

「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して、その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。さらに、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 の蓄積は、本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により成功した。イネの AS α サブユニット遺伝子は 2 個存在し、発現特性が異なる。このうち、*OASA1* の改変型である *OASAIID* を導入したすべての植物(イネ、バレイショ、ダイズ、アズキ、シロイヌナズ)が効率的に Trp の蓄積を示すことを確認した。このうち、イネについては、3 年間にわたる安全性評価試験終了後に、平成 16 年度に一般ほ場での栽培を行い、十分な量の子実を得て飼料価値の評価を行った。また、同酵素遺伝子のうち、エリシター誘導性のある *OASA2* についても、*in vitro* でのタンパク質合成系を用いて、効率的に Trp を蓄積する改変酵素を創生することができたので、イネに導入して形質転換体を作製した。今後、Trp 含量などの特性を解析して *OASAIID* との違いの有無を確認する。また、飼料用作物など実用的にこれらを利用するためには、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、イネ、バレイショ、シロイヌナズナ、ダイズのカルス、植物体、種子などを用いて代謝産物のプロファイリングを行い、少数の微量化合物を除いて、Trp 以外に大きな変動のないことを確認した。これまでの結果から *OASAIID* は実用的な価値が高いと考えられる。

高濃度での Trp 蓄積はこれを利用した二次代謝産物の合成を可能にすると考えられる。実際、Trp 合成系の下流に位置するトリプトファン脱炭酸酵素遺伝子を導入して Trp を関連二次代謝化合物に流すことに成功した。一方、二次代謝産物の生産に役立つ新たな遺伝子を獲得するため、変異体の探索と解析を行ってきたが、Trp と Phe の増加と二次代謝化合物の変動を示すイネの変異体から単離した変異型プレフェン酸デヒドラターゼを導入したイネは、変異体と同じ特性を示すことから、これが原因遺伝子であることを決定した。さらに、この酵素の機能解析により、Phe によるフィードバック阻害に感受性が低下したことが変異の原因であることを確認した。インドー

ルグルコシノレートを蓄積するシロイヌナズナの5MT 抵抗性変異株は、二重突然変異体であることが明らかとなり、詳細な解析を行った。今後はこれらの知見を元に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 を蓄積した作物

*OASA1D*遺伝子を導入したイネ2系統 HW1 および HW2 の子実をニワトリに与える飼養試験の結果、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。さらに、マウスに両系統の玄米粉末を 21 日間投与した場合も、対照区の「日本晴」に比べて有意な差はなく、毒性は認められなかった。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。ついで、実用的な飼料イネ開発のために、新たなベクターを構築して直接遺伝子導入法によりイネ品種「クサホナミ」に導入した。その結果、選抜マーカー遺伝子とプラスミドの骨格配列を持たず、導入遺伝子が 1 あるいは 2 コピーである形質転換体を育成し、特定網室での安全性評価を実施した(図1)。これらのイネ種子における Trp 含量もこれまでの系統と同様に増加していた(表1)。

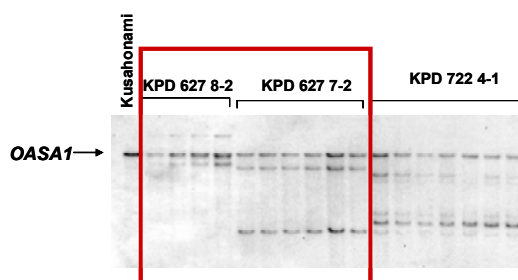


図1 *OASA1D*導入クサホナミ形質転換体。
赤く囲んだ系統は導入遺伝子を1 あるいは
2 コピー持つ。

表1 葉と種子における遊離Trp含量

系統	葉の遊離Trp含量 (nmol/gFW)	種子の遊離Trp含 量(nmol/seed)
KPD627 7-2*	2471.8 (×23)	9651.7 (×98)
KPD627 8-2*	2926.28 (×28)	14943.3 (×151.4)
KPD722 4-1	184.73 (×1.7)	7715.1 (×78.2)
クサホナミ	106.1 (×1)	98.7 (×1)

ウィスカー法で導入。

*は1あるいは2コピーの導入遺伝子を持つ系統。

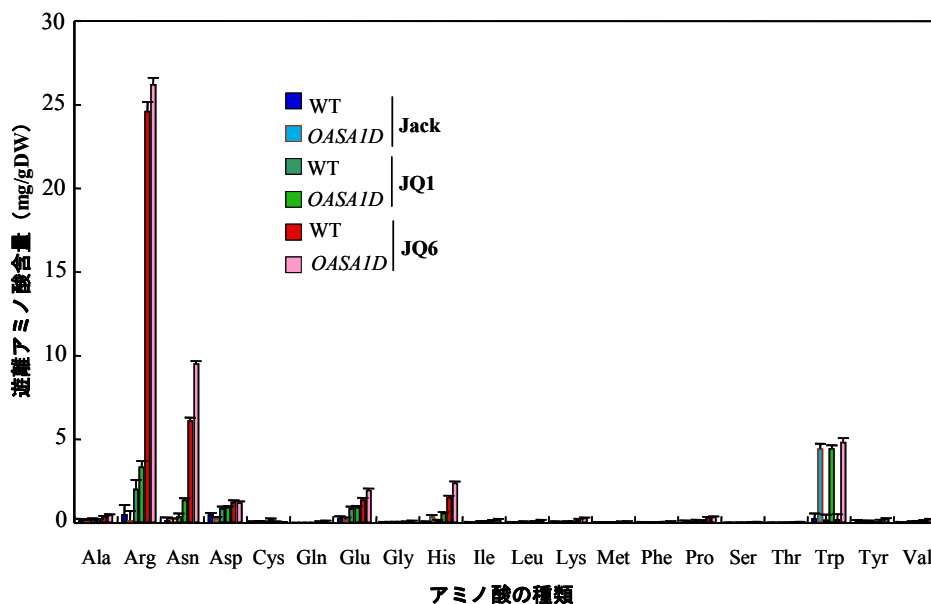


図2 *OAS1D*遺伝子を導入した高遊離アミノ酸系統(JQ系統)の遊離アミノ酸含量

ダイズに *OAS1D* 遺伝子を導入して Trp 含量が増加することはすでに報告したが, 新たに, 高遊離アミノ酸ダイズ系統に *OAS1D* 遺伝子を導入した. ダイズの遺伝子組換え効率は品種に依存するので, 遺伝子組換えに適した品種 Jack を戻し交配親として, 高遊離アミノ酸でかつ遺伝子組換えに適した系統 JQ1 と JQ6 を作出して, 遺伝子を導入した. *OAS1D* の発現を種子タンパク質グリニシン遺伝子(*gy2*)のプロモーターにより制御した結果, 導入 JQ 系統では遊離 Trp が増加したが, その量は Jack の形質転換体種子と同程度であった(図2). 形質転換体のアルギニン, アスパラギン, アスパラギン酸等の濃度は高いままであることから, これらと Trp 生合成系とは独立して制御されており, 窒素等の原料に競合がないことが示唆された.

2) 二次代謝産物を産生する変異体の解析

シロイヌナズナにおいて新たに単離したトリプトファンアナログである 5MT 抵抗性の *rmt1* 変異体は, Trp 由来の抗菌性二次代謝産物インドールグルコシノレート類 (IGs) を野生型の約 20 倍蓄積する. 本変異体の IGs の代謝関連遺伝子群の発現プロファイリング解析の結果, ATR1 遺伝子によって制御される一群の遺伝子で転写レベルでの上昇が認

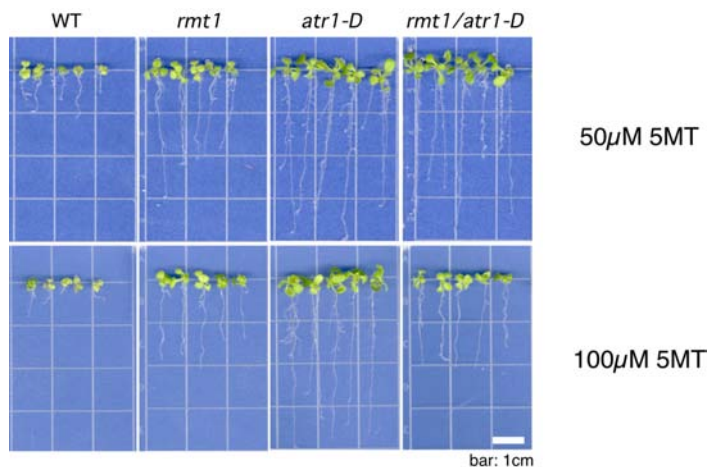


図3 *rmt1*, *atr1-D* とこれらの二重変異体の5MT抵抗性

められ、IGs 蓄積の一因と推測された。 *rmt1* の ATR1 遺伝子上流域の解析から、 *atr1D* 変異を持つ事が明らかとなり、 *rmt1* は *atr1D* との二重変異であることが明らかとなった。 ATR1 と RMT1 は共に第5染色体に座乗している。これらの単独変異および二重変異での 5MT 抵抗性を解析したところ、共に 5MT 培地上で根の伸長(図3)および生重量の増加を示した。現在、 *rmt1* 原因遺伝子による変異表現型の再構築実験を進行中である。

イネにおける 5MT 抵抗性変異体 MTR1 の原因遺伝子としてシキミ酸生合成経路関連の酵素遺伝子、プレフェン酸デヒドラターゼ(PDT) 遺伝子を単離した。変異体の PDT 遺伝子は、バクテリアのアロステリック領域に対応する 298 番目のセリンがイソロイシンに変わっていた。この変異遺伝子を導入したイネカルスは変異体と同様の 5MT 抵抗性を示し(図4)、Phe と Trp 含量も増加した(図5)。また、変異体と同様に二次代謝産物の増加も認められた。その一つであるマロニルロジンについて図5に示した。これらの結果から、本突然変異体は酵素 PDT 遺伝子が原因遺伝子であり、アミノ酸置換により Phe に対する感受性を低下させたためと考えられた。これを確認するため、変異酵素のタンパク質を合成して酵素活性を解析した。

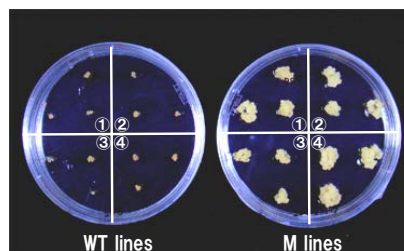


図4 形質転換体の5MT抵抗性試験
(左)野生型遺伝子、(右)変異型遺伝子導入個体のカルス

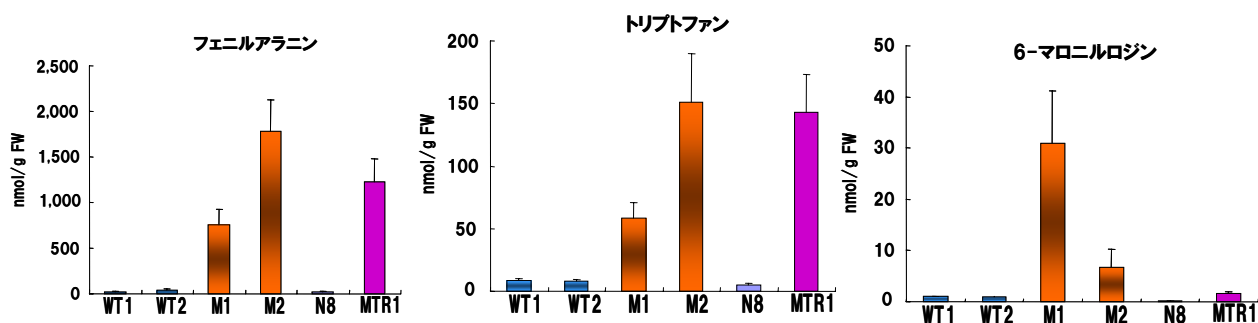
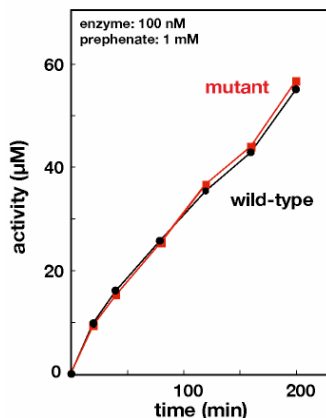


図5 形質転換カルスにおけるフェニルアラニン、トリプトファンおよびマロニルロジン含量

まず、PDT の色素体局在性を調査するため、単離エンドウマメ葉緑体を用いた試験管内タンパク質輸送試験を行なった。その結果、イネ PDT はアミノ末端のシグナル配列を利用して葉緑体へ移行し、シグナル除去されて成熟型酵素になることが確認できた。芳香族アミノ酸生合成系は色素体内で起こると考えられており、PDT も予想通り色素体酵素であることが強く示唆された。続いて、確認されたシグナル切断部位を末端に持つ成熟型酵素領域を無細胞系によりタンパク質合成し、酵素機能解析を進めた。その結果、野生型 PDT はプレフェン酸デヒドラターゼ活性を有し、Phe によるフィードバック阻害を受けること、変異型 PDT は Phe による阻害を回避する機能を示すことが明らかになった(図6)。

1. タイムコース



2. フェニルアラニンによるフィードバック阻害

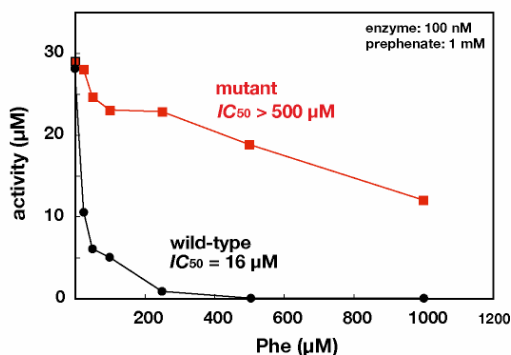


図6 変異型PDTの酵素活性とフェニルアラニン感受性

3) 新たな変異酵素の創出

無細胞タンパク質合成系を利用して、これまでよりさらに活性と Trp 耐性に優れた変異型イネ *OASA2* 酵素遺伝子を創出した. この変異型遺伝子 *OASA2* (SL)を発現するイネカルスで, Trp 含量が飛躍的に向上(〜400倍)することを確認した. この変異酵素は知られている変異型アントラニル酸合成酵素と比較しても Trp によるフィードバック阻害に対し耐性が格段に強く ($K_i > 500 \mu\text{M}$), 触媒活性そのものも野生型の2倍以上に改良されている. 形質転換イネカルスの Trp 含量は, 試験管内の *OASA2*(SL)機能が実際に細胞内にも反映されていることを示すものとなっている(図7).

4) 二次代謝化合物の生産

植物におけるトリプトファン由来の有用物質生産技術の確立に向けて, *OASA1D* 遺伝子と同時にトリプトファン脱炭酸酵素 (TDC)をイネに導入した.

その結果, *OASA1D* 発現カルスで顕著に蓄積していた Trp は大幅に減少して日本晴よりもむしろ低くなった. 一方, 日本晴でほとんど検出されなかったトリプタミンの含量は 1000 倍以上に増大し(図8),

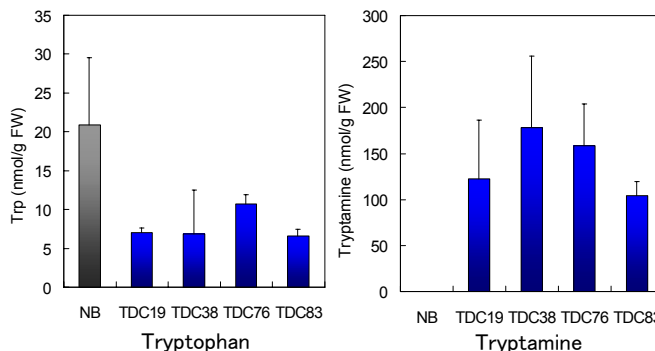


図8 *OASA1D* / TDC導入カルスのトリプトファンおよびトリプタミン含量

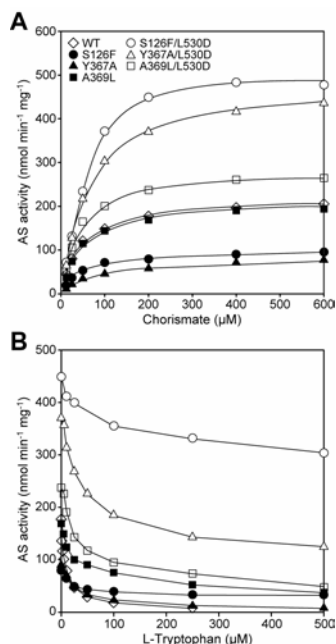


図7 変異型 *OASA2* 遺伝子の酵素活性解析結果

A; 基質濃度と反応速度の関係,

B; Trp によるフィードバック阻害効果

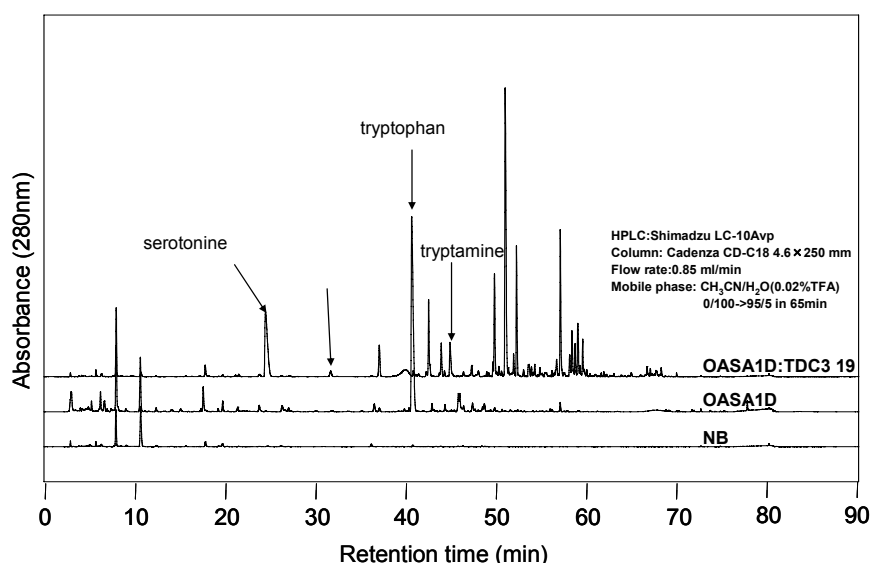


図9 OASA1D/TDC 発現イネカルの代謝プロファイル分析

OASA1Dの導入により生合成が活性化された Trp が TDC により変換され、トリプタミン含量を上げることができたと考えられる。しかし代謝プロファイリングの結果から、TDC 導入の効果はそれほど単純なものではないことがわかった。カルス抽出液を、フォトダイオードアレイ検出器(検出波長 190-400 nm)を装備した HPLC で分析したところ、OASA1D/TDC 導入カルスでは、トリプタミン以外に日本晴および OASA1D 導入カルスいずれにも見られなかった成分が多数増加しており、その代謝プロファイルは非常に複雑に変化していた(図9)。増加した成分を単離精製し、機器分析による構造解析をおこなった結果、トリプタミン以外の主要な増加成分としてセロトニンを同定した。またインドール環を二つ含む新規アルカロイド化合物の構造を推定したが、その他多くの成分が不明のままである。以上の結果から、イネにおける Trp 由来二次代謝の制御には TDC がきわめて重要な役割を果たしていることが明らかになった。

以上のように、Trp の効率的な蓄積とその実用的利用のための研究は予定通り進み、Trp 合成系をめぐる各種の化合物の生合成についても新たな酵素遺伝子の導入と変異体原因遺伝子の利用により可能性が示されたので、今後、さらに研究を進める。

3. 研究実施体制

「作物改変グループ」グループ

- ①研究分担グループ長：若狭 暁（東京農業大学・農研機構作物研、教授）
石本 政男（農研機構北農研、室長）

②研究項目：

- 1) 各種形質換体作製と解析
- 2) トリプトファン含量の向上した実用的な作物の作製
- 3) 二次代謝化合物生合成のための遺伝子単離と導入

「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、教授）
- ②研究項目：無細胞合成系を利用した遺伝子改変と 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、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、教授）
- ②研究項目：
 - 1) 各種形質転換体の代謝産物解析
 - 2) IAA 代謝系の解析
 - 3) 各種形質転換体の病虫害反応の解析

「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、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

- Kasai, K., T. Kanno, M. Akita, Y. Ikejiri-Kanno, K. Wakasa and Y. Tozawa Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during panicle development of the enzymatic activities of the encoded proteins. *Planta* 222: 438-447 (2005)
- Matsuda, F., T. Yamada, H. Miyazawa, H. Miyagawa and K. Wakasa Characterization of tryptophan-overproducing potato transgenic for a mutant rice anthranilate synthase α -subunit gene (*OAS1D*). *Planta* 222: 535-545 (2005)
- Kanno, T., A. Komatsu, K. Kasai, J. G. Dubouzet, M. Sakurai, Y. Ikejiri-Kanno, K. Wakasa and Y. Tozawa Structure-based *in vitro* engineering of the anthranilate synthase, a metabolic key enzyme in the plant Trp pathway. *Plant Physiology* 138: 2260-2268 (2005)
- Khalafalla, M. M., S. M. Rahman, H. A. El-Shemy, Y. Nakamoto, K. Wakasa and M. Ishimoto Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP(S65T) expression in transformed soybean. *Breeding Science* 55: 257-263 (2005)

- Kawagishi-Kobayashi, M., N. Yabe, M. Tsuchiya, S. Harada, T. Kobayashi, Y. Komeda and K. Wakasa Rice OASA1D, a mutant anthranilate synthase α subunit gene, is an effective selectable marker for transformation of *Arabidopsis thaliana* Plant Biotechnology 22: 271-276 (2005)
- Komatsu, A., M. Ohtake, H. Hasegawa, T. Terakawa and K. Wakasa Transgenic rice for animal feed with high tryptophan content generated by a selectable marker- and vector backbone-free technology. Plant Biotechnology 23: 39-46 (2006)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 10 件)