。光条件は(C)と同じとした。(C)および(E)の気孔開度は25個の気孔に関する測定値の平均値であり; エラーバーは標準誤差 (SEM) を表している。気孔開度の差はスチューデントの t -検定を用いて検出した ($*** P < 0.001$)。(F) 播種後4週目のWTおよびAHA2-形質転換植物から切り離れたロゼット葉の生重量の変化の動態。葉の相対重量は、初期重量 (植物体からの切断直後の各ロゼット葉の重量) に対する割合として示されている。データは10枚の葉の平均値であり; エラーバーは標準偏差 (SD) を表している。

30

40

図2は、AHA2-形質転換植物のガス交換特性を示す。野生型 (WT) およびAHA2形質転換植物における(A) 気孔コンダクタンスの光応答ならびに(B) CO_2 同化速度。測定は $380 \mu L L^{-1}$ の CO_2 で行い; 葉温およびリーフチャンバーの相対湿度はそれぞれ24 および40~50%に維持した。(C) 野生型およびAHA2-形質転換植物における CO_2 同化速度と細胞間隙 CO_2 濃度との関係。測定は約 $750 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ の白色光下で行った。葉温およびリーフチャンバー内の相対湿度はそれぞれ24 および40~50%に維持した。データは3つの異なる植物体に関する測定値の

50

平均値であり；エラーバーはSDを表しており、また記号よりも小さい場合は表示されていない。白い四角は野生型植物であり；ダークブルーの円およびライトブルーの三角はA H A 2 - 形質転換植物である。

図3は、A H A 2 - 形質転換植物の表現型の特徴を示す。(A)および(B)強光条件($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)下で25日間生育させた野生型およびA H A 2 - 形質転換植物の表現型。(C)強光条件下で生育させた野生型およびA H A 2 - 形質転換植物のロゼット葉および幼葉。(D)播種後25日目の植物体の相対的な地上部の生重量および乾燥重量。(E)強光条件下で50日間生育させた野生型およびA H A 2 - 形質転換植物の表現型。(F)播種後45日目の植物の相対乾燥茎重。生重量および乾燥重量は6個体以上の植物体の測定値の平均値であり；エラーバーはSEMを表している。差はスチューデントのt-検定により検出した(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.001$)。 10

図4は、G C 1プロモーターを使用したP H O T 2 - G F P、A K T 1またはK A T 1の過剰発現は気孔開口に影響を与えなかったことを示す。(A)G C 1::P H O T 2 - G F Pから得た典型的な気孔の明視野像および蛍光画像。(B)(E)(F)野生型(W T)および形質転換植物G C 1::P H O T 2 - G F P、G C 1::A K T 1およびG C 1::K A T 1におけるP H O T 2、A K T 1、K A T 1およびT U B U L I N B E T A C H A I N 2 (T U B 2)のR T - P C R解析。T U B 2は対照として使用した。(C)(G)(H)2.5時間の暗黒下、2.5時間の光照射($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光および $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色光)下または2.5時間の光照射下かつ $20 \mu\text{M}$ A B Aの存在下での気孔開度。(D)暗黒下または2.5時間の光処理後のp h o t 1 p h o t 2二重変異体およびG C 1::P H O T 2 - G F P / p h o t 1 p h o t 2形質転換植物の気孔開度。光条件は(C)と同じとした。気孔開度の差はスチューデントのt-検定を用いて検出した(*** $P < 0.001$)。 20

図5は、A H A 2 - 形質転換植物の生産性を示す。(A)強光条件($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)下で45日間生育させた野生型およびA H A 2 - 形質転換植物の表現型。(B)野生型(W T)またはA H A 2 - 形質転換植物(G C 1::A H A 2)各々の乾燥長角果。(C)1植物体当たりの長角果の相対値。(D)各植物体の長角果の全乾燥重量を各植物体の長角果数で割ったものとして算出した1植物体当たりの長角果の平均乾燥重量の相対値。長角果数および乾燥重量は、3個体の植物体の測定値の平均値であり；エラーバーはSDを表している。差はスチューデントのt-検定により検出した(* $P < 0.05$)。 30

図6は、G C 1プロモーターを使用したA H A 2 - P 6 8 Sの過剰発現は気孔開口を増加させるが植物成長は増加させないことを示す。(A)2.5時間の暗黒下、光照射($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光および $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色光)下または光照射下かつ $20 \mu\text{M}$ A B Aの存在下での気孔開度。(B)強光条件($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)下で25日間生育させた野生型(W T)およびA H A 2 - P 6 8 S - 形質転換植物(G C 1::A H A 2 - P 6 8 S)の表現型。(C)播種後25日目の植物体の相対的な地上部の生重量および乾燥重量。生重量および乾燥重量は10個体以上の植物体の測定値の平均値であり；エラーバーはSEMを表している。差はスチューデントのt-検定により検出した。 40

図7の表1は、野生型(W T)およびG C 1::A H A 2形質転換植物のガス交換パラメーターを示す。

図8の表2は、野生型(W T)およびG C 1::A H A 2形質転換植物の気孔の密度、指数、および大きさを示す。

図9の表3は、野生型(W T)および形質転換植物の地上部のバイオマス生産性を示す。

図10の表は、野生型(W T)に対する形質転換植物の遺伝子発現の比を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 5 】

本発明者らは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において、孔辺細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーター (GC1プロモーター) 下で気孔開口をさらに促進させるために、気孔開口における主要成分の形質転換植物を作出しようと試みた (22)。本発明者らは、孔辺細胞において H^+ -ATPase (AHA2) を過剰発現する形質転換植物が光による気孔開口、光合成および植物成長の増大を示すこと、ならびに気孔開度が光合成および植物成長における制限因子であることを見出した。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の AHA2 遺伝子の塩基配列を配列番号 1 に示す。AHA2 遺伝子には AHA2 遺伝子の相同遺伝子またはオルソログが含まれる。すなわち、AHA2 遺伝子には、AHA2 遺伝子と機能的に等価な遺伝子、例えば、配列番号 1 の塩基配列と 80% 以上、90% 以上、95% 以上、または 99% 以上の配列同一性を有する塩基配列からなる遺伝子が含まれる。

AHA2 遺伝子の相同遺伝子またはオルソログの具体例を以下に示す。

[表]

GeneBank ID	種	同一性%	説明
186501447	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	94.42	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 1 (AHA1) mRNA、完全長 cds
334188459	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	88.49	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 3 (AHA3) mRNA、完全長 cds
18412882	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	84.18	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 9 (AHA9) mRNA、完全長 cds
30678426	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	82.89	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 6 (AHA6) mRNA、完全長 cds

10

20

30690657	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	82.68	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 8 (AHA8) mRNA、完全長 cds	
18400566	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	82.33	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 5 (AHA5) mRNA、完全長 cds	
145359569	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	81.26	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 11 (AHA11) mRNA、完全長 cds	
145339230	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	80.63	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 4 (AHA4) mRNA、完全長 cds	10
334186149	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	73.21	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 7 (AHA7) mRNA、完全長 cds	
42562115	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	72.41	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>) H ⁺ -ATPase 10(AHA10) mRNA、完全長 cds	
224126018	コットンウッド(<i>Populus trichocarpa</i>) バルサムポプラの亜種トリコカルバ(<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i>)	88.7	コットンウッド(<i>Populus trichocarpa</i>) 自己阻害 H ⁺ -ATPase、mRNA	20
435000	ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>)	88.91	ジャガイモ(<i>S. tuberosum</i> L.) (Desiree) PHA2 mRNA	
19703	ニコチアナ・ブルムバギニフォリア(<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>) (縮れた葉をもつタバコ)	88.38	N.ブルムバギニフォリア (<i>N. plumbaginifolia</i>)細胞膜 H ⁺ -ATPase の pma4 mRNA	
225446001	ヨーロッパブドウ (<i>Vitis vinifera</i>) (ワイン用ブドウ)	87.96	予測: ヨーロッパブドウ (<i>Vitis vinifera</i>)細胞膜 ATPase 4-様、転写変異体 1 (LOC100242786)、mRNA	30
449461192	キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)	88.28	予測: キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)細胞膜 ATPase 4-様 (LOC101221564)、mRNA	
356556195	ダイズ (<i>Glycine max</i>)	88.28	予測: ダイズ (<i>Glycine max</i>) 細胞膜 ATPase 4-様、転写変異体 1 (LOC100804422)、mRNA	
6759596	モモ (<i>Prunus persica</i>)	86.91	モモ (<i>Prunus persica</i>)細胞膜 H ⁺ -ATPase (PPA2 遺伝子) の mRNA	
242074625	モロコシ (<i>Sorghum bicolor</i>) (ソルガム)	86.86	モロコシ (<i>Sorghum bicolor</i>) 仮想タンパク質、mRNA	40
392055979	リンゴ (<i>Malus xiaojinensis</i>)	86.91	リンゴ (<i>Malus xiaojinensis</i>) 細胞膜 H ⁺ -ATPase (HA2) mRNA、完全長 cds	
219888400	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>)	86.54	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>) 全長 cDNA クロ	

			ーン ZM_BFc0076C02 mRNA、完全長 cds	
46430474	ニンジン (<i>Daucus carota</i>)	87.01	ニンジン (<i>Daucus carota</i>) 細胞膜 H ⁺ -ATPase の DcPA 1 mRNA、完全長 cds	
115461035	イネ (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)	85.8	イネ (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>) Os04g0656100 (Os04g0656100) mRNA、完全長 cds	
66132296	シロバナルーピン (<i>Lupinus albus</i>)	86.48	シロバナルーピン (<i>Lupinus albus</i>) 細胞膜 H ⁺ -ATPase (LHA3) mRNA、完全長 cds	10
4220624	ソラマメ (<i>Vicia faba</i>)	86.48	ソラマメ (<i>Vicia faba</i>) p 型 H ⁺ -ATPase の VHA2 mRNA、完全長 cds	
758249	インゲンマメ (<i>Phaseolus vulgaris</i>) (マメ)	86.06	インゲンマメ (<i>P. vulgaris</i>) 細胞膜 H ⁺ -ATPase の mRNA	
241987283	コムギ (<i>Triticum aestivum</i>) (パンコムギ)	84.86	コムギ (<i>Triticum aestivum</i>) cDNA、クローン: WT010_E01、品種: Chinese Spring.	
151426614	シジョウオオムギ (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>) (栽培オオムギ)	84.65	シジョウオオムギ (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>) cDNA クローン: FLbaf5p16、mRNA 配列	20

* 「%同一性」は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) H⁺-ATPase 2 (AHA2) mRNA、完全長 cds との % 同一性を指す。

AHA2 を過剰発現する形質転換植物は、AHA2 遺伝子を過剰発現させるために植物に遺伝子改変を導入することにより作出してもよい。かかる遺伝子改変としては、好ましくはベクター (例えば、プラスミド) に含まれる AHA2 遺伝子の、植物への導入が挙げられる。AHA2 遺伝子は、好ましくは孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーター、好ましくは GC1 プロモーターにより過剰発現される。AHA2 遺伝子は、好ましくは、植物に、孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーター、好ましくは GC1 プロモーターと共に導入される。言い換えると、AHA2 遺伝子は孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーターの制御下にある。遺伝子改変の導入は、植物のゲノム DNA の相

同的組換えにより行うこともできる。

AHA2 を過剰発現する形質転換植物は、気孔を閉じる能力を有する。形質転換植物の気孔を閉じるこの能力は、野生型植物の該能力と類似している。

導入する AHA2 遺伝子は、好ましくは、該遺伝子を導入する植物と同一の科、属または種に由来する。しかし、AHA2 遺伝子を導入する植物の科、属または種とは異なる科、属または種に由来する該遺伝子を導入することもできる。

植物に遺伝子改変を導入する方法は、例えば Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 に記載されているように、当分野で周知である。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の GC1 プロモーターの塩基配列を配列番号 2 に示す。GC1 プロモーターには、GC1 プロモーターと機能的に等価なプロモーター、例えば、配列番号 2 の塩基配列と 80% 以上、90% 以上、95% 以上、または 99% 以上の配列同一性を有する塩基配列からなるプロモーターが含まれる。

GC1 プロモーター以外の孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーターを使用することもできる。孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーターの具体例としては、MYB6 プロモーター (Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K.A.S., Geiger, D., Marten, I., Martinoia, E. および Hedrich, R. (2

10

20

30

40

50

010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cell. The Plant Journal, 63:1054-1062; Bauer, H., Ache, P., Lautner, S., Fromm, J., Hartung, W., Rasheid, K., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kneitz, S., Lachmann, N., Mendel, R., Bittner, F., Hetherington, A. および Hedrich, R. (2013). The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. Current Biology, 23:53-57) が挙げられる。

10

植物は特に限定されない。ある実施形態では、植物として双子葉植物が挙げられる。該双子葉植物としてはアブラナ科の植物が挙げられる。該植物は、好ましくは Arabidopsis 属または Brassica 属に属する。該植物は、好ましくは、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)、セイヨウアブラナ (Brassica napus)、アブラナ (Brassica rapa var. nippon-oleifera)、キャベツ (Brassica oleracea var. capitata)、ブロッコリー (Brassica oleracea var. italica)、カリフラワー (Brassica oleracea var. botrytis)、およびハクサイ (Brassica rapa var. pekinensis) からなる群から選択される。

20

Luらは、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) の KAT1 プロモーターおよび PLD1 遺伝子を用いてセイヨウアブラナ (Brassica napus) を形質転換し、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) の KAT1 プロモーターおよび PLD1 遺伝子を用いて形質転換したシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) において見られるものと類似の PLD1 遺伝子の発現パターンおよび効果を得た (Plant Biotechnology Journal, (2012), pp. 1-10, DOI: 10.1111/pbi.12028)。従って、Brassica 属に属する植物の、AHA2 遺伝子および GC1 プロモーターによる形質転換は、AHA2 遺伝子および GC1 プロモーターを用いて形質転換したシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) において見られるものと類似の結果をもたらすと考えられる。

30

別の実施形態では、植物として単子葉植物が挙げられる。該単子葉植物としてはイネ科の植物が挙げられる。該植物は、好ましくは Oryza 属、Zea 属、Saccharum 属または Sorghum 属に属する。該植物は、好ましくは、モロコシ (Sorghum bicolor)、イネ (Oryza sativa)、アフリカイネ (Oryza glaberrima)、サトウキビ (Saccharum officinarum)、トウモロコシ (Zea mays)、オオムギ (Hordeum vulgare) およびコムギ (Triticum aestivum) からなる群から選択される。

また本発明は、植物の生産量を増加させる方法にも関する。該方法は、AHA2 遺伝子を過剰発現させるために遺伝子改変を植物に導入することを含む。植物の生産量を増加させるということは、形質転換植物の重量が野生型植物の重量より大きくなることを意味する。形質転換植物の重量には、地上部の重量、最終的な茎の重量、種子の重量などが含まれる。

40

また本発明は、植物における光合成を増加させる方法にも関する。該方法は、AHA2 遺伝子を過剰発現させるために遺伝子改変を植物に導入することを含む。植物における光合成のレベルは、気孔コンダクタンス、CO₂ 同化速度などを測定することにより測定可能である。

光に応答して増大した気孔開口を示す形質転換植物を作出するため、本発明者らは、気孔開口の3つの主要因子：青色光受容体フォトトロピンのアイソフォームである PHOT

50

2 (1 3) ; 細胞膜 $H^+ - ATPase$ の代表的なアイソフォームである $AHA2 (2 3)$; ならびに細胞膜 K^+_{in} チャネルのアイソフォームである $KAT1$ および $AKT1 (1 9, 2 0)$ を孔辺細胞で高発現させることを試みた。これらのタンパク質を孔辺細胞特異的に過剰発現させるため、本発明者らは孔辺細胞特異的に高発現する遺伝子のプロモーター、すなわち $GC1$ プロモーター (2 1, 2 2) を使用した。免疫組織化学的解析により、同じプロモーターを使用して作製した $AHA2 - 形質転換植物 (GC1 : : AHA2)$ の孔辺細胞における $AHA2$ レベルが、野生型孔辺細胞における $AHA2$ レベルより約 1.5 倍高いことが示された (図 1 a)。 $AHA2 - 形質転換植物$ の孔辺細胞を含む表皮組織内の $AHA2$ 転写産物もまた、野生型における $AHA2$ 転写産物より約 1.5 倍多かった (図 1 b)。そこで、本発明者らは、これらの植物における気孔開口の光応答性について調べた。2.5 時間光照射に曝露した際、 $AHA2 - 形質転換植物$ は野生型植物より約 25% 大きい気孔開度を示したが、これらの気孔は暗黒下では野生型と同様に閉じた (図 1 e)。また本発明者らは、 $AHA2 - 形質転換植物$ の気孔が、30 分間の光照射下で野生型の気孔よりも急激に開口することも見出した (図 1 d, e)。対照的に、 $PHOT2 - GFP (GC1 : : PHOT2 - GFP)$ 、 $AKT1 (GC1 : : AKT1)$ および $KAT1 (GC1 : : KAT1)$ の過剰発現は、これらの成分が孔辺細胞内または表皮内に増加したレベルで存在していたにもかかわらず、これらの条件下では気孔開口に影響を与えなかった (図 4)。これらの結果は、フォトロピンおよび K^+_{in} チャネルではなく $H^+ - ATPase$ が光による気孔開口の制限因子であること、また孔辺細胞における $H^+ - ATPase$ の量の増加により気孔開口の規模と速度の両方が増大することを示している。

$AHA2 - 形質転換植物$ における光による気孔開口が、植物ホルモン・アブシジン酸 (ABA) により野生型において見られるのと同程度まで阻害されたことに注目されたい (図 1 c)。 $AHA2 - 形質転換植物$ における切断葉の重量減少もまた、野生型における重量減少と類似していた (図 1 f)。これらの結果は、 $AHA2 - 形質転換植物$ の乾燥ストレスに対する感受性が正常であることを示唆している。

そこで本発明者らは、 $AHA2 - 形質転換植物$ の無傷葉における気孔コンダクタンスおよび光合成活性 (CO_2 同化速度) について、ガス交換システムを利用して詳細に調べた。気孔コンダクタンスは、比較的高い光強度 ($\geq 200 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) 下では、野生型よりも $AHA2 - 形質転換植物$ において明らかに大きかった (図 2 a)。これと一致して、周囲 CO_2 条件 ($380 \mu L L^{-1}$) 下の $AHA2 - 形質転換植物$ における光合成の速度 (CO_2 同化速度) もまた野生型植物における光合成の速度より高かった (図 2 b)。 $AHA2 - 形質転換植物$ における気孔コンダクタンスは、植物に光合成飽和白色光を連続的に照射した場合、野生型における気孔コンダクタンスより約 44 ~ 49% 高かった (図 7 の表 1)。 $AHA2 - 形質転換植物$ における光合成速度は、同じ飽和 - 光条件下では野生型における光合成速度より約 11 ~ 18% 高かった (図 7 の表 1)。結果、 $AHA2 - 形質転換植物$ および野生型植物の水利用効率 (光合成速度と蒸散速度との比) は有意な差を示さなかった (図 7 の表 1)。 $AHA2 - 形質転換植物$ の高い光合成速度がその大きな気孔開口程度に起因するものかどうかを判定するために、本発明者らは CO_2 同化速度と葉内細胞間隙 CO_2 濃度との応答曲線について調べた (図 2 c)。これら 2 つの曲線は互いにほぼ一致しており、このことは、 $Rubisco$ のカルボキシル化能力と電子伝達能力がいずれも野生型と形質転換植物の間で類似しており、気孔コンダクタンスだけが $AHA2 - 形質転換植物$ でより大きいということを示している。これらの結果は、 $AHA2 - 形質転換植物$ において、増大した気孔開口が増加した光合成速度に寄与しているということを明確に示している。

次に、本発明者らは、 $AHA2 - 形質転換植物$ の成長について調べた (図 3)。植物を $200 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ の光強度下で 25 日間生育させた場合、 $AHA2 - 形質転換植物$ が野生型より大きくかつ増加した数のロゼット葉を付け、その生重量および乾燥重量が約 42 ~ 63% 大きかったことに留意されたい。さらに、播種後 45 日目の $AHA2 - 形質転換植物$ における種子、長角果および花を含む全花茎の乾燥重量は、同じ生育条

10

20

30

40

50

件下では野生型の全花茎の乾燥重量より約36~41%大きかった。AHA2-形質転換植物における各長角果の乾燥重量は野生型植物の各長角果の乾燥重量と同程度であるにもかかわらず、各AHA2-形質転換植物当たりの長角果の数は野生型植物の長角果の数よりずっと多かった(図5)。AHA2-形質転換植物の気孔の密度、指数および大きさは野生型植物の気孔の密度、指数および大きさと同程度であった(図8の表2)。これらの結果は、増加した生産性は気孔の形態または分化の差に起因するものではないということ、また光による気孔開口の増大が植物成長を促進したということを示している。

AHA2-形質転換植物を $80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度下で生育させた場合、AHA2-形質転換植物と野生型植物との植物生産性の差が小さい(図9の表3)ということは特筆に値する。これらの光条件下では、気孔コンダクタンスではなく、光合成電子伝達速度が光合成における制限因子であることが示された(24)。従って、AHA2-形質転換植物は高い光強度($200\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)下で優れた成長を示した。対照的に、PHOT2-、KAT1-およびAKT1-形質転換植物の成長は、 $200\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度下でも野生型の成長と類似していた(図9の表3)。加えて、本発明者らは、第1膜貫通セグメント内のPro₆₈のSerへの点突然変異により恒常的高活性-H⁺-ATPaseを有すると推定されるAHA2-P68S-形質転換植物(GC1::AHA2-P68S)(25)における気孔の表現型および植物成長について調べた。実際、AHA2-P68S-形質転換植物の気孔は明暗条件下で、さらにはABAの存在下でも、常に大きく開口することが示された(図6a)。しかし、AHA2-P68S-形質転換植物は増大した植物成長を示さなかった(図6b、c)。

本研究において、本発明者らは、光による気孔開口において重要な成分(例えば、細胞膜H⁺-ATPase、フォトロピンおよびK⁺_{i n}チャネル)を過剰発現するシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)形質転換植物を、GC1プロモーターを使用して作出した。孔辺細胞における細胞膜H⁺-ATPaseの量の増加だけが光による気孔開口に有意な影響を与え(図1)、このことは、細胞膜H⁺-ATPaseが気孔開口過程の制限因子であることを示している。本発明者らは、この影響が細胞膜K⁺_{i n}チャネルの電気的特性に起因しているのではないかと考えた。細胞膜K⁺_{i n}チャネルの電圧-電流関係は、K⁺_{i n}チャネルの活性が過分極-依存性であることを示している(18)。従って、青色光にตอบสนองして細胞膜の過分極を促進する孔辺細胞H⁺-ATPaseのレベルの増加(16)は、気孔開口を効果的に誘導する。加えて、AHA2-形質転換植物は増大した光合成活性および植物成長を示した(図2および3)。本発明者らの知る限り、これは植物成長への気孔開口の寄与を明確に示す最初の証拠である。本発明者らの結果は、細胞膜H⁺-ATPaseの操作が、気孔開口を促進させるためだけでなく、光合成および植物成長を増大させるためにも非常に有用であることを示している。

近年、イネ変異体slac1(乾燥-感受性開口-気孔変異体)が、増加した葉の光合成速度を有することが示された(3)。しかし、slac1変異が乾燥ストレスに対する非感受性を理由に植物成長に影響を与えることはなかった。これと一致して、恒常的開口-気孔およびABA-非感受性の表現型を示すAHA2-P68S形質転換植物は、増大した植物成長を示さなかった(図6)。また本発明者らは、気孔開口の正の調節因子であるFLOWERING LOCUS T(FT)の孔辺細胞における発現(21)を、GC1プロモーターを使用して人為的に増加させた。正常な乾燥応答を示すFT-形質転換植物の気孔は、明暗条件下で常時より大きく開口していた。しかし、FT-形質転換植物の成長は野生型植物の成長と同程度であった。これらの結果は、乾燥耐性に対する感受性の欠如または夜間の水分損失の増加がバイオマスの蓄積において不利になりうることを明確に示している。従って、明所で増加した気孔開口を示すだけでなく、暗所で、およびABAにตอบสนองして正常に閉じるAHA2-形質転換植物の気孔(図1c)は、炭素の固定および蓄積に良い影響を与える。さらに、AHA2-形質転換植物の気孔は、高いCO₂濃度にตอบสนองして野生型植物の気孔よりも大きく開口すると思われる(図2c)。高CO₂濃度では蒸散の低下により作物の栄養減少が生じる(4)ことから、気孔を介してより多く

10

20

30

40

50

の蒸散を行う AHA2 - 形質転換植物は CO₂ 濃度が高い環境で繁茂することができるだろう。この戦略の作物および燃料用植物への利用は、植物生産量の促進および持続可能な低炭素社会に大いに貢献することが期待される。

【実施例】

【0006】

材料および方法

植物材料および生育条件

本明細書中で野生型 (WT) として使用したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) gl1 [ホモ接合型劣性 gl1 を持つ *Columbia* (Col)] は、全形質転換植物の背景植物のエコタイプである。遺伝子発現、気孔開度およびガス交換の実験に使用した植物は、生育室内で湿度 55 ~ 70%、24 にて 16 時間蛍光灯 (80 μmol m⁻² s⁻¹) / 8 時間暗期のサイクル下、土壌で生育させた。バイオマス生産性測定に使用した植物は、光強度を約 80 μmol m⁻² s⁻¹ (弱光条件) および 200 μmol m⁻² s⁻¹ (強光条件) とした以外は同じ環境条件下で生育させた。

10

形質転換用ベクターの構築および植物の形質転換

植物の形質転換のために使用したプラスミドベクターは、従来の方法 (21) に従って構築した。手短に述べると、HindIII および XbaI 部位に挟まれた GC1 の開始コドンの 1,702 bp ~ 1 bp 上流のゲノム DNA 断片 (AT1G22690) を使用することにより、pPZP211 中の CaMV35S の対応領域を置き換えた (pPZP211 - GC1)。HindIII 消化の前に、単一ヌクレオチド置換 (1,453 位の C を G に置換) を部位特異的突然変異誘発によりこの GC1 断片に導入した。AHA2 (AT4G30190)、PHOT2 (AT5G58140)、KAT1 (AT5G46240) および AKT1 (AT2G26650) の cDNA 断片を、次のオリゴヌクレオチドプライマー: 5' - CGGGATCCGAGATGTCGAGTCTCGAAGATA TCAAGAAC - 3' (配列番号 3) および 5' - CGGGATCCCTACACA GTGTAGTGA CTGGG - 3' (AHA2 用) (配列番号 4)、5' - GCCTC TAGAGTTATGGGGATGGAGAGGCCAAGAGCCC - 3' (配列番号 5) および 5' - CATGCCATGGCGAAGAGGTCAATCTCCAAGT CCG - 3' (PHOT2 用) (配列番号 6)、5' - GCCTCTAGAAAGATG TCGATCTCTTGGACTCG - 3' (配列番号 7) および 5' - GCCTCT AGATCAATTTGATGAAAAATACAAATGATCACCC - 3' (KAT1 用) (配列番号 8)、ならびに 5' - GCCTCTAGAGTGTGAGAGGGAG GGGCTTTGTTATGC - 3' (配列番号 9) および 5' - GCCTCTAGA TTAAGAATCAGTTGCAAGATGAGATGATC - 3' (AKT1 用) (配列番号 10) を用いて増幅した。増幅した DNA 断片を、BamHI、XbaI または NcoI を使用して pPZP211 - GC1 に挿入した。pPZP211 - GC1: : PHOT2 内の PHOT2 コード配列の終止コドンを、S65T 変異を有する合成緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子 (GFP) と置き換えた。単一アミノ酸置換 (P68S) を、次のプライマー: 5' - GGGGTTTATGTGG AATTC ACTTTTCAT GGGTCA TGG - 3' (配列番号 11) および 5' - CCATGACCCATGA AAGTGAATTCACATAAACCC - 3' (配列番号 12) を使用して部位特異的突然変異誘発により pPZP211 - GC1: : AHA2 に導入した。GC1: : FT - GFP の構築については以前に記載した (21)。全ての植物形質転換用プラスミドベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) (GV3101) に導入し、これをその後、標準法を利用して植物を形質転換するために使用した。F₃ ホモ接合型植物を実験のために使用した。

20

30

40

RT - PCR

全 RNA を、RNeasy 植物 Mini Kit (Qiagen) を使用して表皮断片から抽出した。該表皮断片は、播種後 4 ~ 6 週目の植物体の完全に展開した口ゼット葉か

50

ら以前に記載した通りに単離した(26)。一本鎖cDNAをPrimeScript II First Strand cDNA Synthesis Kitを用い、オリゴ(dT)プライマー(Takara)を使用して全RNAから合成した。AHA2およびTUB2のcDNA断片は、次のオリゴヌクレオチドプライマー：5'-GGGGAATTCATGTCGAGTCTCGAAG-3' (配列番号13)および5'-GGGGAATTCTACACAGTGTAGTGAC-3' (AHA2用) (配列番号14)、ならびに5'-CAATTGTTGATCTCTAAGATCCGTG-3' (配列番号15)および5'-TACTGCTGAGAACCTCTTGAG-3' (TUB2用) (配列番号16)を用いて増幅した。全てのPCRを30サイクル実施した。

孔辺細胞における細胞膜H⁺-ATPaseの免疫組織化学的検出

免疫組織化学的検出を、従来の方法(26)に従い、これに修正を加えて実施した。野生型およびAHA2-形質転換植物の完全に展開したロゼット葉を収穫した後、小片に切り分けた。該小片を、固定バッファー[50mM PIPES-NaOH(pH7.0), 5mM MgSO₄, 5mM EGTA]中室温で1時間、パラホルムアルデヒドから新たに調製した4%(w/v)ホルムアルデヒドを用いて固定した。この固定試料をリン酸緩衝食塩水(PBS; 137mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄)を用いて洗浄し、37℃で100%メタノールを用いて脱色した後、Milli-Q水(Millipore)を用いて室温で洗浄した。この脱色試料をスライドガラスに貼り付け、カバーガラスで封止してから、液体窒素を用いて5回冷凍および解凍した。カバーガラスを取り外した後、該試料を一晩かけて完全に乾燥させた。2日目に、該試料を、PBS中の4%Cellulase Onozuka R-10(Yakult)および0.5%Macerozyme R-10(Yakult)を用いて37℃で1時間、スライドガラス上で消化した。消化後、該試料をPBSで洗浄し、さらに3%(v/v)Nonidet P-40(NP-40; MP Biomedicals)および10%(v/v)ジメチルスルホキシド(DMSO; Wako)を用いて室温で30分間透過処理した。該試料を次にPBSで洗浄し、さらにPBS中の3%ウシ血清アルブミンFraction V(BSA; Sigma)を用いて室温で1時間ブロックした。その後、該試料を、3%(w/v)BSAを含むPBSで1:5,000に希釈した抗-H⁺-ATPase抗体と共に37℃で6時間、または4℃で一晩インキュベートした。該試料をPBSで洗浄し、さらに3%(w/v)BSAを含むPBSで1:500に希釈したAlexa Fluor 488ヤギ抗-ウサギIgG(Invitrogen)と共に37℃で3時間暗所にてインキュベートした。PBSによる洗浄後、各標本を50%(v/v)グリセロールを用いてカバーガラス下に封入した。該標本を、励起光源としてHgアークランプを使用し、Alexa Fluor 488用の狭帯域励起バンドパスフィルターセットBP460-480HQ BA495-540HQ(U-MGFPHQ; Olympus)を備えた蛍光顕微鏡(BX50; Olympus)で観察した。蛍光画像はCCDカメラシステム(DP72; Olympus)を使用して収集し、さらにDP2-BSWソフトウェア(Olympus)を使用して処理した。蛍光強度を評価するために、全ての画像を同一露光時間で撮影した。気孔の蛍光強度はImageJ(NIH)を使用して数値化した。

気孔開度の測定

気孔開度は従来の方法(27)に従い、これに若干の修正を加えて測定した。一晩暗順応させた播種後3~4週目の植物体から単離した表皮組織を、基礎バッファー(basal buffer)(5mM MES-BTP, pH6.5, 50mM KCl, および0.1mM CaCl₂)中でインキュベートした。光による気孔開口のABAによる阻害のために、表皮組織を、20μM ABAの存在下または非存在下24℃で2.5時間、青色光/赤色光[50μmol m⁻² s⁻¹のバックグラウンド赤色光(LED-R; EYELA)に重ね合わせた10μmol m⁻² s⁻¹の青色光(Stick-B-32; EYELA, Tokyo, Japan)]下でインキュベートした。背軸側表皮における気孔開度を顕微鏡で測定した。気孔開度は25個の気孔の平均値として標準誤

10

20

30

40

50

差 (SEM) と共に示した。結果は、別の研究員による盲検的再評価 (blind re-assessment) により確認した。

ガス交換測定

ガス交換測定は LI-6400 システム (Li-Cor) を使用して実施し、またパラメーターは製造業者から提供されたソフトウェアを用いて算出した。白色光は、光源としてハロゲンプロジェクターランプ (15 V / 150 W; Moritex Corporation, Japan) を備えた光ファイバー照明器により供給した。電源 (MHA B-150 W, AC 100 V, 2.2 A, 50 / 60 Hz; Moritex Corporation) を使用してランプに電力を供給した。一連の光学クラウンガラス金属中性濃度フィルター (Newport Japan, Hakuto Co., Ltd, Japan) を用いて光を減衰させた。流速、葉温および相対湿度は、それぞれ $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ 、24 および 40 ~ 50 % で一定に保った。光反応曲線に関しては、条件は同じとし、また最初の 30 分間の暗順応後は、白色光の強度を 20 分超の間隔で増加させた (安定状態 (stable statue))。CO₂ 反応曲線に関しては、葉を先ず $400 \mu\text{L L}^{-1}$ の CO₂ に飽和白色光条件 (約 $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下で 40 分間順化させた後、CO₂ 濃度を約 20 分の間隔で $50 \mu\text{L L}^{-1}$ CO₂ から $1,500 \mu\text{L L}^{-1}$ へと段階的に増加させた。

10

気孔の密度、指数および大きさ

異なる植物体から完全に展開した葉を選択した。ガス交換測定のために使用した葉の葉身の同一部位から無作為に 3 枚の顕微鏡写真を撮影した。気孔密度を算出するために、各顕微鏡写真中の気孔の数を数えた。気孔指数 (I) は $I = [S / (E + S)] \times 100$ (式中の S は気孔の数であり、かつ E は表皮細胞の数である) として算出した。気孔の長軸を該気孔の大きさとして使用した。

20

統計解析

有意性は、Excel (Microsoft) を使用したスチューデントの t - 検定に従って判定した。両側検定を等分散行列 (homoscedastic matrices) について実施した。

参考文献

1. Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 33: 317 - 345.
2. Hetherington AM, Woodward FI (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424: 901 - 908.
3. Kusumi K, Hirotsuka S, Kumamaru T, Iba K. (2012) Increased leaf photosynthesis caused by elevated stomatal conductance in a rice mutant deficient in SLAC1, a guard cell anion channel protein. *J Exp Bot* 63: 5635 - 5644.
4. McGrath J, Lobell D (2013) Reduction of transpiration and altered nutrient allocation contribute to nutrient decline of crops grown in elevated CO₂ concentrations. *Plant Cell Environ* 36: 697 - 705.
5. Roelfsema MRB, Hedrich R (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the watergate'. *New Phytol* 167: 665 - 691.
6. Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, K

30

40

50

- wak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:627-658.
7. Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58:219-247.
8. Kinoshita T, Hayashi Y (2011) New insights into the regulation of stomatal opening by blue light and plasma membrane H⁺-ATPase. *Int Rev Cell Mol Biol* 289:89-115 10
9. Sharkey TD, Ogawa T (1987) in *Stomatal Function, Stomatal responses to light*, eds Zeiger E, Farquhar G, Cowan I (Stanford Univ Press, Stanford, CA), pp 195-208.
10. Vavasseur A, Raghavendra AS (2005) Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytol* 165:665-682.
11. Baroli I, Price D, Badger MR, von Caemmerer S (2008) The contribution of photosynthesis to the red light response of stomatal conductance. *Plant Physiol* 146:737-747. 20
12. Wang Y, Noguchi K, Terashima I (2011) Photosynthesis-dependent and -independent responses of stomata to blue, red and green monochromatic light: differences between the normally oriented and inverted leaves of sunflower. *Plant Cell Physiol* 52:479-489. 30
13. Kinoshita T, et al. (2001) phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414:656-660.
14. Kinoshita T, Shimazaki K (1999) Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J* 20:5548-5558.
15. Kinoshita T, Shimazaki K (2002) Biochemical evidence for the requirement of 14-3-3 protein binding in activation of the guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase by blue light. *Plant Cell Physiol* 43:1359-1365. 40
16. Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba* L. *Nature* 318:285-287.
17. Shimazaki K, Iino M, Zeiger E (1986) Blue light-dependent proton extrusion by gu 50

ard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 319:324-326.

18. Schroeder JI, Raschke K, Neher E (1987) Voltage dependence of K^+ channels in guard cell protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4108-4112.

19. Kwak JM, et al. (2001) Dominant negative guard cell K^+ channel mutants reduce inward-rectifying K^+ currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127:473-485. 10

20. Szyroki A, et al. (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2917-2921.

21. Kinoshita T, et al. (2011) FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening. *Curr Biol* 21:1232-1238.

22. Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI (2008) Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* 4:6. 20

23. Ueno K, Kinoshita T, Inoue S, Emi T, Shimazaki K (2005) Biochemical characterization of the plasma membrane H^+ -ATPase activation in guard-cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. *Plant Cell Physiol* 46:955-963.

24. Ogren E, Evans JR (1993) Photosynthetic light-response curves: I. The influence of CO_2 partial pressure and leaf inversion. *Planta* 189:182-190. 30

25. Merlot S, et al. (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H^+ -ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO J* 26:3216-3226.

26. Hayashi M, Inoue S, Takahashi K, Kinoshita T (2011) Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H^+ -ATPase in stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol* 52:1238-1248. 40

27. Inoue S, et al. (2008) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5626-5631.

配列番号1 (NCBI Reference Sequence: NM_001203941.1)

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のAHA2遺伝子の塩基配列 50

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) H (+) - ATPase
2 (HA2) mRNA、完全長 c d s

C D S 1 3 9 . . 3 0 8 4

```

139          at gtogagtctc gaagatatca agaacgagac tgttgatctg
181 gaaaaaattc cgattgagga agttttccag cagctaaaat gttcaaggga aggattgaca
241 acgcaggaag gggaggacag gattcagatc ttggcccca acaagctcga agagaaaaag
301 gaaagcaaac ttctgaagtt tttggggttt atgtggaatc cactttcatg ggtcatggaa
361 atggctgcaa tcatggcoat tgctttggcc aacggtgatg gtaggcctcc ggattggcag
421 gattttgttg gtattatctg tctgttggtt atcaactcta ccatcagttt tatogaagaa
481 aacaatgctg gtaatgctgc tgctgctctt atggctggtc ttgctcctaa aaccaaggtt
541 cttagggatg gaaagtggag tgaacaagaa gctgctattc ttgtcccagg agatattggt
601 agcattaaat taggagacat tatcccagct gatgcccgtc tacttgaagg tgatccttta
661 aaggttgacc aatctgctct aactggagag tcccttcctg taaccaagca ccogggtcaa
721 gaagttttct ctggttcaac ctgcaaacia ggagaaatcg aggcggttgt tattgccact
781 ggggttcata ctttcttcgg taaagctgct caccttgttg acagcactaa ccaagttgga
841 cattccaga aggttcttac agccattggg aacttctgta tctgttccat tgctatcggt
901 atggtgattg agatcatcgt catgtatccg atccaacgcc gaaagtacag agatggaatt
961 gacaaccttt tggctcctct gatcgggtgt atccccattg ctatgcctac agtcttgtcc
1021 gtgaccatgg ctattgggtc tcacaggttg tctcagcaag gtgccatcac caagcgtatg
1081 actgccattg aagagatggc aggaatggat gtctctgtgca gtgacaaaac cgggacacta
1141 accctcaaca aattgagtgt ggacaaaaac ttggtcgagg ttttctgcaa ggggtgtggag
1201 aaagatcaag tcctattatt tgcagctatg gcttccaggg ttgagaacca ggatgccatt
1261 gatgcagcca tggttgggat gcttgcctgat ccaaaggagg ctagagctgg aatcagggaa
1321 gttcaacttc ttccattcaa ccctgtggat aagagaactg ctttgactta cattgacggc
1381 agtggtaact ggcacagagt cagtaaaggt gctcctgagc agatcctoga acttgccaaa
1441 gccagcaatg atcttagcaa gaaggtgctc tccattattg acaagtatgc tgagcgtggt
1501 cttaggtcgt tggctgttgc tggccaggtg gtgccagaga aaacaaagga aagcccaggt
1561 ggcocatggg aatttgttgg cttgttgcca ctttttgatc cccaagaca tgacagtgct
1621 gaaacaattc gacgggcttt gaatcttggt gttaacgtca agatgatcac tggtgaccaa

```

1681 cttgctattg gtaaggaaac tggtcgcaga cttggaatgg gaacaaacat gtatccatct
 1741 tcggctcttc ttggtacaca caaagaacga aacctogcat ccattcctgt tgaggagttg
 1801 attgaaaagg ctgatggatt tgccggagtc ttcccagggtt ataatctgct tatttattgt
 1861 ttggattata aacctacta tatgttcatt gcaaagggtg tgatgttagt tctaagcttt
 1921 gtttttttta ttgcagagca caaatacga atgttgaaaa agttgcagga gaggaagcat
 1981 attgttgga tgactgggta tgggtgcaat gatgcccctg ctctaaagaa agctgatac
 2041 ggtattgctg ttgctgatgc tacagatgct gctcgtgggtg cttcagatat cgtgctcact
 2101 gagcctggac tcagcgttat tatcagtgct gttctcacca gcagagctat tttccagaga
 2161 atgaagaact atactatcta tgcagtctca atcaccatcc gtattgtgtt tggtttcatg
 2221 cttattgctt tgatatggga atttgaactc tcagccttca tggttctgat cattgccatt
 2281 cttaacgacg gtaccatcat gacaatctca aaggacagag ttaagccatc tcccacacct
 2341 gatagctgga aacttaaaga aatttttgct actggagtcg ttctaggagg ctaccaggcc
 2401 atcatgactg ttattttctt ctggggcggcg cacaagactg actttttctc ggacacattc
 2461 ggtgtgaggt ccattaggga caataaccac gagctaattg gtgcggtgta cttacaagtt
 2521 agtatcatta gtcaagctct gatcttcgtc acaagatcaa ggagttggtc tttgttgaa
 2581 cgtcctggag cattgctgat gattgcttcc ctcatgcaac aactgattgc tactttgatt
 2641 gcggtttacg ccaactggga atttgcaaag attaggggta ttggatgggg atgggctggt
 2701 gtgatctggc tatacagtat tgtoacatac ttcccattgg acgttttcaa gtttgccatt
 2761 cgatacatct tgagcggaaa ggctggtctc aacttgtttg agaacaagac ggctttcacg
 2821 atgaagaaag attacggaaa agaagagaga gaggctcaat gggcacttgc tcaaaggaca
 2881 cttcacggtt tacagccaaa agaagctggt aacatcttcc ctgagaaagg aagttacaga
 2941 gaattgtctg agatcgctga gcaagctaag agaagagctg agatcgctag gcttagggag
 3001 ctgcacacac tcaagggaca tgtggaatca gtcgtgaagc taaagggctt ggacattgaa
 3061 actcccagtc actacactgt gtag

10

20

30

配列番号2 (A t 1 g 2 2 6 9 0) プロモーター (- 1 , 7 0 2 b p ~ - 1 b p)
 シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の GC 1 プロモーター
 の塩基配列

Yang , Y . , Costa , A . , Leonhardt , N . , Siegel , R . S .
 , および Schroeder , J . I . (2 0 0 8) . Isolation of a
 strong *Arabidopsis* guard cell promoter
 and its potential as a research tool . *Plant
 Method* . 4 , 6 .

Kinoshita , T . , Ono , N . , Hayashi , Y . , Morimoto ,
 S . , Nakamura , S . , Soda , M . , Kato , Y . , Ohnishi , M .
 , Nakano , T . , Inoue , S . , 他 (2 0 1 1) . FLOWERING L
 OCUS T regulates stomatal opening . *Curr . B
 iol* . 2 1 , 1 2 3 2 - 1 2 3 8 .

40

CTACAAGAAGAGTAAAGATTGAGTAACCCGATGCTCCTGCTCTTCTCAAGACCTTCCTTGATTGCGCGCCGGTATGT
 TCTCGGTCTGTGGTAGCGCCTTTGGAACACTCTACCAACGCCGCATGAAAGGATCTCTCATGGCCGACAGGGACGTG
 TTCTTCTACATCTGGTGTTAGGGCTATGTTACTCCAGTGAGGAGGGAGAGGCAAGAGGTTGCTTAATGATTGCTTT

TTCCGGTGATACGAGAACTCTTTAGGTTTACCGGGAAGGTTTTCCCATGAAAATGGGATGCCAAGTGGATGGAGAGGA
 GTTGCCGGAGAGTTGCCGGAGAATAGGAGGGAATTGGAGGAGGAGGAAGAGAGTGATCGCCGGGTTGAAATGTTAACC
 GTCGAGGAGAATTTGACCGAGTTGGATCGTCTAGTAGGTACAATTCGGGTCCTTGGCGAAGTATCCATtcaaaatagt
 gtttagttttggacttgagaacttgttgtctctttgatctcttttatataaaaactttggacgtgtaggacaaaacttgt
 caacataagaaacaaaatggttgcaacagagaggatgaatttataagttttcaacaccgcttttcttattagacggac
 aacaatctatagtgaggataaatttttttttggtaaaatggtagtgaattcaaatactaaattttgtgactcact
 aacattaacaaaatagcataagacataaaaaaaaaagaagaataattcttatgaaacaagaaaaaaaaacctatacaatc
 aatcttttaggaattgacgatgtagaattgtagatgataaattttctcaaatatagatgggcctaatgaagggtgccgc
 ttattggatctgacccattttgaggacattaatttttcattggttataagccttttaatacaaaattgtcattaaatt
 gatgtctccctctcgggtcattttctctctccctcacaattaatgtagacttttagcaattttgcacgctgtgctttgt
 ctttatatttagtaacacaaaacattttgacttgtctttagagtttttctctttttattttctatccaatatgaaaac
 taaaagtgttctcgtatacatatattaaaattaaagaaacctatgaaaacaccaatacaaatgcatattgttttcag
 ttcgaagtttcatgtttgtagaaaatttctaatacgtttgtataaaaatagacaattaaacgccaacactacatct
 gtgttttcgaacaatattgctctcgttttctctctctcagtgtcacaatgtctgaactaagagacagc
 tgtaaaactatcattaagacataaaactaccaaaagtatcaagctaattgtaaaaattactctcatttccacgtaacaaatt
 gagttagcttaagatattagtgaactaggtttgaattttctctctctctcctcagtcacatcctccgaaaaaagggaac
 caatcaaaactgtttgcatatcaaaactccaacactttacagcaaatgcaatctataatctgtgatttatccaataaaa
 acctgtgatttatgtttggctccagcagatgaaagtctatgcatgtgatctctatccaacatgagtaattgttcagaaa
 ataaaaagtagctgaaatgtatctatataaagaatcatccacaagtaactattttcacacactacttcaaaatcactac
 tcaagaaat

10

20

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許および特許出願は、参照によりそれらの全内容が本明細書中に組み込まれるものとする。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY

<120> METHOD OF INCREASING PHOTOSYNTHESIS AND PRODUCTION OF PLANT

<130> PH-5522-PCT

<150> US 61/777,655

<151> 2013-03-12

<160> 16

10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2946

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atgtcagatc tcgaagatal caagaacgag actgttgatc tggaaaaaat tccgattgag 60

gaagtttcc agcagctaaa atgttcaagg gaaggattga caacgcagga aggggaggac 120

20

aggattcaga tctttggccc caacaagctc gaagagaaaa aggaaagcaa acttctgaag 180

tttttgggt ttatgtggaa tccacttca tgggcatgg aaatggctgc aatcatggcc 240

attgctttgg ccaacggtga tggtagcct cgggatggc aggatlttgt tggtaattc 300

tgtctgttg ttatcaactc taccatcagt tttatcgaag aaaacaatgc tggtaatget 360

gctgctgctc ttatggetgg tcttgcctc aaaaccaagg ttcttaggga tggaaagtgg 420

agtgaacaag aagctgctat tcttgcceca ggagalattg ttagcattaa attaggagac 480

30

attatcccag ctgatccccg tctacttgaa ggtgatcctt taaaggttga ccaatctgct 540

ctaactggag agtcccttcc tgtaaccaag cacccegggc aagaagttt ctctggttca 600

acctgcaaac aaggagaaat cgaggcgggt gttattgcca ctggggttca taccttctc 660

ggtaaagctg ctacacttgt ggacagcact aaccaagttg gacatttcca gaaggttctt 720

acagccattg ggaacttctg tatctgttcc attgctatcg gtatggtgat tgagatcacc 780

gtcatgtacc cgatccaacg ccgaaagtac agagatggaa ttgacaacct tttggtctc 840

40

ttgatcggtg gtatcccac ttgatgcct acagcttgt ccgtgacat ggctattggg 900

tctcacaggt tgtctcagca aggtgccacc accaagcgtg tgactgccat tgaagagatg 960

gcaggaatgg atgtcctgtg cagtgacaaa accgggacac taacctcaa caaattgagt 1020

gtggacaaaa acttggtcga ggtttctgc aagggtgtgg agaaagatca agtccatata 1080

tttgagctc tggcttccag ggttgagaac caggatgcca ttgatgcacc catggttggg 1140

atgcttgctg atccaaagga ggctagagct ggaatcaggg aagttcactt ccttccattc	1200	
aaccctgtgg ataagagaac tgctttgact tacattgacg gcagtggtaa ctggcacaga	1260	
glcagtaaag gtgctcctga gcagatcctc gaacttgcca aagccagcaa tgatcttagc	1320	
aagaaggtagc tctccattat tgacaagtat gctgagcgtg gtcttaggtc gttggctggt	1380	
gctcgccagg tggtgccaga gaaaacaaag gaaagcccag gtgcgccaig ggaatttggt	1440	
ggcttggtgc cactttttga tcccccaaga catgacagtg ctgaaacaat tcgacgggct	1500	10
ttgaatcttg gtgttaacgt caagatgac actggtgacc aacttgctat tggttaaggaa	1560	
actggctgca gacttggaaat gggaacaaac atgtatccat cttcggctct tcttggtaga	1620	
cacaaagacg caaaccctgc atccattcct gttgaggagt tgatigaaaa ggctgatgga	1680	
tttgcggag tcttcccagg ttataactg ctattttatt gtttggatta taaacctcac	1740	
tatatgttca ttgcaaaggt ggtgatgta gtctaaagct ttgtttttt tattgcagag	1800	
cacaaatagc aaatttgtaa aaagttgcag gagaggaagc atattgttgg aatgactggt	1860	20
gatgggtgca atgatgcccc tgctctaaag aaagctgata tcggtattgc tgttgcctgat	1920	
gctacagatg ctgctctggtg tgcttcagat atcgtgctca ctgagcctgg actcagcgtt	1980	
attatcagtg ctgttctcac cagcagagct attttccaga gaatgaagaa ctatactatc	2040	
tatgcagtct caatcaccat ccgtattgtg tttggtttca tgcttattgc tttgatatgg	2100	
gaatttgact tctcagcctt catggttctg atcattgcca ttcttaacga cggtaaccac	2160	
atgacaactc caaaggacag agttaagcca tctcccacac ctgatagctg gaaacttaaa	2220	30
gaaatttttg ctactggagt cgttctagga ggctaccagg ccatcatgac tgttattttc	2280	
ttctggggcg cgcacaagac tgactttttc tcggacacat tcggtgtgag gtccattagg	2340	
gacaataacc acgagctaat ggggtgcggtg tacttacaag ttagtatcat tagtcaagct	2400	
ctgatcttgc tcacaagatc aaggagttag tcttttgttg aacgtcctgg agcattgctg	2460	
atgattgctt tctcatttgc acaactgatt gctactttga tgcggttta cgcacaactg	2520	
gaatttgcaa agattagggg tattggatgg ggatgggctg gtgtgatctg gctatacagt	2580	40
attgtcacat acttcccatt ggacgtttc aagtttgcca ttcgatacat ctgagcggga	2640	
aaggcgtggc tcaacttggt tgagaacaag acggctttca cgatgaagaa agattacgga	2700	
aaagaagaga gagaggctca atgggcactt gctcaaagga cacttcacgg ttacagcca	2760	
aaagaagctg ttaacatctt ccctgagaaa ggaagttaca gagaattgtc tgagatcgt	2820	
gagcaagcta agagaagagc tgagatcgct aggccttagg agctgcacac actcaaggga	2880	

catgtggaat cagtcgtgaa gctaaagggc ttggacatlg aaactcccag tcactacact	2940	
gtgtag	2946	
<210> 2		
<211> 1725		
<212> DNA		
<213> Arabidopsis thaliana		
<400> 2		10
ctacaagaag agtaaagatt cagtaaccgc atgctcctgc tcttctcaa gaccttctt	60	
gattcgccgc eggtatgttc tccgtctgtg gtagcgcctt tggaacactc taccaacgcc	120	
gccatgaaag gatctctcat ggccgcaggg gacgtgttct tcttacatct ggtgttaggg	180	
ctatggttac tccagtgagg agggagaggc aagaggttgc ttaatgatte gtttttcgg	240	
tgatacgaga actcttttagg ttaceggga aggttttccc atgaaaatgg gatgccaagt	300	
ggatggagag gagttagcgg agagttgccg gagaatagga gggaaattgga ggaggaggaa	360	20
gagagtgate gccgggttga aatgtlaacc gtcgaggaga atttgaccga gttggatcgt	420	
clagtaggta caattcgggt ccttggcgaa gtaaccattc aaaaatagtgt ttagttttgg	480	
acttgagaac ttgttgtctc ttgactctc ttatataaaa actttggacg tgtaggacaa	540	
acttgtcaac ataagaaaca aaatggttgc aacagagagg atgaatttat aagttttcaa	600	
caccgctttt ctiattagac ggacaacaal ctatagtgga gtaaattttt attttttgta	660	
aaatggttag tgaattcaaa tatctaaatt ttgtactca ctaacattaa caaatatgca	720	
taagacataa aaaaaagaaa gaataattct tatgaaaca gaaaaaaaaac ctatacaatc	780	30
aatcttttag aattgacgat gtagaattgt agatgataaa tttctcaaa tatagatggg	840	
cctaatagag ggtgccgctt attggatcig acccattttg aggacattaa tattttcatt	900	
ggttataage cttttaatca aaattgtcat taaattgatg tctccctctc gggtcatttt	960	
ccittctccc tcacaattaa ttagactttt agcaatttgc acgctgtget ttgctttat	1020	
atntagtaac acaaacattt tgacttgtct ttagagttt tctctttta ttttctatc	1080	
caatatgaaa actaaaagtg ttctcgtata calatattaa aattaaagaa acctatgaaa	1140	40
acaccaatac aaatgcgata ttgtttcag ttgcagttt catgtttgtt agaaaatttc	1200	
taatgacgtt tgtataaaat agacaattaa acgcaaaaca ctacatctgt gttttcgaac	1260	
aatattgcgt ctgcgtttcc ttcactatc tctctcagtg tcacaatgtc tgaactaaga	1320	
gacagctgta aactatcatt aagacataaa ctaccaaagt atcaagctaa tgtaaaaatt	1380	

actctcattt ccacgtaaca aattgagtta gcttaagata tiagtgaaac taggtttgaa	1440	
ttttcttctt cttcttccat gcatectcgg aaaaaaggga accaatcaaa actgittgca	1500	
tatcaaacte caacacttia cagcaaatgc aatctataat ctgtgattta tccaataaaa	1560	
accigtgatt tatgittggc tccagegatg aaagictatg catgigatct ctatccaaca	1620	
tgagtaattg ttcagaaaat aaaaagtage tgaaatgtat ctatalaaag aatcatccac	1680	
aagtactatt ttcacacact acttcaaaat cactactcaa gaaat	1725	10

<210> 3
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic DNA

<400> 3		
egggatccga gatgtcgagt ctccaagata tcaagaac	38	20

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic DNA

<400> 4		
egggatccct acacagtgtg gtgactggg	29	30

<210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic DNA

<400> 5		
gcctctagag ttatggggat ggagaggcca agagccc	37	40

<210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic DNA

<400> 6

catgcatgg cgaagaggtc aatctccaag tccg	34	
<210> 7		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		10
<400> 7		
gcctctagaa agatgtegat ctcttgact cg	32	
<210> 8		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		20
<400> 8		
gcctctagat caattigatg aaaaatacaa atgatacc	39	
<210> 9		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		30
<400> 9		
gcctctagag tgatgagagg aggggctttg ttatgc	36	
<210> 10		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		40
<400> 10		
gcctctagat taagaatcag ttgcaaagat gagatgatc	39	
<210> 11		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		

<400> 11		
ggggtttatg tggaattcac tticatgggt catgg	35	
<210> 12		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		10
<400> 12		
ccatgaccca tgaaagtga ttcacataa acccc	35	
<210> 13		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		20
<400> 13		
ggggaattca tgtcgagtct cgaag	25	
<210> 14		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		30
<400> 14		
ggggaattct acacagtga gtgac	25	
<210> 15		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Synthetic DNA		40
<400> 15		
cattgtgat ctctaagatc cgtg	24	
<210> 16		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial		

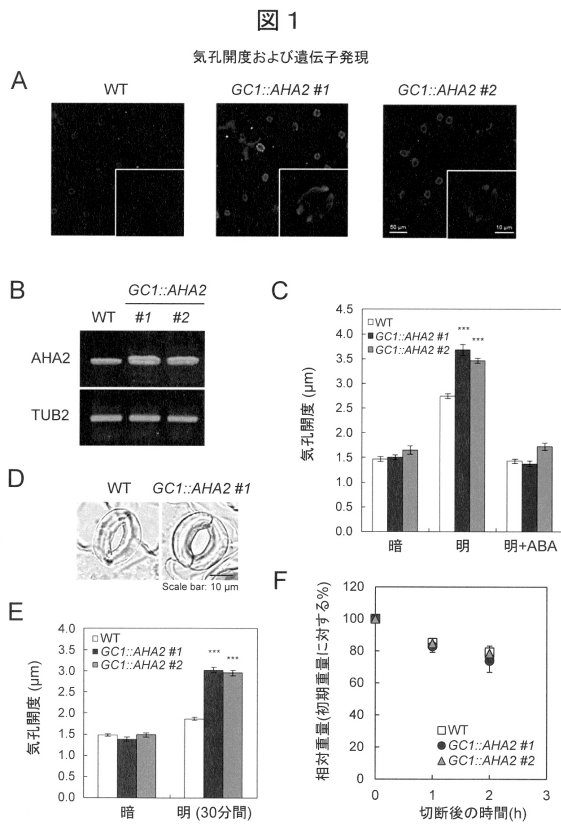
<220>

<223> Synthetic DNA

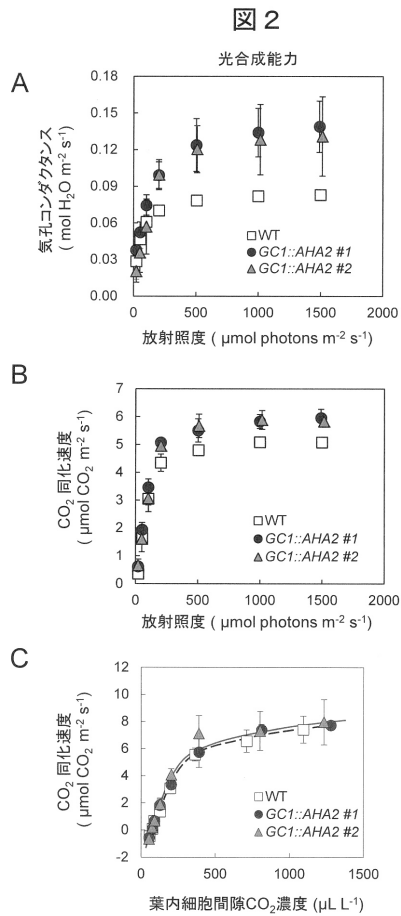
<400> 16

tactgctgag aacctcttga g

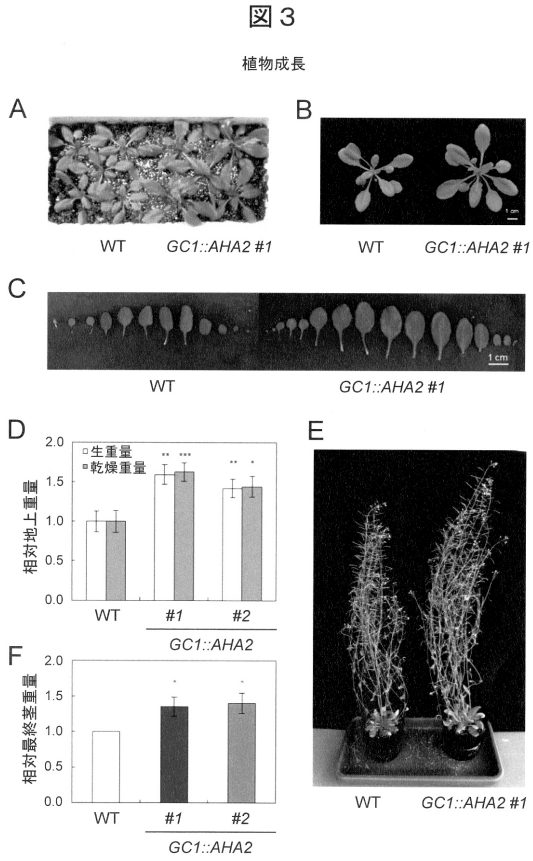
【 図 1 】



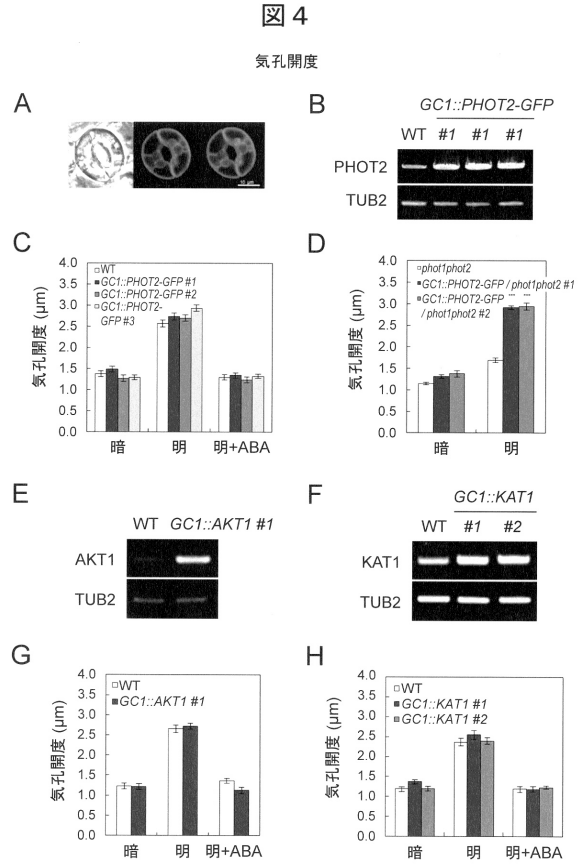
【 図 2 】



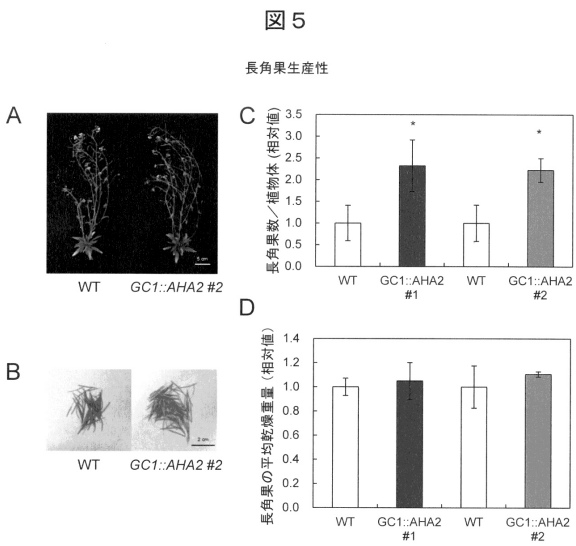
【 図 3 】



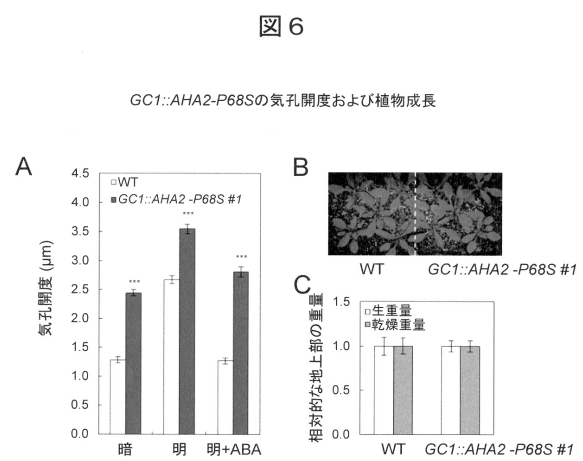
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

図 7

表1. 野生型(WT) およびGC1::AHA2 形質転換植物のガス交換パラメーター

	WT	GC1::AHA2 #1		GC1::AHA2 #2	
CO ₂ 同化速度 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (CO ₂ = 380 $\mu\text{L L}^{-1}$)	5.06 ± 0.31	5.64 ± 0.08 *	(+11.46%)	5.96 ± 0.20 *	(+17.79%)
気孔コンダクタンス ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0.086 ± 0.009	0.124 ± 0.016 *	(+44.19%)	0.128 ± 0.023 *	(+48.83%)
水利用効率	3.10 ± 0.41	2.97 ± 0.56	ns	2.73 ± 0.69	ns
最大光合成CO ₂ 同化速度 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (CO ₂ = 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$)	7.40 ± 0.99	7.73 ± 0.13	ns	7.96 ± 1.66	ns

水利用効率はCO₂ 同化速度と蒸散速度との比として算出した; 最大光合成CO₂ 同化速度は周囲CO₂を1500 mL L⁻¹に維持して算出した。
*学生t検定によればP < 0.05; ±SD (n ≥ 3). nsは非有意を表す。

【 図 8 】

図 8

表2. 野生型(WT)およびGC1::AHA2 形質転換植物の気孔の密度、指数、および大きさ

		WT	GC1::AHA2 #1	GC1::AHA2 #2
気孔の密度 (/mm ²)	向軸側	88.5 ± 13.8	84.8 ± 12.8	87.0 ± 12.2
	背軸側	130.2 ± 18.8	129.5 ± 25.4	122.0 ± 15.6
気孔の指数	向軸側	0.36 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.37 ± 0.05
	背軸側	0.30 ± 0.06	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03
気孔の大きさ (μm)	向軸側	24.94 ± 1.94	24.83 ± 2.34	24.59 ± 1.97
	背軸側	23.28 ± 2.16	23.54 ± 2.66	23.20 ± 1.76

【 図 9 】

図 9

表3. 野生型(WT)および形質転換植物の地上部のバイオマス生産性

	生重量	乾燥重量
WT	100%	100%
GC1::AHA2 #1	159.7 ± 12.7%	163.1 ± 11.6%
GC1::AHA2 #2	142.1 ± 11.7%	144.6 ± 13.3%
強光		
GC1::PHOT2-GFP #3	99.3 ± 7.3%	95.6% ± 6.5%
GC1::AKT1 #1	78.4 ± 7.5%	78.0% ± 8.0%
GC1::KAT1 #2	101.5 ± 26.2%	106.5 ± 27.6%
GC1::FT-GFP #1	94.5 ± 13.5%	102.0 ± 13.7%
GC1::AHA2-P68S #1	99.7 ± 6.4%	100.0 ± 6.3%
弱光		
WT	100%	100%
GC1::AHA2 #1	107.4 ± 26.2%	112.8% ± 15.4%
WT		100%
最終茎 GC1::AHA2 #1		135.6% ± 13.3%
GC1::AHA2 #2		140.6% ± 14.6%

*強光 = 200 mmol photons m⁻² s⁻¹; 弱光 = 80 mmol photons m⁻² s⁻¹

【 図 10 】

図 10

遺伝子発現 (WTに対する比)

RT-PCR	AHA2	AHA2/TUB	n
GC1::AHA #1	1.47	1.49	n = 4
GC1::AHA #2	1.33	1.39	n = 3
(GC1::AHA #1 GC1::AHA #2)	1.51 1.31	1.61 1.50	図1参照
GC1::AKT1 #1	AKT1 2.18	AKT1/TUB 2.12	n = 2
GC1::KAT1 #1	KAT1 1.39	KAT1/TUB 1.26	n = 4
GC1::KAT1 #2	1.43	1.52	n = 3
GC1::PHOT2-GFP #1	PHOT2 1.53	PHOT2/TUB 1.72	n = 5
GC1::PHOT2-GFP #2	1.58	1.85	n = 5
GC1::PHOT2-GFP #3	1.69	1.90	n = 5
IHC	AHA2		
GC1::AHA #1	1.65		n = 6
GC1::AHA #2	1.49		n = 3

フロントページの続き

- (72)発明者 王 いん
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 井上 晋一郎
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 小野 奈津子
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

審査官 川合 理恵

- (56)参考文献 国際公開第2013/023992(WO, A1)
日本植物学会第76回大会研究発表記録, 公益社団法人日本植物学会, 2012, p.221(要旨番号P-096)
蛋白質 核酸 酵素, 2006, Vol. 51, No. 7, pp.871-876
Plant Cell Physiol., 2005, Vol. 46, No. 6, pp. 955-963
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2001, Vol. 52, pp. 817-845
Plant Methods, 2008, 4:6, URL, <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4811-4-6>
New Phytologist, 2013, Vol. 198, pp. 757-764, URL, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.12186/pdf>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)