

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580039

研究課題名(和文) プロテオーム解析によるナス科作物のクロモプラスト分化機能解明

研究課題名(英文) A functional analysis of chromoplast differentiation in Solanaceae using proteome analysis

研究代表者

本橋 令子 (Motohashi, Reiko)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90332296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：クロモプラスト分化に重要なタンパク質を同定する為に、カロテノイドを蓄積しない白トマト、クロロフィルが残っている黒トマトのプラスチドタンパク質の二次元電気泳動のデータと、Micro-Tomのプラスチドタンパク質と比較した。その結果、リポカリンタンパク質、plastid lipid associated protein CHRC, Harpin binding protein 1が大きく白トマト、黒トマトで変動していることが解かった。これらのタンパク質がプラスチド分化に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify important proteins for chromoplast differentiation, we compared the data of plastid proteins of White Tomato (which does not accumulate carotenoid), Black Tomato (whose ripened fruit retains chlorophyll), and Micro-Tom using two-dimensional electrophoresis. Results showed differences in lipocalin protein, plastid lipid associated protein CHRC, and Harpin binding protein 1 in Black Tomato and White Tomato. It is suggested that such proteins are actively participating in chromoplast differentiation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：トマト クロモプラスト プロテオーム プラスチド分化

1. 研究開始当初の背景

2010年2月にトマト全ゲノムのドラフト配列が公開され、トマトがナス科植物研究の重要な基盤になった。我々は、まだ、葉緑体以外のプラスチド研究に関する基盤が十分に整備されていない時期から、シロイヌナズナのプラスチド研究の経験を生かし、急速に技術が発達して来ているプロテオーム解析技術とトマトゲノムリソースを利用し、クロモプラスチドの分化メカニズムの解明を試みている。始めに、トマト果実細胞中に存在するクロモプラスチドに得的なタンパク質を同定するために、未成熟果実ステージの葉緑体と成熟果実ステージのクロモプラスチドの単離方法を確立した。そして、葉緑体からクロモプラスチドへ分化する過程のプラスチドに存在するタンパク質の網羅的解析を試みた。我々は成熟段階の異なるマイクロトム果実の緑、黄、オレンジ、赤の4ステージよりプラスチドの単離し、ショットガンプロテオーム解析を行った。その結果、各ステージより約600タンパク質を同定することができた。また、電子顕微鏡を用いて、各果実成熟ステージのプラスチドの形態を観察し、大きくプラスチドの形態が変化するステージが緑色果実から黄色果実への成熟過程であることを突き止めた。

2. 研究の目的

研究代表者は、葉緑体からクロモプラスチドへの分化に関与するタンパク質を同定するために、成熟段階の異なるマイクロトム果実よりプラスチドを単離し、ショットガンプロテオーム解析により約600のプラスチドタンパク質を同定した。そこで、本研究では、さらにクロモプラスチド分化に関与するタンパク質を絞り込む為に、さまざまな果実色のトマト品種や変異体、パプリカやベルペッパーなどのナス科作物を用いて、プラスチドプロテオームデータを取得する。ナス科作物に共通するタンパク質を探索することにより、クロモプラスチド分化に必須なタンパク質を同定する。また、それら変異体を得、プラスチドの形態を観察することにより、クロモプラスチドへの分化の制御因子を探索することを目的としている。さらに、葉緑体からクロモプラスチドへの分化過程で修飾されるタンパク質を探索し、タンパク質修飾による分化制御の可能性を調べる。

3. 研究の方法

- ・果実色変異体及び白色トマトの原因遺伝子の解析

- ・アレリズムテストの実施

白色トマト：トマト栽培品種 White Beauty は白色果実で、成熟しても果実が白く、さらに成熟が進むと果実は黄色く色づく、エアルーム品種である。同様にエアルーム品種である Great White、White Queen、やや小型の果実の Snow White、Ghost Cherry、Dr. Carolyn

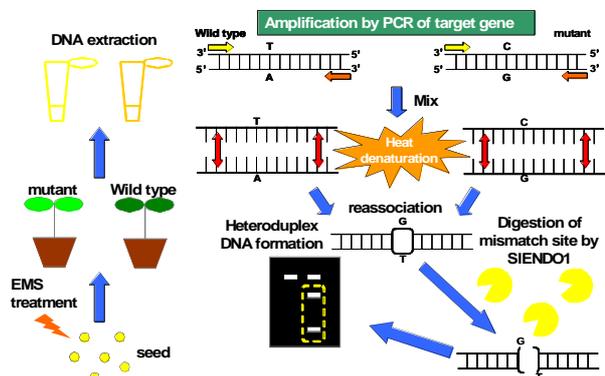
について、白色の原因遺伝子が同じであるか確認した。

マイクロトムの種子を化学変異原 EMS で処理することにより生じたオレンジ色のトマト果実系統 *vo* (*vivid orange mutant*) 変異体を筑波大学より分譲して頂きサンプルとして用いた。

さらに、マイクロトム栽培中に自然突然変異によって得られた *gw* (*ghost white*) 変異体を果実色とプラスチド分化のメカニズムの解明の材料とした。

- ・SIENDO1 酵素法を用いた変異箇所の探索

岡部らによって開発されたエンドヌクレアーゼ SIENDO1 酵素法を用いて、*vo* と *gw* 変異体について点突然変異の位置を調べた(図)。野生型と変異体の DNA を混合しアニーリングさせると、変異箇所にミスマッチが生じ、その部位を SIENDO1 エンドヌクレアーゼが切断し、変異箇所を検出する方法である。



- ・2次元電気泳動

トマト果実よりプラスチドを単離し、タンパク質を TCA/アセトン沈殿、フェノール抽出し、2次元電気泳動に供した。Multiphor (Pharmacia Biotech) を使用し、IPG ドライストリップ 24cm (Immobiline™ DryStrip pH4-7; GE Healthcare Bio-Sciences AB) を用いた等電点電気泳動法により、タンパク質を分離し、その後、SDS-PAGE をおこなった。パリアブルイメージアナライザー Typhoon (GE Healthcare) を使いゲルをスキャンし、Ettan Spot Picker (GE Healthcare) によりタンパク質スポットを回収した。スポット中のタンパク質をゲル内消化し、LC-MS/MS (Nano Frontier eLD 日立ハイテクノロジー) で *de novo* sequencing 法によりタンパク質の質量を測定した。MATRIX SCIENCE の MASCOT MS/MS Ions Search を用いて、タンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

- ・果実色変異体 (*vo* と *gw* 変異体) 及び白色トマトの原因遺伝子の解析

市販の白い果実品種数種類のアレリズムテストを行なったが、すべて同一遺伝子アレルである事が示唆された。この事から、果実色の変異体の原因遺伝子は複数存在せず、限られていることがわかった。

vo 変異体は野生型と比較して花卉や葉の

色が薄く、雄ずいが濃いオレンジ色を呈しており、成熟段階の果実は鮮やかなオレンジ色を示した。電子顕微鏡観察により、*vo* 変異体と野生型のクロモプラストの形態を観察した結果、野生型と比較し *vo* 変異体は、発達した渦巻き構造やカロテノイドが結合すると考えられる電子密度の高い紐状の構造はほとんど見られなかった。次に、HPLC 分析により果実のカロテノイド含有量を調べた結果、野生型と比較し *vo* 変異体ではリコペン蓄積の 97.6%の減少とカロテンの 52%の増加が見られた。これらの結果から *vo* 変異体における変異がクロモプラスト分化やカロテノイド合成へ関与することが示唆された。カロテノイド構成の変化がカロテノイド合成経路の遺伝子発現によるものか調査するために RT-PCR を用いて葉と果実で発現量を調査したが、*vo* 変異体と野生型間に転写レベルで違いは見られなかった。*vo* 変異体のカロテノイド合成経路の遺伝子に点突然変異による翻訳異常が生じていると考えられたため、SIENDO1 酵素を用いて変異箇所を同定した。その結果、カロテノイドイソメラーゼ (*CRTISO*) 遺伝子の 2704 番目の塩基に G T の置換が見られ、173 個目のアミノ酸であるグリシンがストップコドンへと置換するナンセンス突然変異が生じていた。本研究から *CRTISO* 遺伝子内の点突然変異による翻訳異常がカロテノイド合成や植物内の酸化還元状態に影響を与えることにより、オレンジ色の果色やクロモプラストの内部構造の変化を引き起こすことが示唆された。

また、我々は、mature green ステージで白色果実となり、その後赤く果実が着色する 'Micro-Tom' の突然変異体 (*gw: ghost white mutant*) を発見した。光化学系 II の量子収率の測定結果では、開花後 5 日の果実と葉において野生型と *gw* 変異体に差はないが、開花後 25 日の変異体果実では顕著な減少が観察された。また、*gw* 変異体は果実での退緑が野生型に比べ早い、種子数、発芽率、果実の大きさは野生型と同等であった。また、カロテノイド合成関連遺伝子とクロロフィル合成関連遺伝子の発現を RT-PCR により野生型と *gw* 変異体と比較したところ、変異体で *Chromoplast-specific lycopene beta-cyclase* (*CycB*) と *Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase* (*GSA*) の mRNA 量の減少を確認した。そこで、我々は SIENDO1 酵素を用いて *gw* の変異箇所を調べたが、カロテノイド合成遺伝子、クロロフィル合成遺伝子中には、変異箇所は観察されなかった。*gw* 変異体の早期退緑がもたらす影響とプラスチド分化の関係を調べるために、*gw* 変異体と野生型果実のトランスクリプトームとプロテオームデータの比較解析を試みた。トマトオリゴ DNA マイクロアレイを用いて、*gw* 変異体の遺伝子発現について網羅的な解析を試みた結果、表現型の違いが顕著に現れている mature green ステージの方が red ス

テージより発現変動のある遺伝子数が多い事が解った。

・2次元電気泳動を用いたプロテオーム解析
トマト果実は成熟するに従い光合成を行うクロロプラストからカロテノイドを蓄積するクロモプラストに分化する。本研究は、Micro-Tom 果実や白と黒の果実色を持つ Heirloom トマト栽培品種 (White Beauty, Black tomato) を用いて、クロモプラストに特異的なタンパク質を多数同定し、クロモプラストのプロテオームデータを得て、クロモプラスト分化メカニズムの解明、分化の鍵タンパク質の特定を目的としていた。2次元電気泳動法を用いて、トマト果実の成熟に伴い変動するプラスチドタンパク質を同定した。同様に、白や黒の果色系統のクロモプラストプロテオームデータを取得し比較した。その結果、plastid lipid associated protein CHRC、Temperature Induced Lipocalin (TIL) と Harpin binding protein1 に発現量などの違いが観察された。

カロテノイド関連のタンパク質として、プラスチド特異的に存在する plastid lipid associated protein CHRC は、2次元電気泳動で可視化できるほど大量に赤色果実で蓄積していることから、カロテノイド蓄積とクロモプラスト分化に重要な役割を担っているタンパク質であると考えられた。

また、リポカルリタンパク質である TIL がカロテノイド蓄積量やクロモプラスト分化に関与していると考え、リポカルリタンパク質の細胞内局在及び発現について調べた。リポカルリタンパク質の細胞内局在観察の結果、TIL1 と TIL2 が細胞基質と細胞膜に局在していることが観察され、CHL は葉緑体に局在することが観察された。さらに、TIL1 は、果実の成熟するにつれて発現量が増え、TIL2 は調べた各器官で恒常的に発現していることが分かった。さらに、同定したプラスチドタンパク質の機能を解明するために、RNA 干渉 (RNAi) のシステムを用い、発現抑制変異体の作製を試みた。しかし、目的遺伝子を発現抑制できた形質転換体が残念ながら得られなかった。カナマイシンによる形質転換体の選抜が上手くできなかった事が原因と考えられる。

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)

1 Satou M, Enoki H, Oikawa A, Ohta D, Saito K, Hachiya T, Sakakibara H, Kusano M, Fukushima A, Saito K, Kobayashi M, Nagata N, Myouga F, Shinozaki K, Motohashi R. Integrated analysis of transcriptome and metabolome of *Arabidopsis albino or pale green* mutants with disrupted

nuclear-encoded chloroplast proteins.
Plant Mol Biol. 2014 Jul;85(4-5):411-428

2 Choi JH, Ohnishi T, Yamakawa Y, Takeda S, Sekiguchi S, Maruyama W, Yamashita K, Suzuki T, Morita A, Ikka T, Motohashi R, Kiriiwa Y, Tobina H, Asai T, Tokuyama S, Hirai H, Yasuda N, Noguchi K, Asakawa T, Sugiyama S, Kan T, Kawagishi H. The source of "fairy rings": 2-azahypoxanthine and its metabolite found in a novel purine metabolic pathway in plants. Angew Chem Int Ed Engl. 2014 Feb 3;53(6):1552-1555

3 Ma G, Zhang L, Matsuta A, Matsutani K, Yamawaki K, Yahata M, Wahyudi A, Motohashi R, Kato M. Enzymatic formation of β -Citraurin from β -Cryptoxanthin and Zeaxanthin by Carotenoid Cleavage Dioxygenase4 in the Flavedo of Citrus Fruit. Plant Physiol. 2013 163(2):682-695

4 Motohashi R, Rödiger A, Agne B, Baerenfaller K and Baginsky S Common and specific protein accumulation patterns in different albino/pale-green mutants reveals regulon organization at the proteome level. Plant Physiol. 2012 160(4):2189-2201

[学会発表](計 29 件)

1 近藤敬典, 本橋令子, 早期退緑を示す ghost white 突然変異体のトランスクリプトーム、プロテオーム解析
園芸学会平成 26 年度春季大会筑波大学(つくば市) 2014 年 3 月 29,30 日

2 稲葉亮介, Anung Wahyudi, 本橋令子, トマト果実成熟過程におけるリポカリンたんぱく質 (TIL1, TIL2, および CHL) の役割
園芸学会平成 26 年度春季大会筑波大学(つくば市) 2014 年 3 月 29,30 日

3 大門靖史, Jae-Hoon Choi, 河岸洋和, 本橋令子, イネマイクロアレイを用いたフェアリーリング誘起物質による植物生長促進メカニズムの解明
第 5 5 回日本植物生理学会年会富山大学(富山市) 2014 年 3 月 18~20 日

4 岩本耕太郎, 大門靖史, 深沢知加子, Jae-Hoon Choi, 河岸洋和, 本橋令子, シロイヌナズナにおけるフェアリーリング形成化合物 ICA, AHX, AOH への生理反応
第 5 5 回日本植物生理学会年会富山大学(富山市) 2014 年 3 月 18~20 日

5 山崎覚, 鈴木康祐, 明賀史純, 篠崎一雄, 本橋令子, シロイヌナズナの葉緑体リボソ-

ム 30S サブユニット形成における補助因子の機能解析

第 5 5 回日本植物生理学会年会富山大学(富山市) 2014 年 3 月 18~20 日

6 鈴木崇臣, 竹林有理佳, 佐野亮輔, 倉田哲也, 本橋令子, 大谷美沙都, 出村拓, VND7 過剰発現による致死性を抑圧する新規因子の遺伝学的単離

第 5 5 回日本植物生理学会年会富山大学(富山市) 2014 年 3 月 18~20 日

7 橋川博一, 高林佑輔, 萬年一斗, 高橋征司, 本橋令子, 古山種俊, 中山亨, Arabidopsis Response Regulator 14 の生理機能解析

第 5 5 回日本植物生理学会年会富山大学(富山市) 2014 年 3 月 18~20 日

8 川口修治, 飯田慶, 豊島裕美, 本橋令子, 豊田哲郎, 多群条件下での mRNA-Seq を用いた Micro-Tom の De novo トランスクリプト構築
第 3 6 回日本分子生物学会年会神戸ポートピア(神戸市) 2013 年 12 月 3~6 日

9 Reiko Motohashi, Kosuke Suzuki, Mizuho Ichinose, Kazuo Shinozaki, Functional analysis of ribosome assembly cofactors related to 30S ribosome subunits in chloroplast

24th International Conference on Arabidopsis Research ICAR 2013 SYDNEY AUSTRALIA 2013 年 6 月 24~28 日

10 河村 友香子, 関口 周兵, 崔 宰燾, 本橋令子, 河岸 洋和, イネにおける植物成長調節物質の生合成経路に関する化学的研究

日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学(仙台市) 2013 年 3 月 24~28 日

11 崔 宰燾, 山下 起三子, 大西 利幸, 本橋令子, 河岸 洋和, コムラサキシメジが産生するフェアリーリング惹起物質の植物内生に関する化学的研究

日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学(仙台市) 2013 年 3 月 24~28 日

12 高林佑輔, 萬年一斗, 高橋征司, 本橋令子, 古山種俊, 中山亨, Arabidopsis Response Regulator によるイソプレノイド代謝制御機構の解析

第 5 4 回日本植物生理学会年会岡山大学(岡山市) 2013 年 3 月 21~23 日

13 藤野尚人, 杉山圭吾, 名川賢治, 山崎達也, 吉田佐央里, 本橋令子, 高橋征司, 中山亨, キンギョソウにおけるメタボロンを介するフラボノイド生合成に関する研究

第 5 4 回日本植物生理学会年会岡山大学(岡山市) 2013 年 3 月 21~23 日

14 鈴木康祐, 一瀬瑞穂, 明賀史純, 篠崎一雄, 本橋令子, シロイヌナズナの葉緑体 30S リボソームサブユニット形成におけるリボソームコファクターの機能解析
第 54 回日本植物生理学会年会岡山大学(岡山市) 2013 年 3 月 21~23 日

15 佐藤由佳, 藤原誠, 明賀史純, 吉田茂男, 篠崎一雄, 本橋令子, 永田典子, 斑入り突然変異体 *thf1* の異常色素体分布に関する時空間的解析.

37 回日本顕微鏡学会関東支部講演会 2013 年 3 月 6 日, 東京大学 (東京都文京区)

16 本橋令子, The relationship of fruit color to chloroplast development.
JSOL Tomato Workshop 筑波大(茨城圏つくば市) 2013 年 2 月 8,9 日

17 Reiko Motohashi, Anja Rodiger, Birgit Agne, Katja Baerenfaller, Kazuo Shinozaki, Sacha Baginsky, Common and specific protein accumulation patterns in different albino/pale green (apg) mutants reveals regulon organization at the proteome level.
第 35 回日本分子生物学会年会 福岡国際開場 マリンメッセ福岡(博多市) 2012 年 12 月 11~14 日

18 Reiko Motohashi, Jae-Hoon Choi, Hiroyuki Tobina, Takahiro Mine, Chikako Fukazawa, Tomohiro Asakawa, Toshiyuki Kan, Hirokazu Kawagishi, Responses in rice and Arabidopsis to the "fairies" of fairy rings.
10th International congress on Plant Molecular Biology Jeju, Kourea 2012 年 10 月 21~26 日

19 Jae-Hoon Choi, Yasuhiro Yamakawa, Shogo Takeda, Shuhei Sekiguchi, Waki Maruyama, Kimiko Yamashita, Tomohiro Suzuki, Toshiyuki Ohnishi, Akio Morita, Takashi Ikka, Reiko Motohashi, Yoshikazu Kiriwa, Hiroyuki Tobina, Tatsuo Asai, Shinji Tokuyama, Hirofumi Hirai, Nobuhiro Yasuda, Keiichi Noguchi, Tomohiro Asakawa, Toshiyuki Kan, Hirokazu Kawagishi, The "Fairy" of Fairy Ring and its Metabolite Exist in Plants -A Candidate for a New Plant Hormone Family-
10th International congress on Plant Molecular Biology Jeju, Kourea 2012 年 10 月 21~26 日

20 近藤敬典, 切岩祥和, 神谷志織, 林万里奈, 加藤雅也, 岡部佳弘, 浅水恵理香, 江面浩, 本橋令子, 早期退緑を示す Micro-Tom 突然変異体の果実着色異常がもたらす影響について.

園芸学会秋大会 福井県立大学(福井県)2012 年 9 月 22~24 日

21 Reiko Motohashi, Miho Suzuki, Takanori Kondo, Hideo Dohra, Yoshikazu Kiriwa, Chloroplast proteome in Solanaceae.
9th Solanaceae Conference, Neuchatel Swiss 2012 年 8 月 26~30 日

22 佐藤由佳, 小林恵, 澤木史江, 藤原誠, 明賀史純, 吉田茂男, 篠崎一雄, 本橋令子, 永田典子, シロイヌナズナ斑入り突然変異体における異常色素体分布の時空間的解析.
日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会 千葉大(千葉市) 2012 年 5 月 14~16 日

23 五島文子, 齋藤秀之, 本橋令子, 王権, 苗場山ブナ樹冠における光合成特性と生理特性の空間変異.
123回森林学会 宇都宮大学(栃木県宇都宮市) 2012年3月26~29日

24 文順姫, 赤池由佳, 板山俊一, 明賀史純, 篠崎一雄, 永田典子, 本橋令子, シロイヌナズナのアルビノ原因遺伝子 APG11、APG12 機能の解析.
第53回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都市) 2012年3月16~18日

25 金子謙佑, 岡部佳弘, 浅水恵理香, 江面浩, 永田典子, 加藤雅也, 本橋令子, トマトオレンジ果色変異体 *vivid orange (vo)* 変異体の解析.
第53回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都市) 2012年3月16~18日

26 鈴木美穂, 近藤敬典, 高橋祥子, 道羅英夫, 切岩祥和, 加藤雅也, 藤原正幸, 深尾陽一郎, 永田典子, 本橋令子, ナス科植物を用いたクロモプラストプロテオーム解析.
第53回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都市) 2012年3月16~18日

27 Anung Wahyudi, 原亮介, 吉積毅, 松井南, 本橋令子, エンドリデュープリケーションを利用したトマト果実の大型化.
第53回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都市) 2012年3月16~18日

28 Hiromi Toyoshima, Shuji Kawaguchi, Kei Iida, Takanori Kondo, Reiko Motohashi, Tetsuro Toyoda, Improving gene annotations and transcription initiation sites using mRNA-seq data from various tissues and stages of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.
第53回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都市) 2012年3月16~18日

29 Reiko Motohashi, Making bigger seeds in non toxic *Jatropha*(核相増加によるヤトロ

ファ無毒系統の種子の大型化).
5th Meeting of International Society for
Environmental Bio Resources 大阪大学
(大阪市) 2012年3月9日

〔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：
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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 令子 MOTOHASHI, REIKO
静岡大学・農学研究科・教授
研究者番号：90332296

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：