

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2010
課題番号：19580110
研究課題名 (和文) イネ胚乳に見いだされた新規プロテインジスルフィドイソメラーゼの生理機能の解明
研究課題名 (英文) Physiological role of a novel protein disulfide isomerase present in rice endosperm tissue
研究代表者
小川 雅広 (OGAWA MASAHIRO)
山口県立大学・共通教育機構・教授
研究者番号：10160772

研究代表者の専門分野：植物生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：イネ PDI 胚乳 突然変異 分子シャペロン RNAi 組換え体 MNU プロテインボデイ

1. 研究計画の概要

(1)イネ胚乳には、11S グロブリンの分子内S-S結合形成を触媒する分子サイズが60kDaのプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI1, 1)が、存在している。近年、PDI1, 1が欠損したイネ突然変異体 esp2 の胚乳には、分子サイズが40kDaの新規PDI (PDI2, 3)が、多量に発現していることがわかり、さらに野生型にも酵素として機能していることが判明した。

(2)そこでこの基盤研究では、新規PDI2, 3が、イネ貯蔵タンパク質の合成蓄積にどのような機能を果たしているのかを明らかにすることが研究目的である。

(3)本研究ではPDI2, 3に関するイネ突然変異体を選抜し、選抜した変異体における貯蔵タンパク質の合成蓄積、特にプロテインボデイ (PB)形成にどのような変化を引き起こすのかについて検討し、PDI2, 3の生理機能を突き止めようとした。

(4)また、PDI2, 3のRNAi組換え体を作成し、その組換え体において生じる胚乳のPB形成について免疫細胞化学的手法を用いて特にPB形成の変化について検討し、PDI2, 3の生理機能を明らかにしようとした。

(5)さらに、PDI2, 3の細胞内局在について明らかにしようとした。

2. 研究の進捗状況

(1)新規PDIに関する突然変異体の選抜をするために改良Tilling法を用いてPDI2, 3に関する一塩基置換変異系統を選抜した。その結果、2系統の候補変異体を得られた。現在これらの変異体のホモ個体を育成中である。

(2)PDI2, 3に関するRNAi組換え体の作成をした。その結果、1系統の候補組換え体を得られた。この組換え体では、PDI1-1は正常レベルまで発現されていたが、PDI2, 3タンパク質は、免疫反応レベルでほとんどないことがわかった。そこで胚乳におけるプロテインボデイ形成にどのような変化が起こっているかを調べた。その結果、プロラミンを集積する小胞体型プロテインボデイ (PBI)の形態に変化が見られた。さらに、プロラミン分子のうちシステイン残基の多い10kDaプロラミンが、PBIの中心に分布せず、PBI全体に分布する傾向が見られた。従ってPDI2, 3の欠損によってPBI形成に対して支障が出ることが分かった。

(3)PDI2, 3の局在部位を明らかにするため登熟種子胚乳から細胞器官を超遠心分離法で分画し、PDI2, 3がどの各分に分布するのかを調査した。その結果、PDI2, 3が、PBI画分に存在している可能性があることが示唆された。さらに、PDI2, 3遺伝子に蛍光色素を結合させた遺伝子組換え体を作成し、その合成遺伝子の胚乳における発現部位を調査した。その結果、PDI2, 3に由来する蛍光が、dilated ER (膨らんだ小胞体)内に存在するプロラミンPBの周辺に見られた。しかし、cis-ER (扁平小胞体)には、蛍光は観察されなかった。以上結果からPDI2, 3が、cie-ERよりむしろPB-ERに偏在している可能性があることが判明した。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由) 困難が予想されたPDI2, 3に関する

遺伝子組換え体が、順調に作出された。

4. 今後の研究の推進方策

研究計画は順調に進んだので、研究の方向には変更はない。残された研究課題であるPDI2,3の突然変異体のホモ個体の作出とその個体の生理的变化の解析が急がれる。

5. 代表的な研究成果

(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1件)

Kumamaru T, Y. Uemura, Y. Inoue, Y. Takemoto M, Ogawa, I Hara-Nishimura, H. Satoh Vacuolar processing enzyme plays an essential role in the crystalline structure of glutelin in rice seed. *Plant Cell Physiology*:51 38-46(2010). (査読有り)

[学会発表] (計11件)

- ①長嶺愛 イネプロラミンPBの核構造形成における10kDaプロラミンの役割
日本植物生理学会 2008. 3. 22 北海道
- ②恩田弥生 イネ種子貯蔵タンパク質のジスルフィド結合形成の電子伝達系の可視化から見たタンパク質分別輸送・集積の分子機構
日本植物生理学会 2008. 3. 22 北海道
- ③熊丸敏博 イネグルテリンの細胞内輸送と蓄積を制御する遺伝的メカニズム
日本植物生理学会 2008. 3. 22 北海道
- ④川越靖 イネ種子貯蔵タンパク質の突然変異体 esp2 における米粉の製パン特性
日本植物生理学会 2008. 3. 22 北海道
- ⑤恩田弥生 イネ種子貯蔵タンパク質の分別輸送・蓄積における PDI1-1 および PDI2, 3 の機能解析
日本農芸化学会 2008. 3. 29 名古屋
- ⑥川越靖 イネ種子貯蔵タンパク質の突然変異体 esp2 の優れた加工特性
日本農芸化学会 2008. 3. 29 名古屋
- ⑦牛島智一 低システインプロラミンの集積にかかわる Esp1 遺伝子は eucaryotic Release Factor 1 (eRF1) をコードする
日本植物生理学会 2009. 3. 20 名古屋
- ⑧Kumamaru T. Vacuolar processing enzyme plays an essential role in the formation of the glutelin crystalline structure in rice seed.
Plant Biology 2009 7.18-22 Hawaii
- ⑨Fukuda M. The small GTPase Rab5a is essential for intracellular transport of glutelin precursor from Golgi apparatus and endosomal membrane organization in developing rice endosperm.
Plant Biology 2009. 7.18-22 Hawaii

⑩Nagamine I. The role of cystein-rich prolamines for the formation of prolamine protein body in rice.
Plant Biology 2009. 7.18-22 Hawaii

⑪熊丸敏博 液胞プロセシング酵素はイネ種子グルテリンの結晶構造形成に寄与する
日本植物生理学会 2010. 3. 18 熊本

[図書] (計2件)

①Kumamaru, T., Ogawa, M., Satoh, H., and Okita, T.W. *Plant Cell Monographs* (8) Odd-Arne Olsen(ed.):Endosperm. "Protein Body Biogenesis in Cereal Endosperm"
Springer-Verlag Heidelberg (2007)

②熊丸敏博、小川雅広、佐藤光、T.W.Okita 種子の科学とバイオテクノロジー (原田久也監修) イネ種子貯蔵タンパク質集積の遺伝的制御機構 (2009)

[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]