

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「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」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

齊藤 和季 (千葉大学大学院薬学研究院 教授)

主たる研究代表者

山谷 知行 (東北大学大学院農学研究科教授(平成12年12月～))

三村 徹朗 (奈良女子大学理学部 教授(平成12年12月～平成16年3月))
神戸大学理学部 教授(平成16年4月～))

山口 淳二 (北海道大学大学院理学研究科 教授(平成12年12月～))

林 誠 (自然科学研究機構基礎生物学研究所 助教授(平成12年12月～))

3. 研究内容及び成果

3-1. 研究課題全体の研究内容

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、トランスクリプトミクスやプロテオミクス、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した。具体的には、トランスクリプトミクスやタンパク質レベルでのダイナミクスに加え、遺伝子機能とその代謝物パターンの変化を一対一対応させるメタボロミクス研究に重点をおき、代謝の分子ネットワーク解明を目指した。これらの研究によって、植物の生産性と品質の向上に関わる分子基盤を、植物代謝機能と制御の局面から確立することを最終目標とした。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

3-2. 研究成果

齊藤グループ

○硫黄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)を時系列で行った。特に、メタボローム解析は、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時系列で網羅的なプロファイリングを行い、トランスクリプトームの結果と統合した。統合には自己組織化マップ(SOM)を用いた。その結果、グルコシノール生合成と分解などの特異的代謝系の協調的な応答が示され、これらからグルコシノール代謝に関わる遺伝子の機能を網羅的に同定することに成功した。

- 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ー発現、ストレス誘導性などを検討した。その結果、従来は注目されていなかった2個のマイナーなアイソフォームをコードする遺伝子が硫黄欠乏、重金属添加などのストレスに対して応答する遺伝子である事が示された。
- 種子貯蔵タンパク質がタンパク質レベルで硫黄欠乏条件下でどのように制御されているかを解明するために、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などで同定した。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示された。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。
- 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複数の未知遺伝子機能の同定を行った。こ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することが出来た。

山谷グループ

- イネの生産性に大きく関わる窒素同化代謝の研究は、その重要性にもかかわらず断片的な個別研究が多い。穂を構成している窒素の約80%は、老化器官からの転流によることがわかっており、窒素同化代謝の中でもこの窒素転流は重要な機構である。本グループでは、イネゲノム解析の成果を十分に活用し、窒素転流の分子機構解明と、窒素利用とその農業形質に関わる全体像の把握を目的に研究を進めた。窒素転流に関しては、過剰発現系や遺伝子破壊系を用いることで、老化器官における窒素の送り出しにサイトゾル型グルタミン合成酵素 1;1 (GS1;1) が、また若い器官での窒素の再利用にはNADH依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)が鍵を握ることを、ほぼ証明できた。
- また、根においては、NADH-GOGAT 反応に炭素骨格を供給するのがミトコンドリアに局在するイソクエン酸脱水素酵素(IDH)である可能性を指摘でき、同化代謝間のクロストーク機構にも言及した。
- 一方、生産性の全体像を俯瞰するために、量的形質を決定している遺伝子座(QTL)解析を導入し、マッピングされた QTL 領域からの原因遺伝子単離を目指した。特に穂数とGS1 含量を決定している第2染色体上の QTL と、粒重とGS1含量を決定している第11染色体上の QTL に着目し染色体置換系統群を多数作出して解析を進めた。

三村グループ

- 植物細胞が外界からリン酸イオンを取り込み、細胞内で分配、蓄積していくための分子機構を、膜輸送系、リン酸代謝系に基づいて検討した。細胞質のリン酸濃度維持に働く液胞膜のリン酸輸送機構を明らかにするために、シロイヌナズナ培養細胞からインタクト液胞を単離し、そのプロテオーム解析をおこない、138種の膜貫通タンパク質を見出した。複数の機能未知液胞膜タンパク質について、それらの形質転換体の作成と機能解析を進めた。
- イオンクロマトグラムを用いた糖リン酸の網羅的分析手法を確立するとともに、栄養条件を変えて生育させたシロイヌナズナと、リン酸代謝変異体を比較分析した。その結果、糖リン酸組成と含有量調節が、外部リン酸環境をモニターしながら行われていることを明らかにした。
- 動植物に普遍的に見いだされ、様々な生理反応に寄与することが知られるリン酸化イノシトール代謝に焦点を絞って、その生合成と機能解析を進めた。イオンクロマトグラムを用いたリン酸化イノシトールの網羅的測定系を開発した。リン酸化イノシトール合成系の解析を可能にする培養細胞系を開発するとともに、そこで働く遺伝子群の発現解析を進めた。

山口グループ

- 作物の生産性は、炭素(C)と窒素(N)の適切な同化・吸収とその再配分を基盤とする。根における窒素吸収と緑葉の糖輸送の実質を担う窒素源・糖トランスポーターに着目し、輸送の分子機構と制御機構について検討した。
- 糖トランスポーターの分子機構を解明するために、イネ、スクローストランスポーター遺伝子(OsSUT1-2)の機能に着目した研究とともに、イネ登熟時の親組織(種皮)から子組織(胚・胚乳)への物質移動に関わる遺伝子群の解析を行った。その結果、OsSUT1が篩部維管束伴細胞にて発現すること、また、種子発芽時の糖輸送に関与することを明らかにした。
- また、細胞内糖センシングの分子機構を解明するために、シロイヌナズナ糖高感受性変異体 ghs1 (glucose hyper-sensitive 1)の遺伝学的・生理学的解析を進めた。ghs1は野生型より2%低い5%グルコース培地で本葉展開の阻害、アントシアニンの蓄積、クロロフィル合成の抑制等の糖応答を示す。原因遺伝子単離の結果、GHS1遺伝子は色素体30Sリボソームタンパク質S21をコードする遺伝子にT-DNAが挿入されることによって生じた劣性変異体であることを明らかにした。この変異体を用いた解析により、葉緑体機能と糖シグナリングとのクロストーク現象の存在が示唆された。
- 糖と植物ホルモンのシグナル伝達のクロストーク機構については、イネ α -アミラーゼ遺伝子RAmy3DならびにRab16Aを用いた詳細な解析により、糖による遺伝子発現制御がABAやジベレリンシグナルと密接に関係することを明かした。また、イネジベレリン恒常的感受性変異体 slender riceを用いた実験により、この遺伝子SLRが「緑の革命」に

関係したコムギ遺伝子 RHT のオルソログであること、またジベレリンシグナルと糖・ABA シグナルのクロストーク現象を明らかにした。

- 窒素源トランスポーターの分子機構解明のために、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た。その結果、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た。

林グループ

- 植物が同化した炭素・窒素・硫黄・リンなどは、最終的に種子の貯蔵脂肪や貯蔵タンパク質、フィチン酸などとして次世代に託される。同化の最終形態としての種子貯蔵脂肪および貯蔵タンパク質の量や質に影響を及ぼすペルオキシソームとプロテインボディの機能に着目しその機能制御機構を解析した。
- ペルオキシソーム機能制御機構については、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 PEX 遺伝子候補を予測し、網羅的な in vivo 機能解析を進めた。それらのうちで PEX5 および PEX7 遺伝子は、それぞれの翻訳産物が結合してサイトゾル型レセプター複合体を形成していること、この複合体が PTS1 型および PTS2 型ペルオキシソームタンパク質輸送の両方を制御していることを明らかにした。また、全遺伝子について RNA 抑制法によるフェノーム解析を行った。その結果、これらの遺伝子は、1) 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らかとなった
- プロテインボディ形成の制御機構については、形質転換アラビドプシス At2S.LP をエチルメタンサルホン酸で処理して突然変異を誘発した後に、ホスフィノスリシンに対して耐性を示す個体を多数得ることに成功した。これらのうち6系統の変異体は貯蔵タンパク質前駆体が蓄積しており、種子のオルガネラの形態に変異が認められた。現在、マップベースクローニングによる遺伝子の同定を行っている。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待:口頭	ポスター	報道	特許
国内	国外				
52	221	102	303	10	13

- 各々の成果は論文としてまとめられており、また論文、口頭発表ともに質・量ともレベルは高い。これだけの生産性を維持されたことは大いに評価に値する。
- 国内出願数13件は量的には評価できる。出願の中には有望と考えられる技術も含んで

おり、実用化に向けての検討も必要となる。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

- 総合的には、シロイヌナズナのゲノム情報をもとに、メタボロームとトランスクリプトームの統合による新たなファンクショナルゲノム解析法を開発したことの意義は大きいと考える。アントシアニン生合成の研究成果は、植物科学における今後のメタボロミクス研究を拓く実際例となっている。
- 科学技術への貢献に関しては、硫黄栄養欠乏シロイヌナズナのメタボローム・トランスクリプトームの統合解析の結果、植物のファンクショナルゲノム解析に大きな進展をもたらし、世界的に大きなインパクトを与えた。今後の植物メタボローム分野がどの程度発展しうるかは未知数であるが、いずれにしても日本のこの分野の中心人物として大きな期待が出来るようになったことは、この領域(CREST)の成果として特筆すべきである。
- 今後の展開としては、トランスクリプトームとメタボロミクスの統合により、新たな遺伝子機能解析の時代が幕開けされたが、それをさらに統合してゆくための戦略については、まだ今後の課題として大きく残っている。より高度な生産性開発のための展開には、別の何かが必要と思われる。今後の展開に期待したい。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

- 受賞歴として、日本植物細胞分子生物学会奨励賞(2002)(野路征昭);根研究会学術奨励賞(2002)(池田亮);日本植物細胞分子生物学会論文賞(2003);日本植物生理学会奨励賞(2005)(高橋秀樹);日本植物細胞分子生物学会奨励賞(2005)(平井優美)以上5件受賞。
- その他特記事項として、DNA マイクロアレイのデータから計算された共発現情報、共制御を推測するための新規予測アルゴリズムによる共発現遺伝子グループとそれらのシス配列情報に関するデータベース、ATTED-II、を構築した。共通のデータベースやメタボロームのプラットフォームを作成するなど、基盤研究の土台を構築した。国内外の研究者からの利用は多い。
- 多くの国際会議(5件)、国内会議(3件)を企画し、成果をタイムリーに公表し、この分野のプレゼンスを確保した。