

平成22年 6月 3日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20880013  
 研究課題名（和文）種子貯蔵物質の高蓄積に関わる転写活性化機構の解明  
 一分子農業の基礎的研究  
 研究課題名（英文）Studies on transcriptional activation of genes involving synthesis of seed storage components.  
 研究代表者  
 山本 将之（YAMAMOTO MASAYUKI）  
 富山大学・大学院理工学研究部（理学）・助教  
 研究者番号：10456402

研究成果の概要(和文):本研究ではタイプの異なる種子貯蔵物質のタンパク質と油脂について、イネとゴマを用いて種子特異的な高蓄積に関わる転写活性化機構を調査した。その結果、イネの種子貯蔵タンパク質遺伝子の高発現は、少なくとも2種の転写因子間の相互作用が関与すること、加えて、両転写因子は貯蔵油脂や貯蔵デンプンの蓄積にも関与することも明らかとなった。また、ほとんど知見の得られていなかった、ゴマの貯蔵油脂生合成系遺伝子の発現解析に必要な遺伝子群の単離、解析を行った。

研究成果の概要(英文): In this study, the expression mechanism of genes involving synthesis of seed storage proteins and lipids was examined. I report that combinatorial interaction of two rice transcriptional factors activate the transcription of many rice seed storage protein genes and indirectly regulate starch and lipid content. In addition, I isolated and characterized of genes involving synthesis of sesame seed storage lipids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,460,000	738,000	3,198,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：種子貯蔵物質、転写因子、発現制御、イネ、ゴマ、バイオリクター

## 1. 研究開始当初の背景

植物の種子に貯蔵されるタンパク質や油脂などの種子貯蔵物質は、人類の食糧として、また家畜飼料としても重要な資源である。加えて、種子貯蔵物質は種子特異的に多量に蓄積することから、植物における有用物質生産システムの開発（分子農業）の面からも注目

されている。一般に、高等植物においても遺伝子の発現レベルは、第一義的には転写段階で制御されている。種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現制御機構は、穀類やシロイヌナズナで知見が集積されているが、その全容は明らかとはなっていない。また、貯蔵油脂の生合成に関わる遺伝子の転写制御に関する知見

は極めて限られている。

本研究では、タイプの異なる種子貯蔵物質であるタンパク質と油脂のそれぞれに関して、種子での高蓄積に関わる転写活性化機構の解明を試みた。まず、すでに有用物質の生産系として利用されつつある、(1)イネ種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現に関与する転写活性化因子の機能解析を行った。次に、(2)油糧作物であるゴマを材料として、まだ未解明の部分の多い貯蔵油脂生合成系遺伝子の転写活性化機構について調査した。

## 2. 研究の目的

### (1) イネ種子における貯蔵タンパク質遺伝子の高蓄積に関わる転写活性化機構の解明

イネの種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現には、少なくとも2種の転写活性化因子(RISBZ1とRPBF)が相乗的に作用することが、*in vitro*の実験系や培養細胞を用いた研究によって明らかとなっている。

本研究ではイネ種子貯蔵タンパク質遺伝子の転写制御に関する更なる知見を得るために、以下の実験を行った。①RISBZ1とRPBFの発現抑制株を作出し、*in vivo*での両転写活性化因子の役割を調査した。RISBZ1とRPBFの相乗的な転写活性化作用に関する知見を得るために、②未同定であったRPBFの転写活性化ドメインの同定を行った。

### (2) ゴマ種子における貯蔵油脂の高集積に関わる転写活性化機構の解析

貯蔵油脂生合成系遺伝子の発現制御に関わる転写活性化因子の知見は、種子貯蔵タンパク質遺伝子と比べて少ない。

本研究では、他の油糧種子に比べて極めて高い含油率(種子重量の約50%)を示すゴマ種子における、貯蔵油脂の高集積のメカニズムに関する知見を得るために、以下の研究を行った。まず、①ゴマ種子における油脂の生合成や蓄積に関与する遺伝子のcDNAを単離し、発現パターンを調査を行った。続いて、②クローニングした遺伝子のプロモーター領域を単離し、塩基配列の決定を行い、領域内に含まれるシスエレメントと遺伝子の発現パターンとの間に相関があるか調査した。③ゴマや、モデル植物のシロイヌナズナで貯蔵油脂生合成系遺伝子の転写に関与するとの報告のある転写活性化因子もしくはそのゴマにおける相同遺伝子を単離し、上記②で単離したプロモーター領域に対する転写活性化能を調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) イネ種子における貯蔵タンパク質遺伝子の高蓄積に関わる転写活性化機構の解明

#### ①転写活性化因子の発現抑制株の解析

研究開始時にRISBZ1とRPBFの発現が抑制された形質転換イネを作出していたため、両転写活性化因子の単独抑制株、および両者の交雑に由来する2重発現抑制株を用いて、種子貯蔵タンパク質遺伝子や転写活性化因子遺伝子の遺伝子産物(転写産物、翻訳産物)の蓄積量をRT-PCR法、ウエスタンブロット法により調査した。また、転写活性化因子抑制株の種子中のタンパク質、油脂、デンプン含有量の調査も同時に行った。

#### ②RPBFの転写活性化ドメインの同定

RPBFの転写活性化ドメインを明らかとするために、イネ培養細胞を用いた一過的発現解析により以下の実験を行った。RPBFの一部を欠質させた変異RPBFタンパク質の、種子貯蔵タンパク質遺伝子プロモーター領域に対する転写活性化能の調査を行った。続いて、RPBFタンパク質の一部と、酵母GAL4 DNA結合領域との融合タンパク質の転写活性化能を調査した。

### (2) ゴマ種子における貯蔵油脂の高集積に関わる転写活性化機構の解析

#### ①貯蔵油脂生合成に関わる遺伝子の単離と発現解析

ゴマより種子で発現する貯蔵油脂生合成系遺伝子のcDNAをディジェネレートPCR法により単離した。その後、登熟種子や栄養器官より調製したRNAを用いて、RT-PCR法により発現パターンを調査した。

#### ②貯蔵油脂生合成系遺伝子のプロモーター領域の単離

ゴマはゲノム情報が明らかとされていないため、cDNAの配列を元にしてインバースPCR法により、遺伝子の5'側の未知領域を増幅、単離し、塩基配列の決定を行った。その後、プロモーター領域内に含まれる既報のシスエレメントをデータベースにより解析し、遺伝子の発現パターンとの間に相関がみられるか調査を行った。

#### ③貯蔵油脂生合成系遺伝子の転写に関与する転写活性化因子の単離と機能解析

ゴマの種子より調製したcDNAを用いて、これまでに、種子貯蔵油脂の発現に関与すると報告されていた、ゴマのbHLH型転写活性化因子(SebHLH)のコード域に対応するcDNAおよび、シロイヌナズナのWrinkled1(WRI)とFUSCA3(FUS3)のゴマでの相同遺伝子のcDNAの単離を試みた。その後、単離した転写活性化因子の、貯蔵油脂生合成系遺伝子に対する転写活性化能を、ゴマ子葉を用いた一過的発現解析により調査した。

## 4. 研究成果

### (1) イネ種子における貯蔵タンパク質遺伝

子の高蓄積に関わる転写活性化機構の解明

#### ①転写活性化因子の発現抑制株の解析

RISBZ1、RPBF および両者の発現抑制株における種子貯蔵タンパク質遺伝子の遺伝子産物の調査を行ったところ、ほとんどの遺伝子では、どちらかの転写活性化因子のみが発現低下している単独発現抑制株では転写産物、翻訳産物ともに野生型株と比べて、顕著な差異はみられなかった。その一方で、両者の2重発現抑制株では、ほとんどの種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現は著しく減少していた。また、2重発現抑制株では、貯蔵油脂や貯蔵デンプンも著しく減少しており、種子の形状も異常を示した。このことは、両転写因子の相互作用が種子の正常な発達に必要な必須であり、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現のみならず、少なくとも間接的には貯蔵油脂や貯蔵デンプンの蓄積に関与していることを示している。筆者らが以前行ったイネ培養細胞を用いた一過的発現解析により、RISBZ1 と RPBF は多くの種子貯蔵タンパク質遺伝子の転写活性化に、単独でも関与し、また両者は相乗的に作用することが明らかとなっている。本研究では単独の転写活性化因子抑制株では、RISBZ と RPBF の両者により転写が促進される種子貯蔵タンパク質遺伝子の遺伝子産物の顕著な減少は見られなかったが、RPBF のみで転写が活性化される遺伝子では、RPBF 単独抑制株において遺伝子産物の蓄積量が著しく減少していた。これらを考えあわせると、RISBZ と RPBF の両者により転写が促進される遺伝子（ほとんどの種子貯蔵タンパク質遺伝子）は、野生型では両転写活性化因子の相乗作用により、高発現をしており、単独の転写活性化因子の発現抑制株では、RISBZ1 もしくは RPBF と同じファミリーに属する未同定の転写活性化因子との相互作用（すなわち、RISBZ1-Dof 型因子、もしくは bZIP 型因子-RPBF 間の相乗作用）により発現量が維持されている可能性が高いと考えられる。今後、未同定のこれら転写活性化因子を同定し、解析に加えていくことで、複雑な種子貯蔵タンパク質遺伝子の高発現メカニズムの全容が明らかになると期待される。

#### ②RPBF の転写活性化ドメインの同定

RPBF の転写活性化ドメインの調査を行ったところ、RPBF のC末端側に、比較的離れて存在する、疎水性アミノ酸に富む2つの領域の双方が RPBF の転写活性化に必要なことが明らかとなった。以前の研究により、RISBZ1 の転写活性化ドメインはN末端側のプロリンに富む領域であることが明らかとなっている。今後、これらの転写活性化ドメインに結合するタンパク質を同定していけば、両転写活性化因子の転写活性化機構も明らかとなり、種子貯蔵タンパク質遺伝子の高発現を促す両転写活性化因子の相乗効果の分

子メカニズムに関する知見が得られると考えられる。さらに、未同定の他の転写活性化因子に関しても同様の解析を行うことで、種子貯蔵タンパク質遺伝子の高発現を担う、転写活性化因子間の相互作用の分子メカニズムを明らかにできると期待される。

#### (2) ゴマ種子における貯蔵油脂の高集積に関わる転写活性化機構の解析

##### ①貯蔵油脂生合成に関わる遺伝子の単離と発現解析

ゴマより貯蔵油脂の生合成に関与すると考えられる遺伝子10種の部分配列を単離し、発現パターンを調査した。その結果、すべての遺伝子は登熟種子において発現していることが確認された。

##### ②貯蔵油脂生合成系遺伝子のプロモーター領域の単離

①で単離した遺伝子のうち、4種 (KAS1, SACP1, FAD2, オレオシンタンパク質遺伝子) についてプロモーター領域を決定した。また、これとあわせて6種の種子貯蔵タンパク質遺伝子 (11S グロブリン遺伝子: 11S-1, 11S-2, 11S-3, 11S-4, 2S アルブミン遺伝子: 2S-3, 7S グロブリン遺伝子)、ゴマに含まれる機能性成分のリグナン類 (セサミンなど) の生合成系遺伝子3種 (CYP81Q1, UGT71A9, UGT94D1) とトコフェロール生合成系遺伝子4種 (HGP, MPBQMT, TC,  $\gamma$ -TMT) のプロモーター領域についても決定した。これら遺伝子のプロモーター領域内にみられる既報のシスエレメントと発現パターンとの間に相関が見られるか調査した。その結果、高発現する種子貯蔵タンパク質遺伝子とオレオシンタンパク質遺伝子では、いずれも、RY リピートモチーフと ACGT モチーフが近接して存在していたが、他の遺伝子に関しては、発現パターンとシスエレメントの間に明確な関連性は見られなかった。

##### ③貯蔵油脂生合成系遺伝子の転写に関与する転写活性化因子の単離と機能解析

ゴマで FAD2 遺伝子の転写活性化に関与すると報告されている SebHLH を単離した。また、シロイヌナズナで油脂生合成系遺伝子の発現に関与する WRI1 と FUS3 のゴマの相同遺伝子の単離を試みた。WRI1 に関しては、コード域に対応する cDNA を単離することができた。一方で、FUS3 に関しては単離することができなかった。SebHLH と SeWRI1 の発現パターンを調査したところ、両者とも登熟種子で発現していることが確認できた。ゴマより相同遺伝子が単離できなかった FUS3 に関してはシロイヌナズナより単離し、以降の解析に用いた。

SebHLH, SeWRI1 および FUS3 を用いて、②で単離した種々のプロモーター領域に対する転写活性化能の調査を行ったところ、いず

れの転写活性化因子も多くの貯蔵油脂生合成系遺伝子の発現に関与することが示された。また、これら因子は、機能性成分生合成系遺伝子の転写活性化にも関わっている可能性が示唆された。

本研究により、これまで知見の少なかったゴマ種子に含まれる貯蔵油脂生合成系遺伝子の転写活性化機構を解明する上での基礎的な情報を得ることができた。今後、プロモーター解析を行い、種子での発現を担うシスエレメントの同定を行うとともに、種子で発現する転写活性化因子の単離を進め、解析に供することで、油糧種子の中でも極めて高い含油量を示すゴマ種子における油脂の高集積に関する知見を得ることができると考えられる。加えて、本研究を進める過程で、これまで解析のなされてこなかった、ゴマの機能性成分生合成系遺伝子の転写活性化機構に関する基礎的な情報を得ることもできた。今後は機能性成分生合成系遺伝子に関する解析も進めることで、登熟種子における遺伝子の転写活性化機構の全容が明らかになるものと期待される。

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :

#### 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2件)

① Kawakatsu, T., Yamamoto, M.P., Touno, S.M., Yasuda, H., and Takaiwa, F., Compensation and interaction between RISBZ1 and RPBF during grain filling in rice., The Plant Journal, 査読有, vol 59, 2009, pp. 908-921

② 角谷裕幸、山本将之、増田恭次郎、若杉達也、山田恭司、ゴマ種子に高蓄積する成分の生合成に関わる遺伝子群のプロモーター領域の構造解析、育種学研究、査読無、11 巻別 2、2009、pp. 295

[学会発表] (計1件)

角谷裕幸、ゴマ種子に高蓄積する成分の生合成に関わる遺伝子群のプロモーター領域の構造解析、日本育種学会、2009年9月25日、北海道大学(北海道)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 将之 (YAMAMOTO MASAYUKI)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・  
助教

研究者番号 : 10456402