

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H02933

研究課題名（和文）イネ種子の細胞内物質貯蔵における小胞体機能タンパク質の機能解明とその育種的利用

研究課題名（英文）Functional analysis of the proteins for the endoplasmic reticulum in the intracellular storage of substance in rice seed and the use in breeding

研究代表者

熊丸 敏博（Kumamaru, Toshihiro）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：00284555

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,700,000円

研究成果の概要（和文）：プロラミンに関するesp1突然変異、lcrp突然変異、及びesp3突然変異の原因遺伝子はそれぞれeRF1、SHMT4、及びアミノ酸代謝に関する因子をコードしていた。グルテリン前駆体を多量に集積するglup7突然変異の原因遺伝子はグルテリンの小胞体からの輸送に関する因子をコードしていた。種子貯蔵タンパク質に関する突然変異種子の澱粉合成関連酵素とデンプン特性を解析したものの、解析した突然変異体では野生型と有意差は認められなかった。グルテリン前駆体を小胞体内に多量に集積しPDIL1-1を欠損するesp2変異体に関して、コシヒカリを遺伝的背景とするesp2系統の米粉は優れた食品加工特性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の物質貯蔵機能の理解のために、小胞体関連機能タンパク質（以下小胞体タンパク質）の貯蔵タンパク質の輸送・蓄積と澱粉合成代謝における機能、小胞体タンパク質と加工特性等との関係を明らかにすることは重要である。本研究の成果は、植物における種子貯蔵タンパク質の輸送・蓄積系のモデル構築を担うと共に、植物の澱粉、脂質等の物質貯蔵における小胞体タンパク質の機能解明の一助となる。加えて、イネ種子の小胞体タンパク質と加工特性及び機能性付与との関係が明らかになり、優れた加工特性や新奇機能性を有するコメの開発に寄与する。

研究成果の概要（英文）：The causal genes of esp1, lcrp, and esp3 mutations for the prolamine accumulation encoded the eRF1, SHMT4, and the factor for the amino acid metabolism, respectively. The causal gene of glup7 mutation accumulating the proglutelin encoded the factor for the transportation of the proglutelin from the endoplasmic reticulum (ER). The starch synthesis related enzymes and the starch properties in the seed of mutants for the storage proteins were analyzed, resulting that those in mutants didn't indicate the significant difference compared to the wild type. Koshihikari breeding line with the esp2 mutant allele, which accumulates the proglutelin within the ER and defects the PDIL1-1, indicated the good processing properties for food.

研究分野：植物育種学

キーワード：貯蔵タンパク質 イネ 種子 デンプン

1. 研究開始当初の背景

植物は種子や根等の貯蔵器官に、タンパク質、澱粉、脂質等を大量に蓄積している。これらの蓄積のメカニズム解明が、貯蔵物質の改良のための知見を得ることに結び付く。貯蔵タンパク質は当該遺伝子産物自体が蓄積することから、分子レベルでの議論が容易である。

小胞体上で翻訳されたタンパク質は小胞体内において正しい立体構造に折りたたまれ(フォールディング)、小胞輸送により小胞体からゴルジ体を経て各オルガネラに向かう。種子貯蔵タンパク質は小胞体内に蓄積するものと、小胞体上で前駆体として翻訳された後、小胞輸送によってゴルジ体を経由し貯蔵型液胞内に蓄積するものがあり、いずれもプロテインボディ(PB)として蓄積する。貯蔵タンパク質の小胞体蓄積型と貯蔵型液胞蓄積型は作物によって異なるが、イネのみ両者を有する。プロラミン(アルコール可溶性)は小胞体内に蓄積しPB-Iを形成する。一方、小胞体上で翻訳されたグルテリン(酸・アルカリ可溶性)前駆体は、小胞輸送によってゴルジ体を経由して貯蔵型液胞に輸送され蓄積し、PB-IIを形成する(図1)。

プロラミンの小胞体内蓄積には分子シャペロン等が作用することが報告されている。グルテリン前駆体の小胞輸送に関与する因子が複数報告されている。しかしながら、プロラミンの小胞体内蓄積やグルテリン前駆体の小胞輸送に関与する因子の詳細な機能は明らかではない。

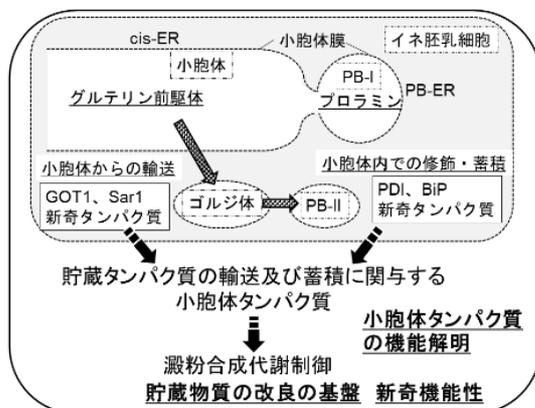


図1. イネ種子における小胞体関連機能タンパク質の機能解明

2. 研究の目的(図1)

以下の3点を明らかにする。

- プロラミンの小胞体内集積への蓄積機構解明
- グルテリン前駆体の小胞体からの小胞輸送機構解明
- 小胞体タンパク質と澱粉合成代謝制御との関連性解明
- 小胞体タンパク質変異とコメの加工適性との関連性解明

3. 研究の方法

プロラミンの小胞体内への蓄積機構解明

複数の CysP (cysteine poor) プロラミン分子を欠失する *endosperm storage protein 1 (esp1)* 変異に関して遺伝子連鎖地図を用いて変異の原因となる候補遺伝子を特定する。複数の CysR (cysteine rich) プロラミン分子を欠失する *esp3* 変異及び *low level of cysteine-rich proteins (lcrp)* 変異に関してそれぞれ、MutMap 法と遺伝子連鎖地図を用いて変異の原因となる候補遺伝子を特定する。

グルテリン前駆体の小胞体からの小胞輸送機構解明

グルテリン前駆体を多量に蓄積する突然変異である *Glup1* 及び *glup7* の原因遺伝子

小胞体タンパク質と澱粉合成代謝制御との関連性解明

グルテリン前駆体を多量に蓄積する突然変異体並びにプロラミンの組成が変化した突然変異体種子において、澱粉合成関連酵素とデンプン特性を解析する。

小胞体タンパク質変異によるコメの加工適性の向上

各変異体の米粉製パン特性を解析する。

4. 研究成果

プロラミンの小胞体内への蓄積機構解明

・ *esp1* 突然変異 (CysP プロラミン減少) (図2)

複数の CysP プロラミン分子が減少する *esp1* 変異遺伝子について高密度連鎖地図を構築し、候補遺伝子を 20kb の領域内に絞り込んだ。この領域内に一塩基多型を有し Eukaryotic peptide chain release factor (eRF1) をコードする遺伝子が含まれていたことから *eRF1* を候補遺伝子とした。候補遺伝子の相補性検定の結果、*eRF1* 遺伝子が *esp1* 変異の原因遺伝子であることが明らかとなり、ESP1/eRF1 と命名した。eRF1 はタンパク質の翻訳時に mRNA の終止コドンの認識と新生ポリペプチド鎖をリボソームから遊離させる機能を有している。*esp1* 変異体において減少する CysP プロラミン分子の終

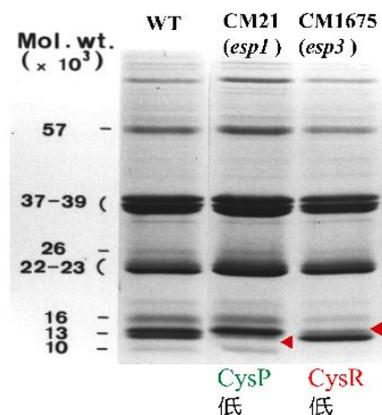


図2. *esp1* 突然変異と *esp3* 突然変異の種子貯蔵タンパク質の電気泳動

止コドンは全て UAA であり、減少しない CysP プロラミン分子の終止コドンは全て UAA 以外であった。終止コドン認識解析によって ESP1/eRF1 は終始コドンの UAA と UAG を認識するが、UGA は認識しないことが明らかとなった。これらの結果から、ESP1/eRF1 は特定の CysP プロラミン分子の翻訳終結に関与していると結論した。

・ *esp3* 突然変異(CysR プロラミン減少) (図 2)

複数の CysR プロラミン分子が減少する *esp3* 変異について Mutmap 法によって原因となる候補遺伝子を同定した。候補遺伝子について相補性検定の結果、同候補遺伝子が *esp3* 変異の原因遺伝子であることが明らかとなった。同遺伝子はアミノ酸代謝に関する因子をコードしていた。

・ *lcrp* 突然変異(CysR プロラミン減少) (図 3)

low level of cysteine-rich proteins (lcrp) 変異体では CysR プロラミンと グロブリンが減少する。*lcrp* 変異の原因となる因子の同定と CysR タンパク質のプロテインボディ形成に果たす役割を明らかにするために *lcrp* 変異体を解析した。LCRP 遺伝子の連鎖地図を構築した結果、同遺伝子を 4.3cM の領域内に絞り込んだ。同領域内に予測された遺伝子の内、Os01g0874900 において一塩基多型が認められた。Os01g0874900 は Serine hydroxymethyltransferase4 (SHMT4) をコードする。複数の *lcrp* 同座変異体のゲノム塩基配列解析の結果、いずれの系統においても Os01g0874900 がコードする推定アミノ酸に置換やスプライシング部位の塩基置換が生じていた。この結果は SHMT4 が *lcrp* 変異の原因遺伝子であることを示している。SHMT4 はアミノ酸代謝において可逆的にセリン残基をグリシン残基に変換する反応を触媒する酵素であり、一炭素基の代謝を行う細胞内での重要な役割を有する。*lcrp* 変異種子では L-セリン残基、グリシン残基、及びメチオニン残基が野生型と比べて有意に増加していた。野生型種子では CysP プロラミンと CysR プロラミンを集積する PB-I が観察されるが、*lcrp* 変異種子では CysP

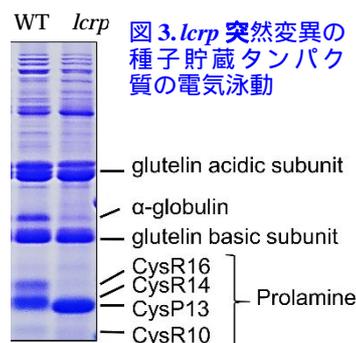


図 3. *lcrp* 突然変異の種子貯蔵タンパク質の電気泳動

プロラミンを集積する PB-I が観察されるが、*lcrp* 変異種子では CysP プロラミンのみを集積する PB-I が観察された(図 4)。これらの結果から、SHMT4 は CysR プロラミンの合成に関与すること、CysR プロラミンは PB の形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

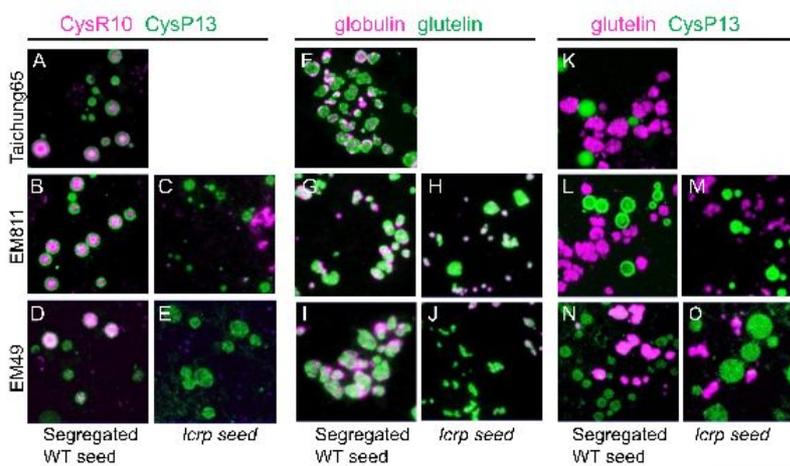


図 4. *lcrp* 突然変異種子の二重免疫蛍光顕微鏡観察
貯蔵タンパク質のプロテインボディへの集積状況
特異抗体によって免疫した PB をローダミンと FITC によって可視化

グルテリン前駆体の小胞体からの小胞輸送機構解明

・ *glup7* 突然変異 (図 5)

グルテリン前駆体の小胞体からゴルジ体への輸送に関与する因子の突然変異と推定している *glup7* 変異について、Mutmap 解析により原因となる候補遺伝子を検出した。候補遺伝子について相補性検定の結果、同候補遺伝子が *glup7* 変異の原因遺伝子であることが明らかとなった。同遺伝子はグルテリン前駆体の小胞体からゴルジ体への輸送に関与すると考えられる因子をコードしていた。

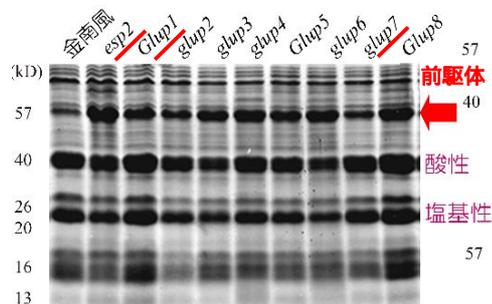


図 5. グルテリン前駆体を集積する突然変異の種子貯蔵タンパク質の電気泳動

・ *Glup1* 突然変異 (図 5)

グルテリン前駆体のゴルジ体から貯蔵型液胞への輸送に関与する因子の突然変異と推定している *Glup1* 変異について、Mutmap 解析により原因となる候補遺伝子を検出した。同候補遺伝子による相補性検定を実施中である。

小胞体タンパク質と澱粉合成代謝制御との関連性解明

登熟種子における澱粉合成関連酵素を解析した。澱粉合成酵素 (Starch synthase: SS)、デンプン枝造り酵素(Starch branching enzyme: BE)、デンプン枝切酵素(Debranching enzyme: DBE)について、Native-PAGE による活性染色と各特異抗体による免疫ブロッティング解析を実施した。その結果、いずれの突然変異体においても、酵素活性やタンパク質量について野生型と有意差は認められなかった。澱粉特性については完熟種子におけるアミロペクチンの鎖長分布を解析したが、いずれの変異体においても野生型と有意差は認められなかった。

小胞体タンパク質変異によるコメの加工適性の向上

小胞体内でタンパク質分子のシステイン残基間のジスルフィド結合を触媒する酵素 Protein disulfide isomerase like 1-1 (PDIL1-1)の欠失突然変異 (*esp2* 変異) はグルテリン前駆体を小胞体内に異常蓄積する (図 6)。さらに同変異の米粉より製造したパンは良質の製パン特性を有する。*esp2* 変異を良食味水稻品種「コシヒカリ」(K)と多収性水稻品種「オオナリ」(O)に導入した系統を作出した。その結果、「コシヒカリ-*esp2*」系統(Ke)において、米粉パン、米麺、スポンジケーキへの加工特性は優れていたが、「オオナリ-*esp2*」系統(Oe)では良好な加工特性を示さなかった。「コシヒカリ-*esp2*」系統と「オオナリ-*esp2*」系統種子の外観品質は「コシヒカリ」と「オオナリ」と大差なかった (図 7)。



図 7. *esp2* 突然変異体の種子外観

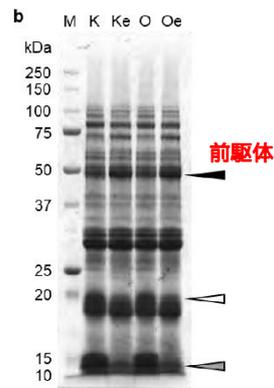


図 6. *esp2* 突然変異体の種子貯蔵タンパク質の電気泳動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hiroaki Matsusaka, Masako Fukuda, Ammar Elkahdar, Toshihiro Kumamaru	4. 巻 312
2. 論文標題 Serine hydroxymethyltransferase participates in the synthesis of cysteine-rich storage proteins in rice seed.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 111049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2021.111049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kiyosumi Hori, Tomoya Okunishi, Kenji Nakamura, Ken Iijima, Masahiro Hagimoto, Katsuyuki Hayakawa, Koka Shu, Takashi Ikka, Masanori Yamasaki, Yoshinobu Takeuchi, Shota Koyama, Keisuke Ozawa, Yoshimasa Tsujii, Toshiaki Kayano, Takuro Ishii, Toshihiro Kumamaru, Yasushi Kawagoe, Toshio Yamamoto.	4. 巻 15
2. 論文標題 Genetic background negates improvements in rice flour characteristics and food processing properties caused by a mutant allele of the PDIL1-1 seed storage protein gene.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rice	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12284-022-00560-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tian Li, Doroshenk Kelly A., Zhang Laining, Fukuda Masako, Washida Haruhiko, Kumamaru Toshihiro, Okita Thomas	4. 巻 32
2. 論文標題 Zipcode RNA-Binding Proteins and Membrane Trafficking Proteins Cooperate to Transport Glutelin mRNAs in Rice Endosperm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2566 ~ 2581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1105/tpc.20.00111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tian Li, Chou Hong-Li, Fukuda Masako, Kumamaru Toshihiro, Okita Thomas W.	4. 巻 182
2. 論文標題 mRNA Localization in Plant Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 97 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.19.00972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Chou Hong-Li、Tian Li、Fukuda Masako、Kumamaru Toshihiro、Okita Thomas W	4. 巻 60
2. 論文標題 The Role of RNA-Binding Protein OsTudor-SN in Post-Transcriptional Regulation of Seed Storage Proteins and Endosperm Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2193 ~ 2205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 福田真子, 熊丸敏博	4. 巻 31
2. 論文標題 コメ貯蔵タンパク質グルテリンの細胞内輸送機構の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Morphology	6. 最初と最後の頁 31-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chou Hong-Li、Tian Li、Washida Haruhiko、Fukuda Masako、Kumamaru Toshihiro、Okita Thomas W.	4. 巻 284
2. 論文標題 The rice storage protein mRNAs as a model system for RNA localization in higher plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 203 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2019.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Elakhdar Ammar、Ushijima Tomokazu、Fukuda Masako、Yamashiro Noriko、Kawagoe Yasushi、Kumamaru Toshihiro	4. 巻 281
2. 論文標題 Eukaryotic peptide chain release factor 1 participates in translation termination of specific cysteine-poor prolamines in rice endosperm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 223 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2018.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tran Hong Quan, Hiroaki Matsusaka, Tomokazu Ushijima, Takahiko Kubo, Toshirhiro Kumamaru
2. 発表標題 Identification of genomic region harboring Endosperm Storage Protein (ESP) 3 gene regulating the Cysteine-rich prolamine by MutMap
3. 学会等名 日本育種学会第14回九州育種談話会,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masako Fukuda, Toshihiro Kumamaru, Thomas W. Okita
2. 発表標題 GOT1B is required for localization of storage protein RNA and for export of proglutelin from ER
3. 学会等名 American Society of Plant Biologist (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田真子, 松坂弘明, 長嶺愛, 熊丸敏博
2. 発表標題 Serine hydroxymethyltransferase (SHMT)はイネ種子のシステイン高含有貯蔵タンパク質の合成に関与する
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保 貴彦, 山形 悦透, 松坂 弘明, 佐藤 豊, 熊丸 敏博
2. 発表標題 イネ変異体オンラインスクリーニングシステムの構築と公開,
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lin T., T. Nakamura, T. Kumamaru, T. Kubo
2. 発表標題 Identification of a causal gene controlling floury endosperm in rice
3. 学会等名 日本育種学会第16回九州育種談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Elakhdar A, T. Ushijima, M. Fukuda, N. Yamashiro, Y. Kawagoe, T. Kumamaru.
2. 発表標題 The translation termination factor eRF1 protein is essential for the accumulation of specific cyatein-poor prolamines in rice endosperm
3. 学会等名 Annual WSU (Washington State University) Plant Science Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田真子, 松坂弘明, 長嶺愛, 熊丸敏博
2. 発表標題 Serine hydroxymethyltransferase (SHMT)はイネ種子のシステイン高含有貯蔵タンパク質の合成に関与する
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村哲洋, Tho Nguyen, 久保貴彦, 熊丸敏博
2. 発表標題 超軟質米の作出に向けた Isoamylase 1 活性低下変異の単離および解析
3. 学会等名 日本育種学会第14回九州育種談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tran Hong Quan, Hiroaki Matsusaka, Tomokazu Ushijima, Takahiko Kubo, Toshirhiro Kumamaru
2. 発表標題 Identification of genomic region harboring Endosperm Storage Protein (ESP) 3 gene regulating the Cysteine-rich prolamine by MutMap.
3. 学会等名 日本育種学会第14回九州育種談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masako Fukuda, Toshihiro Kumamaru, Thomas W. Okita
2. 発表標題 GOT1B is required for localization of storage protein RNA and for export of proglutelin from ER
3. 学会等名 American Society of Plant Biologist, Plant Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村敏貴, 小林奈通子, グエンタンハオ, 石川亮, 且原真木, 田野井慶太郎, 松坂弘明, 熊丸敏博
2. 発表標題 イネのTILLING 変異系統を用いたOsHKT1;4 Na ⁺ 輸送体の塩ストレス下における生理機能の解明
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田真子, 熊丸敏博, Thomas W. Okita
2. 発表標題 Golgi Transport 1 (GOT1B)は貯蔵タンパク質RNAの特定小胞体領域への局在及びグルテリンと -グロブリンの小胞体からの効率的な輸送に必要である
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 グエン ティ フォング トー, 中村 哲洋, 熊丸 敏博, 久保 貴彦
2. 発表標題 Characterization of a new gene involved in starch metabolism of rice
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永松 志朗, 和田 卓也, 松島 良, 藤田 直子, 三浦 聡子, クロフツ 尚子, 保坂 優子, 熊丸 敏博
2. 発表標題 イネデンプン構造変異系統の胚乳特性解析および原因遺伝子探索
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田卓也, 松島良, 藤田直子, 三浦聡子, クロフツ尚子, 保坂優子, 永松志朗, 熊丸敏博
2. 発表標題 難消化性澱粉を保有するイネ澱粉構造変異系統の胚乳特性解析
3. 学会等名 第68回日本応用糖質科学学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学研究者情報 (熊丸敏博) https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001628/research.html 九州大学農学研究院 植物遺伝子資源分野 http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/pgf/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保 貴彦 (Kubo Takahiko) (00370148)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	牛島 智一 (Ushijima Tomokazu) (50815058)	摂南大学・農学部・講師 (34428)	
研究分担者	藤田 直子 (Fujjita Naoko) (90315599)	秋田県立大学・生物資源科学部・教授 (21401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ワシントン州立大学			