

「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研究を進めた。硫黄欠乏、窒素欠乏に対してのグローバルな応答とグルコシノレートなどの特異代謝系の応答を示すことが出来た。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ると同時に QTL 領域を含む染色体置換系統を作出し、約 40cM から約 1.8 cM までこの領域を狭めることに成功した。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、液胞膜リン酸輸送系同定のために進めていた液胞膜プロテオーム解析を終え、163 のタンパク質と多数の膜貫通タンパク質の同定に成功した。また、イノシトールリン酸化合物の代謝過程の解析を進めるために、複数の関連酵素のシロイヌナズナノックアウト株を作成した。さらにイオンクロマトグラムに電気化学検出法とチタニアカラム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、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解析とペルオキシソームタンパク輸送因子の網羅的 *in vivo* 機能解析を行った。

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（トランスクリプトミクス）と網羅的代謝物解析（メタボロミクス）を行った。(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た。同時に超高分解能フーリエ変換質量分析による非ターゲット解析と、HPLC, キャピラリー電気泳動などによるターゲット解析を組み合わせ、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。その結果、硫黄欠乏と窒素欠乏に共通に見られるグローバルな応答と、グルコシノレート系などの特異的代謝系の応答を示すことが出来た。
2. 次に、硫黄欠乏の経時変化におけるトランスクリプトーム、メタボローム応答を研究した。マイクロアレイにより21,500遺伝子の葉と根における発現の変化を調べた。またフーリエ変換イオンサイクロトロンマスペクトロメトリー(FT-MS)により葉と根の非ターゲットメタボローム分析を、HPLCやキャピラリー電気泳動によりアミノ酸や糖、有機酸などのターゲット代謝物プロファイリングを行った。いくつかのグローバルな変化の中で、グルコシノレート代謝が栄養ストレスによって大きく変化することが明らかになり、特定グルコシノレート代謝物変動と遺伝子発現変動からグルコシノレート代謝に関与する遺伝子候補を特定することができた。
3. 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るスクリーニングを進め、マンノース耐性を付与された変異体を複数得ることが出来た。
4. 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。シロイヌナズナゲノムに存在する5個のセリンアセチル転移酵素様遺伝子について包括的に、酵素学的性質、局在性、組織特異的プロモータ発現、ストレス誘導性などを検討した。その結果、2個の新規アイソフォームは硫黄欠乏時や重金属添加ストレス時などに重要な役割を果たすことが示された。また、これらの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進めた。
5. 硫黄欠乏条件下での制御機構の解明を目的としてシロイヌナズナ種子のプロテオーム解析を行った。シロイヌナズナを硫黄欠乏条件下および通常条件下で栽培し得られた完熟種子より抽出したタンパク質を二次元電気泳動で分離しMALDI-TOFMSにて同定した。主要な種子貯蔵タンパク質の各サブユニットはそれぞれが複数のスポットとして検出され、そのいくつかの蓄積量に変化がみられた。硫黄欠乏条件下で12S種子貯蔵タンパク質の1つであるCRA1の前駆体タンパク質の蓄積量が増加していた。また、

クルシフェリンについては β サブユニットで蓄積量の増加するペプチドが観察された。各スポットを消化酵素で分解し、C末端側に相当するペプチドの分子量を解析した結果、C末端のアミノ酸が1つずつ失われてゆく断片化が起こっていることが明らかになった。さらに硫黄欠乏条件下では、この断片化が抑制されることが推定された。これらの事から種子貯蔵タンパク質は硫黄欠乏条件下で異なる翻訳後切断や修飾を受けていることが示唆された。

6. シロイヌナズナのアントシアニン高蓄積変異体である *pap1-D* 変異体について、トランスクリプトミクスとメタボロミクスを統合し、アントシアニン生産に関与する遺伝子-代謝産物ネットワークの解明と未知遺伝子機能の同定を可能にした。
7. 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。具体的には、アントシアニン生産に関する成分変種である赤ジソ、青ジソと抗腫瘍性アルカロイド・カンプトテシンを生産する細胞培養系について、メタボロミクスと網羅的遺伝子発現解析による未知遺伝子機能の決定を進めた。
8. 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40cMのみがインド型品種カサラスに置換された染色体置換系統群 (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系統を選抜き、遺伝子型を決定した。この領域を、染色体置換系統と新規に設定したDNAマーカーを用いて、約1.8 cMまで絞り込むことができた。同時に、第11染色体にも着目し、GS1含量と粒重を決定しているQTLに着目し、解析を進めている。
9. イネにおけるグルタミン情報伝達機構に着目し、グルタミンセンサーと考えられる *OsACR* 遺伝子群を単離すると共に、ACR3がグルタミン結合能を持つこと、酵母ツーハイブリッド法により小さな分子シャペロンと相互作用すること、並びに核膜に局在することなどを明らかにした。またPIIタンパク質が1コピーであり、プラスチドに局在していることなどが明らかとなった。
10. イネに新たなサイトゾリックGSが存在することを見出し、それぞれ *OsGS1;1* (従来のGS1)、*OsGS1;2* (従来のGSr)、*OsGS1;3* (新規なGS1) と命名した。*OsGS1;3*の発現は穎果に限定されており、また *OsGS1;1*は主に地上部と根、*OsGS1;2*は主に根で発現していた。*Tos17*挿入により *OsGS1;1*が破壊された変異体の解析を進め、GS1;1の生理的な重要性を明らかにすると共に、根における *OsGS1;1*と *OsGS1;2*の発現解析や大量発現系を用いた酵素の動力学的解析を行っている。
11. 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、種々の解析を行ったが、現時点でどの経路によって2-OGが供給されているか、依然として判明していない。

12. 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進めた。163種類のタンパク質を同定し、その中に機能未知を含む多数の膜貫通タンパク質を同定した。また、シロイヌナズナ植物体からもインタクト液胞を単離する手法を確立した。
13. シロイヌナズナイノシトールリン酸合成系に関するMIPS（ミオイノシトール-1-リン酸合成酵素）とイノシトールリン酸化酵素について、複数の遺伝子のタグラインとRNAi株の取得に成功した。同様の変異株の取得をイネでも進めている。また、植物細胞におけるIP6合成系の解析を進めるために、MIPS酵素の細胞内局在を明らかにした。
14. 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とチタニアカラムを組み合わせる手法を洗練させ、新しい糖リン酸の網羅的分析法を開発した。シロイヌナズナ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。
15. 細胞内糖センシングの分子機構：3種類のイネヘキソキナーゼ遺伝子（*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た。詳細な解析の結果、*OsHXX1*、*OsHXX2*いずれのノックアウト変異体についても顕著な表現型の変化が観察されなかった。この原因としてイネゲノム中にヘキソキナーゼ遺伝子が多数存在しており、*OsHXX1*および*OsHXX2*それぞれの機能に他の相同遺伝子との重複性が予想された。今後、全ての*OsHXX*遺伝子を考慮した研究が必要である。
16. 糖シグナリング機構の解析：シロイヌナズナの芽生えにおいて、本葉の展開を停止する休眠現象が観察される。すなわち、シロイヌナズナの芽生えには、環境に応じて茎頂分裂組織（SAM）の分裂活性を制御する機構の存在が想定される。本研究では、シロイヌナズナにおいて糖の生成量低下がアブシジン酸（ABA）の生合成上昇を促進するとともに、SAMの分裂活性の低下を誘導することを明らかにした。この知見は、発芽時の使用の展開に続く形態形成過程において、糖とABAがSAMの分裂活性制御に拮抗的に作用することを示す結果である。糖シグナリング機構をより明確にするため、シロイヌナズナ糖高感受性変異体*ghs1*（glucose hyper-sensitive 1）を単離し、遺伝学的・生理学的解析を行った。原因遺伝子単離の結果、*GHS1*遺伝子はプラスチド30S

リボソームタンパク質S21をコードしていることが明かとなった。本研究によって、葉緑体機能と糖シグナリングの関連が具体的に示された。

17. 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。窒素代謝や窒素輸送の制御には、根で土壤中の外部窒素源の存在を認識することで規定される場合と、植物体内のグルタミンなどアミノ酸量 (Nステータス) によって規定される場合とが考えられる。アンモニウムイオンに依存していると思われた *OsAMT1* 遺伝子群の発現は、グルタミン合成酵素反応の阻害剤を用いた実験結果から、輸送基質であるアンモニウムイオンの受容ではなく、植物体内におけるグルタミンに制御されている可能性が示唆された。植物の窒素吸収能は、根内のグルタミン量の増加にともない負のフィードバック制御があることが知られている。しかしながら、本研究により *OsAMT1;2* は、その発現がグルタミンの増加によって、正のフィードバック制御を受ける新規の窒素トランスポーターであることを見出した。現在上記 *OsAMT1;2* 遺伝子センス植物体を用いての解析を進めている。
18. 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。
19. P A C 小胞由来のタンパク質輸送解析について、変異体の絞り込みを進めた。栄養成長細胞で P A C 小胞が形成される形質転換体 *At2S ΔLP* を EMS 処理して得られた 3 系統の変異体のうち、少なくとも 1 つはプロテインボディの形態異常を示すことが明らかとなった。現在これら 3 つの変異体のバッククロス中である。
20. データベース解析からペルオキシソームタンパク質の輸送を制御する因子として 15 種類 21 個の遺伝子候補を予測した。これらの遺伝子候補について RNAi 法による遺伝子抑制を行い、網羅的な *in vivo* 機能解析を行った。その結果、1) これらの遺伝子がペルオキシソームタンパク質の識別に関わるもの、2) タンパク質輸送に関与するもの、3) ペルオキシソームの構造維持に関わるもの、4) ペルオキシソームと無関係なもの、に大別できることが明かとなった。

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）（現 神戸大学理学部・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

- Kayo Yoshimatsu, Koichiro Shimomura, Mami Yamazaki, Kazuki Saito and Fumiyuki Kiuchi: Transformation of ipecac (*Cephaelis ipecacuanha*) with *Agrobacterium rhizogenes*. *Planta Med.*, **69**, 1018-1023 (2003)
- Patrik Jones, Burkhard Messner, Jun-ichiro Nakajima, Anton R. Schäffner and Kazuki Saito: UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonols glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 43910-43918 (2003)
- Yasuyo Yamazaki, Mariko Kitajima, Masanori Arita, Hiromitsu Takayama, Hiroshi Sudo, Mami Yamazaki, Norio Aimi and Kazuki Saito: Biosynthesis of camptothecin. *In silico* and *in vivo* tracer study from [1-¹³C]glucose. *Plant Physiol.*, **134**, 161-170 (2004)
- Jonathan J. Turnbull, Jun-ichiro Nakajima, Richard W.D. Welford, Mami Yamazaki, Kazuki Saito and Christopher J. Schofield: Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: Anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3 β -hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 1206-1216 (2004)
- Cintia Goulart Kawashima, Masaaki Noji, Michimi Nakamura, Yasumitsu Ogra, Kazuo T. Suzuki and Kazuki Saito: Heavy metal tolerance of transgenic

tobacco plants over-expressing cysteine synthase. *Biotech. Lett.*, **26**, 153-157 (2004)

- Masami Yokota Hirai, Mitsuru Yano, D. Goodenowe, Shigehiko Kanaya, Tomoko Kimura, Motoko Awazuhara, Masanori Arita, Toru Fujiwara, and Kazuki Saito: Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10.1073/pnas.0403218101 (2004)
- Ishiyama, K., Kojima, S., Takahashi, H., Hayakawa, T. and Yamaya, T.: Cell-type distinct accumulation of mRNA and protein for NADH-glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH_4^+ . *Plant Physiol. Biochem.*, **41**, 643-647 (2003)
- Maruyama-Nakashita, A., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T. and Takahashi, H.: Transcriptome profiling of sulfur responsible genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol.*, **132**, 597-605 (2003)
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., von Wirén, N., Yamaya, T. and Yamaguchi, J.: Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 726-734 (2003)
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., Yamaya, T. and Yamaguchi, J.: Feedback regulation of the ammonium transporter gene family *AMT1* by glutamine in rice. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 1396-1402 (2003)
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T. and Takahashi, H.: Induction of *SULTR1;1* sulfate transporter in *Arabidopsis* roots involves protein phosphorylation/dephosphorylation circuit for transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 340-345 (2004)
- Ohtomo R., Sekiguchi Y., Mimura T., Saito M., Ezawa T.: Quantification of polyphosphate: different sensitivities to short-chain polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography. *Analytical Biochemistry*, **328**, 139-146 (2004).
- Sekiguchi Y., Mitsuhashi N., Inoue Y., Yagisawa H., Mimura T.: Analysis of sugar phosphates in plants by ion chromatography on a titanium dioxide column with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1039**, 71-76 (2004).
- Loreti, E., Yamaguchi, J., Alpi, A., Perata, P.: Gibberellins are not required for rice germination under anoxia. *Plant and Soil.*, **253**, 137-143 (2003)
- Morita-Yamamuro, C., Vernieri, P., Yamaguchi, J.: Low sugar status promotes

endogenous ABA levels and ABA sensitivity in Arabidopsis. *Plant Biotechnol.*, **21**, 9-14 (2004)

- Fukao, Y., Hayashi, M. and Nishimura, M.: Novel glyoxysomal protein kinase, GPK1, identified by proteomic analysis of glyoxysomes in etiolated cotyledons of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 1002-1012 (2003)
- Kamada, T., Nito, K., Hayashi, H., Mano, S., Hayashi, M. and Nishimura, M.: Functional differentiation of peroxisomes revealed by expression profiles of peroxisomal genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 1275-1289 (2003)
- Shoji Mano, Chihiro Nakamori, Maki Kondo, Makoto Hayashi and Mikio Nishimura: An Arabidopsis dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division. *Plant J.*, **38**, 487-498 (2004)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数 3件 (CREST研究期間累積件数 11件)