

様式6 (第15条第1項関係)

2017年4月3日

独立行政法人  
日本学術振興会理事長 殿

研究機関の設置者の所在地	〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保255	
研究機関の設置者の名称	国立大学法人埼玉大学	
代表者の職名・氏名	学長・山口 宏樹 (記名押印)	
代表研究機関名 及び機関コード	埼玉大学	12401

平成28年度戦略的国際研究交流推進事業費補助金  
実績報告書

戦略的国際研究交流推進事業費補助金取扱要領第15条第1項の規定により、実績報告書を提出します。

整理番号	S2801	補助事業の完了日	平成29年3月31日	関連研究分野 (分科細目コード)	植物分子・生理科学 (6801)
------	-------	----------	------------	---------------------	---------------------

補助事業名(採択年度) 光合成有用物質生産の高効率化を目指した植物機能開発研究ネットワークの構築(平成28年度)	補助金支出額(別紙のとおり) 8,250,000 円
---	-------------------------------

代表研究機関以外の協力機関  
なし

海外の連携機関  
大韓民国・浦項工科大学、米国・カリフォルニア大学バークレー校、米国・ケンタッキー大学、フランス・フランス国立科学研究センター、ドイツ・フライブルク大学、イギリス・ケンブリッジ大学

1. 事業実施主体

フリガナ 担当研究者氏名	所属機関	所属部局	職名	専門分野
主担当研究者 ニシダ イクオ 西田 生郎	埼玉大学	大学院理工学研究科	教授	植物分子生理学
担当研究者 ニシヤマ ヨシタカ 西山 佳孝	埼玉大学	大学院理工学研究科	教授	植物分子生理学
タカギ マサル 高木 優	埼玉大学	大学院理工学研究科	教授	植物分子生物学
カワイ マキ 川合 真紀	埼玉大学	大学院理工学研究科	教授	植物分子細胞生物学
ヒハラ ユ 日原 由	埼玉大学	大学院理工学研究科	准教授	植物分子生物学
カコ 香子	埼玉大学	大学院理工学研究科	准教授	植物糖鎖生物学
コタケ トシヒサ 小竹 敬久				
計6名				

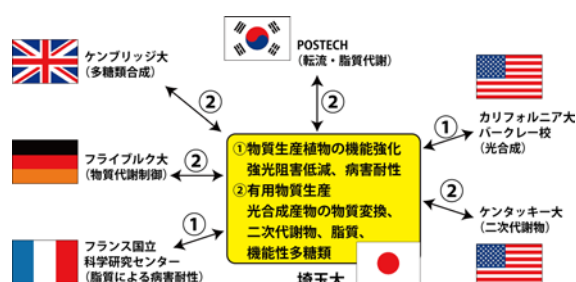
フリガナ 連絡担当者	所属部局・職名	連絡先(電話番号、e-mailアドレス)
イチムラ マサユキ 市村 真之	研究協力部研究推進課・主任	048-829-7303 sangaku@gr.saitama-u.ac.jp

※2頁以降は、交付決定を受けた時点の事業計画の項目に合わせて必要に応じて修正すること。

## 2. 本年度の実績概要

### 〔研究概要〕

化石燃料の枯渇が危惧される中、再生可能な炭素資源に依存する社会を構築することは極めて重要である。本学では、この分野で独自の研究を展開して顕著な成果を挙げている。平成 25 年度から実施した頭脳循環プログラムでは、光合成の光阻害、同化産物の転流、脂質と糖質への変換、の各プロセスに焦点を当てた国際共同研究を実施し、多数の優れた研究成果を挙げている(Plant Cell 2015; JBC 2016 他)。



本事業では、実用的な資源生産を実現するために、①植物の機能強化と、②有用物質生産に関する6つの研究テーマを設定し、事業期間内に6つの海外共同研究機関にそれぞれ1名の若手研究者を派遣することとした。平成 28 年度は、若手研究者1名をフランス・国立科学研究センターに、1名をドイツ・フライブルク大学に派遣した。また、米国・ケンタッキー大学から教授1名を、韓国・浦項工科大学 (POSTECH) から特任助教1名を招聘し、研究交流を行った。

研究成果として、8件の英文原著論文を発表した。また、1件の国際会議での研究発表を行った。

### 〔各研究テーマの実施状況〕

**テーマ①-I:** 光合成の強光ストレス耐性を増大させるため、葉緑体翻訳因子 EF-Tu を過剰発現させるコンストラクト、および酸化標的システイン残基を改変した EF-Tu を過剰発現させるコンストラクトを作製し、それぞれシロイヌナズナに遺伝子導入した。

**テーマ①-II:** ラフトの増大による植物免疫改良技術を確立するため、スフィンゴ脂質改変システムをシロイヌナズナとイネで作出した。シロイヌナズナ系統において、免疫が向上することを明らかにした。さらに、各種ラフトマーカールの導入に着手した。

**テーマ②-I:** グリコーゲン合成をはじめとする炭素代謝の制御に働くと考えられる非コード sRNA PmgR1 の発現制御メカニズムとその sRNA としての機能を解明するため、相互作用タンパク質を単離する実験系の構築を行った。

**テーマ②-II:** 植物の二次代謝産物の中で、有用アルカロイドを生産する主要回路であるシキミ酸経路を中心に、それに関わる遺伝子と制御機構に関する情報交換と議論を、本分野で顕著な成果を挙げているケンタッキー大学と共同で行った。

**テーマ②-III:** CRES-T ラインから単離した糖転流制御に関する転写因子候補 X の変異体の表現型解析(デンプン蓄積、糖転流関連遺伝子の RT-PCR 解析、さらにマイクロアレイ法による網羅的な遺伝子発現変化)を進めた。また、酵母ワンハイブリッドスクリーニングで得られた RSX1 転写因子候補 A~D の各変異体の表現型 (RSX1 の発現変化、デンプン蓄積) を解析した。シロイヌナズナの種子貯蔵タンパク質変異体の種子生産を向上させる栽培条件についての再検討 (土壌の種類と給水頻度) を行った。

**テーマ②-IV:** 不溶性のグルコマンナンを水溶性のガラクトグルコマンナンに変換することで高蓄積する実験を開始した。蘚類やタイ類、イネのガラクトース転移酵素遺伝子をクローニングし、シロイヌナズナに遺伝子導入した。

### 3. 到達目標に対する本年度の達成度及び進捗状況

#### 到達目標①-I：光合成装置の修復過程で、光酸化ストレスの影響を受ける分子を特定する。

シアノバクテリアを用いた研究から、光化学系の修復を支えるタンパク質合成系の翻訳伸長因子が光酸化ストレスで傷害を受けることが明らかになっているため、平成 28 年度はシロイヌナズナ葉緑体の翻訳伸長因子 EF-Tu に着目して、この翻訳因子の酸化傷害の分子機構を *in vitro* で解析した。その結果、葉緑体 EF-Tu は酸化傷害を受けやすく、149 番目のシステイン残基が酸化されると失活することがわかった。この結果を受け、葉緑体 EF-Tu およびシステイン 149 をアラニンに改変した葉緑体 EF-Tu をシロイヌナズナの葉緑体で過剰発現するコンストラクトを作製した。現在、これらのコンストラクトを用いてシロイヌナズナの形質転換を行っている。

#### 到達目標①-II：スフィンゴ脂質の改変による耐病性強化植物の作出

平成 28 年度は、シロイヌナズナの脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ (*FAH*) 過剰発現系統を選抜し、2-ヒドロキシスフィンゴ脂質の割合が増加していることを明らかにした。また、シロイヌナズナ *FAH* 過剰発現系統において、*AvrRPT2* を有するシュドモナス菌に対する耐病性が向上していることも明らかにした。さらに、*FAH* 改変シロイヌナズナ系統に対して各種ラフトマーカークの導入を開始した。次年度以降は、フランス国立科学研究センターにおいてラフト、及びタンパク質動態解析を行う。

#### 到達目標②-I：シアノバクテリアの転写・転写後制御による光合成・代謝制御技術の確立

本年度においては主に(i)の *pmgR1* の発現制御メカニズムの解析を行った。派遣者はフライブルグ大においてバイオインフォマティクス解析により *pmgR1* のプロモーター領域を解析し、-35 ボックスに隣接した上流域にシアノバクテリア間で高度に保存された配列を見出した。またこの情報を元に DNA アフィニティークロマトグラフィーを行い、*pmgR1* プロモーターに結合する転写因子の単離を試みている。次年度は *pmgR1* の発現を制御する転写因子の単離・同定を試み、その転写因子破壊株を解析することで *pmgR1* の発現制御メカニズムの詳細を解析する。また、本年度では(ii)の sRNA *PmgR1* の機能解析のため、*in vitro* 転写により *pmgR1* 転写産物を合成し、これを用いて RNA アフィニティークロマトグラフィーにより相互作用タンパク質を単離する実験系を構築した。

#### 到達目標②-II：植物の有用二次代謝物合成に関わる鍵因子の同定

埼玉大学の技術である転写抑制因子を用いた遺伝子発現抑制技術 (CRES-T 法) を利用して、目的物質以外の経路を堰き止めるというこれまでに無い代謝経路改変法を用いることにより、有用アルカロイドなどの高蓄積につながる代謝改変技術の開発を行うため、候補転写因子に対するキメラリプレッサー発現体を生育準備を開始した。加えて、アルカロイドを中心とした多様な代謝物生成に関わる転写因子の研究の専門家であるケンタッキー大学の Yuan 教授を招聘し、代謝経路の改編によるアルカロイド物質生産研究について、具体的な戦略について議論を行った。

#### 到達目標②-III：油脂生産強化および転流強化をめざした技術の確立と油糧作物への応用

今年度は、糖転流制御に関する転写因子候補 X の変異体の表現型解析を進めた。変異体 X では、糖転流関連遺伝子 *SUC2* および *RSX1* の発現量が有意に低下していた。一方、根では明らかな生育の遅延が確認され、シンク組織である根への糖転流経路が一部制限されていることが示唆された。また、光田展隆准教授 (産業技術総合研究所) から技術指導を受けて変異体 X のマイクロアレイ解析を実施し、糖トランスポーター遺伝子だけでなく、維管束形成に関わる転写因子数種が変異体 X で発現低下していることが分かった。一方、酵母ワンハイブリッドスクリーニングで得られた *RSX1* 転写因子候補 A~D の各変異体では、*rsx1-2* 変異体のようなソース葉特異的なアントシアニンおよびデンプンの蓄積は見られなかった。今後、多重変異体を作成して糖転流への影響を調べる予定でいる。

#### 到達目標②-IV：機能性多糖類を高蓄積する技術の確立

平成 28 年度は、(i) ヒメツリガネゴケ、ゼニゴケ、イネ、シロイヌナズナから、計 6 種類のガラクトース転移酵素遺伝子をクローニングし、シロイヌナズナ野生株に遺伝子導入した。また、(ii) GDP-マンノース合成の促進をねらって、デキサメタゾン制御下で KONJAC タンパク質が発現するシロイヌナズナの作出も開始した。遺伝子導入植物は次年度以降に解析予定である。さらに、(iii) 細胞壁のキシランが少ない (相対的にマンナン多糖類が多い) シロイヌナズナの細胞壁変異体 *irx9* と *irx14* を収集した。

#### 4. 日本側研究グループ（実施主体）の研究成果発表状況（本年度分）

##### ①学術雑誌等（紀要・論文集等も含む）に発表した論文又は著書

論文名・著書名 等	
<p>（論文名・著書名、著者名、掲載誌名、査読の有無、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）について記入してください。）（以上の各項目が記載されていれば、項目の順序を入れ替えても可。）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・査読がある場合、印刷済及び採録決定済のものに限って記載して下さい。査読中・投稿中のものは除きます。</li> <li>・さらに数がある場合は、欄を追加して下さい。</li> <li>・著者名について、責任著者に「※」印を付してください。また、主担当研究者には<u>二重下線</u>、担当研究者については<u>下線</u>、若手研究者については<u>波線</u>を付してください。</li> <li>・海外の連携機関の研究者との国際共著論文等には、番号の前に「◎」印を、また、それ以外の国際共著論文等については番号の前に「○」印を付してください。また、主要連携研究者については<u>斜体・太下線</u>、連携研究者については<u>斜体・破線</u>としてください。</li> </ul>	
1	Ueno M., Sae-Tang P., Kusama Y., <u>Hihara Y.</u> , Matsuda M., Hasunuma T., ※ <u>Nishiyama, Y.</u> (2016) Moderate heat stress stimulates repair of photosystem II during photoinhibition in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. <i>Plant Cell Physiol.</i> , 57, 2417-2426.
2	Yoshimi Y., Sugawara Y., Hori C., Igarashi K., Kaneko S., Tsumuraya Y., ※ <u>Kotake T.</u> (2017) A protease/peptidase from culture medium of <i>Flammulina velutipes</i> that acts on arabinogalactan-protein. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 81, 475-481.
3	Ishikawa Y., Miyagi A., Haishima Y., Ishikawa T., <u>Nagano M.</u> , Yamaguchi M., <u>Hihara Y.</u> , ※ <u>Kawai-Yamada M.</u> (2016) Metabolomic analysis of NAD kinase-deficient mutants of the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. <i>J. Plant Physiol.</i> , 205, 105-112.
4	Ishikawa T., Ito Y., ※ <u>Kawai-Yamada M.</u> (2016) Molecular characterization and targeted quantitative profiling of the sphingolipidome in rice. <i>Plant Journal</i> , 88, 681-693.
5	※Hashida S., Itami T., Takahara K., Hirabayashi, T., Uchimiya H., <u>Kawai-Yamada M.</u> (2016) Increased rate of NAD metabolism shortens plant longevity by accelerating developmental senescence in Arabidopsis. <i>Plant Cell Physiology</i> , 57, 2427-2439.
○ 6	Fang L., Ishikawa T., Rennie E.A., Murawska G.M., Lao J., Yan J., Tsai A.Y., Baidoo E.E., Xu J., Keasling J.D., Demura T., <u>Kawai-Yamada M.</u> , Scheller H.V., ※Mortimer J.C. (2016) Loss of inositol phosphorylceramide sphingolipid mannosylation induces plant immune responses and reduces cellulose content in Arabidopsis. <i>Plant Cell</i> , 28, 2991-3004.
7	Miyagi A., Uchimiya H., ※ <u>Kawai-Yamada M.</u> (2017) Synergistic effects of light quality, carbon dioxide and nutrients on metabolite compositions of head lettuce under artificial growth conditions mimicking a plant factory. <i>Food Chemistry</i> , 218, 561-568.
8	<u>Fujiki Y.</u> , Teshima H., Kashiwao Shinji, Kawano-Kawada M., Ohsumi Y., Kakinuma Y., ※Sekito T. (2017) Functional identification of <i>AtAVT3</i> , a family of vacuolar amino acid transporters, from <i>Arabidopsis</i> . <i>FEBS Lett.</i> 591, 5-15

##### ②学会等における発表

発表題名 等	
<p>（発表題名、発表者名、発表した学会等の名称、開催場所、口頭発表・ポスター発表の別、審査の有無、発表年月（西暦）について記入してください。）（以上の各項目が記載されていれば、項目の順序を入れ替えても可。）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・発表者名は参加研究者を含む全員の氏名を、論文等と同一の順番で記載すること。共同発表者がいる場合は、全ての発表者名を記載し、責任発表者名は「※」印を付して下さい。発表者名について主担当研究者には<u>二重下線</u>、担当研究者については<u>下線</u>、若手研究者については<u>波線</u>を付してください。</li> <li>・口頭・ポスターの別、発表者決定のための審査の有無を区分して記載して下さい。</li> <li>・さらに数がある場合は、欄を追加して下さい。</li> <li>・海外の連携機関の研究者との国際共同発表には、番号の前に「◎」印を、また、それ以外の国際共同発表については番号の前に○印を付してください。また、主要連携研究者については<u>斜体・太下線</u>、連携研究者については<u>斜体・破線</u>としてください。</li> </ul>	
1	<u>Fujiki Y.</u> , Inoue H., Sato A., Kudo K., Kato A., <u>Lee Y.</u> , <u>Nishida I.</u> ※ (ポスター発表から口頭発表に選抜) Combined effects of 12S globulin mutation and overexpression of <i>DGAT1</i> on seed oil content in <i>Arabidopsis thaliana</i> . ゴードン会議 plant lipids, 2017年2月1日、ガルベストン、CA, USA, 審査無

2	
3	
4	
5	

## 5. 若手研究者の派遣実績（計画）

### 【海外派遣実績（計画）】

年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	合計
派遣人数	2 人	4 人 ( 2 人)	4 人 ( 2 人)	6 人

※当該年度は実績、次年度以降は計画している人数を記載

### 【本年度の海外派遣実績】

派遣者①の氏名・職名：門脇 太朗・ポスドク

（当該若手研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動）

派遣者は、グリコーゲン蓄積に関連する sRNA PmgR1 に着目し、*pmgR1* の遺伝子発現制御メカニズムおよび、sRNA としての機能解析を行っている。これまでに *pmgR1* の遺伝子発現制御メカニズムを明らかにするため、バイオインフォマティクス解析により -35 ボックスに隣接する上流域にシアノバクテリア間で高度に保存された配列を見出し、この情報を元に DNA アフィニティークロマトグラフィーを行い、*pmgR1* のプロモーター領域に結合する転写因子の単離を行っている。また、sRNA PmgR1 の機能を明らかにするため、*in vitro* 転写の鋳型 DNA を作製し、sRNA PmgR1 に結合するタンパク質の単離を行っている。

（具体的な成果）

バイオインフォマティクス解析により *pmgR1* のプロモーター領域を解析し、-35 ボックスに隣接する上流域にシアノバクテリア間で高度に保存された配列を見出し、*pmgR1* の転写制御メカニズムおよび機能解析を行うための実験系を構築した。

派遣先 (国・地域名、機関名、部局名、受入研究者)	派遣期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
ドイツ、フライブルク大学、生物学第 3 研究所、Wolfgang R. Hess 教授	88 日	275 日	0 日	363 日

派遣者②の氏名・職名：長野 稔・助教

(当該若手研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動)

スフィンゴ脂質が形成するラフトに焦点を当て、スフィンゴ脂質の改変によるラフトの増大が植物の耐病性を向上させるか解明する。

派遣予定者は *FAH* 過剰発現系統をシロイヌナズナとイネで選抜し、ラフトの形成に重要な 2-ヒドロキシ脂肪酸を有したスフィンゴ脂質の増大を LC-MS/MS を用いることにより明らかにした。また、シュードモナス感染実験をシロイヌナズナ *FAH* 過剰発現系統に対して実施することにより、*FAH* の過剰発現が免疫の向上に寄与することを見出した。さらに、派遣先であるフランス国立科学研究センターの Mongrand 研究ディレクターよりラフトマーカータンパク質を入手し、それらを導入した形質転換系統の作出に着手した。

(具体的な成果)

スフィンゴ脂質改変植物系統を整備し、それらの耐病性が向上していることを明らかにした。また、ラフトマーカータンパク質導入植物系統の構築に着手した。

派遣先 (国・地域名、機関名、部局名、受入研究者)	派遣期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
フランス、フランス国立科学研究センター、生合成膜研究所、Sébastien Mongrand 研究ディレクター	31 日	335 日	0 日	366 日

※本年度の派遣者毎に作成すること。

6. 研究者の招へい実績 (計画)

【招へい実績 (計画)】

年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	合計
招へい人数	2 人	1 人 ( 0 人)	1 人 ( 0 人)	4 人

※当該年度は実績、次年度以降は計画している人数を記載

【本年度の招へい実績】

招へい者①の氏名・職名：Ling Yuan・教授

(当該研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動)

Yuan 教授グループは、植物の二次代謝物生合成経路に関わる遺伝子の発現制御機構の解明を目的としており、本事業では有用アルカロイドの蓄積につながるシキミ酸-リグニン生合成経路の制御因子を CRES-T 法で探索する。埼玉大学は二次代謝物を分析する LC/MS などの機器を所有するが、より詳細な解析をおこなうため、平成 28 年度に Yuan 教授を招へいし、代謝経路を制御する遺伝子因子の情報と分析に関する専門知識の提供を受ける。また、平成 29 年度には、シキミ酸-リグニン生合成経路の制御因子のスクリーニングをケンタッキー大で実施する。

(具体的な成果)

有用なアルカロイドの主要な代謝経路であるシキミ酸経路に関わる酵素遺伝子とそれらの発現制御機構に関する情報を交換し、具体的に実施するための議論を行うことがで

き、二次代謝物の分析を担当する川合グループと研究情報を交換することができた。また、研究者向けの有用物質生産に関するセミナーを開催した。				
招へい元（機関名、部局名、国名）及び 日本側受入研究者（機関名）	招へい期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
ケンタッキー大学、植物・土壌科学科、アメリカ 受け入れ：高木優（埼玉大学）	13 日	0 日	0 日	13 日

**招へい者④の氏名・職名：Jae-Ung Hwang・特任助教**

<p>（当該研究者の国際共同研究における役割を含めた具体的な研究活動）</p> <p>Hwang 特任助教（POSTECH の Lee 研究室）は、植物の ABC トランスポーターの生理機能解析や重金属汚染土壌の浄化技術（ファイトレメディエーション）の開発に取り組んでいる。本事業では西田グループが POSTECH で予定している糖転流や油脂蓄積に関する形質転換体の作出とその表現型解析を分担する。</p> <p>（具体的な成果）</p> <p>今回の招へいでは、土壌のカドミウム蓄積への耐性に関わる転写因子についてセミナーを行っていただくとともに、平成 29 年度に POSTECH で実施予定の、糖転流や油脂蓄積に関する形質転換体の作出について、具体的な実験計画の打ち合わせを行った。</p>				
招へい元（機関名、部局名、国名）及び 日本側受入研究者（機関名）	招へい期間			合計
	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	
POSTECH、生命科学部門、韓国 受け入れ：西田生郎（埼玉大学）	6 日	0 日	0 日	6 日

※本年度の招へい者毎に作成すること。

## 7. 翌年度の補助事業の遂行に関する計画

### 研究計画の概要

※ 補助事業が完了せずに国の会計年度が終了した場合における実績報告書には、翌年度の補助事業の遂行に関する計画を附記すること。