

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21570050

研究課題名（和文） TPR モチーフを含む新規な遺伝子ファミリー-OsCEO の機能解明

研究課題名（英文） Function of a novel gene OsCEO containing a TPR motif

研究代表者

島田 浩章 (SHIMADA HIROAKI)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：70281748

研究成果の概要（和文）：

イネの胚乳変異体である *flo2* 変異体は、種子貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質生合成に関わる複数の遺伝子の発現量が顕著に低下し、乳白で小粒の胚乳を生じる。このことからこの変異の原因遺伝子は貯蔵物質生合成に関わる制御因子をコードしていることが示唆されている。マップベースクローニングにより、この変異の原因遺伝子を単離した。その結果、この変異体では TPR モチーフを有する新規なタンパク質をコードしている遺伝子に点変異が生じていることがわかった。この野生型の遺伝子を *flo2* 変異体に導入したところ、得られた形質転換体の種子は野生型の表現型を示した。これらの形質転換体は、*flo2* 変異体で発現量が減少していた貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の生合成に関わる遺伝子の発現量が回復していた。また、貯蔵デンプンの構造も野生型と同等になった。このことから、この遺伝子(*FLO2*)が *flo2* 変異の原因遺伝子であることがわかった。*FLO2* 遺伝子は緑葉および未熟種子で強く発現をしていた。また、この遺伝子の発現量は登熟の進行とともに増加した。*FLO2* と相互作用する因子を探索したところ、bHLH タンパク質と LEA タンパク質が検出された。*FLO2* はこれらの因子と協調的に種子貯蔵物質生合成系遺伝子群の発現を制御しており、種子の大きさや品質に関わる重要な因子であることが示唆された。*FLO2* 遺伝子の過剰発現形質転換体では貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の生合成に関わる遺伝子の発現量が野生型よりも高くなっていた。また、生じた種子サイズや種子重量は野生型よりも有意に大きかった。このことから *FLO2* は種子貯蔵物質生合成系遺伝子群の発現を制御している上位の制御因子であり、この過剰発現により貯蔵物質の生合成に関わる遺伝子群の発現量が増加し、その結果として種子の大型化が起こったものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

An endosperm mutant *flo2* is represented by reduced production of seed storage starch and storage proteins, and results in small chalky gains. This suggests that the gene responsible to this mutation encodes a regulatory gene, which may globally control the biosynthesis of storage substances. We isolated the gene responsible to the *flo2* mutation by a map-based cloning method. This gene, named *FLO2*, contained a TPR motif, in which a point mutation occurred in the mutant gene. The wild-type *FLO2* gene completely restored the phenotype of the *flo2* mutation, indicating that this gene was the gene responsible to the *flo2* mutation. The expression of *FLO2* gene was detected in leaves and immature seeds. We found that the *FLO2* protein interacted with a bHLH transcription factor and a LEA protein, suggesting that this protein may be involved in regulation of the gene expression for production of the storage substances. Overexpression of the *FLO2* gene indicated overexpression of the genes for storage proteins and storage starch, resulting in enlargement of the grain size.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学／植物分子生物・生理学

キーワード：植物分子機能

1. 研究開始当初の背景

イネには OsCEO1、OsCEO2、OsCEO3 の 3 つの CEO 遺伝子群が存在する。これらは 1700 アミノ酸残基ほどの大きな分子量を有するタンパク質で、分子内に 3 つの TPR (tetratricopeptide repeat) ドメインを有する他は、これまでに知られている機能ドメインが存在しない。このタンパク質の遺伝子はイネの胚乳変異体である *flo2* 変異体の原因遺伝子として単離された（申請者により論文を投稿中）。*flo2* 変異体は九州大学において取得されたイネの胚乳変異体であり、この変異体では、貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の構造的変化が生じることが知られている。これにより胚乳形質が野生型と大きく異なり、粉質の胚乳となる。マイクロアレイ解析の結果、*flo2* 変異体では、種子貯蔵デンプン生合成に関わる主な遺伝子、貯蔵タンパク質など胚乳で機能する多数の遺伝子の発現量が顕著に減少していることがわかった。さらに、この変異体では、数多くの転写因子の発現量も低下していることが明らかとなった（表 1）。このことから、*flo2* 変異の原因遺伝子は、胚乳の機能形成を統御する上位の制御因子であることが強く示唆される。そこで、この遺伝子を OsCEO1 と命名した（論文を投稿した際に、遺伝子名を *FLO2* と改名するよう編集委員より指摘があり、これに従って変更した）。

2. 研究の目的

*FLO2* はこれまで全く報告がない構造を有する新規な遺伝子である。また、*FLO2* はこれまで全く知られていない「新たな構造を有する発現制御因子ファミリー」を形成しているものと思われる。*FLO2* には TPR ドメインが存在する。TPR ドメインはタンパク質相互作用に関与すると言われているが、その機能は不明である。これまでの研究結果では、酵母 two hybrid 法により、*FLO2* の TPR ドメインと相互作用する多数の蛋白質が見つかって

いる。これらのことから、*FLO2* は、TPR ドメインを介して様々な遺伝子の発現制御に関わっているものと示唆される。しかしながらこれが、どのような仕組みで下流の遺伝子群の発現制御をしているかは全く不明である。そこで、*FLO2* について、これらのタンパク質がどのような仕組みで遺伝子発現制御を行っているかを解明する。

3. 研究の方法

転写制御因子であると考えられる、新規な遺伝子ファミリー、*FLO2* による植物の機能制御機構を明らかにするために、以下の 3 つのアプローチでの研究を実施する。

① 3 つの遺伝子の発現様式（発現部位、発現時期など）② 変異体あるいは形質転換体に現れる表現型③ タンパク質の相互作用（酵母 two hybrid システムなど）。これらの実験により、これらのタンパク質が緑葉などの組織で、どのような仕組みで下流の遺伝子の発現制御を行っているかを解明する。また、3 つの *FLO2* ホモログの間での相互作用（相補性）などを検定し、*FLO2* が植物機能を維持するためにどのような貢献をしているかを明らかにする。これにより *FLO2* を頂点とする新規な植物の機能制御システムが明らかになると考えている。

4. 研究成果

*flo2* 変異体では、貯蔵デンプン生合成や貯蔵タンパク質遺伝子などの種子貯蔵物質生合成にかかわる多くの遺伝子の発現量が大きく低下していることが分かった。しかし、デンプンの生合成系酵素では、RBEI、RBEIIb、Starch synthase (SSI, SSIIa, SSIIc, SSIIIa, SSIVb) の発現量は大きく低下していたが、同化デンプン生合成にも関与する BEIIa、SSIIb、SSIIb、SSIVa などの遺伝子の発現

にはほとんど影響がなかった。すなわち、*flo2* 変異の原因遺伝子による発現量の低下が現れているのは、種子貯蔵物質の生合成に関与する遺伝子だけに限られていることがわかっていて、一方、*flo2* 変異体に関するマイクロアレイ実験で、この変異により発現量が低下する遺伝子は全体の1割以上に及ぶことが分かっていることから、*flo2* 変異の影響は広範囲に及ぶことが示唆されている。この制御様式は他の因子と相互作用により複雑に組み合ったものであると予想された。

この *flo2* 変異の原因遺伝子は第4染色体にある Os04g0645100 遺伝子であることが分かった。*flo2* 変異体のひとつである EM37 では、この遺伝子の ORF の中央付近に G→A の点変異が起こり、終止コドンが生じていた。これにより、この変異体では、*FLO2* の機能が失われていると予測された。

この野生型の遺伝子を *flo2* 変異体に導入したところ、得られた形質転換体の種子は野生型の表現型を示した。これらの形質転換体は、*flo2* 変異体で発現量が減少していた貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の生合成に関わる遺伝子の発現量が回復していた。また、貯蔵デンプンの構造も野生型と同等になった。このことから、この遺伝子 (*FLO2*) が *flo2* 変異の原因遺伝子であることがわかった。

*FLO2* は TPR モチーフを持つ 1720 アミノ酸残基からなる分子量 189 kDa の巨大なタンパク質で、既知の転写因子や翻訳制御因子と相同性がない。TPR モチーフはタンパク質-タンパク質間相互作用に関与すると考えられている。このことから *FLO2* は何らかのタンパク質因子と相互作用していると考えられている。そこで、*FLO2* と相互作用するタンパク質を解析することにより、*FLO2* 遺伝子による種子貯蔵物質生合成の制御の分子機構を解明できると考えた。

Yeast Two-Hybrid 法により *FLO2* と相互作用すると考えられる複数の候補因子が見つかった。これらのうち、LEA タンパク質と bHLH 型転写因子様タンパク質が複数回検出されたことから、これらのタンパク質は *FLO2* と密接に相互作用する有力な候補であると考えられた。そこで、この bHLH および LEA と *FLO2* との相互作用をさらに詳しく調べるために *in vitro* pull down assay を行ったところ、この LEA および bHLH と *FLO2* との相互作用が示された。また、この遺伝子である *bHLH* および *LEA* 遺伝子についてリアルタイム PCR による発

現時期の解析を行ったところ、これらの遺伝子は *FLO2* と同様に種子の登熟後期に発現量が増加していることがわかった。これらのことから、LEA と bHLH は *FLO2* と相互作用して様々な遺伝子の転写制御を行っていることが推測された。

ところで、野生型 *FLO2* を導入した形質転換体の中には *FLO2* 遺伝子が過剰発現している個体が存在した。これらの過剰発現形質転換体では貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の生合成に関わる遺伝子の発現量が野生型よりも高くなっていた。また、生じた種子サイズや種子重量は野生型よりも有意に大きかった (図1)。このことから *FLO2* は種子貯蔵物質生合成系遺伝子群の発現を制御している上位の制御因子であり、この過剰発現により貯蔵物質の生合成に関わる遺伝子群の発現量が増加し、その結果として種子の大型化が起こったものと考えられた。

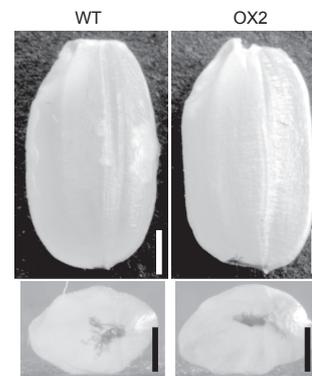


図1. *FLO2* 遺伝子を導入した組換え体イネの種子の形態

## 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)

①H. Teramura, Y. Enomoto, H. Aoki, T. Sasaki, H. Shimada. A long 5' UTR of the rice *OsMac1* mRNA enabling the sufficient translation of the downstream ORF. *Plant Biotechnology* 29, 43-49 (2012).

②K.-C. She, H. Kusano, K. Koizumi, H. Yamakawa, M. Hakata, T. Imamura, M. Fukuda, N. Naito, Y. Tsurumaki, M. Yaeshima, T. Tsuge, K. Matsumoto, M. Kudoh, E. Itoh, S. Kikuchi, N. Kishimoto, J. Yazaki, T. Ando, M. Yano, T. Aoyama, T. Sasaki, H. Satoh, H. Shimada. A novel factor *FLOURY ENDOSPERM 2* is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *Plant Cell*. 22, 3280-3294 (2010)

③T. Sasaki, H. Akutsu, H. Shimada, S. Miura. A rice cytochrome p450 *OsCYP84A* that may

interact with UV tolerance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1045-1049 (2010)

④K.-C. She, H. Kusano, M. Yaeshima, T. Sasaki, H. Satoh, H. Shimada: Reduced rice grain production with ATP shortage during seed development. *Plant Biotechnol.* 27, 67-73 (2010)

⑤ T. Imamura, M. Yasuda, H. Kusano, H. Nakashita, Y. Ohno, T. Kamakura, S. Taguchi, H. Shimada: Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin. *Transgenic Res.* 19, 415-424 (2010)

⑥M. Higuchi, T. Yoshizumi, T. Kuriyama, H. Hara, C. Akagi, H. Shimada, M. Matusi: Simple construction of plant RNAi vectors using long oligonucleotides. *J. Plant Res.* 122, 477-482 (2009)

〔学会発表〕(計 37 件)

①H. Shimada, H. Takeda, A. Tsunoda, T. Sasaki. Regulatory mechanism on sucrose metabolism in rice endosperm by a specific protein kinase, SPK. XVI International Plant Nutrition Colloquium (IPNC). Sacramento, CA, U. S. A. August 26-30, 2009

②草野博彰、シャクタカシ、羽方誠、内藤夏佳、鶴巻由美、八重島充弘、佐々木忠将、青山卓史、佐藤光、山川博幹、島田浩章。形質転換体を用いたイネ CE01 遺伝子の機能解析。第 3 2 回日本分子生物学会年会。2009 年 12 月、横浜

③内藤夏佳、草野博彰、シャクタカシ、田中基、佐々木忠将、島田浩章。イネ CE01 による発現制御の解析。第 3 2 回日本分子生物学会年会。2009 年 12 月、横浜

④鶴巻由美、草野博彰、シャクタカシ、内藤夏佳、佐々木忠将、島田浩章。イネ CE01 遺伝子と相互作用する因子の解析。第 3 2 回日本分子生物学会年会。2009 年 12 月、横浜

⑤竹田遥、角田明奈、佐々木忠将、三浦成敏、島田浩章。イネのショ糖代謝における sucrose synthase のリン酸化による活性制御機構の解析。第 3 2 回日本分子生物学会年会。2009 年 12 月、横浜

⑥島田浩章、草野博彰、シャクタカシ、佐々木忠将、佐藤光。イネの高温登熟障害は未熟種子の ATP 含量と強く相関する。日本育種学会第 1 1 7 回講演会。2010 年 3 月、京都

13. K.-C. She, H. Kusano, H. Yamakawa, M. Hakata, Y. Tsurumaki, M. Yaeshima, T. Ando, M. Yano, T. Aoyama, T. Sasaki, H. Satoh, H. Shimada. A novel factor *FLOURY ENDOSPERM 2* is involved in regulation of rice grain quality. International Symposium on Biodiversity Science 2010. July 31-August 3, 2010, Nagoya

⑦T. Sasaki, K.-C. She, H. Kusano, M. Yaeshima,

H. Satoh, H. Shimada. ATP shortage during seed development affect to reduction of rice grain production under high-temperature stress. International Symposium on Biodiversity Science 2010. July 31-August 3, 2010, Nagoya

⑧大沼万里子、シャクタカシ、八重島充弘、佐々木忠将、島田浩章。FLO2 遺伝子のプロモーター解析。BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会大会合同大会)。2010 年 12 月。神戸

⑨八重島充弘、シャクタカシ、草野博彰、鶴巻由美、内藤夏佳、河本健正、廣政智子、平井望央、佐々木忠将、島田浩章。F1-ATPase はイネ胚乳の品質管理に関わる。BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会大会合同大会)。2010 年 12 月。神戸

10. 鶴巻由美、草野博彰、シャクタカシ、内藤夏佳、佐々木忠将、島田浩章。イネ FLO2 と相互作用する因子の解析。BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会大会合同大会)。2010 年 12 月。神戸

11. 佐々木忠将、シャク高志、草野博彰、佐藤光、島田浩章。登熟期の高温ストレスがイネ未熟種子の ATP 含量と種子生産性に及ぼす影響。第 5 2 回日本植物生理学会年会。2011 年 3 月 (仙台)

12. シャク高志、草野博彰、鶴巻由美、八重島充弘、内藤夏佳、山川博幹、羽方誠、青山卓史、佐々木忠将、佐藤光、島田浩章。イネ FLO2 は種子貯蔵物質の生合成を統御する上位制御因子である。第 5 2 回日本植物生理学会年会。2011 年 3 月 (仙台)

13. 島田浩章、シャク高志、草野博彰、鶴巻由美、八重島充弘、河本健正、佐々木忠将。イネ FLO2 過剰発現による種子貯蔵物質の生合成量の増強。日本農芸化学会 2011 年大会。2011 年 3 月 (京都)

14. 佐々木忠将、シャクタカシ、八重島充弘、草野博彰、大沼万里子、河本健正、佐藤光、島田浩章。イネの種子収量および品質に関与する FLO2 遺伝子の品種間差異の解析。日本育種学会第 1 1 9 回講演会 (2011 年春季)。(横浜)

15. K.-C. She, H. Kusano, Y. Tsurumaki, M. Yaeshima, H. Yamakawa, M. Hakata, T. Aoyama, T. Sasaki, H. Shimada. A novel factor rice *FLOURY ENDOSPERM 2* is involved in regulation of gene expression for storage substances. XVIII International Botanical Congress (IBC2011), Melbourne, Australia, July 23-30, 2011

16. シャクタカシ、草野博彰、鶴巻由美、八重島充弘、河本健正、佐々木忠将、島田浩章。イネの FLO2 過剰発現による種子貯蔵物質の

生合成量の増強。第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム。2011 年 9 月  
(九州大学)

17. 八重島充弘、シヤク高志、草野博彰、河本健正、大沼万里子、廣政智子、平井望央、松永拓也、田代涼夏、佐々木忠将、島田浩章。  
F1 ATPase はイネ胚乳の品質管理に関わる。第 34 回日本分子生物学会大会。2011 年 12 月。横浜

18. 廣政智子、八重島充弘、河本健正、シヤク高志、草野博彰、佐々木忠将、島田浩章。  
イネ FLO2 のタンパク質解析。第 34 回日本分子生物学会大会。2011 年 12 月。横浜

33. 大沼万里子、廣政智子、シヤク高志、八重島充弘、佐々木忠将、島田浩章。FLO2 遺伝子の発現機構の解析。第 34 回日本分子生物学会大会。2011 年 12 月。横浜

19. 八重島充弘、シヤク高志、草野博彰、河本健正、大沼万里子、廣政智子、平井望央、松永拓也、田代涼夏、佐々木忠将、島田浩章。  
高温登熟障害におけるイネ胚乳の品質低下は登熟中の ATP 量に依存する。日本農芸化学会 2012 年度大会。2012 年 3 月。京都

20. シヤクタカシ、八重島充弘、草野博彰、河本健正、大沼万里子、廣政智子、平井望央、松永拓也、田代涼夏、佐々木忠将、島田浩章。  
登熟中のイネ未熟種子の ATP 量の減少と高温登熟障害との相関の解析および品種間差異の検定。日本育種学会第 121 回講演会。2012 年 3 月。宇都宮

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島田浩章 (SHIMADA HIROAKI)  
東京理科大学・基礎工学部生物工学科・教授  
研究者番号：7028174

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

佐々木忠将 (SASAKI TADAMASA)  
東京理科大学・基礎工学部生物工学科／助教  
研究者番号：50432802