

# イネ培養細胞におけるスクロース誘導性タンパク質の網羅的解析

共生基盤学専攻 機能性食品変換学分野  
アンストーン ワスサン

**【背景と目的】**デンプン生合成に関する多くの研究はアミロースやアミロペクチン分子の生合成に直接関わる酵素の解析が中心であった。しかし、これらの酵素を試験管内で反応させても、デンプンを合成することは出来ない。このことから、生体内では様々なデンプン生合成を制御する因子およびメカニズムが存在していると考えられるが、これらの詳細な役割は明らかにされていない。デンプン生合成に関する研究の難しさの一因として、植物体では、デンプン生合成をコントロールすることができないという問題が挙げられる。そこで本研究では、生育条件を制御可能なイネ培養細胞を用い、デンプン生合成に関わる因子を網羅的に解析することを目的とした。

**【方法および結果】**イネ培養細胞はスクロース添加培地にて培養することで、細胞内のデンプン生合成が誘導される。そこで、スクロース添加によりデンプン生合成を誘導した+Suc 細胞と未誘導の-Suc 細胞より抽出した可溶性タンパク質を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、0.2 M および 0.4 M NaCl 溶出画分を得た。それらを二次元電気泳動で分離し、CBB 染色した。-Suc 細胞と比べ +Suc 細胞で相対的に増加したスポットを、0.2 M NaCl 溶出画分で 18 スポット、0.4 M NaCl 溶出画分で 9 スポット検出した。一方、+Suc 細胞に比べ -Suc 細胞で増加したスポットは、0.2 M NaCl 溶出画分で 19 スポット、0.4 M NaCl 溶出画分で 13 スポットであった。これらの中から、Suc に誘導される 23 種類のスポット、抑制される 17 種類のスポットについて MALDI TOF-MS 解析により同定を行った。Suc 誘導性タンパク質としては、エネルギー代謝に関わる succinyl-CoA synthetase や appr-1-p processing enzyme 等、分子シャペロンとして機能する熱ショックタンパク質、糖代謝に関わる酵素、タンパク質代謝に関わる酵素が検出された。一方、Suc 抑制性で同定されたタンパク質の多くは糖代謝関連タンパク質であり、その半数以上は  $\alpha$ -amylase であった。RT-PCR により各タンパク質遺伝子の発現解析を行ったところ、Suc 誘導性タンパク質のうち、D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, adenylosuccinate synthetase 等の 9 種類、Suc 抑制タンパク質のうち、glutamate dehydrogenase, 3-methylcrotonyl CoA carboxylase 等の 6 種類が、タンパク質レベルと一致した転写レベルの変動を示した。また、転写レベルでは差異が認められないものも存在した。転写レベルで誘導された遺伝子については、培養細胞以外においても発現しており、葉、葉鞘および種子で異なる発現パターンを示すことを明らかにした。

**【考察及び結論】**スクロースによるタンパク質の発現調節は、転写レベルだけではなく、翻訳、輸送等の転写後段階においても起こることが明らかとなった。また、イネの器官特異的発現解析の結果から、種子で多く発現したスクロース誘導性タンパク質の遺伝子にはプリン代謝に関わり、ヌクレオチド合成に関与する adenylosuccinate synthetase と種子の発芽阻害や AGPase の活性に関与する peroxiredoxin 1 が認められ、これらの遺伝子は種子のデンプン生合成に関わると予想された。今後、これらのタンパク質がどのようにデンプン生合成に影響を与えるのかを調べる必要がある。