

「植物の機能と制御」

平成14年度採択研究代表者

西村 いくこ

(京都大学大学院理学研究科 教授)

## 「種子蛋白質の量的・質的向上を目指した分子育種」

### 1. 研究実施の概要

世界的な人口増加による食糧難の時代に備えて、作物の生産向上が緊急の課題の一つとなっている。特に、コメや豆類をはじめとする様々な植物の種子はタンパク質、脂質、糖質などを貯蔵しており、私達の貴重な食糧源であり、また家畜飼料としても重要な資源である。これまでに種子の貯蔵タンパク質を改変し、より高品質のタンパク質を含む作物を創出するための試みが多数なされている。このような分子育種を行う際には、有用物質の遺伝子をただ導入するというのではなく、導入した遺伝子産物を安定な形で細胞内に大量に蓄積させることが重要な鍵となる。このための技術基盤として、植物が本来持っている“タンパク質の合成の場から蓄積の場への大量輸送・集積の分子機構”の解明が必須である。本研究課題では、植物の特性を理解し、それを十分に生かして量的向上と質的向上の両面から種子の高付加価値化を達成するための基盤作りの一環としての研究を行う。

### 2. 研究実施内容

#### 1. 質的向上を目指した解析：

これまでの解析から、種子貯蔵タンパク質の選別輸送レセプターレセプター (AtVSR1と命名した) を同定し、レセプター依存的な種子タンパク質の細胞内輸送の存在を初めて明らかにすることができた。このレセプターを介した輸送系の全貌を明らかにし、種子タンパク質の効率的な集積機構を分子レベルで解明する目的で、下記の解析を行った。

種子タンパク質の輸送異常を示すシロイヌナズナ変異体 (A01, A02, A03, A04, A06, A07, A11, A12, kam2) の原因遺伝子の同定を行ったところ、A02とA03の両変異体は同じ遺伝子の欠損であることが分かった。A02/A03変異体は、種子の細胞内に新規の構造体が多量に蓄積していた。A02/A03変異体と野生型の種子の構成タンパク質の差をプロテオーム解析により、小胞体内に局在する分子シャペロンBiPとPDIが異常に蓄積していることが分かった。これらのシャペロンは、上記の構造体の周辺部分に局在していたことから、この構造体は、小胞体に由来するものであることが分かった。A06変異体は、種子タンパク質を蓄積しているタンパク質蓄積型液胞が異常に小型化していた。A06遺伝子産物は、間接的にレセプターAtVSR1に間接的に結合し、レセプター分子のリサイクルに働くレトロマ

一複合体を形成している可能性がある。kam2変異体は、細胞内膜系自体が異常になり、そのために合成された貯蔵タンパク質が正常に輸送されないと考えられる。貯蔵タンパク質が細胞外に輸送されてしまう点では、レセプターの欠損変異体と類似の形質を示した。

## 2. 質的向上を目指した解析：

液胞プロセシング酵素は、私たちが見いだした新規のシステインプロテアーゼで、液胞機能分子の成熟化に関わる鍵酵素である。この酵素を制御することにより、様々な種子タンパク質の性質を変えることができる。これまでにシロイヌナズナVPE欠損株は種子タンパク質の成熟化が起こらず、前駆体が大量に蓄積することが分かった (JBC, 2003)。本年度は、VPEについて以下の3点について解析を行った。まず、タバコのVPE遺伝子の発現を抑えると、ウイルス感染による過敏感細胞死が抑制されてしまうことを見出した (Science, 2004, 図1)。次に、シロイヌナズナVPE欠損株と野生株を比較したプロテオーム解析を行うために、それぞれから液胞を単離する技術を確立することができた。また、シロイヌナズナの新規VPE ( $\delta$ VPE)は種子の発生の過程で種皮 (内珠皮) に一過的に発現することが分かった (Plant Cell, 2005)。

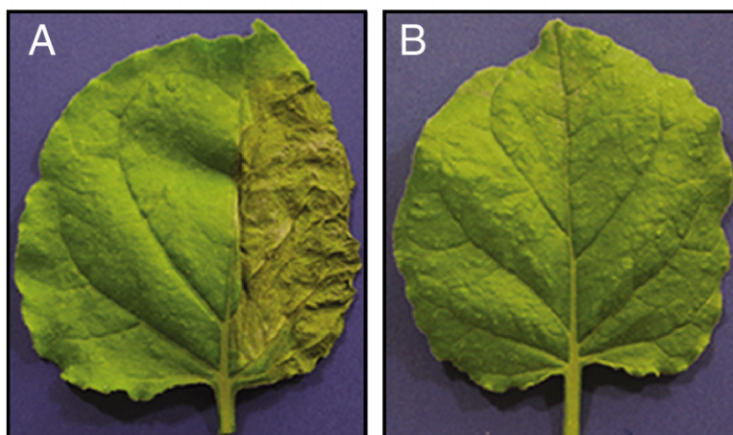


図1. VPEノックダウン植物における過敏感細胞死の抑制

タバコ葉の右半分にウイルスを接種した。野生型の葉 (A) では病斑が形成されているが、VPEノックダウン植物の葉 (B) では細胞死は抑えられる。

## 3. 研究実施体制

- ① 研究分担グループ長：西村いくこ (京都大学大学院理学研究科・教授)
- ② 研究項目：種子タンパク質の量的・質的向上を目指した研究の全般

## 4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

### (1) 論文 (2004年の原著論文) 発表

- Hara-Nishimura, I., Matsushima, R., Shimada, T., and Nishimura, M. (2004). Diversity and functions of ER-derived compartments in plants:

Are these compartments specific to plant cells? *Plant Physiol.* **136**, 3435-3439.

- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**, 855-858.
- Matsushima, R., Fukao, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). *MAII* gene that encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of a novel ER-derived structure, the ER body. *Plant Cell* **16**, 1536-1549.
- Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K., Maeshima, M., Yokota, A., Tomizawa, K., and Mimura, T. (2004). Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 672-683.
- Tamura, K., Yamada, K., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. (2004). Endoplasmic reticulum-resident proteins are constitutively transported to vacuoles for degradation. *Plant J.* **39**, 393-402.
- Watanabe, E., Shimada, T., Tamura, K., Matsushima, R., Koumoto, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). An ER-localized form of PV72, a seed-specific vacuolar sorting receptor, interferes the transport of an NPIR-containing proteinase in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol.* **45**, 9-17.
- Yamada, K., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). The slow wound-response of  $\gamma$ VPE is regulated by endogenous salicylic acid in *Arabidopsis*. *Planta* **218**, 599-605.
- Zeeuwen, P.L.J.M., Vlijmen-Willems, I.M.J.J.v., Olthuis, D., Johansen, H.T., Hitomi, K., Hara-Nishimura, I., Powers, J.C., James, K.E., Camp, H.J.o.d., Lemmens, R., and Schalkwijk, J. (2004). Identification of legumain and cystatin M/E as a functional dyad in skin: Evidence for a role in stratum corneum and skin barrier formation. *Human Mol. Gene.* **13**, 1069-10079.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：5件）