

「植物の機能と制御」

平成12年度採択研究代表者

齊藤 和季

(千葉大学大学院薬学研究院 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。本年度は本格的にポストゲノム解析研究を行った。特に、栄養ストレス下におけるシロイヌナズナのトランスクリプトームとメタボローム解析の結果を統合的にマップ上に投影する試みをスタートした。硫黄同化系に関与する個別遺伝子については、シロイヌナズナゲノムの硫酸イオントランスポーター遺伝子、セリンアセチル転移酵素遺伝子の機能解析を進めた。これらの変異体や過剰発現体のトランスクリプトーム、メタボローム解析によって遺伝子-代謝産物ネットワークの理解を進めた。窒素同化代謝については、イネのインブレット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をマップするとともに、QTL領域から原因遺伝子の単離を目指し、第2染色体QTL領域の高密度マッピングを進めた。また、サイトゾル型グルタミン合成酵素遺伝子欠損株の解析を進めた。リン酸代謝については、昨年度に引き続き液胞膜リン酸輸送系の解析を進めるとともに、イノシトールリン酸化合物の代謝過程の解析を進めた。さらにイオンクロマトグラムに電気化学検出法を組み合わせることで、植物体から抽出した糖リン酸の網羅的分析法を開発し、それを用いてリン酸代謝に関わる変異体や栄養条件を変えて生育させたシロイヌナズナの糖リン酸分布の解析を進めた。また、遺伝子破壊株をもちいて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、小胞体由来の特異的なタンパク輸送小胞を失った突然変異株のスクリーニングとペルオキシソームタンパク質輸送をもとにしたトランスクリプトーム解析を行った。

2. 研究実施内容

1. 硫黄欠乏および窒素欠乏条件下の遺伝子発現の変化を包括的に記述し、さらにその制御機構を推定することを目的として、シロイヌナズナマクロアレイを用いた

解析を行った（トランスクリプトミクス）。(1)発芽から3週間にわたり栄養欠乏処理を施した植物および、(2)通常条件から栄養欠乏条件または鍵中間体のO-アセチルセリン添加条件にシフトして2日目の植物を用いて、遺伝子発現の変化を解析した。その結果、硫黄欠乏条件と中間体添加条件にシフトした時に変化する遺伝子セットに共通性が見られ、両条件で変動する約120個の遺伝子を同定することが出来た。同時に超高分解能フーリエ変換質量分析によって、栄養欠乏条件下での代謝産物の変動について網羅的なプロファイリングを試みた（メタボロミクス）。その結果、いくつかの代謝経路の中間体の変動が見られ、一部はトランスクリプトミクスの結果と一致した。

2. 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および成長阻害剤に対する耐性によってスクリーニングする系を確立し、スクリーニングを進めた。
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る。フィードバック阻害非感受型酵素遺伝子をシロイヌナズナに導入し、得られたトランスジェニックシロイヌナズナではシステイン、グルタチオンが増加していた。また、硫黄同化系の制御に関わっていると考えられる細胞質性の本遺伝子破壊株を取得し、網羅的なトランスクリプトーム、メタボローム解析を開始した。
4. シロイヌナズナから高親和型の硫酸イオントランスポーター*Sultr1;3*のcDNAを単離した。プロモーター-GFPを用いた形質転換体の実験から*Sultr1;3*は師部伴細胞に局在していることが示された。また、*Sultr1;3*遺伝子へのT-DNA挿入変異体の解析から、硫酸イオンのソース器官からシンク器官の長距離輸送に関わっていることが示された。
5. 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、そのシロイヌナズナのオルソログ遺伝子およびその翻訳産物の解析をした。その結果、シロイヌナズナのシスチンリアーゼはチロシンアミノ転移酵素類似とアノテーションされたタンパク質であることが明らかにされた。
6. 上記の技術基盤をもとに、シロイヌナズナだけでなくいくつかの実用植物についてもメタボロミクスに基づいたファンクショナルゲノミクス研究を開始した。
7. 窒素リサイクル機構で鍵を握る、老化葉身のGS1と若い器官のNADH-GOGATの量を決定している複数のQTLを染色体上にマッピングした。本年度は、GS1と穂数など農業形質のQTLが重複して検出された第2染色体に着目し、コシヒカリを遺伝背景として、これらのQTL領域約50cMのみがインド型品種カサラスに置換された準同質遺伝子系統群(NIL: C22)を作出した。詳細な連鎖解析に必須である15個のDNAマーカーを新たに設定した。検出されたQTLを含む染色体領域のみが分離している集団(C系統)の自殖後代4191個体より、マーカーC777とC10005の領域間での組み換え体283系統を選抜し、遺伝子型を決定した。ガラス室および水田での栽培を行い、

連鎖解析を行った結果、C777の近傍に①一穂重量、C10005を含む領域に②分げつ数および穂数を規定している二種の原因遺伝子の存在が示された。

8. イネにおけるアンモニウムイオントランスポーター (OsAMT) 遺伝子を10種類見出し、その中で新規な *OsAMT2;1* の酵母における機能相補に成功し、種々の条件や器官の成育に伴う発現解析を行った。 *OsAMT2;1* は地上部でも恒常的に発現していたが、他の新規な *OsAMT3;1* の発現は極めて低いことがわかった。
9. 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。この供給系を解明するため、NADイソクエン酸脱水素酵素 (IDH)、NADPイソクエン酸脱水素酵素 (ICDH)、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) に着目し、分子資材獲得後、主にタンパク質とmRNAの組織学的発現解析を行った。未抽出葉身、登熟過程の穎果で、ICDH1、IDHaタンパク質は、ともに篩管や導管から物質が輸送される経路に相当する維管束組織柔細胞群に主に局在していた。これらの結果より、ICDH、IDHの両酵素ともNADH-GOGATへの2-OG生成が可能であることが示唆された。GDHは、師部伴細胞に強いシグナルが認められた。
10. シロイヌナズナ培養細胞から単離、純化した液胞膜を用いて、リン酸輸送体同定のためのプロテオーム解析を開始した。リン酸輸送体の想定含量が極めて少量のため、平成14年度は液胞膜タンパク質の蓄積につとめた。
11. シロイヌナズナ発芽時にIP6分解で生じるイノシトールリン酸化合物の分析を進めるとともに、その分解に働くフィターゼの活性測定に成功した。また、ニチニチソウ培養細胞を用いて、培養条件によって細胞内にIP6を蓄積する系の開発に成功した。さらにこの実験系は、培養条件によってIP6の細胞内蓄積箇所が変わることが明らかとなってきたので、植物細胞におけるIP6合成系の解析を進める予定である。
12. シロイヌナズナを材料に、イオンクロマトグラムに電気化学検出法を組み合わせることで、糖リン酸の網羅的分析法を開発した。栄養条件を変えて生育させたシロイヌナズナと、リン酸代謝の変異体として知られる植物体 (*pho1*, *pho2*) の糖リン酸化合物を比較分析し、リン酸代謝変異体が、単にリン酸含有量の変化で生育が変わっているだけとは言えないことを明らかにした。さらに、リン酸化合物を特異的に結合できるチタニアカラムを用いることで、糖リン酸の測定を妨害する物質の除去を可能とする測定系を開発した。
13. 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 (*OsHXX1-3*) 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 *OsHXX1* 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 *OsHXX1* 由来のグルコキナーゼ活性のみが減少していた。 *OsHXX2* の

ノックアウト変異体の単離も終了し、現在詳細な解析を進めている。

14. 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。現在上記遺伝子センス植物体を用いての解析を進めている。
15. 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。
16. P A C小胞由来のタンパク質輸送解析については、栄養生長細胞でP A C小胞が形成される形質転換体*At2S*・LPに戻って再スクリーニングを始めた。これまでの経験をもとにP A C小胞が形成されない変異体を選抜する条件を模索中で、すでに候補となる変異体をいくつか単離している。
17. ペルオキシソームタンパク質の輸送シグナルをもとにアラビドプシス全ゲノムからペルオキシソーム関連遺伝子を網羅的に検索し、これらの遺伝子すべてを網羅したDNAマイクロアレイを作製した。さらに、このDNAマイクロアレイの有効性を実証するために、アラビドプシス各種器官で特異的に発現しているペルオキシソーム遺伝子の探索を行った。その結果、黄化子葉や緑化子葉、根のペルオキシソームには、これまでに知られていないペルオキシソームタンパク質が機能していることが明らかになった。

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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著）発表

- Mami Yamazaki, Emiko Yamagishi, Zhizhong Gong, Masako Fukuchi-Mizutani, Yuko Fukui, Yoshikazu Tanaka, Takaaki Kusumi, Masaatsu Yamaguchi and Kazuki Saito: Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunina 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)
- Hiroshi Sudo, Takashi Yamakawa, Mami Yamazaki, Norio Aimi and Kazuki Saito: Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila*. *Biotech. Lett.*, **24**, 359-363 (2002)
- Kanokporn Sompornpailin, Yukiko Makita, Mami Yamazaki and Kazuki Saito: A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant Mol. Biol.*, **50**, 485-495 (2002)
- Yasuyo Yamazaki, Akiko Urano, Hiroshi Sudo, Mariko Kitajima, Hiromitsu Takayama, Mami Yamazaki, Norio Aimi and Kazuki Saito: Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants. *Phytochemistry*, **62**, 461-470 (2003)
- Naoko Yoshimoto, Eri Inoue, Kazuki Saito, Tomoyuki Yamaya and Hideki Takahashi: Phloem-localizing sulfate transporter, *Sultr 1;3*, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **131**, 1511-1517 (2003)
- Masami Yokota Hirai, Toru Fujiwara, Motoko Awazuhara, Tomoko Kimura, Masaaki

- Noji and Kazuki Saito: Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of *O*-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J.*, **33**, 651-663 (2003)
- Mami Yamazaki, Jun-ichiro Nakajima, Mutsuki Yamanashi, Mitsuyo Sugiyama, Yukiko Makita, Karin Springob, Motoko Awazuhara and Kazuki Saito: Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*, **62**, 987-995 (2003)
- Mami Yamazaki, Yukiko Makita, Karin Springob and Kazuki Saito: Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochem. Eng. J.*, **14**, 191-197 (2003)
- Michael G. Kocsis, Philippe Ranocha, Douglas A. Gage, Eric S. Simon, David Rhodes, Gregory J. Peel, Stefan Mellema, Kazuki Saito, Motoko Awazuhara, Changjiang Li, Robert B. Meeley, Mitchell C. Tarczynski, Conrad Wagner and Andrew D. Hanson: Insertional inactivation of the methionine *S*-methyltransferase gene eliminates the *S*-methylmethionine cycle and increases the methylation ration. *Plant Physiol.*, **131**, 1808-1815 (2003)
- Patrik Jones, Tomofumi Manabe, Motoko Awazuhara and Kazuki Saito: A new member of plant CS-lyases - A cystine lyase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 10291-10296 (2003)
- Yasuyo Yamazaki, Hiroshi Sudo, Mami Yamazaki, Norio Aimi and Kazuki Saito: Camptothecin biosynthetic genes in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*: Cloning, characterization and differential expression in tissues and by stress compounds. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 395-403 (2003)
- Yamaya, T., Obara, M., Nakajima, H., Sasaki, S., Hayakawa, T. and Sato, T.: Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J. Exp. Bot.*, **53**, 917-925 (2002)
- Srivastava, H.S., Shankar, N. and Yamaya, T.: Role and regulation of glutamate synthases in higher plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **8**, 39-60 (2002)
- Hayakawa, T., Sakai, T., Ishiyama, K., Hirose, N., Nakajima, H., Takezawa, M., Naito, K., Hino-Nakayama, M., Akagawa, T., Goto, S., Yamaya, T.: Organization and structure of ferredoxin-dependent glutamate synthase gene from rice plants. *Plant Biotech.*, **20**, 43-55 (2003)
- Suenaga, A., Moriya, K., Sonoda, Y., Ikeda, A., von Virén, N., Hayakawa, T., Yamaguchi, J. and Yamaya, T.: Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 206-211

(2003)

- Belimov A., Safronova V.I., Mimura T.: Response of spring rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase depends on nutrient status of the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**, 189-199 (2002)
- Yamada A., Saitoh T., Mimura T., Ozeki Y.: Detection of Differences in mRNA Expression Regulated by Salt-Stress in Mangrove Cultured Cells. *Plant Biotech.*, **19**, 145-148 (2002)
- Yamada A., Saitoh T., Mimura T., Ozeki Y.: Expression of mangrove allene oxide cyclase enhances salt tolerance in *Escherichia coli*, yeast, and tobacco cells. *Plant Cell Physiology*, **43**, 903-910 (2002)
- Yamada A., Sekiguchi M., Mimura T., Ozeki Y.: Expression of Plant CCTa Enhances Salt-tolerance in *Escherichia coli* and Yeast. *Plant Biotechnology*, **19**, 191-196 (2002)
- Yamada A., Sekiguchi M., Mimura T., Ozeki Y.: The role of plant CCTa in salt- and osmotic- stress tolerance. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1043-1048 (2002)
- Mimura T., Reid R.J., Ohsumi Y., Smith F.A.: Induction of the Na⁺/Pi co-transport system in the plasma membrane of *Chara corallina* requires external Na⁺ and low levels of Pi. *Plant Cell & Environment*, **25**, 1475-1481 (2002)
- Mimura T., Kura-Hotta M., Tsujimura T., Ohnishi M., Miura M., Okazaki Y., Mimura M., Maeshima M., Washitani-Nemoto S.: Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta*, **216**, 397-402 (2003)
- Yamashita K., Mimura T., Shimazaki K.: Evidence for nucleotide-dependent passive H⁺-transport protein in the plasma membrane of barley roots. *Plant & Cell Physiol.*, **44**, 55-61 (2003)
- Yamada A., Nozaki A., Sano E., Mimura T., Ozeki Y.: Expression of mangrove eEF1A enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Escherichia coli*. *Plant Biotechnology*, **20** (1), 81-85 (2003)
- Ngampanya B, Takeda T, Sonoda Y, Naragajavana J, Ikeda A, Yamaguchi J: Characterization of *OsSUT2* cDNA expressed before flowering stage of rice. *Rice Genetics Newsletter*, **19**, 1-3 (2002)
- Ngampanya B, Takeda T, Naragajavana J, Ikeda A, Yamaguchi J: Sugar transporters involved in flowering and grain development of rice. *J. Appli. Glycoscience*, **50**, 237-240 (2003)
- Ohtsuki S, Ikeda A, Sunako T, Muto S, Yazaki J, Nakamura K, Fujii F, Kanako

- S, Otsuka Y Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, Kishimoto N, Kikuchi S, Yamaguchi J: A novel gene encoding a Ca²⁺-binding protein is under hexokinase-dependent sugar regulation. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **67**, 347-353 (2003)
- Ngampanya B, Sobolewska A, Takeda T, Toyofuku K, Naragajavana J, Ikeda A, Yamaguchi J: Characterization of new rice functional monosaccharide transporter, OsMST5, involved in Flower development. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **67**, 556-562 (2003)
- Loret E, Yamaguchi J, Alpi A, Perata P: Sugar modulation of α -amylase genes under anoxia. *Ann. Bot.*, **91**, 143-148 (2003)
- 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)
- Mano, S., Nakamori, C., Hayashi, M., Kato, A., Kondo, M. and Nishimura, M.: Distribution and characterization of peroxisomes in Arabidopsis by visualization with GFP: dynamic morphology and actin-dependent movement. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 331-341 (2002)
- Nito, K., Hayashi, M. and Nishimura, M.: Direct interaction and determination of binding domains among peroxisomal import factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 355-366 (2002)
- Fukao, Y., Hayashi, M. and Nishimura, M.: Proteomic analysis of leaf peroxisomal proteins in green cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 689-696 (2002)
- Hayashi, H., De Bellis, L., Hayashi, Y., Nito, K., Kato, A., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M.: Molecular characterization of an Arabidopsis acyl CoA synthetase localized on glyoxysomal membranes. *Plant Physiol.*, **130**, 2019-2026 (2002)
- Kamigaki, A., Mano, S., Terauchi, K., Nishi, Y., Tachibe-Kinoshita, Y., Nito, K., Hayashi, M., Nishimura, M. and Esaka, M.: Identification of peroxisomal targeting signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS1 receptor. *Plant J.*, **33**, 161-175 (2003)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数 4件 (CREST研究期間累積件数 8件)