

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：種子蛋白質の量的・質的向上を目指した分子育種

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

西村 いくこ(京都大学大学院理学研究科 教授)

主たる共同研究者

多葉田 誉(北海道三井化学(株) 主席研究員)(平成19年7月~)

3. 研究内容及び成果

3-1. 研究内容

世界的な人口増加による食糧難の時代に備えて、作物の生産向上が緊急の課題の一つとなっている。特に、コメや豆類をはじめとする様々な植物の種子はタンパク質、脂質、糖質などを貯蔵しており、私達の貴重な食糧源であり、また家畜飼料としても重要な資源である。これまでに種子の貯蔵タンパク質を改変し、より高品質のタンパク質を含む作物を創出するための試みが多数なされている。このような分子育種を行う際には、有用物質の遺伝子をただ導入するというのではなく、導入した遺伝子産物を安定な形で細胞内に大量に蓄積させることも重要な鍵となる。

このための技術基盤として、植物が本来持っている“タンパク質の合成の場から蓄積の場への大量輸送・集積の分子機構”の解明が必須である。本研究課題では、植物の特性を理解し、それを十分に生かして量的向上と質的向上の両面から種子の高付加価値化を達成するための基盤作りの一環としての研究を行った。量的向上研究では、登熟期の種子の細胞内での種子タンパク質の大量集積に関わる因子を網羅的に単離し、これに関わる分子機構の全容の解明を目指した。一方、質的向上研究では、液胞の機能発現に関わる液胞プロセッシング酵素VPEに注目し、種子タンパク質の性質の改変と病害に対する抵抗反応の分子機構を解明することを目標とした。

種子の貯蔵物質の大量合成・集積研究の流れから、平成19年度には外来の有用タンパク質の大量合成系の開発を目指した研究にも着手することとした。この研究の遂行は多葉田グループによって行われた。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

3-2. 研究成果

3-2-1. 量的向上を目指した解析(京都大学 西村グループ)

貯蔵タンパク質は、登熟期の種子の細胞の中で、粗面小胞体で合成された後、タンパク質蓄積型液胞へ輸送されて蓄積される。私たちは、このタンパク質の輸送に関与する小胞を見だし、PAC小胞と命名した。PAC小胞依存的なタンパク質輸送系は、ゴルジ体を介さない輸送系として注目された。この新規の経路は、効率よいタンパク質の輸送系として植物が獲得してきたものと考えられる。

これまでに貯蔵タンパク質の輸送経路に関わる分子は見いだされていなかった。PAC小胞は機能的に特殊化した小胞であることから、この小胞に焦点を当てたプロテオーム解析により、種子タンパク質の大量輸送システムを駆動している有用遺伝子を見出すことが可能になる。登熟期のカボチャ種子より単離したPAC小胞のプロテオーム解析から、液胞選別輸送レセプターを同定し、液胞選別輸送レセプター(Vacuolar Sorting Receptor1, VSR1)と命名した。この成果は、レセプター依存的な種子タンパク質の細胞内輸送の存在を初めて明らかにすることができた点で評価された。

貯蔵タンパク質の大量輸送系に関わる分子を網羅的に単離する目的で、2つの正(順)分子遺伝学的アプロ

一チを開発した。第一の方法のアイデアは、「タンパク質の輸送が異常になり、最終的な集積部位である液胞へ到達できない場合、タンパク質の成熟化不全となり、種子内に前駆体タンパク質が蓄積される」というものである。得られた変異体はmaigo (mag) 変異体と命名した。

第二の方法のアイデアは、液胞選別輸送レセプター欠損変異体の種子に液胞型緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させると、種子が光るという発見が端緒となった。この方法によって得られた変異体は green-fluorescent-seed (gfs) と命名した。これまでに、7ラインのmag変異体と約200ラインのgfs変異体を単離することができた。

それぞれの変異体の原因遺伝子の単離と機能解析を行った。GFS1は液胞選別輸送レセプターVSR1と一致した。このレセプターのリサイクルに関わるレトロマーの構成因子として、MAG1が同定された。

3 - 2 - 2 . 質的向上を目指した解析 (西村グループ)

上記の量的向上と対をなすのが質的向上である。分子育種においては、質的な向上なくしては種子の高付加価値化はあり得ない。私たちは、様々な液胞タンパク質の成熟化に関与する酵素を発見し、液胞プロセシング酵素 (VPE, Vacuolar Processing Enzyme) と命名した。液胞プロセシング酵素は、新規のシステインプロテアーゼで、液胞機能分子の成熟化に関わる鍵酵素であることから、この酵素を制御することにより、様々なタンパク質の性質を変えることができる。

シロイヌナズナは4種類のVPEのホモログを持つが、これらの遺伝子の1重、2重、3重遺伝子破壊株を作製した。この内3種類のVPE遺伝子を破壊すると、種子タンパク質の成熟化が完全に阻害されることが明らかになった。即ち、VPEを鍵酵素とする液胞プロセシング系は種子タンパク質の機能発現を制御していた。

VPE遺伝子のノックアウトマウスを作製することにより、VPEがリソソーム酵素群の成熟化に関与していることも分かった。即ち、液胞・リソソーム系の機能発現のための鍵酵素と位置づけることができた。

VPEの酵素化学的解析から、VPEが、動物のプログラム細胞死 (アポトーシス) の実行因子として知られる caspaseの活性を持つことが分かった。植物の細胞死でも、caspase-1の活性が重要であると言われながら、その実体が長く不明であったが、これに解答を与えることができた。

一方、*in vivo*の解析でもVPEが植物独特の細胞死を制御していることが分かった。タバコのVPE遺伝子の発現を抑えると、ウイルス感染による過敏感細胞死が抑制されることを見出した。植物はこのような抵抗性の細胞死の外、罹病生の細胞死も引き起こす。VPEはカビ毒による罹病生の細胞死にも関与していることが分かった。

一方、シロイヌナズナの新規VPE (VPE) は胚発生の初期に種皮 (内珠皮) に一過的に発現し、堅い種皮を形成するための細胞層のプログラム細胞死を制御していることが明らかになった。

3 - 2 - 3 . 培養細胞系による有用タンパク質の大量生産の研究 (多葉田グループ)

植物培養細胞を用いて有用タンパク質を効率よく大量生産する系の確立では、植物細胞を短期に、より高い増殖倍率が達成できる条件下において培養シマスを確保する工程と、大量に増殖した細胞に対し形質転換したタンパク質の生産誘導を行う工程を組み合わせることで、高い有用タンパク質生産性を実現することが可能になると考えられる。本研究においては、森正之准教授 (石川県立大) らによって構築された形質転換タバコ培養細胞BY-2 E182株およびE113株 (共に転写因子発現用DNA断片 (ベクターpER8 (- Stu) およびGFP発現用DNA断片 (ウイルスベクターpBICER8 - ToMVerG3 (SF3) SRz) 導入) を用いて有用タンパク質の大量生産系構築を目的とした形質転換細胞株の比較および安定した通気攪拌培養実施に必要な初期細胞移植密度の設定について検討を開始した。

細胞増殖性の観点からはE182株の方が有用タンパク質の効率的生産に適しているものと判断した。決定した初期細胞移植密度をもとに1Lスケールの通気攪拌培養を実施した。培養2日目に10 μ M α -estradiolを添加することによりGFP生産誘導を行い、更に3日間培養した後 (培養開始から5日後)、細胞を回収し、蛍光実体顕微鏡 (MZFLIII, Leica製) を用いてGFP由来の蛍光を観察した。 α -estradiolによる誘導を行うことによりGFPに由来する緑色蛍光が認められた。一方、 α -estradiolによる誘導を行わない場合にはGFPに由来する緑色蛍光は

認められなかった。以上の結果から、本システムは通気攪拌培養においても問題なく作動して有用タンパク質を生産できることを確認した。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待・口頭・ポスター		報道	特許	
国内	国外	国内	国外		国内	海外
0	39	86	69	15	5	1

論文数は多くはないが、非常に高いレベルのJournalに出ている。とくに種子タンパク質の輸送に関する重要な成果をPlant Cell, PNASに発表すると共に、同タンパク質輸送におけるプロセッシング酵素の生理的役割についてScienceに報告するなど高く評価できる。また国際会議での招待講演も多く、先導的役割を担っている。

特許出願しにくい課題であり、そのため数は少ない。VPEを欠損したマウスがリソソーム蓄積症のモデルとして認められるならその利用価値は高い。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

総合的には、独自のタンパク質輸送の変異体選抜法を確立し、数多くの変異体の獲得・解析を通してnoveltyのある非常にレベルの高い研究成果が得られた。例えば液泡選別輸送レセプターの発見、maigo遺伝子によるPAC小胞のゴルジ体への逆行輸送系の解明、種子タンパク質のプロセッシング酵素の機能解析など種子タンパク質の輸送系の解明は素晴らしい。またVPEが細胞死に関わる遺伝子であることを見事に証明した。当初計画以上の成果といって良い。一方、当初の計画の中に含まれていなかったはずの量的向上、質的向上という観点からの研究はやや物足りなかった。しかし、それを割りいても余りある予想外の成果、例えばタンパク質大量輸送系に関わる分子の網羅的同定と機能について、MAG1、MAG2、ZW10、MAG2 interacting factorなど巨大protein complexを見出しているのは評価できる。

科学技術の貢献に関しては、独自の系を用いた研究により、国内外においてこの分野をリードしている。研究テーマの焦点が絞られ、着実に成果が得られた。種子タンパク質の輸送の分子メカニズム解明を先導する研究として高く評価される。今後、大量輸送系が貯蔵タンパク質特異的なものではなく、他のタンパクにも適用でき、普遍性が示されることを期待する。また、VPEの細胞死における役割を解明した研究としても、植物の発生・分化・環境応答において重要な知見を与えており高く評価できる。またシロイヌナズナ変異株取得法(GFS法)の開発は特色と言える。

今後の展開としては、基礎科学として、種子タンパク質輸送系の解明は、GFS法を用いた変異体の単離と、その機能同定から進展することが期待される。一方、タンパク質の大量蓄積、質的改変という点では現状では余り期待出来るほどのデータは出ていない。もし、タンパク質の改変、あるいは油料成分との観点で研究するならば、新たな視点での解析が必要であろう。また、今後の植物分子生物学の応用分野として、最もHotなタンパク質生産工場としての利用、タバコ培養細胞系でのタンパク質大量生産システムの開発も期待出来る。

4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

Science(2004)1件。

Plant Cell Physiology誌論文賞:西村いくこ(2003)。

中日文化賞:西村いくこ(2006)。

文部科学大臣表彰科学技術賞:西村いくこ(2007)。