

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 26 年度博士課程入学
氏名 緑川 景子
指導教員 朝倉 富子

論文題目

窒素施肥が米の成分組成および品質に与える影響の分子生物学的解析

1 研究の背景と目的

出穂期以降の窒素追肥は、コメの収量を増加させる一方で食味を低下させる。そのようなコメでは、プロラミン等の貯蔵タンパク質が増加しており、これが食味低下の原因との指摘がある。しかし、それを直接的に証明した研究結果はなく、また粘りや硬さ、甘みや香りといった食味構成要素の変化全てを貯蔵タンパク質の増加で説明することはできない。一般に、植物は限られた栄養素を効率よく利用するため、炭素 (C) と窒素 (N) のバランス調節機構を有し、栄養状態により炭素源の分配先を調節する。追肥による食味低下も、種子内部で C/N バランスの調節が起きた結果としてもたらされると考えられるが、メカニズムの詳細はわかっていない。そこで本研究では、登熟期の窒素追肥に応答した遺伝子発現変動を網羅的に解析することによって、追肥により変動する種子成分とそれに関与する分子群を見出すことを目的とした。

2 登熟期窒素追肥の網羅的遺伝子発現と成分変化

本研究では追肥時期を出穂時に設定し、種子内の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。これは、追肥以前にイネ植物体の大きさおよび籾数を確定させることで、追肥による根圏窒素増加の影響が、より直接的に種子の遺伝子発現に及ぶようにするためである。

DNA マイクロアレイに供するサンプルの選定のために登熟途上の種子の窒素含有量を測定したところ、開花後7日目ですでに追肥群とコントロール群で差がみられた。これは、追肥の効果が7日目ですでに現れた結果と推定されたが、この時期は成分の集積が始まったばかりであり、遺伝子発現と含有量の関係性を解析することは難しい。そこで、開花後10日目以降5日ごとに登熟途上の種子を採取し、それらのうち貯蔵物質の合成が盛んでデンプン粒などの貯蔵顆粒が一定量形成されている開花後15日目の種子を用いてDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、有意に発現変動した遺伝子群として炭素固定(Rubisco)、光合成(chlorophyll binding protein)、アミノ酸合成、貯蔵タンパク質合成 (13 kDa Cys-poor prolamin)、細胞壁合成(SUS3, CesA など)、トレハロース合成(TPP, TPS)、デンプン合成・代謝 (SSI, BEIIb, α -Amy, β -Amy) などに関連する遺伝子群が抽出された(図)⁽¹⁾。

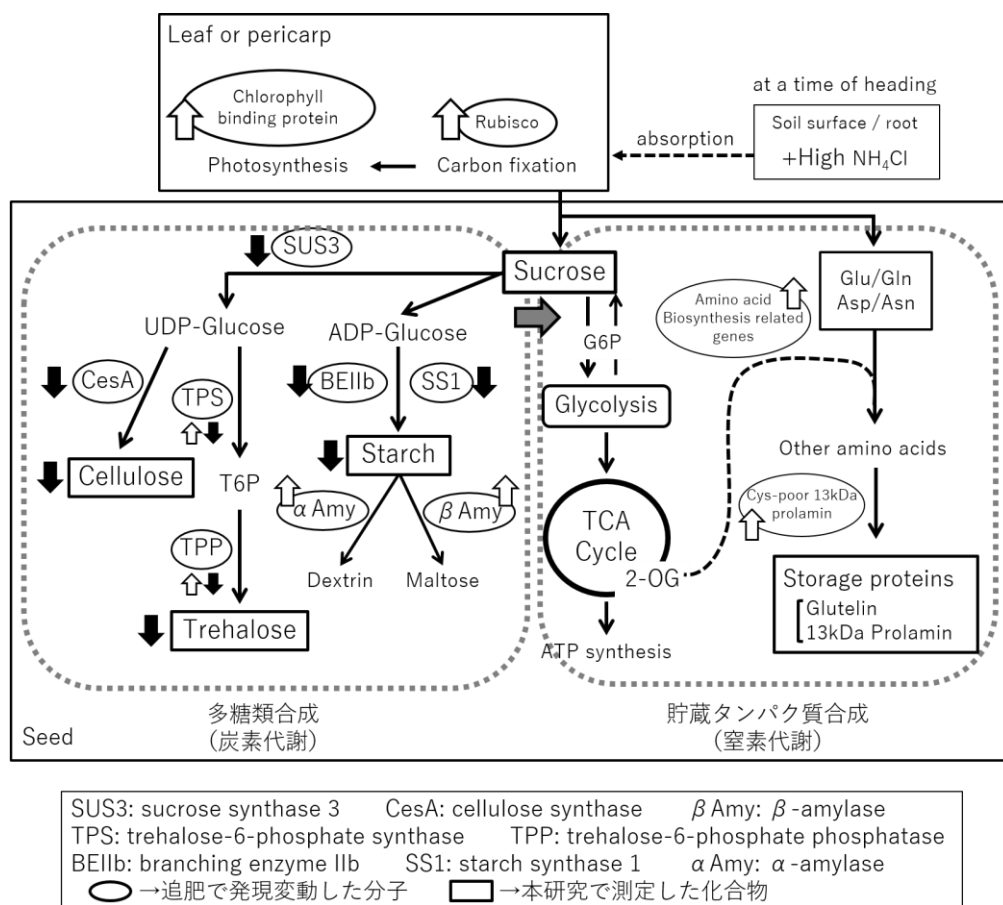


図 登熟種子における追肥の効果

次に、完熟種子の成分を分析し、遺伝子発現変動と相関するかを解析した。種子の窒素含有量は追肥区で高くなり、これはアミノ酸合成関連遺伝子の発現が上昇した結果と考えられる。ただし、胚乳の遊離アミノ酸は追肥群、コントロール群ともに極めて低い含有量であったことから、

追肥によって増加した種子内のアミノ酸は、そのほとんどがタンパク質合成に用いられていることが示唆された。SDS-PAGEにより種子タンパク質を解析したところ、貯蔵タンパク質であるグルテリンと Cys-poor 13 k Da プロラミンの顕著な増加がみられた。一方で、細胞壁合成に関連する遺伝子群の発現が減少したことを受け、種子細胞壁の構成成分である β グルカン量をカルコフロー染色により評価した。その結果、追肥群において β グルカン含量が有意に減少しており、細胞壁のセルロースが減少していることが示唆された。またデンプン合成関連の遺伝子は発現低下し、分解関連の遺伝子群が発現上昇したことから、追肥によりデンプン蓄積量の低下が予想された。そこで、各群における総デンプン量を測定したところ、追肥群がコントロール群に対し有意に減少していた。種子重量が追肥によって増えていなかったことを考え合わせると、登熟期の窒素追肥によって種子貯蔵物質の総量は増加せず、貯蔵タンパク質が増加する分、デンプンや細胞壁といった多糖類の蓄積が減少することが明らかとなった(図)。

DNA マイクロアレイの結果では、追肥群で多糖類合成に関連する遺伝子群が発現低下していたことから、多糖類合成の炭素源となる sucrose 量の減少が予想された。即ち、開花後 15 日目の遺伝子発現変動は、それ以前の時期での種子内の sucrose 含有量の低下によりもたらされた可能性を予想し、開花後 10 日目の各群におけるイネ種子の sucrose 量を GC-MS により測定した。その結果、種子内の sucrose 含有量は追肥群とコントロール群では有意な差は見られなかった。sucrose はアミノ酸合成の炭素骨格としても利用されることから、多糖類の合成低下の原因は、種子内で貯蔵タンパク質合成に割られる炭素源が増加した結果によるものと結論付けた。さらにその他の主要な代謝産物について測定した結果では、解糖系で消費されるリン酸化糖(G6P, F6P)やアミノ酸合成経路への分岐点である 2-OG 合成過程の citric acid や isocitric acid も追肥群で増加傾向にあり、炭素源の分配先が窒素集積側へ大きく傾いていることを示していた。さらにその後の解析で、種子内の窒素量に応答して炭素源の分配先を制御する因子として、TPP や SnRK1b が候補として挙げられた。

3 新規胚乳細胞壁合成関連遺伝子の機能解析

細胞壁はコメの割れやすさや吸水性、細胞構造の維持による食感など、品質に大きく関わっている可能性がある。しかし、胚乳で細胞壁が占める割合は重量の 1%程度と少なく、簡便に分析する方法もないことからほとんど研究が行われてこなかった。DNA マイクロアレイ解析では、セルロース合成酵素など細胞壁合成に関与する酵素の多くが窒素追肥で発現低下する遺伝子として検出されており、種子内の細胞壁もまた C/N バランス調節機構に組み込まれて質的变化を起こすことが示唆された。検出された遺伝子の中で、主に胚乳で細胞壁合成に関与している新規

分子として BC1L6 (Brittle Culm1-Like6) に着目した。BC1L6 のホモログである BC1 は“鎌いらず遺伝子”として知られており、BC1 を欠損させた株は茎が折れやすく、矮性を示す。また、BC1L6 は C 末端側に GPI アンカードメインを有する GPI アンカー型タンパク質である。GPI アンカー型タンパク質は、細胞膜中の脂質ラフトにつなぎ止められており、細胞表層に位置することから、BC1L6 は他の細胞膜に局在する細胞壁合成酵素と協働して、胚乳細胞壁の合成制御に関与しているのではないかという仮説を立てた。そこでまず BC1L6 を発現抑制したイネ胚盤由来カルスを作製し、プロトプラストを単離した。カルコフロー染色により再形成された細胞壁の蛍光強度を観察したところ、変異株において蛍光が減退することが判明した。さらに BC1L6 ノックアウト株であるレトロトランスポゾン挿入株 (Tos ライン) の β グルカン量も減少が認められた。次に、BC1L6 の細胞内局在を確認するため、RFP 融合 BC1L6 タンパク質をシロイヌナズナ根由来の培養細胞 Deep cell で発現させたところ、BC1L6 も細胞膜に局在することが明らかとなった。また *in situ* hybridization 法により、BC1L6 の組織内での発現部位を経時的に解析したところ、登熟期後半の外周部に特に強く発現していた。種子の登熟は内側から外側に向かってすすむ。種子の細胞数は登熟初期で決定付けられることから、BC1L6 は登熟後期の貯蔵物質蓄積に伴う細胞肥大化のための細胞壁合成に関与している可能性が示唆された。BC1L6 は多糖類との結合が予測されるドメイン (CBM: carbohydrate-binding module) を有していた。CBM はアミノ酸配列に基づいて CBM1 から CBM80 までのファミリーに分類されているが、BC1L6 の持つ CBM はキシラン主鎖やセルロースに結合能を持つ CBM2 に最も近いと推定された。以上の結果から、BC1L6 は胚乳中の細胞壁合成にあたり、 β -グルコシド結合の伸長に関わる分子シャペロンのような働きを担っている可能性が示唆された。

4 まとめ

本研究は、窒素追肥がコメのタンパク質合成を増強する一方で、デンプン・細胞壁といった多糖類の合成・集積経路を抑制するというトレードオフの関係を明らかにした。また、BC1L6 の欠損変異体では β グルカン含有量が減少していた。今後この変異体を用いてコメの品質に果たす細胞壁の機能を明らかにすることで、コメの品質制御に関する更なる知見が得られるものと期待される。

(1) **K. Midorikawa**, M. Kuroda, K Terauchi, M. Hoshi, S. Ikenaga, Y. Ishimaru, K. Abe, and T. Asakura, Additional nitrogen fertilization at heading time of rice down-regulates cellulose synthesis in seed endosperm. PLOS ONE. 9(6) : e98738 (2014).