

「植物の機能と制御」

平成 12 年度採択研究代表者

齊藤 和季

(千葉大学薬学部 教授)

「ポストゲノム科学を基盤とする植物同化代謝機能のダイナミクス解明」

1. 研究実施の概要

本研究では、急速にゲノム解析が進んでいるシロイヌナズナとイネを研究材料として、プロテオミクスやメタボロミクスなどのポストゲノム科学を基盤とした炭素・窒素・硫黄・リンの同化代謝間相互のダイナミクスを解明することを目的とする。本年度は主にポストゲノム解析のための基礎的な研究を行った。特に、シロイヌナズナを用いたトランスクリプトミクスを開始し、またメタボロミクスの基礎的検討を行いアクティベーションタグラインのスクリーニングも開始した。硫黄同化系については、シロイヌナズナゲノムに同定した14個の硫酸イオントランスポーター遺伝子のうち高親和型のトランスポーターの機能解析を進め、また、セリン代謝とシステイン代謝の分岐点に位置するセリンアセチル転移酵素遺伝子の高発現植物体、挿入変異植物体を解析した。その結果、変異型遺伝子の高発現体において高いレベルのシステインとグルタチオンを蓄積していることが示された。窒素同化代謝については、イネのインブレッドラインを用いて量的形質を決定している遺伝子座(QTL)の解析を進め、重要な QTL をマップできた。リン酸代謝については、液胞膜リン酸輸送系の解析を進めるとともに、植物にとって最も重要なリン酸貯蔵体であるイノシトールリン酸化合物の定量的測定法を確立し、その動態の一部を解析した。また、イネの糖代謝に関与する3種類のヘキソキナーゼ遺伝子の機能解析を遺伝子破壊株を用いて進めた。また、タンパク質の大量蓄積系を制御する遺伝子(群)を同定するとともに、植物細胞に任意のタンパク質を大量蓄積させる方法論の開発をめざして研究を進めた。本年度は特異的なタンパク輸送小胞を失った突然変異株のグループ分けを行った。

2. 研究実施内容

1. 硫黄栄養に応答する遺伝子を網羅的に同定するために、シロイヌナズナのDNAアレイを用いたトランスクリプトミクスを行い、硫黄栄養変化に応答する複数の未知遺伝子を特定することができた。また、シロイヌナズナのアクティベーションタグラインを代謝産物の定量によってスクリーニングする系を確立し、スクリーニングを開始した。
2. シロイヌナズナから硫黄欠乏によって誘導される高親和型の硫酸イオントランスポーターSultr1;1に加え、さらに2種類の高親和型トランスポーターSultr1;2 と Sultr1;3 の cDNA を単離した。Sultr1;2 の発現部位は Sultr1;1 とほぼ同じく根の表皮および皮層であり、硫黄栄養が十分の時

にも強く発現しており、通常栄養時の硫酸イオン取り込みに関わっていることが示された。

3. セリンアセチル転移酵素は、システイン生合成の重要な中間体である O-アセチルセリンを生成する酵素であり、これは硫黄同化系遺伝子の発現誘導物質としての役割も果たしている。そこでシステインによりフィードバック阻害を受けない点変異体を作製し、これらの遺伝子をシロイヌナズナに導入した。得られた形質転換体の O-アセチルセリン、システイン、グルタチオン含量を測定した結果、野生型シロイヌナズナと比較して増加していた。また、硫酸イオントランスポーター遺伝子の発現も見られた。これらのことから、O-アセチルセリンを介してセリンアセチル転移酵素が制御に関わっていることが *in vivo* の実験によって証明できた。
4. 酸化型システインであるシスチンを分解するシスチンリアーゼをブロッコリーから精製し、候補 cDNA クローンを単離した。さらにそのオルソローグ遺伝子をシロイヌナズナから単離した。これらはある種のアミノ酸代謝酵素と同一か非常に相同性が高い。
5. 窒素同化代謝について、イネのインブレッドラインを用いて量的形質を決定している遺伝子座 (QTL) の解析を進め、重要な QTL をマップできた。日本型イネニホンバレとインド型イネカサラスを親とするバッククロスインブレッドライン (BIL) 98 系統を用い、老化器官からの窒素転流に鍵を握ると考えられているサイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1) の含量と、若い器官で転流窒素の再利用に重要な NADH グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) 含量の量的形質を決定している遺伝子座 (QTL) を染色体上にマップした。農業形質を決定している QTL と重複している第二染色体に着目し、コシヒカリとカサラスに由来し、第2染色体上の QTL 領域のみが分離した遺伝型をもつ C 系統群 42 個体を用い、その自殖後代からこの領域のみがカサラス由来の染色体断片で置換された系統である C-22 を選抜し、表現型の調査を行った。
6. NADH-グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) 過剰発現形質転換イネを作出した。ササニシキから単離した NADH-GOGAT プロモーターに同 cDNA を連結したキメラ遺伝子をササニシキに導入し T0 世代の形質評価を行った。未抽出葉身における NADH-GOGAT 含量・活性は最大で 80% 増加したラインが複数得られ、これらのラインでは、対照と比較して一粒重と穂重の増加が認められた。本年度は、自殖後代の T1 世代で形質評価を行い、T0 世代と類似の結果を得た。
7. GOGAT 反応は、窒素代謝と炭素代謝の接点に位置しており、代謝間クロストーク研究として重要である。しかし、2-OG の GOGAT 反応への供給系は依然として不明である。本年度から、この供給系を解明するため、ミトコンドリアにある NAD イソクエン酸脱水素酵素 (IDH)、サイトゾルに分布する NADP イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH)、それにミトコンドリアのグルタミン酸脱水素酵素に着目し、研究を開始した。
8. ニチニチソウ単離液胞を用いてリン酸取り込み能を測定し、リン酸欠乏下での輸送活性の上昇を確認するとともに、ニチニチソウ、シロイヌナズナ培養細胞から単離した液胞膜上で、リン酸輸送に機能するタンパク質を同定中である。現在、SDS 電気泳動ゲル上で少数のタンパク質に候補を絞り込み、一次構造の解析を始めることを予定している。
9. イオンクロマトグラムを用いたイノシトールリン酸系の定量的測定方法を確立し、シロイヌナズナ種子発芽時のイノシトールリン酸化合物の変動を測定した。良く知られているように、種子には

IP6(フィチン酸)が蓄積されているが、これは発芽とともに減少し、発芽 4 日目には、ほぼ消失した。この時、IP6 分解過程で生じるイノシトール高リン酸化化合物の変動を同時測定することに成功した。さらに、リン酸代謝の突然変異体では、IP6 の分解が正常体とは異なる形で進むことを明らかにした。ニチニチソウ培養細胞から単離した液胞内に IP6 が存在することを初めて見出した。この液胞内の IP6 は、リン酸栄養条件によって、大きく変動することが分かった。

10. 細胞内糖センシングの分子機構: 3種類のイネヘキソースキナーゼ遺伝子 (*OsHXK1-3*) の糖代謝・センシングにおける機能分担について、ノックアウト変異体を用いた解析を行った。レトロトランスポゾン *TOS17* 遺伝子による遺伝子挿入破壊株についてスクリーニングを行い、第3エクソンに挿入された *OsHXK1* 遺伝子破壊株の同定に成功した。この破壊株では、mRNA、タンパク質ともに発現が観察されず、活性も *OsHXK1* 由来のグルコキナーゼ活性のみが減少していた。
11. 窒素源トランスポーターの分子機構: 3種類のイネアンモニウムトランスポーターcDNA・遺伝子 (*OsAMT1;1, 1;2, 1;3*) に着目し、根におけるアンモニウムイオンの取込に関する機能分担の仕組みを検討している。ノーザン解析の結果、*OsAMT1;1, 1;2, 1;3* はそれぞれ異なる発現様式を示したことから、根における窒素の取込において異なる機能を担っていると考えられる。酵母変異体を用いた取込活性の解析から、上記3種の AMT はアンモニウム取込活性を有していることが明らかとなった。同時にポジトロンイメージング法を用いた窒素化合物の生体内移動に関する非破壊観察を行った。窒素飢餓処理を施したイネの根におけるアンモニウムの吸収は、3時間のアンモニウム添加処理によって数倍程度上昇することが明らかとなった。
12. キャピラリー電気泳動を用いた発芽イネ胚における代謝産物の解析: メタボロミクス研究実施の手始めとして、発芽時のイネ胚における代謝産物パターンについて検討を加えた。完熟胚ではスクロースや一部のアミノ酸からなる比較的単純な可能性物質のみであったのに対して、発芽に伴い多くの代謝産物の検出・変動が観察された。これらの基礎データをもとに今後さらに研究を進める。
13. 特異的なタンパク質輸送小胞を失った形質転換アラビドプシス *At2S-LP* に由来する4つの突然変異株について遺伝的検討を加えた結果、これらが遺伝的に2つのグループに属することが判明した。そこで、それぞれの遺伝子座を *VES1* および *VES2* と命名した。本突然変異株で発現される融合タンパク質の蓄積部位を細胞分画法および免疫電子顕微鏡観察によって解析した。その結果、この融合タンパク質は細胞内でなんらかのプロセッシングを受けた上、ペルオキシソームに蓄積していることが明らかになった。そこで、本突然変異体のペルオキシソームについてポストゲノム解析を行うためにペルオキシソームに特化したDNAマイクロアレイを作製中である。本突然変異体においてペルオキシソームをはじめ液胞などのオルガネラへのタンパク質輸送活性を調べるための実験準備に取りかかった。まず、各オルガネラへのタンパク質輸送を調べるために、GFPにペルオキシソームや小胞輸送系に必要な輸送シグナルを付加した形質転換体を確立した。これら形質転換体と今回得られた突然変異体を掛け合わせ、後代においてGFPによる蛍光を同定しようと考えている。現在、各形質転換体と突然変異体の掛け合わせを行っている。

3. 研究実施体制

(1) 斉藤グループ

グループ長: 斉藤和季 (千葉大学大学院薬学研究院・教授)

研究項目: 総括、硫黄代謝、二次代謝、メタボロミクス

(2) 山谷グループ

グループ長: 山谷知行 (東北大学大学院農学研究科・教授)

研究項目: 窒素代謝、QTL 解析

(3) 三村グループ

グループ長: 三村徹郎 (奈良女子大学理学部・教授)

研究項目: リン代謝

(4) 山口グループ

グループ長: 山口淳二 (北海道大学大学院理学研究科・教授)

研究項目: 糖代謝、窒素代謝

(5) 林グループ

グループ長: 林 誠 (岡崎共同研究機構基礎生物学研究所・助教授)

研究項目: タンパク輸送蓄積

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Jun-ichiro Nakajima, Yoshikazu Tanaka, Mami Yamazaki and Kazuki Saito: Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 276, 25797-25803 (2001)
- Akiko Maruyama, Kazuki Saito and Kimiharu Ishizawa: β -Cyanoalanine synthase and cysteine synthase from potato: molecular cloning, biochemical characterization, and spartial and hormonal regulation. *Plant Mol. Biol.*, 46, 749-760 (2001)
- Chika Kitada, Zhizhong Gong, Yoshikazu Tanaka, Mami Yamazaki and Kazuki Saito: Differential expression of two cytochrome P450s involved in the biosynthesis of flavones and anthocyanins in chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol.*, 42, 1338-1344 (2001)
- Mami Yamazaki, Emiko Yamagishi, Zhizhong Gong, Masako Fukuchi-Mizutani, Yuko Fukui, Yoshikazu Tanaka, Takaaki Kusumi, Masaatsu Yamaguchi and Kazuki Saito: Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression. *Plant Mol. Biol.*, 48, 401-411 (2002)
- Mami Yamazaki, Mitsuyo Sugiyama and Kazuki Saito: Intercellular localization of cysteine synthase and alliinase in bundle sheaths of *Allium* plants. *Plant Biotech.*, 19, 7-10 (2002)
- Naoko Yoshimoto, Hideki Takahashi, Frank W. Smith, Tomoyuki Yamaya and Kazuki Saito:

Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in Arabidopsis roots. *Plant J.*, 29, 465-473 (2002)

- Motoko Awazuhara, Hideki Takahashi, Akiko Watanabe-Takahashi, Hiroaki Hayashi, Tohru Fujiwara and Kazuki Saito: Function of the sulfate transporter Sultr2;1 in seeds of Arabidopsis thaliana. in “Plant nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research” W.J. Horst et al., eds. pp. 38-39, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2001)
- 中嶋淳一郎, 山崎真巳, 斉藤和季, “アントシアニン生合成の生化学 酵素反応機構解明における最近の進歩” *蛋白質・核酸・酵素*, 47, 217-224 (2002)
- Sakurai N., Katayama Y. and Yamaya T.: Overlapping expression of cytosolic glutamine synthetase and phenylalanine ammonia lyase in immature leaf blades of rice. *Physiol. Plant.*, 113 (3): 400-408 (2001)
- Saijo Y., Kinoshita N., Ishiyama K., Hata S., Kyojuka J., Hayakawa T., Nakamura T., Shimamoto K., Yamaya T. and Izui K.: A Ca²⁺-dependent protein kinase that endows rice plants with cold- and salt-stress tolerance functions in vascular bundles. *Plant Cell Physiol.*, 42: 1228-1233 (2001)
- Hayashi M., Nito K., Takei-Hoshi R., Yagi M., Kondo M., Suenaga A., Yamaya T. and Nishimura M.: Ped3p is a novel type of peroxisomal ATP-binding cassette transporter involved in fatty acid β -oxidation. *Plant Cell Physiol.*, 43: 1-11 (2002)
- 山谷知行, 鈴木石根, 林誠, 小原実広: ゲノム科学と21世紀の植物栄養学 -具体例の紹介-. *日本土壌肥料学雑誌*, 73: 69-72 (2002)
- Kura-Hotta M, Mimura M, Tsujimura T, Nemoto-Washitani S, Mimura T: High salt treatment-induced Na⁺ extrusion and low salt treatment-induced Na⁺ accumulation in suspension-cultured cells of the mangrove plant, *Bruguiera sexangula*. *Plant Cell & Environment* 24, 1105-1112 (2001).
- Tavakoli N, Kluge C, Gollmack D, Mimura T, Dietz K-J, : Reversible redox control of the plant vacuolar H⁺-ATPase activity is related to disulfide bridge formation not only in subunit A but also in subunit E. *The Plant Journal*, 28, 51-59 (2001).
- Dietz K-J, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma S, Harris GC, Chardonnens AN, Gollmack D: Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1969-1980 (2001).
- Takeda T, Toyofuku K, Matsukura C and Yamaguchi J: Sugar transporters in grain development of rice. *J. Plant Physiol.*, 158, 465-470 (2001)
- Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M and Yamaguchi J: *Slender rice*, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a

null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell*, 13, 999-1010 (2001)

- Mitsunaga S, Kawakami O, Numata T, Yamaguchi J, Fukui K and Mitsui T: Polymorphism in rice amylases at an early stage of seed germination. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 662-665 (2001)
- Loreti E, Yamaguchi J, Alpi A and Perata P: Sugar modulation of α -amylase genes under anoxia. *Ann. Bot.* in press (2001)
- 武田泰斗, 山口淳二: デンプンの合成と分解. 朝倉植物生理学講座第2巻代謝 (山谷知行編集), pp. 94-102 朝倉書店, 東京 (2001)
- 齋木里文, 園田裕, 池田亮, 山口淳二: 根のアンモニウムイオン取り込みに関与する遺伝子群, *農業および園芸*, 77, 39-47 (2001)
- Fukao Y., Hayashi Y., Mano M., Hayashi M. and Nishimura M.: Developmental analysis of a putative ATP/ADP carrier protein localized on glyoxysomal membranes during the peroxisome transition in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.*, 42, 835-841 (2001)
- Hayashi Y., Hayashi, M., Hayashi H., Hara-Nishimura I. and Nishimura M. Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of *Arabidopsis thaliana ped1* mutant. *Protoplasma.*, 218, 83-94 (2001)
- Hayashi M., Nito K., Takei-Hoshi R., Yagi M., Kondo M., Suenaga A., Yamaya T. and Nishimura M. : Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid β -oxidation. *Plant Cell Physiol.*, 43, 1-11 (2002)
- 山谷知行, 鈴木石根, 林 誠, 小原実広: ゲノム科学と21世紀の植物栄養学 日本土壤肥料学会雑誌, 73, 69-72 (2002)

(2) 特許出願

1. 国内出願 1件
2. 外国出願 なし