

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770046

研究課題名(和文) 新奇の色素体分裂機構の解明

研究課題名(英文) Molecular characterization of novel mechanisms underlying plastid division

研究代表者

松島 良 (Matsushima, Ryo)

岡山大学・その他部局等・助教

研究者番号：80403476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：胚乳における澱粉粒の大きさは、澱粉の精製効率や利用用途を規定する重要形質である。澱粉粒の大きさは植物種によって異なるが、その決定機構に関与する分子群は分かっていない。本研究では、澱粉粒が巨大化するイネ*ssg4* (substandard starch grain 4)突然変異体の解析を進めており、マップベースクローニング法ならびに様々な解析を行ない、澱粉粒の大きさを制御する新規因子であるSSG4遺伝子の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：The size of starch grains differs depending on the plant species and is one of the most important factors for industrial applications of starch. However, the molecular machinery that regulates the size of SGs is unknown. We are studying a novel rice mutant called *ssg4* (substandard starch grain 4) that develops enlarged SGs in the endosperm. We identified the SSG4 gene by map-based cloning and performed various characterization of SSG4 gene.

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：アミロプラスト 澱粉粒 色素体 イネ 胚乳 突然変異体

1. 研究開始当初の背景

(1) 基礎科学的な側面からの背景

色素体は、約 20 億年前のシアノバクテリアの共生に由来する植物オルガネラであり、組織や器官に応じて様々なタイプに分化して独自の役割を担う。宿主である植物細胞が色素体の大きさと数を制御することは、共生関係を成立させるために必須であり、光合成を担う色素体である葉緑体を中心に分裂制御機構に関して多くの研究が進められている。アミロプラストは色素体の分化型の 1 つで、貯蔵器官において澱粉を集積する役割を担う。アミロプラストの分裂制御機構は、他の色素体 (葉緑体) のものとは異なると予想されているが、その詳細は不明である。また、アミロプラスト内部に集積する澱粉は結晶状の粒子を形成し、「澱粉粒」と呼ばれている。アミロプラスト内部のほとんどは、澱粉粒が占有しているため、「アミロプラストの大きさ = 澱粉粒の大きさ」と言える。したがって、アミロプラストの分裂制御機構は、澱粉粒の大きさを直接的に制御していると考えられる。

(2) 応用可能性から背景

澱粉粒の大きさは植物種によって著しい多様性を示し、澱粉の精製効率や利用用途を規定する重要形質である。しかし、アミロプラストの分裂制御機構が不明であると同様に、澱粉粒の大きさを制御する分子機構も未解明のままである。澱粉は主食としてだけでなく、加工澱粉 (化学修飾をした澱粉) という形で食品添加剤 (増粘剤、安定剤、ゲル化剤) として広く利用されている。澱粉粒の大きさは溶液中における澱粉の沈殿性と相関を示し、加工澱粉を大量生産する場合の修飾効率に影響する。したがって、アミロプラストの分裂制御機構を解明し、澱粉粒の大きさを自在に制御する事ができれば、物性が従来のもの異なる新奇澱粉の創出につながり、加工澱粉の製造効率や機能性を改善する。それは、食味、食感、製造特性等がこれまでと全く異

なった新しい多様性を示し、商品の開発につながる事が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が独自の方法より単離していたアミロプラストと澱粉粒が巨大化するイネの新奇突然変異体、"ssg4 変異体" を研究対象とした。ssg4 変異体の解析を通して、「アミロプラストの分裂制御機構」ならびに「澱粉粒の大きさの制御機構」に関わる新奇分子群の同定と解析を行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 澱粉粒簡便観察法

研究代表者は、これまでに胚乳に含まれる澱粉粒の形状を簡便に観察できる方法を開発している。本研究でも多用した。まず、ピペットマン用の使い捨てプラスチックチップの先端をハサミで切断し、切断部位にイネの種子をはめ込み固定する。次に、種子を保持したチップを電子顕微鏡用のブロックトリミング台に固定した。ブロックトリミング台を実体顕微鏡の下に置くことにより、拡大観察しながら種子のトリミングならびに切片作成を行なった。得られた切片をヨウ素溶液で染色し、顕微鏡を用いて澱粉粒の観察を行なった。詳しくは、下記の論文を参照。Matsushima, R. et al. *Plant Cell Physiology* 51: 728-741, 2010

(2) テクノビット樹脂切片法

上記の簡便観察法と併用して、テクノビット 7100 樹脂 (Heraeus-Kulzer 社) を用いた切片作成も行ない、良い明瞭な澱粉粒の顕微鏡像を得た。まず、種子を FAA 固定液 (5% ホルマリン、5% 酢酸、45% エタノール) で一晩固定し、エタノール系列 (30%、50%、70%、90%、95%、99%、100%) で脱水した。脱水試料をテクノビット 7100 樹脂に包埋し、包埋試料からダイヤモンドナイフとウルトラマイクロームを使って切片 (約 1 μ m) を作成した。得られた切片をヨウ素溶液で染色し、顕微鏡を用

いて澱粉粒の観察を行なった。

(3) マップベースクロニング法

マップベースクロニング法により、*ssg4*遺伝子座の同定した。まず、日本晴背景である*ssg4*変異体とインディカ系統であるKasalath系統を交配し、F1ならびにF2集団を得た。F2集団の種子に対して、澱粉粒簡便観察法を用いて、*ssg4*変異を示す種子を選抜した。これらの種子を発芽させ、ゲノムDNAを単離し、ジェノタイピングを行なうことにより、*ssg4*遺伝子座を限定した。ジェノタイピングに用いたプライマーは、下記の論文を参考にした。

Temnykh S. et al. *Theor Appl Genet* 100:

697-712, 2000

McCouch S.R. et al. *DNA Res* 9: 199-207, 2002

4. 研究成果

(1) *ssg4* 変異体の表現型

テクノビット樹脂切片法で得た切片を観察し、澱粉粒の大きさを定量したところ、*ssg4*変異体の胚乳の澱粉粒は、日本晴と比較して直径約 6 倍に達することが分かった (図 1, Matsushima et al. 2014 より改変)。また、澱粉粒の数が野生型よりも *ssg4* 変異体では減少していた。このことから、*ssg4* 変異は、澱粉粒の大きさを増加させる一方で、数は減少させる変異であることが分かった。このような表現型を示す変異は、どの植物種においても報告されていないことから、新奇性の高い変異であると言える。

(2) *ssg4* 変異体の原因遺伝子の同定

*ssg4*変異体の原因遺伝子 (*SSG4*遺伝子)を同定するために、マップベースクロニング法を行なった。その結果、*ssg4*変異を第一染色体短腕62kbの領域に限定することができ、この領域には、10個のORFが予測されていた(図2A, Matsushima et al. 2014より改変)。*ssg4*変異体において、これらすべての塩基配列を決定したところ、*Os01g0179400*遺伝子に塩基置換を発見することができた(図2B, Matsushima et

al. 2014より改変)。

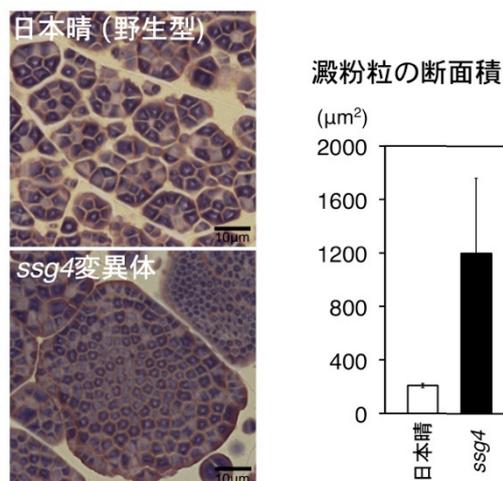


図1

図2B中の赤矢印が*ssg4*変異部位を示す。次に、野生型の*Os01g0179400*遺伝子配列を*ssg4*変異体へ形質転換法により導入したところ、大きさならびに数が野生型と同様の澱粉粒が観察された。この事は、*Os01g0179400*遺伝子が、*ssg4*変異を相補した事を意味し、*Os01g0179400*遺伝子が*SSG4*遺伝子の実体であることを意味する。*SSG4*タンパク質は、2,135アミノ酸から成り、Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)によると、イネにおいて11番目の大きさであった。その巨大な大きさに関わらず、配列内には、DUF (Domain of Unknown Function) 490という機能未解明の領域が存在する以外、機能が推定できる配列領域は存在しなかった。また、DUF490を持つ遺伝子は、シアノバクテリア、緑藻類、ならびに他の高等植物に広く存在するが、動物には存在しないことも分かった。*ssg4*変異で見出された塩基置換は、DUF490領域内において、生物種間で保存されているグリシン残基をセリン残基に置換する変異であった (図2C, Matsushima et al. 2014より改変)。*ssg4*変異体は、澱粉粒に関しては表現型を示すが、倉敷の圃場で生育させる限りでは、個体の生育には大きな影響は観察されなかった。一方、実験植物であるシロイヌナズナでは、DUF490-containing proteinをコードする遺伝子に欠損すると致死になることが報

告されている。*ssg4*変異体は、DUF490を持つ遺伝子の変異体としては、唯一の生存可能であり、今後、DUF490の生化学的な機能を解析する上で重要な研究材料であると言える。また、本研究により、*SSG4*遺伝子に変異が起こると、胚乳の澱粉粒が巨大化することが分かった。つまり、*SSG4*遺伝子は、澱粉粒の大きさを制御する遺伝子であると言える。澱粉粒の大きさを制御する遺伝子の同定は過去に例がなく、*SSG4*遺伝子が最初の例である。

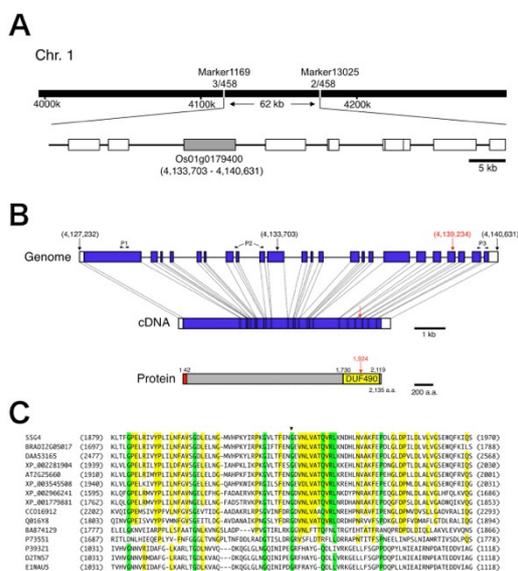


図2

(3) 今後の展望

ssg4 変異体は、澱粉粒が巨大化するイネの新奇突然変異体である。澱粉粒の大きさが巨大化する変異体は、他の作物種においては現在まで報告されていない。*SSG4* 遺伝子と配列相同性がある遺伝子は、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、ソルガムなど他の作物種においても存在する。これらの相同性遺伝子では、*ssg4* 変異が起きていたアミノ酸は完全に保存されており、イネの野生型と同じであった。この事は、他の作物種においても *ssg4* 変異と同様の変異を導入することができれば、澱粉粒を巨大化する事ができることを意味する。したがって、*SSG4* 遺伝子の今後の応用可能性は高いと思われる。研究代表者は、*ssg4* 変異体以外に、様々な形状の澱粉粒を発達させ

る *ssg* 変異体群を単離している。現在、これらの変異体群を交配して多重変異体の作出に取り組んでいる。これらの変異体の澱粉特性を調べる事で、新しい物性の澱粉粒の創出につながる事が期待できる。本研究で作出されるイネの系統が、基礎研究の枠を超えて、今後応用に結びつくことができれば、この上ない喜びである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① [Matsushima, R., Maekawa M., Kusano, M., Kondo, H., Fujita, N., Kawagoe, Y., Sakamoto, W., Amyloplast-Localized SUBSTANDARD STARCH GRAIN4 Protein Influences the Size of Starch Grains in Rice Endosperm., Plant Physiology](#), 査読有, 164巻, 2014, 623-636, DOI 10.1104/pp.113.229591
- ② [Matsushima, R., Yamashita, J., Kariyama, S., Enomoto, T., Sakamoto, W., A phylogenetic re-evaluation of morphological variations of starch grains among Poaceae species., Journal of Applied Glycoscience](#), 査読有, 60巻, 2013, 37-44, DOI 10.5458/jag.jag.JAG-2012_006
- ③ [Nakano, R.T., Matsushima, R., Nagano, A. J., Fukao Y., Fujiwara, M., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., ERMO3/MVP1/GOLD36 is involved in a cell type-specific mechanism for maintaining ER morphology in Arabidopsis thaliana., PLoS ONE](#), 査読有, e49103巻, 2012, e49103, DOI 10.1371/journal.pone.0049103
- ④ [松島良, 澱粉粒の簡便観察法の開発とその利用, 応用糖質科学](#), 査読無, 2巻, 2012 147-149, ISSN : 2185-6427
- ⑤ [Tang L. Y., Matsushima R., Sakamoto W., Mutations defective in ribonucleotide reductase activity interfere with pollen plastid DNA degradation mediated by DPD1 exonuclease. The Plant Journal](#), 査読有, 70巻, 2012, 637-649, DOI 10.1111/j.1365-313X.2012.04904.x
- ⑥ [Ozawa, R., Matsushima, R., Maffei, M. E., Takabayashi, J., Interaction between Phaseolus](#)

plants and two strains of Kanzawa spider mites.,
Journal of Plant Interactions, 査読有, 6巻, 2011,
125-128, DOI 10.1080/17429145.2010.544922

⑦ Matsushima R., Tang L. Y., Zhang L.,
Yamada H., Twell D., Sakamoto W., A conserved,
Mg²⁺-dependent exonuclease degrades organelle
DNA during Arabidopsis pollen development.,
Plant Cell, 査読有, 23巻, 2011, 1608-1624, DOI
10.1105/tpc.111.084012

[学会発表] (計 10 件)

① 松島良, 前川雅彦, 草野都, 近藤秀樹,
藤田直子, 坂本亘、澱粉粒の大きさを制御す
る *SSG4* 遺伝子の同定と解析, 日本育種学会
第 125 回講演会, 2014 年、3 月 21 日-22 日, 東
北大学

② Matsushima, R., Maekawa, M., Fujita, N.,
Kawagoe, Y., Sakamoto, W., Molecular
dissection of starch grain size control in rice
endosperm (招待講演), 7th International Rice
Genetics Symposium, November 5-8, 2013,
Manila, Philippines

③ Naoko Crofts, Natsuko Abe, Ryo Matsushima,
Ian J. Tetlow, Michael J. Emes, Yasunori
Nakamura, Naoko Fujita, Rice starch biosynthetic
enzyme complexes have the ability to generate
glucans. 第55回日本植物生理学会年会, 2014
年、3月18日-20日, 富山大学

④ 松島良, 山下純、前川雅彦, 坂本亘, イネ
科植物の澱粉粒の形状多様性についての研究,
日本育種学会第123回講演会, 2013年03月27日
~2013 年03月28日, 東京農業大学

④ 松島良, 前川雅彦, 藤田直子, 坂本亘, イ
ネの胚乳のアミロプラストが巨大化する *ssg4*
変異体の解析, 日本育種学会第122回講演会,
2012年09月14日~2012 年09月15日, 京都産業
大学

⑥ 藤田直子, 豊澤佳子, 松島良, 川越靖, 中
村保典, 澱粉粒の形態に影響を与える要因,
日本育種学会第122回講演会, 2012年09月14日
~2012 年09月15, 京都産業大学

⑦ 松島良, 澱粉粒の形状決定に関する細胞
生物学的研究, 第52回澱粉研究懇談会
(SRT)(招待講演), 2012年06月07日~2012 年06
月09日, 神戸市

⑧ 藤田直子, 豊澤佳子, 松島良, 川越靖, 中
村保典, 澱粉粒の形態が激変する二重変異体
イネの解析, 日本応用糖質科学会, 2012年09
月19日~2012 年09月20日, 東京農工大学府中
キャンパス

⑨ 松島良・前川雅彦・藤田直子・山下純・坂
本亘, 胚乳の澱粉粒の形状決定に関する分子
細胞生物学的研究, 日本育種学会第120回講
演会, 2011年9月24日, 福井県立大学

⑩ 松島良・前川雅彦・藤田直子・山下純・坂
本亘, 胚乳の澱粉粒の形状決定に関する分子
細胞生物学的研究, 日本応用糖質科学会中
国・四国支部平成23年度シンポジウム (招待
講演), 2011年11月18日, 福山大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 良 (MATSUSHIMA RYO)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号: 80403476