

「植物の機能と制御」

平成13年度採択研究代表者

若狭 暁

(独立行政法人 農業技術研究機構 作物研究所 研究室長)

「トリプトファン生合成系における一次・二次代謝の制御と利用」

1. 研究実施の概要

本研究では、DNA組換え技術によりトリプトファン(Trp)生合成系を制御することを目的として、本合成系の一次代謝と二次代謝を制御する機構を明らかにする。さらに、Trpを増加した安全な作物の作製と病虫害防御物質など有用な二次代謝産物の生産をめざす。

これまでに、Trp合成系の鍵酵素であるアントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子をイネから単離して、Trpによるフィードバック阻害に感受性の低下した酵素を作製し、これを導入したイネの遊離Trp含量の飛躍的向上に成功している。この成果をもとに、必須アミノ酸であるTrpの増加した飼料イネ品種の開発をめざして、安全性評価試験を行った。さらに、バレイショやダイズ、アズキなどのナス科およびマメ科作物とシロイヌナズナに改変遺伝子を導入して形質転換体を作製した。このような代謝系の遺伝子操作は、予期しない化合物の生成をもたらす可能性があるとの観点から、これら形質転換体の代謝産物の網羅的解析を行った。さらに、別の α サブユニットの改変型を作製してイネに導入し、特性を明らかにした。

本合成系の各酵素には、アントラニル酸合成酵素(AS)も含めて2~3個のアイソザイムが存在する。一次・二次代謝におけるアイソザイムの役割を明らかにするため、本酵素の生化学的解析および制御領域の解析をめざして、*in vitro*の翻訳システムを確立した。これを利用して活性のある α サブユニットおよび β サブユニットタンパク質を合成し、 α 単独、さらに α と β との相互作用の酵素活性への影響を明らかにした。また、RNAi法によりアイソザイム機能を抑制するためのイネ形質転換体を作製した。さらに、ゲノムの全塩基配列が明らかになっているシロイヌナズナにおいて、Trp生合成系のネットワークに関わる各種の変異体獲得をめざしてスクリーニングを行い、候補系統を得た。

改変型酵素遺伝子OASA1Dを発現するイネ、バレイショ、シロイヌナズナの代謝成分を分析して、Trp以外の関連化合物の変動があまり大きくないこと、および植物種による特徴を明らかにした。

今後、これらの結果に基づいてTrp含量の高い作物を開発する。また、ASアイソザイム機能を明らかにし、新たなASの変異酵素遺伝子を作製する。変異酵素を植物に導入して植物体における機能を*in vitro*の結果と比較する。また、フィードバック制御以外の制御機

構の有無とTrp合成系のネットワークを明らかにする。また、作製した各種の形質転換体の代謝産物を網羅的に分析して、代謝産物の変動の有無、植物による違いをこれまで以上に詳細に解析する。これによって、一次代謝と二次代謝の合成を制御する方法の開発をめざす。これらの研究を総合して、代謝系遺伝子操作の安全性と危険性、また、有効性をあきらかにする。

2. 研究実施内容

(1) 改変作物の作製と解析

作製したTrp含量の増加した作物の特性を明らかにするため、OASA1D遺伝子を導入したイネとアズキ種子のアミノ酸を比較した。遊離Trp含量は、イネで35~270倍、アズキで6~15倍増加していた。これらの遊離アミノ酸含量を図1、図2に示す。イネでは、6系統のうち1系統でアスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、プロリンの増加が見られた。この系統はTrp含量の増加が最も大きかったもので(270倍)、Trp増加の影響を受けていると考えられた。しかし、他の5系統ではアスパラギン、アルギニンの変動が少しみられただけで、大きな変動はなかった。一方、アズキではアルギニン、フェニルアラニンの低下が見られたが大きい変化はなかった。これらのことから、100倍程度の遊離Trpの増加は他のアミノ酸の変動を伴わないと考えられる。

昨年度の閉鎖系温室に続いて、非閉鎖系温室で安全性評価を行った2系統(HW1とHW5)は、導入遺伝子によるTrp含量以外には対象品種である日本晴と差のないことを明らかにした。両系統の全Trp含量は日本晴種子の約200%程度の増加を示した。この2系統については、さらに隔離圃場における安全性評価試験を実施する。

また、エリシター誘導性を示すOASA2について、改変型遺伝子OASA2-M368Kを導入したイネの5MT抵抗性を調査した。その結果、野生型OASA2導入カルスに比べ抵抗性を示すカルスの割合は高いが、OASA1D導入カルスと異なり、強い抵抗性を示すものは少なかった。

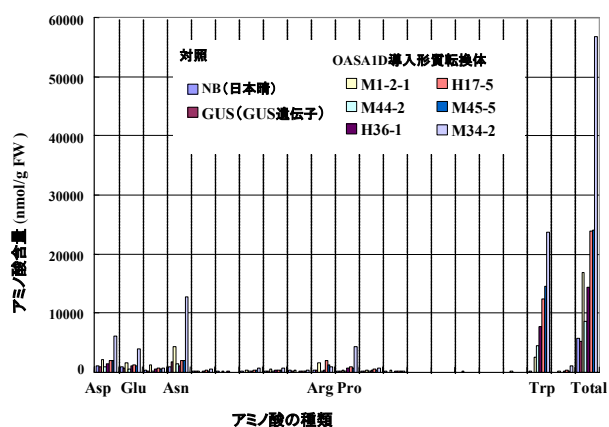


図1 OASA1Dを導入した形質転換体イネ種子の遊離アミノ酸含量比較

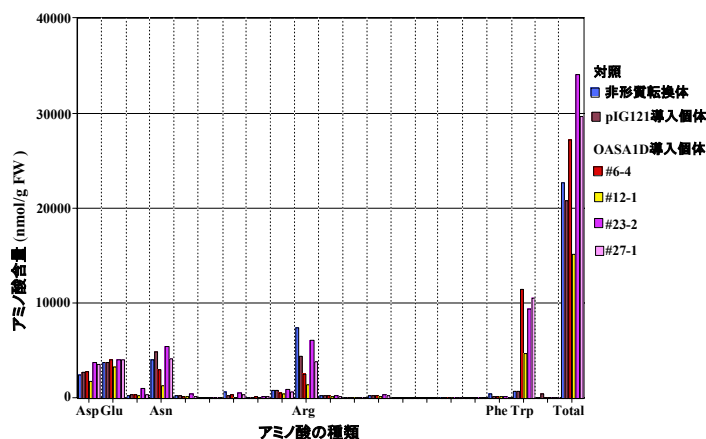


図2 OASA1Dを導入した形質転換体アズキ種子の遊離アミノ酸含量比較

したがって、フィードバック阻害感受性のさらに低下した改変型を作製する必要がある。

RNAi法による解析のため、OASA1とOASA2遺伝子のそれぞれと両遺伝子の発現を抑制するよう設計した数種のベクターを構築してイネに導入し、目的遺伝子の発現が抑制された形質転換体を作製した。これらの特性を解析して、アソザイムの機能を明らかにしていく。

(2) In vitro解析系の応用

イネのアントラニル酸合成酵素βサブユニット遺伝子2個（OASB1およびOASB2）を単離した。OASB1の発現は植物体中で恒常的に高く、エリシターで継続的に誘導されるが、OASB2の発現量は著しく低く、エリシター非誘導性であった（図3）。この結果は、それぞれα2、α1サブユニット遺伝子に対応している。両遺伝子を用いて酵素タンパク質をコムギ胚芽の無細胞系で合成し、βサブユニットとして機能していることを確認した（図4）。本合成タンパク質を用いてαサブユニットとβサブユニットの詳細な酵素学的諸性質を解析する。

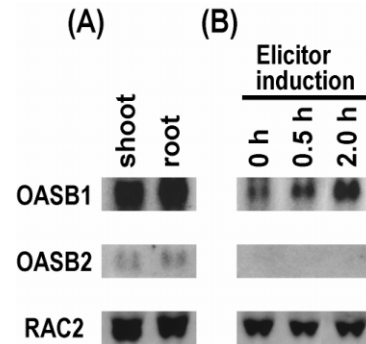
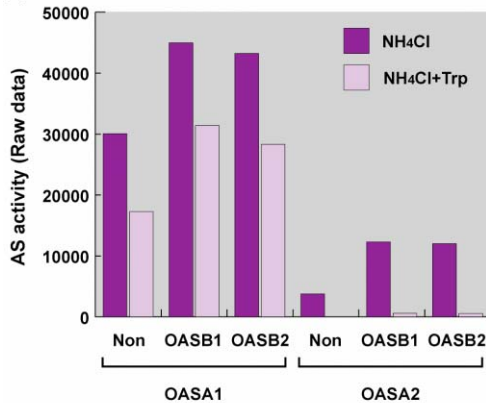


図3 OASB1およびOASB2の遺伝子発現解析

(1) NH₄Clを基質とした場合



(2) Glnを基質とした場合

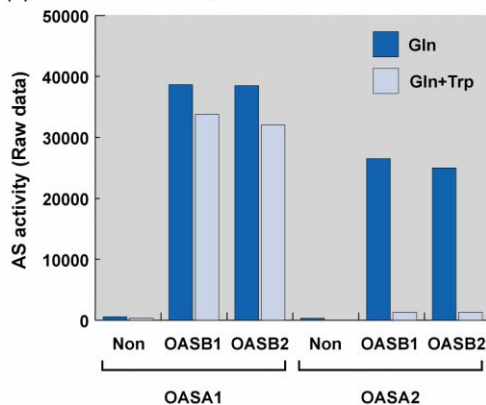


図4 合成イネβサブユニットの活性

Trpフィードバック阻害に対して非感受性の酵素遺伝子を創出するため、部位特異的変異導入技術を利用してOASA2のトリプトファン結合領域のアミノ酸残基を網羅的にアラニン残基に置換し、in vitro解析を行った。この一次スクリーニングによって野生型よりも活性が高まる変異体やフィードバック阻害が低下する変異体などが選抜できた（図5）。これらの有効な変異を組み合わせた変異体をデザインし、in vitro解析し

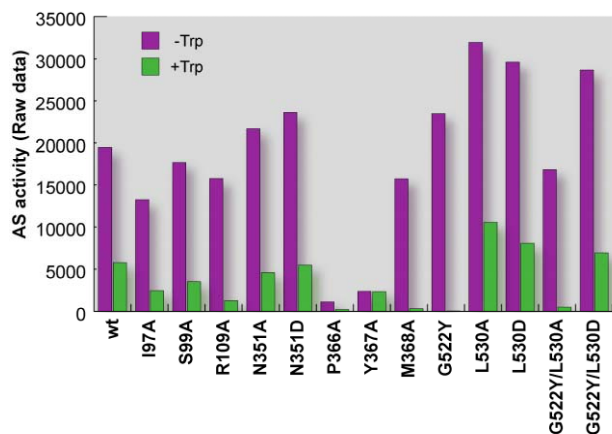


図5 OASA2への部位特異的変位導入

た結果、高活性でTrpフィードバック非感受性の改変型OASA2を創生することができた。

(3) 変異体の探索

イネ由来OASA1Dを導入した形質転換シロイヌナズナを用いて、イネ、バレイショに続いて形質転換植物の選抜マーカーとして利用できる事を示した。また、ASA遺伝子ファミリーには、既知のASA1、2とアミノ酸配列レベルで極めて相同性の高い新規ORFが存在することを見出していたが、RT-PCR法およびRACE法により完全長cDNAを単離して、591アミノ酸からなるASAと極めて高い相同性を持つ新奇遺伝子であること、Trpによるフィードバック制御に関与すると考えられる領域が異なることを明らかにした。さらに、解析を進める。

独自に確立した約12,000の独立なアクティベーション・タギングラインのDNAプールの作成、各プールを構成する1ライン毎のDNAの調製などを行い、全ラインについて挿入破壊株の検索、同定が可能なシステムを完成した。すでに、ASA1, 2, 3の挿入破壊変異候補株の解析を進めている。また、挿入破壊DNAプールの作成過程で植物ゲノムDNAのハイスループレット単離技術を確立した（特許出願2件）。5MT耐性変異体のスクリーニングでは、全てのラインについて一次スクリーニングを終了し、100 μ M 5MTを含む培地上で発芽、生育できる複数の系統を単離し、二次、三次のスクリーニングによる確認を行っている（図6）。

(4) 代謝産物の解析

OASA1D遺伝子を導入してTrp含量が増加したバレイショ塊茎の代謝プロファイル分析を行った。HPLCでの分析結果を図7に示す。OASA1D遺伝子バレイショではTrp（図中のピーク1）の他に、3つの成分含量が2~3倍程度増加しており（ピーク2~4）、これらの成分をそれぞれクロロゲン酸、フェルロイルプトレシン、フェルロイルオクトパミンと同定した。LC/MS, LC/MS/MSによる詳細な検討によっても、有意に含量が変化する他の成分は見られなかった。傷害を与えた場合でもTrp関連化合物の新たな生成は見られなかった。塊茎組織中のAS活性は、非形質転換体と同程度であったものの、Trpからの



図6 アクティベーションタギングライブラリからの新規5MT抵抗性変異株の単離

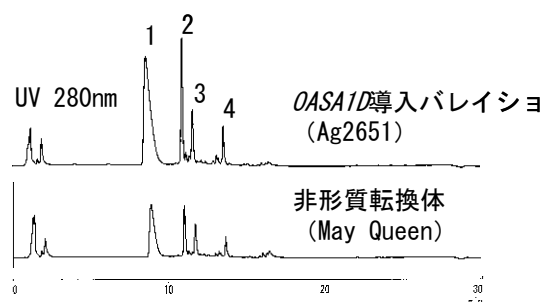


図7 バレイショ塊茎組織中成分のHPLCクロマトグラム
 検出はPDAでおこなった。図はUV280nmの結果を示している。

フィードバック阻害に対して非感受性になっていた。また、エンバクにおけるTrp生合成系改変の影響を予測するために、根に外部からアントラニル酸を投与し、防御物質アベナシン類の蓄積量に対する影響を検討した。アベナシン類の増大は見られなかったが、トリプトファンが増加とともに新たに蓄積してくる化合物の存在が判明した。シロイヌナズナのOASA1D形質転換体の中から、トリプトファンを高濃度に蓄積する系統が見いだされた。この系統ではいくつかの二次代謝化合物の含量がコントロールに比べ減少する傾向が見られた(図8)。

以上のように、先行するイネ、アズキの形質転換体の解析は進んでおり、Trp以外の化合物についても大きな変動がないことが明らかとなった。今後、IAAやファイトアレキシンの解析を行う。in vitro翻訳系での α 、 β サブユニットの機能解析手法を確立できたので、さらに詳細な解析を加えると同時に、RNAi法を利用した植物における解析結果と比較する。シロイヌナズナにおける膨大なスクリーニング作業も終盤を迎えたので、今後、変異体の解析を行う。代謝化合物の分析手法もほぼ確立できたので、作物による違いや、エリクター処理による違いなど詳細な解析を進める。

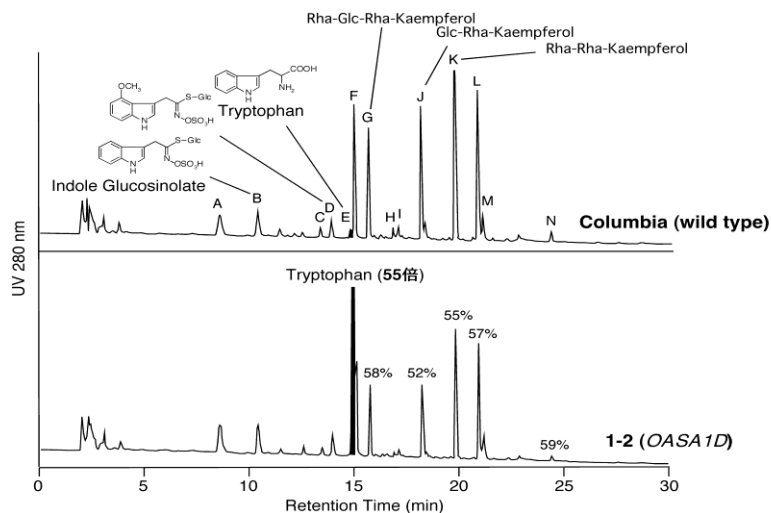


図8 OASA1Dを導入したシロイヌナズナにおける二次代謝産物の変化

3. 研究実施体制

チームリーダー 若狭 暁 (独立行政法人農業技術研究機構 作物研究所、研究室長)
作物改変研究グループ 1

① 研究分担グループ長：若狭 暁 (独立行政法人農業技術研究機構 作物研究所、研究室長)

② 研究項目：形質転換作物作製と解析によるトリプトファン生合成系の制御と利用
法開発

作物改変研究グループ 2

① 研究分担グループ長：石本 政男 (独立行政法人農業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター、主任研究官)

② 研究項目：トリプトファン生合成系の制御による実用的ダイズ形質転換体の開発
in vitro解析グループ

① 研究分担グループ長：戸澤 譲（愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター教授）

② 研究項目：Trpフィードバック制御の新規機能部位の同定と利用
変異探索グループ

① 研究分担グループ長：矢部 尚登（東京大学大学院理学系研究科、助手 7/1より）

② 研究項目：トリプトファン合成系の一次・二次代謝制御に関わる新規因子の単離、
および有用農産物への応用のための基礎的な機能解析
代謝解析グループ

① 研究分担グループ長：宮川 恒（京都大学大学院農学研究科、教授）

② 研究項目：形質転換体におけるトリプトファン合成系代謝の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

○ H. A. El-Shemy, M. M. Khalafalla, K. Wakasa & M. Ishimoto

Reproducible transformation in two grain legumes - soybean and azuki bean -
using different systems, CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS 7:709-719(2002)

（2）特許出願

H14年度特許出願件数：2件（研究期間累積件数：3件）