

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07117

研究課題名(和文)ペルオキシソーム膜ABCトランスポーターによる種子発芽制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on seed germination regulated by peroxisomal membrane ABC transporter

研究代表者

林 誠 (Hayashi, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：50212155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： PED3はペルオキシソーム膜に局在するABCトランスポーターである。種子のオイルボディに蓄積している種子貯蔵脂肪から切り出された脂肪酸は、PED3によってペルオキシソームへ輸送され、種子発芽に必要なエネルギー源であるスクロースに変換される。

本研究では、種子発芽における炭素代謝の制御機構に関わる遺伝子の網羅的同定をめざしてped3サプレッサー変異体の単離と分子遺伝学的解析を行った。これまでに6系統の変異体を同定し、表現型解析を行った。その中の1系統はプラスチド型ホリルポリグルタミン酸合成酵素を欠損しており、暗所発芽時にデンプン合成能を有することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： PED3 is a peroxisomal membrane ABC transporter. Fatty acids released from seed reserved lipid in oil body are imported into peroxisome by PED3, and then converted into sucrose supplying essential energy for seed germination.

To identify genes regulating carbon metabolism during germination, we performed comprehensive isolation and molecular genetical analyses of ped3 suppressor mutants. Six mutants were so far identified and analyzed their phenotypes. One of the mutant was revealed that it had defect in plastidial polyglutamate synthetase gene, and accumulated starch during germination in the dark.

研究分野：植物生理学

キーワード：ペルオキシソーム 種子発芽 貯蔵脂肪 デンプン 葉酸 プラスチド

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナなどの脂肪性種子植物は、種子の発芽時にオイルボディに蓄積した貯蔵脂肪からスクロースを作ることで発芽に必要なエネルギーを得ている。研究代表者は、ペルオキシソーム膜 ABC トランスポーターを同定した。本タンパク質を欠損する *ped3* 変異体は種子の発芽率が極端に低下した。これまでの解析から、このタンパク質には、脂肪酸の輸送とアブシジン酸シグナリングの2つの働きによって種子発芽を促進するというモデルを提唱しているが、その分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PED3 による種子発芽の制御機構を解明することにある。そのため、PED3 と連携して種子発芽を促進する遺伝子を同定する方法を確立し、同定した遺伝子の機能を解析する。

3. 研究の方法

*ped3* 変異体は発芽率が極端に低い。そこで、この変異体がよく発芽する条件を確立した上で、変異を誘発した M2 種子を得る。得られた M2 種子の中から発芽率が高くなった個体を選抜し、*ped3* サプレッサーとした。*ped3* サプレッサーは定法に従い、原因遺伝子のマッピングや表現型解析などを行い、遺伝子の機能を明らかにした。

4. 研究成果

*ped3* 変異体は顕微鏡下で種皮を切開すると発芽率が回復することが分かっていた。そこで、高速振とう機を用いて *ped3* 変異体種子の種皮を物理的に傷つけることによって発芽率を向上させる方法を確立した。この方法を用いることで、エチルメタンスルホン酸によって変異を誘発した大量の *ped3* 変異体の M2 種子を得ることができた。そこで、この M2 種子を用いたスクリーニングを実施し、現在までに 6 系統の *ped3* サプレッサー変異体を同定しており、現在もスクリーニングを続行中である。その中の 1 系統は発芽に際してデンプンを合成する能力を有することが明らかになった。本変異体はプラスチック型ホルリポリグルタミン酸合成酵素を欠損しており、野生型植物と比較してアデニン量が増加していた。そこで、メトトレキサートや 5 フルオロウラシルなどの葉酸代謝拮抗剤やアデニンを投与したところ、野生型植物にデンプンの蓄積が誘導されたことから、葉酸によるデンプンの蓄積制御という新しい概念を提唱した。これらの結果は、掲載雑誌の Research Highlight に選ばれたり、NHK「ガッテン」で取り上げられるなど注目を浴びた。

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)

1) Shimada, T. L., Hayashi, M. and Hara-Nishimura, I. (2018) Membrane dynamics and multiple function of oil bodies in seeds and leaves. *Plant Physiol.* 176, 199-207., DOI:10.1104/pp.17.01522, 査読有り

2) Hayashi, M., Tanaka, M., Yamamoto, S., Nakagawa, T., Kanai, M., Anegawa, A., Ohnishi, M., Mimura, T. and Nishimura, M. (2017) Plastidial folate prevents starch biosynthesis triggered by sugar influx into non-photosynthetic plastids of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 58, 1328-1338., DOI:10.1093/pcp/pcx076, 査読有り

3) Kanai, M., Mano, S., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2016) Designing novel breeding strategies for producing high-oil crops based on a molecular understanding of triacylglycerol metabolism. *In* New challenges in seed biology – basic and translational research driving seed technology. (Eds. Araujo, S. and Balestrazzi, A.) INTECH, pp137-153., DOI:10.5772/64465, 査読有り

4) Cui, S., Hayashi, Y., Otomo, M., Mano, S., Oikawa, K., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2016) Sucrose production mediated by lipid metabolism suppresses physical interaction of peroxisomes and oil bodies during germination of Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* 291, 19734-19745., DOI:10.1074/jbc.M116.748814, 査読有り

5) Kanai, M., Mano, S., Kondo, M., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2016) Extension of oil biosynthesis during the mid-phase of seed development enhances oil content in Arabidopsis seeds. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1241-1250., DOI: 10.1111/pbi.12489, 査読有り

6) Mori, Y., Hayashi, M., Nishimura, M. and Yamamoto, K. T. (2015) A new temperature-insensitive allele of the Arabidopsis AXR6/CUL1 locus derived from a missense mutation in the C-terminal RBX1 binding region. *Plant Signal. Behav.* 10, e1078956, 1-4., DOI:10.1080/15592324.2015.1078956, 査読有り

7) Nguyen, A. H., Matsui, A., Tanaka, M., Mizunashi, K., Nakaminami, K., Hayashi, M., Iida, K., Toyoda, T., Nguyen, D. V. and Seki, M. (2015) Loss of Arabidopsis 5'-3' exoribonuclease AtXRN4 function enhances heat stress tolerance of plants subjected to severe heat stress. *Plant Cell Physiol.* 56, 1762-1772., DOI:10.1093/pcp/pcv096、査読有り

8) Oikawa, K., Matsunaga, S., Mano, S., Kondo, M., Yamada, K., Hayashi, M., Kagawa, T., Kadota, A., Sakamoto, W., Higashi, S., Watanabe, M., Mitsui, T., Shigemasa, A., Iino, T., Hosokawa, Y. and Nishimura, M. (2015) Physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis. *Nature Plants* 1, Article number: 15035., DOI:10.1038/nplants.2015.35、査読有り

〔学会発表〕(計 8件)

1) 金井雅武、山田哲也、林誠、真野昌二、西村幹夫「トリアシルグリセロールリパーゼ SDP1 はダイズの脂質含量と脂肪酸組成を制御する」日本植物生理学会年会、札幌(札幌コンベンションセンター) 2018年3月28-30日

2) 金井雅武、山田哲也、林誠、真野昌二、西村幹夫「トリアシルグリセロールリパーゼ SDP1 の発現抑制はダイズの脂質含量と脂肪酸組成を改良する」ConBio2017 神戸(ポートアイランド) 2017年12月6-9日

3) 林誠、山本沙季：葉酸によるデンブ蓄積の抑制メカニズム、日本植物学会、千葉(東京理科大学)、2017年9月6-8日

4) 齊藤美幸、林誠：*xrn4* 変異によって誘導される遺伝子サイレンシングを抑制する遺伝子の探索、日本植物学会年会、新潟(新潟コンベンションセンター) 2015年9月6-8日

5) Oikawa, K., Matsunaga, S., Mano, S., Kondo, M., Hayashi, M., Sakamoto, W., Mitsui, T., Iino, T., Hosokawa, Y., and Nishimura, M. "Photosynthesis-dependent physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis" The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing (AIST Tokyo Waterfront, Tokyo)、2015年3月13日~15日

6) Nguyen, H. A., Matsui, A., Tanaka, M., Mizunashi, K., Nakaminami, K.,

Hayashi, M., Iida, K., Toyada, T., Nguyen, V. D., Seki, M.: Loss of Arabidopsis 5'-3' exoribonuclease AtXRN4 function enhances heat tolerance under short-time heat stress treatments、日本植物生理学会年会、東京(東京農大) 2015年3月16-18日

7) Oikawa, K., Matsunaga, S., Mano, S., Kondo, M., Hayashi, M., Sakamoto, W., Mitsui, T., Iino, T., Hosokawa, Y., and Nishimura, M. "Photosynthesis-dependent physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis" The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing (AIST Tokyo Waterfront, Tokyo)、2015年3月13日~15日

8) Kanai, M., Tetsuya Yamada, Mano, S., Hayashi, M. and Nishimura, M. Triacylglycerol lipase regulates quantity and quality of seed storage oils in Soybean、CREST 国際会議「食糧とバイオ材料の品質・生産性の向上を図る樹木・作物技術：新たな緑の革命、グルタチオン農業の実現に向けて」、東京、2015年2月14日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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〕

報道など  
NHK「ガッテン」2018年1月17日  
ホームページなど  
<http://b-lab.nagahama-i-bio.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 誠 (HAYASHI, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・  
教授

研究者番号：50212155

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )