

二国間交流事業 共同研究報告書

平成22年3月31日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 独立行政法人 農業・食品産業技術
総合研究機構 作物研究所

職・氏名 ^(ふりがな) チーム長・小松節子

1. 事業名 相手国(スロバキア)との共同研究 振興会対応機関 (Slovak Academy of Sciences)

2. 研究課題名 プロテオミクス解析技術を利用したダイズの生育初期の湿害耐性機構の解明

3. 全採用期間

平成21年4月1日～平成23年3月31日 (2年0ヶ月)

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5,000千円

初年度経費2,500千円、 2年度経費2,500千円、 3年度経費0千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 0千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
(こまつせつこ) 小松 節子	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 チーム長	日本側研究統括、プロテオミクス解析技術の開発
(なかむらたくじ) 中村 卓司	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 主任研究員	質量分析計利用によるダイズ湿害条件下で変動する代謝産物の解析
(なんじょうようへい) 南條 洋平	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 任期付研究員	質量分析計利用によるダイズ湿害条件下で変動するタンパク質の解析
(にしざわけいと) 西澤 けいと	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 任期付研究員	分子生物学的手法によるダイズ湿害発生機構の解析
(のうりざまん) NOURI Zaman	筑波大学連携大学院 博士課程学生	質量分析計利用によるダイズ湿害条件下で変動するタンパク質の解析

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 スロバキア科学アカデミー植物遺伝工学研究所・主任研究員・HAJDUCH Martin

(3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
○HAJDUCH Martin	スロバキア科学アカデミー 植物遺伝工学研究所・主任研究員	スロバキア側研究統括、プロテオミクス解析技術の開発
SKULTETY Ludovit	スロバキア科学アカデミー ウイルス研究所・部長	質量分析計利用によるダイズ湿害条件下で変動するタンパク質の解析
KLUBICOVA Katarina	スロバキア科学アカデミー 植物遺伝工学研究所・	生化学的手法によるダイズ湿害発生機構の解析
UVACKOVA Lubica	博士課程学生 スロバキア科学アカデミー 植物遺伝工学研究所 博士課程学生	生化学的手法によるダイズ湿害発生機構の解析

6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

地球温暖化による降雨の集中化や長雨に伴い、作物における湿害は深刻な問題である。湿害は作物に生育遅延のみならず病害も引き起こす複雑な農業形質であるが、その対策は不十分である。特にダイズは国内消費量のほとんどを輸入に頼っている上に、世界的なバイオ燃料作物との作付け競合の影響を受け、輸入量の確保が厳しくなっていることから自給率の向上が急務である。ダイズの重要形質である耐湿性を改良することは、生産性の安定・向上に不可欠である。従来のダイズ耐湿性に関する研究は個々の遺伝子解析にとどまり、発現機構は未解明であった。本研究では、包括的手法であるプロテオミクス解析技術を開発・導入し、さらに、ダイズプロテオミクス研究に力を入れているスロバキアのグループと共同することにより、ダイズの湿害発生機構の解明研究を加速する。このことにより、湿害発生バイオマーカー探索や耐湿性ダイズの作出に寄与する。

1. プロテオミクス解析手法の高感度化

ダイズ出芽期で冠水処理した根を試料とし、粗抽出タンパク質、細胞壁・細胞膜画分タンパク質、リン酸化タンパク質等について、二次元電気泳動を基盤にしたプロテオミクス解析法と、蛍光標識および非標識を用いた質量分析計を基盤にしたゲルフリープロテオミクス解析法にて、検出できるタンパク質を比較検討した。その結果、粗抽出タンパク質においては二次元電気泳動を基盤にしたプロテオミクス解析法が比較解析に適しているが、精製を介した場合は非標識・ゲルフリープロテオミクス法を用いることにより、微量タンパク質も含めて高精度に湿害で変動するタンパク質群を検出できることを証明した。

2. 細胞壁プロテオミクス

湿害は細胞壁に障害を及ぼすことが示唆されていることから、この障害機構を解明するために、細胞壁を精製しゲルフリープロテオミクス手法にて解析した。冠水の早期に根の細胞膜および細胞壁のタンパク質群が変動し、特に細胞壁のリグニン合成やリグニン化等に関与するタンパク質群が減少した。さらに、湿害により細胞伸長に関与する酵素類が変動することが明らかになり、湿害時にはエネルギー消費を回避するために細胞伸長を制御している可能性を示唆した。

3. リン酸化プロテオミクス

冠水処理した根の抽出タンパク質からリン酸化タンパク質を特異的に吸着するカラムを用いてリン酸化タンパク質を精製した。Multi-Stage Activation 法による質量分析により、冠水処理により 40 個のタンパク質が脱リン酸化され、21 個のタンパク質がリン酸化された。そのうち 12 個のタンパク質は量的変動を示した。湿害によりエネルギー合成、細胞構造、タンパク質修飾、転写に関わるタンパク質が脱リン酸化され、一次代謝、タンパク質分解、翻訳に関わるタンパク質がリン酸化される等、耐湿性付与にタンパク質のリン酸化による制御が重要であることを示唆した。

4. プロテオミクス解析技術で検出した冠水応答性タンパク質群の転写レベルでの機能解析

湿害下で変動する 97 個のタンパク質のうち、12 個のタンパク質はリン酸化により調節を受けており、そのリン酸化タンパク質について、転写レベルでの変動の有無を解析した。熱ショックタンパク質および翻訳後伸長因子をコードする遺伝子が顕著に減少する一方で、グリセルアルデヒド 3-リン酸化デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は増加しており、解糖系に関わる酵素は、湿害初期においては、リン酸化を介して転写・翻訳を活発に行っていることを明らかにした。