

「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植物の種子は私達の貴重な食糧源であり、また家畜飼料としても重要である。高品質のタンパク質や有用なタンパク質を含む作物を創出するためには、目的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”の解明が必須となる。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。量的向上研究では、登熟期の種子の細胞内での種子タンパク質の大量集積に関わる因子を網羅的に単離し、これに関わる分子機構の全容の解明を目指している。一方、質的向上研究では、液胞の機能発現に関わる液胞プロセッシング酵素 VPE に注目し、種子タンパク質の性質の改変と病害に対する抵抗反応の分子機構を解明しようとしている。

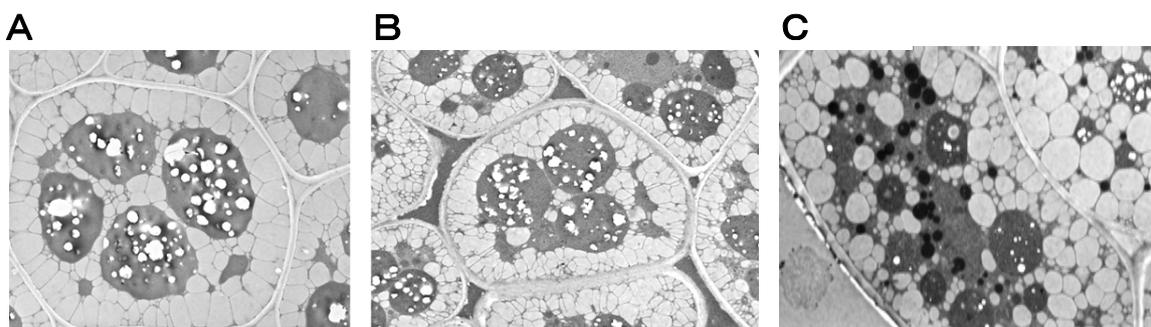
## 2. 研究実施内容

(1) 質的向上を目指した解析：

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、貯蔵タンパク質を前駆体の状態で蓄積しているシロイヌナズナ変異体の種子を選抜してきた。得られた9種類の変異体 (A01, A02, A03, A04, A06, A07, A11, A12, kam2) の種子の細胞内構造を電子顕微鏡で観察した。その結果、これらの変異体は、(A)種子タンパク質を細胞外に分泌するタイプと(B)種子タンパク質を細胞内の電子密度の高い構造体に蓄積するタイプの2つに分けられることが分かった。また、これまで2種類の主要貯蔵タンパク質である12S グロブリンと2S アルブミンは同じ機構でタンパク質蓄積型液胞へ運ばれると考えられてきたが、両者の輸送系が独立して支配されていることが判明した。タンパク質ごとの輸送制御の可能性が示唆された。

2005 年度には、これらの変異体の解析と平行して、新たに変異体の大量単離を可能とす

る方法を確立した。その原理は、下記の通りである。これまでに私たちは、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示してきたが、液胞選別輸送シグナルを付加した緑色系高タンパク質 (GFP) が AtVSR1 欠損変異体では、細胞外に分泌され種子が蛍光を発することを見いだした。この成果を利用して、GFP 蛍光を指標に選別輸送異常を示す変異体を大量にかつ容易に単離する方法を確立した。この方法により、上記の A タイプの変異体が取得できる。得られた変異体の原因遺伝子の同定と解析を順次進めている。従来法と併せて、種子タンパク質の大量集積のための分子機構の全容が解明できると考えている。



**図 1. 種子タンパク質の輸送異常を示す 2 つのタイプのシロイヌナズナ変異体**

野生型のシロイヌナズナの種子細胞 (A) では電子密度の高いオルガネラとして観察されるタンパク質蓄積型液胞に貯蔵タンパク質が集積している。種子タンパク質の液胞への選別輸送が異常になった変異体は、細胞外にタンパク質が分泌されるタイプ (B) と細胞内の新たな構造体に貯蔵タンパク質を集積してしまうタイプ (C) に分類される。

(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。植物の VPE はファミリーを形成しており、種子型 VPE のほか、栄養器官型の VPE と珠皮型 VPE が存在する。昨年度までに、栄養器官型 VPE は、ウイルス感染による過敏感細胞死を制御していることを示してきたが、2005 年度は、VPE がカビ毒による罹病生の細胞死も制御していることが分かった (図 2)。また、珠皮型 VPE については、珠皮の形成過程の細胞死に関与していることが明らかになった。即ち、VPE は、生体防御のための細胞死だけでなく発生の過程の細胞死も制御する実行因子であることを示すことができた。VPE を制御することにより、病原体に対して抵抗性を付与した植物を作ることが可能になった。

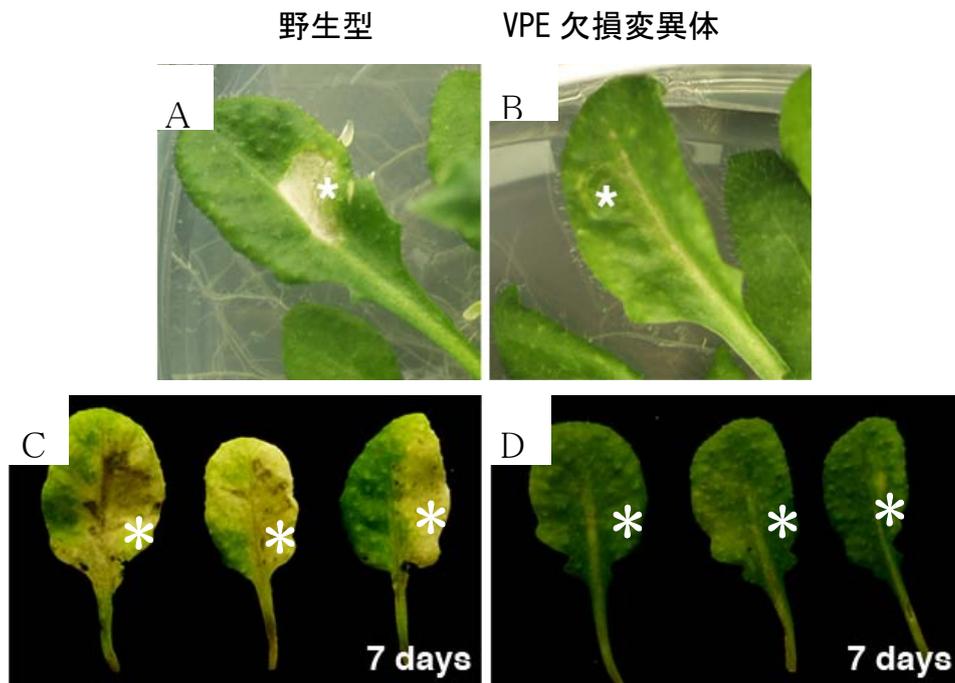


図2. 栄養器官型 VPE はカビ毒による細胞死を制御している.

シロイヌナズナの葉をフザリウムの毒素フモニシン (FB1) で処理すると細胞死が起こる (野生型; A, C). VPE 欠損変異体では, この細胞死が抑制される (VPE 欠損株; B, D). \*, FB1 処理部位.

### 3. 研究実施体制

「西村」グループ

- ①研究分担グループ長：西村 いくこ (京都大学、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

### 4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (2005 年の原著論文) 発表

- Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M., Kato, T., Tabata, S., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005) A novel-type VPE,  $\delta$ VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* **17**, 876-887.
- Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2005) KATAMARI1/MUR3 is a novel Golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 1764-1776.
- Kuroyanagi M., Yamada K., Hatsugai N., Kondo M., Nishimura M. and Hara-Nishimura I. (2005). Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in

*Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **280**, 32914-20.

- Yamada, K., Fuji, K., Shimada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005) Endosomal proteases facilitate the fusion of endosomes with vacuoles at the final step of the endocytotic pathway. *Plant J.* **41**, 888-898.
- Nagano AJ, Matsushima R, Hara-Nishimura I. (2005) Activation of an ER-body-localized beta-glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1140-8.
- Maehr, R., Hang, H.C., Mintern, J.D., Kim, Y.-M., Culvillier, A., Nishimura, M., Yamada, K., Shiramama-Noda, K., Hara-Nishimura, I. and Ploegh, H.L. (2005) Asparagine endopeptidase is not essential for class II MHC antigen presentation but is required for processing of Cathepsin L in murine primary antigen presenting cells. *J. Immunol.*, **174**, 7066-7074.
- Ohtomo I., Ueda H., Shimada T., Nishiyama C., Komoto Y., Hara-Nishimura I. and Takahashi T. (2005) Identification of an allele of VAM3/SYP22 that confers a semi-dwarf phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1358-65.
- Kong, S., T. Suzuki, K. Tamura, N. Mochizuki, I. Hara-Nishimura, and A. Nagatani (2005) Blue light-dependent translocation of phototropin 2 to the Golgi Apparatus. *Plant J.*, **45**, 994-1005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 5 件)