

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780001

研究課題名（和文）ゴマ種子に含まれる機能性成分の高蓄積に関わる転写活性化機構の解明

研究課題名（英文）Studies on transcriptional regulation of genes involving synthesis of lignans and tocopherols in sesame.

研究代表者

山本 将之（YAMAMOTO MASAYUKI）

富山大学・大学院理工学研究部（理学）・講師

研究者番号：10456402

研究成果の概要（和文）：種子に含まれる成分のうち、機能性を有する二次代謝産物の生合成系遺伝子の発現制御機構に関する知見は非常に乏しい。本研究では、ゴマの種子中に多く含まれるリグナン類（セサミン、セサミノールなど）およびトコフェロールの転写活性化機構を調査した。その結果、少なくとも貯蔵油脂生合成系遺伝子の発現に関与する2種の転写活性化因子が、ゴマの機能性成分生合成系遺伝子の発現にも関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, the expression mechanism of genes involving biosynthesis of lignans (sesamin, sesaminol, etc.) and tocopherols in sesame was examined. I report that at least two sesame transcriptional activators responsible for the expression of storage lipid biosynthetic genes may activate the transcription from the promoter regions of biosynthetic genes of lignans and tocopherols.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：転写制御、種子成分、ゴマ、転写因子

1. 研究開始当初の背景

植物は種子中に発芽時の栄養源としてタンパク質、脂質、デンプンなどの貯蔵物質を高蓄積している。これらに加えて、多くの植物は種子中に様々な二次代謝産物も含んでおり、近年、これらの中の薬効・健康機能性を有する成分に対して注目が集まっている。

高等植物においても遺伝子発現のレベルは、主として転写段階で制御される。種子貯蔵物質に関しては、その生合成経路も明らかとなっており、生合成に関わる遺伝子群の発

現制御機構に関する知見も多く集積している。一方で、機能性成分に関しては、生合成経路の解明は進みつつあるものの、生合成系遺伝子の発現制御機構はほとんど明らかとなっていない。その原因として、機能性成分が貯蔵物質と比較して含有量が少ないことに加えて、植物種により蓄積する物質や量も異なるため、解析が十分に進んでいないことが挙げられる。機能性成分の発現制御機構を明らかとするためには、植物種ごとに解析を進め、知見を集積していく必要がある。そ

ここで、本研究では、ゴマを材料に、ゴマ種子に含まれる機能性成分の発現制御機構の調査を行うこととした。

2. 研究の目的

ゴマ種子は健康機能性の高い植物油脂資源として知られており、多量かつ良質の油脂に加えて、セサミン、セサミノールなどのリグナン類やトコフェロールなど、機能性成分を豊富に含んでいる。とりわけ他植物種と比べて特にゴマ種子に多く含まれるリグナン類は、強い抗酸化作用に加えて、動物実験において脂肪酸代謝の促進作用や動脈硬化の抑制作用などの機能性を有することが示されている。本研究では、ゴマの種子中に豊富に含まれるこれらの機能性成分の多量蓄積メカニズムの解明を目的に、これら成分の生合成に関わる遺伝子群の転写活性化機構について調査を行う。本研究により、ゴマの機能性成分の生合成に関わる遺伝子の発現制御機構が明らかとなれば、ゴマの機能性成分のさらなる質的・量的な改良に役立つのみならず、多植物種の種子中に含まれる機能性成分の改良にも応用できる。また、植物の機能性を有する二次代謝産物の蓄積量は、種子貯蔵物質と比べて僅かであり、現段階では産業的な応用は限られている。本研究の成果は、種子中に機能性成分を高蓄積する形質転換植物の作成にも応用可能と考えられ、分子育種の面からも期待される。

3. 研究の方法

著者らは、これまでに、ゴマより種子貯蔵タンパク質遺伝子や貯蔵油脂生合成系遺伝子のプロモーター領域を単離し、ゴマにおける、貯蔵物質生合成系遺伝子の転写活性化機構についての調査を進めている。

加えて、著者らは、ゴマよりリグナンやトコフェロールの生合成にかかわる7種の遺伝子のプロモーター領域(3種のリグナン生合成系酵素遺伝子:CYP81Q1、UGT71A9、UGT94D1、および4種のトコフェロール生合成系遺伝子:フィトールキナーゼ(PK)、ホモゲンチジン酸フィチル基転位酵素(HPT)、MPBQメチル基転位酵素(MPBQMT)、トコフェロールサイクラーゼ(TC)、 γ -トコフェロールメチル基転位酵素(γ -TMT)をコードする遺伝子)を単離している。機能性成分生合成系遺伝子の発現制御機構に関する知見はほとんど無いため、まず、同じく種子で発現し、転写制御機構に関する知見の多い、種子貯蔵物質との間の共通性について、トランジェント・アッセイによる調査を行った。

ゴマでは効率的なトランジェント・アッセイ系が確立していなかったため、まず(1)ゴマ培養細胞を用いた、トランジェント・アッ

セイ系の構築を行った。続いて、確立した実験系を用いて、(2)種子貯蔵物質(①貯蔵油脂および②種子貯蔵タンパク質)の生合成系遺伝子の発現にかかわる転写活性化因子が機能性成分生合成系遺伝子のプロモーター領域に対しても転写活性化能を有するか否かを調査した。

4. 研究成果

(1) ゴマ培養細胞を用いたトランジェント・アッセイ系の構築

理化学研究所より固型培地で維持されている3種類のゴマの培養細胞を、数ヶ月間液体培地中で振盪培養し、ゴマの懸濁培養細胞を得た。3種類の細胞のうち最も高い増殖率を示した細胞を用いて、他の植物種で用いられている遺伝子導入法(プロトプラスト・PEG法)を参考に改良を加え、効率的にプロトプラストにDNAを導入する系を確立した。

(2) 種子貯蔵物質の発現にかかわる転写活性化因子の機能成分生合成系遺伝子に対する転写活性化能の調査

①貯蔵油脂の生合成に関与する転写活性化因子の調査

双子葉植物の貯蔵油脂生合成系遺伝子の発現には、少なくとも3種類のシスエレメント(RYリピート、AW-boxおよびE-box)が関与することが明らかとなっており、これらのうちRYリピートはB3型転写活性化因子(FUSCA3(FUS3)など)により認識され、AW-boxにはAP2型因子WRINKLED1(WRI1)が、E-boxにはbHLH型因子が結合する。ゴマより単離したWRI1(SeWRI1)、SebHLHおよびシロイヌナズナのAtFUS3のcDNAの上流に細胞非特異的に過剰発現を促す35Sプロモーターを連結したエフェクター・コンストラクトと、機能性成分生合成系遺伝子のプロモーター領域の下流に β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子を連結したレポーター・コンストラクトを同時に、ゴマの培養細胞に導入し、GUSの発現量を指標に転写活性化能の調査を行った。

トランジェント・アッセイの結果、リグナン生合成系遺伝子については、CYP81Q1とUGT94D1のプロモーター領域に対して、SebHLHの転写活性化因子をエフェクターとして用いると、コントロール(control:転写活性化因子のcDNAが挿入されていないエフェクタープラスミド)の場合の少なくとも2倍以上のGUS活性が検出された。一方で、他のプロモーター領域/転写活性化因子の組み合わせでは、GUSの発現が誘導されることはなかった(図1)。

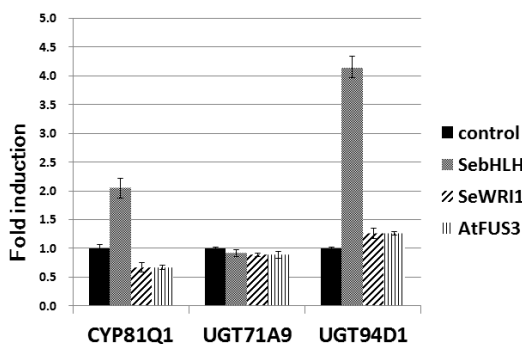


図1 リグナン生合成系遺伝子に対するトランジェント・アッセイ

トコフェロール生合成系遺伝子に関しては、SebHLH はすべての遺伝子のプロモーター領域に対してコントロールの1.3倍以上の転写活性化能を示した。また、SeWRI1 は TC のプロモーター領域に対して高い活性化能を有することが示された (図2)。一方で、AtFUS3 はいずれのプロモーター領域からの転写も誘導しなかった。

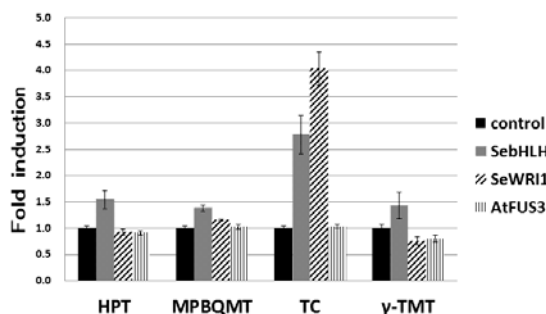


図2 トコフェロール生合成系遺伝子に対するトランジェント・アッセイ

転写活性化因子と認識シスエレメントの相関を調査すると、ほとんどの場合、転写活性化因子による活性化能の有無は、各プロモーター領域中の当該転写活性化因子の認識シスエレメントの有無と一致していたが、FUS3/HGPT、FUS3/UGT94D1、SebHLH/UGT71A9 の組み合わせでは、プロモーター領域内に結合しうるシスエレメントが存在するものの、GUS 遺伝子の発現は誘導されなかった (表1)。

表1 機能性成分生合成系遺伝子のプロモーター領域に見いだされるシスエレメントと3種の転写活性化因子によるトランジェントアッセイの結果

酵素名	シスエレメント			転写活性化因子 (結合するシスエレメント)		
	RYリピート	E-box	AW-box	AtFUS3 (RYリピート)	SebHLH (E-box)	SeWRI1 (AW-box)
トコフェロール生合成系遺伝子						
HGPT	+	+	-	-	+	-
MPBQMT	-	+	-	-	+	-
TC	-	+	+	-	+	-
γ-TMT	-	+	+	-	+	-
リグナン生合成系遺伝子						
CYP81Q1	-	+	-	-	+	-
UGT71A9	-	+	-	-	+	-
UGT94D1	+	+	-	-	+	-

以上の結果より、貯蔵油脂生合成系遺伝子の発現にかかわる2種の転写活性化因子 (SebHLH と SeWRI) が機能性成分生合成系遺伝子の発現にも関与する可能性が示された。

② 種子貯蔵タンパク質の発現に関与する転写活性化因子の調査

シロイヌナズナの種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現には、少なくとも2種類のシスエレメント (G box/ ACGTモチーフおよびRYリピート) が関わることが知られており、G box/ ACGTモチーフはbZIP型因子により、RYリピートはB3型因子 (LEC2など) に認識される。種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現に関与する既報のシロイヌナズナの転写活性化因子遺伝子のゴマホモログの単離が難しかったため、シロイヌナズナから6種のbZIP型因子 (*AtbZIP1*, *AtbZIP10*, *AtbZIP25* (*AtbZIP25*についてはスプライシングバリエーションと考えられる2種のcDNAを用いた)、*AtbZIP53*, および *ABI5*) とB3型因子の *LEC2* のcDNA単離し解析に供した。まず、これら転写活性化因子がヘテロな系でも機能するか (ゴマ培養細胞中でゴマの遺伝子のプロモーター領域に対する転写活性化能を示すか) 否かの確認を行った。ゴマの主要な種子貯蔵タンパク質遺伝子 (*11S globulin-2*) のプロモーター領域を用いて調査したところ、すべての転写活性化因子が、その度合いは高くはないものの、転写活性化能を示すことが確認された。

続いて、これらの転写活性化因子が、7種の機能性成分生合成系遺伝子のプロモーター領域に対して転写活性化能を示すか否かを調べたところ、いずれの転写活性化因子も機能性成分のプロモーター領域からは顕著に転写を誘導することはなかった。従って、これら因子は、少なくとも単独では、ゴマの機能性成分生合成系遺伝子の転写にはかかわらないか、関与するとしても主要な役割は果たしていないと考えられる。今後は転写活性化因子同士の相加的・相乗的效果についても検討することが必要である。

本研究により、貯蔵物質の生合成に関与する既報の転写活性化因子のうち、ゴマより単離されたSebHLHとSeWRIが、少なくともトランジェント・アッセイではゴマの機能性成分生合成系遺伝子の転写活性化に関与することが明らかとなった。これら転写因子と、本研究で用いたすべての機能性成分生合成系遺伝子はゴマの種子の発達段階において、同時期に発現していることを既に確認している。これらの事を考え合わせると、これら2種の転写活性化因子が、種子中で実際に機能性成分の生合成に関与している可能性は高いと考えられる。

現在は、本研究により、多くの機能性成分

生合成系遺伝子の転写誘導にかかわることが示された、SebHLHを過剰発現させたシロイヌナズナの作出を試みており、過剰発現体のトコフェロール生合成系遺伝子の発現や、トコフェロール含量の測定を行うことで、*in vivo*での役割について調査する予定である。また、今後は、ゴマでの効率的な形質転換系の確立を急ぎ、SebHLHの過剰発現により、ゴマ種子中の機能性成分の増強が可能か否かにも検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Tanesaka, E., Umeda, E., Kajiwara, A., Yamamoto, M., Masuda, K., Yamada, K., Yoshida, M., Seed germination of sesame (*Sesamum indicum L.*) and dormancy break of its wild relative *S. mulayanum* Nair., J Crop Res, 査読無, vol 59, 2011, pp. 79-82

② 山本将之、小笠原嘉紀、増田恭次郎、若杉達也、山田恭司、ゴマにおける機能性成分の生合成系遺伝子群の発現制御機構の解析、育種学研究、査読無、14巻別2、2012、pp.222

[学会発表] (計1件) 山本将之、小笠原嘉紀、増田恭次郎、若杉達也、山田恭司、ゴマにおける機能性成分の生合成系遺伝子群の発現制御機構の解析、日本育種学会、2012年3月30日、宇都宮大学(栃木県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 将之 (YAMAMOTO MASAYUKI)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・
講師

研究者番号: 10456402