

「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・生物系特定産業技術研究機構 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、トリプトファン(Trp)生合成系の制御と利用を目的とする。そのため、一次代謝と二次代謝の制御機構を明らかにするとともに、実際にTrpを蓄積する作物の作製と病虫害防御物質などの二次代謝産物の生産をめざす。

トリプトファン生合成系の鍵酵素であるアントラニル酸合成酵素 (AS) α サブユニット遺伝子をイネより単離 (*OASA1*) し、これを改変して、最終産物であるTrpによるフィードバック阻害に感受性の低下した酵素遺伝子 (*OASA1D*) を導入したイネを作製した。これまでに、閉鎖系温室、非閉鎖系温室、隔離ほ場における安全性評価試験を終了し、平成16年度に一般ほ場での栽培を予定している。イネ以外にもダイズ、アズキ、バレイショ、シロイヌナズナに*OASA1D* 遺伝子を導入して形質転換体を作製した。新たに作製したダイズを含め、すべての作物でTrp含量が増加している。イネ、バレイショ、シロイヌナズナでは代謝産物プロファイリングの結果、Trpの増加以外に特に大きな変動はないことを確認した。イネカルス、バレイショ幼植物体においてはIAAの含量を明らかにした。今後は、これらの形質転換植物におけるプロファイリングの継続と微量な増加を示す化合物の分析、植物ホルモンIAAの詳細な解析を重点的に行う。また、RNAi法により、*OASA1*, *OASA2* 遺伝子の発現を抑制したイネのプロファイリングを行って、これらの酵素の役割の解明につなげる。

イネAS α サブユニット遺伝子には発現特性の異なる2個の遺伝子がある。このうち、エリシター誘導性のある*OASA2*は、病害抵抗性などに関与している可能性が高いと考えられているが、フィードバック阻害を回避することができなかった。そのため、in vitroでのタンパク質合成系を駆使して、効率的にフィードバック阻害を受けない*OASA2*を創生した。in vitroでのタンパク質合成系で作製した*OASA1*と*OASA2*の解析により生化学的な機能の差を明らかにした。この研究の過程でin vitroでのタンパク質合成系を用いた効率的な改変酵素のスクリーニングを確立し特許申請した。今後、シキミ酸合成系の各種酵素遺伝子の改変と機能解析、植物体への導入により、トリプトファン合成ならびに、インドール系の二次代謝化合物の合成制御をめざす。

合成酵素の特性を明らかにするため、シロイヌナズナの変異体作出、RNAi法による発

現抑制個体の作製をめざし、シロイヌナズナにおいてはアクティベーションタギングによる5 MT抵抗性変異株、T-DNA挿入破壊変異株を確立した。また、体細胞変異による5 MT抵抗性変異イネの解析を開始した。これらの変異体と発現抑制個体は原因遺伝子の単離と代謝プロファイリングによって酵素の機能あるいは代謝ネットワークを明らかにする。

2. 研究実施内容

1) トリプトファンを蓄積する作物とその代謝プロファイリングについて

高トリプトファン含量のイネは隔離ほ場における安全性評価試験を終了した。ほ場栽培によって、玄米中のトリプトファンが温室栽培時よりさらに蓄積するとともに、温室栽培では見られなかった短稈形質や種子稔性の低下、籾収量の低下、発芽率の低下と発芽遅延などが認められた(表1)。これらはトリプトファン含量の増加と関連している可能性がある。これらの形質以外には親品種である「日本晴」と差は認められなかった(図1)。



図1 隔離圃場におけるHW1(左)と日本晴(右)

表1 隔離ほ場におけるHW1とHW5の主な特性

() 内は日本晴

出穂期、低温耐性、越冬性、

花粉の特性、脱粒性など: **差なし**

種子全トリプトファン含量: 6-8倍

稈長: HW1は **8cm 短い**

粒着密度: HW1は**疎**、 HW5は**やや疎**、(中)

種子稔性: HW1は **60-70%**、HW5は**75-85%**、(92%)

籾収量: HW1は **53%**、 HW5は**70%**、(625 g/m²)

発芽特性: HW1は**不良**、 HW5は**やや良**、(良)

OASAIIDを導入したダイズを作製し、Trpおよび他の遊離アミノ酸量を測定したところ、図2に示すように、種子のTrp含量は0.5%にまで増加した。Arg, Asn, Aspなどは減少する傾向にあるが、総遊離アミノ酸量も約2倍に増加した。これは、T1種子の結果であるため、固定系統の種子のTrp含量はさらに高いと考えられる。OASAIIDを導入したバレイシヨのTrp含量は茎葉と根の両方で3倍程度増加した。

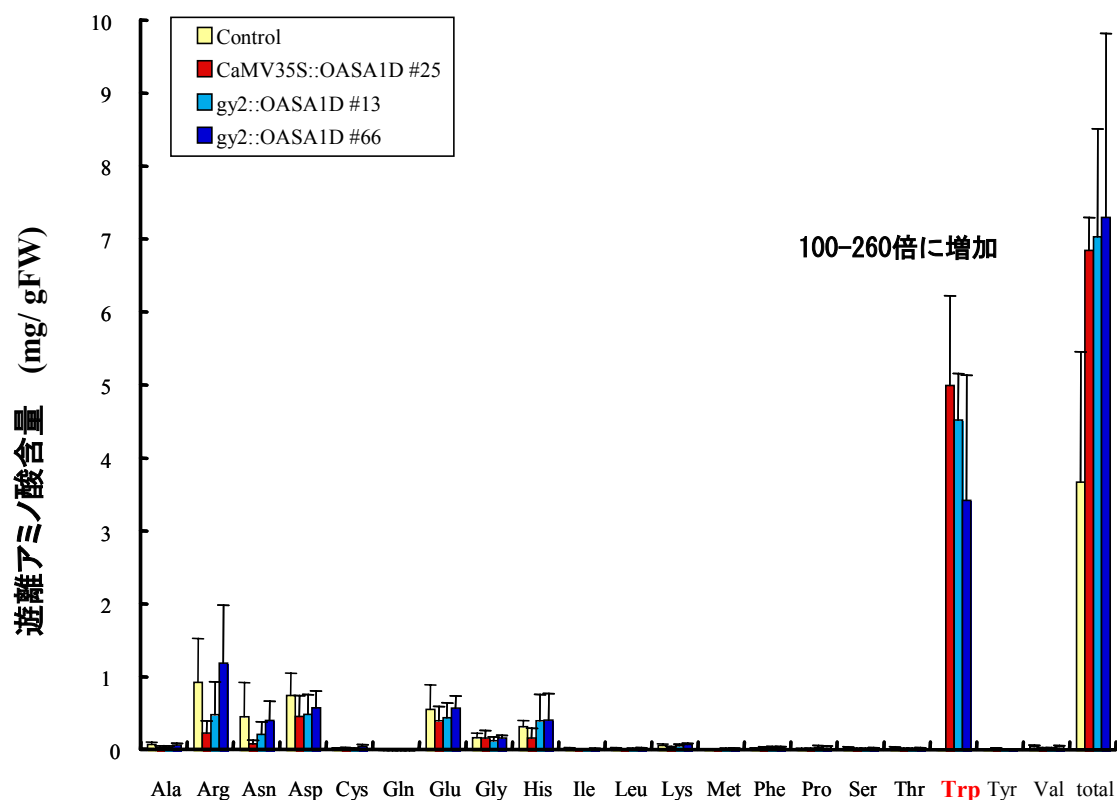


図2 OASA1Dを導入したダイズにおける種子の遊離トリプトファン含量の増加

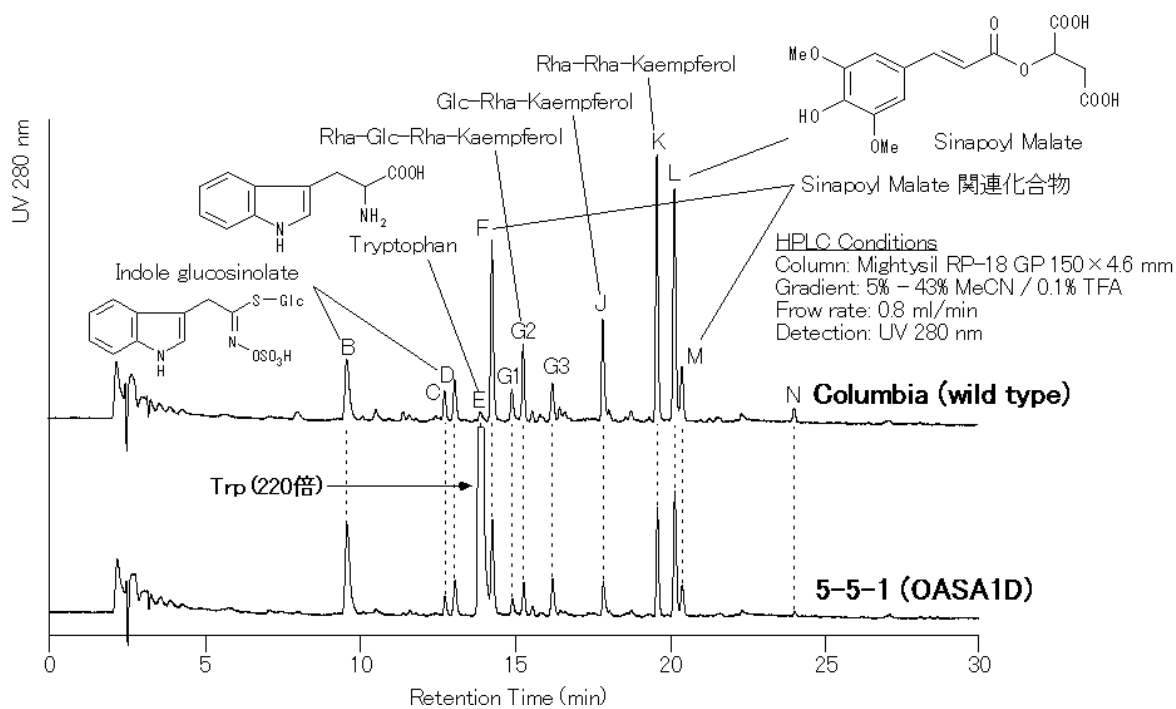


図3 OASA1Dを導入したシロイヌナズナにおける二次代謝産物の変化(葉)

トリプトファンを蓄積したイネのカルス、葉、玄米の芳香族化合物のプロファイリングの結果、いずれにおいても対照の「日本晴」と大きな変化は認められなかった。*OASA1D*を導入したバレイシヨではトリプトファンの他にクロロゲン酸の増加が見られた。シロイヌナズナでは、高トリプトファン蓄積系統でインドールグルコシノレートが増加する傾向が見られたが(図3)、*Alternaria brassicicola*の接種によって誘導されるカマレキシンの量は変化しなかった。*OASA1D*を導入したイネカルスとバレイシヨ再分化植物において植物ホルモンであるIAAが増加していることを確認した(図4、5)。

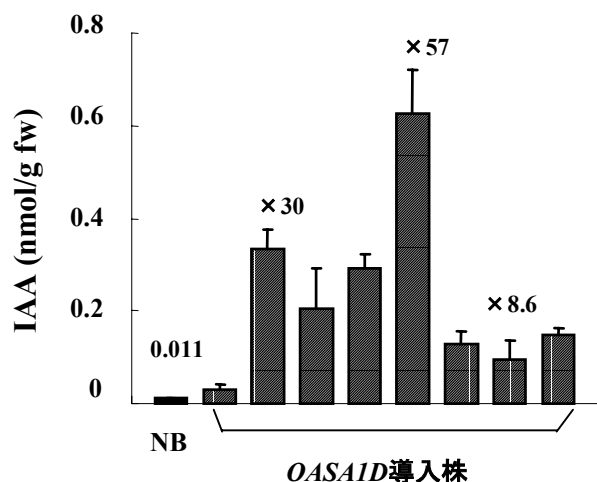


図4 *OASA1D*導入イネカルスのIAA含量

NB: 日本晴

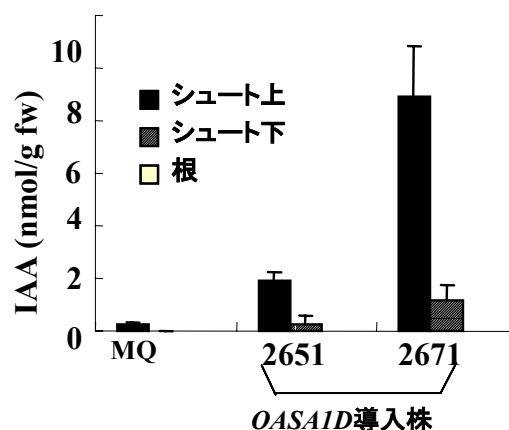


図5 *OASA1D*導入バレイシヨのIAA含量

MQ: メイクイーン

2) アントラニル酸合成酵素と関連酵素の機能解明

イネAS α サブユニット遺伝子には発現特性の異なる2個の遺伝子がある。このうち、エリシター誘導性のあるOASA2は、病害抵抗性などに関与している可能性が高いと考えられているが、酵素活性を維持してフィードバック阻害を回避することができなかった。そこで、*in vitro*でのタンパク質合成系を用いて、フィードバック阻害を受けず酵素活性の低下しないOASA2の効率的なスクリーニング方法を開発した。その結果、2箇所あるいは3箇所のアミノ酸置換によって、酵素活性を維持してフィードバック阻害に感受性が低下した改変型酵素を得ることができた(図6、7)。これらの酵素とOASA1Dについて、 β サブユニットとの相互関係を含めた特性を解析し、OASA1は細胞のTrp濃度を決定する主な役割を持つ酵素であり、OASA2は、病原菌感染などにより二次代謝物合成へTrpが必要となった場合にTrp供給の役割を持つとの仮説を提唱した。図中、星印をつけた酵素遺伝子について、イネなどに導入して代謝変動を明らかにする予定である。

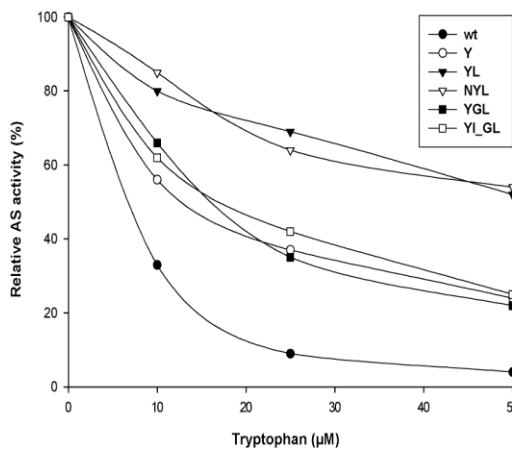


図6 改変型OASA2の Trpによるフィードバック阻害

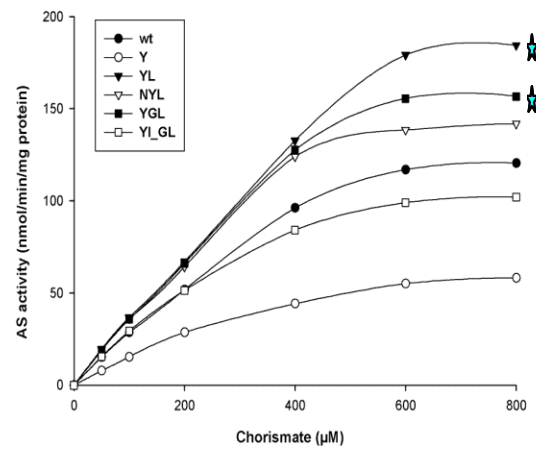


図7 改変型OASA2の酵素活性

代謝産物の合成を制御するためには、合成酵素の特性を明らかにすることが重要である。そのため、シロイヌナズナの変異体探索と解析、イネ5MT抵抗性変異体の解析、RNAi法によるイネ *OASA1* と *OASA2* の発現抑制個体の作製をめざした。その結果、シロイヌナズナにおいてはアクティベーションタギングによる5MT抵抗性変異株、T-DNA挿入破壊変異株が確立できた。得られた5MT抵抗性変異体は、既知の変異体 (*trp-5*) と同じかやや強い5MT抵抗性を示したが(図8)、2,4-D培地での根の伸長は対照の「コロンビア」と変わらず(図9)、内生IAA含量に差がないことが示唆された。5MTによる根の伸長阻害は50 μM付近から現れ始め75 μMで顕著になったが、100 μMでも生育は可能であった。しかし、根の伸長阻害が起こることと並行して主根の優占性が失われるという表現型が認められた(図10)。これは *OASA1D* を導入した形質転換体では認められないものであり、また外部からオーキシンを与えたとき認められる側根の促進とも異なっている。今後、特性を詳細に解析するとともに原因遺伝子を単離する。

イネの体細胞変異による5MT抵抗性変異体カサの芳香族アミノ酸について比較したところ、抵抗性カサではTrpとともにPheの蓄積が認められた。今後、原因遺伝子を単離して機構を明らかにする。また、RNAi法により作製したイネについて、*OASA1* と *OASA2* の発現抑制について詳細な解析を終了した。*OASA2* のコード領域の配列でRNAiを起こしたイネは培地中にTrpが存在しないと枯死した(図11)。カサと個体の代謝プロファイリングによって差の有無を明らかにする。

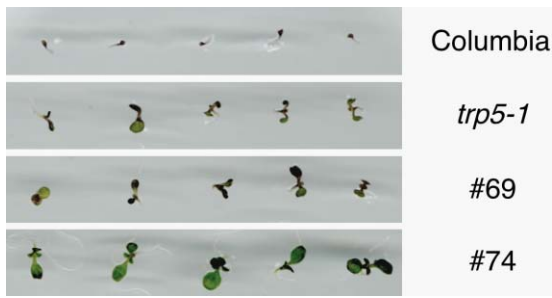


図8 新奇および既知の5MT抵抗性変異体の5MT抵抗性

50 μ M 5MT培地上、播種後9日目の様子.
上から野生型、既知変異体 (*trp5-1*)、新奇
変異体 (#69, #74)

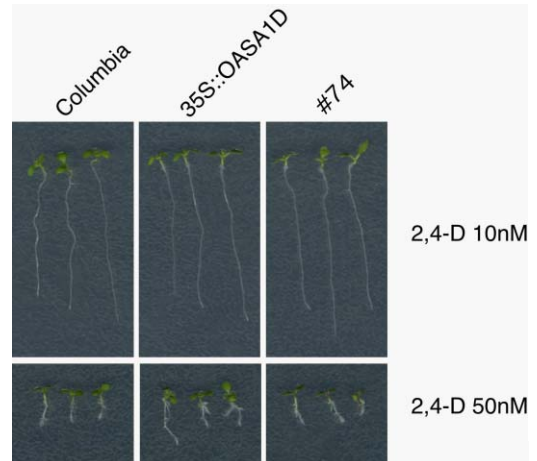


図9 OASA1D過剰発現体および新奇5MT抵抗性
変異体 (#74) の2,4-Dによる根の伸長阻害効果

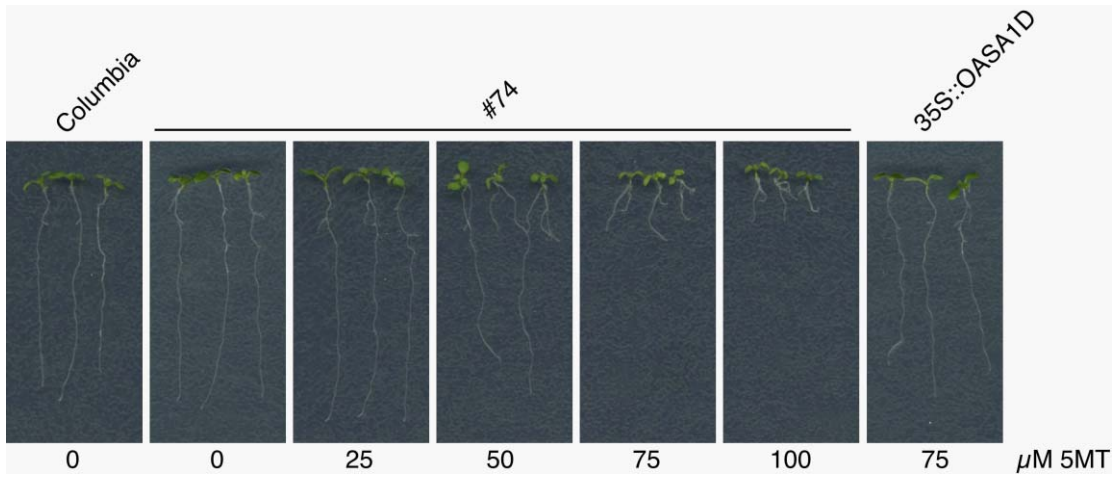


図10 5MT培地での根の伸長

縦置培地上で播種後11日の様子.
新奇5MT抵抗性変異体 (#74) は高濃度5MT上で主根の優占性が低下する.

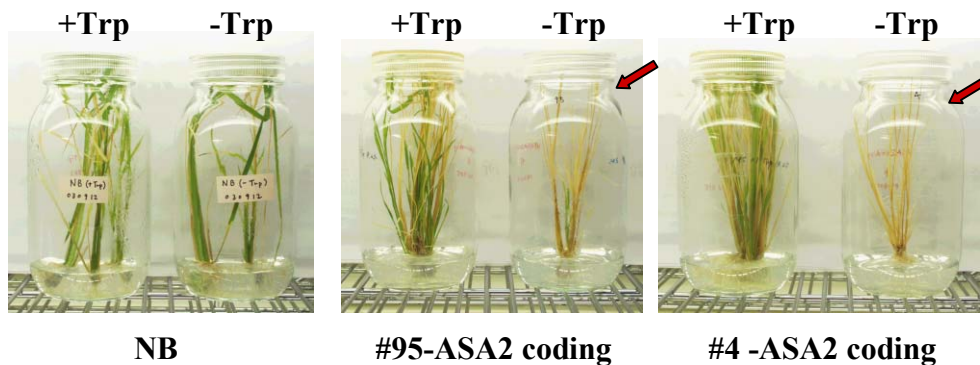


図11 RNAiによりトリプトファン要求性となったイネ (赤矢印)

NB: 日本晴 (コントロール)、#95, #4 は抑制個体.
移植後 3 週間の様子.

3. 研究実施体制

作物改変グループ

- ① 研究分担グループ長：若狭 暁（（独）農業・生物系特定産業技術研究機構 作物研究所室長）
- ② 研究分担グループ長：石本政男（（独）農業・生物系特定産業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター 主任研究官）
- ③ 研究項目：形質換体作製解析、作物遺伝子等の単離

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：遺伝子改変とIn vitro解析

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研究科 助手）
- ② 研究項目：新奇変異探索とその解析

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 形質転換体の代謝産物解析

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

- Kanno, T., K. Kasai, Y. Ikejiri-Kanno, K. Wakasa and Y. Tozawa In vitro reconstitution of rice anthranilate synthase: distinct functional properties of the α subunits OASA1 and OASA2. *Plant Molecular Biology* 54: 11-23 (2004)

（2）特許出願

H15年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：6件）