

平成22年 6月21日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19780011

研究課題名（和文） 有用物質を高度に蓄積した植物工場用宿主イネの開発

研究課題名（英文） Development of host rice as a bioreactor for high value recombinant protein production

研究代表者 川勝 泰二（KAWAKATU TAIJI）

独立行政法人 農業生物資源研究所・遺伝子組換え作物開発センター

任期付研究員

研究者番号：30435614

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では有用外来物質を蓄積する遺伝子組換え作物の実用化を目指し、外来有用物質を高度に蓄積するメカニズムの解析を行った。種子貯蔵タンパク質を低減し、外来遺伝子産物に余剰アミノ酸を利用させるために、各種種子貯蔵タンパク質低減システムを作出した。種子特異的転写因子である RISBZ1 および RPF が種子貯蔵タンパク質遺伝子を冗長的に正に制御していることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

This research project aims for understanding mechanisms of seed storage protein (SSP) synthesis in rice endosperm. We generated several transgenic rice plants with reduced SSPs, in which recombinant products can use surplus amino acids. Rice seed specific transcription factors RISBZ1 and RPF regulate SSP gene expression redundantly. RISBZ1 and RPF are regulatory factors of endosperm quality.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：イネ、胚乳、種子貯蔵タンパク質、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子組換え作物の作付けが世界的に増加しているが、ほとんどが除草剤抵抗性・耐虫性が付与されたものである

(2) 研究代表者が所属する研究室では有用外

来タンパク質を蓄積した遺伝子組換えイネの開発が進められていた

(3) イネ種子は組換えタンパク質を蓄積させるのに適したバイオリクターであることが明らかになっていた

(4) イネ種子を用いた物質生産の真の実用化のためには更に高度に外来遺伝子産物を蓄積させる必要があると考えられた

(5) 外来遺伝子産物高度蓄積のストラテジーとして、主にプロモーターの改変が行われてきていたが、遺伝的背景の改善は行われてこなかった

## 2. 研究の目的

(1) イネ種子で物質生産を行うということは、成分を改変することである。そのためにはまずイネ種子中に高度に蓄積する種子貯蔵タンパク質の性質等について理解する必要がある。そこで様々な品種の多様性を解析することで、新たな種子貯蔵タンパク質の同定、総種子タンパク質含量と種子タンパク質組成を解析する。

(2) イネ種子貯蔵タンパク質を低減することで生じる余剰アミノ酸を外来遺伝子産物で利用することが可能と考えられたため、グルテリン、プロラミン、グロブリンといった主要な種子貯蔵タンパク質を低減したイネを作出し、物質生産に適した宿主イネの候補とする。またそれらの種子貯蔵タンパク質低減系統の特性を解析する。

(3) *in vivo* で種子貯蔵タンパク質遺伝子発現を制御する転写因子の *in planta* における機能を解析し、利用することで更に自在な遺伝子発現制御を可能にすることを旨とする

## 3. 研究の方法

(1) 様々なイネ品種の種子貯蔵タンパク質を農業生物資源研究所ジーンバンクから取り寄せ、種子タンパク質含量を dumas 法（食品総合研究所 LEC0528 を使用）で測定し、種子タンパク質組成を SDS-PAGE で解析した。

(2) (1) で同定した SDS-PAGE でジャポニカ/インディカ多型を示すタンパク質をジャポニカ/インディカ間の染色体部分置換系統および組換え自殖系統を用いて構造遺伝子を同定した。この遺伝子のプロモーター領域を単離し、GUS 遺伝子と融合させ、プロモーター解析を行った。種子貯蔵タンパク質遺伝子発現を制御する転写因子の制御下にあることを EMSA、プロトプラストを用いたレポーターアッセイによって証明した。

(3) 遺伝子発現抑制法を用いて種子貯蔵タンパク質低減系統を作出し、イネ種子への影響を解析した。具体的には種子タンパク含量、各種種子貯蔵タンパク質蓄積量、デンプン含量について調査した。細胞内構造についても解

析した。また種子貯蔵タンパク質は発芽後のアミノ酸源として高度に蓄積されるため、種子貯蔵タンパク質低減系統ではアミノ酸組成が変化していることが考えられたため、HPLC で遊離アミノ酸含量、総アミノ酸含量を定量した。

(4) 種子特異的転写因子である RISBZ1 および RPBF のノックダウン系統を作出し植物体内での機能を解析した。また、RISBZ1 および RPBF が植物細胞内で複合体を形成するかどうか、共沈降実験で解析した。

## 4. 研究成果

(1) 取り寄せたほとんどの遺伝資源の種子重あたり種子タンパク質重量パーセントは、報告されている値よりも低かった。重量パーセントで最大値を示したのは RAMINAD STRAIN 3 の 12.6% で、種子 1 粒当たり 2.161mg のタンパク質を含有していた。種子 1 粒当たりのタンパク質重量で最大値を示したのは DOURADO AGULHA で、2.572mg/粒 (8.8%) だった。SDS-PAGE のパターン（それぞれの種子貯蔵タンパク質の割合）はほぼ一様であったが、ジャポニカ-インディカ間において 60kDa、30kDa 付近のバンドが多型を示した。60kDa 付近のバンドはインディカで見られたが、ジャポニカでは見られなかったことから、WAXY タンパク質であると推察された。30kDa 付近のバンド (a4) はグルテリン酸性サブユニットの直下のバンドで、ジャポニカのバンドはインディカよりも若干泳動度が早かった。GluA、GluB、GluC 特異的抗体を用いたウェスタンブロットではこのバンドは検出できなかったが、全てのグルテリン反応する抗体では検出されたことから新規のグルテリンであることが明らかになった。

(2) a4 の遺伝子を同定するため、コシヒカリ/Nona Bokra 間の染色体部分置換系統、日本晴/Kasalath 間の組換え自殖系統を用いてマッピングを行ったところ、複数のグルテリンがクラスターを形成する領域に座乗していることが明らかになった。この内、0s02g024900 にアミノ酸置換を引き起こす SNP が見つかった。大腸菌においてジャポニカ、インディカの SNP を持つ組換えタンパクを産生し泳動度を比較したところジャポニカ型の組換えタンパクの方が泳動度が早かった。特異的抗体を作成しウェスタンブロット解析に供した結果、a4 は 0s02g024900 であることが明らかとなった。そこで新規グルテリン a4 を GluD-1 とした。

*GluD-1* は登熟中の種子特異的に発現していた。*GluD-1* プロモーターと GUS 遺伝子を融合し、イネに形質転換したところ、GUS 活性は登熟初期に内胚乳のみで見られたが、登熟

が進むにつれて胚乳全体に広がっていった。内胚乳特異的プロモーターとして *RAG* プロモーターが同定されていたが、*GluD-1* プロモーターよりも活性が低かった。したがって *GluD-1* プロモーターは新規の内胚乳特異的プロモーターとして有用であると考えられた (図 1)。

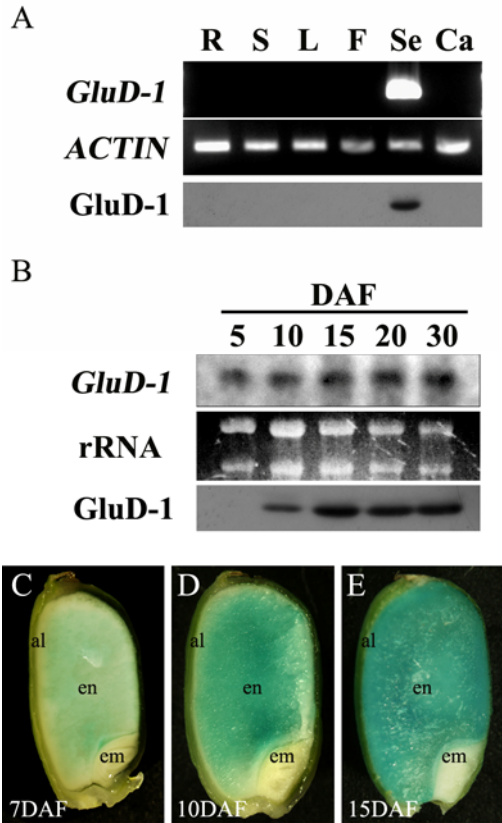


図 1 *GluD-1* の発現パターン  
A 器官特異的発現パターン. B 登熟ステージ特異的発現パターン. C-E 組織特異的発現パターン.

*GluD-1* プロモーターのデリベーションラインと GUS 遺伝子を融合し、イネに形質転換したところ、内胚乳特異的発現には翻訳開始点から約 200bp 上流の領域で充分であることが明らかになった。この領域内には種子貯蔵タンパク質遺伝子発現を *in vivo* で制御することが知られている bZIP 型転写因子である RISBZ1 が認識する GCN4 様配列、DOF 型転写因子である RPBPF の認識配列である P box が 3 つタンデムに並んで存在していた。イネプロトプラストを用いたレポーターアッセイの結果、RISBZ1 は弱く、RPBPF は強く *GluD-1* プロモーターに対して転写活性化能を有していることが明らかになった。また、RISBZ1 と RPBPF 両方を発現させるとその転写活性化能は相乗的になった。このことから、RISBZ1 と RPBPF は協調的に *GluD-1* 遺伝子発現を制御していることが明らかになった。

次に EMSA により実際に RISBZ1 と RPBPF が

*in vitro* で *GluD-1* プロモーターに結合することが明らかになった。3 つの P Box の内、一番 5' よりの P box に変異を入れることで RPBPF は結合しなくなったため、この P box を介して RPBPF は *GluD-1* プロモーターを制御していることが明らかになった。GCN4 様配列に変異を入れ、典型的な GCN4 にすると結合が強まり、完全に GCN4 をなくすことで結合が見られなくなった。レポーターアッセイでも同様のことが観察された。これまでに *GluB-1* プロモーターの GCN4 モチーフに変異を入れると発現領域がアリュuron層、サブアリュuron層から内胚乳に変わることが報告されていた。本研究の結果と付き合わせると、GCN4 モチーフのゆらぎによって胚乳内での組織で発現するかが決定されることが示唆された。

(3) 遺伝子発現抑制法を用い、各種種子貯蔵タンパク質低減系統を作出した。具体的には、主に *GluA* および *GluB* を低減させた”*Gluless*”、主に *GluB* を低減させた”*GluB less*”、*GluB* および  $\alpha$ -グロブリンを低減させた”*GluB·Glb less*”、13kD プロラミンを低減させた”13kD *Proless*”、10kD プロラミンを低減させた”10kD *Proless*”、16kD プロラミンを低減させた”16kD *Proless*”である。種子貯蔵タンパク質を低減させると他の種子貯蔵タンパク質の増加により、総種子タンパク質含量が補償されることがよく知られている。作出した種子貯蔵タンパク質低減系統においても、他の種子貯蔵タンパク質の増加による補償効果が観察された。これらの貯蔵タンパク質低減や、補償効果は遺伝子発現レベルでも確認された。

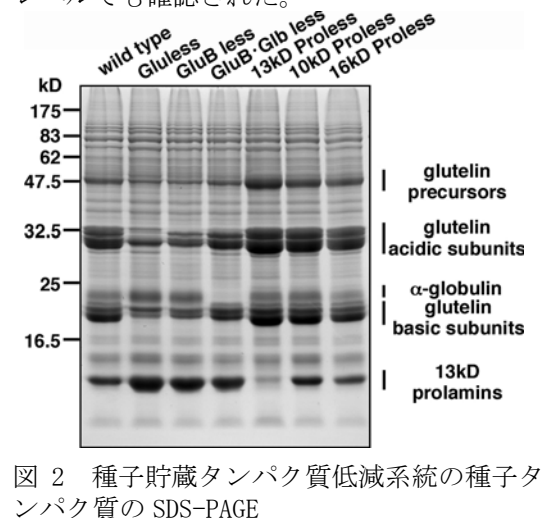


図 2 種子貯蔵タンパク質低減系統の種子タンパク質の SDS-PAGE

粗タンパク含量は、*Gluless*、*GluB less*、*GluB·Glb less*、13kD *Proless* では野生型とほぼ同等であったが、10kD *Proless*、16kD *proless* ではやや減少していた。貯蔵タンパク質低減系統の種子サイズ・重量はやや野生

型よりも減少したが、ほぼ同等であった。デンプン含量は変化しなかった。トウモロコシの $\alpha$ -zeinが減少したopaque2変異体を始め、種子貯蔵タンパク質の減少に、種子の白濁化が付随することがよくあるが、これらの貯蔵タンパク質低減系統では白濁化は付随しなかった。

グルテリンおよびグロブリンは、易消化性のタンパク質貯蔵液胞であるプロテインボディ II (PB-II) に、プロラミンは難消化性であり、ER 由来の PB-I に貯蔵される。貯蔵タンパク質低減系統においてプロテインボディ形状について調べた結果、グルテリン低減系統では PB-II がやや小型化し、大量の小型の PB-I が増加した。プロラミン低減系統では PB-II がやや大型化した。13k Proless では PB-I が極小化した。10k Proless ではやや小型化し、16k Proless では変化は見られなかった。

遊離アミノ酸含量は貯蔵タンパク質低減系統で一様にやや増加した。グルテリン低減系統では総リシン含量が減少し、プロラミン低減系統では増加した。13k Proless では野生型の約 1.5 倍まで増加した。1 分子あたりにグルテリンは 12~14 のリシンを含み、プロラミンは含まない。プロラミン低減系統ではグルテリンは増加するため、リシン含量の変動につながったと考えられた。cereal のほとんどがプロラミンを主要な種子貯蔵タンパク質とするのに対し、イネはグルテリンが主要な種子貯蔵タンパク質であるため、イネは cereal の中では比較的リシンの割合がまともであることが示唆された。

(4) *in vivo* で種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現制御に関与する RISBZ1 および RPBF の *in planta* における機能を明らかにするため、ノックダウン (KD) 系統を作出・解析した (それぞれ KD-RISBZ1, KD-RPBF)。ダブル KD でのみ種子貯蔵タンパク質含量が顕著に減少したため (mRNA レベル、タンパク質レベルで)、RISBZ1 と RPBF が冗長的に直接種子貯蔵タンパク質遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。他の主要貯蔵物質であるデンプン、脂質含量については、RISBZ1 および RPBF によって間接的に制御されていることが明らかとなった。興味深いことに、KD-RISBZ1 では RPBF が、KD-RPBF では RISBZ1 の蓄積量が登熟後期に増加しており、お互いの減少を補償しあっていた。一方で、RISBZ1 と RPBF はプロトプラスト核内で複合体を形成し、相乗的に種子貯蔵タンパク質遺伝子発現を制御することが明らかとなった。したがって、イネ種子登熟過程のホメオスタシスは RISBZ1 と RPBF の補償効果によって維持され、相互作用によって強固になっていると考えられる。

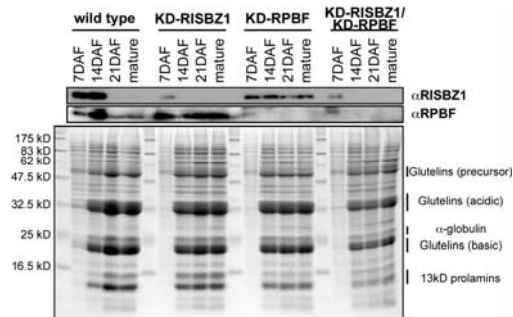


図 3 RISBZ1 および RPBF ノックダウン系統における RISBZ1、RPBF、種子タンパク質含量

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Yang L, Wakasa Y, Kawakatsu T, Takaiwa F (2009) The 3' -untranslated region of rice glutelin GluB-1 affects accumulation of heterologous protein in transgenic rice. *Biotechnology Letters* 31:1625-1631

(2) Kawakatsu T, Yamamoto M.P, Touno S.M, Yasuda H, Takaiwa F (2009) Compensation and interaction between RISBZ1 and RPBF during grain filling in rice. *The Plant Journal* 59:908-920

(3) Yasuda H, Hirose S, Kawakatsu T, Wakasa Y, Takaiwa F (2009) Overexpression of BiP has inhibitory effects on the accumulation of seed storage proteins in endosperm cells of rice. *Plant and Cell Physiology* 50:1532-1543

(4) Kawakatsu T, Taramino G, Itoh J, Allen J, Sato Y, Hong S-K, Yule R, Nagasawa N, Kojima M, Kusaba M, Sakakibara H, Sakai H, Nagato Y (2009) PLASTOCHRON3/GOLIATH encodes a glutamate carboxypeptidase required for proper development in rice *The Plant Journal* 58:1028-1040

(5) Kawakatsu T, Yamamoto M.P, Hirose S, Yano M, Takaiwa F (2008) Characterization of a new rice glutelin gene GluD-1 expressed in the starchy endosperm. *Journal of Experimental Botany* 59:4233-4245

(6) 廣瀬咲子, 高木英典, 川勝泰二, 若佐雄也, 土門英司, 遠藤雄士, 村岡賢一, 平井一夫, 渡邊朋也, 服部誠, 立石剣, 高岩文雄 (2008) スギ花粉症緩和米の安全性確

保への取り組み－大規模隔離ほ場栽培と生物多様性影響評価－ 育種学研究 10:23-30

〔学会発表〕(計9件)

(1) 川勝泰二 イネ bZIP 型転写因子 RISBZ1 と DOF 型転写因子 RPBF の種子登熟における補償作用および相互作用 日本植物生理学会 2010年3月21日 熊本大学(熊本)

(2) Kawakatsu T Compensation and interaction between RISBZ1 and RPBF during grain filling in rice. the 9th International Plant Molecular Biology Congress 2009年10月27日 セントルイス(アメリカ)

(3) Wakasa Y The role of ER-chaperone BiP on quality control in rice endosperm cells the 9th International Plant Molecular Biology Congress 2009年10月27日 セントルイス(アメリカ)

(4) 川勝泰二 イネ bZIP 型転写因子 RISBZ1 と DOF 型転写因子 RPBF の種子登熟における補償作用および相互作用 日本育種学会 2009年9月26日 北海道大学(北海道)

(5) 若佐雄也 イネ胚乳タンパク質の品質管理における ER シャペロン BiP の役割 日本育種学会 2009年9月26日 北海道大学(北海道)

(6) 高岩文雄 RSIS を用いた新規遺伝子発現抑制手法の開発 日本育種学会 2009年9月26日 北海道大学(北海道)

(7) 川勝泰二 内胚乳で発現するイネグルテリン遺伝子 *GluD-1* の発現制御機構の解析 日本育種学会 2009年3月28日 つくば国際会議場(茨城県)

(8) 川勝泰二 イネ種子貯蔵タンパク質低減系統の作出および解析 日本育種学会 2008年10月12日 滋賀県立大学(滋賀県)

(9) 川勝泰二 イネ新規グルテリン遺伝子 *GluD-1* の同定および解析 日本育種学会 2007年9月23日 山形大学(山形県)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：植物の内胚乳に特異的に発現する遺伝子および該遺伝子のプロモーター、並びにそれらの利用

発明者：高岩文雄、川勝泰二  
権利者：農業生物資源研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2009/057311

出願年月日：2009年4月10日

国内外の別：外国

名称：植物の内胚乳に特異的に発現する遺伝子および該遺伝子のプロモーター、並びにそれらの利用

発明者：高岩文雄、川勝泰二

権利者：農業生物資源研究所

種類：特許

番号：特願 2008-104132

出願年月日：2008年4月11日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川勝 泰二 (KAWAKATSU TAIJI)

独立行政法人農業生物資源研究所

遺伝子組換え作物開発センター

任期付研究員

研究者番号：30435614