

平成22年 6月16日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780069
 研究課題名 (和文) 種子形成における胚乳分化・糖代謝を制御するリン酸化タンパク質の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of phosphoprotein to control endosperm formation and sugar metabolism in plant seed.
 研究代表者
 濱田 茂樹 (HAMADA SHIGEKI)
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所米品質研究チーム・任期付研究員
 研究者番号：90418608

研究成果の概要 (和文)：本研究では、登熟種子におけるリン酸化タンパク質、リン酸化酵素の同定および機能解析を行なった。インゲンマメ登熟種子より、5種のプロテインキナーゼと、カルシウムセンサープロテインである2種の calcineurin B-like protein 遺伝子を単離し、yeast two-hybrid system によってこれらタンパク質の相互作用解析した。その結果、知見の少ないマメ登熟種子中にもリン酸化制御機構が存在することを示した。イネ登熟種子よりリン酸化タンパク質として、Heat shock protein 82 および Nucleoside diphosphate kinase 1 を同定した。欠損変異体の解析や遺伝子発現解析から、これらタンパク質がデンプン合成をはじめとする貯蔵物質の生合成に関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Protein phosphorylation plays a key regulatory role in a variety of cellular processes. To better understand the function of protein phosphorylation in seed maturation, I employed a PCR-based cloning method and isolated five cDNA clones (*pvcipk1-5*) for protein kinases and two cDNA clones (*pvcbl1* and 2) for CBLs from a cDNA library prepared from immature seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Yeast two-hybrid assay indicated that among the five PvCIPKs, only PvCIPK1 interacts with both PvCBL1 and PvCBL2. These results suggest that calcium-dependent protein phosphorylation-signaling via CBL-CIPK complexes occurs during seed development. Furthermore I identified heat shock protein 82 (Hsp82) and nucleoside diphosphate kinase 1 (NDPK1) as phosphoproteins in rice developing seed. The results of subcellular localization, gene expression and mutant analysis of these proteins indicated that Hsp82 and NDPK1 are involved in starch biosynthesis in plat seed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物生化学

1. 研究開始当初の背景

(1)イネ、トウモロコシなどの種子穀物はわれわれ人類が食するエネルギー源として極めて重要な作物である。昨今のバイオエタノールブームによりその供給は逼迫し、それを飼料とする畜産物の価格高騰にとどまらず、われわれ自身の食糧確保が問題となっている。今後の人口増加に対応しうる植物の生産能力の向上は必須事項である。

(2)デンプンは最も重要な炭水化物資源であり、かつ増大する工業的利用価値から、多くの研究分野においてその生合成機構の解明はきわめて重要である。また貯蔵器官である種子、特に胚乳組織の形成メカニズム解明も物質生産増大の観点から必須である。

(3)デンプン生合成にも複数の制御機構が存在すると考えられ、生合成制御因子という点での研究は皆無である。近年のタンパク質解析技術の進歩により、世界的にはデンプン生合成に関する網羅的なプロテオミクス解析が進められつつあるが、実際に機能する新規タンパク質の同定および機能解析には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、植物種子における貯蔵物質の質および量的変化を目指した分子育種を可能にするため、貯蔵器官の形成および糖代謝の制御機構解明を目的としている。特に、タンパク質のリン酸化修飾に着目し、リン酸化による酵素群の機能変換が種子形成に及ぼす影響を探る。

3. 研究の方法

(1)インゲンマメ由来プロテインキナーゼの同定

インゲンマメの登熟初期、登熟中期、登熟後期種子および完熟種子にそれぞれ3倍量の緩衝液を加え、ポリトロンで破碎した。上清を回収し、Q Sepharose FFに供することで部分精製を行った。SDS-PAGEによりタンパク質を分離した後、ゲル上のリン酸化タンパク質をPro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Pro-Q, Molecular Probes)を用いて検出し、N末端アミノ酸配列の解析を行った。

インゲンマメ protein kinase (PvCIPK) および calcineurin B-like protein (PvCBL) cDNAを単離するため、登熟種子より調製したcDNAライブラリーからのスクリーニングを行った。陽性クローンについては、塩基配列を確認し、同源性検索および一次構造の多重

整列は、BLAST および ClustalW (Version 1.83, BLOSUM62) を使用した。

(2)プロテインキナーゼのタンパク質間相互作用および発現解析

酵母ツーハイブリッドアッセイには、ProQuest™ Two-Hybrid System (Invitrogen) を用いた。結合活性は、レポーター遺伝子 *URA3* を用いて測定した。SC-Leu-Trp-Ura 寒天培地に接種し、30°C で一晚培養し生育速度の速さで転写活性を測定した。

全 RNA の調製は、各登熟段階の種子からフェノール/SDS 法によって行った。全 RNA を鋳型とし、oligo dT-adaptor primer を用いて逆転写産物を得た。等量の全 RNA から調製した逆転写産物を鋳型とし、RT-PCR を用いて半定量的な遺伝子発現解析を行った。内部標準にはインゲンマメ *actin* (AB067722) を用いた。

(3)イネ登熟種子由来リン酸化タンパク質の同定

イネ登熟種子を二倍量の抽出用緩衝液中で乳棒、乳鉢を用いて押しつぶし、ガーゼで濾過した抽出液を 12,000 g で遠心した。その上清を 0.45 μm のフィルターを通したものをイネ登熟種子中の粗抽出液とした。粗抽出液は、陰イオン交換や疎水カラムクロマトグラフィーに供することで部分精製を進めた。その後、一次元 SDS-PAGE および二次元 SDS-PAGE (2-DE) にサンプルを供した。リン酸化タンパク質の検出には、Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Pro-Q, Molecular Probes) を用いた。検出されたタンパク質は、MALDI-TOF MS により解析し、マススペクトルをもとに PMF (peptid mass fingerprinting) 法でデータベース検索することでタンパク質を同定した。検索サイトには Protein Prospector (MS-Fit) (<http://prospector.ucsf.edu/>) を用いた。

(4)イネリン酸化タンパク質の細胞内局在性および発現特性

同定したリン酸化タンパク質の遺伝子をクローニングした。イネ登熟種子より調製した全 RNA を鋳型に Oligo-dT primer を用いて逆転写反応を行った。特異的なプライマーを用いた PCR 反応によって得られた増幅断片をクローニングし、塩基配列を確認した。これをもとに、細胞内局在性解析用のベクターを構築した。標的タンパク質の C 末端側に GFP を連結させ、タマネギ表皮細胞およびイネプロトプラストに導入した。遺伝子導

入は、パーティクルガン法を用い、形質転換細胞は蛍光顕微鏡を用いて観察された。

発現解析は、RT-PCR 法による半定量解析およびノーザンブロット解析によって行った。RT-PCR 法は、上述のインゲンマメと同様に、イネ登熟種子より調製した全 RNA を鋳型とし、内部標準にはユビキチン遺伝子を用いた。ノーザンブロット解析は、DIG で標識されたプローブを作製し、登熟種子から調製した 20 μg の全 RNA をブロッティングしたナイロン膜とハイブリダイゼーションを行った。

(5)欠損変異株を用いた解析

同定したリン酸化タンパク質について、データベースを用いた TOS ミュータントの検索を行った (<http://tos.nias.affrc.go.jp>)。欠損変異体の種子を入手し、人工気象器内で生育させた。生育条件は、室温 30°C、湿度 60%、光量 530 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、明期 10.5 時間で行った。葉を採種し、PCR 法による genotype の解析を行った。また、明期 10.5 時間後の葉をエタノールで脱色後、ヨウ素溶液に浸すことで、葉内の同化デンプン蓄積を観察した。

4. 研究成果

(1)インゲンマメ登熟種子由来リン酸化タンパク質

インゲンマメ種子中から抽出したタンパク質を Q-Sepharose FF カラムクロマトグラフィーに供した後、0.1—0.5 M NaCl で段階的に溶出した各画分の SDS-PAGE の結果、図 1 に示された (a)~(g) リン酸化タンパク質が検出された。

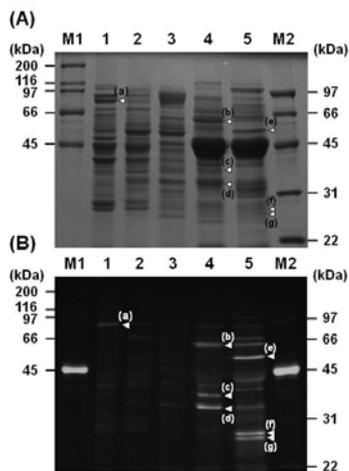


図1 インゲンマメ登熟種子由来リン酸化タンパク質 (A) CBB 染色 (B) Pro-Q 染色

(c)以外のバンドについて N 末端アミノ酸解析を行った結果、(a)および(b)は、N 末端がブロックされており解析できなかった。(d)の N 末端は、ATETSFIIIDAFNKTN で、 α -amylase inhibitor、(e)は、KVFFEERFEDGGEN で

calreticulin、(f)および(g)は、MLVYQDLLTG で、translationally controlled tumor protein と同定された。

(2)インゲンマメ登熟種子由来 PvCIPK および PvCBL の単離

① PvCIPK cDNA 全塩基配列の解析

インゲンマメ登熟中期種子 cDNA ライブラリーよりスクリーニングされた陽性クローンから、PCR によって protein kinase をコードすると考えられる 5 種の cDNA (PvCIPK1, PvCIPK2, PvCIPK3, PvCIPK4 および PvCIPK5) をクローニングした。いずれも、推定アミノ酸配列の相同性検索により、植物由来 protein kinase が高いスコア (67% 以上の同一性) でヒットしたことから、5 種の cDNA はいずれも protein kinase をコードすることが示唆された。PvCIPK1—PvCIPK5 の塩基配列から推定された一次配列を比較した。多重配列をもとに各アイソザイム間の同一性および類似性を算出したところ、全体として 43% (68%) 以上の同一性 (類似性) を示した。中でも PvCIPK2 と PvCIPK5 との同一性 (類似性) は 80% (90%) と非常に高く、機能も類似していると推測された。

protein kinase は N 末端側がリン酸化能を有する触媒領域、C 末端側がその活性を調節する調節領域とされている。PvCIPK アイソザイムのアミノ酸配列を比較した結果、N 末端側の触媒領域には極めて高い類似性 (78% 以上) が見られた。また、いずれの PvCIPK にも、protein kinase の触媒残基や構造の安定化に重要な残基などが保存されており、protein kinase としての機能を有すると考えられた。一方、C 末端側の調節領域の類似性は、触媒領域に比べると低く、異なる調節を受けると考えられた。しかし、いずれの PvCIPK にも Asn, Ala, Phe が必須の NAF モチーフが存在した。NAF モチーフをもつ protein kinase は、この領域に結合するカルシウムシグナル伝達タンパク質 calcineurin B-like protein (CBL) により活性制御を受けることが知られている。これらのことから、クローニングされた PvCIPK はいずれも protein kinase としてのリン酸化能をもち、NAF モチーフを介して CBL により異なる調節を受けることが示唆された。

PvCIPK1—PvCIPK5 の推定一次構造を、これまでに報告されている SNF (sucrose nonfermenting) 1-related kinase [SnRK] に属する protein kinase の一次構造とともに系統樹を作製した (図 2)。全ての PvCIPK は、コムギ (WPK4)、シロイヌナズナ (AtCIPK1—4, 24)、イネ (OsCK1)、エンドウ (PsCIPK) 由来の protein kinase などと共に SnRK3 に分類された。

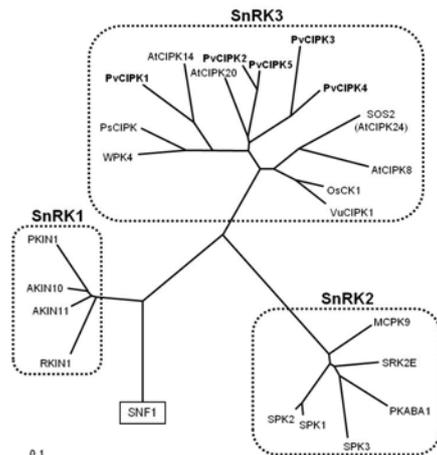


図2 インゲンマメ登熟種子由来 protein kinase (PvCIPKs)の系統樹

②PvCBL cDNA の全塩基配列の解析

cDNA ライブラリーからスクリーニングを行ったところ、2種の CBL 遺伝子が単離出来た。PvCBL1, PvCBL2 および PsCBL の一次配列を整列し、比較した。多重配列をもとに PvCBL1 および PvCBL2 間の同一性および類似性を算出したところ、93% (96%) の同一性 (類似性) を示した。また、PvCBL1 および PvCBL2 は PsCBL との相同性が極めて高く、同一性 (類似性) はそれぞれ 98% (99%), 93% (97%) であった。PvCBL1 は PvCBL2 よりも PsCBL との類似性が極めて高く、PvCBL1 がインゲンマメにおいて PsCBL と同様の機能をもつことが示唆された。

(3)PvCIPK および PvCBL の発現特性と相互作用の解析

本研究では、より感度の高い RT-PCR 法によって比較した (図3)。全ての遺伝子は葉において顕著に発現していた。また、登熟種子においても登熟初期、登熟中期の発現が認められた。PvCIPK1 および PvCIPK2 遺伝子の発現量は、葉および登熟初期において同等の高い発現が認められた。登熟中期から完熟期にかけても発現していたが、その発現量は極端に減少していた。PvCIPK3 遺伝子は登熟初期で顕著に発現しており、登熟中期では減少していた。また、葉でも登熟中期と同等に発現していた。登熟後期および完熟期の発現は認められなかった。PvCIPK4 遺伝子は主に葉で発現していた。登熟初期から中期にかけての発現も確認できたが、発現量は極めて低く、登熟後期および完熟期の発現は認められなかった。PvCIPK5 遺伝子は葉で強く発現していた。登熟種子および完熟種子においても発現が認められた。発現パターンは PvCIPK1 および PvCIPK2 遺伝子と類似しており、登熟初期から完熟期にかけて減少していた。PvCBL1 および PvCBL2 遺伝子は葉での発現が最も高かった。登熟初期から完熟

期にかけての発現は PvCBL2 遺伝子では減少傾向であり、PvCIPK1, PvCIPK2, PvCIPK5 遺伝子にみられる発現パターンを示した。一方 PvCBL1 遺伝子は登熟初期から完熟期にかけて恒常的に発現しており、PvCIPK 遺伝子および PvCBL2 遺伝子と異なる発現パターンを示した。

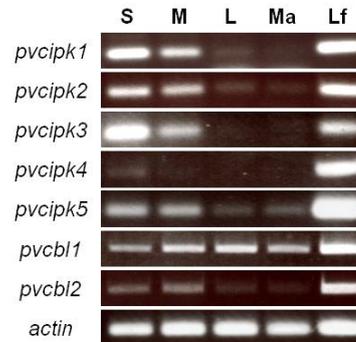


図3 RT-PCR 法による PvCIPKs の発現解析
S:登熟初期, M:登熟中期, L:登熟後期, Ma:完熟, Lf:葉

本研究で単離した5種の PvCIPK と2種の PvCBL が相互作用するか否かを、酵母ツーハイブリッド法により調べた。その結果、PvCIPK1 と PvCBL1 および PvCBL2 が *in vitro* で相互作用することが示された。特に、PvCIPK1 と PvCBL1 の結合力の強いことが明らかとなった (図4)。

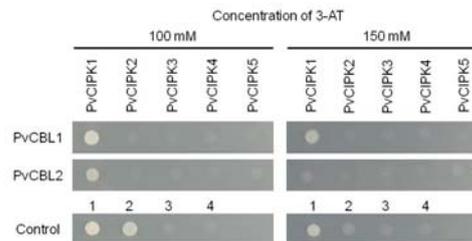


図4 Two-Hybrid System による相互作用解析

(4)イネ登熟種子由来リン酸化タンパク質の同定

イネ登熟種子中のリン酸化タンパク質を Pro-Q 染色によって検出を行った。

MALDI-TOF MS により解析した結果、nucleoside diphosphate kinase (NDPK1), GSH-dependent dehydroascorvate reductase 1, Heat shock protein 82 (Hsp82), Sucrose synthase 1 (SUS1), 14-3-3 like protein, Eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A), RNA binding protein 120 (Rp120) の7種類のリン酸化タンパク質が同定された。存在量やリン酸化の度合いから Hsp82 および NDPK1 に関してさらに研究を進めた。

(5)イネリン酸化タンパク質の細胞内局在性および発現特性

Hsp82 および NDPK1 の細胞内局在性解析を行った。Hsp82 および NDPK1 とともに細胞全体で GFP 蛍光が確認され、いずれも細胞質に局在しているということが明らかとなった。一方、NDPK1 のアイソザイムである NDPK2, NDPK3 はプラスチドに存在することがわかり、異なる機能を有するものと示唆される (図5および6)。

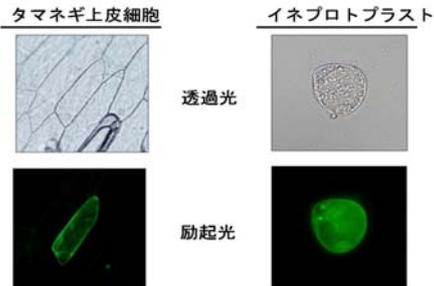


図5 Hsp82 の細胞内局在性解析

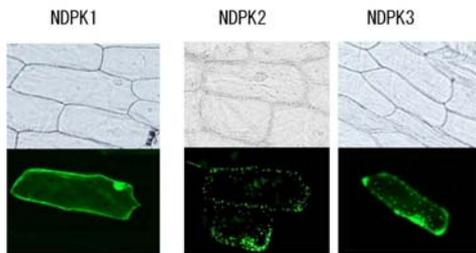


図6 イネ NDPKアイソザイムの細胞内局在

さらに Hsp82 および NDPK1 のスクロース誘導性についてノーザンブロット解析を行った。Hsp82 はわずかながらだが、タンパク質の発現と同様に +Suc 細胞において mRNA の蓄積の増加が見られた。一方、NDPK1 は明らかなスクロース誘導性を示した。また、ともに登熟種子中でも 発現していることがわかった。

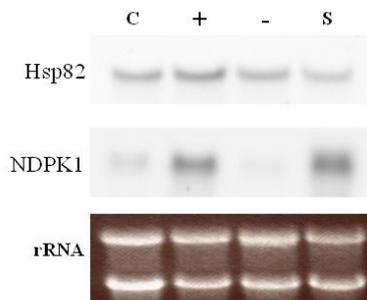


図7 ノーザンブロット解析

C: standard culture condition
+: +sucrose
-: -sucrose
S: developing seed.

(6)欠損変異株を用いた解析

Hsp82 のデータベース検索を行なったところ、図8のようにレトロトランスポゾン (TOS17) が3UTRに挿入されている遺伝子破壊系統が見つかった。生育させた植物体はす

べてヘテロ、あるいは野生型であり、ミュータントホモ型は存在しなかった。Hsp82 を欠失したミュータントホモは致死であり、ヘテロ体を生育した場合でも、極めて念性が低いこともわかった。結実しない多くの種子は乳熟期の過程で、透明な液体を種子に溜めていたこのことから、デンプン生合成が正常に行なわれていないことが予想された。

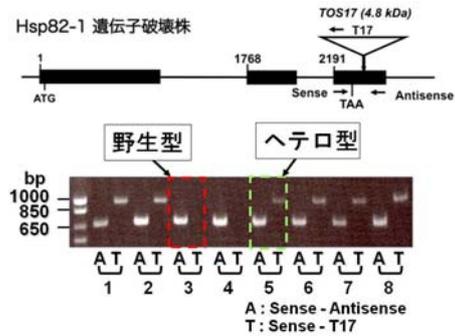


図8 Hsp82 遺伝子破壊株の解析

そこで、デンプン生合成が正常に行なわれているかを確認するために、ヘテロ型の野生型の植物体の葉における同化デンプンの蓄積を確認した。その結果、変異株は野生型と比べて明らかにデンプンの蓄積量が低下していることがわかった。この結果は Hsp82 がデンプンの生合成に関与しているということが示唆された。

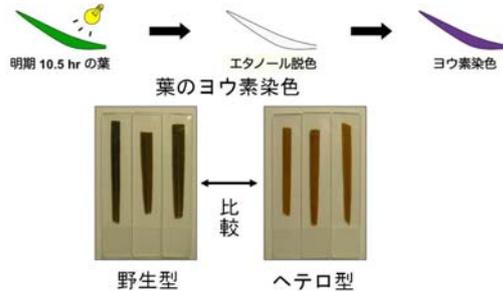


図9 Hsp82 遺伝子破壊株の葉における同化デンプンの蓄積

NDPK1 に関しては、同様な欠損変異株が得られず、現在アンチセンス法、あるいは RNAi 法を用いて変異体作製を試みている。

デンプン生合成の調節因子はまだまだ不明な点が多いが、今回の結果はデンプン生合成量の制御機構解明に新たな展開を与えるものである。今後、更に生体内での機能が明らかにされていくものと期待している。

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4件)

①Wang, C., Washida, H., Crofts, A.J., Hamada

S., Katsube-Tanaka, T., Kim, D., Choi, S.B., Modi, M., Shigh, S., and Okita, T.W.: The cytoplasmic-localized, cytoskeletal-associated RNA binding protein OsTudor-SN: evidence for an essential role in storage protein RNA transport and localization. *Plant J.*, **55** (3), 443-454 (2008).

②Seto, Y., Hamada, S., Matsuura, H., Satou, C., Masuta, C., Matsushige, M., Takahashi, K., Ito, H., Matsui, H., and Nabeta, K.: Metabolism of tuberonic acid (12-hydroxyjasmonic acid) in plants: Purification and characterization of tuberonic acid glucosyltransferase activated by wounding stress. *Phytochemistry*, **70** (3), 370-379 (2009).

③Hamada, S., Seiki, Y., Watanabe, K., Ozeki, T., Matsui, H., and Ito, H.: Expression and identification of the CBLs and CIPKs from immature seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytochemistry*, **70** (4), 501-507 (2009).

④Washida, H., Sugino, A., Kaneko, S., Crofts, N., Sakulsingharoj, C., Kim, D., Choi, S.B., Hamada, S., Ogawa, M., Wang, C., Esen, A., Higgins, T.J., and Okita, T.W.: Identification of cis-localization elements of the maize 10 kD delta-zein and their use in the targeting RNAs to specific cortical ER subdomains. *Plant J.*, **60** (1), 146-155 (2009).

[学会発表] (計9件)

①瀬戸義哉, 濱田茂樹, 松浦英幸, 松重真奈, 佐藤千鶴, 高橋公咲, 増田税, 伊藤博之, 松井博和, 鍋田憲助: ツペロン酸グルコシルトランスフェラーゼの精製とその生理的作用に関する研究. 植物化学調節学会第43回大会(つくば市)

②長屋裕之, 濱田茂樹, 伊藤浩之, 松井博和: イネ登熟種子中におけるリン酸化タンパク質の同定; Hsp82 遺伝子のクローニングと機能解析. 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)

③和久田真司, 濱田茂樹, 松井博和, 瀬戸義哉, 松浦英幸, 鍋田憲助, 伊藤浩之: イネ由来ツペロン酸グルコシドグルコシダーゼの精製および諸性質の解析. 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)

④瀬戸義哉, 松浦英幸, 濱田茂樹, 高橋公咲, 鍋田憲助: UDP-glucose 非依存型ツペロン酸グルコシルトランスフェラーゼの精製, 同定. 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)

⑤渡辺和弘, 濱田茂樹, 伊藤浩之, 松井博和: プラスチドタンパク質の輸送因子同定を目指した変異体植物の作成. 日本農芸化学会北海道支部 平成21年度第一回合同学術講演会(札幌)

⑥濱田茂樹, 長屋裕之, 木原明彦, 伊藤浩之, 松井博和: イネ登熟種子由来リン酸化タンパ

ク質 Hsp82 および NDPK1 の発現特性. 日本応用糖質科学会2009年度大会(弘前)

⑦和久田真司, 濱田茂樹, 伊藤浩之, 松浦英幸, 鍋田憲助, 松井博和: ツペロン酸グルコシドグルコシダーゼの酵素学的諸性質の解明および遺伝子の同定. 日本応用糖質科学会 2009年度大会(弘前)

⑧鷺田治彦, 杉野彩, N. Crofts, A. Crofts, T. Okita, 小川雅広, 濱田茂樹: トウモロコシゼインの細胞内 RNA 局在に関するシス制御配列の解析と RNA 局在を利用したイネ胚乳細胞におけるタンパク質局在および蓄積量制御の試み. 日本育種学会第116回講演会2009年秋季(札幌)

⑨和久田真司, 濱田茂樹, 伊藤浩之, 松浦英幸, 鍋田憲助, 今井亮三, 松井博和: ツペロン酸グルコシドグルコシダーゼアイソザイム間の酵素学的諸性質の比較. 第51回日本植物生理学会年会 2010 年度大会(熊本)

[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

取得年月日:

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]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 茂樹 (HAMADA SHIGEKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所米品質研究チーム・任期付研究員

研究者番号: 90418608

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし