

イネ培養細胞を利用したフィチン酸生合成の制御機構の研究

2014年1月

松野 幸也

イネ培養細胞を利用したフィチン酸生合成の制御機構の研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
国際地縁技術開発科学専攻
博士（農学）学位論文

松野 幸也

目次

| | |
|---------------------------------|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 第2章 フィチン酸高蓄積培養細胞培養系の開発 | 13 |
| 1-1 緒言 | 14 |
| 1-2 材料と方法 | 14 |
| 1-3 結果 | 17 |
| 1-4 考察 | 18 |
| 第3章 共発現解析による制御系遺伝子の探索 | 27 |
| 2-1 緒言 | 28 |
| 2-2 材料と方法 | 28 |
| 2-3 結果 | 29 |
| 2-4 考察 | 30 |
| 第4章 培養細胞と胚を形成する細胞との遺伝子発現からみた共通性 | 31 |
| 3-1 緒言 | 32 |
| 3-2 材料と方法 | 32 |
| 3-3 結果 | 34 |
| 3-4 考察 | 34 |
| 第5章 総合考察 | 36 |
| 概要 | 39 |
| 謝辞 | 41 |
| 引用文献 | 42 |

第 1 章 序論

富栄養化の原因物質、フィチン酸

近年、湖沼や都市部内湾では、生活排水、農業排水、工業排水などに含まれるリンや窒素が原因で急速に富栄養化が進み、水質悪化や生態系の破壊といった問題を引き起こしている。工業化や農地への過剰施肥、人口の集中によって引き起こされる今日の急速な富栄養化は、湖沼や湾の水環境のみならず、人の生活にも悪影響を与える。その悪影響は主に夏に見られる。夏は日差しが強く水面が温まるため、水面と湖底とで温度差が大きくなる。この温度差は水の密度に影響し、温かい水面は密度が軽く、冷たい湖底は密度が重くなる。結果として、鉛直方向の攪拌が起こりにくくなり、上層と下層とに分かれた状態になる。上層は大気からの酸素の供給や植物プランクトンの光合成により十分な酸素が存在するが、下層は酸素供給が止まり、次第に酸素が不足する。ここに、富栄養化による植物性プランクトンの異常増殖が起きると、富栄養化の悪影響が生じる。植物性プランクトンの捕食者である動物性プランクトンの増殖が続き、この急激な増殖は呼吸による溶存酸素の低下を招く。さらに、動物性プランクトンの死骸が急激に増加し、湖底で酸化的に分解される。湖底近くの酸素濃度はさらに低下し、貧酸素水塊と呼ばれるようになる。このような貧酸素水塊が上部の水塊と混合した時には、最悪の場合は酸欠による魚類の大量死が発生する。したがって、生じる問題としては、水環境の生態系の破壊、水産資源の減少、貧酸素水塊における嫌気性細菌由来の異臭、水質の悪化があげられる。湖沼や湾は、水産資源の重要な窓口、釣りやマリンスポーツなどの娯楽の場や公園、貯水池として機能しており、富栄養化が近隣住民や将来世代にまで大きな影響を与えることは明らかである。今後、行政機関はこのような問題を正しく評価し、さらに力を加えて問題の解決に臨むことが求められる。

富栄養化は、有機物や栄養塩類の流入によって引き起こされるが、それら成分の中で多くの場合、リンが制限要素となる。その他には炭素や窒素が制限要素として知られているが、いずれも大気を介して湖沼に供給されるため、究極的にはリンの供給量を減少させることが必須の対策となる[1]。リンの供給源には、家畜の排泄物、化学肥料、生活排水、工業排水などがあげられる。家畜の排泄物に含まれるリン化合物はフィチン酸と呼ばれる物質である。フィチン酸は植物種子におけるリン貯蔵形態として知られており、穀物中のリンの多くはフィチン酸の金属キレート塩であるフィチンとして存在する。マグネシウムやカルシウム、鉄などとキレートした場合には、溶解度が著しく低下する。家畜には穀物飼料が与えられるが、ヒトを含む単胃動物（トリやブタ）はフィターゼというフィチン分解酵素の働きが極めて弱いためわずしかフィチンを分解、吸収できない。また、日本のような先進国では十分な食料供給があるため問題にならないが、発展途上国など穀物に頼った食生活が強いられる貧しい国では、フィチン酸が金属イオンをキレートするためにその金属イオンを吸収できなくなり[2]、栄養失調の原因となる。

吸収されずに排泄物中に残存したフィチンは、多くの場合野積みや素堀りと言った排泄物の不適切な処理によって、河川や湖沼へ流入しリンの供給源となる。これに対し、給餌の際のフィチン酸含量を減らすことが進められている。そこで、フィチン酸の分解酵素であるフィターゼで穀物を処理する方法と、フィチン酸含量の低い低フィチン酸穀物を給餌する方法である。フィターゼ処理によりフィチンの3分の1が有効なリンの形態となることが示されており、そのフィターゼの市場は500億円程度になるとRoche社は試算している[3]。フィターゼの添加は排泄する

フィチン酸の低下と餌に添加するリンの低減を可能にするが、コストが高い。これに対して低フィチン酸穀物の開発が進められており、トウモロコシ、オオムギ、イネ、ダイズ等の主要穀物を中心にいくつもの低フィチン酸穀物が開発されてきた。こうした開発は、植物の変異体ライブラリーから低フィチン酸種子を見つけ出したり、その変異した遺伝子情報を元に、遺伝子組換えにより作出したりする方法で行われてきた。一般的な種子中のフィチン酸含量は全リンの75%程度を占めており、乾燥種子重量の数%の重量と言われている（イネ玄米で0.46-1.35%）[4]。一方、低フィチン酸穀物として見出された植物では、例えば全リンの30%がフィチン酸となり、本来フィチン酸に合成されるはずだったリンは無機リン酸や低次元のイノシトールリン酸として存在する。このため、種子に含まれる全リン量はほとんど変化しない。低フィチン酸穀物で家畜を育てれば、フィターゼと無機リンの添加が必要なくなり、家畜糞尿を介した水環境へのフィチン酸流出を低減することになる。しかしながら、低フィチン酸穀物はストレスに若干弱いことが指摘されており、その発芽率や収量が野性型に比べて低下することが報告されている[5][6]。発芽率低下の原因として、抗酸化物質であるフィチン酸が減少したことにより、種子貯蔵時に胚が酸化ストレスを受けることが考えられている[6]。こうした問題に対し、部位特異的や時期特異的な発現抑制が有効と考えられている[7]。また、ターゲット遺伝子の選定も重要である。

フィチン酸の合成

フィチン酸は *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate であり、イノシトールにリン酸が6基リン酸エステル結合した化合物である（図1）。フィチン酸の合成にはその骨格であるイノシトール環が不可欠である。glucose-6-phosphate が inositol-3-phosphate (Ins(3)P) に合成される反応でイノシトール環が形成され、フィチン酸合成の最初のステップとして考えられている。この反応は *myo*-inositol-3-phosphate synthase (MIPS) により触媒される。続くフィチン酸合成の反応は lipid-dependent pathway と lipid-independent pathway の2通りに大別される。Lipid-dependent pathway は酵母を用いた実験で見出された経路であり、細胞膜の phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate が phospholipase C (PLC) により分解され、diacylglycerol と inositol-1,4,5-trisphosphate が生じる。Ins(1,4,5)P₃ は inositol-1,4,5-tris-phosphate kinase (IPK2) と inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase (IPK1) とによりフィチン酸に合成される[8]。Lipid-independent pathway はウキクサ (*Spirodela polyrhiza* L.) を用いた実験で見出された経路であり、Ins(3)P から Ins(3,4)P₂, Ins(3,4,6)P₃, Ins(3,4,5,6)P₄, Ins(1,3,4,5,6)P₅, InsP₆ と連続的にリン酸化する経路である[9]。

これまでに多くの低フィチン酸植物が見出されており、種子におけるフィチン酸合成に重要な遺伝子や酵素、主要な合成経路が判明している。低フィチン酸の研究は主要な穀物であるトウモロコシやダイズやイネ、それに加えてモデル植物であるアラビドプシスで主に行われている。イネやアラビドプシスは単子葉植物と双子葉植物のモデル植物となっており、遺伝子組換え技術、ゲノム情報や過剰発現体ライブラリー、変異体ライブラリーなどデータが豊富で、分子生物学的に研究を進めるには有利である。

イネでは MIPS をコードする遺伝子が *RINO1* と *RINO2* との 2 つ存在することが知られている [10]。そのうち *RINO1* 遺伝子を種子特異的に発現抑制したところ、低フィチン酸種子となった [7]。また、アラビドプシスでは MIPS をコードする遺伝子が 3 つ (*AtIPS1*, *AtIPS2*, *AtIPS3*) 存在しており、それぞれの変異体が見つかったが、フィチン酸含量の低下は起きていない [11]。おそらく、*AtIPS1* および *AtIPS2* との両者の発現が高く、相互に補完するために種子でのフィチン酸含量の低下が起きなかったのだろう [12]。

myo-Inositol kinase (MIK) の変異体はトウモロコシで 2 系統見つかリ *lpa3-1*, *lpa3-2* と命名された [13]。*lpa3-1* はトウモロコシ種子でフィチン酸が最も蓄積する胚において野性型の 46% のフィチン酸含量を示した。また、大腸菌から調製したトウモロコシの MIK は *myo*-inositol を基質として Ins(1 or 3)P, Ins(4 or 6)P にリン酸化する活性を示した [13]。この発見により、遊離のイノシトールからフィチン酸が合成される経路が種子において重要であることが明かとなった。その後、イネでも MIK の変異体が低フィチン酸であることが示されている [14]。

イネでは IPK1 をコードする遺伝子は 1 つしか存在しておらず、その RNAi 抑制体は低フィチン酸種子となった [15]。また、アラビドプシスとダイズとで *IPK1* の変異体が低フィチン酸種子として見つかった [11,16]。

Inositol tris/tetrakisphosphate kinase (ITPK) はイネでは 6 遺伝子あるが、低フィチン酸種子となる変異体は見つからない。一方、アラビドプシスとトウモロコシでは ITPK 変異による低フィチン酸種子が見つかった [11,17]。ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) とアラビドプシスとの ITPK を大腸菌合成され調製したタンパク質で ITPK の活性が調べられている [18–20]。ポテトの ITPK (*StITPK1*) はリン酸化と脱リン酸化の 2 方面の活性を有しており、それぞれ次のような活性を示した：リン酸化；Ins(3,4)P₂ or Ins(3,4,5)P₃ or Ins(1,4,6)P₃ → Ins(1,3,4,6)P₄, Ins(1,3,4) → Ins(1,3,4,5)P₄, Ins(3,4,5)P₃ → Ins(3,4,5,6)P₄；脱リン酸化；Ins(1,3,4,5,6)P₅ → Ins(3,4,5,6)P₄。また、アラビドプシスの ITPK (*AtITPK1*, *AtITPK2*, *AtITPK3*, *AtITPK4*) は次のようなリン酸化活性とイソメラーゼ活性を示した：*AtITPK1*; Ins(1,3,4)P₃ → Ins(1,3,4,5)P₄ or Ins(1,3,4,6)P₄, *AtITPK2* および *AtITPK3*; Ins(1,3,4)P₃ → InsP₄, Ins(1,3,4/3,4,6)P₃ → InsP₄, Ins(3,4,5,6)P₄ → InsP₅, *AtITPK4*; Ins(1,3,4)P₃ → InsP₄, Ins(1,3,4/3,4,6)P₃ → InsP₄, Ins(1,3,4,6)P₄ → InsP₄。低フィチン酸を示したアラビドプシスの ITPK 変異体は *AtITPK1* および *AtITPK4* である。以上のように ITPK の活性は多様である。種子におけるフィチン酸合成において ITPK が重要であることは低フィチン酸種子となることから明らかであり、InsP₃ から InsP₅ までのリン酸化を担っていると信じられている。

リン酸化酵素に加えて、フィチン酸トランスポーターの存在が知られており、その変異体および発現抑制体が低フィチン酸種子となることが知られている [21–24]。種子に蓄積されるフィチン酸は金属イオンと塩を形成し、グロバイドと呼ばれる貯蔵性タンパク質と共に液胞中に蓄積される。フィチン酸トランスポーターの変異により液胞に区画ができなくなり、細胞質中に存在したフィチン酸もしくはフィチンがフィチン酸合成を抑制したと考えられている。

他に、現在提案されているフィチン酸合成経路に当てはまらない酵素をコードする遺伝子の変異により低フィチン酸種子が得られている [25][26]。その遺伝子は超高熱性メタン生産菌由来の 2-tripolyphosphate kinase (2-PGA kinase) が有する P-loop ドメイン (ATP/GTP 結合サイト) とホモロジーがある [26,27]。Phosphatidylinositol (PtdIns) polyphosphate-5-phosphatase は Ins(1,4,5)P₃ の近接するリン酸エステル結合 (4 と 5) を認識し、5 位のリン酸を脱リン酸する。Raboy 氏は本酵素について以下の可能性をレビューにて述べている [28]。2-PGA kinase の産物である 2,3-bisphosphoglycerate はこの認識されるリン酸エステル結合と競合するため、結果として Ins(1,4,5)P₃ の安定化に寄与する可能性がある。このような 2-PGA kinase の機能が種子におけるフィチン酸合成にポジティブな影響をもたらすかもしれない。また他に、Ins(3)P kinase として機能する可能性を述べている。2-PGA および 2,3-bis-PGA が Ins(3)P および Ins(3,4)P₂ と構造

的に似ているためである。これまで、MIK や ITPK、IPK1 とイノシトールリン酸化酵素は報告されているが、いずれも Ins(3)P から InsP₂ を作り出すような活性を示していない。仮に本遺伝子が inositol monophosphate kinase として機能すれば、イノシトールからフィチン酸までのリン酸化経路が一通り説明可能となる。以上のフィチン酸合成経路を図1および表1にまとめた。

これまでフィチン酸合成に関わる酵素とトランスポーターとその遺伝子について述べた。しかしながら、これら遺伝子の発現を制御する機構についてはこれまで報告されておらず、未解明のままである。

種子貯蔵性物質とその蓄積、合成制御

フィチン酸合成に関する転写因子はこれまで報告されていないものの、種子貯蔵物質であるタンパク質、脂質、デンプンの合成制御因子が報告されている。

種子貯蔵性タンパク質は溶解性の違いから3種に分類され、生理食塩水に可溶のグロブリン、アルコールに可溶のプロラミン、難溶性のグルテリンである。イネ種子ではグルテリンが主要なタンパク質であり、胚乳中タンパク質の80%を占めることもある[29]。プロラミンは胚乳中タンパク質の5-10%を占める。グロブリンは胚とアリューロン層に蓄積するタンパク質である[30]。タンパク質の集積は開花後5日以後に始まり、開花後20日ころに最大となる。成熟するまでにわずかに減少するが、ほぼ一定である。グルテリンは開花後5日目から急速に増加し、30日ころに最大となる。グロブリンは開花後5日目から徐々に増加し、開花後30日ころに最大となる。プロラミンは開花後10日目から増加し始め、開花後30日目に最大となる。イネグルテリンの発現は蓄積場所である胚乳で特異的に起こり、そのプロモーター領域には、胚乳特異的発現を示す cis-element の GCN4 と prolamin box (P box) が見つかっている[31][32][33]。GCN4 モチーフを認識する転写因子として RISBZ1(OsbZIP58)が、P box を認識する転写因子として RPBF が明らかになっており、両転写因子によって発現が制御されている[34][31]。

種子貯蔵性脂質はイネの場合、アリューロン層と胚盤組織に蓄積し、デンプン性胚乳には蓄積しない。脂質の蓄積は開花後4日目から急速に行われ、12日目に最大となる[35][36]。1分子のグリセロールに3分子の脂肪酸 (Fatty acid, FA) がアシル基として結合した triacylglycerol (TAG)の形で脂質は存在する。TAG は一層のリン脂質により囲まれており、オレオシンとカレオシンと呼ばれるタンパク質でオイルボディがコートされることで安定化されている[37][38]。TAG の合成は小胞体の膜局在性の酵素により行われており、膜二重層の内部に蓄積され、最終的にはオイルボディとして分離する[39]。FA 合成はプラスチドにて行われる。まず、acetyl-CoA carboxylase (ACCase)によりアセチル CoA からマロニル CoA が生じ、次いで FA 合成酵素複合体により2炭素ずつ伸長する。C16-18 への伸長は acyl carrier protein (ACP)が結合した状態で FA-ACP の状態で行われる。FA-ACP は acyl-ACP hydrolase により FA 単体となる。プラスチドを出て活性型の FA-CoA に変換される。TAG 構築のためのグリセロール骨格はグリセロール3リン酸から生ずる。Acyl-CoA:sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)によりグリセロール3リン酸に FA が1基付き lysophosphatidic acid (LPA)となる。LPA はさらに acyl-CoA:lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT)によりアシル化され、phosphatidic acid (PA)

となる。PAはphosphatidic acid phosphatase (PAP)により脱リン酸され、sn-1,2-diacylglycerol (DAG)となる。最後にdiacylglycerol acyltransferase (DGAT)によりアシル化が行われ、FAがアシル基として3基結合したTAGが合成される。LPA以降のアシル化は小胞体で行われる[40]。これらの反応には多くの酵素が関与しているが、それらを制御する転写因子が報告されている。アラビドプシスの *wrinkled1* 変異体(*wri1*)は種子中の脂質が80%減少し、マイクロアレイの結果からWRI1が脂質蓄積を制御する転写因子であることが示された[41][42]。また、WRI1を制御する転写因子としてLEC2が存在し、LEC2はWRI1を介してFA代謝を制御する[43]。

イネの場合、種子貯蔵性デンプンは胚乳に蓄積する。イネ種子は内穎と外穎の内側に果皮と種皮が薄く存在する。その内側が胚乳であり、アリューロン細胞から成る1-2層のアリューロン層(糊粉層)とデンプン貯蔵細胞から成るデンプン貯蔵柔細胞組織とで構成されている。アリューロン層には一時的にデンプンの蓄積が見られるが、成熟した種子のアリューロン層にデンプンは見られない。デンプン貯蔵柔組織はデンプン粒で充満しており、すき間部分に少量のタンパク顆粒が存在する。デンプンの蓄積は開花後4日目ころから胚乳組織の内部から始まり、徐々に外側の胚乳組織でデンプン蓄積が起こる。15日目ころには内部の細胞はデンプン粒で充満するが、開花後30-35日目に外側の細胞はデンプン粒で充満する。胚乳におけるデンプンの合成にはADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)、granule-bound starch synthase (GBSS)、soluble starch synthase (SS)、starch branching enzyme (BE)、starch debranching enzyme (DBE)といった複数の酵素が必要である[44]。AGPaseはデンプン合成の最初に位置する重要な酵素であり、glucose-1-phosphateとATPとからADP-glucoseとphyrophosphate (PPi)を生成する。AGPaseはヘテロテトラマーの4次構造を形成しており、2つのラージサブユニットと2つのスモールサブユニットとから成る。Starch synthaseはグルコースを直鎖状に伸長する酵素であり、GBSSとSSとを指す。GBSSはイネには2つのアイソフォームがありそれぞれGBSSIとGBSSIIである。GBSSIIは葉などで一時的なデンプン貯蔵時に機能する。GBSSIが胚乳で機能する。SSはイネには4つのアイソフォームがありそれぞれSSI、SSII、SSIII、SSIVである。さらに、登熟種子での発現パターンに基づいてサブグループに分かれており、初期に発現が強い場合はb、後期に発現が強い場合はaとなっている。例えば、SSIIaは登熟後半に発現が強いことを示す。BEは α 1-4結合を切断し、 α 1-6結合にする酵素である。DBEにはisoamylase (ISA)とpullulanase (PUL)と2種類の酵素が存在し、グルコース直鎖の α 1-6結合を加水分解する。近年、イネ種子におけるデンプン合成を制御する2つの転写因子OsbZIP58およびRSR1が明らかになった[45][46]。OsbZIP58は6デンプン合成関連遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を制御する。RSR1はネガティブレギュレーターであり、種子で発現レベルが高くなるデンプン合成関連遺伝子の発現がRSR1の過剰発現により抑制されることを示した。

これまで記したようにフィチン酸以外の主要な種子貯蔵物質の制御機構は一部明らかになりつつある。フィチン酸合成に関連する遺伝子はほぼ明らかになっていることから、デンプン合成の制御因子RSR1の報告であるように、共発現解析やプロモーター領域の解析からアプローチする方法がフィチン酸の制御機構を明らかにする上で有効だと考える。

フィチン酸の機能

フィチン酸は種子貯蔵物質である一方で、生体内の制御に関与することが知られている。

植物の気孔閉口にフィチン酸は関与する[46]。気孔の開閉は孔辺細胞が膨圧の増減により体積を変化させることにより起こり、それは K^+ および対イオンの移動により調節される。気孔を構成する孔辺細胞はABAに応答し、孔辺細胞の細胞質カルシウム濃度が上昇する。上昇したカルシウム濃度は細胞膜のアニオンチャネルを刺激し、孔辺細胞からアニオンが流出する。アニオン流出は細胞膜の脱分極を引き起こし、それに応じて K^+ が K^+ 流出チャネルにより流出することで孔辺細胞の浸透圧が低下する。細胞内浸透圧の低下により細胞が縮小し、気孔が閉口する。また、カルシウム濃度の上昇は、細胞膜に存在し H^+ 流出を能動的に行う H^+ -ATPase輸送体と K^+ 流入チャネルを阻害し、それにより気孔開口、つまり高い浸透圧を維持するのに必要な K^+ およびその対イオンの流入を阻害する。以上のように、ABAは孔辺細胞の開口を阻害する[47]。ABA誘導性のカルシウム濃度上昇には細胞外からの流入と、液胞内から細胞内への放出とがある。液胞内から細胞内への放出にフィチン酸とその前駆体である $Ins(1,4,5)P_3$ がそれぞれ関与する。ABAを感受した孔辺細胞内ではその細胞質中のフィチン酸含量が数分以内に増加することが観察されており、カルシウム依存的に K^+ の流入を阻害する可能性が示されている[48]。アラビドプシスでは液胞膜にはフィチン酸トランスポーターであるAtMRP5が局在しており、その変異体は低フィチン酸種子であるとともに気孔の開口が常に不完全であることが示されている[49]。 $Ins(1,4,5)P_3$ は細胞膜に存在するphosphatidylinositol-4,5-diphosphateがphospholipase C (PLC)によりdiacylglycerol (DAG)と $Ins(1,4,5)P_3$ とに分解されることで生じる。おそらく液胞膜に $Ins(1,4,5)P_3$ のレセプターがあり、 Ca^{2+} の放出につながると考えられている[47][50]。

また、フィチン酸は根の構造に関与すると考えられる。フィチン酸のトランスポーターであるAtMRP5の変異体では根の伸長が抑制され、側根が多く生じた[51]。この変異体ではオーキシン含量が増加しており、AtMRP5もしくはフィチン酸がオーキシンの制御に関与している可能性が指摘されている。

他に、イーストではRNAの核外への輸送、クロマチンリモデリング、テロメアの制御に関与することが知られている[52]。フィチン酸が種子貯蔵時の酸化物質として酸化ストレスから種子を保護していることが示されている[6]。抗ガン作用があるとして、研究が進められている[53]。

種子登熟過程

胚の発生。受粉1日後には2分裂し、分裂を繰り返し3日後にはクワの実状になる。4-5日後には始原生長点や種子根原基の分化が始まる。6日後にかけて生頂点の少し下位から第1葉原基が分化し、8日後には第2葉原基が分化する。同時期に種子根の先端に根冠が分化する。10日後には胚のサイズが急速に大きくなり、第3葉原基も分化する。11-12日後には胚での細胞分裂はほとんど終了し、ゆっくりと発達を進める。25日後ころには胚は形態的にほぼ完成する。それ以降は乾燥縮小し、生理的休眠状態に入る。つまり、およそ10日間で発芽生長能力を備える。

胚乳の形成。受精後、胚乳原核が分裂して2個の胚乳核ができる。このとき、細胞膜を形成す

ることなく、直ちに次の核分裂を繰り返し、胚乳核が急速に増える。胚乳核は周囲に多くの原形質を伴い全体として組織的な多核体として胚乳組織を形成する（これを核期という）。胚乳核は胚嚢の表層部で1層に連なり、胚乳の表層部を形成する。受精3-4日後にはそれぞれの核と原形質とを囲むように細胞膜を一斉に形成し始める。このころ、胚嚢の表層部の胚乳核は並層分裂を行い2層になる。4日後以降は細胞膜を持つ細胞組織となり、細胞分裂により増殖する（細胞期）。中央部に向かい表層部の細胞が増殖し、受精5日後ころに胚乳細胞により胚嚢は埋め立てられる。受精9-10日後に細胞分裂は停止し、胚乳細胞の総数が決定する。その数はおよそ18万個である。同時期に胚の細胞分裂も終了しており、胚と胚乳とは分裂・分化という点で同調的に発達する。

アリュースロン層の分化と発達。胚乳細胞の表層1-2層がアリュースロン細胞に分化する。アリュースロン細胞と胚乳細胞の間にはサブアリュースロン細胞が存在する。これは発達の初期にはややアリュースロン層に似ているが、最終的にはデンプン貯蔵性胚乳になる。

培養細胞の利用

培養細胞は、サンプルの均一性、生育環境の制御、無菌性、高い物質吸収効率、供給サンプルの量といった点でモデル系として優れている。したがって、種々の環境因子の影響における二次代謝産物の合成や遺伝子発現制御について研究するには培養細胞は有益なツールとなる。一方で、組織同士が互いに影響していることは十分に有り得るため、相互作用を含めた解析には植物体を利用すべきである。例えば、イネ種子は内穎と外穎とに玄米が包まれた状態になっており、さらに玄米は果皮と種皮とに被われ、その内側にアリュースロン細胞とデンプン貯蔵細胞とから成る胚乳および胚が存在するが、目的に応じてレーザーマイクロダイセクションなどを用いて純度よく分離し、解析すべきである。

培養細胞を用いた研究は一般的に行われており、特定組織を単離して一時的に培養する場合や *Agrobacterium rhizogenes* 感染による毛上根を培養する場合、脱分化した細胞を継続的に培養する場合がある。培養する細胞により性質が異なるため、目的に応じた細胞が用いられる[54]。食用油の製造に用いられるナタネでは、その小孢子由来胚の培養細胞で脂質合成の研究が行われ、胚での脂質合成にABAが関与していることが示された[55][56]。また、イネでは胚由来培養細胞で、デンプン合成にABAとsucroseとの協調的制御が存在することが示された[57]。

リン回収技術

高濃度にリンが存在する下水などの処理方法にはHAP (hydroxyapatite) 法とMAP (Magnesium Ammonium Phosphate) 法とが知られている。リン酸カルシウム的一种であるヒドロキシアパタイトとリン酸マグネシウムとの結晶としてそれぞれ溶存リンを回収する方法であり、回収されたリン化合物 (HAP と MAP) は肥料や化学原料として有効利用される。島村らはHAP法を用い、リン酸態リンを15.3 mg/L含む水を処理し、0.91 mg/Lにまでリンを除去した。また、さらに低濃度の1.3-2.0 mg/Lの水を処理し、0.20-0.37 mg/Lにまでリンを除去した[121]。このような工学的なリン回収技術は低濃度のリンも回収可能であるが、その一方でコス

トが高いことが懸念される。

工学的な手法に対し、微生物を利用した生物学的手法が研究されている。これは、微生物がポリリン酸を蓄積する能力があることから、その蓄積能力を強化することで微生物に高度にリンを濃縮させ回収する方法である。既に遺伝子変異によりポリリン酸合成能力を強化した微生物を見出している（特願 2002-111281）。

ファイトレメディエーションとリン資源問題

リン回収技術は工学的な手法が実施されているが、高コストであるために、下水や汚泥に比べて低濃度の富栄養湖に実施することは現実的ではない。安価な手法として、植物の栽培・回収により富栄養湖からリンを除去する試みがあり、一部で行われている。このように、植物を利用した環境浄化をファイトレメディエーションと呼ぶ。

茨城県土浦市では平成 2 年から平成 20 年の間、水生植物のホテイアオイを霞ヶ浦に流入する河川で栽培し、ホテイアオイ、窒素、リンの回収量を報告している。それによれば、ホテイアオイ湿重量あたり 0.018% のリンを保有し、1200m² の栽培面積で 53t のホテイアオイと 7.8 kg のリンを回収した。霞ヶ浦の水量は 0.8×10^{12} L であり、全リン濃度は 8 月の湖心で 0.11 mg/L であることから、水中の全リン量は 88000 kg と算出される。ホテイアオイで回収したリンは 0.0089% と極微量である。霞ヶ浦の面積は 220km² であるため、栽培面積をさらに増やすことは可能だろうが、回収するホテイアオイの重量も増加する。土浦市は回収したホテイアオイを緑肥として配布した。しかし、リン含量が 0.018-0.028% であり、鶏糞などの堆肥のリン含量は数% である点から、リン肥料としての効果は期待できず、また、緑肥としての価値は極めて低い。

そこで、富栄養湖からリンを効率よく回収し、肥料としての 2 次利用を可能にするため、高フィチン植物の開発を提案する。不溶性の塩であるフィチンは、細胞質の組成に及ぼす影響が少なく、種子に蓄積されているとおりに保存形態として優れている。葉などの栄養細胞では種子のようにフィチンを蓄積することはないが、仮に積極的に蓄積できれば、フィチンとしてリンを多量に保持した植物が得られるだろう。したがって、富栄養湖のように低濃度・広範囲に拡散したリンに対し、高フィチン植物は優れたリン浄化植物になると期待できる。

低濃度に散在するリンの回収は今後の食料の安定供給にも役立つことが期待できる。近年の急激な人口増加に伴い、食料需要は必然的に増加している。この食料生産を支える重要なファクターの一つが肥料であり、リン、窒素、カリウムが植物の三大要素である。リン肥料はリン鉱石を加工して得られるが、そのリン鉱石の埋蔵量は偏っており、特にモロッコに多く、中国、アメリカにも多い。年間産出量はモロッコ、中国、アメリカの三国だけでおよそ 70% を占めており、石油同様にリン資源は戦略的な価値を持つ。CEEP（ヨーロッパ化学工学評議会とリン酸工業協会の主催する団体）はリン鉱石枯渇のシナリオを次のようにまとめている。「リン酸肥料の消費が年間 3% ずつ増加すると過程した場合に、経済的に採掘できるリン鉱石は 2060 年代にすべて枯渇する」[58]。このシナリオには採掘技術の向上やリン再回収技術の発達を組み込まれていない。このシナリオを回避するためにも安価な採掘技術や、これまでにリン鉱石として採掘され各地にリン肥料として拡散した希薄なリンを回収、利用する技術の向上が求められる。こうした背

景から、高フィチン植物は優れたリン回収植物としても有益である。

高フィチン植物の作出には合成系全体を活性化させるような転写因子をコントロールすることが適切だと考える。なぜなら、種子蓄積物質である脂質やタンパク質を制御する転写因子を幼植物で強制的に発現させた場合に、その種子貯蔵性脂質を蓄積した報告があるためである [59][60]。しかしながら、これまでに世界中の多くの研究者が低フィチン酸変異体のスクリーニングを行ってきたにも関わらず、フィチン酸合成に関与する転写因子は見出せていない。本研究では、フィチン酸合成を制御する環境要因を探り、同時に培養細胞によるモデル系を確立し、共発現解析と培養系を利用した制御因子の探索を試みた。最後には、培養細胞の遺伝子発現特性を調べ、フィチン酸合成制御機構について言及した。

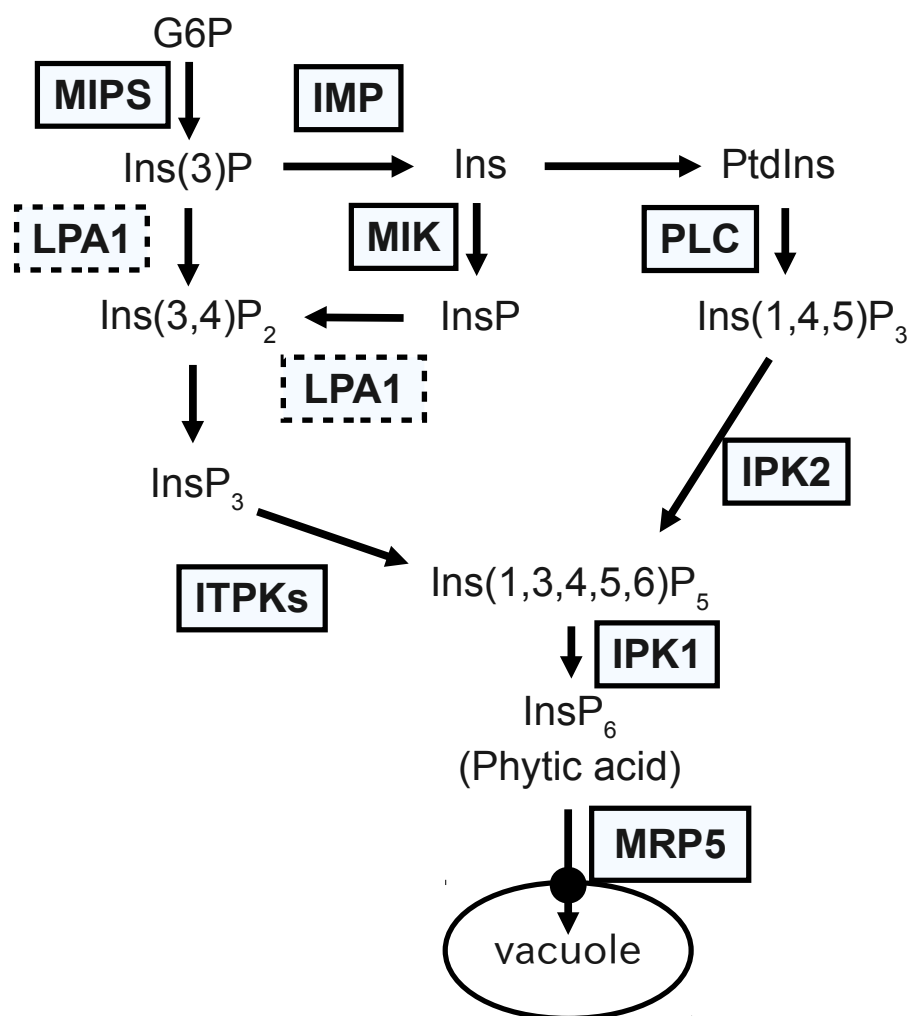


図1 フィチン酸合成経路

lipid-independent 経路（左側）と lipid-dependent 経路（右側）とでフィチン酸は合成される。G6P から始まり、最終的に液胞に貯蔵される。LPA1 はその機能が不明瞭であり、ここでは Raboy 氏の仮説に従い配置した。G6P; glucose-6-phosphate, Ins; inositol, PtdIns; Phosphatidyl inositol, MIPS; *myo*-inositol phosphate synthase, IMP; inositol monophosphate phosphatase, MIK; *myo*-inositol kinase, ITPK1; inositol trisphosphate kinase, IPK1; inositol pentakisphosphate kinase, MRP5; phytic acid transporter, LPA1; 2-tripolyphosphate kinase.

表1 イネのフィチン酸合成関連遺伝子

| Gene | coding protein | Accession # |
|--------------|------------------------------------|-------------|
| <i>RINO1</i> | Myo-Inositol phosphate synthase | AK103501 |
| <i>RINO2</i> | Myo-Inositol phosphate synthase | AK100872 |
| <i>IMP1</i> | Inositol monophosphate phosphatase | AK071149 |
| <i>IMP2</i> | Inositol monophosphate phosphatase | AK103039 |
| <i>MIK</i> | <i>myo</i> -inositol kinase | AK243444 |
| <i>ITPK1</i> | Inositol trisphosphate kinase | AK106544 |
| <i>ITPK2</i> | Inositol trisphosphate kinase | AK100971 |
| <i>ITPK3</i> | Inositol trisphosphate kinase | AK067068 |
| <i>ITPK4</i> | Inositol trisphosphate kinase | AK071209 |
| <i>ITPK5</i> | Inositol trisphosphate kinase | AK059148 |
| <i>ITPK6</i> | Inositol trisphosphate kinase | AK102571 |
| <i>IPK1</i> | Inositol pentakisphosphate kinase | AK102842 |
| <i>IPK2</i> | Inositol pentakisphosphate kinase | AK072296 |
| <i>MRP5</i> | Phytic acid transporter | AK121451 |
| <i>LPA1</i> | 2-Tripolyphosphate kinase | AK100921 |

第2章 フィチン酸高蓄積培養細胞培養系の開発

2-1 緒言

フィチン酸合成に関する研究は、種子における発現解析や変異体や発現抑制体の解析が行われてきた[10,16,17,22,25,26,61]。それにより、種子におけるフィチン酸合成で重要な役割を担う酵素が明らかになり、複数あるアイフォームのうち、重要な遺伝子が明らかになってきた。しかしながら、それら遺伝子にどのような制御が働いているかは明らかにされていない。イネ種子ではアリューロン層にフィチン蓄積が蓄積する[62]。アリューロン層は薄層であり、解析し難い。培養細胞はサンプルの調製が容易であり、環境を一定に制御でき、環境変化の影響を評価しやすいため、制御因子の研究に適している。そこで、培養細胞をモデルとして、フィチン酸合成を制御する因子を明らかにし、その制御を解析することにした。

イネ種子登熟の過程において、開花後 7-20 日の間にフィチン酸が蓄積し、同時期に sucrose 濃度と ABA 濃度が上昇することが知られている。さらに、イネ培養細胞では、sucrose と ABA との協調的制御によりフィチン酸合成関連遺伝子である *RINO1* が高発現し、また、種子蓄積物質であるデンプン合成が活性化される[63][57]。このことからフィチン酸も sucrose と ABA とに制御されている可能性が考えられた。これまでに、ABA 処理したウキクサ (*Spirodela polyrrhiza*) でフィチン酸を含むイノシトール化合物の含量が増加したことが報告されており、ABA によるフィチン酸合成制御の可能性は高い[64]。

本章ではイネ培養細胞を様々な濃度の ABA 存在下で培養し、ABA とフィチン酸との関係を調べた。また、フィチン酸の基質である sucrose とリンを高濃度で添加し、フィチン酸合成が促進されるかを調べた。最後に、ABA 誘導によるフィチン酸蓄積の経時的変化およびフィチン酸合成関連遺伝子の発現解析を行った。

2-2 材料と方法

イネ培養細胞の誘導と懸濁培養

滅菌したイネ種子から培養細胞を誘導した後、液体培地にて懸濁培養を行った。イネ種子には *Oryza sativa* spp *japonica* cv.Nipponbare を用いた。脱穀した種子を 70% EtOH に懸濁した後、次亜塩素酸ナトリウム (和光純薬工業) に 20 分浸漬し、滅菌水で種子を 5 回洗浄することで種子を滅菌した。N6 固体培地(2 mg/L 2,4-D、3% sucrose、0.3% Gellum Gum を含む。pH5.7)上に置床し、28°C 暗黒条件下で培養した。3 週間後、20 mL の N6 液体培地 (1 mg/L 2,4-D、3% sucrose、pH5.7)が入った 100 mL のフラスコに移し、28°C、暗黒条件下、115 stroke per min で振盪培養した。5 日ごとに継代を繰り返した。

培養細胞のサンプリング

sucrose と無機リン酸とがフィチン酸含量に及ぼす影響を調べるため、前培養として、滅菌したステンレス製メッシュ (開口 1.5 mm) を通過した培養細胞を新鮮な N6 液体培地 (1 mg/L 2,4-D、3% sucrose、2.9 mM Pi)に移して 2 日間振盪培養を行った。本培養では、メッシュ (開口 1.75 mm) を通過した培養細胞を N6 液体培地(1 mg/L 2,4-D、3% sucrose、2.9 mM Pi)に移し、スターラーで攪拌しながら、100 mL のフラスコに 10 mL ずつ分注した。室温(27°C)、暗黒条件

下、115 stroke per min で振盪培養した。24 時間培養し、5mL の培地を加えることで6 条件の培地を調製した (表 2)。さらに 24 時間培養し、培養細胞をサンプリングした。培養細胞はろ紙 (ADVANTEC、3A、55 mm) を用いて吸引ろ過し、80°C で 24 時間以上乾燥させた。

フィチン酸蓄積に及ぼす ABA の影響を評価するため、上述のように 2 日間の前培養を行った。2 日後、別のメッシュ (開口 1.75 mm) を通過した培養細胞を N6 液体培地 (1 mg/L 2,4-D、3% sucrose、2.9 mM Pi) に移し、スターラーで攪拌しながら、100 mL のフラスコに 15 mL ずつ分注した。室温 (27°C)、暗黒条件下、115 stroke per min で振盪培養した。24 時間の培養の後、10mM ABA を 0-50 μ M となるように培地に添加し、さらに 24 時間培養した。上述の様に培養細胞をサンプリングし、乾燥させた。

ABA 添加後のフィチン酸蓄積量の変化を経時的に調べるため、上述のように 2 日間の前培養を行った。本培養では、上述の様にメッシュを通過した培養細胞を N6 液体培地 (1 mg/L 2,4-D、3% sucrose、2.9 mM Pi) に移し、スターラーで攪拌しながら、100 mL のフラスコに 15 mL ずつ分注した。上述同様に 24 時間培養し、17 μ M ABA となるように 10 mM ABA を添加した。添加後 0-144 時間培養し、その培養液と培養細胞を 24 時間毎にサンプリングし、培養細胞は 80°C で 24 時間以上乾燥させた。また、ABA 添加後 24 時間以内のフィチン酸の蓄積量測定およびフィチン酸合成関連遺伝子の発現解析を行うため、同様の培養を行い、0 分、15 分、40 分、90 分、4 時間、9 時間、16 時間、24 時間でサンプリングした。フィチン酸蓄積量測定用に培養細胞を乾燥させ、発現解析用に吸引ろ過直後に液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。

培養液中の無機リン酸の測定、培養細胞中のフィチン酸および無機リン酸の測定

得られた培養液はモリブデンブルー比色定量法にて無機リン酸濃度を測定した [65]。2.5 M 硫酸、32.4 mM モリブデン酸アンモニウム ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) 水溶液、4.11 mM 酒石酸アンチモニルカリウム (C₈H₄K₂O₁₂Sb₂) 水溶液、0.1 M アスコルビン酸水溶液 (用時調整) を 10:3:1:6 で混合し、発色試薬とした。培養液は室温で 3000 rpm、3 分間遠心し、上澄みを適当に希釈して測定した。試料 1 mL に発色試薬 200 μ L を加え、混和後 10 分間静置し、880 nm の吸光度を測定した。0-40 μ M KH₂PO₄ 水溶液を用いて、発色試薬調製ごとに検量線を作成した。作成した検量線から培養液の無機リン酸濃度を算出した。

培養細胞中のフィチン酸は HCl で抽出後、鉄-フィチン酸キレート (Fe-IP₆) 沈殿として精製した [66][67]。得られた Fe-IP₆ 沈殿を無機リン酸とイノシトールとに分解し、モリブデンブルー比色定量法にて無機リン酸を定量することで、培養細胞中のフィチン酸量を算出した。乾燥重量 10-12 mg の培養細胞をジルコニウムビーズ (ϕ 5 mm) により粉碎し、2.4% HCl 1 mL を加え、100°C に 15 分間静置することでフィチン酸の抽出を行った。室温で 15000 rpm、10 分間遠心後、フィチン酸粗抽出液 (SUP) として上清を得た。120 μ L の SUP を 4°C に保存し、後に無機リン酸の定量に用いた。500 μ L の SUP は 1% FeCl₃ · 6H₂O / 1.0 N HCl 300 μ L と混和後、100°C に 45 分間静置した。室温で 15 分間冷ました後、4°C で 15000 rpm、15 分間遠心した。Fe-IP₆ 沈殿を 400 μ L の 0.5 N HCl に懸濁し、室温で 2 時間静置することで、Fe-IP₆ 沈殿以外のリン酸化合物を溶解した。2 時間静置後、4°C で 15000 rpm、10 分間遠心し、上清を除去した。沈殿に 200 μ L

の 0.5 N HCl を加え、10 分間静置した後、4°C で 15000 rpm、15 分間遠心、上清を除去することでリンスとした。同様のリンスを合計 2 回行った後、沈殿に 1.5 N NaOH 300 μ L と DW 700 μ L とを加え、100°C に 15 分間静置した。室温で 15 分間冷ました後、4°C で 15000 rpm、10 分間遠心、上清をフィチン酸抽出液(PPT)として得た。PPT は終濃度 2.0 N HCl 溶液とし、それぞれガラス管に封入した。110°C に 24 時間静置することでフィチン酸を無機リン酸とイノシトールとに加水分解した。加水分解した PPT (PPT-H) と及び SUP はモリブデンブルー比色定量法にて無機リン酸を定量した。希釈後の試料の pH によっては発色反応が安定しないので、希釈と同時に中和した。PPT-H、SUP の無機リン酸濃度からそれぞれ培養細胞中のフィチン酸、培養細胞中の無機リン酸を算出した。

RNA 抽出

凍結したままのイネ培養細胞 50 mg を 50°C に温めておいた ISOGEN (NipponGene) 1mL に加え、直ちにマイクロホモジナイザー(マイクロテックニチオン)を用いて 30 秒間ホモジナイズした。その後、50°C の恒温槽に 10-18 分静置した。恒温槽から取り出し、室温で 15000 rpm、3 分間の遠心をした。上澄み 900 μ L を別の 1.5 mL チューブに移し、クロロホルム 180 μ L を加え、1 分間ボルテックスした。室温で 2-20 分静置後、4°C で 15000 rpm、10 分間遠心した。上層 350 μ L を新しい 1.5 mL チューブに移し、等量のイソプロパノールを加えた。15 秒間のボルテックスの後、4°C に 10 分間静置した。4°C で 15000 rpm、10 分間遠心し、上澄みを除去した。沈殿を 70% エタノールでリンスし、4°C で 15000 rpm、10 分間遠心し、上澄みを除去した。沈殿を 3 分間真空乾燥させた後、DEPC 処理水 100 μ L を加え、15 秒間ボルテックス、60°C の恒温槽に 5 分間静置することで沈殿を完全に溶解した。10 M LiCl 25 μ L を添加した後、-20°C に一晩静置した。4°C で 15000 rpm、10 分間遠心後、上澄みを除去した。沈殿を 70% エタノールでリンスし、4°C で 15000 rpm、10 分間遠心した。上澄みを除去し、3 分間真空乾燥させた後、RNase-Free Water(NipponGene) 50 μ L を加え、15 秒間ボルテックス、60°C の恒温槽に 5 分間静置することで沈殿を完全に溶解した。得られた全 RNA 溶液は純度と濃度を確認するために、100 倍希釈し 260 nm と 280 nm との吸光度を測定し、全 RNA 2 μ g を電気泳動することで分解されていないことを確認した。分解していないこと確認後、Recombinant DNase I (TaKaRa Bio)を使用して全 RNA からゲノム DNA を除去した。操作はマニュアル通りに行った。

相対定量 RT-PCR

全 RNA 0.5 μ g を PrimeScript[®] RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio)を用いて逆転写し、cDNA を得た。操作はマニュアル通り行った。20 倍希釈した cDNA をテンプレートに、Table 3 に示すプライマーで qPCR を行った。酵素には SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa Bio)を用いた。検量線法により発現量を算出したのち、OsAct1 を内部標準、ABA 添加直前を基準として相対発現量を算出した。

2-3 結果

ABA, sucrose、無機リン酸がフィチン酸蓄積に及ぼす影響

ABA, sucrose, 無機リン酸とがフィチン酸含量に及ぼす影響を調べるため、通常の培養液に比べて3倍高濃度の9% sucrose と 8.8 mM KH_2PO_4 とにおけるフィチン酸含量と無機リン酸含量を調べた(図2)。条件S1とS2とでは、フィチン酸含量は7.91 nmol/mg (C1の89%) と 14.2 nmol/mg (C2の74%) であり、高濃度 sucrose によりフィチン酸含量は減少した(図2A)。無機リン酸含量もまた、170 nmol/mg (C1の88%)、98 nmol/mg (C2の86%) と高濃度 sucrose でそれぞれ減少した(図2B)。条件P1とP2とでは、フィチン酸含量において差は見られなかった(図2A)。一方、無機リン酸含量は上昇し、P1で224 nmol/mg (C1の115%)、P2で135 nmol/mg (C2の118%) を示した(図2B)。

ABA 濃度とフィチン酸含量の関係

フィチン酸含量がABA処理により上昇したため、その濃度とフィチン酸含量との関係を調べた。培地を交換してから24時間後にABAを添加し、0-50 μM ABAとした後さらに24時間培養した(図3)。フィチン酸含量は0 μM ABA(未添加)において7.4 nmol/mg、50 μM ABAにおいて18.8 nmol/mgであり、ABA濃度増加に伴い2.5倍にまで上昇した(図3A)。培養細胞中の無機リン酸含量は0 μM ABAにおいて200 nmol/mg、50 μM ABAにおいて132 nmol/mgであり、ABA濃度増加に伴い66%にまで減少した(図3B)。フィチン酸含量を6倍することでフィチン酸態リンを求め、無機リン酸との和を求めた(図3C)。その結果、フィチン酸含量と無機リン酸含量とはそれぞれABAにより増減したものの、両者のリンの和はABA濃度に因らず一定だった。

ABA 添加後のフィチン酸含量経時変化

継代24時間後、17 μM ABAになるように10 mM ABAを添加し、フィチン酸蓄積量の変化を経時的に調べた。ABAの添加・未添加で乾燥重量に変化はなかった(図4A)。水分含量はABAを添加しない場合には5.2 mg/mgから6.5 mg/mgにまで徐々に増加し、ABAを添加した場合には添加72時間後にかけて4.7 mg/mgにまで減少した(図4B)。その後水分含量は回復に向かった。培地の無機リン酸濃度はABAの添加・未添加で違いは見られなかった(図4C)。ABA添加・未添加の両方で96時間以降には培地無機リン酸濃度が5-8 μM を示した。これまでの無機リン酸の吸収量を考えると、リン酸欠乏状態と考えられる。フィチン酸含量は0時間時点で4.4 nmol/mgであった。フィチン酸含量は、ABA添加により14.9 nmol/mg、18.8 nmol/mg、22.2 nmol/mgと最初の24時間で大きく増加し、添加72時間後まで増加した。その後、フィチン酸含量は減少した。ABA未添加では、72時間後までフィチン酸含量が増加し、8.5 nmol/mgになった。無機リン酸含量は0時間時点で203 nmol/mgであったが、ABA添加により138 nmol/mg、122 nmol/mg、117 nmol/mgと最初の24時間で大きく減少し、その後添加72時間時点までわずかに減少した。72時間以降はさらに減少し、144時間時点で61.5 nmol/mgにまで減少した。ABA未添加では、72時間時点までおよそ200 nmol/mgと一定であったが、72時間以降

は減少し、120 時間時点で 135 nmol/mg になった。ABA 添加によりフィチン酸含量が上昇し、無機リン酸含量が減少したものの、フィチン酸態リンと無機リン酸の和は ABA 添加・未添加に因らず同じような経時変化であった。

ABA 添加後の最初の 24 時間をもっともフィチン酸含量の増加が大きかった。そのため、最初の 24 時間のフィチン酸含量の変化を調べた。ABA 添加後 40 分、90 分、4 時間、9 時間、16 時間、24 時間のフィチン酸含量と無機リン酸含量を測定した。ABA 添加 9 時間後にフィチン酸含量は 8.68 nmol/mg となり、未添加の同時間と比べ有意なフィチン酸含量の増加を示した (図 5A)。無機リン酸含量は 0 時間時点で 184 nmol/mg であり、ABA 未添加の場合には 24 時間時点で 201 nmol/mg とわずかに上昇した (図 5B)。一方で、ABA 添加の場合には、添加 9 時間後に 155 nmol/mg と減少し、16 時間後には 123 nmol/mg にまで減少した。フィチン酸態リンと無機リン酸との和は ABA 添加後 16 時間において ABA 添加、未添加でそれぞれ 192 nmol/mg、242 nmol/mg と、両者の間に差が生じた (図 5C)。24 時間後には差は見られなくなった。

培養細胞における ABA 添加後のフィチン酸合成関連遺伝子の発現解析

ABA 添加後の培養細胞に対し、フィチン酸合成関連遺伝子の発現解析を行った (図 6)。

15 遺伝子のうち、12 遺伝子 (*RINO1*, *MIK*, *IMP1*, *ITPK1*, *ITPK2*, *ITPK3*, *ITPK4*, *ITPK6*, *IPK1*, *IPK2*, *MRP5*, *LPA1*) が ABA 添加に反応した。そのうち、4 遺伝子 (*IMP1*, *ITPK2*, *ITPK3*, *MRP5*) が一時的な増加であり、7 遺伝子 (*RINO1*, *MIK*, *ITPK4*, *ITPK4*, *ITPK6*, *IPK1*, *LPA1*) が持続的にコントロールより高い発現を示した。また、*IPK2* は ABA 添加により発現量が減少した。ABA 添加により発現量が増加した場合には、添加後 40 分から 4 時間の間に発現量のピークが見られたが、その時間に違いがあった。*MIK*, *ITPK1*, *ITPK2* は ABA 添加 90 分後に、*IMP1* は ABA 添加 4 時間後にピークが見られた。*ITPK3*, *ITPK4*, *ITPK6*, *IPK1*, *MRP5*, *LPA1* は 40 分から 90 分にピークが見られ、*RINO1* は 90 分から 4 時間にピークが見られた。

2-4 考察

種子の登熟過程で ABA が蓄積されることが知られており、イネでは開花後から ABA 濃度が上昇し始め、開花後 14-21 日目に最大になることが報告されている [68][69]。また、イネ種子におけるフィチン酸蓄積は開花後 7 日目から 20 日目の間にアリュロン層にて起こる [70][62]。本研究では、培地中 ABA 濃度の増加と共に培養細胞中のフィチン酸含量が増加し、フィチン酸合成が ABA 濃度によって制御されていることを示した。この結果は、登熟種子のフィチン酸合成においても ABA 濃度がフィチン酸合成を制御している可能性を強く示している。

ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) の培養細胞は高濃度無機リン酸によりフィチン酸含量が増加することを示し、培養細胞の無機リン酸含量がフィチン酸含量に影響することを示唆した [71]。本研究では通常の 3 倍濃度の無機リン酸濃度を加え、無機リン酸含量はわずかに増加したもののフィチン酸含量に影響は見られなかった。この差は、両者の培養条件の違いが関係したと考える。イネ培養細胞ではおそらく継代期間が短いために Pi 含量が高く (ニチニチソウの通常培養の 10 倍以上)、PA 含量もまた高 (ニチニチソウの通常培養の 50 倍以上) だった。イネ細

胞を高濃度 Pi 培地で培養したときに PA 含量への影響がなかったのは、Pi 含量が既に十分に高くあまり上昇しなかったためだろう (図 2)。長時間の培養では培地中 Pi が不足した後に Pi 含量が減少し、ABA 処理した細胞の PA 含量が有意に減少した (図 4C, 4D)。それ故、ニチニチソウでみられた Pi 含量と PA 含量と間の比例関係はイネ培養細胞でも存在する考える。しかし、培養条件が違うためにイネ培養細胞の Pi 含量及び PA 含量が常に高く、Pi 高濃度としたときにはその関係が現れなかったと考える。

ABA を添加した培養細胞では、フィチン酸含量が増加した一方で、無機リン酸含量が減少した。しかし、ABA 添加と未添加との細胞の間でリンの物質レベルで差は生じなかった (図 3C、図 4F)。このようなリンの物質レベルでの保存は、これまでに報告されてきた多数の低フィチン酸種子でも示されてきた [22][72][73][74]。つまり、フィチン酸合成関連遺伝子の変異や RNAi 抑制によるフィチン酸含量の減少の一方で、低次のイノシトールリン酸や無機リン酸の含量が上昇することで種子に含まれる全リン量は大きく変化しなかった。本培養系も含めこれらのことは、フィチン酸含量の変化はリンの流入量には影響しないことを示している。この事実は、低フィチン酸植物の作出においては望まれる現象である。富栄養化の原因物質である穀物中のフィチンが減少し、その一方で栄養として添加しているリンを減らせるからである。一方で、フィチン酸高蓄積によるリン回収植物の作出に対しては不都合な真実に思える。栄養細胞に含まれる無機リンを強制的にフィチン酸に変換したところでその細胞への流入量は変化しない可能性がある。しかしながら、フィチン酸合成に伴いリンが減少することで植物細胞がリン飢餓応答を示す可能性もまた存在する。後者の場合には、期待しているようなリン回収植物となるだろう。

Bromegrass (イネ科スズメノチャヒキ属の雑草) の培養細胞は、75 μ M ABA 存在下で培養した場合に非存在下と比較して、細胞増殖速度と乾燥重量当たりの水分含量が減少した。その一方で、細胞当たりの水分含量に変化はなく、細胞当たりの乾燥重量が増加した [75]。おそらく、本研究においても同様の作用がみられたと推測される。つまり、ABA 存在下では細胞増殖速度の低下と細胞数当たりの乾燥重量の増加とが起き、結果として ABA 存在下と非存在下との間で乾燥重量に変化が見られなかったと考える (図 4A、4B)。この場合、ABA 存在下の培養細胞は細胞 1 個あたりの乾燥重量が増加したということであるから、何らかの物質を細胞に蓄積したことになる。フィチン酸の蓄積は本章で確認し、さらに本培養条件でデンプンが合成・蓄積されることが報告されている [57]。フィチン酸とデンプンは種子蓄積物質として知られており、その合成時期も似ている。その他の種子蓄積物質はたんぱく質や脂質であり、これらは抗 ABA 抗体を用いて登熟過程の ABA の機能を阻害した場合にその蓄積が見られなくなった [76]。また、LEA (late embryogenesis abundant) タンパク質の多くが ABA により誘導されることが知られている [77]。したがって、ABA 処理によりフィチン酸以外にもデンプン、貯蔵性脂質、貯蔵性タンパク質、など多数の化合物が含まれていることが考えられる。

これまでにイネでは 15 遺伝子 (表 1) がフィチン酸合成に関連する遺伝子として報告されており、本研究ではそれら 15 遺伝子をフィチン酸合成関連遺伝子として発現解析に用いた [10][14][26][23]。15 遺伝子のうち、*RINO1*, *MIK*, *IPK1*, *MRP5*, *LPA1* に関してはその変異体や発現抑制体が低フィチン酸種子となっており、種子でのフィチン酸合成に関与することがわかって

いる[23][14,26][7]。アラビドプシスとトウモロコシでは ITPK の変異体が低フィチン酸種子となっており、イネ種子においても ITPK がフィチン酸合成に関与することが考えられる[17][11]。イネで確認される 6 種のアイソフォームの変異体もしくは発現抑制が低フィチン酸種子となる報告はまだない。しかし、*ITPK4* と *ITPK6* とが登熟種子において発現が高められることからイネでは *ITPK4* と *ITPK6* とが種子でのフィチン酸合成に関与すると考えられている[10]。

本研究では培養細胞に ABA を与え、ABA 添加後の最初の 24 時間でもっともフィチン酸合成が活性化した (図 4)。そのフィチン酸合成制御を明らかにするため、最初の 24 時間に注目し、デンプン含量の蓄積量測定、フィチン酸合成関連遺伝子の発現解析を行った (図 5、6)。イネ種子でのフィチン酸合成に関与する 7 遺伝子のうち *MRP5* を除く 6 遺伝子 (*RINO1*, *MIK*, *ITPK4*, *ITPK6*, *IPK1*, *LPA1*) が ABA 添加後に継続的にコントロールより高い発現を示した。ABA 添加によるフィチン酸含量の増加は添加 9 時間後に明確に現れ、72 時間後まで高いフィチン酸合成能力を示した (図 4、5)。先ほどの 6 遺伝子は 40 分から 90 分にピークを示しており、その後も継続的に高い発現をしていることから、ABA 添加後のフィチン酸合成に関与した可能性が高い。この 6 遺伝子はイネ種子におけるフィチン酸合成に関与すると考えられているが、登熟種子では ABA が高濃度となる時期とフィチン酸が蓄積する時期とが一致しており、登熟種子においても ABA 濃度の増加によりフィチン酸合成が活性化される可能性が高い。つまり、本培養細胞で ABA により活性化したフィチン酸合成制御機構は登熟種子のフィチン酸合成制御機構を模倣している可能性を示している。

表2 qRT-PCR に使用したプライマー

| Gene | Accession number | Primer (5' → 3') | |
|----------------|------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | F | R |
| <i>RINO1</i> | AK103501 | GCGAATGGGATGGAGCAAGAAAG | AGTCTCACACAAAGCACAGAAGGT |
| <i>RINO2</i> | AK100872 | ACAAGAGGCCAAGTGGGGAAG | AGTGTCAAAGTGTCAATAGATGCC |
| <i>OsIMP1</i> | AK071149 | CTTCGGGAAGCTGGTGGTTTTG | TGTTTGATCCTGCCATTCTTCGTG |
| <i>OsIMP2</i> | AK103039 | CCGTCTTTGATCGTTCTGTCCTTG | AAGTCGGTAGGGTATTTGTCGGG |
| <i>OsMIK</i> | AK243444 | ATCTGTGTAAACACATGACCCAACA | TTCTGCACTCAGCGATTCCCA |
| <i>OsITPK1</i> | AK106544 | GGTCAAGGAGATGTTAGCTTTGAGG | TTACACAGGTTGGGCACGGA |
| <i>OsITPK2</i> | AK100971 | CGGCTGAAGTGCAAAGAGTCC | GCCACCATTTTCTGGGAAGACAC |
| <i>OsITPK3</i> | AK067068 | TCATGCGAGGGGTGAAACGA | TGATGCCCAACTTTACCACGGA |
| <i>OsITPK4</i> | AK071209 | CCGACCCAGCGTTTGAACA | GGTTTAGCTTGCACTTGTAGCATTT |
| <i>OsITPK5</i> | AK059148 | TGATGAGGGGAATAGCGAGCAAG | AGGATTTACACCGCAGGTAGGG |
| <i>OsITPK6</i> | AK102571 | GCATACAGGCGACAACATTCATAC | TCATCGCAAGCAGTTCACAAATC |
| <i>OsIPK1</i> | AK102842 | GTTTCAGCTCCAACATTGACGACC | TGGACATGCACACTTGTAGAAACAC |
| <i>OsIPK2</i> | AK072296 | CGGTAACGTAAATGCGAAGCGA | AGTAAGATCCAATGCACCCCGAA |
| <i>OsMRP5</i> | AK121451 | CCCAGCCAAAATTCACCTCGCTC | CTCCTCTCACCAACTCCCTCAAC |
| <i>OsLPA1</i> | AK100921 | AAAACAAATCCAAAAGCGAAGACCC | TCTCGGCGTCCTCTTCTACC |
| <i>OsAct1</i> | AK100267 | CCCAAGGCCAATCGTGAGAAG | ACCATCACCAGAGTCCAACACAA |

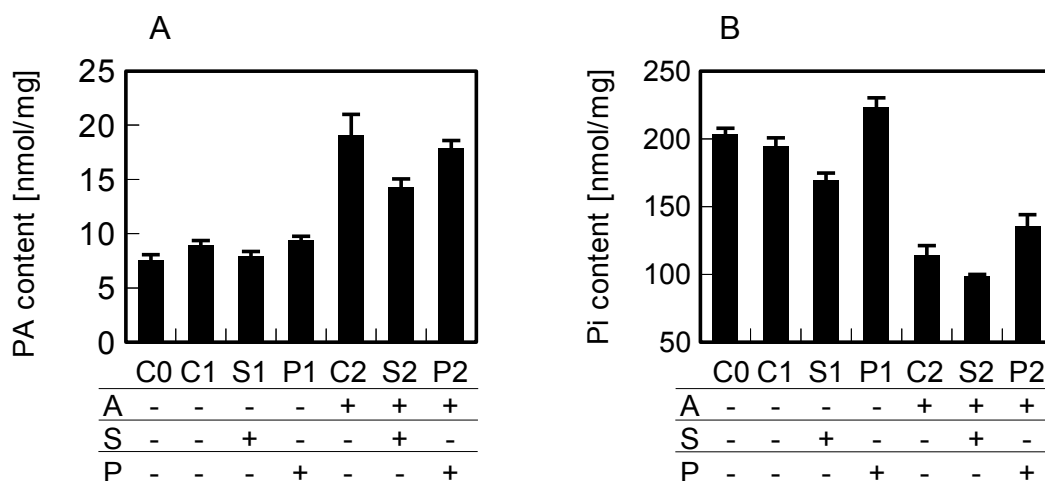


図2. Sucrose と無機リン酸がフィチン酸含量に及ぼす影響

10 mL の培地で培養した後、5 mL の培地を添加することで6条件（Table 2）の培地を調製した。添加24時間後に培養細胞を回収し、フィチン酸含量（A）と無機リン酸含量（B）を測定した。C0は10 mLの培地で24時間培養したのち、新たに培地を添加することなく培養細胞を回収し、測定した。

表3 培地条件

Sucrose と無機リン酸がフィチン酸含量に及ぼす影響を調べるため、10 mL の培地に5 mL の培地を添加することで6条件の培地を調製した。

| | ABA | sucrose | Pi |
|----|------------|---------|--------|
| C1 | 0 μ M | 3% | 2.9 mM |
| S1 | 0 μ M | 9% | 2.9 mM |
| P1 | 0 μ M | 3% | 8.8 mM |
| C2 | 17 μ M | 3% | 2.9 mM |
| S2 | 17 μ M | 9% | 2.9 mM |
| P2 | 17 μ M | 3% | 8.8 mM |

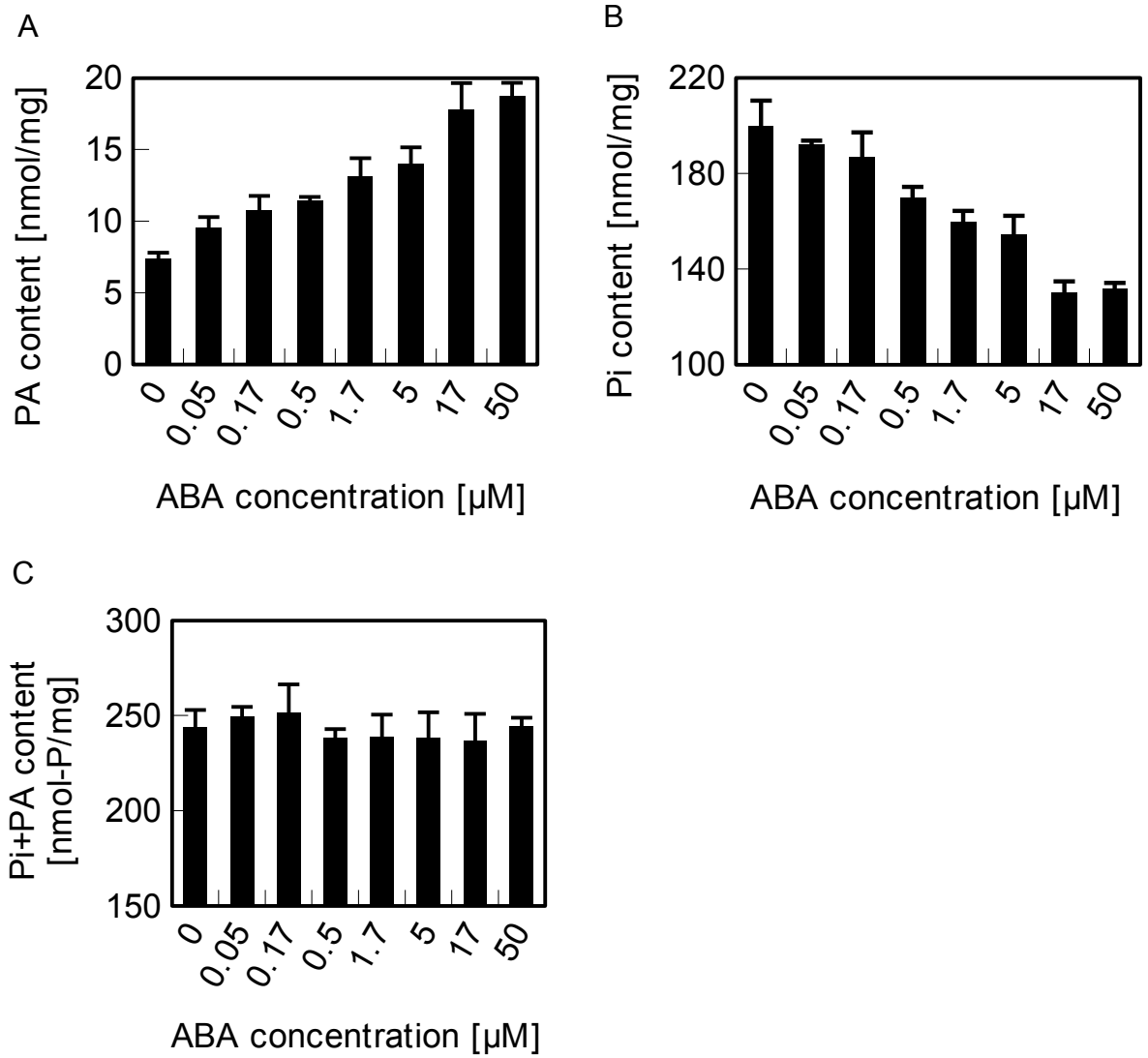


図3. ABA 濃度に応じたフィチン酸含量、無機リン酸含量の変化

ABA 添加の 24 時間後に培養細胞を回収し、細胞のフィチン酸含量 (A)、無機リン酸含量 (B) を測定した。「Pi+PA content」 (C) はフィチン酸に含まれるリン (フィチン酸含量の 6 倍) と無機リン酸含量との和である。

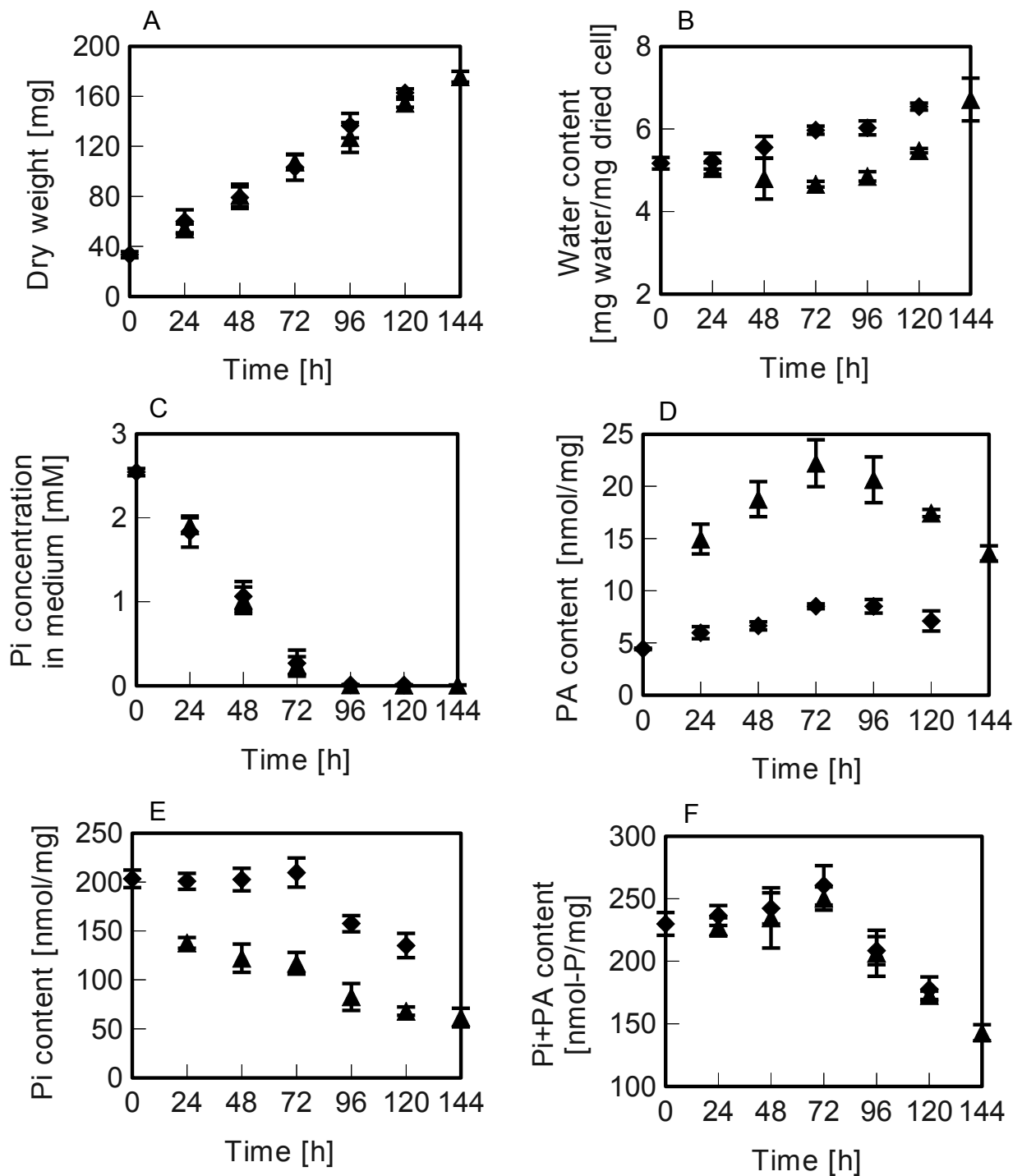


図4. ABA 添加が培養細胞に及ぼす影響

17 μ M ABA 添加後、24 時間毎に培養細胞を回収し、培養細胞の乾燥重量 (A) を測定した。乾燥前の湿重量との差から乾燥重量あたりの水分量 (B) を算出した。培養細胞と同時に回収した培地の無機リン酸濃度 (C) を測定した。乾燥した培養細胞からフィチン酸含量 (D) と無機リン酸含量 (E) を測定した。「Pi+PA content」(F) はフィチン酸に含まれるリン (フィチン酸含量の 6 倍) と無機リン酸含量との和である。ABA 添加は三角形 (\blacktriangle)、ABA 未添加は菱形 (\blacklozenge) で示す。値は 4 反復の平均値と標準偏差とで示す。

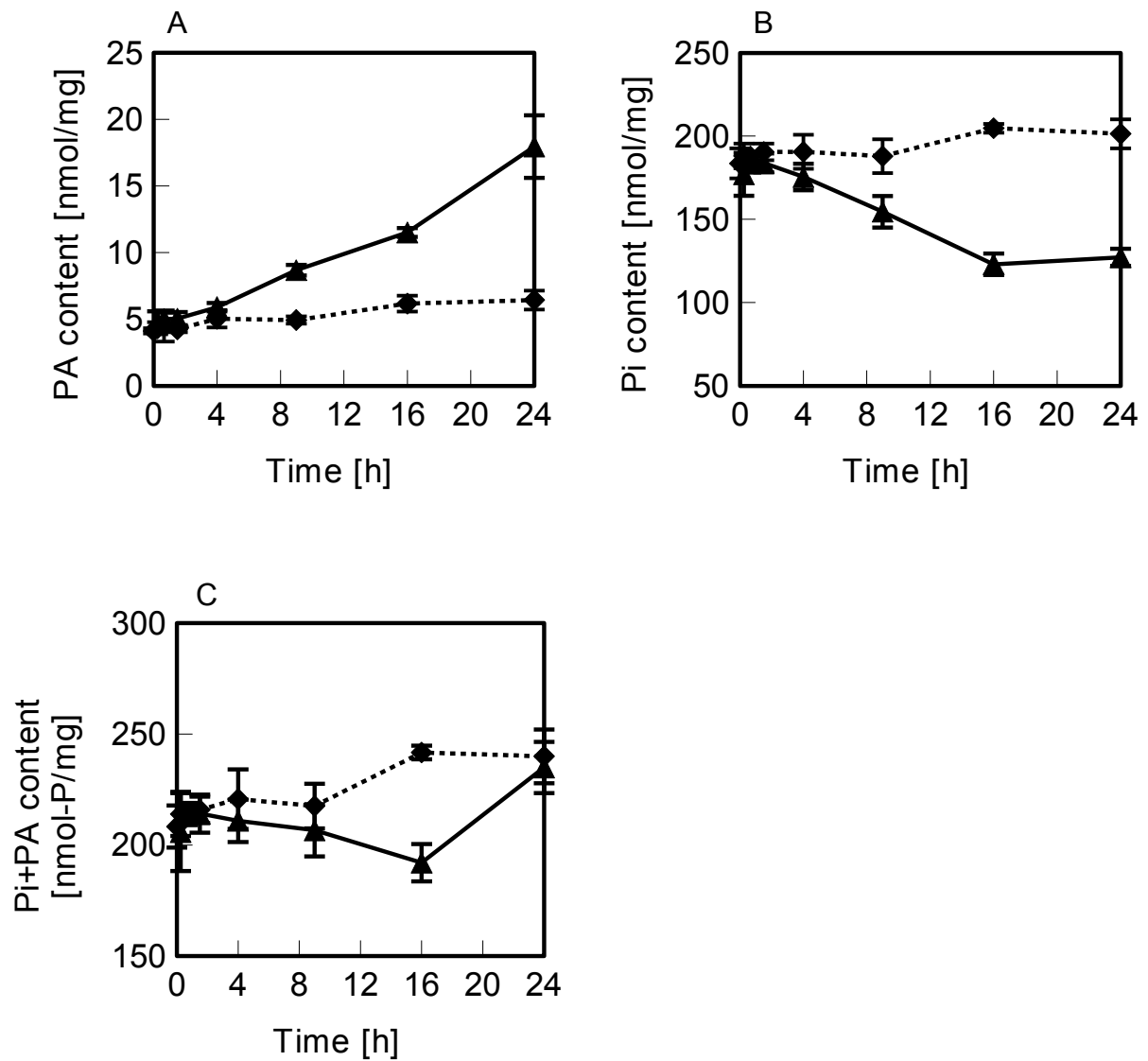


図5. ABA 添加によるフィチン酸合成の初動
 17 μ M ABA 添加後、15分、40分、90分、4時間、9時間、16時間、24時間において培養細胞を回収し、フィチン酸含量 (A) と無機リン酸含量 (B) を測定した。フィチン酸に含まれるリン (フィチン酸含量の6倍) と無機リン酸含量との和を「Pi+PA content」(C) とした。ABA 添加は三角形 (▲)、ABA 未添加は菱形 (◆) で示す。値は3反復の平均値と標準偏差とで示す。

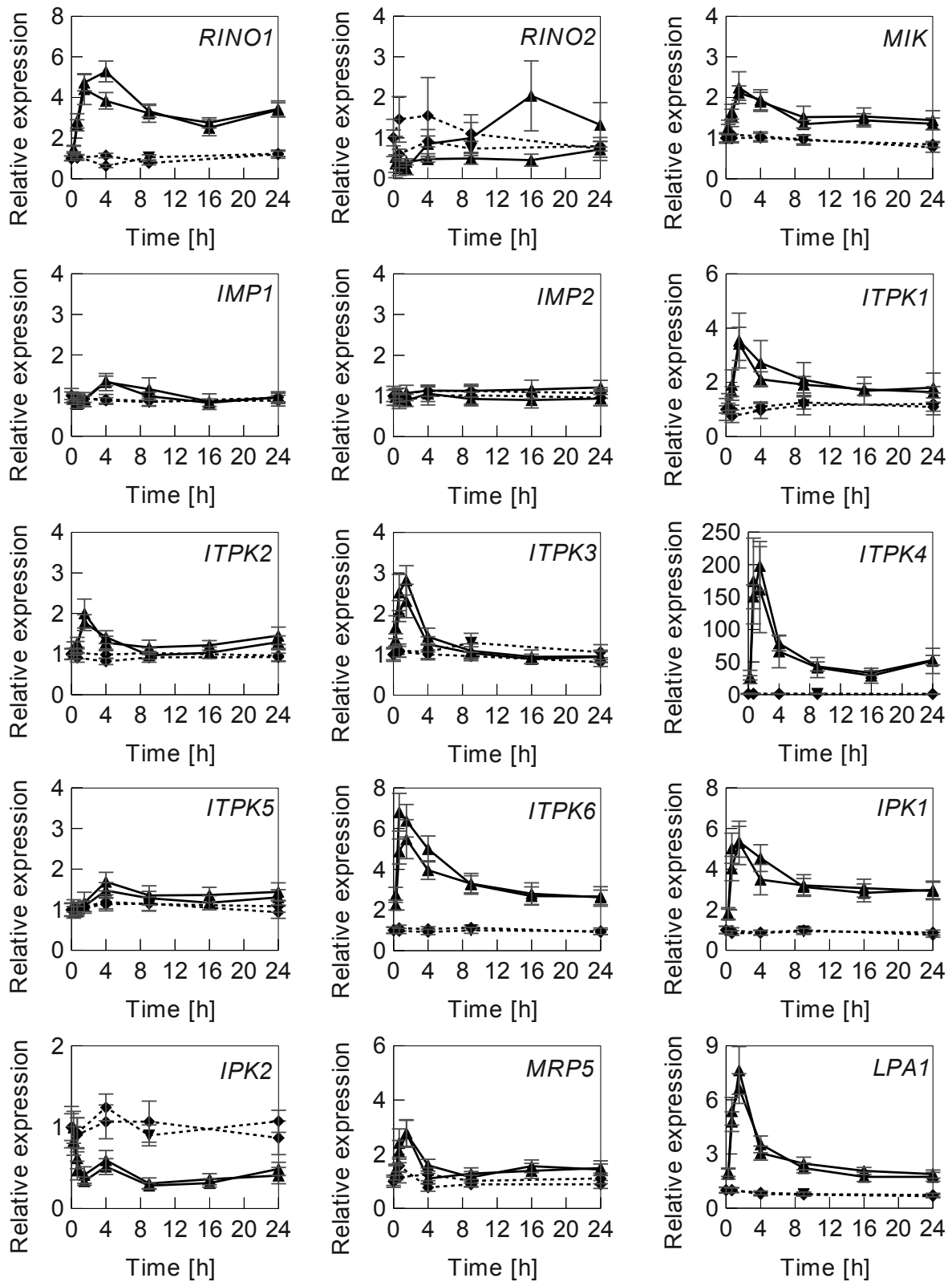


図6. ABA添加後のフィチン酸合成関連遺伝子の発現量

17 μ M ABA添加後、15分、40分、90分、4時間、9時間、16時間、24時間において培養細胞を回収し、qPCRを行った。ABA添加は三角形(▲)と実線、ABA未添加は四角(■)と破線で示す。値は3反復の平均値と標準偏差とで示す。培養は2反復で行った。OsAct1を内部標準、0時間を基準として相対発現量で表現した。

第3章 共発現解析による制御系遺伝子の探索

3-1 緒言

近年、全ゲノム配列解読と工学的技術の進歩により、マイクロアレイという遺伝子発現解析技術が普及してきた。マイクロアレイはゲノム配列既知の生物に対し、遺伝子発現を網羅的に解析する技術である。サンプルから抽出した mRNA を cDNA に逆転写し、チップ上に緻密に整理した 60 bp 程度のプローブとハイブリダイズさせることでプローブに応じた遺伝子の発現量を調べることができる。現在、アジレント・テクノロジー株式会社がイネ用に販売しているマイクロアレイチップは、イネゲノムから推測されるすべての遺伝子（およそ 42000 遺伝子）の発現を一度に調べることができる。こうしたマイクロアレイチップを用いて世界中の研究者が様々な条件で発現解析を行い、その結果が Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に提出されている。GEO に提出されたデータは自由に利用することができる。こうした大量の発現データを解析し、新たな生物学的知見を得る分野が成長し、バイオインフォマティクスと呼ばれる。その基本となっている考え方は、共発現関係にある遺伝子は何らかの繋がりがあ、というものである[78]。最近では、イネの共発現解析によりデンプン合成制御因子である RSR1 が報告された[46]。このとき、デンプン合成の遺伝子の発現データから遺伝子間の相関係数を算出し、その相関の高い遺伝子群をガイド遺伝子とまとめた。さらに、ガイド遺伝子と発現パターンにおいて逆相関のある転写因子を見出し、解析し、デンプン合成を制御する転写因子ということが明らかにした。このような手法をフィチン酸合成の遺伝子に応用すれば、フィチン酸合成制御因子を見出せるかもしれない。

第 2 章では、培地に添加した ABA によりフィチン酸含量が増加し、イネ種子のフィチン酸合成制御機構を模倣している可能性を示した。第 3 章では共発現解析によりフィチン酸合成制御因子の候補遺伝子を選抜し、本培養細胞の ABA 応答によりさらに選抜した。続いて、この候補遺伝子进行评估するために組換え体を作成し、培養細胞で評価した。

3-2 材料と方法

フィチン酸合成関連遺伝子の共発現解析

15 のフィチン酸合成関連遺伝子の共発現性を調べた。マイクロアレイデータは GEO からアクセッションナンバー GSE21396 を取得した。これは葉や根、種子など部位および時期とで分類された 48 のサンプルからなるマイクロアレイデータである[79]。用いたマイクロアレイデータは Rice Gene Expression 4x44K Microarray (アジレント・テクノロジー株式会社、catalog number, 015241) を用いて得られた。

共発現解析の手法については結果に示す。

培養細胞による選抜

第 2 章のように ABA 処理した培養細胞から得られた RNA を用いて、候補遺伝子の発現を調べた。ABA 処理 24 時間後のサンプルで RT-PCR を行い、アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後、GelRed™ (和光純薬工業株式会社) でバンドを検出した。

コンストラクト作成

コンストラクトはベクターに pCAMBIA1300、プロモーターに OsCc1 promoter、ターミネーターに Waxy terminator を用い、候補遺伝子を発現させた。OsCc1 promoter はニホンバレのゲノムを鋳型にフォワードプライマー(AAGCTTGGATCTTCGAAGGTAGGCTGC)とリバースプライマー(TCCGAGGTGACGCCATGCCGCC)とで PCR することで得た。Waxy terminator はユキヒカリのゲノムを鋳型にフォワードプライマー(TGAAGAGCTCGAGATCTACATATGGAGTG)とリバースプライマー(TAGTGAATTCGTATCCACTCCCTCCGTC)とで PCR することで得た。OsCc1

promoter は HindIII と NcoI とで、Waxy terminator は SacI と EcoRI とで pCAMBIA1300 に挿入した。候補遺伝子は cDNA を鋳型に PCR し、NcoI と BamHI とで挿入した。使用した cDNA は農業生物資源研究所から配布を受けた。得られたコンストラクトはシーケンスし、エラーがないことを確認した。

イネカルの形質転換

形質転換は Ozawa 氏の方法にしたがった[80]。カルス誘導後 3 週間培養し、よく増殖しているカルスを新鮮な N6D 培地に移植した。同日に、導入遺伝子を有するアグロバクテリウムを AB 培地に塗布した。3 日後、増殖したアグロバクテリウムを N6AS 培地に懸濁し、O.D. = 0.05 – 0.2 に調製した。そこにカルスを入れ、1 分間穏やかに攪拌した。懸濁液を捨てた後、滅菌ろ紙の上で転がすことで余分な菌液を除いた。シャーレ (Φ90 mm x 20 mm) に滅菌ろ紙 (Φ9 cm, No. 2, ADVANTEC) を 2 枚押し込み、N6AS 培地を 3.6 mL 染み込ませた。そこに余分な菌液を除いたカルスを広げた。パラフィルムで密封し、暗所、25°C にて 3 日間培養した。N6SE 培地 (50mg/L ハイグロマイシン) にカルスを移植し、サージカルテープで封をした。10 日間、30°C で培養し、再度新鮮な N6SE 培地 (50mg/L ハイグロマイシン) に全てのカルスを移植した。さらに 10 日間培養し、形質転換カルスを得た。

懸濁培養

得られた形質転換カルスを 50 mg/L ハイグロマイシンが入った N6D 液体培地で浸透培養した。最初の培養は 7 日間行い、その後は 5 日毎に継代した。2 回か 3 回の継代の後に 2 日間の前培養、本培養へと続いた。本培養を始めて 24 時間後に ABA を添加し、24 時間培養した。24 時間後に吸引ろ過器を用いてサンプリングし、液体窒素で凍結後 -80°C で保存した。

3-3 結果

フィチン酸合成関連遺伝子の共発現性

Rice Gene Expression 4x44K Microarray にはおよそ 45,000 プローブが存在する。アジレント社からプローブと対応する遺伝子のリストがダウンロードでき、フィチン酸合成関連遺伝子と対応するプローブをまとめた。MIK に対応するプローブが存在しなかったため、14 のフィチン酸合成関連遺伝子で共発現解析を進めた。

標準化されたマイクロアレイデータをダウンロードし、各プローブ毎の 3 反復実験の平均値を算出した。フィチン酸合成関連遺伝子間での共発現性を示すため、対応するプローブの平均値をまとめ、フィチン酸合成関連遺伝子同士でピアソンの相関係数を算出した。相関係数 0.6 を閾値とし、相関係数が 0.6 以上を示した。14 のフィチン酸合成関連遺伝子うち、*RINO1*, *ITPK4*, *ITPK6*, *IPK1*, *MRP5*, *LPA1* の 6 遺伝子間で高い相関が得られた。

候補遺伝子の ABA 応答

ABA 処理した培養細胞ではフィチン酸合成が活性化するため、フィチン酸合成を制御する転写因子は培養細胞でも発現量が上がると考えられる。そこで、ABA 処理した培養細胞を用いて候補遺伝子の発現解析を行った。参考のため、フィチン酸合成関連遺伝子として *RINO1* と *IPK1* の発現解析も同時に行い、発現量が上昇していることを確認した。CG6, CG19, CG23 の発現が ABA より高められた。

高発現体を利用した候補遺伝子の評価

候補遺伝子の高発現カルスを作成し、形質転換当代の培養細胞でフィチン酸合成遺伝子が発現

上昇するか調べた。増殖したハイグロマイシン耐性カルスを懸濁培養し、その発現解析を行った。CG19の過剰発現でITPK4の発現が高められた。RINO1, MIK, ITPK6, IPK1も同様に発現解析したが、sGFPの過剰発現体と比べて差は見られなかった。

3-4 考察

本研究では共発現解析によりフィチン酸合成を総合的に制御可能な転写因子を見出そうとした。共発現解析は遺伝子同士の共発現性を利用しターゲットとなる遺伝子を選抜するが、その共発現性を示す相関係数の閾値の設定については決まりがたい。本研究では共発現関係の閾値として相関係数0.6を使用した。これは、ガイドジーンに設定した *RINO1*, *ITPK4*, *ITPK6*, *IPK1*, *MRP5*, *LPA1* の6遺伝子が0.6以上でクラスター形成が認められたことから設定した。また、3つ以上のガイドジーンと相関があるプローブを選抜したが、それもまた決まりがたい。2つ以上とした場合には116の転写因子が、3つ以上とした場合には54の転写因子が、4つ以上とした場合には34の転写因子がそれぞれ得られた。ITPK4の発現を高めたCG19は本選抜条件に含まれる結果となり、条件設定の妥当性がある程度示された。しかしながら、フィチン酸合成経路を総合的に制御するような転写因子を見つけるには至らなかった。今後は選抜条件を変更し、さらにフィチン酸合成を制御する転写因子の探索を進める必要がある。

CG19はこれまでに報告のない転写因子である。CG19の過剰発現によりITPK4の発現が上昇したが、今後はRNAiなどの発現抑制技術を用いて、その機能をさらに確認する必要がある。さらに、Mybタンパク質にはリン酸化や他のタンパク質との相互作用によりその活性化が制御されている可能性があるため、培養細胞以外の環境でCG19がITPK4の発現を制御するのか調べることも必要であろう。

ヒートマップの結果、胚でフィチン酸合成関連遺伝子の発現が高められていることが示された。フィチン酸はアリュuron層以外に胚にも蓄積する。O'Dellらは長粒種の玄米において全リンの81%がフィチン態リンであり、フィチンの80%が果皮に、7.6%が胚にあることを示した[85]。ただし、果皮もしくは胚の“重量あたり”のフィチン態リン含量は果皮で0.95%、胚で0.98%と濃度に差は無く、どちらも同等にフィチン酸を合成していると考えられる。これまで低フィチン酸を扱い、フィチン酸合成関連遺伝子の機能が確かめられてきたが、アリュuron層と胚とで区別して評価している報告はなく、両方でフィチン酸合成に関わる遺伝子が同じなのか、合成制御が同じなのかは不明である。今後、胚とアリュuron層とを区別した研究が行われ、その差異を明確にすれば、フィチン酸合成制御の理解が深まると期待できる。

第4章 培養細胞と胚を形成する細胞との遺伝子発 現からみた共通性

4-1 緒言

フィチン酸は種子における貯蔵以外にも気孔の閉鎖におけるシグナル物質としての役割が明らかとなっており、その他にも機能がある考えられている[47,48][6,49,51–53]。しかし、葉や根といった栄養細胞では胚やアリューロン層のように高濃度にフィチン酸を蓄積することはなく、フィチン酸の蓄積は種子特異的な反応である [122]。それにも拘らず、本研究ではABA処理した培養細胞がフィチン酸合成を活性化し通常の4倍程度にまでフィチン酸含量が増加し、22 nmol/mg (PA: 1.45%(w/w)) を示した。ヌカのフィチン酸含量が数%-10%であることと、培養細胞が増殖が活発であることを考慮すれば、十分な蓄積量と言える。また、ABA処理した培養細胞はデンプン合成が活性化する報告があり、脂質合成の鍵酵素の発現もまたABA処理により上昇していることから脂質合成が活性化していることも示唆している[57][86]。フィチン酸、デンプン、脂質は種子蓄積物質であることから、培養細胞と種子とで共通の制御が種子貯蔵物質の蓄積を可能にしていることが予想できた。この共通の制御の理解が、フィチン酸合成制御機構の解明に有益な情報を示すことを期待した。

登熟種子のデンプン合成についての知見は蓄積されており、関与するデンプン合成関連遺伝子も制御因子も示されている。そこで、まずデンプン合成が培養細胞で活性化していることを確認した。その後、ABA処理した培養細胞のデンプン合成活性化に寄与する遺伝子を明らかにするため、デンプン合成関連遺伝子の発現解析を行った。同時に、種子登熟のマスター因子と呼ばれる転写因子についても発現解析をした。マスター因子を異所的に発現させた植物体では種子特異的な遺伝子発現や形質を示すことが知られているため、マスター因子の関与を疑った。

4-2 材料と方法

培養細胞中可溶性デンプンの測定

第2章でサンプリングした培養細胞を用いてデンプン含量を測定した。デンプン測定には total starch assay kit (Megazyme 社、Cat.No.; K-TSTA)を用い、難消化性デンプンを含む全デンプン含量を測定した。方法は製造元のプロトコールを多少改変した。グルコースやマルトデキストリンの低分子糖を除いた後、KOHでマルトデキストリンに分解し、amyloglucosidaseによりグルコースに分解した。グルコース含量を測定し、デンプン含量を算出した。具体的な手順は以下に示す。

乾燥した培養細胞 10-12.5 mg と 1 粒のジルコニアビーズ (φ 5 mm) を 2.0 mL チューブに入れ培養細胞を粉碎した。80%(v/v) EtOH を 625 μL 加え、82°Cで5分間加熱した。加熱後、80%(v/v) EtOH を 625 μL を足した。遠心 (8000 xg, 10min) し、上澄み液を捨てた。1.25 mL の 80%(v/v) EtOH を加え攪拌後、遠心 (8000 xg, 10min) し、上澄み液を捨てた。冷えている 250 μL の 2 M KOH を加え、直ちに転倒混和した。低温室にて 20 分間攪拌した。1.0 mL の 1.2M NaOAc バッファー (pH3.8) を加え転倒混和した。12.5 μL の α-amylase (bottle 1) と 12.5 μL の AMG (bottle 2) とを加え、転倒混和した。50°Cにて、5分毎に転倒混和しながら 30分間反応させた。300 μL の DW で 4 回リンスすることで完全に別容器に反応液を移した。3.0 mL にメスアップし、遠心 (3000 xg, 10 min) し、40 μL の上澄みと 1.2 mL の GOPOD Reagent を混合した。50°Cで

30 分間反応させた後、510 nm の吸光度を測定した。上澄みの代わりに D-glucose standard solution (1 mg/L) を使用することで検量線を作成した。

デンプン合成関連遺伝子の発現解析

第 2 章で得た cDNA を用い、ABA 添加後のデンプン合成関連遺伝子の発現解析を行った。酵素には SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa Bio) を用いた。検量線法により発現量を算出したのち、*OsAct1* を内部標準、ABA 添加直前を基準として相対発現量を算出した。なお、*AGPS2a* と *AGPS2b* はスプライシングバリエーションであり、マイクロアレイのプロブでは区別することはできず、本発現解析では両者を区別するプライマー設計をしていない。したがって、マイクロアレイと本発現解析では *AGPS2a/b* と表記する。

デンプン合成関連遺伝子のクラスター解析

27 のフィチン酸合成関連遺伝子の共発現性を調べた。マイクロアレイデータは GEO からアクセッションナンバー GSE39427 を取得した[87]。これは開花 1 日後から 10 日後までの子房のサンプルと開花 4 日後から 10 日後までの胚のサンプルと Rice Gene Expression 4x44K Microarray (アジレント・テクノロジー株式会社、catalog number, 015241) を用いて得られたデータである。RiceXPro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) にてヒートマップを描いた。

登熟種子関連遺伝子の発現解析

第 2 章と同じように培養細胞を培養し、17 μ M ABA を添加し、12 時間培養した。12 時間の培養の後、吸引ろ過で培養細胞を回収し、直ちに液体窒素で凍結し -80°C にて RNA 抽出まで保存した。2011 年に筑波大学加藤盛夫氏が管理する 13 号水田からイネ (ニッポンバレ) をサンプリングした。9 月 7 日、8 日、10 日の 21 時に、開花後 7 日目の穂を回収し、ただちに脱粒し、10 倍量の RNeasy Lysis Solution (Qiagen) に浸漬した。その後、4°C にて保存した。RNeasy Lysis Solution に浸漬した状態で、ピンセットを用いて籾殻を除いた。その後、胚を RNeasy Lysis Solution 内に回収した。続いて、胚を除いた子房を RNeasy Lysis Solution 内で軽く洗うことで胚乳を回収した。残った果皮と種皮、種皮に残った胚乳を "アリュウロン層" として RNeasy Lysis Solution 内に回収した。

胚とアリュウロン層については RNeasy plant mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。プロトコール通りに行い、DNaseI をメンブレン上で処理した。培養細胞については第 2 章と同様に ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて RNA を抽出した。胚乳は ISOGEN と High-Salt Precipitation Solution (ニッポンジーン) を用いて RNA を抽出した。

得られた RNA を第 2 章に示すように逆転写反応し、cDNA を得た。発現解析をした。具体的には、種子貯蔵タンパク質であるグルテリンとグロブリン、種子貯蔵脂質に関するオレオシンとカレオシンと種子貯蔵脂質の制御因子、種子登熟のマスター因子である。

4-3 結果

培養細胞中可溶性デンプンの測定

フィチン酸蓄積を確認したABA処理培養細胞(図3)のデンプン含量を測定した。0-50 μ M ABAによりデンプン含量は上昇し、フィチン酸蓄積と同様にABA濃度とデンプン含量とが比例関係にあることを示した。ABA添加後のデンプン合成の経時変化を見るため、デンプン含量を測定した。

デンプン合成関連遺伝子の発現解析

フィチン酸合成関連遺伝子の発現解析に用いたcDNAを使用し、デンプン合成関連遺伝子の発現解析を行った。デンプン合成関連遺伝子にはOhdan氏が用いた27遺伝子を参考にした[88]。27遺伝子のうち、GBSSIはqPCRでシグナルが検出できなかった。18遺伝子(AGPL1, AGPL3, AGPS1, AGPS2a, ISA2, ISA3, PUL, GBSSII, BEIIa, BEIIb, DPE1, EPE2, SSI, SSIIa, SSIIb, SSIIc, SSIIIb, SSIVa)がABA添加に反応した。そのうち、7遺伝子(GBSSII, BEIIb, DPE2, PUL, SSIIa, SSIIc, SSIVa)が一時的な増加であり、2遺伝子(SSIIb, SSIIIb)が一時的な減少、9遺伝子(AGPL1, AGPL3, AGPS1, ASP2a/b, ISA2, ISA3, BEIIa, DPE1, SSI,)がABA添加後24時間にわたりコントロールより高い発現を示した。

デンプン合成関連遺伝子のクラスター解析

フィチン酸合成関連遺伝子と同様に、27のデンプン合成関連遺伝子についてマイクロアレイデータからヒートマップを描いた。また、相関係数が0.60以上になった組合せについてまとめ、その相関係数を示した。ISA1, AGPL2, SSIIa, AGPS2a/b, PUL, SSIVb, GBSSI, BEIIb, AGPS1, PHOL, AGPL3, SSIIIa, BEIの13遺伝子は明確な一つのクラスターを形成した。

4-4 考察

培養細胞がABA処理によりデンプン合成が活性化することは知られていた[57]。デンプンもフィチン酸も種子貯蔵物質であることから、種子と培養細胞とで共通性が存在し、その共通性が培養細胞に種子貯蔵物質の蓄積能力を付与していると考えた。フィチン酸合成と同じく、培養細胞はABA濃度に応じてフィチン酸含量を増加した。胚乳のデンプン合成に関与することが分かっている遺伝子はAGPS2b, AGPL2, SSIIa, BEI, BEIIb, ISA1, GBSSIである[89][90][91][92][93][94]。発現パターンのクラスター解析の結果、それら遺伝子は同一のクラスターを形成し、開花後5日目あたりから発現量が増加していた。胚乳のデンプン合成は開花後5日目から始まることから、そのクラスターを形成するISA1, AGPL2, SSIIa, AGPS2a/b, PUL, SSIVb, GBSSI, BEIIb, AGPS1, PHOL, AGPL3, SSIIIa, BEIの13遺伝子が胚乳でのデンプン合成に関与すること強く示している。ABA処理した培養細胞では、9遺伝子(AGPL1, AGPL3, AGPS1, ASP2a/b, ISA2, ISA3, BEIIa, DPE1, SSI,)がABA添加後24時間継続的にコントロールより高い発現を示した。デンプン含量はABA添加後96時間まで増加し続けたことから、継続的に高い発現量を示したこれら9遺伝子が培養細胞のデンプン合成に関与したと考える。胚乳の

デンプン合成と ABA 処理した培養細胞のデンプン合成とでは機能したデンプン合成遺伝子が異なり、両者には異なるデンプン合成制御機構が働いたことが示された。このことから、デンプン合成については培養細胞と種子とで共通性は存在しないと判断した。

第 5 章 総合考察

富栄養湖の解消やリン資源枯渇に対応するため、低濃度に拡散したリンを効率的に回収する仕組みが求められる。そこで、リンの貯蔵形態であるフィチン酸を強制的に葉で合成させ、フィチン酸の塩であるフィチンとして無毒な形で葉に濃縮することを考えた。フィチン酸合成には複数の酵素やトランスポーターが関与するため、フィチン酸を強制的に合成させるにはそれらを総合的に上方制御する必要があるだろう（図1、表1）。そこで、それらを総合的に制御するような転写因子の存在を求めて、フィチン酸合成制御機構の解明を試みた。

第2章において、イネの培養細胞にABA処理をすることでフィチン酸合成が活性化し、また、ABA濃度増加に応じてそのフィチン酸合成がより活性化することを示した。このことから、少なくとも培養細胞はABAによりフィチン酸合成が制御されていることを明かにした。登熟種子では、開花後7-20日の間にフィチン酸が蓄積し、同時期にABA濃度が増加することが示されている。したがって、培養細胞で示されたようなABAによるフィチン酸合成の制御が登熟種子でも起きている可能性を示した。また、ABA添加後のフィチン酸合成関連遺伝子の発現解析からは、登熟種子とABA処理した培養細胞とでフィチン酸合成に関与する遺伝子の同一性から、同一の制御機構が機能した高い可能性を示した。

同一の制御機構が機能しているとすれば、ABA刺激を受けてフィチン酸合成関連遺伝子を制御するような転写因子の発現が培養細胞と種子とで共に関与しているはずである。第3章において、イネ植物体のマイクロアレイデータから共発現解析により候補となる転写因子を選抜し、培養細胞で高発現させることで、フィチン酸合成関連遺伝子の発現が上昇するかどうか調べた。本解析により、ITPK4を上方制御する転写因子（CG19）を見出すことに成功した。過剰発現体の作出に取り組み、再分化したT₀植物体をグロースチャンバー内で栽培している。6系列で始めたが、2系列は鉢に移植後に死滅した。残り4系列のうち3系列がWTとは異なる外観を示し、5ヶ月以上栽培しても出穂する様子がない。1系列のみが出穂し、多くが不稔であるが、見た目が正常な種子を作り出した。この1系列は導入したCG19の発現量が低いことを確認しており、今後の機能評価には誘導性のプロモーターを使用するなどの工夫が求められる。また、培養細胞にてRNA干渉技術を用いてその発現を抑制することでも評価可能だろう。本研究では、共発現解析の参考としてデンプン合成の制御因子RSR1を見出した報告と共発現解析について書かれたミニレビューを参考にした[46][78]。RSR1の報告では171のマイクロアレイの結果を使用しており、ミニレビューでは100以上のマイクロアレイの結果を用いることで信頼性の高い安定した相関係数が算出されることを示した。本研究では48のアレイデータを用いており、さらに別のアレイデータを導入することにより、有効的な候補遺伝子の選抜が可能になる可能性がある。

ABA処理した培養細胞ではフィチン酸合成が活性化した。同じようにABA処理した培養細胞ではデンプン合成が活性化することが報告されている。フィチン酸もデンプンも種子貯蔵性物質であることから、種子と培養細胞とで共通の制御が機能していると予測した。デンプン合成はフィチン酸と同じくABA濃度増加によりさらに活性化した。しかし、ABA処理した培養細胞でデンプン合成に関与した遺伝子と、胚乳でデンプン合成に関与する遺伝子とで異なっていることが示唆された。種子貯蔵性物質は他に脂質やタンパク質が知られている。

そこで、それらに関連する遺伝子が培養細胞で発現しているか調べた。その結果、種子貯蔵性脂質関連の遺伝子発現は培養細胞でみられ、ABA 処理により発現上昇した。一方で、種子貯蔵性タンパク質関連の遺伝子発現は ABA 処理・未処理に拘らず発現が不検出であったり、極微量であった。種子貯蔵性脂質はフィチン酸と同じく、胚・アリューロン層に蓄積し、種子貯蔵性タンパク質とデンプンは胚乳に蓄積する。さらに、種子登熟の主要な制御因子の発現解析により、培養細胞は開花後 7 日目の胚と同レベルかそれ以上にマスター因子の発現が高められていることを明かにした。それらマスター因子と相互作用することが報告されている制御因子もまた、培養細胞で発現していることを示した。マスター因子が種子特異的な ABA 応答性を付与することはこれまでに報告されていること、胚乳特異的なデンプン合成や種子貯蔵性タンパク質の発現が培養細胞ではみられないこと、以上の 2 点からこれら種子登熟を制御するマスター因子の高い発現レベルが培養細胞に胚・アリューロン層特異的な ABA 応答性を付与した可能性を考えた。

登熟種子では、4 つのマスター因子が胚形成や種子貯蔵物質の合成を制御している。WR11 は脂質合成の制御因子として知られており、LEC2, FUS3 の制御下に位置する。LEC1 と ABI3 は ABA 応答によりリン酸化した bZIP 転写因子とそれぞれ相互作用し、登熟種子で特異的な ABA 応答を示す。本研究では、ABA 処理により培養細胞が登熟種子のフィチン酸合成を模倣することを示した。また、発現解析から ABA 処理により種子貯蔵性脂質の合成が活性化した可能性を示した。イネのマスター因子の発現が培養細胞で高められているため、培養細胞では種子特異的な ABA 応答を示し、種子貯蔵性脂質の合成やフィチン酸の合成が活性化したと考える。共発現解析で見出された CG19 は、培養細胞の ABA 処理により発現量が増加していることから、種子特異的な ABA 応答に属する可能性がある。

本研究により、ABA 処理した培養細胞で活性化したフィチン酸合成の制御機構は登熟種子の制御機構を模倣している高い可能性を示した。このことは、本培養細胞が種子のフィチン酸合成制御機構を研究するモデル系として有益であることを示している。ABA 処理した培養細胞と種子とのフィチン酸合成にマスター因子が関与している可能性が高い。今後、登熟種子と ABA 処理した培養細胞の両サンプルの共通点や相違点から効率的にフィチン酸合成制御機構が明かになることを期待する。

概要

フィチン酸は種子におけるリンの貯蔵形態であり、米ぬかには10%前後存在する。もしフィチン酸を葉で種子並に蓄積させることができれば、その植物体は高濃度にリンを濃縮することになる。このような植物は富栄養湖でのファイトレメディエーションを飛躍的に高効率化するだろう。そのためには種子のフィチン酸合成の制御機構を葉に応用し、フィチン酸合成系全体を刺激することが有効であろう。しかし、フィチン酸合成経路は解明されつつあるものの、その制御機構について報告がない。そこで、本研究では種子でフィチン酸合成を制御する環境因子、転写因子、その制御機構の解明を試みた。

フィチン酸の蓄積部位であるアリューロン層はサンプル調製が容易ではない。そこで、調製が容易で環境因子等の研究に有用な培養細胞を用いた。種子登熟過程の制御にはABAとショ糖が関与する。種子貯蔵物質のフィチン酸の合成もまた制御されることが予想された。ABA、ショ糖、無機リン酸を種々の濃度で与えた結果、ABAによりフィチン酸含量が増加することがわかった。また、ABA濃度増加に伴いフィチン酸含量が増加した。種子中ABA含量の増加とフィチン酸合成の時期が一致すること、本研究でもABA高濃度によりフィチン酸合成がより活性化したことから、種子でのフィチン酸合成もABA濃度により制御されている可能性がある。

ABA添加後の培養細胞でフィチン酸合成関連遺伝子の発現解析を行った。フィチン酸合成関連遺伝子として既に15の遺伝子が知られており、そのうち*RINO1*, *MIK*, *ITPK1*, *ITPK4*, *ITPK6*, *IPK1*, *LPA1*の7遺伝子の継続的な発現上昇が確認されたことから、この7遺伝子の発現上昇がフィチン酸合成を活性化したと考えた。*RINO1*, *MIK*, *IPK1*, *LPA1*は種子でのフィチン酸合成に関与することが明らかであり、*ITPK4*および*ITPK6*は関与すると考えられている。同一遺伝子が制御されていることから、培養細胞と種子とで同じ制御機構が働いたと考えられる。

フィチン酸合成を制御する転写因子を明らかにしようと、共発現解析を行った。登熟種子のフィチン酸合成に関与する*RINO1*, *ITPK4*, *ITPK6*, *IPK1*, *LPA1*, *MRP5*の6遺伝子が互いに高い相関関係を示した。これら6遺伝子と相関の高い転写因子から、発現パターンが似ていると見える転写因子を選抜し、11の候補遺伝子を得た。そのうち、ABA応答する3遺伝子を培養細胞で過剰発現させた。*CG19*の過剰発現で*ITPK4*の発現が高められており、*CG19*が*ITPK4*を制御する可能性を示した。

葉と異なり、培養細胞は常にフィチン酸を蓄積し、ABAによりさらに蓄積している。また、デンプンも蓄積することが知られている。デンプンもフィチン酸も種子貯蔵物資であることから、培養細胞と種子との共通性が種子貯蔵物質の蓄積を可能にしていると予想された。培養細胞のデンプン合成関連遺伝子の発現解析から、培養細胞では胚乳のデンプン合成系とは異なる制御系によって活性化されていることが示された。また、培養細胞では種子貯蔵性タンパク質の発現がなかった。一方で、胚やアリューロン層に蓄積する種子貯蔵性脂質関連の遺伝子発現がABAにより高められていた。これらに加え、胚特異的に発現し、イネの種子登熟のマスター因子の発現が胚と同等に高発現であった。これらマスター因子の高発現が培養細胞に胚との共通性を付与していることが考えられる。

本研究では培養細胞を用いた研究により、ABAによりフィチン酸合成が制御されることを示し、その制御が種子でも働くことが考えられた。共発現解析により *ITPK4* を制御するだろう転写因子を見出した。同方法でフィチン酸合成系全体を制御する転写因子を見出せると期待できる。培養細胞ではマスター因子の発現が胚と同レベルに高く、種子貯蔵性脂質の点でも胚との共通性が見出せた。これら制御が葉では生じないフィチン酸蓄積を可能にしていることが予想される。マスター因子が脂質合成を制御する報告は数多くあるが、フィチン酸合成に関しては報告がない。マスター因子との関連と共発現解析の進展がフィチン酸合成制御機構に新たな知見をもたらすだろう。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導を頂いた筑波大学大学院生命環境科学研究科 藤村 達人 教授に心より感謝致します。研究面のみならず、日々の会話の中から農業に関する知識や研究者としての姿勢など大変多くのことを学ぶことができ、研究者としても一人の人間としても実りの多い日々を過ごすことができました。

筑波大学大学院生命環境科学研究科 中嶋光敏 教授、宮崎均 教授、松倉千昭 准教授には、本論文作成にあたり有意義なご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

生物資源研究所機能性作物研究開発ユニット 小澤 憲二郎 主任研究員にはイネの組換え体作出について直接ご指導いただきました。ここに感謝の意を表します。

産業技術総合研究所生物プロセス研究部門植物機能制御研究グループ 鈴木馨 グループリーダーには、転写因子の研究に関して大変参考となるご助言を頂きました。ここに感謝の意を表します。

東京農工大学工学研究院 生命機能科学部門 小関良宏 教授には、本研究を進めるにあたり厳しくも貴重なご意見を頂きました。ここに感謝の意を表します。

東京農工大学農学研究院 生物システム科学部門 梅澤泰史 准教授には、ABA 応答のメカニズムについて直接ご指導いただき、研究に対するご助言もいただきました。ここに感謝の意を表します。

島根大学生物資源科学研究科 秋廣高志 助教には、培養細胞の継代についてご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

筑波大学大学院生命環境科学研究科 加藤盛夫 助教には、加藤助教が管理されていたイネの一部をサンプリングを許可していただき、大変有意義なデータを得ることができました。ここに感謝の意を表します。

最後に、本研究を進めるにあたり今日まであらゆる面で支えてくれた家族に感謝いたします。

引用文献

- [1] S.R. Carpenter, Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 11039–11040.
- [2] R.F. Hurrell, Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability, *J. Nutr.* 133 (2003) 2973S–2977S.
- [3] P.H. Abelson, A potential phosphate crisis, *Science* 283 (1999) 2015–2015.
- [4] J.N. Lott, I. Ockenden, V. Raboy, G.D. Batten, Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits : a global estimate, *Seed Sci. Res.* 10 (2000) 11–33.
- [5] P. Bregitzer, V. Raboy, Effects of four independent low-phytate mutations on barley agronomic performance, *Crop Sci.* 46 (2006) 1318-1322.
- [6] E. Doria, L. Galleschi, L. Calucci, C. Pinzino, R. Pilu, E. Cassani, E. Nielsen, Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 967–978.
- [7] M. Kuwano, T. Mimura, F. Takaiwa, K.T. Yoshida, Generation of stable “low phytic acid” transgenic rice through antisense repression of the 1D-*myo*-inositol 3-phosphate synthase gene (*RINO1*) using the 18-kDa oleosin promoter, *Plant Biotechnol. J.* 7 (2009) 96–105.
- [8] A.R. Odom, A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control, *Science* 287 (2000) 2026–2029.
- [9] C.A. Brearley, D.E. Hanke, Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters in the *myo*-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *Spirodela polyrhiza* L., *Biochem. J.* 314 (1996) 227–233.
- [10] M. Suzuki, K. Tanaka, M. Kuwano, K.T. Yoshida, Expression pattern of inositol phosphate-related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.): implications for the phytic acid biosynthetic pathway, *Gene* 405 (2007) 55–64.
- [11] S.I. Kim, T.H. Tai, Identification of genes necessary for wild-type levels of seed phytic acid in *Arabidopsis thaliana* using a reverse genetics approach, *Mol. Genet. Genomics.* 286 (2011) 119–133.
- [12] N. Mitsuhashi, M. Kondo, S. Nakaune, M. Ohnishi, M. Hayashi, I.H. Nishimura, A. Richardson, H. Fukaki, M.

- Nishimura, T. Mimura, Localization of *myo*-inositol-1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds of *Arabidopsis*., J. Exp. Bot. 59 (2008) 3069–3076.
- [13] J. Shi, H. Wang, J. Hazebroek, D.S. Ertl, T. Harp, The maize *low-phytic acid 3* encodes a *myo*-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds, Plant J. 42 (2005) 708–719.
- [14] S.I. Kim, C.B. Andaya, J.W. Newman, S.S. Goyal, T.H. Tai, Isolation and characterization of a low phytic acid rice mutant reveals a mutation in the rice orthologue of maize MIK, Theor. Appl. Genet. 117 (2008) 1291–1301.
- [15] N. Ali, S. Paul, D. Gayen, S.N. Sarkar, K. Datta, S.K. Datta, Development of low phytate rice by RNAi mediated seed-specific silencing of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene (*IPK1*), PLoS One. 8 (2013) e68161.
- [16] F.-J. Yuan, D.-H. Zhu, Y.-Y. Tan, D.-K. Dong, X.-J. Fu, S.-L. Zhu, B.-Q. Li, Q.-Y. Shu, Identification and characterization of the soybean IPK1 ortholog of a low phytic acid mutant reveals an exon-excluding splice-site mutation, Theor. Appl. Genet. 125 (2012) 1413–1423.
- [17] J. Shi, H. Wang, Y. Wu, J. Hazebroek, R.B. Meeley, D.S. Ertl, The maize low-phytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene, Plant Physiol. 131 (2003) 507–515.
- [18] M.P. Wilson, P.W. Majerus, Characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase, Biochem. Biophys. Res. Commun. 232 (1997) 678–681.
- [19] S.E.K. Caddick, C.J. Harrison, I. Stavridou, J.L. Mitchell, A.M. Hemmings, C.A. Brearley, A *Solanum tuberosum* inositol phosphate kinase (StITPK1) displaying inositol phosphate-inositol phosphate and inositol phosphate-ADP phosphotransferase activities, FEBS Lett. 582 (2008) 1731–1737.
- [20] D. Sweetman, I. Stavridou, S. Johnson, P. Green, S.E.K. Caddick, C. a Brearley, *Arabidopsis thaliana* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase 4 (AtITPK4) is an outlier to a family of ATP-grasp fold proteins from *Arabidopsis*, FEBS Lett. 581 (2007) 4165–4171.
- [21] R. Nagy, H. Grob, B. Weder, P. Green, M. Klein, A. Frelet-Barrand, J.K. Schjoerring, C. Brearley, E. Martinoia, The *Arabidopsis* ATP-binding cassette protein AtMRP5/AtABCC5 is a high affinity inositol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage, J. Biol. Chem. 284 (2009) 33614–33622.

- [22] J. Shi, H. Wang, K. Schellin, B. Li, M. Faller, J.M. Stoop, R.B. Meeley, D.S. Ertl, J.P. Ranch, K. Glassman, Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 930–937.
- [23] X.-H. Xu, H.-J. Zhao, Q.-L. Liu, T. Frank, K.-H. Engel, G. An, Q.-Y. Shu, Mutations of the multi-drug resistance-associated protein ABC transporter gene 5 result in reduction of phytic acid in rice seeds., *Theor. Appl. Genet.* 119 (2009) 75–83.
- [24] D. Panzeri, E. Cassani, E. Doria, G. Tagliabue, L. Forti, B. Campion, R. Bollini, C.A. Brearley, R. Pilu, E. Nielsen, F. Sparvoli, A defective ABC transporter of the MRP family, responsible for the bean *lpa1* mutation, affects the regulation of the phytic acid pathway, reduces seed *myo*-inositol and alters ABA sensitivity, *New Phytol.* 191 (2011) 70–83.
- [25] S.-I. Kim, T.H. Tai, Genetic analysis of two *OsLpa1*-like genes in *Arabidopsis* reveals that only one is required for wild-type seed phytic acid levels, *Planta* 232 (2010) 1241–1450.
- [26] S.I. Kim, C.B. Andaya, S.S. Goyal, T.H. Tai, The rice *OsLpa1* gene encodes a novel protein involved in phytic acid metabolism, *Theor. Appl. Genet.* 117 (2008) 769–779.
- [27] A. Lehmacher, R. Hensel, Cloning, sequencing and expression of the gene encoding 2-phosphoglycerate kinase from *Methanothermobacter ferredoxin*, *Mol. Gen. Genet.* 242 (1994) 163–168.
- [28] V. Raboy, Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus, *Plant Sci.* 177 (2009) 281–296.
- [29] H. Yamagata, T. Sugimoto, K. Tanaka, Z. Kasai, Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds, *Plant Physiol.* 70 (1982) 1094–1100.
- [30] M. Horikoshi, Y. Morita, Localization of γ globulin in rice seed and changes in γ globulin content during seed development and germination, *Agric. Biol. Chem.* 39 (1975) 2309–2314.
- [31] Y. Onodera, A. Suzuki, C.Y. Wu, H. Washida, F. Takaiwa, A rice functional transcriptional activator, RISBZ1, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 14139–14152.
- [32] C.-Y. Wu, A. Suzuki, H. Washida, F. Takaiwa, The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants, *Plant J.* 14

(1998) 673–683.

- [33] J. Vicente-Carbajosa, S.P. Moose, R.L. Parsons, R.J. Schmidt, A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 7685–7690.
- [34] T. Kawakatsu, M.P. Yamamoto, S.M. Touno, H. Yasuda, F. Takaiwa, Compensation and interaction between RISBZ1 and RPBF during grain filling in rice, *Plant J.* 59 (2009) 908–920.
- [35] N.H. Choudhury, B.O. Juliano, Lipids in developing and mature rice grain, *Phytochem.* 19 (1980) 1063–1069.
- [36] K. Ichihara, N. Kobayashi, K. Saito, Lipid synthesis and acyl-CoA synthetase in developing rice seeds, *Lipids* 38 (2003) 881–884.
- [37] Y.-Y. Wu, Y.-R. Chou, C.-S. Wang, T.-H. Tseng, L.-J. Chen, J.T.C. Tzen, Different effects on triacylglycerol packaging to oil bodies in transgenic rice seeds by specifically eliminating one of their two oleosin isoforms, *Plant Physiol. Biochem.* 48 (2010) 81–89.
- [38] G.I. Frandsen, J. Mundy, J.T.C. Tzen, Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin, *Physiol. Plant.* 112 (2001) 301–307.
- [39] J.A. Napier, A.K. Stobart, P.R. Shewry, The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins, *Plant Mol. Biol.* 31 (1996) 945–956.
- [40] R.J. Weselake, D.C. Taylor, M.H. Rahman, S. Shah, A. Laroche, P.B.E. McVetty, J.L. Harwood, Increasing the flow of carbon into seed oil, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 866–878.
- [41] N. Focks, C. Benning, *wrinkled1*: A novel, low-seed-oil mutant of Arabidopsis with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism, *Plant Physiol.* 118 (1998) 91–101.
- [42] S.A. Ruuska, T. Girke, C. Benning, J.B. Ohlrogge, Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling, *Plant Cell* 14 (2002) 1191–206.
- [43] S. Baud, M.S. Mendoza, A. To, E. Harscoët, L. Lepiniec, B. Dubreucq, WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in Arabidopsis, *Plant J.* 50 (2007) 825–838.

- [44] J.-S. Jeon, N. Ryoo, T.-R. Hahn, H. Walia, Y. Nakamura, Starch biosynthesis in cereal endosperm, *Plant Physiol. Biochem.* 48 (2010) 383–392.
- [45] J.-C. Wang, H. Xu, Y. Zhu, Q.-Q. Liu, X.-L. Cai, OsbZIP58, a basic leucine zipper transcription factor, regulates starch biosynthesis in rice endosperm, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 3453–3466.
- [46] F.-F. Fu, H.-W. Xue, Coexpression analysis identifies Rice Starch Regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator, *Plant Physiol.* 154 (2010) 927–938.
- [47] T.-H. Kim, M. Böhmer, H. Hu, N. Nishimura, J.I. Schroeder, Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling, *Annu. Rev. Plant Biol.* 61 (2010) 561–591.
- [48] F. Lemtiri-Chlieh, E.A MacRobbie, C.A Brearley, Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺-inward rectifying conductance in guard cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8687–8692.
- [49] M. Klein, L. Perfus-Barbeoch, A. Frelet, N. Gaedeke, D. Reinhardt, B. Mueller-Roeber, E. Martinoia, C. Forestier, The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use, *Plant J.* 33 (2003) 119–129.
- [50] G.E. Gillaspay, The cellular language of *myo*-inositol signaling, *New Phytol.* 192 (2011) 823–839.
- [51] N. Gaedeke, M. Klein, U. Kolukisaoglu, C. Forestier, a Müller, M. Ansorge, D. Becker, Y. Mamnun, K. Kuchler, B. Schulz, B. Mueller-Roeber, E. Martinoia, The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement, *EMBO J.* 20 (2001) 1875–1887.
- [52] M. Bennett, S.M.N. Onnebo, C. Azevedo, a Saiardi, Inositol pyrophosphates: metabolism and signaling, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 552–564.
- [53] C.H. Fox, M. Eberl, Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review, *Complement. Ther. Med.* 10 (2002) 229–234.
- [54] A. Kastell, I. Smetanska, M. Schreiner, I. Mewis, Hairy roots, callus, and mature plants of *Arabidopsis thaliana* exhibit distinct glucosinolate and gene expression profiles, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 115 (2013) 45–54.
- [55] D. Hays, R. Wilen, C. Sheng, M. Moloney, R. Pharis, Embryo-specific gene expression in microspore-derived embryos of *brassica napus*. An interaction between abscisic acid and jasmonic acid, *Plant Physiol.* 119

(1999) 1065–1072.

- [56] A.S. Jadhav, D.C. Taylor, M. Giblin, A.M.R. Ferrie, S.J. Ambrose, A.R.S. Ross, K.M. Nelson, Z.L. Irina N. Sharma, M. Anderson, P.R. Fobert, S.R. Abrams, Hormonal regulation of oil accumulation in *Brassica* seeds: metabolism and biological activity of ABA, 7'-, 8'- and 9'-hydroxy ABA in microspore derived embryos of *B. napus*, *Phytochemistry*. 69 (2008) 2678–2688.
- [57] T. Akihiro, K. Mizuno, T. Fujimura, Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA, *Plant Cell Physiol*. 46 (2005) 937–946.
- [58] A. Kuroda, N. Takiguchi, J. Kato, O. Hisao, Development of technologies to save phosphorus resources in response to phosphate crisis, *J. Environ. Biotechnol*. 4 (2005) 87–94.
- [59] B. Shen, W.B. Allen, P. Zheng, C. Li, K. Glassman, J. Ranch, D. Nubel, M.C. Tarczynski, Expression of *ZmLEC1* and *ZmWRI1* increases seed oil production in maize, *Plant Physiol*. 153 (2010) 980–987.
- [60] H.U. Kim, S.-J. Jung, K.-R. Lee, E.H. Kim, S.-M. Lee, K.H. Roh, J.-B. Kim, Ectopic overexpression of castor bean LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) in *Arabidopsis* triggers the expression of genes that encode regulators of seed maturation and oil body proteins in vegetative tissues, *FEBS Open Bio*. 4 (2013) 25–32.
- [61] J.L. Donahue, S.R. Alford, J. Torabinejad, R.E. Kerwin, A. Nourbakhsh, W.K. Ray, M. Hernick, X. Huang, B.M. Lyons, P.P. Hein, G.E. Gillaspay, The *Arabidopsis thaliana* myo-inositol 1-phosphate synthase1 gene is required for myo-inositol synthesis and suppression of cell death, *Plant Cell* 22 (2010) 888–903.
- [62] T. Iwai, M. Takahashi, K. Oda, Y. Terada, K.T. Yoshida, Dynamic changes in the distribution of minerals in relation to phytic acid accumulation during rice seed development, *Plant Physiol*. 160 (2012) 2007–2014.
- [63] K.T. Yoshida, T. Fujiwara, S. Naito, The synergistic effects of sugar and abscisic acid on myo-inositol-1-phosphate synthase expression, *Physiol. Plant* 114 (2002) 581–587.
- [64] S. Flores, C.C. Smart, Abscisic acid-induced changes in inositol metabolism in *Spirodela polyrrhiza*, *Planta* 211 (2000) 823–832.
- [65] J.B. Rodriguez, J.R. Self, P.N. Soltanpour, Optimal conditions for phosphorus analysis by the ascorbic acid-molybdenum blue method, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58 (1994) 866–870.

- [66] M. Latta, M. Eskin, A simple and rapid colorimetric method for phytate determination, *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 1313–1315.
- [67] R. Ellis, E.R. Morris, C. Philpot, Quantitative presence determination of phytate in the of high inorganic phosphate, *Anal. Biochem.* 77 (1977) 536–539.
- [68] T. Kato, K. Takeda, Endogenous abscisic acid in developing grain of primary and secondary branches of rice (*Oryza sativa* L.), *Japanese J. Crop Sci.* 62 (1993) 636–637.
- [69] T. Tang, H. Xie, Y. Wang, B. Lü, J. Liang, The effect of sucrose and abscisic acid interaction on sucrose synthase and its relationship to grain filling of rice (*Oryza sativa* L.), *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 2641–2652.
- [70] M. Ogawa, K. Tanaka, Z. Kasai, Accumulation of phosphorus, magnesium and potassium in developing rice grains: followed by electron microprobe X-ray analysis focusing on the aleurone layer, *Plant Cell Physiol.* 20 (1979) 19–27.
- [71] N. Mitsuhashi, M. Ohnishi, Y. Sekiguchi, Y. Kwon, Y. Chang, S. Chung, Y. Inoue, R.J. Reid, H. Yagisawa, T. Mimura, Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* induced by high concentration of inorganic phosphate and cations, *Plant Physiol.* 138 (2005) 1607–1614.
- [72] V. Raboy, P.F. Gerbasi, K.A Young, S.D. Stoneberg, S.G. Pickett, A.T. Bauman, P.P. Murthy, W.F. Sheridan, D.S. Ertl, Origin and seed phenotype of maize *low phytic acid 1-1* and *low phytic acid 2-1*, *Plant Physiol.* 124 (2000) 355–368.
- [73] B. Campion, F. Sparvoli, E. Doria, G. Tagliabue, I. Galasso, M. Fileppi, R. Bollini, E. Nielsen, Isolation and characterisation of an *lpa* (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Theor. Appl. Genet.* 118 (2009) 1211–1221.
- [74] F.-J. Yuan, H.-J. Zhao, X.-L. Ren, S.-L. Zhu, X.-J. Fu, Q.-Y. Shu, Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.), *Theor. Appl. Genet.* 115 (2007) 945–957.
- [75] K. Tanino, C.J. Weiser, L.H. Fuchigami, T.H. Chen, Water content during abscisic acid induced freezing tolerance in Bromegrass cells, *Plant Physiol.* 93 (1990) 460–464.
- [76] J. Phillips, O. Artsaenko, U. Fiedler, C. Horstmann, H.P. Mock, K. Müntz, U. Conrad, Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch, *EMBO J.* 16 (1997) 4489–

4496.

- [77] K. Nakashima, K. Yamaguchi-Shinozaki, ABA signaling in stress-response and seed development, *Plant Cell Rep.* 32 (2013) 959–970.
- [78] K. Aoki, Y. Ogata, D. Shibata, Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology, *Plant Cell Physiol.* 48 (2007) 381–390.
- [79] Y. Sato, B.A. Antonio, N. Namiki, H. Takehisa, H. Minami, K. Kamatsuki, K. Sugimoto, Y. Shimizu, H. Hirochika, Y. Nagamura, RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in japonica rice grown under natural field conditions, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) D1141–D1148.
- [80] K. Ozawa, Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Sci.* 176 (2009) 522–527.
- [81] H. Zhang, J. Jin, L. Tang, Y. Zhao, X. Gu, G. Gao, J. Luo, PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) D1114–D1117.
- [82] C. Dubos, R. Stracke, E. Grotewold, B. Weisshaar, C. Martin, L. Lepiniec, MYB transcription factors in *Arabidopsis*, *Trends Plant Sci.* 15 (2010) 573–581.
- [83] S. Araki, M. Ito, T. Soyano, R. Nishihama, Y. Machida, Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G₂/M phase-specific genes in tobacco, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 32979–32988.
- [84] R. Stracke, M. Werber, B. Weisshaar, The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (2001) 447–456
- [85] B.L. O'Dell, A.R. De Boland, S.R. Koirtyohann, Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains, *J. Agric. Food Chem.* 20 (1972) 718–723.
- [86] T. Akihiro, T. Umezawa, C. Ueki, B.M. Lobna, K. Mizuno, M. Ohta, T. Fujimura, Genome wide cDNA-AFLP analysis of genes rapidly induced by combined sucrose and ABA treatment in rice cultured cells, *FEBS Lett.* 580 (2006) 5947–5952.
- [87] Y. Sato, H. Takehisa, K. Kamatsuki, H. Minami, N. Namiki, H. Ikawa, H. Ohyanagi, K. Sugimoto, B.A. Antonio, Y. Nagamura, RiceXPro version 3.0: expanding the informatics resource for rice transcriptome, *Nucleic*

Acids Res. 41 (2013) D1206–D1213.

- [88] T. Ohdan, P.B. Francisco, T. Sawada, T. Hirose, T. Terao, H. Satoh, Y. Nakamura, Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice, *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 3229–3244.
- [89] S.-K. Lee, S.-K. Hwang, M. Han, J.-S. Eom, H.-G. Kang, Y. Han, S.-B. Choi, M.-H. Cho, S.H. Bhoo, G. An, T.-R. Hahn, T.W. Okita, J.-S. Jeon, Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Mol. Biol.* 65 (2007) 531–546.
- [90] T. Umemoto, M. Yano, H. Satoh, a Shomura, Y. Nakamura, Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties, *Theor. Appl. Genet.* 104 (2002) 1–8.
- [91] H. Satoh, A. Nishi, K. Yamashita, Y. Takemoto, Y. Tanaka, Y. Hosaka, A. Sakurai, N. Fujita, Y. Nakamura, Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm, *Plant Physiol.* 133 (2003) 1111–1121.
- [92] A. Nishi, Y. Nakamura, N. Tanaka, H. Satoh, Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose-extender* mutation in rice endosperm, *Plant Physiol.* 127 (2001) 459–472.
- [93] A. Kubo, N. Fujita, K. Harada, T. Matsuda, H. Satoh, Y. Nakamura, The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm, *Plant Physiol.* 121 (1999) 399–410.
- [94] Y. Sano, M. Katsumata, K. Okuno, Genetic studies of speciation in cultivated rice. 5. Inter- and intraspecific differentiation in the waxy gene expression of rice, *Euphytica.* 35 (1986) 1–9.
- [95] C. Wu, T. Adachi, T. Hatano, H. Washida, A. Suzuki, F. Takaiwa, Promoters of rice seed storage protein genes direct endosperm-specific gene expression in transgenic rice, *Plant Cell Physiology.* 39 (1998) 885–889.
- [96] T. Kawakatsu, M.P. Yamamoto, S. Hirose, M. Yano, F. Takaiwa, Characterization of a new rice glutelin gene *GluD-1* expressed in the starchy endosperm, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 4233–4245.
- [97] M.P. Yamamoto, Y. Onodera, S.M. Touno, F. Takaiwa, Synergism between RPBF Dof and RISBZ1 bZIP activators in the regulation of rice seed expression genes, *Plant Physiol.* 141 (2006) 1694–1707.

- [98] D.-H. Chen, C.-L. Chyan, P.-L. Jiang, C.-S. Chen, J.T.C. Tzen, The same oleosin isoforms are present in oil bodies of rice embryo and aleurone layer while caleosin exists only in those of the embryo, *Plant Physiol. Biochem.* 60 (2012) 18–24.
- [99] A. Cernac, C. Benning, *WRINKLED1* encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant J.* 40 (2004) 575–585.
- [100] B. Pouvreau, S. Baud, V. Vernoud, V. Morin, C. Py, G. Gendrot, J. Pichon, J. Rouster, W. Paul, P.M Rogowsky, Duplicate maize *Wrinkled1* transcription factors activate target genes involved in seed oil biosynthesis, *Plant Physiol.* 156 (2011) 674–686.
- [101] M. Suzuki, M.G. Ketterling, Q.-B.Li, D.R. McCarty, Viviparous1 alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling, *Plant Physiol.* 132 (2003) 1664–1677.
- [102] T. Hobo, Y. Kowyama, T. Hattori, A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 15348–15353.
- [103] Y. Kagaya, T. Hobo, M. Murata, A. Ban, T. Hattori, Abscisic Acid-Induced Transcription Is Mediated by Phosphorylation of an Abscisic Acid Response Element Binding Factor, TRAB1, *Plant Cell* 14 (2002) 3177–3189.
- [104] M. Zou, Y. Guan, H. Ren, F. Zhang, F. Chen, A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance, *Plant Mol. Biol.* 66 (2008) 675–83.
- [105] S. Nakamura, T.J. Lynch, R.R. Finkelstein, Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*, *Plant J.* 26 (2001) 627–635.
- [106] J. Verdier, R.D. Thompson, Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling, *Plant Cell Physiol.* 49 (2008) 1263–1271.
- [107] D.-M. Xi, C.-C. Zheng, Transcriptional regulation of seed storage protein genes in *Arabidopsis* and cereals, *Seed Sci. Res.* 21 (2011) 247–254.
- [108] M.J. Holdsworth, L. Bentsink, W.J.J. Soppe, Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination, *New Phytol.* 179 (2008) 33–54.
- [109] S.A. Braybrook, J.J. Harada, LECs go crazy in embryo development, *Trends Plant Sci.* 13 (2008) 624–630.

- [110] D.W. Meinke, L.H. Franzmann, T.C. Nickle, E.C. Yeung, Leafy *cotyledon* mutants of *Arabidopsis*, *Plant Cell*. 6 (1994) 1049–1064.
- [111] T. Lotan, M. Ohto, K.M. Yee, M.A. West, R. Lo, R.W. Kwong, K. Yamagishi, R.L. Fischer, R.B. Goldberg, J.J. Harada, *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells, *Cell*. 93 (1998) 1195–205.
- [112] Y. Kagaya, R. Toyoshima, R. Okuda, H. Usui, A. Yamamoto, T. Hattori, LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of *FUSCA3* and *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*, *Plant Cell Physiol*. 46 (2005) 399–406.
- [113] M. Santos Mendoza, B. Dubreucq, M. Miquel, M. Caboche, L. Lepiniec, LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves, *FEBS Lett*. 579 (2005) 4666–4670.
- [114] R.W. Kwong, A.Q. Bui, H. Lee, L.W. Kwong, R.L. Fischer, R.B. Goldberg, J.J. Harada, LEAFY COTYLEDON1-LIKE Defines a Class of Regulators Essential for Embryo Development, 15 (2003) 5–18.
- [115] Z. Xie, X. Li, B.J. Glover, S. Bai, G.-Y. Rao, J. Luo, J. Yang, Duplication and functional diversification of *HAP3* genes leading to the origin of the seed-developmental regulatory gene, *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*), in nonseed plant genomes, *Mol. Biol. Evol.* 25 (2008) 1581–1592.
- [116] A. Yamamoto, Y. Kagaya, R. Toyoshima, M. Kagaya, S. Takeda, T. Hattori, *Arabidopsis* NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors, *Plant J*. 58 (2009) 843–856.
- [117] L.-T. Peng, Z.-Y. Shi, L. Li, G.-Z. Shen, J.-L. Zhang, Ectopic expression of OsLFL1 in rice represses *Ehd1* by binding on its promoter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360 (2007) 251–256.
- [118] X. Guo, X. Hou, J. Fang, P. Wei, B. Xu, M. Chen, Y. Feng, C. Chu, The rice *GERMINATION DEFECTIVE 1*, encoding a B3 domain transcriptional repressor, regulates seed germination and seedling development by integrating GA and carbohydrate metabolism, *Plant J*. 75 (2013) 403–16.
- [119] M. Suzuki, H.H.-Y. Wang, D.R. McCarty, Repression of the *LEAFY COTYLEDON 1/B3* regulatory network in plant embryo development by *VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3* genes, *Plant Physiol*. 143 (2007) 902–911.

[120] H. Nakagawa, E. Ohkura, K. Ohmiya, T. Hattori, The seed-specific transcription factor VP1 (OSVP1) is expressed in rice suspension-cultured cells, *Plant Cell Physiol.* 37 (1996) 355–362.

[121] 島村和彰、黒澤建樹、渡邊昌次郎、下水処理分野における晶析技術を利用したりん回収、*エバラ時報*、No.227、(2010)

[122] 木村午朗、フィチン酸について、*有機合成化学*、第 25 巻、(1967) 167-169