

## 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14日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580417

研究課題名（和文）イネ種子中のプロラミン分子種がプロテインボディ I へ局在化するミクロな制御機構

研究課題名（英文）The molecular mechanism of each prolamin molecular species localized to protein body I in the rice seed.

研究代表者

増村 威宏（TAKEHIRO MASUMURA）

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：50254321

研究成果の概要（和文）：本研究では、イネ種子のPB-I内部における各プロラミン分子種の詳細な局在化機構を明らかにした。プロラミンの局在化には、プロラミンプロモーターの制御と、タンパク質間の相互作用（ジスルフィド結合、疎水結合など）が重要な役割を担うことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In this study, I clarified the detailed localization mechanism of each prolamin molecular specie in PB-I of the rice seed. For localization of the prolamin, it was revealed that the control of the prolamin promoter and protein and protein interaction (including disulfide combination, the hydrophobic bond) took an important role.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：植物、遺伝子、蛋白質、イネ種子、プロテインボディ、プロラミン

## 1. 研究開始当初の背景

イネ種子貯蔵タンパク質は、プロラミン、グルテリン、グロブリンに分類され、それぞれ複数の分子種より構成される。プロラミンはPB-Iへ、グルテリンとグロブリンはPB-IIに特異的に集積するが、その細胞内輸送機構の解析は、合成・集積には複数の段階があり、PBの形成機構の詳細は未だに不明な点が多い。PB-Iは人の消化管ではほとんど分解され

ないが、何故消化されにくいかにについては、不明であった。申請者は、一連の研究の中で、プロラミン分子種の多様性がPB-I形成に重要な役割を担う可能性を見出していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト消化管においてPB-Iが難分解性となる原因がPB-Iの構造上の特徴にあるという仮説を立て、イネPB-Iの形成

機構に焦点を絞り、イネ種子における PB-I の形成機構を分子生物学的、細胞生物学的手法で解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、3方向からのアプローチにより計画を立てて行った。1)金コロイド標識した抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察と、蛍光色素標識した抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡観察を組合せ、PB-I 内部におけるプロラミンの局在部位を解析した。2)RT-PCR 法を用いたプロラミン分子種ごとの発現時期、発現量の解析を行った。3)各分子種のプロラミン+GFP 融合タンパク質を発現する形質転換イネを作出し、PB-I の構成に必要なプロラミン分子種を明らかにした。

### 4. 研究成果

#### 1) プロラミン分子種を区別する抗体を用いた PB-I 内部におけるプロラミンの局在性の解析

これまでに作製した5種類のプロラミンに対する抗体(全13kDa, 10kDa, 13kD-a (Cys rich), 13kD-b (Cys less), 16kDa プロラミン抗体)を用い免疫蛍光組織観察、免疫電子顕微鏡観察を行い、プロラミン分子種のPB-I 内における局在化様式を明らかにした。その結果、PB-I の中心部に10kDa, その周囲に13kD-b, 中間層には13kD-a および16kDa, 最外周層には再び13kD-b が局在化している事が明らかになった(図1)。

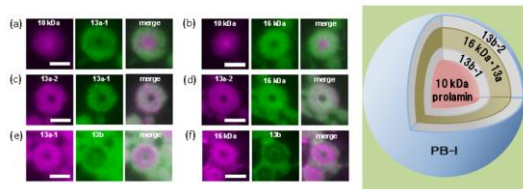


図1. PB-Iにおけるプロラミンの局在

5種類の抗体を用いた蛍光顕微鏡観察像とPB-Iの構造を示すモデル図

また、溶媒分画法を用いることで、13kD-b プロラミンが PB-I 内から遊離し易い事が明らかになった。

#### 2) プロラミン分子種ごとの発現時期、発現量の解析

これまでに作製した各プロラミン遺伝子を区別可能なプライマー配列を用い、開花後の経時変化における各プロラミン遺伝子の発現解析を行ったところ、各プロラミン mRNA の発現ピーク時期の順番が、PB-I 内部から外周部へ向かうタンパク質の局在化の順番と同様であることが判った。即ち、遺伝子発現の順番とタンパク質の局在化する順序はほぼ一致していた(図2)。

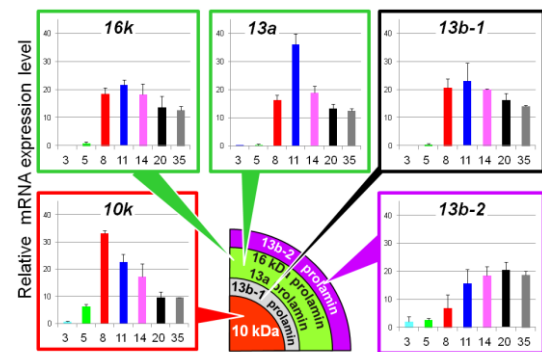


図2. プロラミン mRNA の経時的発現パターン

横軸は開花後日数, 縦軸は mRNA の相対的な発現量

#### 3) プロラミン+GFP 融合タンパク質を用いた PB-I の構成ポリペプチドの解析

プロラミンプロモーター制御下で発現したプロラミン+GFP融合タンパク質が種子中のPB-Iに合成・集積する形質転換イネを用いて、各種プロラミンとGFP融合タンパク質の局在部位を明らかにした。その結果、PB-I中の内在性プロラミンの局在部位とプロラミン+GFP融合タンパク質の局在性が一致した。即ち、各プロラミンがPB-Iに局在化する機構にはプロラミンプロモーターの制御が強く関与していることが判った(図3)。

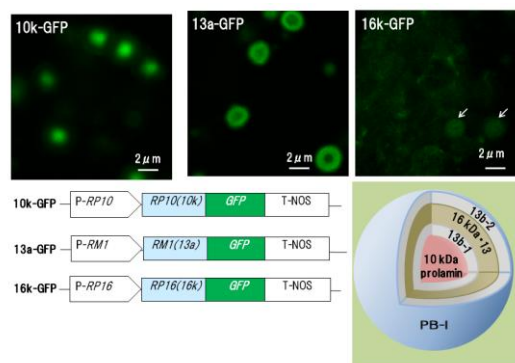


図 3. プロラミンプロモーター制御下で発現したプロラミン+GFP 融合タンパク質の局在部位

以上の結果より、PB-I 内部における各プロラミン分子種の詳細な局在化機構が明らかになり、プロラミンの局在化には、プロラミンプロモーターの制御と、タンパク質間の相互作用（ジスルフィド結合、疎水結合など）が重要な役割を担うことが明らかになった。

#### 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 11 件)

- 1) Masatoshi Kubota, Yuhi Saito, Takehiro Masumura, Takehisa Kumagai, Reiko Watanabe, Shinobu Fujimoto, Motoni Kadowaki, Improvement of the In vivo digestibility of rice protein by alkaline extraction is due to structural changes in prolamins/protein body-I particle. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 74 巻, 2010, 614-619
- 2) Yuhi Saito, Takanari Shigemitsu, Kunisuke Tanaka, Shigeto Morita, Shigeru Satoh, Takehiro Masumura, Ultrastructure of Mature Protein Body in the Starchy Endosperm of Dry Cereal Grain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 74 巻, 2010,

1485-1487

- 3) Youichi Ohdaira, Takehiro Masumura, Nobuaki Nakatsuka, Takanari Shigemitsu, Yuhi Saito, and Ryouji Sasaki, Analysis of Storage Protein Distribution in Rice Grain of Seed-protein Mutant Cultivars According to Immunofluorescence Microscopy. *Plant Production Science*, 査読有, 14巻, 2011, 219-228
- 4) 増村威宏, 米の成分(1)粒の生物的形成. *食品と容器*, 51 巻, 2010, 592-599
- 5) 齊藤雄飛, 増村威宏, 米加工食品に役立つタンパク質の分析技術. *ニューフードインダストリー*, 査読無, 52 巻, 2010, 1-8
- 6) 増村威宏, 齊藤雄飛, 米の食味に関する貯蔵タンパク質の米粒内分布の解析. *農業および園芸*. 査読無, 85 巻, 2010, 1235-1239
- 7) Kanae Ashida, Yuhi Saito, Takehiro Masumura, Shuichi Iida, Ultrastructure of protein bodies in mutant rice (*Oryza sativa* L.) with altered storage composition. *Breed Sci.* 査読有, 61 巻, 2011, 201-207, DOI: 10.1270/jsbbs.61.201
- 8) Takanari Shigemitsu, Shinji Ozaki, Yuhi Saito, Masaharu Kuroda, Shigeto Morita, Shigeru Satoh, Takehiro Masumura, Production of human growth hormone in transgenic rice seeds: co-introduction of RNA interference cassette for suppressing the gene expression of endogenous storage proteins. *Plant Cell Reports*, 査読有, 31巻, 2012, 539-549, DOI: 10.1007/s00299-011-1191-y
- 9) Takanari Shigemitsu, Yuhi Saito,

- Shigeto Morita, Shigeru Satoh, Takehiro Masumura, Separation and identification of rice prolamins by two-dimensional gel electrophoresis and amino acid sequencing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 76 巻, 2012, 594-597, DOI:10.1271/bbb.110791
- 10) Yuhi Saito, Takanari Shigemitsu, Ryuichi Yamasaki, Ai Sasou, Futami Goto, Koichi Kishida, Masaharu Kuroda, Kunisuke Tanaka, Shigeto Morita, Shigeru Satoh, Takehiro Masumura, Formation mechanism of internal structure of type I protein bodies in rice endosperm: relationship between the localization of prolamin species and the expression of individual genes. *Plant Journal*, 査読有, 2012, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.04947.x. [Epub ahead of print]
- 11) 重光隆成, 増村威宏, 米および米加工食品に適用可能なタンパク質分析技術. *ニューフードインダストリー*, 査読無, 54 巻, 2012, 1-8
- [学会発表] (計 15 件)
- 1) 齊藤雄飛, 岸田浩一, 高田健司, 高橋英之, 島田武明, 田中國介, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, イネのプロテインボディ・タイプ I 形成におけるプロラミンポリペプチドの重要性, 第 27 回植物細胞分子生物学会, 日本大学, 2009 年 7 月 30-31 日
- 2) 山崎竜一, 岸田浩一, 重光隆成, 田中國介, 齊藤雄飛, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, 形質転換イネにおけるインゲンマメ液胞輸送配列を付加した GFP 融合タンパク質の蓄積部位, 第 27 回植物細胞分子生物学会, 日本大学, 2009 年 7 月 30-31 日
- 3) 齊藤雄飛, 重光隆成, 黒田昌治, 田中國介, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, イネ種子における I 型プロテインボディの構造とプロラミンの分布, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 東京大学, 2010 年 3 月 27-30 日
- 4) 齊藤雄飛, 重光隆成, 田中國介, 森田重人, 佐藤茂, 黒田昌治, 増村威宏, イネ種子における小胞体由来 I 型プロテインボディの構造とその形成機構, 日本農芸化学会 関西支部例会, 京都府立大学, 2010 年 5 月 29 日
- 5) 齊藤雄飛, 重光隆成, 田中國介, 森田重人, 佐藤茂, 黒田昌治, 増村威宏, イネ種子における小胞体由来 I 型プロテインボディの構造とその形成機構, 第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会, 東北大学, 2010 年 9 月 2-3 日
- 6) 重光隆成, 齊藤雄飛, 森田重人, 佐藤茂, 石丸努, 近藤始彦, 増村威宏, 高温ストレスを受けたイネ種子における貯蔵タンパク質の解析, 第 28 回植物細胞分子生物学会, 東北大学, 2010 年 9 月 2-3 日
- 7) 山崎竜一, 岸田浩一, 重光隆成, 田中國介, 齊藤雄飛, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, イネ種子貯蔵タンパク質の細胞内選別におけるシグナルペプチドの機能解析, 日本農芸化学会 2010 年度関西支部大会, 近畿大学, 2010 年 10 月 2-3 日
- 8) 佐生愛, 齊藤雄飛, 山崎竜一, 重光隆成, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, プロラミン GFP 融合タンパク質を発現するイネ種子における細胞内局在化に関する研究, 第 29 回植物細胞分子生物学会, 九州大学, 2011 年 9 月 6-8 日
- 9) 重光隆成, 齊藤雄飛, 石丸努, 近藤始彦, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, 高温ス

レスを受けたイネ種子における貯蔵タンパク質の解析, 第 29 回植物細胞分子生物学学会, 九州大学, 2011 年 9 月 6-8 日

- 10) 後藤双水, 重光隆成, 齊藤雄飛, 森田重人, 佐藤茂, 石丸努, 近藤始彦, 増村威宏, 遮光処理を行ったイネ種子中の貯蔵タンパク質の解析, 第29回植物細胞分子生物学学会, 九州大学, 2011年9月6-8日
- 11) 東田潤, 齊藤雄飛, 土居誠, 森田重人, 佐藤茂, 石丸努, 近藤始彦, 増村威宏, イネ胚乳分化期に組織特異的に発現する遺伝子群の網羅的解析, 日本農芸化学会 2011 年度関西・中部支部合同大会, 京都大学, 2011 年 10 月 1-2 日
- 12) 山口雅祥, 齊藤雄飛, 中塚信明, 森田重人, 佐藤茂, 石丸努, 近藤始彦, 増村威宏, イネ種子発芽期における貯蔵タンパク質分解に関わる遺伝子群の発現解析, 日本農芸化学会 2011 年度関西・中部支部合同大会, 京都大学, 2011 年 10 月 1-2 日
- 13) 重光隆成, 齊藤雄飛, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, Separation and identification of rice prolamin polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis and amino acid sequencing 農学プロテオーム研究の最前線, つくば国際会議場, 2011 年 11 月 8-10 日
- 14) 佐生愛, 齊藤雄飛, 山崎竜一, 田中愛実, 重光隆成, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, 経口ワクチン用カプセルを目指したイネ種子 PB-I の特定部位への外来タンパク質局在化に関する研究, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 2012 年 3 月 23-25 日
- 15) 重光隆成, 森田重人, 佐藤茂, 増村威宏, イネカルスにおけるプロラミン GFP 融

合タンパク質の発現, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 2012 年 3 月 23-25 日

[図書] (計 2 件)

- 1) 齊藤雄飛, 増村威宏 (2011): 米粒および米加工品におけるタンパク質の可視化技術の開発と利用. 「食のバイオ計測の最前線—機能解析と安全・安心の計測を目指して—」, 植田充美監修, CMC 出版, 東京, pp.311-315 (共著)
- 2) Takehiro Masumura, Yuhi Saito (2012): Structure and Function of Rice Seed Protein, 「Rice studies, present and future」, 小川誠一郎編, 三共出版, 東京, pp.144-149 (共著)

[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:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
[http://www2.kpu.ac.jp/life\\_environ/genetic\\_eng/index.html](http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/genetic_eng/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増村 威宏 (TAKEHIRO MASUMURA)  
京都府立大学・大学院生命環境科学研究

科・講師

研究者番号：50254321

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：