

「植物の機能と制御」
平成12年度採択研究代表者

齊藤 和季

(千葉大学薬学部 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。本年度は主にポストゲノム解析のための準備と予備的な研究を行った。

硫黄同化系については、シロイヌナズナゲノムに11個の硫酸イオントランスポーター遺伝子を同定し、これらの機能解析を進めた。また、セリン代謝とシステイン代謝の分岐点に位置するセリンアセチル転移酵素遺伝子の高発現植物体、アンチセンス植物体を作製した。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)の解析を進めた。また、イネの3種のアンモニウムイオントランスポーターの機能と発現組織を明らかにした。リン酸イオン吸収については、ニチニチソウなどの実験系を用いて細胞膜、液胞膜リン酸輸送系の生理解析と制御機構の一部を明らかにすると同時に、シロイヌナズナでの単離液胞膜の実験系を確立した。また、イネの複数の糖トランスポーターが花芽・種子形成にどのように機能分担して関与しているかを解明した。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。本年度は特異的なタンパク輸送小胞を失った突然変異株を単離することに成功した。

さらに、シロイヌナズナを用いたメタボロミクスの基礎的検討を行い準備を進めた。今後これらの研究を進めていく。

2. 研究実施内容

1. シロイヌナズナから硫黄欠乏によって誘導される高親和型の硫酸イオントランスポーター Sultr 1;1 に加え、さらに2種類の高親和型トランスポーター Sultr 1;2 と Sultr 1;3 のcDNAを新たに単離した。これらの硫酸イオントランスポーターは酵母欠損株の硫酸イオン取り込みを相補し、根において硫黄欠乏によってそのmRNAレベルが誘導された。Sultr 1;2 の発現部位はSultr 1;1 とほぼ同じく

根の表皮および皮層であった。

- 2．低親和型硫酸イオントランスポーターのうちSultr2; 1のアンチセンス植物体を作製し、硫黄欠乏マーカー遺伝子(ダイズの β -コングリシニン β -サブユニットのプロモーター-GUS)を有する組み換え体と交配し、*in vivo*でSultr2; 1の機能を解析した。その結果、Sultr2; 1は種子への硫酸イオン輸送に関与していることが示唆された。
- 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り、これは硫黄同化系遺伝子の発現誘導物質としての役割も果たしている。そこでセリンアセチル転移酵素遺伝子を導入した形質転換植物を作製して解析を行った。
- 4．細胞質局在性のセリンアセチル転移酵素はシステインによりフィードバック阻害を受けるが、阻害を受けない点変異体を作製した。これらの遺伝子をシロイヌナズナに導入し、得られた形質転換体のO-アセチルセリン、システイン、グルタミン酸含量を測定した結果、野生型シロイヌナズナと比較して増加していた。これらの事から、O-アセチルセリンを介してセリンアセチル転移酵素が制御に関わっていることが*in vivo*の実験によって証明できた。
- 5．窒素同化代謝機能制御に関わる遺伝子群を網羅的に解析する目的の第一歩として、日本型イネニホンバレとインド型イネカサラスを親とするバッククロスインブレッドライン98系統を用いて、老化器官からの窒素転流に鍵を握ると考えられているサイトゾル型グルタミン合成酵素(GS1)の含量と、若い器官で転流窒素の再利用に重要なNADHグルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)含量の量的形質を決定している遺伝子座(QTL)解析を免疫プロット法により行った。同時に、収量や老化速度などの農業形質に関わるQTLを解析した。その結果、7個のGS1含量に関わるQTLと6個のNADH-GOGAT含量を決定するQTLが検出され、そのうちのいくつかは農業形質を決定しているQTLと重なっていることが判明した。
- 6．ニチニチソウ培養細胞からの単離液胞を用いて、リン酸取り込み能を測定し、その輸送が膜電位によって駆動されること、リン酸欠乏下では輸送活性が上がるが、その際に輸送機構駆動系である液胞膜H⁺ポンプの活性が上昇し、その活性制御がポストトランスレショナルな機構による可能性があることを明らかにした。また、この輸送系をゲノムレベルで解析できるように、アラビドプシスの培養細胞からも高純度のインタクト液胞を単離する系を開発することに成功した。
- 7．細胞膜リン酸輸送系の制御機構として、すでに知られているリン酸輸送体遺伝子の発現制御の他に、細胞質pH変化、細胞内リン酸濃度変化、細胞膜H⁺ポンプの三者が相互ネットワークを作っていることを見いだした。
- 8．シャジクモ節間細胞の細胞膜リン酸輸送系は、高等植物のH⁺駆動型と異なり、

動物細胞と同様のNa⁺駆動型であることを明らかにしてきたが、この輸送系の誘導にリン酸のみならず駆動イオンであるNa⁺が関与することを明らかにした。

9. リン酸の同化、蓄積機構を明らかにするために、種子におけるリン酸貯蔵物質であるイノシトールリン酸に着目し、その合成、液胞への輸送を解析する系の開発に着手し、植物細胞から抽出したイノシトールリン酸系の測定方法の検討を行った。
 10. イネの花芽・種子形成に関与する糖輸送・蓄積の分子機構について、糖トランスポーターに焦点をあてて研究を行った。花粉形成時の糖輸送にスクローストランスポーター OsSUT2と単糖トランスポーター OsMST5が関与すること、また種子形成時の維管束・胚乳細胞の糖輸送にOsSUT1が関与することを明らかにした。
 11. イネの根の窒素取り込みの分子機構を解明する目的で、アンモニウムトランスポーターに焦点をあてた研究を行った。複数の遺伝子 (OsAMT1; 1 ~ 1; 3) 間で、発現様式・組織局在性に違いが見られ、各遺伝子間で機能が分担されていることが明らかとなった。酵母変異株を用いた相補実験より、これらの翻訳産物はアンモニウム輸送活性を保持していることを証明した。
 12. 形質転換アラビドプシス At2SΔLPは、種子貯蔵タンパク質 2 S アルブミンの N 末端側79アミノ酸残基と除草剤耐性遺伝子、ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) を含む融合タンパク質2SΔLPを高発現する。この形質転換植物は、栄養成長細胞に新たに誘導された特異的な輸送小胞 (PAC) に多量の2SΔLPを蓄積するにもかかわらず、除草剤、ホスフィノスリシンに対して感受性を示す。そこで、本形質転換体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スクリーニングした。現在、5系統のホスフィノスリシン耐性突然変異株の単離に成功しており、遺伝学的解析を行っている。これらの変異体の栄養成長細胞にはPAC輸送小胞が消失しており、2SΔLPがペルオキシソームに蓄積していることが明らかになった。
3. 主な研究成果の発表 (論文発表)
- Yves Hatzfeld and Kazuki Saito (2000) Evidence for the existence of rhodanese (thiosulfate: cyanide sulfurtransferase) in plants: preliminary characterization of two rhodanese cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, 470, 147-150
- Yves Hatzfeld, Akiko Maruyama, Ahlert Schmidt, Masaaki Noji, Kimiharu Ishizawa and Kazuki Saito (2000) β-Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 123, 1163-1171
- Yves Hatzfeld, Sangman Lee, Minsang Lee, Thomas Leustek and Kazuki Saito

(2000) Functional characterization of a gene encoding a fourth ATP sulfurylase isoform from *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 248, 51-58

Hideki Takahashi, Akiko Watanabe-Takahashi, Frank W. Smith, Mechteld Blake-Kalff, Malcolm J. Hawkesford and Kazuki Saito (2000) The roles of three functional sulfate transporters involved in uptake and translocation of sulfate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 23, 171-182

Yasuomi Urano, Tomofumi Manabe, Masaaki Noji and Kazuki Saito (2000) Molecular cloning and functional characterization of cDNAs encoding cysteine synthase and serine acetyltransferase that may be responsible for high cellular cysteine content in *Allium tuberosum*. *Gene*, 257, 269-277

Kazuki Saito (2000) Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 188-195

Kazuki Saito, Hideki Takahashi, Masaaki Noji, Kenji Inoue and Yves Hatzfeld (2000) Molecular regulation of sulfur assimilation and cysteine synthesis. in "Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants" C. Brunold, H. Rennenberg, L.J. Kok, I. Stulen and J.-C. Davidian, eds. pp. 59-72, Paul Haupt Publishers, Berne

Hideki Takahashi, Akiko Watanabe, Noriko Sasakura, Wataru Asanuma, Michimi Nakamura and Kazuki Saito (2000) Molecular characterization of the sulfate transporter gene family in *Arabidopsis thaliana*. in "Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants" C. Brunold, H. Rennenberg, L.J. Kok, I. Stulen and J.-C. Davidian, eds. pp. 265-268, Paul Haupt Publishers, Berne

Yves Hatzfeld and Kazuki Saito (2000) Regulation of sulfate transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. in "Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants" C. Brunold, H. Rennenberg, L.J. Kok, I. Stulen and J.-C. Davidian, eds. pp. 269-272, Paul Haupt Publishers, Berne

Masaaki Noji, Maiko Saito, Mitsuko Aono, Hikaru Saji and Kazuki Saito (2000) Modulation of cysteine biosynthesis and resistance to SO₂ in transgenic tobacco overexpressing cysteine synthase in cytosol and chloroplasts. in "Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants" C. Brunold, H. Rennenberg, L.J. Kok, I. Stulen and J.-C. Davidian, eds. pp. 289-290, Paul Haupt Publishers, Berne

Kenji Inoue, Masaaki Noji, Takeshi Katagiri, Kazuo Shinozaki and Kazuki Saito (2000) Subcellular localization and feedback inhibition of serine acetyltransferase. in "Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants"

C. Brunold, H. Rennenberg, L.J. Kok, I. Stulen and J.-C. Davidian, eds. pp. 372-330, Paul Haupt Publishers, Berne

Tomofumi Manabe, Asako Hasumi, Mitsuyo Sugiyama, Mami Yamazaki and Kazuki Saito (2000) Alliinase (S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase) from *Allium tuberosum* (Chinese chive) in "Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants" C. Brunold, H. Rennenberg, L.J. Kok, I. Stulen and J.-C. Davidian, eds. pp. 419-420, Paul Haupt Publishers, Berne

M. Obara, T. Sato and T. Yamaya (2000) High content of cytosolic glutamine synthetase does not accompany with a high activity of the enzyme in rice (*Oryza sativa* L) leaves of indica cultivars during the life span. *Physiol. Plant.* 108: 11-18.

S. Kojima, M. Kimura, Y. Nozaki and T. Yamaya : (2000) Analysis of a promoter for NADH-glutamate synthase gene in rice (*Oryza sativa*) Cell-type specific expression in developing organs of transgenic rice plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 27 : 787-793.

S. Kojima, S. Hanzawa, T. Hayakawa, M. Hayashi and T. Yamaya (2000) Nucleotide sequence of a genomic DNA (Accession No. AB037664) and a cDNA (Accession No. AB037595) encoding cytosolic glutamine synthetase in Sasanishiki, a leading cultivar of rice (*Oryza sativa* L) in northern Japan (PGR 00-048) *Plant Physiol.* 122: 1459.

K. Nakano, T. Suzuki, T. Hayakawa and T. Yamaya : (2000) Organ and cellular localization of asparagine synthetase in rice plants. *Plant Cell Physiol.* 41:874-880.

Massonneau A., Martinoia E., Dietz K.-J., Mimura T (2000) Phosphate uptake across the tonoplast of intact vacuoles isolated from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Planta* 211:390-395.

Mimura T., Shindo C., Kato M., Yokota E., Sakano K., Ashihara H., Shimmen T. (2000) Regulation of cytoplasmic pH under extreme acid treatment in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* : A possible role of inorganic phosphate. *Plant & Cell Physiology* 41:424-431.

Reid R.J., Mimura T., Ohsumi Y., Walker N.A., Smith F.A (2000) Phosphate transport in Chara : membrane transport via Na/Pi cotransport. *Plant Cell & Environment* 23:223

Kashiyama T., Kimura N., Mimura T., Yamamoto K (2000) Cloning and characterization of a myosin from characean alga, the fastest motor protein in the world *Journal of Biochemistry* 127:1065-1070.

Mimura T., Ashihara H(2000)Physiology of plant cells in culture. In: The Encyclopedia of Cell Technology, Ed. Spier, R.E., pp. 979-987, John Wiley & Sons, Inc.

Huang J, Toyofuku K, Yamaguchi J, Akita S(2000) Expression of α -amylase isoforms and the *RAmy1A* gene in rice(*Oryza sativa* L.)during seed germination in submerged soil, and its relationship with coleoptile length. *Plant Prod. Sci.* 3 : 32-37

Guglielminetti L, Perata P, Morita A, Loreti E, Yamaguchi J, Alpi A(2000) Isoform characterization of hexose kinase in rice embryo. *Phytochem.* 53: 195-200

Matsukura C, Kawai M, Toyofuku K, Barrero RA, Uchimiya H, Yamaguchi J (2000)Transverse vein differentiation associated with the gas space formation - fate of middle cell layer in leaf sheath development of rice -. *Ann. Bot.* 85: 19-27

Awazuhara M, Nakagawa A, Yamaguchi J, Fujiwara T, Hayashi H, Hatae K, Chino M, Shimada A(2000)Distribution and characterization of enzymes responsible causing starch degradation in rice(*Oryza sativa* cv. Koshihikari) *J. Agr. Food Chem.* 48: 245-252

Toyofuku K, Loreti E, Vernieri P, Alpi A, Perata P, Yamaguchi J(2000)Glucose modulates the abscisic acid-inducible Rab16A gene in cereal embryos. *Plant Mol. Biol.* 42: 451-460

Matsukura C, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J(2000)Sugar uptake and transport in rice embryos. Expression of companion cell-specific sucrose transporter(*OsSUT1*) induced by sugar as well as light-. *Plant Physiol.*124: 85-94

Toyofuku K, Kasahara M, Yamaguchi J(2000)Characterization and expression of monosaccharide transporters(*OsMSTs*) in rice. *Plant Cell Physiol.*41: 940-947

Loreti E, Matsukura C, Gubler F, Alpi A, Yamaguchi J, Perata P(2000)Glucose repression of α -amylase in barley embryos is independently of GAMYB transcription. *Plant Mol. Biol.* 44: 85-90

Otsuki S, Matsukura C, Yamaguchi J(2000)The expression of a gene encoding Ca²⁺-binding EF-hand motif is induced by sugars in rice embryos. *Rice Genetics Newsletter* 17: 92-94

Sonoda Y, Ikeda A, Yamaguchi J(2000)Characterization of rice ammonium transporters, *OsAMT1;1* and *OsAMT1;2*. *Rice Genetics Newsletter* 17: 89-92

Hayashi, M., Nito, K., Toriyama-Kato, K., Kondo, M., Yamaya, T. and Nishimura, M(2000)AtPex14p maintains peroxisomal functions by determining protein

targeting to three kinds of plant peroxisomes. *EMBO J.* 19, 5701-5710.

De Bellis, L., Gonzali, S., Alpi, A., Hayashi, H., Hayashi, M. and Nishimura M. (2000) Purification and characterization of a novel pumpkin short-chain acyl-CoA oxidase with structural similarity to acyl-CoA dehydrogenases *Plant Physiol.* 123, 327-334.

Takemoto, D., Hayashi, M., Doke, N., Nishimura, M. and Kawakita, K. (2000) Isolation of the gene for EILP, an elicitor-inducible LRR receptor-like protein, from tobacco by differential display. *Plant Cell Physiol.*, 41, 458-464.

Hayashi, M. (2000) Plant peroxisomes; molecular basis of the regulation of their functions. *J. Plant Res.* 113, 103-109

Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Kato, A., Mano, S., De Bellis, L., Ishimaru, Y., Yamaguchi, K., Hayashi, H. and Nishimura, M. (2000) Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochem. Biophys.* 32, 295-304.

Kato, A., Hayashi, M., Kondo, M. and Nishimura, M. (2000) Transport of peroxisomal proteins that are synthesized as large precursors in plants. *Cell Biochem. Biophys.* 32, 269-275.

Mano, S., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2000) A leaf-peroxisomal protein, hydroxypyruvate reductase, is produced by light-regulated alternative splicing. *Cell Biochem.*

Chai-Ling Ho and Kazuki Saito (2001) Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 20: 243-259.

Kazuki Saito, Hiroshi Sudo, Mami Yamazaki, Mio Koseki-Nakamura, Mariko Kitajima, Hiromitsu Takayama and Norio Aimi (2001) Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila*. *Plant Cell Rep.*, 20, 267-271

Takeda T, Toyofuku K, Matsukura C, Yamaguchi J (2001) Sugar transporters in grain development of rice. *J. Plant Physiol.* 158: 465-470.

Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J (2001) Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell*, 13: 999-1010.

Nito, K., Yamaguchi, K., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2001) Pumpkin peroxisomal ascorbate peroxidase is localized on peroxisomal membranes and unknown membranous structures. *Plant Cell Physiol.* 42, 20-27.

池田 亮, 園田 裕, 山口淳二(2000)植物の根に関する諸問題(79) 根の側根形成と窒素の取り込みに関する遺伝子群. 農業および園芸, 75: 301-308.

大槻茂男 山口淳二(2000)肥育イネの作出 - 糖センサー改変による新しい植物代謝工学. バイオサイエンスとインダストリー, 58: 38-39 (ISSN 0914-8981)

林 誠(2000)連載講座「見る」生物学 - 4GFPを用いてタンパク質の動きや輸送を見る、化学と生物、38、386-389.

林 誠(2000)高等植物ペルオキシソームに秘められた未知なる機能、化学と生物、38、602-603.

粟津原元子、斉藤和季、“植物における硫黄代謝とその制御”植物の化学調節、35、160-168(2000)