

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658097

研究課題名(和文) イネ種子における脂質合成の分子機構解明によるリピッド高蓄積米の作出

研究課題名(英文) Construction of high lipid content rice by the molecular mechanism analysis of the lipid synthesis in rice seed

研究代表者

増村 威宏 (Takehiro, Masumura)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・講師

研究者番号：50254321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイネ種子において機能性成分を蓄積するアリューロン層を強化することを目的とし、アリューロン層における遺伝子の網羅的発現解析を行い、その中から重要な転写因子や酵素遺伝子を見出し、高発現することによりリピッド高蓄積のイネ種子を作出することを目指した。胚乳分化初期に特異的に発現する転写因子(NFYB)遺伝子を、ユビキチンプロモーター制御下で過剰発現するイネを作出し、種子の形態観察、脂質蓄積量に関する実験を行った。その結果、デンプン性胚乳組織が縮小し種子当りの脂質含量は増加する過剰発現イネが得られた。種子中の貯蔵タンパク質合成部位を減少させることで、脂質合成能を向上させる可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：This study was intended to strengthen the aleurone layer which accumulated functional materials in rice seeds. High-coverage profiling analysis of gene expression in the aleurone layer was performed, and searched for important transcription factors or enzyme genes from the profiling data. The candidate clone was introduced into rice genome to create high content of lipid accumulation in transgenic rice seed.

Under ubiquitin promoter control, the transgenic rice which overexpressed the transcription factor (NFYB) gene which specifically expressed during early differentiation stage of endosperm tissue was created. The seed morphology of the transgenic rice was observed, and lipid content was measured. The starchy endosperm tissues of transgenic seed were reduced, and the lipid contents per seed were increased. We found possibility to improve the lipid synthesis ability by decreasing the site of storage protein synthesis in transgenic seed by this study.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物 遺伝子発現 脂質 イネ種子 アリューロン層 転写因子 脂質合成遺伝子 形質転換イネ

### 1. 研究開始当初の背景

穀類の胚乳形成に関する研究は、胚乳組織における貯蔵デンプン、貯蔵タンパク質合成に関わる遺伝子の器官レベルの解析が主であった。イネ種子の機能性成分の利用に注目が集まっているが、胚乳形成に関する分子機構は未解明の事象が多かった。

### 2. 研究の目的

イネ種子の機能性成分である脂質や有機酸類は、胚芽とアリューロン層に多く蓄積するが、アリューロン層は種子全体の5%未満と少ない。そこで、本研究では機能性成分を蓄積するアリューロン層を増強することを目指した。そのため、胚乳分化を制御し、本来デンプン性胚乳へ分化する組織をアリューロン層に変換すること、アリューロン層において代謝産物の合成経路を強化することが必要だと考えられる。本研究では脂質をモデル系とし、胚乳分化期に特異的な転写因子の発現を制御した上で、アリューロン層における脂質合成の鍵酵素を高発現することにより、リピッド高蓄積のイネ種子を作出することを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでの研究で、胚乳形成初期における組織特異的なトランスクリプトーム解析を行い、胚乳分化に発現する転写因子、および脂質合成経路の重要な遺伝子候補を複数単離した。本研究では、1) 胚乳分化制御を調査するため、単離した転写因子遺伝子を過剰発現するイネを作出し、胚乳組織の形態観察、成分分析を行い、アリューロン層が増大する系統を探索した。2) 胚乳形成初期における組織特異的なトランスクリプトーム解析データを得たので、アリューロン層特異的に発現し、脂質蓄積増加に関与する鍵遺伝子を探索するため、共発現ネットワーク解析を行い、アリューロン層を発達させる転写因子と、貯蔵脂質を増加する合成系酵素をコードする遺伝子の関係性を調査した。

### 4. 研究成果

1) 胚乳分化期特異的転写因子遺伝子を過剰発現するイネの解析 これまでに単離した胚乳分化初期に特異的に発現する転写因子 (NFYB) 遺伝子を、ユビキチンプロモーターの制御下で過剰発現するイネを作出し、胚乳組織と蓄積部位の形態観察、脂質蓄積量の変化に関する実験を行った。その結果、アリューロン層の数に変化は無かったが、デンプン性胚乳組織が縮小し種子当りの脂質含量は増大することが明らかになった。本結果より、種子中の貯蔵タンパク質合成部位を減少させることで、脂質合成能を向上させる可能性が見いだされた。

2) 種子中における脂質合成関連遺伝子群の共発現解析 脂肪酸合成の初発に重要な働きをするACCase遺伝子、アシルACPを転移するGPAT遺伝子、貯蔵脂質合成の最終段階で働くDGAT遺伝子をそれぞれ過剰発現する酵母クローンの解析を進めたが、各酵母における脂質含量については大きな変動は見られず、個々の遺伝子の過剰発現では代謝系全体は動かない可能性が示唆された。そこで、脂質合成時期の遺伝子発現プロファイルを元に脂質合成関連遺伝子群の共発現解析を行った。その結果、イネ種子における貯蔵脂質合成に関わる遺伝子ネットワークが明らかになった。

### 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9件)

1. 増村威宏 (2015) : お米のおいしさ . 化学と教育 , 63, 144-145 (査読無)
2. Naoki Yamamoto, Ai Sasou, Yuhi Saito, Toshio Sugimoto, Takehiro Masumura\* (2015) : Protein and gene expression characteristics of a rice phosphoeno/pyruvate carboxylase *Osppc3*; its unique role for seed cell maturation. Journal of

- Cereal Science, 64, 100-108. (査読有)
3. 増村威宏, 佐生愛, 齋藤雄飛 (2014): イネ種子の電子顕微鏡的解析. 顕微鏡, 49, 211-215. (査読無)
  4. Naoki Yamamoto, Toshio Sugimoto and Takehiro Masumura\* (2014): Concomitant increases of the developing seed phospho*eno*/pyruvate carboxylase activity and the seed protein content of field-grown wheat with nitrogen supply. Agricultural Sciences, 5, 1558-1565. (査読有)
  5. Naoki Yamamoto, Masayuki Shimada, Toshio Sugimoto, Yoshikiyo Oji and Takehiro Masumura\* (2014): Dynamic protein expressions of phospho*eno*/pyruvate carboxylase in developing rice seeds. Journal of Cereal Science, 60, 457-480. (査読有)
  6. Naoki Yamamoto, Tatsuya Kubota, Takehiro Masumura, Naomasa Shiraishi, Kunisuke Tanaka, Toshio Sugimoto and Yoshikiyo Oji (2014): Molecular cloning, gene expression and functional expression of a phospho*eno*/pyruvate carboxylase *Osppc1* in developing rice seeds: implication of involvement in nitrogen accumulation. Seed Science Research, 24, 23-36. (査読有)
  7. 佐生愛, 重光隆成, 増村威宏 (2013): 米タンパク質に適したプロテオーム解析技術の開発. New Food Industry, 55, 16-22. (査読無)
  8. Masaya Kawarada, Yoshihiro Nomura, Taro Harada, Shigeto Morita, Takehiro Masumura, Hiroyasu Yamaguchi, Koji Tanase, Masafumi Yagi, Takashi Onozaki and Shigeru Satoh (2013): Cloning and expression of cDNAs for biosynthesis of very-long-chain fatty acids, the precursors for cuticular wax formation, in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) petals. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 82, 161-169. (査読有)
  9. 重光隆成, 増村威宏 (2012): 米および米加工食品に適用可能なタンパク質分析技術. New Food Industry 54, 1-8. (査読無)
- [学会発表](計9件)
1. Takehiro Masumura, Takanari Shigemitsu, Ai Sasou.: Protein analysis of rice. East Asia Conference on Standardization of Rice Function 2014, Kyoto Research Park, Kyoto 10 - 12 December 2014
  2. Naoki Yamamoto, Toshio Sugimoto, Ai Sasou, Tatsuya Kubota, Masahiro Shimada, Yuki Saito, Naomasa Shiraishi, Shigeto Morita, Shigeru Sato, Kentaro Yano, Kunisuke Tanaka, Yoshikiyo Oji, Takehiro Masumura. :A potential use of phospho*eno*/pyruvate carboxylase in developing rice seeds. 4th International Rice Congress, Bangkok, Thailand, 27 October - 1 November 2014
  3. Takehiro Masumura, Yuhi Saito, Takanari Shigemitsu, Ai Sasou, Kunisuke Tanaka. :Ultrastructure of mature protein body in the starchy endosperm of dry rice grain. 4th International Rice Congress, Bangkok, Thailand, 27 October - 1 November 2014
  4. 山本直樹、高野知之、矢野健太郎、杉本敏男、増村威宏: ダイズ種子ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの情報科学的解析, 日本農芸化学会関西支部大

- 会 奈良先端科学技術大学院大学 奈良  
県生駒市 2014年9月19～20日
5. Naoki Yamamoto, Tomoyuki Takano, Yuki Kinoshita, Ai Sasou, Kentaro Yano, Toshio Sugimoto, Takehiro Masumura: Response of wheat seed phosphoeno/pyruvate carboxylase to nitrogen supply at grain-filling stages and its molecular basis. The 11th Conference of the International Society for Seed Science (ISSS), Changsha, China, 15 - 19 September, 2014
6. 木下由貴、齊藤雄飛、東田潤、土居誠、寺島伸、堺谷莊太、森田重人、佐藤茂、石丸努、近藤始彦、山本直樹、矢野健太郎、増村威宏：イネ登熟種子中の脂質合成関連遺伝子群の組織別・網羅的発現解析（ポスター発表），第32回日本植物細胞分子生物学会 岩手大学 盛岡市 2014年8月21～22日
7. 山本直樹、高野知之、木下由貴、佐生愛、矢野健太郎、杉本敏男、増村威宏：コムギ登熟種子ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの開花期窒素供給への応答と遺伝子発現，日本農芸化学会第485回関西支部例会 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス 大阪府堺市 2014年7月12日
8. 堺谷莊太、齊藤雄飛、東田潤、土居誠、森田重人、佐藤茂、石丸努、近藤始彦、増村威宏：イネ種子で発現する貯蔵脂質合成関連遺伝子群の解析（ポスター発表），第31回植物細胞分子生物学会 北海道大学 札幌市 2013年9月10日
9. 堺谷莊太、齊藤雄飛、東田潤、土居誠、森田重人、佐藤茂、石丸努、近藤始彦、増村威宏：イネ種子における貯蔵脂質合成関連遺伝子群の発現解析，第30回植物細胞分子生物学会 奈良先端科学技術大学院大学 生駒市 2012年8月3～5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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www2.kpu.ac.jp/life\\_environ/genetic\\_eng/index.html](http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/genetic_eng/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増村 威宏 (TAKEHIRO MASUMURA)  
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師  
研究者番号：50254321

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：