

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05778

研究課題名(和文) ゲノム編集によるファイトケラチン合成酵素活性を強化したヒ素低集積イネの開発

研究課題名(英文) Development of low arsenic rice with enhanced phytochelatin synthase activity by genome editing

研究代表者

石川 覚 (Ishikawa, Satoru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・グループ長

研究者番号：40354005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒ素によるファイトケラチン合成酵素(OsPCS1)活性が上昇した低ヒ素イネの作出を目指し、以下の成果を得た。OsPCS1のC末端領域に変異を入れたDNA断片を組換え酵母株に導入し、ヒ素耐性スクリーニングを行ったところ、いくつかの変異型OsPCS1導入により、酵母のヒ素耐性が高まった。さらに得られたヒ素耐性OsPCS1クローンから大腸菌でOsPCS1酵素を生産させたところ、野生型のOsPCS1よりもヒ素添加によってファイトケラチン合成量が高まった。今後はゲノム編集によりOsPCS1活性が高まったイネを作出し、コメのヒ素濃度を調べる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はイネのファイトケラチン合成酵素のヒ素応答性に関して、活性化に必要なアミノ酸部位やヒ素とその他金属の認識応答性の違いを解明する研究につながる。さらにファイトケラチン合成酵素の機能強化はヒ素だけでなく、カドミウム等の有害金属の作物可食部への蓄積を抑制することが可能になると思われる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify the amino acid required for arsenic (As)-induced phytochelatin synthase (OsPCS1) activity of rice and to produce low-As rice by enhancing the enzyme activity. DNA fragments with random mutations in the C-terminal region of OsPCS1 were introduced into recombinant yeast strains and screened for arsenic tolerance. We found that several yeast strains with mutated OsPCS1 showed higher tolerance to As stress than those with wild-type OsPCS1. The OsPCS1 enzyme from the obtained As-tolerant OsPCS1 clones was produced in *E. coli* cells and the amounts of phytochelatin (PCs) by arsenic addition were measured by LC-MS-MS. The results showed that there was some mutated OsPCS1 that synthesized higher amounts of PCs than wild-type OsPCS1. In the future, rice plants with enhanced OsPCS1 activity would be produced by genome editing, and the As concentration in such rice plants should be analyzed.

研究分野：植物栄養学

キーワード：ヒ素 イネ ファイトケラチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農耕地土壌には天然由来のヒ素が含まれており、そこで生産された作物は微量なヒ素を含んでいる。特に日本人が食品から摂取する無機ヒ素のうち、約6割はコメ由来である。スウェーデンでは、コメが他の食品よりもはるかに高濃度の無機ヒ素を含んでいる理由から、摂取制限を勧告するほど、コメは健康リスクの高い食品に位置づけられている。このようにコメは無機ヒ素の主要な摂取源であることから、コーデックス委員会ではコメの無機ヒ素濃度に関する国際基準値(精米が0.2mg/kg、玄米が0.35mg/kg)を設定した。

イネ(水稻)が他の作物に比べて高いヒ素集積を示す理由は主に2つある。一つは土壌の還元化に伴う亜ヒ酸[As(III)]の可溶化と、もう一つはケイ酸トランスポーターを介したAs(III)の高い吸収能力である。我々はこれまでイネ変異体の解析を通してファイトケラチン合成酵素(以下、PC合成酵素またはPCS)であるOsPCS1が液胞膜トランスポーターであるOsABCC1と協調して、節部の液胞にAs(III)を隔離し、玄米へのヒ素移行を抑制していることを明らかにした(Hayashi et al., Plant J. 2017)。PC合成酵素はヒ素やカドミウム(Cd)等の有害金属によって活性化され、ファイトケラチン(PCs)を生合成する。PCsは分子内にチオール基があることで、金属イオンと抱合体を形成し、無毒化に貢献する。イネには2つのPC合成酵素(OsPCS1とOsPCS2)が存在するが、OsPCS1はAs(III)に対する活性が高く、一方OsPCS2はCdに対する親和性が高い。この金属応答性の違いはCドメインの活性制御部位にあるアミノ酸配列の違いが影響していると推定される。そのため、酵素活性制御に関わるアミノ酸を特定し、その改変によってPC合成酵素のヒ素応答性を高めたイネを作出すれば、コメのヒ素濃度を大幅に減らせる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究はヒ素の抱合機能を強化したPCSの改変を行い、ゲノム編集等のツールを使ったヒ素低集積イネを作出することを目的に、以下の3つの研究課題に取り組んだ。

- (1) 液体クロマト質量分析計(LC/MS/MS)を用いたPCsの高感度分析
- (2) 組換えタンパク質によるPC合成酵素活性の評価
- (3) ゲノム編集技術等を用いたヒ素低集積イネの開発

3. 研究の方法

- (1) 液体クロマト質量分析計(LC/MS/MS)を用いたPCsの高感度分析

液体クロマト質量分析計Xevo TQD(Waters製)にメタルフリーのペンタフルオロフェニル(PFP)基結合型カラム(150 mm x 4.6 mm, 3 μ m, GL Science)を装着し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)水-メタノール系の溶離液でメタノール濃度にグラジエントを持たせPCsの分離・分析を1検体あたり7分以内に完了するよう分離条件を調整した。

質量分析ではMultiple Reaction Monitoring(MRM)モードとし、各トランジションとイオン化電圧は表1の通りである。

表1 RMトランジションパラメーター

化合物	トランジション (<i>m/z</i>)	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)
EC	251 > 122	50	50
GSH	308 > 162	33	28
PC ₂	540 > 336	33	28
PC ₃	722 > 643	33	28
PC ₄	1005 > 540	65	33

- (2) 組換えタンパク質によるPC合成酵素活性の評価

エラーブローンPCRによってランダムに変異を導入したPC合成酵素の活性を、ヒ素処理した酵母細胞の生育(生死)から簡易に評価するため、ヒ素耐性スクリーニング用の遺伝子組み換え酵母株を作製した。ヒ素の排出トランスポーター遺伝子が欠損した遺伝子破壊株(*acr3*)にイネのケイ酸トランスポーター(OsLsi1)とシロイヌナズナ由来の液胞膜トランスポーター(*AtABCC2*)を導入した。エラーブローンPCRに用いるMnイオンと酵母によるスクリーニングのAs(III)処理濃度について条件検討を行った。改変を伴うPCR条件で増幅したOsPCS1のDNA断片と酵母でのスクリーニング用シャトルベクターをモル比3:1で混合(Gap-Repair Cloningを利用)し、上記組換え酵母株にエレクトロポレーション法で導入した。改変OsPCS1遺伝子を導入した酵母と対照の野生型OsPCS1を導入した酵母を亜ヒ酸を含む選択培地に塗布し30、5日間培養した。ヒ素耐性を示したクローンのOsPCS1については、タンパク質生産用のベクター(pMAL-c5X)の

maltose-binding protein (MBP) の下流に蛍光タンパク質 (GFP) を融合させ、さらにその下流に OsPCS1 を導入し、そのプラスミドを大腸菌 [BL21 (DE3)] に組み込んで、組換えタンパク質を生産させた。大腸菌を超音波破碎後、上清の粗酵素液に含まれる OsPCS1 のタンパク量を蛍光プレートリーダーによる GFP 蛍光強度で評価し、さらに粗抽出タンパク溶液を還元型グルタチオンと亜ヒ酸溶液と反応させた後、上記 (1) の LC/MS/MS で PCs 量を測定した。

4. 研究成果

(1) 液体クロマト質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた PCs の高感度分析

UPLC/MS/MS による PCs 分析方法について、標準品を用いて検討を行った結果、1 検体 7 分でグルタミルシステイン (EC)、グルタチオン (GSH)、PC2-4 を分離し測定できる分離用カラム・溶離液等の条件と、各化合物のイオン化およびコリジョン電圧を選定した (図 1)。一般的な PCs 抽出液に用いられていた還元性のキレート剤 DTPA は EC と分子量が同じで UPLC での保持時間も近かったため、UPLC/MS/MS 分析用の抽出溶媒には適さないことが分かった。そこで新たな還元剤の検討を行った結果、TCEP 塩酸塩を選定した。本還元剤を使って、幼植物地上部から PCs を抽出したところ、その抽出効率が向上した。

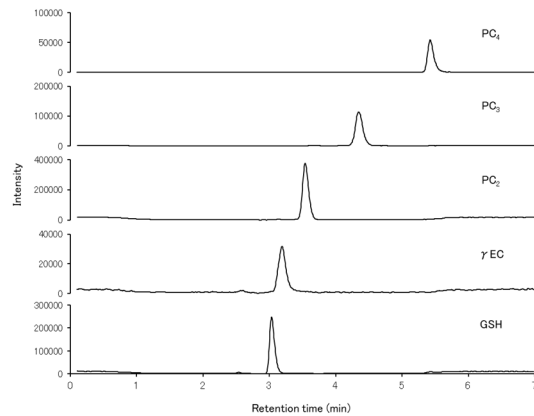


図 1 ファイトケラチンの LC/MS/MS 分析

(2) 組換えタンパク質による PC 合成酵素活性の評価

エラーブローン PCR によるランダム変異を導入するための条件検討を行った結果、1ng 分の OsPCS1 cDNA 鋳型に対して通常の PCR 反応液に 112.5 μM MnCl₂ を添加し、40 サイクルの PCR 反応が一塩基の変異を効率よく導入できた。一方、酵母のヒ素耐性を指標にしたスクリーニング条件は As(III) 濃度で 220 μM とした。

30、5 日間の培養した結果、改変 OsPCS1 遺伝子のプレートからヒ素耐性クローンが出現した (図 3)。一方、野生型 OsPCS1 を塗布したプレートにはコロニーは確認されなかった。この 1 次スクリーニング操作を 2 回行い、合計 240 のヒ素耐性クローンを得た。この中でコロニーの生育が特徴的だった (良いあるいは遅い) 12 クローンを優先的に 2 次スクリーニングに供試した。それらのクローンを大腸菌で遺伝子発現させるため MBP::GFP pMAL-c5X ベクターにサブクローニングし、BL21 (DE3) 株で PCS1 酵素生産を行った。遺伝子発現誘導した大腸菌を集菌し、細胞を超音波破碎した上清 (粗酵素液) に還元型グルタチオンと亜ヒ酸溶液を加え反応させた後、LC/MS/MS で PCs 量を測定した。野生型 OsPCS1 よりも PCs 合成量が高まった、または低かったクローンについてエラーブローン PCR による変異をシーケンス解析で確認したところ、非同義置換変異のあった 5 クローンを選抜した。しかし、一方で同義置換変異でも PCs 合成量が高まるケースもあり、おそらく各スクリーニングにおいて遺伝子発現させる宿主のコドン使用頻度 (Codon usage) が影響していると考えられる。

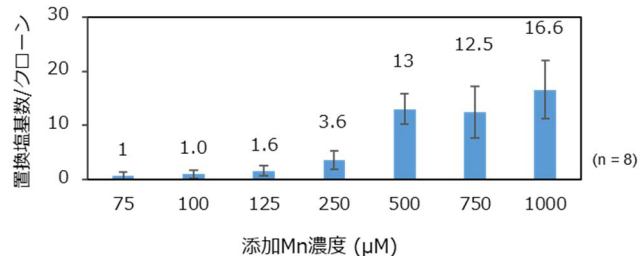


図 2 エラーブローン PCR による Mn 濃度と塩基置換数の関係

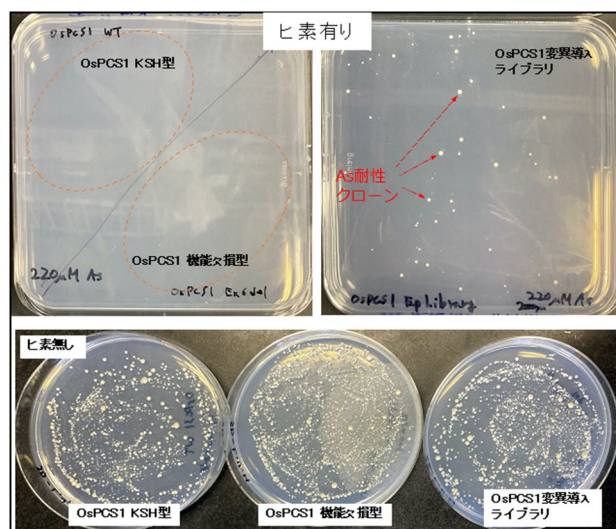


図 3 組換え酵母を用いた変異型 OsPCS1 のヒ素耐性スクリーニング

(3) ゲノム編集技術等を用いたヒ素低集積イネの開発

コシヒカリの変異集団の中から、*OsPCS1* と *OsPCS2* について 1 塩基置換によるアミノ酸が変異した非同義置換系統をそれぞれ 12 系統と 18 系統選抜した。それら系統の玄米ヒ素濃度を測定したところ、C 末端側のアミノ酸が変わることによって、コメのヒ素濃度が低下する系統があった。

以上の結果から、*OsPCS1* のアミノ酸変異によって、その酵素活性が高まる可能性が明らかになった。今後はゲノム編集などにより、実際のイネにおいても *OsPCS1* 活性の上昇が認められるのか、また玄米ヒ素濃度は低下するのか、検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉俣正人、林晋平、安部匡、谷川八大、石川覚
2. 発表標題 ヒ素によるイネのファイトケラチン合成酵素の活性増大に関わるアミノ酸部位の検討
3. 学会等名 第27回ヒ素シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安部 匡 (Abe Tadashi) (70729201)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・上級研究員 (82111)	
研究分担者	倉俣 正人 (Kuramata Masato) (80826991)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・主任研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------