

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658271

研究課題名(和文) アミロプラスト分化マスター遺伝子の同定による植物バイオマスの革新的改変

研究課題名(英文) Innovation of plant biomass production by identifying master genes for amyloplast differentiation and dedifferentiation

研究代表者

高橋 秀幸 (Takahashi, Hideyuki)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70179513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、アミロプラスト分化・脱分化誘導系の検討を行い、アミロプラスト、脱分化スクリーニング系として、0.4Mマンニトール溶液処理を4時間行うこと、再分化スクリーニング系として、デンプンを消失させた個体をMS培地で4時間処理することが適当であることが見いだされた。次に、デンプン合成・貯蔵能に特化した色素体であるアミロプラストの分化マスター因子の探索に必要なレポーター遺伝子のスクリーニングを実施した。その結果、デンプン貯蔵細胞で特異的な発現パターンを示す19遺伝子を見いだした。これにより、アミロプラスト分化/脱分化マスター遺伝子の同定に必要なツールの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular mechanism of amyloplast differentiation and dedifferentiation, we first intended to establish experimental system that can reproducibly induce amyloplast differentiation and dedifferentiation. Treating Arabidopsis seedlings with 0.4 M mannitol solution, we found that amyloplasts at their root caps degraded in 4 hrs. Furthermore, we found that transferring these amyloplast-less seedlings resulted in the recovery of amyloplasts. Together with other results, we concluded that the treatments described above are suitable for analyzing the physiological and molecular biological nature of amyloplast differentiation and dedifferentiation. Next, we screened genes that are closely related with amyloplast differentiation and dedifferentiation. We referred to the public transcriptome database and successfully identified 19 genes as candidates. Of these genes, two genes were picked up as molecular markers of amyloplast differentiation and dedifferentiation.

研究分野：植物生理学

キーワード：アミロプラスト 分化 脱分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 独立栄養性を有する植物は地球上のエネルギー生産者として、誕生以来その役割を果たし続けている。今日の生態系の基盤も、エネルギーを消費する動物の存在もすべて植物の独立栄養性に依存している。この独立栄養性を支えるオルガネラが色素体である。色素体は分裂組織中の原色素体より、組織・器官特異的に様々なタイプの色素体へと分化する。例えば、葉では葉緑体へ分化し、光合成による炭酸同化を担う。また、高等植物の炭水化物貯蔵能の中心となる色素体はアミロプラストであり、根端や貯蔵組織において光合成により同化した炭水化物をデンプンに合成し、貯蔵する機能を有する。炭素源としてのデンプンの重要性から、これまではデンプンの質と量に関わる酵素群の解析と制御に関する研究が主に進められてきた。こうした研究は一定の成果を上げながらも、デンプン量を増す植物を作出することはできておらず、むしろ同化産物の「無駄な燃焼」により消費されてしまうことが示されている。これは、そもそも酵素の機能する場であるアミロプラストの分化/脱分化機構の理解が全く進んでいないことにあると考えられる。この理由としては、アミロプラスト分化/脱分化を再現性良く制御できるモデルが存在しなかったことが挙げられる。

(2) 申請者らはアミロプラスト分化機構の解明を目的に、植物細胞生物学のモデルとして解析の進んでいるタバコ培養細胞 BY-2 を用いて培地中の植物ホルモンであるオーキシンを除去するだけという簡便な方法によりアミロプラスト分化を誘導する実験系を確立し、アミロプラスト分化過程での細胞の形態学的解析に加え、デンプン合成に関わる遺伝子発現機構やオルガネラ DNA 複製機構を解析してきた。また、申請者らはアミロプラスト分化を誘導した細胞に対しオーキシンを添加することによりアミロプラストが脱分化することも見出した。そして、この分化/脱分化の過程で、デンプンの基質である ADP-Glucose 合成を行う ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (AGPase S) や AGPase の 1 ステップ手前の基質を色素体へ輸送する Glucose-6-phosphate translocator (GPT) などをコードする遺伝子などが特異的に且つ同時に発現変動することを見出した。さらに、申請者らは高等植物における遺伝学的モデルであるシロイヌナズナにおいて、根端のアミロプラストが周囲の水環境に依存して分化/脱分化を起こすことを発見した。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、シロイヌナズナで見つかった水環境に依存した根端アミロプラストの分化/脱分化の生理学的解析を行い、これを分子遺伝学的な実験系として昇華させることを第一の目的とする。

(2) さらに、(1) で確立された実験系を利用し、シロイヌナズナ根端において特異的に発現するデンプン合成に関わる遺伝子を網羅的に探索し、同定する。その後、そして、同定された遺伝子のプロモーター下流に蛍光レポーターをつないだコンストラクトを導入したシロイヌナズナを作出し、解析することで、アミロプラスト分化/脱分化の遺伝的制御機構を明らかにするとともに、アミロプラスト分化のマスタースイッチを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 申請者らが見いだした水環境に依存したシロイヌナズナ根端のアミロプラスト分化/脱分化の生理学的特性を明らかにするために、様々な溶質を様々な条件でシロイヌナズナ芽生えを処理し、根端アミロプラストの消長を観察した。

(2) シロイヌナズナ根端における、アミロプラスト分化/脱分化のマーカー遺伝子を探索するためにシロイヌナズナゲノム上でデンプン合成や糖の代謝、輸送に関わる遺伝子に関して、公共のトランスクリプトームデータベースを用いた解析を行い、根において根端コルメラ細胞で特異的に発現する遺伝子群を探索した。さらに、ここで同定した遺伝子の発現をモニターできるように、当該遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク質をレポーターとしてつないだコンストラクトを作成し、これを野生型シロイヌナズナに形質転換した。その後、選抜を行うことにより、実験系統の確立を行った。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの根端アミロプラスト中のデンプンは、水分勾配をはじめとした水ストレスにより分解されることが明らかにされていた。この知見を元に、通常の培地で生育している芽生えを、0.4M マンニトール溶液を用いて浸透圧刺激を与えたところ、デンプンの顕著な分解、すなわち、アミロプラストの脱分化が認められた。デンプンの減少は、処理後 1 時間目には処理前の 30% 程度まで落ち、4 時間目までほぼ一定であった。また、デンプンの減少は、0.011M マンニトール溶液や蒸留水の処理でも認められたが、減少のタイムコースが緩慢で、有意なデンプンの減少は処理後 4 時間目にならないと認められなかった。このことから、0.4M マンニトール処理により、芽生えが積極的にデンプンを分解していることが強く示唆された。次に、デンプンの再蓄積の条件について検討した。0.4M マンニトール液で処理した芽生えをそのまま処理し続けた芽生えと、0.011M ショ糖を含む MS 培地 (以下 MS 培地) に移し替えた芽生えとに分け、経時的に根端のデンプン量を追跡した。その結果、0.4M マンニトール溶液で処理し続けた個体の根端アミロプラストのデンプンは分解されたままであ

ったが、MS 培地に移した芽生えでは、根端のデンプン量の有意な上昇が処理後1時間目より観察され、培養4時間目で、ほぼプラトーに達することが明らかになった。このことから、脱分化スクリーニング系として、0.4M マンニトール溶液処理を4時間行うこと、再分化スクリーニング系として、デンプンを消失させた個体をMS培地で4時間処理することが適当であると判断された。

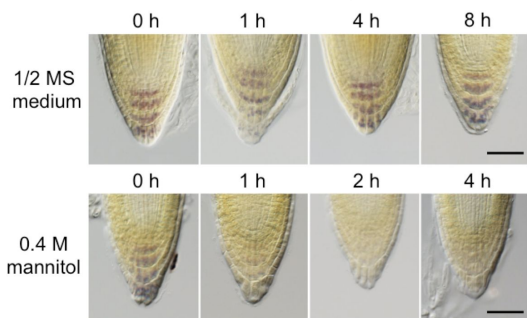


図1 ヨウ素染色によるアミロプラスト脱分化過程の観察

(2) レポーターとして用いる遺伝子のスクリーニングを、公共のシロイヌナズナトランスクリプトームデータベースを参照しながら行った。まず、データベースにあったデンプン合成、分解に関与する51遺伝子について、発現量の数値をリスト化した。次に、シロイヌナズナ根においてデンプンを多く蓄積しているコルメラ細胞で最も強く発現している遺伝子をリストアップしたところ、上記51遺伝子のうち、19遺伝子が該当した。これら19遺伝子は、どれも類似した発現プロファイルを示し、多くの遺伝子がコルメラで最大の発現量を示し、その他の根の組織ではほとんど発現していないことがわかった。これら遺伝子の中には、タバコ培養細胞を用いた先行研究から遺伝子発現レベルがアミロプラスト分化状態と強い相関を持っていた *AGPaseS* や *GPT* をコードする遺伝子が含まれていた。これらことから、これら24遺伝子は、当研究で同定しようとしているアミロプラスト分化マスター遺伝子によって厳密に制御されていることが強く示唆された。さらに、プロモーターデータベースから、これら19遺伝子のプロモーター領域において調節に関与すると推定されるシス配列の推定を行った。しかしながら、すべての遺伝子に共通するシス配列は見つからなかった。このうち、タバコ培養細胞を用いた先行研究でもアミロプラスト分化/脱分化と強く相関する遺伝子として上記2遺伝子をレポーターとして今後のコンストラクトに用いることに決定した。

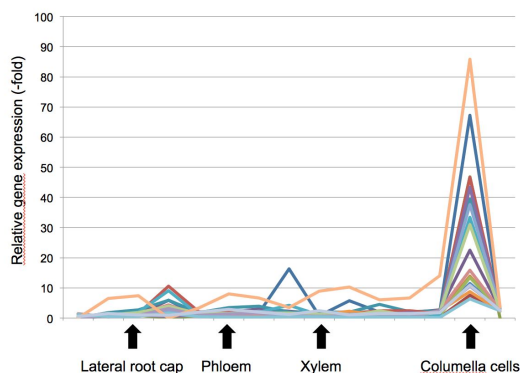


図2 トランスクリプトームデータベースを活用したアミロプラスト分化に関わるデンプン合成関連遺伝子の同定

(3) 上記を踏まえ、*AGPaseS* および *GPT* 遺伝子のプロモーターの下流に *GFP* および *GUS* 遺伝子をそれぞれつないだコンストラクトを完成させ、野生型シロイヌナズナに形質転換を実施した。その後、形質転換体のスクリーニングを実施し、コルメラ細胞で *GFP* 遺伝子を発現する系統を得ることに成功した。さらに、また、デンプン貯蔵細胞において特異的発現を示す遺伝子について、上記アミロプラスト分化・脱分化誘導系における発現変動をRT-PCR法により解析した。その結果、デンプン合成、分解に関わる遺伝子群の発現制御には少なくとも数パターンあることが示唆された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

菊池光太郎、高橋秀幸、宮沢 豊 浸透圧刺激により生じるシロイヌナズナ根端アミロプラスト動態の変化 日本植物学会第78回大会 明治大学(神奈川県川崎市) 2014年9月12日-14日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀幸 (TAKAHASHI, Hideyuki)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：70179513

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

宮沢 豊 (MIYAZAWA, Yutaka)
山形大学・理学部・准教授
研究者番号：00342858