

平成23年5月20日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510190

研究課題名(和文) クロモプラスト分化の鍵タンパク質の探索とその分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) A search of the key proteins related chromoplast differentiation and an elucidation of the mechanism.

研究代表者

本橋 令子 (MOTOHASHI REIKO)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：90332296

研究成果の概要(和文)：

網羅的タンパク質解技術(プロテオミックス)を利用し、葉緑体からクロモプラストへの分化に関与するタンパク質を同定することを目的に実験を行った。

まず、成熟段階の異なるマイクロトム果実(緑、黄、オレンジ、赤)よりプラスチドを単離し、各ステージのプラスチドタンパク質を LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオーム解析により約 440 を同定した。

2番目に、白、黒やオレンジ色の果実を持つ変異体や栽培系統を集めた。2次元電気泳動法により、それら果実のクロモプラストのプロテオームデータを野生型のマイクロトムの4つのステージのプロテオームデータと比較し、クロモプラスト分化や成熟、果実色に関与するタンパク質を同定中である。

研究成果の概要(英文)：

We are analyzing the differentiation mechanism of plastids in tomato using the proteomic techniques as follows.

First, to analyze the comprehensive proteome involved in chloroplast to chromoplast differentiation, we established methods to isolate and identify chromoplast proteins of Micro-Tom fruits at four developmental stages (mature green, yellow, orange and red). We identified approximately 440 plastid proteins using LC-MS/MS.

Second, we are trying to collect natural variations and mutants that have various colors of fruits such as white, black and orange, and then stop their ripening at the intermediate stage. We compare the chromoplast proteome in these fruits with that of Micro-Tom fruits at four developmental stages using two-dimensional gel electrophoresis, and find specific proteins related to chromoplast development, ripening, and the fruits color.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野：植物分子生物学、遺伝学、植物生理学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：プラスチド、クロモプラスト、プロテオーム、トマト

## 1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナでは、近年の解析測定技術の飛躍的な向上により、葉緑体のポストゲノム解析に拍車がかかり、申請者らによって葉緑体ゲノムのトランスクリプトーム解析 (Nagashima et al. 2003) や、変異体のスクリーニングをベースとした葉緑体の機能や形態形成に関係する遺伝子の解析も精力的に進められた (Motohashi et al. 2001, 2003, Shimada et al. 2004)。一方、海外の研究グループによって葉緑体タンパク質の網羅的プロテオーム解析 (Gruissem ら、Wijk らの研究グループ) とそのカタログ化 (PPDB) に関する研究などが精力的に進められている。上記のように、従来のプラスチド研究の多くは、葉緑体タンパク質の機能、特に光合成タンパク質の機能に主眼をおいたものであり、他のプラスチドに関する研究は少なく、各分化状態への分化メカニズムの研究例は極めて少ない。

トマトは 2001 年に Ruf らによりプラスチドへの形質転換が報告され、外来タンパク質を葉緑体に高蓄積させることが可能になった。2006 年にトマトの葉緑体ゲノム配列が Kahlau らによって決定され、日本でもかずさ DNA 研究所を中心に矮性トマト品種マイクロトムを用いて、EST の解読 (Yano et al. 2006)、完全長 cDNA ライブラリーの構築と解読 (Yano et al. 2007)、それらの情報を提供するデータベースの構築 (Yano et al. 2006)、EST 配列に基づいた DNA アレイの作製 (Yano et al. 2006) など、トマトゲノミックスの開発整備が行われ、トマトゲノム配列とともに、ナス科植物研究の重要な基盤となりつつある。

## 2. 研究の目的

本研究は、急速に技術が発達してきているトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析技術とトマトゲノミックスを利用することにより、トマト果実中に存在するクロモプラスチドに特異的なタンパク質を多数同定する。特に、果実の成熟過程における原色素体や葉緑体からクロモプラスチドへの分化に関与するタンパク質の網羅的解析を行ない、クロモプラスチド分化の鍵タンパク質を同定し、分化制御を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

- (1) マイクロトムの果実の各成熟ステージ (緑色果実、黄色、オレンジ、赤色) より、Nycodenz を用いてプラスチドを効率よく単離する。
- (2) プラスチドからタンパク質を抽出する。
- (3) タンパク質を 2 次元電気泳動法により分

離し、タンパク質のスポットを LC-MS/MS を用いて、*de novo* sequencing とペプチド MS フィンガープリント法により同定する。

(4) 量的に変動のあるタンパク質の RNAi 変異体を作成し、プラスチド分化への関与、および機能を調べる。

(5) 各ステージのプラスチドショットガンプロテオームデータの取得する。

(6) 果実色の異なる変異体を集め、そのプラスチドプロテオームデータを得、果実色、プラスチド形態と関係するプラスチドタンパク質を調べる。

## 4. 研究成果

- (1) マイクロトムの果実の各成熟ステージ (緑色果実、黄色、オレンジ、赤色) より、Nycodenz を用いてプラスチドを効率よく単離できるようになった (図 1)。

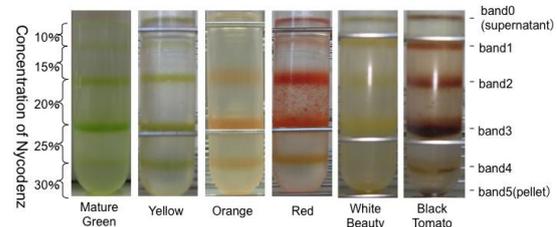


図 1. トマト果実よりプラスチドの単離、バンド 2 と 3 がプラスチド層

- (2) 1) より単離したプラスチドからタンパク質を可溶化し、各成熟ステージごとにプラスチドタンパク質を 2 次元電気泳動により分離した。各 2 次元電気泳動のタンパク質のスポットパターンを比較し、クロモプラスチドへ分化する過程で増減するタンパク質を質量分析機を用いて同定した。
- (3) 2) で得られるプラスチドタンパク質の情報は、タンパク質量が比較的多いものに限定されている。そこで、さらに多くのプラスチドタンパク質情報を得るため SDS-PAGE による泳動後、質量サイズごとに短冊状にゲルを切り、タンパク質を抽出し、網羅的に LC-MS/MS によりタンパク質の同定を行なった。トマトのクロモプラスチドタンパク質のショットガンプロテオームデータと他のプラスチドタイプのプロテオームデータを比較し、クロモプラスチド得意的な 455 タンパク質を同定したが、同じナス科のベルペッパーのクロモプラスチドタンパク質と共通するタンパク質は 33 と少なかった (図 2)。

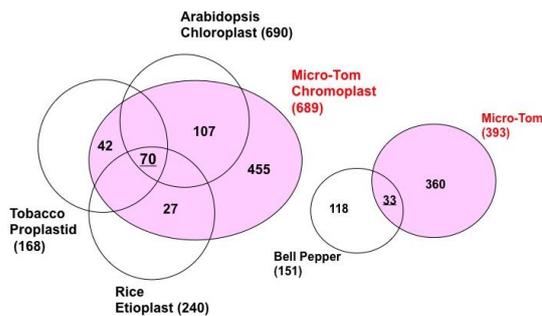


図2. マイクロトムのクロモプラストと他のプラスチドプロテオームデータとの比較

- (4) クロモプラスト分化に重要である候補タンパク質を探索するために、マイクロトム果実の成熟過程におけるマイクロアレイデータが公開されているので、その情報と2次元電気泳動のタンパク質データを比較した。クロモプラストの分化課程で遺伝子発現が増加しているプラスチド移行シグナルを持つタンパク質を4つ選択し、ノックアウト変異体をRNAi法により作製し、表現型、特にプラスチドの形態を観察し、クロモプラストの分化過程で役割の解明を試みた。しかし、目的遺伝子を発現抑制できた形質転換体が得られなかった。カナマイシンによる形質転換体の選抜が上手くできなかった事が原因と考えられる。
- (5) 筑波大学で多数作製されたEMS処理マイクロトム変異体より、オレンジ色の果実をつける変異体を得、果実細胞のプラスチドの形態観察やカロテノイドの成分調査などを行なった。変異体のクロロフィル量とカロテノイド量を測定した結果、クロロフィル量には変化はないが、カロテノイド量は野生型と異なる事がわかった。
- (6) また、オレンジ色の果色変異体、3ラインはすべて同一遺伝子のアレルであることが、アレリズムテストによってわかった。
- (7) 同様に市販の natural variation の白い果実、黒い果実のトマトのプラスチドを単離し、2次元電気泳動法を用い、プラスチドタンパク質の比較を行なっている。
- (8) (6)と同様に natural variation の白い果実品種の数種類のアレリズムテストを行なったが、それらもすべて同一遺伝子アレルである事が示唆された。この事から、果実色の変異体の原因遺伝子は複数存在せず、限られていることがわかった。
- (9) 改変 TILLING 法により、オレンジ色果色EMS変異体の原因遺伝子の同定を試みた。その結果、この変異体は、カロテノイド合成系の遺伝子に変異が入っている事が示唆され、カロテノイド分析結果と一致

すると考えられた。

## 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8件)

①Tanaka R, Rothbart M, Oka S, Takabayashi A, Takahashi K, Shibata M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Grimm B, Tanaka A.

LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010 107(38):1672-16725 (査読有り)

②Choi JH, Abe N, Tanaka H, Fushimi K, Nishina Y, Morita A, Kiriwa Y, Motohashi R, Hashizume D, Koshino H, Kawagishi H. Plant-Growth Regulator, Imidazole-4-Carboxamide, Produced by the Fairy Ring Forming Fungus *Lepista sordida*. J. Agric. Food. Chem. 2010 58:9956-9959 (査読有り)

③Choi JH, Fushimi K, Abe N, Tanaka H, Maeda S, Morita A, Hara M, Motohashi R, Matsunaga J, Eguchi Y, Ishigaki N, Hashizume D, Koshino H, Kawagishi H. Disclosure of the "fairy" of fairy-ring-forming fungus *Lepista sordida*. Chembiochem., 2010 11(10):1373-1377 (査読有り)

④Myouga F, Akiyama K, Motohashi R, Kuromori T, Ito T, Iizumi H, Ryusui R, Sakurai T, Shinozaki K. The Chloroplast Function Database: a large-scale collection of Arabidopsis Ds/Spm- or T-DNA-tagged homozygous lines for nuclear-encoded chloroplast proteins and their systematic phenotype analysis Plant J., 2010 61(3):529-542 (査読有り)

⑤Okuda K, Hammani K, Tanz SK, Peng L, Fukao Y, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Small I, Shikanai T. The pentatricopeptide repeat protein OTP82 is required for RNA editing of plastid *ndhB* and *ndhG* transcripts. Plant J. 2010 61(2):339-349 (査読有り)

⑥Okuda K, Chateigner-Boutin AL, Nakamura T, Delannoy E, Sugita M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Small I, Shikanai T. Pentatricopeptide Repeat Proteins with the

DYW Motif Have Distinct Molecular Functions in RNA Editing and RNA Cleavage in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell*. 2009 21:146-156 (査読有り)

⑦Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Iizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K.  
A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2008 20: 3148-3162 (査読有り)

⑧Shimizu H, Peng L, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T.  
CRR23/NdhL is a subunit of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 2008 49(5):835-842 (査読有り)

[学会発表] (計 36 件)

①金子謙佑、岡部佳弘、浅水恵理香、江面浩、永田典子、加藤雅也、本橋令子  
トマトオレンジ果色変異体 *vivid orange* (vo) 変異体の解析  
第 52 回日本植物生理学会 東北大学 2011 年 3 月 20 -22 日

②Miho Suzuki, Sachiko Takahashi, Hideo Dohra, Yoshikazu Kiriiwa, Noriko Nagata, Reiko Motohashi  
The chromoplast proteome of various color fruits in tomato  
2nd International Symposium Frontier in Agriculture Proteome Research  
Contribution of proteomics technology in agricultural sciences つくば 2010 年 11 月 18-19 日

③Miho Suzuki, Sachiko Takahashi, Kensuke Kaneko, Hideo Dohra, Yoshikazu Kiriiwa, Masayuki Fujiwara, Youichirou Fukao, Noriko Nagata, Erika Asamizu, Reiko Motohashi  
Plastid study of tomato fruits using the proteomic techniques  
The 7th Solanaceae Conference イギリス (スコットランド) ダンディー 2010 年 9 月 5-9 日

④Reiko Motohashi, Miho Suzuki, Sachiko Takahashi, Kensuke Kaneko, Kazue Fukatsu, Hideo Dohra, Yoshikazu Kiriiwa, Masayuki Fujiwara, Youichirou Fukao, Noriko Nagata  
Plastid study of tomato fruits using the techniques of Arabidopsis research

21th International Conference on Arabidopsis Research 日本 横浜 2010 年 6 月 6-10 日

⑤本橋令子、鈴木美穂、高橋祥子、道羅英夫、切岩祥和、藤原正幸、深尾陽一郎、永田典子  
マイクロトムを用いたクロモプラスト分化機構解明のためのプラスチドプロテオーム解析  
第 51 回日本植物生理学会 熊本大学 2010 年 3 月 18-21 日

⑥鈴木美穂、高橋祥子、道羅英夫、切岩祥和、藤原正幸、深尾陽一郎、本橋令子  
LC-MS/MS を用いたトマト果実プラスチドのショットガンプロテオミクス  
第 51 回日本植物生理学会 熊本大学 2010 年 3 月 18-21 日

⑦鈴木美穂、高橋祥子、道羅英夫、切岩祥和、藤原正幸、深尾陽一郎、本橋令子  
LC-MS/MS を用いたトマト果実プラスチドのショットガンプロテオミクス  
平成 21 年度科学交流フォーラム 第 11 回静岡ライフサイエンスシンポジウム 静岡大学 2010 年 3 月 5 日

⑧Sachiko Takahashi, Masayuki Fujiwara, Yoichiro Fukao, Hideo Dohra, Yoshikazu Kiriiwa, Reiko Motohashi  
Proteomic analysis for understanding plastid development and differentiation in Micro-Tom  
JSOL 第 5 回トマト国際シンポジウム 三重県津 2009 年 3 月 11-12 日

⑨Reiko Motohashi  
Identification of proteins destined for the developing chloroplasts and chromoplasts  
国際シンポジウム「The Ins and Outs of Chloroplasts - 葉緑体のすべてに迫る」  
大阪大学銀杏会館 2008 年 10 月 14-15 日

⑩Reiko Motohashi, Tomoko Kato, Kazuo Shinozaki  
Analysis of chloroplast ribosome associated proteins  
19<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research, Montreal, Canada 2008 年 7 月 23-27 日

[図書] (計 1 件)

本橋令子、高橋征司  
ベシクマスター植物生理学, 株式会社オーム社 2008 年 p. 136-158

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 令子 (MOTOHASHI REIKO)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：90332296

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：