

「植物の機能と制御」

平成13年度採択研究代表者

若狭 暁

(東京農業大学 教授)

## 「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。研究期間の後半ではシキミ酸経路を含めた広範囲の代謝経路の制御をめざす。

Trp生合成系の制御は、本合成系の鍵酵素であるアントラニル酸合成酵素(AS)  $\alpha$ サブユニット遺伝子を改変して、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の利用を中心に行った。本酵素遺伝子の一つである*OAS1D*を導入した作物はすべてTrpの蓄積を示した。このうち、イネについては、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行い、家畜への飼養試験に十分な量の子実を得ることができた。ダイズについても安定したTrpの蓄積が確認されたので、今後、飼養試験のための子実の獲得を図る。

飼料用など作物として利用するためには、この改変遺伝子を導入してTrpを蓄積した作物の代謝変動がないことが望ましい。このため、これまでカルス、植物体、種子で代謝産物のプロファイリングを行い、Trp以外に大きな変動のないこと、しかし、微量な化合物であるIAAが増加することを確認した。また、2個のイネAS  $\alpha$ サブユニット遺伝子のうち、エリシター誘導性のある*OAS2*について、in vitroでのタンパク質合成系を駆使して、前年度よりもさらに効率的にTrpを蓄積する改変酵素を創生し、そのTrp蓄積に対する効果を確認した。また、Trp合成系の上流であるシキミ酸経路の制御をめざし、多くの酵素遺伝子を単離し特性を明らかにした。また、Trpとフェニルアラニンが増加するイネの変異体解析の結果、この候補遺伝子のマッピングと同定に成功した。アクティベーションタギングによるシロイヌナズナの5MT抵抗性変異株は、インドールグルコシノレートを蓄積することを明らかにし、原因遺伝子候補の解析を行った。今後はシキミ酸経路の酵素遺伝子と新たな変異体の原因遺伝子の利用により有用な化合物生産のための研究をめざす。

## 2. 研究実施内容

### 1) Trpの蓄積とIAA含量の増加について

*OAS1D*遺伝子を導入したイネおよびダイズについて解析した。イネは2003年に環境に対する安全性評価を隔離ほ場において行ったが、その評価結果をもとに第一種使用申請をして一般ほ場栽培が認められた。この栽培の目的は、家畜に対する飼養試験を実施するのに十分な子実を得ることであったが、2004年は天候にも恵まれ、試験に供した2系統の収穫は、日本晴74kgに対し、HW1は55kg、HW5は61kgとなり、目的を達することができた。隔離ほ場で見られたHW系統と日本晴との特性の違いは、稈長、種子稔性、1穂当たりの穎花数、発芽特性であったが、これらのうち、HW1で見られた短稈傾向はその差が3cmと縮まり、種子稔性も表1に示すように、日本晴に比べてHW1はやや低いものの回復している。玄米収量が少ないことの原因は種子稔性と1穂当たり穎花数が少ないためと思われる、HW1ではその傾向が強かった。結論として、隔離ほ場で認められたHW系統の特性は2004年度の栽培でも同様の傾向が認められたが、その差は小さくなる傾向にあった。今後、得られた子実を用いてまずニワトリへの飼養試験を行う。

**表1 異なる栽培条件におけるトリプトファン高含量イネの種子稔性**

系統	種子稔性 (%)				
	非閉鎖系温室 (2002)	隔離ほ場(2003)		一般ほ場(2004)	
		A	B	A	B
HW1	79.5 ± 6.8	70.2 ± 13.4	59.8 ± 21	78.7 ± 5.7	70.3 ± 7.4
HW5	88.3 ± 5.2	76.7 ± 13.3	86 ± 5.2	81.0 ± 3.4	81.1 ± 7.8
NB	88.2 ± 6.7	92.5 ± 2.8	90.7 ± 2.8	76.6 ± 5.7	88.5 ± 2.3

*OAS1D*の導入により遊離Trp含量が増加したダイズの固定系統 (T<sub>3</sub>世代) を育成した。この種子の遊離Trp含量は非組換え体に比べて、33~72倍増加し、ダイズ種子タンパク質であるグリニシン遺伝子 (*gy2*) のプロモーターにより発現を制御した系統131では乾燥種子重の約0.4%に達した (図2a)。全Trp含量も約1.5~2.0倍に増加した (図2b)。高Trp種子は正常に発芽、生長し、稔実した。*gy2:OAS1D*を導入した組換え体は、ウェスタンプロットにより登熟種子における*OAS1D*の蓄積が認められたが、*35S:OAS1D*を導入した組換え体では*OAS1D*が検出されなかった。しかし、後者においてもL-Trpによる活性阻害の程度が小さくなっており、*OAS1D*の発現により、Trp含量が増加したと推定した。今後、ダイズにおいてもプロファイリングと飼養試験を行う。

これまで、*OAS1D*導入によりTrpを蓄積する植物の代謝プロファイリングの結果から、Trp以外に大きな変動を示す化合物がないことを確認している。しかし、微量成分であるIAAが増加していたことから、*OAS1D*導入イネ植物体 (発芽後2週間) について、Trp蓄積

がIAA含量に及ぼす影響を詳しく調査した。また、IAA生合成中間体の一つであるインドールアセトニトリル (IAN) を定量した。イネ植物体を図3に示した部分毎に80%アセトンで抽出し、抽出物を逆相系の固相カートリッジを用いて精製した後、LC/MS/MS分析に供した。その結果、*OASA1D*導入イネは野生型と比べて形態に顕著な差は見られないにもかかわらず、IAA含量は植物体の全身で有意に増加していた。興味深いことにIAAの植物体内における分布はTrp蓄積と同様の傾向を示していた。さらにIANもこれら二つの成分と同様の分布傾向で増加しており、蓄積しているIAAがTrpからIANを経て生合成されていることが示唆された。

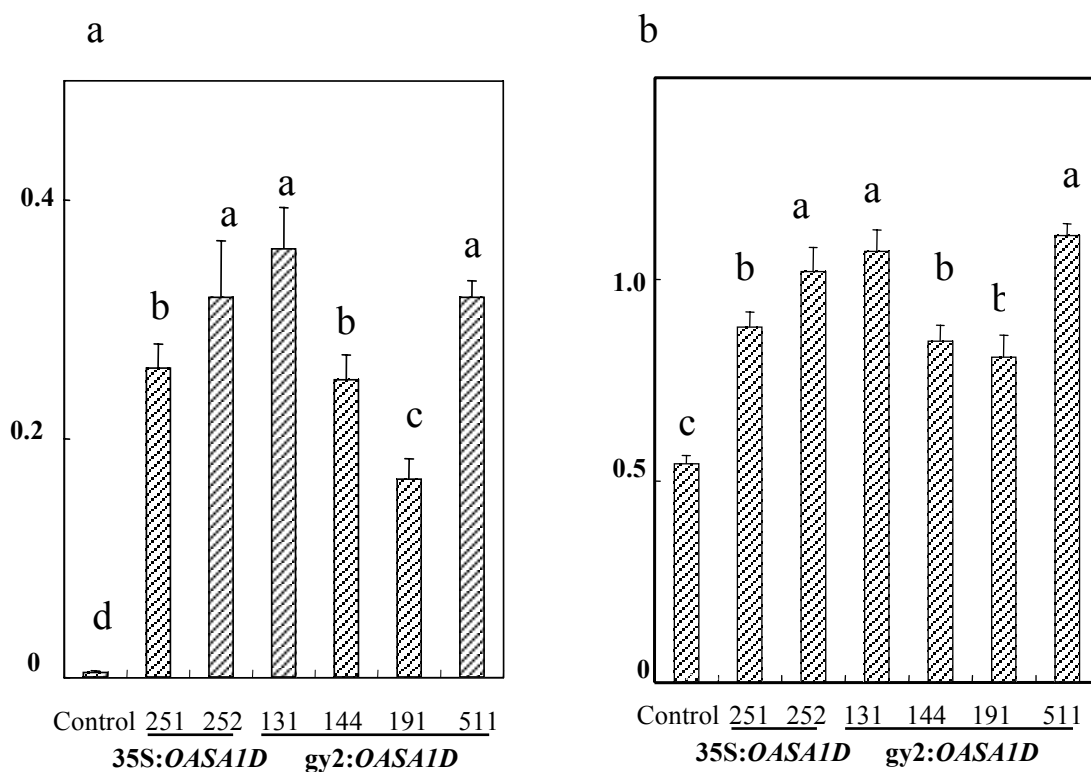


図2 *OASA1D*導入組換え体のダイズ種子トリプトファン含量

a 遊離トリプトファン含量(%), b 全トリプトファン含量(%).

各個体(T3世代)3粒の種子を個別に粉碎し測定した。平均値±SDで示した。

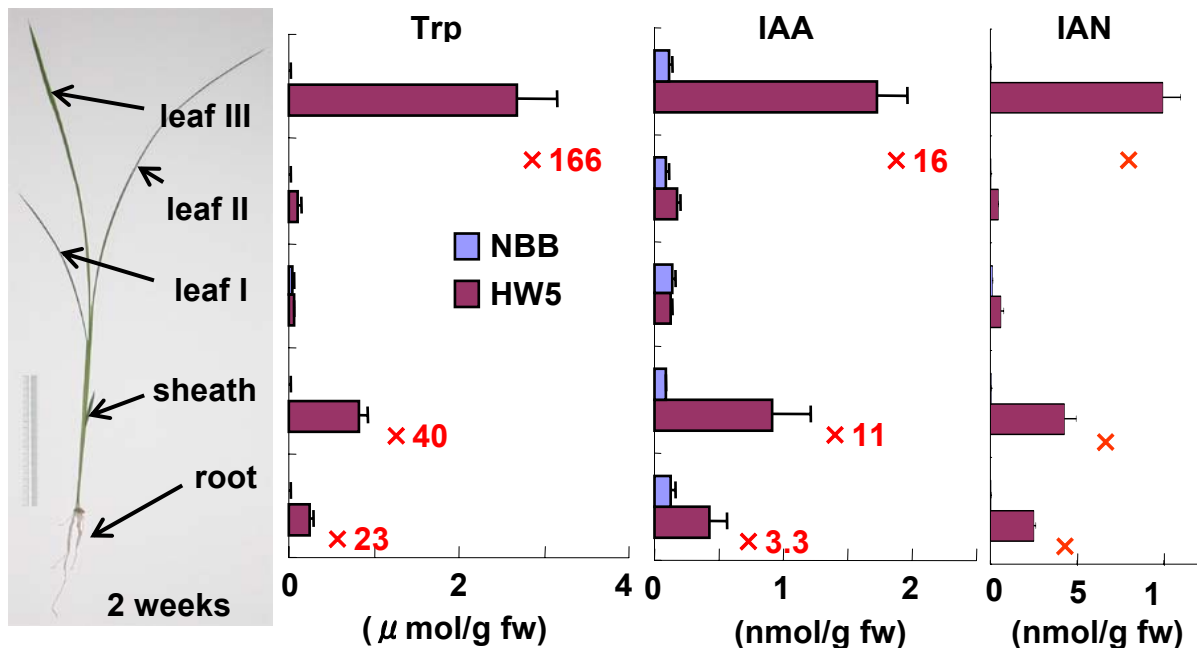


図3 イネ植物体の部位別IAAおよびIAN含量

2) 新たな変異酵素の植物における機能確認とシキミ酸経路の解析

表2 改変 OASA2 遺伝子を導入したイネカルの遊離Trp含量

系統 <sup>a</sup>	遊離Trp含量 <sup>b</sup> (nmol g <sup>-1</sup> fw)	相対値 (倍数)
NB	32 ± 5	1.0
WT 22	7 ± 1	0.2
WT 28	20 ± 5	0.6
Y1	176 ± 12	5.5
Y29	532 ± 225	16.6
YL65	1,106 ± 311	34.6
YL 68	1,243 ± 184	38.8

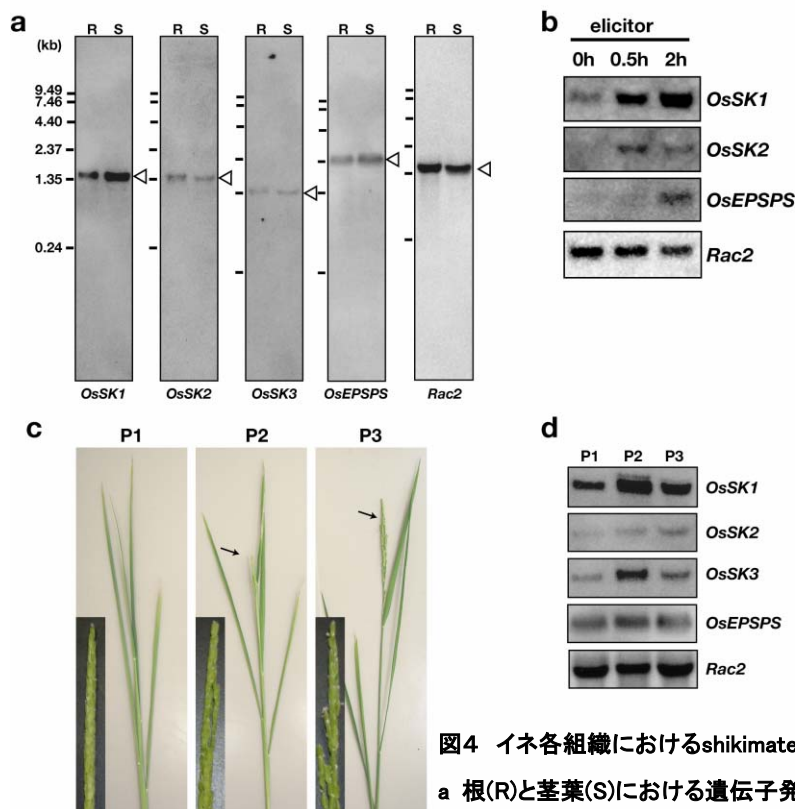
a NB; 日本晴、WT、Y、YL; 形質転換体の系統.

b データは3サンプルの平均± SD.

前年度より進めてきたイネ *OASA2* 遺伝子への変異導入による改変遺伝子をイネに導入し、Trp 含量が向上することを確認した (表2)。この結果から、Trpの蓄積量は生化学的な酵素機能を反映していることが明らかとなり、変異酵素のフィードバック阻害の強弱の差を利用して細胞内Trp蓄積濃度 (5倍~40倍) をある程度制御できることが示唆された。

イネのTrp生合成経路上流に位置するシキミ酸経路に関わる酵素遺伝子の中で特に代謝制御に重要と推定したDAHP合成酵素4

種類、シキミ酸キナーゼ3種類、EPSP合成酵素1種類についてタンパク質合成を行い、酵素機能解析を行った。シキミ酸キナーゼは、芳香族アミノ酸および関連化合物の生合成に重要であるとともに、タンニンなどの二次代謝物の前駆体ともなる。本酵素の発現解析



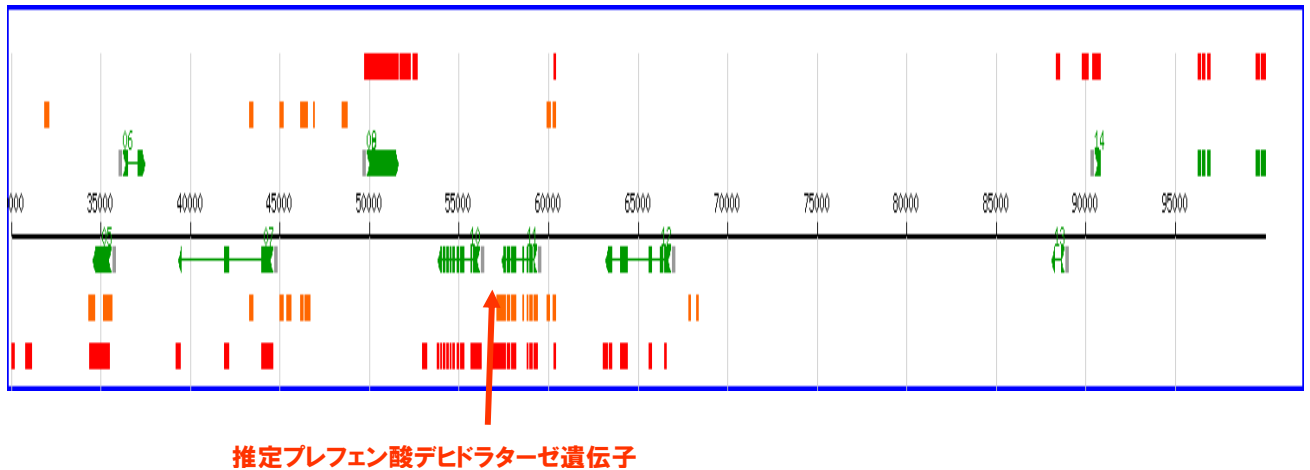
(図4) と生化学的な解析により、アイソザイム遺伝子 (OSK1, OSK2, OSK3) のうちOSK1が主要アイソザイムであると考えられた。また、試験管内で合成した本酵素は、シキミ酸からEPSPまでの変換を効率よく触媒することを確認した。

図4 イネ各組織におけるshikimate kinase遺伝子の発現

a 根(R)と茎葉(S)における遺伝子発現の分布、b エリシター処理の効果、c 穂の発育段階の様子、d 穂の各時期における転写産物、*Rac2*はrice actin2 gene.

### 3) イネ、シロイヌナズナ変異体の解析

5-メチルトリプトファン(5MT)抵抗性を示すイネの体細胞突然変異体はTrpとフェニルアラニンを蓄積し、二次代謝化合物の変化も認められる。この抵抗性因子の同定のため、抵抗性変異体とインド型イネカサラスのF<sub>1</sub>個体から得られた種子を用いて、SSRならびにCAPSマーカーによる発芽種子の5MT抵抗性のマッピングを行い、座乗領域を明らかにした。さらに、候補領域内で組換えを起こしている個体の詳細な解析から、原因遺伝子はPACクローンP0627E10(AP005199)上のSSRマーカーRM172よりもテロメア側にあると予測した。この領域には、シキミ酸生合成経路関連の遺伝子である推定プレフェン酸デヒドラターゼ遺伝子が存在する(図5)。植物でこの酵素が機能することは現在のところ認められていないが、バクテリアではフェニルアラニン生合成に関与する鍵酵素である。変異体からRT-PCRによって本遺伝子をクローニングし、その塩基配列の決定から、変異体には非同義置換が一つ存在することを確認した。この違いを利用して作製したdCAPSマーカーにより、ホモ接合体で維持することが難しい変異体の表現型と、変異遺伝子型との関係を精査することが可能となった。現在、本遺伝子の導入による確認を行っている。



**図5 PACクローンP0627E10 (AP005199) のアノテーションマップ(一部抜粋)**  
**(一部抜粋)推定プレフェン酸デヒドラターゼ遺伝子の位置(赤字)を示す**

新規に単離したシロイヌナズナ5MT抵抗性変異体について、表現型の解析、Trp関連二次代謝系への位置づけを行った。このうち抵抗性の明確な#74について *rmt1* (resistant to methyl tryptophan 1) と命名し、変異体名として登録した。*rmt1* は、可視的変異は認められないものの既知の変異と比べて高い5MT抵抗性を示す。5MT抵抗性が獲得されるためには、何らかの機構で遊離Trp濃度を高めて相対的な細胞内5MT濃度を下げ、5MTの毒性を希釈することで抵抗性を獲得する機構、あるいはTrp由来二次代謝系をはじめとする関連代謝系を活性化することで5MTを無毒な二次代謝産物に変換し、細胞内5MT濃度を低下させることで抵抗性を獲得する機構が考えられる。*rmt1* の根におけるAS活性は2倍程度まで上昇していたが、遊離Trp濃度、ASのフィードバック阻害等は野生型と有意差が認められず、Trp濃度の増加による抵抗性ではないと考えられる。一方、*rmt1* はその二次代謝産物プロファイリングから主にアブラナ科で特徴的なTrp由来抗菌性二次代謝産物であるインドールグルコシノレート類(IGs)を野生型の約20倍という極めて高濃度で蓄積する。これまで、これほどの高濃度で蓄積するものは知られていない。*rmt1* のIGsの生合成系における機能を明らかにするため、IGs合成系、および病害応答系に関与する遺伝子群の発現について解析した(図6)。現在のところMyb様転写因子と考えられるATR1がIGs制御系の最上位に位置づけられている(Calenza et al. 2005)が、*rmt1* においてATR1および下流のIGs合成系遺伝子群の発現も上昇していることから、RMT1はATR1を介してIGs合成系を制御する制御因子であると推定される。現在、新たな遺伝子の挿入破壊変異株との多重変異株を作製して詳細を解析中である。このIGsの生合成系と5MT抵抗性との関連を明らかにするため、5MTの代謝物の探索を行った。その結果、5MTから合成されるインドールグルコシノレートの蓄積が見出された(図7)。したがって、*rmt1* は5MTの代謝・解毒によって、耐性を獲得していると推定された。

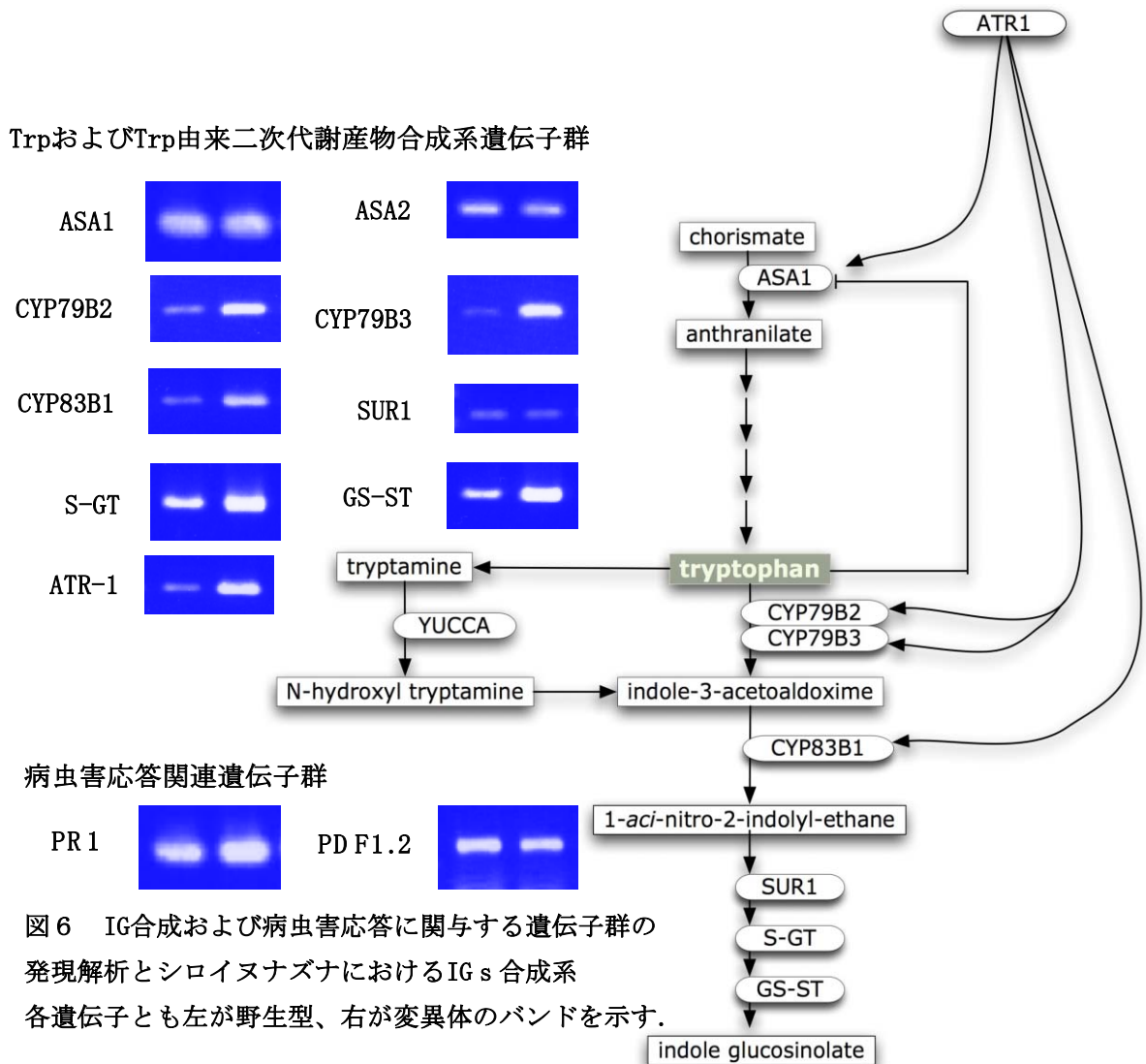


図6 IG合成および病虫害応答に関与する遺伝子群の発現解析とシロイヌナズナにおけるIGs合成系各遺伝子とも左が野生型、右が変異体のバンドを示す。

IGsはTrp由来抗菌性二次代謝産物であり、実用的な価値が期待されている。そのため、*rmt1*にアブラナ科を宿主とする種々の病原菌の接種を行ったが、抵抗性に野生型植物と大きな違いは見られなかった。また、植食性の昆虫による選択にも違いがなかった。

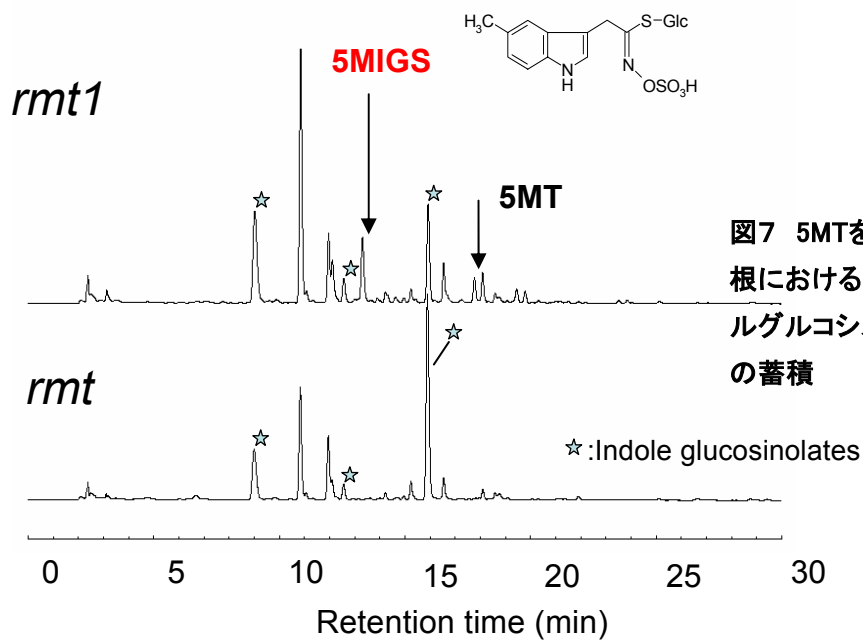


図7 5MTを処理した*rmt1*の根における5-メチルインドールグルコシノレート(5MIGS)の蓄積

### 3. 研究実施体制

#### 1) 作物改変グループ

- ① 研究分担グループ長：若狭 暁（農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所 室長）  
 ；石本 政男（ 同 北農研センター 室長）

- ② 研究項目：形質転換体作製解析、作物遺伝子等の単離

#### 2) 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

#### 3) 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）  
 ② 研究項目：新奇変異探索とその解析

#### 4) 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

#### 5) イネ変異体解析グループ

- ① 研究分担グループ長：山田 哲也（北海道大学大学院農学研究科 助手）  
 ② 研究項目：イネ変異体原因遺伝子の単離と解析



#### 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

- Yamada, T., Y. Tozawa, H. Hasegawa, K. Terakawa, Y. Okawa and K. Wakasa,  
Use of a feedback-insensitive  $\alpha$  subunit of anthranilate synthase as a  
selectable marker for transformation of rice and potato  
Molecular Breeding, 14: 363-373 (2004)
- Matsuda, F., K. Morino, R. Ano, M. Kuzawa, K. Wakasa and H. Miyagawa  
Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-  
treated potato tuber tissue. Plant and Cell Physiology, 46: 454-466  
(2005)
- Kasai, K., T. Kanno, S. Endo, K. Wakasa and Y. Tozawa  
Guanosine tetra- and pentaphosphate synthase activity in chloroplasts of  
a higher plant: association with 70S ribosomes and inhibition by  
tetracycline  
Nucleic Acids Research 32: 5732-5741 (2004)
- Morino, K., F. Matsuda, H. Miyazawa, A. Sukegawa, H. Miyagawa and K.  
Wakasa  
Metabolic profiling of tryptophan-overproducing rice calli that express  
a feedback-insensitive  $\alpha$  subunit of anthranilate synthase  
Plant and Cell Physiology, 46: 514-521 (2005)

##### (2) 特許出願

H16年度特許出願件数：4件（CREST研究期間累積件数：10件）