

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06731

研究課題名(和文) プラスチド局在型葉酸によるデンプン合成抑制機構の解明

研究課題名(英文) Study on mechanism suppressing starch biosynthesis by plastidial folate

研究代表者

林 誠 (Hayashi, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：50212155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが提唱した葉酸がデンプン非蓄積型プラスチドにおけるデンプン蓄積を抑制するというモデルの実証をめざした研究を立案し、以下の結果を得た。

(1) 13株のFU耐性変異体を得た。そのうちの2つは原因遺伝子の特定が終わり、遺伝子の機能を解析中である。どちらの原因遺伝子もこれまでに機能解析が行われた例がない。アデニン耐性変異体とD8耐性変異体についても複数の変異体を単離した。(2) デンプン蓄積誘導能の有する2つの化合物を同定した。そのうちの1つ(D8)は葉酸代謝拮抗剤と考えられた。現在、論文作成中である。D8に結合するタンパク質の生成をめざしてアフィニティー担体を合成中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デンプンは食料やバイオ燃料の原料として重要である。デンプンは光合成の最終産物としてアミロプラストや葉緑体に蓄積する。一方、これら以外のプラスチドでは葉酸がデンプンの蓄積を抑制している。本研究によって同定された遺伝子は葉酸によるデンプン蓄積抑制機構に関わると考えられる。より多くの関連遺伝子が同定され、その機能が明らかになることで、葉酸によるデンプン蓄積抑制機構の理解が進むとともに、植物のデンプン生産性向上に向けた技術基盤の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously, the applicants proposed model that folic acid inhibits starch accumulation in non-starch-accumulating plastids. To examine this model, we performed several experiments, and obtained following results.

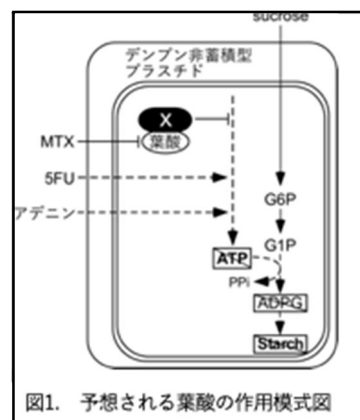
(1) Thirteen FU-resistant mutants were obtained. Mutated gene in two of them was identified. Function of these genes has not demonstrated yet. We are now analyzing the function by demonstrating phenotype of these mutants in detail. Several adenine-resistant and D8-resistant mutants were also isolated and characterized. (2) Two compounds that had ability to induce starch accumulation in non-starch-accumulating plastids were identified. One of them (D8) seemed to be an antifolate. Manuscript describing these results are being prepared for publication. To isolate protein that binds to D8, An affinity carrier containing D8 is under synthesis.

研究分野：植物生理学

キーワード：葉酸 デンプン プラスチド エチオプラスト 葉酸代謝拮抗剤 抗菌剤 除草剤

1. 研究開始当初の背景

デンプンは植物のアミロプラストや葉緑体に蓄積することが知られている。これらはプラスチドと呼ばれる一群のオルガネラの一つである。一方、エチオプラストを含むその他のプラスチドにはデンプンが蓄積しない。アミロプラストや葉緑体にデンプンが蓄積する仕組みについては多くの研究があるが、デンプン非蓄積型プラスチドがデンプンを蓄積しない仕組みに関する研究はほとんどない。研究代表者らが単離したシロイヌナズナ *fpgs1* 変異体はプラスチド局在型の葉酸合成酵素を欠損する。この変異体は葉酸が欠乏しており、エチオプラストや暗条件下の葉緑体など本来デンプンを蓄積しないプラスチドにデンプンが蓄積する。メタボローム解析の結果、アデニンが蓄積していることも判明した。これらの結果を受け、野生型シロイヌナズナに葉酸合成阻害剤であるメトトレキサート (MTX) や葉酸代謝拮抗剤である 5 フルオロウラシル (5FU)、アデニンを投与したところ、エチオプラストにデンプン蓄積が誘導された。これらの研究結果を元に、研究代表者らはデンプン非蓄積型プラスチドも潜在的なデンプン蓄積能を持っているが葉酸がデンプン蓄積を抑制しているというモデルを提唱した (図 1)。葉酸の機能とデンプン蓄積の関連性を論じた報告は研究代表者らの論文が最初だったが、その詳細な分子機作は明らかにできていなかった。



2. 研究の目的

研究代表者らは提唱したモデル (図 1) に従えば、葉酸存在下では ATP が欠乏し、デンプン合成の前駆体である ADP グルコースを合成できず、デンプンが蓄積しない。一方、*fpgs1* 変異や MTX、5FU の添加でエチオプラストにデンプン蓄積が誘導された。これは、葉酸の合成や作用が阻害されたことで、ATP 合成が促進され、デンプンが蓄積すると考えている。*fpgs1* 変異変異体はアデニン量が増加していたことから、野生型シロイヌナズナにアデニンを添加したところエチオプラストのデンプン蓄積が誘導された。このことから、葉酸が ATP 合成を抑制する可能性が示唆されるが、そのメカニズムは明らかにできていない。

葉酸は核酸やアミノ酸の合成に関わる酵素の補酵素として機能することが知られている。しかしながら、葉酸を補酵素とする植物酵素についての知見は非常に乏しく、また葉酸からデンプン蓄積抑制に至るまでに関与する代謝経路も知られていない。そのため、本モデルにどのような遺伝子が関わっているのか、その詳細は不明である。葉酸によるデンプン蓄積抑制に関与する遺伝子やタンパク質の同定し、その機能を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、(1) エチオプラストにデンプン蓄積を誘導する化合物に対して耐性を示す変異体の単離と原因遺伝子の分子遺伝学的解析、(2) エチオプラストにデンプン蓄積を誘導する新規化合物の同定、を行った。方法の詳細は以下の通り。

(1) 変異原処理を行ったシロイヌナズナを 5FU やアデニン、下記 (2) で説明する D8 を含む培地で生育させ、デンプンが蓄積しない薬剤耐性変異体を同定した。得られた変異体の原因遺伝子座を分子遺伝学的手法により特定した。平行して変異体の全ゲノムシーケンズを行い、変異体の原因遺伝子座が存在するゲノム領域内で野生型シロイヌナズナと異なる配列を持つ遺伝子を検索した。該当する遺伝子の T-DNA 挿入株の表現型が本研究で得られた変異体と一致することを確認した。特定した原因遺伝子のアノテーションを参考にして、変異体の表現型を詳細に解析し、原因遺伝子の機能を推定した。

(2) 水耕栽培法を用いて大規模ケミカルライブラリーのスクリーニングを行い、エチオプラストにデンプン蓄積を誘導する化合物を探索した。得られた化合物の構造類縁体の中からデンプン蓄積誘導能が最も高い化合物を同定した。同定した化合物と共通の構造を持つ既知化合物を探し、既知化合物と同様の作用を持つか否かについて検討した。

4. 研究成果

研究代表者らが提唱した葉酸がデンプン非蓄積型プラスチドにおけるデンプン蓄積を抑制するというモデルの実証をめざし、以下の結果を得た。

(1) これまでに約 23,000 個体をスクリーニングし、FU 存在下にも関わらずエチオプラストにデンブンプが蓄積しない FU 耐性変異体を 13 株単離した。これらの変異体を原因遺伝子ごとに 3 つのグループに分類した。グループ 1 には 11 株が分類された。そこで、これらのなかの 1 つの変異体に着目し、以下の実験を行った。まず、変異体の遺伝学的解析を行った。その結果、この変異体は潜在的な 1 遺伝子変異を持つことが分かった。そこで、分子遺伝学的解析によって原因遺伝子を同定した。マッピングの結果、本遺伝子座が 1 番染色体の後ろ、27.3-28.5 Mbp の間に存在することが判明した。次に、変異体のゲノム DNA を抽出し、全ゲノムシーケンスを行った。野生型と変異体のゲノム塩基配列を比較したところ、遺伝子座の存在する範囲内に存在し、かつアミノ酸配列が変化するような変異を持つ遺伝子を 4 つ発見した。そこで、これら 4 つの遺伝子の T-DNA 挿入ノックアウト株を取り寄せた。これらのノックアウト株を FU 存在下で生育したところ、そのうちの 1 つのノックアウト株のエチオプラストのみにデンブンプが蓄積した。以上の結果から、この遺伝子変異が FU によるデンブンプ蓄積効果を阻害することが証明できた。この遺伝子はアミノ酸代謝経路を担う酵素をコードしていた。そこで、FU とこの酵素の代謝産物を野生型シロイヌナズナに同時に投与したところ、FU によるデンブンプ蓄積効果が阻害された。現在、本酵素の機能について検討しているが、まだ成果を発表できるまでには至っていない。そのため、ここでは本酵素名の公表は控えさせていただく。いずれにしても、葉酸機能とアミノ酸代謝、デンブンプ蓄積という、これまでその関連が議論されてこなかった 3 つの現象になんらかの関係があることが示唆されたことで、種子発生のメカニズムの理解に新しい展開を生む可能性を秘めていると考えられる。この成果については、本年度に学会発表を行う予定である。また、残りの 2 つの変異体についても同様の研究を行っている。そのうちの 1 つについてはすでに遺伝子の特定が終わり、遺伝子機能を解析中である。残りの 1 つについては、現在遺伝子座のマッピング中である。アデニン耐性変異体および下記 D8 に耐性を示す変異体のスクリーニングも行った。どちらの化合物についても、これまでに多数の変異体候補株を単離している。アデニン耐性変異体候補株のうちの 2 つについては原因遺伝子の同定中である。

(2) エチオプラストにデンブンプ蓄積を誘導する新規化合物の同定をめざして以下の実験を行った。まず、多検体の化合物の効果をハイスループットで検証するために、液体培養による評価方法を確立した。10 個体の野生型シロイヌナズナを 96 ウェルマイクロプレートに入れた水耕栽培液で暗所 6 日間生育させ、デンブンプ蓄積の有無を調べた。このとき、各化合物につき 3 種類の異なる濃度の水耕栽培液を用いた。ケミカルライブラリーは長浜バイオ大学バイオサイエンス学部の水上教授より分与していただいた。このケミカルライブラリーは、水上教授らのグループによって開発され、オートファジー阻害剤に用いられた実績がある。本研究で開発した水耕栽培法によってケミカルライブラリーをスクリーニングした結果、デンブンプ蓄積誘導能の有する 2 つの化合物を単離した。さらに、それぞれの化合物について構造類似体を探索し、得られた多数の構造類似体の中から最も効果の高い化合物を 1 つずつ同定した。これらの 1 つ D8 は、サルファ剤(合成抗菌剤)やスルフォニルウレア系除草剤と共通する構造を有する新奇化合物であった。そこで、D8 の抗菌および除草剤活性について検討した。その結果、D8 は大腸菌に対する抗菌活性は認められず、除草剤効果を有することが判明した。しかし、共通構造を有するスルフォニルウレア系除草剤がアセト乳酸合成酵素阻害剤であるのとは異なり、D8 はアセト乳酸合成酵素の活性を阻害しないことが判明した。このことから、D8 はスルフォニルウレア系除草剤とは異なる新しい除草剤作用を持つ可能性が示唆された。一方、今回同定したもう一つの構造類似体(D6)は、活性型葉酸と共存するとデンブンプ蓄積誘導効果が抑制された。この結果から、D6 が新規の葉酸合成阻害剤として機能していることが明らかになった。現在、これらの成果をまとめた論文の投稿準備中である。現在、D8 に結合するタンパク質の精製、同定をめざして、D8 をリガンドにするアフィニティー担体を合成している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kanai, M., Yamada, T., Hayashi, M., Mano, S. and Nishimura, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Soybean (Glycine max L.) triacylglycerol lipase GmSDP1 regulates the quality and quantity of seed oil.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 8924,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45331-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goto-Yamada, S., Oikawa, K., Bizan J., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Mano, S., Hayashi, M., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Nishimura M. and Yamada, K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Sucrose starvation induces microautophagy in plant root cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida, H., Okashita, Y., Ishida H., Hayashi, M., Izumi, M., Amane Makino, A., Bhuiyan, N.H. and Van Wijk, K.J.	4. 巻 62
2. 論文標題 GFS9 Affects Piecemeal Autophagy of Plastids in Young Seedlings of Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1372-1386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kameyama, T., Nakagawa, U., Kamemura, K., Hayashi, M. and Imamura, A.
2. 発表標題 Functional analysis of glycosyltransferase SEC in Arabidopsis thaliana de-differentiation and shoot regeneration processes.
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishida, H., Ishida, H., Izumi, M., Hayashi, M., Makino, A. and van Wijk, K.
2. 発表標題 GFS9 has a role in piecemeal autophagy of plastids in dark-grown seedlings of Arabidopsis.
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物環境細胞生化学研究室 http://b-lab.nagahama-i-bio.ac.jp/?page_id=72 研究内容の概要 http://b-lab.nagahama-i-bio.ac.jp/?page_id=175

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------