

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

若狭 暁 (東京農業大学農学部農学科 教授)

主たる共同研究者

戸澤 譲 (愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授)

矢部 尚登 (東京大学大学院理学系研究科 助手)

宮川 恒 (京都大学大学院農学研究科 教授)

石本 政男 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター 上席研究員)

山田 哲也 (北海道大学大学院農学研究科 助手)(平成16年4月～)

3. 研究内容及び成果:

3-1. 研究内容

代謝系の遺伝子操作、いわゆるメタボリックエンジニアリングは、植物の機能改変をめざす植物バイオテクノロジーの重要な目標の一つである。本チームではメタボリックエンジニアリングの可能性を実現するために、栄養価を改善した飼料作物の開発と二次代謝化合物産生への影響、また二次代謝を制御するためのネットワーク解析まで幅広い課題に取り組んだ。以下具体的な取り組みとその主要成果を述べる。

3-2. 研究成果

3-2-1. トリプトファンを蓄積する作物の作用

トリプトファン(Trp)の蓄積を図るためには、シキミ酸経路のキー酵素であるアントラニル酸合成酵素(AS)をTryによるフィードバック阻害に非感受性に変換する必要がある。ASは α と β サブユニットからなる4量体であり、フィードバック制御には α サブユニットが関与している。フィードバック阻害に感受性の低下した改変型酵素遺伝子、OASA1Dを作製し、これを導入したイネのカルスにおける遊離Trp含量は100倍以上、葉のそれは30倍以上蓄積することをポット試験により確認していた。本プロジェクトでは、この遺伝子を導入したイネのTrpの蓄積が後代でもまた圃場栽培でも安定して認められるか、高Trpイネが作物として正常に発育するかどうか、高Trpイネ子実は実際に家畜に対して飼料価値を持つかどうかを明らかにすることを目的の一つとして、イネ2系統(HW系)について環境に対する安全性評価試験を行い、一般圃場栽培まで進めた。

○OASA1D遺伝子によるTrpの蓄積は、2002年から2004年までの試験年度にわたって安定した含有量を示し、全Trp含量は対照品種である「日本晴」の2倍程度であった。これは、実際に飼料用トウモロコシ子実にTrpを添加する量、1.6g/kg種子、に相当する2.4g/kg(HW1)、1.7g/kg(HW5)のTrp含量となり、実用的な量として十分であった。(若狭グループ)

○得られたHW系統子実を用いてニワトリ雛に対する飼養試験を行った結果、対照区の「日本晴」区に比べて有意な飼養効果が認められた。これらのことから、この改変遺伝子によるTrpを蓄積したイネは家畜の飼料として有効であると結論した。(若狭グループ)

○代謝系遺伝子操作は必然的に目的以外の代謝化合物生成をもたらす可能性が高い。そのため、一つは安全性の面から、他方は、新たな代謝化合物生産を制御するための基礎的知見を得るために、形質転換体の代謝プロファイリングを行った。その結果、OASA1D遺伝子を導入して高Trpとなった形質転換体においてTrp以外

の芳香族化合物の大きな変動は認められないことが明らかとなった。(宮川グループ)

○本遺伝子が他の作物でも高濃度のTrp蓄積を可能にするか、代謝ネットワークへの影響は植物種で異なるかを検討するため、OASA1D遺伝子をダイズ、アズキ、バレイショ、シロイヌナズナに導入した結果、すべての作物について、高濃度Trpの蓄積が確認できた。(若狭グループ、矢部グループ、石本グループ)

○イネとは種子成分の大きく異なるダイズでは、遊離Trp含量の増加による総Trp含量の増加は乾燥重の1%以上に達することを明らかにした。(石本グループ)

○これらの形質転換体についても代謝プロファイリング分析を行い、イネと同様にTrp以外の化合物の大きな変動は認められず、種による大きな差異はないことを明らかにした。(宮川グループ)

3-2-2. アントラニル酸合成酵素の解析と新たな変異型酵素の創成

AS α サブユニット遺伝子には発現特性の異なる2つの遺伝子がある。一つはここで用いたOASA1で、発現量は低いが恒常的に発現する。それに対してOASA2は発現量が高い上にエリシターによりさらに発現が誘導される。2つのアイソザイムがどのように役割分担しているかを明らかにするため、イネASの α と β サブユニットの生化学的解析を行った。

○2つの α サブユニットの酵素特性は大きく異なることが明らかとなった。この違いを反映して、OASA2ではOASA1の場合と同様の一アミノ酸置換ではフィードバック阻害を非感受性にする変異型酵素を作製できなかった。そこで、新たに無細胞タンパク質合成系を用いた多数の変異酵素の作製とスクリーニング法を開発した。(戸澤グループ)

○本法を用いて、フィードバック阻害に感受性を低下させるアミノ酸変異と酵素活性を向上させるアミノ酸変異とを明らかにして、これらの複数のアミノ酸を置換した高効率の改変型OASA2酵素を作製することに成功した。(戸澤グループ)

○これを導入したイネはカルスにおいて400倍のTrpを蓄積した。本遺伝子はトウモロコシでもTrpを蓄積することを確認した。ここで開発されたin vitroでの変異タンパク質の作製とスクリーニング法は他の酵素の創成にも適用できる優れたシステムである。(若狭グループ、戸澤グループ)

○2個の α サブユニット遺伝子の機能に違いがあるかどうかを明らかにするために、RNAi法の適用を試みた。OASA1あるいはOASA2の一方の発現を抑制したイネ形質転換体は正常に発育して種子を生産した。両遺伝子の発現を抑制した場合、カルスは正常に増殖するものの植物体の生育にはTrpを要求した。このことは、両遺伝子の発現を抑制した場合、カルスの生育に必要な程度のTrpの合成は起こるが植物体の生育には十分でないことを示している。(若狭グループ)

3-2-3. 新たな代謝系突然変異体の探索と解析

ASに焦点を当てた解析と同時に、新たな代謝系の突然変異体の探索と解析をイネとシロイヌナズナについて行った。

○1989年に、5-メチルTrp (5MT) 抵抗性として報告した体細胞突然変異体イネ(MTR1)はTrpとフェニルアラニン(Phe)を蓄積する。AS α サブユニット遺伝子の変異が最も有力な変異の原因と考えられたが、解析の結果、この遺伝子に変異は存在しなかった。MTR1は新規の変異による可能性が期待された。(若狭グループ)

○MTR1のカルスの代謝プロファイリングから、Trp、Pheとともにフェニルプロパノイド化合物が大きく増加していることが明らかとなった。さらに、この原因遺伝子をイネ染色体上にマップしたところ、推定プレフェン酸デヒドラターゼの遺伝子であるとの結果を得た。(山田グループ、若狭グループ、宮川グループ)

○MTR1変異体の酵素遺伝子は、微生物においてフィードバック制御に重要なアミノ酸として報告されている領域のアミノ酸置換をもたらす変異が存在した。この遺伝子をイネに導入したところ、MTR1変異体の持つ3つの特

性、すなわち、5MT抵抗性、TrpとPheの増加、フェニルプロパノイド化合物の増加が認められたことから、推定プレフェン酸デヒドラターゼ遺伝子が原因遺伝子であることが明らかとなった。(山田グループ、若狭グループ、宮川グループ)

○しかし、高等植物で本酵素が実際にPhe合成に機能しているとの報告はない。そこで、無細胞タンパク質合成系を用いて本酵素遺伝子から酵素タンパク質を合成し、その機能を調べたところ、本酵素は基質としてプレフェン酸を利用することもできるが、アロゲン酸をより効率的に基質として利用しPheを合成することを確認した。(戸澤グループ)

○この変異体は一遺伝子の変異体でありながら、複数のアミノ酸の増加と二次代謝産物の増加をもたらす。フェニルプロパノイド化合物の増加はPhe由来と考えられるところから、Trpを蓄積した場合との違いが際だっている。また、この変異体はPhe合成系酵素の変異を持つにもかかわらず、Trpが同時に蓄積している。現在のところ、これを説明できる機構は全く明らかとなっておらず、未知の代謝ネットワークの存在が示唆される。(若狭グループ、山田グループ、戸澤グループ、宮川グループ)

○シロイヌナズナについては、独自に作製した12,000系統以上のアクチベーション・タギングラインを用いて、5MT抵抗性変異体をスクリーニングした。そのうち、1系統の変異体(rmt1)について詳しく解析した。その結果、この変異体は2個の遺伝子変異を含んでいることが明らかとなった。この突然変異体rmt1はTrpの蓄積は示さなかったが、代謝プロファイリングの結果、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(IGs)の蓄積が野生型に比べて約20倍であった。IGs合成系が活性化されており、5MTがこの合成系に取り込まれる結果、細胞は抵抗性を示すことを明らかにした。これは、これまで知られた5MT抵抗性のメカニズムと異なる新しい機作である。(矢部グループ、宮川グループ)

3-2-4. 形質転換体の代謝プロファイリング

Trpの蓄積による二次代謝合成系の変動は、これを飼料として利用するときにはマイナスとなるが、新たな化合物の合成を制御する技術の開発につながる可能性をも示している。Trpを蓄積したイネその他の作物について芳香族化合物の代謝プロファイリングを行い、Trpの増加と関連のある化合物を探索した。

○Trp以外の化合物に大きな変動は認められなかったが、変動する極微量なインドール化合物を明らかにした。そのうちの一部の化合物については構造を決定した。また、インドール酢酸(IAA)の測定法を開発してTrpの蓄積とともに増加することを見いだした。(宮川グループ)

○OASA1D遺伝子とともに、蓄積するTrpを下流の二次代謝化合物に流すためにTrp脱炭酸酵素(TDC)、セコログニン合成酵素(CrSLS)およびストリクトシジン合成酵素(CrSTR)遺伝子を組み合わせて導入した形質転換体を作製し、これらについても代謝プロファイリングを行った。TDC導入の結果、Trpの蓄積は見られずトリプタミンを蓄積すること、さらに新規のインドールアルカロイドが合成されることなどを見いだした。(若狭グループ)

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待・口頭・ポスター		報道	特許	
国内	国外	国内	国外		国内	海外
2	17	59	16	1	10	1

○研究自体が代謝工学主体であり、かつ圃場実験の実施などで、発表が難しかったのかも知れないが論文数に物足りなさを感じる。今後の纏めに期待する。

○Trpの作物生産は実用的にも重要であり、成果は的確に権利化されており今後の実用化が期待される。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

○総合的には、Trp含有量向上の代謝工学に関連して、実用的利用に向けて圃場試験、栄養評価を行うとともに、代謝プロファイリングにより、品質保証できるシステム作りに貢献したことは、我が国における遺伝子組み換え作物実験において、先導的役割を果たしたとして高く評価できる。また、イネのみならずダイズ、アズキ、バレイショ、シロイヌナズナでも同様にTrp含有量向上が確認され、代謝プロファイルにおいてもイネと同様な傾向を示したことは、本技術が他植物への展開も含め利用価値の高い技術であることを示している。さらに、目的の物質を高生産させるために、酵素改変技術を駆使し、酵素活性を上昇させ、かつそのフィードバック阻害を解除させることに成功したことは、メタボリックエンジニアリングのモデルケースとなろう。ただ、Trp産生作物の安全性/実用性の検証に関して言えば、さらに動物実験系用いた有用性の検証がなされることが望ましかった。2次代謝の改変に関しては、Trp高蓄積イネ、5-MT耐性突然変異体イネMTR1および当グループで独自に構築した約12,000の独立したシロイヌナズナアクティベーション・タギングラインから5-MT耐性でスクリーニングした変異体をモデルにその改変の可能性を検討し、Trp代謝の制御に関わる転写因子の単離、Pheの鍵酵素であるアロゲン酸デヒドラターゼの単離、新規IAA代謝物の同定など基礎研究の分野においても興味深い知見を得た。また、Pheに続く代謝物である多くのフェニルプロパノイド化合物が増大することの知見は、今後代謝工学的手法の一つとして利用されるものと考えられる。

○科学技術への貢献に関しては、アントラニル酸合成酵素遺伝子 α サブユニット変異遺伝子の導入により、Trpの実用に充分な大幅な含有量増加が達成されたことは評価できる。Trp含有量増加に関する知見は、フィードバック阻害効果の強力さにより成功例はこれまで報告されておらず、本研究により始めて達成された。また、その増加は、栽培種、世代を越えて安定した表現型を示しており実用化が期待される。アントラニル酸合成酵素 α サブユニットの人為的改変に成功した事例は、今後蛋白工学における新分野を拓く基盤技術となるものと期待される。また、形質転換体選抜に植物生体成分である5-MTを用いた選抜方法の開発は、新規なマーカーフリー化技術を提供しており、今後の活用が期待される。

○今後の展開として、実用可能なレベルにまでTrpの含有量を向上させる技術を、世界的な飼料作物であるトウモロコシ、ムギ類にまで応用できることを期待する。代謝プロファイリング解析により、改変型アントラニル酸合成酵素OASA1D、OASA2D導入植物においてTrp以外の代謝物の変動は認められないか極微小であること、イネごま葉枯れ病菌による感染下においても変動はほとんど認められないことから安全性については一応問題となる可能性は低いと考えられる。しかし、食用作物を利用すること、突然変異体MTR1や代謝酵素(Trp脱炭酸酵素)導入転換体において代謝物の変動が認められたことより、新たな生理活性物質を産生する可能性は否定できなく慎重な解析、特に代謝プロファイル変動には注意をして継続的に測定する必要がある。学術的にはTrpの生合成をきっかけにしてのフェニルプロパノイドの合成系の解明に期待する。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

○Trpの代謝工学ならびにそれを用いた栽培組換え作物の評価の確立において、先導的役割を果たしたことは特記するに値する。遺伝子組換えイネの実用化検証の先駆けとして、安全性評価や住民説明など、多大なご苦勞をされたことと思う。その貴重な体験を後進の研究者へ繋いで頂きたい。

○受賞歴としては、日本農薬学会奨励賞(石原 亨)の1件。