

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450504

研究課題名(和文) 様々な環境ストレスに応答するイネGABA経路の機能解明と分子育種への展開

研究課題名(英文) Functional analysis of rice GABA shunt that responds to various abiotic stresses and its application to molecular breeding

研究代表者

赤間 一仁 (Akama, Kazuhito)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50252896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境ストレスに応答するγ-アミノ酪酸(GABA)経路の機能を調べるために、GABAアミノ基転移酵素(GABA-T)とグリオキシル酸還元酵素の過剰発現株をイネで作出した。これら植物体を低温、乾燥、高濃度の塩、過酸化水素で一定期間処理した。低温と乾燥ストレスでは全体的にバイオマスの増加が確認された。また、酸化或いは低温ストレス後に土に移植し、生存率を調べた結果、GABA-Tを葉緑体で過剰発現させた株で、野生型に比べて有意な生存率の増加が観察された。このストレス処理により、Gln以外のGABA経路関連遊離アミノ酸(Ala, Gly, Ser, Glu, GABA)の著しい低下が観察された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate function of gamma-aminobutyric acid (GABA) shunt in response to abiotic stresses, we established various kinds of transgenic rice lines that overexpress a gene for GABA aminotransferase (GABA-T) or glyoxylate reductase. These transgenic rice plants were subjected to abiotic stresses such as low temperature, salt, drought and hydrogen peroxide (200 mM). Temperature or drought stresses resulted in increase in biomass from most of plants. After treatment of plants with oxidative or low temperature stresses, plants were planted in the soil to cultivate for one month. The transgenic plants overexpressing OsGABA-T with RecA-chloroplast transit signal could survive at the high frequency. Free amino acid analysis of this lines demonstrated the decrease in GABA shunt-related free amino acids such as Ala, Gly, Ser, Glu and GABA, except for Gln.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：γ-アミノ酪酸(GABA) 応答 イネ 形質転換 GABAアミノ基転移酵素(GABA-T) アグロバクテリウム グリオキシル酸還元酵素(GLYR) ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

-アミノ酪酸 (GABA) は生物が普遍的に持つ非アミノ酸の一種であり、動物では抑制性神経伝達物質として働く。一方、植物では様々な環境ストレスにより細胞内 GABA レベルが上昇することが古くから知られていた。1990 年代初頭、GABA の合成に関わるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) をコードする cDNA がペチュニアから単離され、推定アミノ酸配列の C 末端にカルモジュリン結合部位 (CaMBD) が見つかった (Baum *et al.* 1993)。それ以降、植物 GAD は例外なく CaMBD を持つ  $Ca^{2+}/CaM$  依存性のタンパク質であることがはっきりした。

我々はイネの cDNA ライブラリーから GAD オーソログを複数単離して解析した結果、CaM に依存するタイプと非依存タイプ (*OsGAD2*) を見つけた (Akama *et al.* 2001)。CaMBD を持たない植物 GAD の例はなく、イネ *GAD2* の C 末端領域の働きを調べるため、この部分を欠失させた変異遺伝子 *GAD2ΔC* を作製した。合成した *GAD2ΔC* 酵素は改変前に比べて、約 40 倍も酵素活性が上昇し、生体内で発現させると、野生型の 100 倍以上もの GABA 蓄積が見られた。この結果から、イネ *GAD2* の C 末端は自己阻害ドメインとして機能すると結論した (Akama and Takaiwa *J Exp Bot* 2007)。これに加えて、GABA をコハク酸セミアルデヒド (SSA) に変換する GABA アミノ基転移酵素 (GABA-T) の特性解析を行った結果、イネ GABA-T は 4 種のアイソフォームからなり、細胞内局在、酵素活性、発現レベルが実に多様であることが分かった (Shimajiri, Akama *et al.* 2013a)。

GABA は血圧の正常化作用、抗ストレス効果などの機能性が注目されているために、これらの成果を元にして、改変 *GAD2ΔC* のコメ特異的な過剰発現や、*GAD2ΔC* の過剰発現と *GABA-T* のノックダウンを組み合わせて、GABA 代謝系の人為的な操作を行い、コメに高濃度 GABA を安定的に蓄積させることに成功した (Shimajiri, Akama *et al.* 2013b)。

TCA 回路のバイパスとも言える GABA 経路の遺伝子工学的な操作は、コメ GABA 含量の飛躍的な増大をもたらした。しかし、イネに特有な *GAD2* 自体の調節機能や *GABA-T* アイソフォームの多様性など、興味深い問題が残されている。GABA は様々な生物的・非生物的なストレスに反応して増加することから、多様な機能を持つことが示唆されている。また、酸化的ストレスや光呼吸により産生され、細胞内に蓄積・拡散するグリオキシル酸の負の作用 (RuBisCo 活性化の阻害、DNA 修飾など) が *GABA-T* により取り除かれる可能性がある。*GAD* と *GABA-T* 遺伝子群の生理機能の解析は、細胞内 GABA 量の絶妙な調節機構の理解と GABA 経路のストレスに反応した未知の生理機能の解明につながる。

## 2. 研究の目的

我々は GABA の合成と異化に関わる酵素が、イネではアラビドプシスなど他の植物には見られないユニークな特徴を持つことを発見した。これはイネ GABA 経路が GABA 含量を絶妙に調節するだけでなく、他の生理機能とも密接な関連を持つことを示唆する。本研究ではイネにおいて、ストレスに反応した細胞内 GABA 含量の調節機構と GABA 経路の多様な生理機能を解明することを目的とする。本研究成果により、GABA 経路の改変・強化という全く新しい視点から、複合ストレス耐性形質をイネに付与することも期待される。

## 3. 研究の方法

(1) *GABA-T* 遺伝子の細胞内での異所的な過剰発現を誘導した組換えイネの作出

イネ *GABA-T* アイソフォームの中で最も活性の高い *GABA-T1* の完全長 cDNA を過剰発現させたもの (ミトコンドリア移行タイプ)、N 末の移行シグナルを葉緑体で働く *RecA* 相同タンパク質のものに置換したもの (葉緑体移行タイプ)、移行シグナルを取り除いたもの (細胞質タイプ) を定法に従ってイネカルス細胞に導入し、形質転換イネを再生させて、それぞれ複数系統を確立した。

(2) *GABA-T* の細胞内での異所的な過剰発現体のストレス耐性試験

*GABA-T* の異所的過剰発現体を、種々のストレス条件下で育成させ、野生型 (日本晴) との比較から、バイオマスを含めた生育特性を比較解析した。

高酵素活性の *GABA-T1* を細胞内で異所的に過剰発現させた形質転換イネを作出し、各種ストレス試験に供し、GABA 経路の空間的な改変とストレス応答との関連を調べた。

(3) イネグリオキシル酸還元酵素 (GLYR) の機能解析

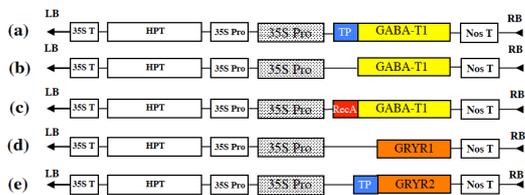
*GABA-T* によって生成した SSA は SSA 脱水素酵素 (SSADH) により、コハク酸に変換され TCA 回路に取り込まれる。また、SSA は GABA 経路から分岐し、SSA 還元酵素 (SSR) によって、 $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) になる。興味深いことに、SSR はグリオキシル酸に対してより高い親和性を示し、この反応によりグリコール酸が生成されることが分かった。このグリオキシル酸還元酵素 (GLYR) はイネで二つのアイソフォームからなり、一つは細胞質に、もう一つはミトコンドリアと葉緑体の両方に局在する。植物 GLYR はストレスにより誘導されることが報告されており、イネ GLYR もまた *GABA-T* のように GABA 代謝系の多様な機能を担っている可能性がある。GABA-T と同様に、逆遺伝学的なアプローチをイネ GLYR に対しても試みた。

## 4. 研究成果

### (1) ベクター構築

GABA の異化を触媒する GABA アミノ基転移酵素はイネにおいて 4 つのアイソフォームがある。これらの中で最も酵素活性が高い GABA-T1 をコードする cDNA を元にして、改変を行った。すなわち、GABA-T1 のミトコンドリア移行シグナルを 葉緑体移行シグナル RecA に置換したもの (GABA-T1-RecA)、移行シグナルそのものを欠失させたもの (GABA-T1 TP)、intact な cDNA を発現させたもの (GABA-T1) を、それぞれカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター (35S Pro) とノパリン合成酵素遺伝子の転写終結配列 (Nos T) の間に組み込んだ。これと並行して、イネの 2 種類のグリオキシル酸還元酵素 (GLYR) をコードする完全長 cDNA を同様に、35S Pro と Nos T の間に組み込み、植物ベクターを構築した (図 1)。

図 1 GABA 経路を操作するための 5 つの改変遺伝子を含む T-DNA



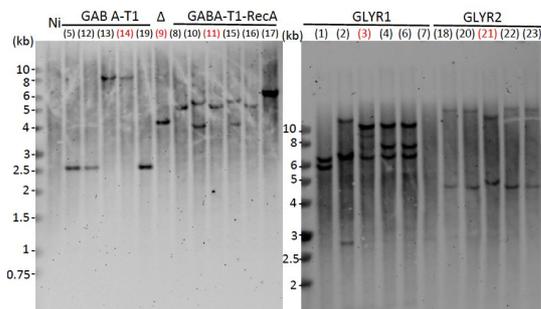
(a) GABA-T1: イネ GABA-T1 の完全長 cDNA, TP: ミトコンドリア移行シグナル  
 (b) GABA-T1ΔTP: GABA-T1 の TP を欠失させたもの (細胞質局在)  
 (c) GABA-T1-RecA: GABA-T1 の TP を RecA (葉緑体局在) TP と置換したもの  
 (d) GLYR1: 完全長のイネ GLYR1 cDNA (細胞質局在)  
 (e) GLYR2: 完全長のイネ GLYR2 cDNA, TP: プラスチドとミトコンドリア両方に移行

### (2) 形質転換イネの作出

アグロバクテリウムを介したイネ形質転換: 構築した Ti プラスミドはアグロバクテリウム株 EHA105 に導入し、形質転換は定法に従い、イネ胚盤由来のカルス細胞に感染を行い、それぞれ 1~6 系統を作出した。

サザン解析: 導入された遺伝子コピー数を推定するために、選抜に用いたハイグロマイシン耐性遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。ほとんどの系統では 1 コピーであり、わずかではあるが 2 ないし 3 コピーの系統が GABA-T1-RecA 系統と GLYR1 系統で確認された (図 2)。

図 2 組換え体イネのサザン解析

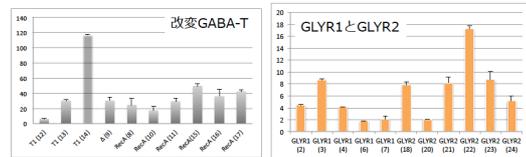


Ni: 日本晴 Δ: GABA-T1ΔTP 赤で示した組換え系統を実験に使用した。

定量 RT-PCR: 導入した遺伝子の発現量を調べるために、幼苗から全 RNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA を合成し、これを鋳型として定量 PCR を行なった。この結果、改変 GABA-T 導入個体では、多くの系統で野生型と比較して 20~40 倍の高発現が確認された。一方、GLYR1 と GLYR2 の過剰発現体では 2~8 倍の発現増大が観察された (図 3)。

ウエスタン解析: 改変 GABA-T の過剰発現体について、幼苗から抽出した全タンパク質に対して、抗 GABA-T1 ポリクローナル抗体を用い、ウエスタン解析を行なった。この結果、野生株では検出感度以下であったのに対して、過剰発現株ではいずれも予想される位置にバンドが検出された。GABA-T1-RecA#11 と #16 では極めて高い発現が観察された (図 4)。

図 3 組換え体イネの qRT-PCR 解析



組換え体イネと野生型イネ (日本晴) の GABA-T1, GLYR1, GLYR2 の発現量を TATA-bind protein 2 (TBP2) の発現量で標準化。値は野生型を 1 とした相対値で表示。T1: GABA-T1, Δ: GABA-T1ΔTP, RecA: GABA-T1-RecA

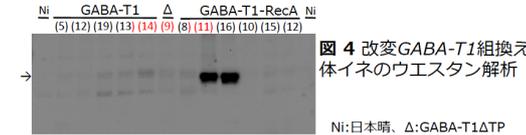


図 4 改変 GABA-T1 組換え体イネのウエスタン解析

Ni: 日本晴, Δ: GABA-T1ΔTP

### (3) 環境ストレス

#### ストレス試験のデザイン

環境ストレスとして、低温 (4℃)、乾燥、塩 (250 mM NaCl)、過酸化水素 (200 mM) に一定時間幼苗を暴露し、非ストレス下で植物体を生育させ、湿重量の変動や代謝レベル (遊離アミノ酸) の動態を調べた。

表 1 各種ストレス試験の結果

(a) 塩 (250 mM NaCl) ストレス						
サンプリング区分	日本晴	GABA-T1 (14)	GABA-T1-RecA (11)	GABA-T1ΔTP (9)	GLYR1 (3)	GLYR2 (21)
ストレス直後	0.97±0.11	1.08±0.04	1.08±0.12	0.97±0.11	1.21±0.08	1.06±0.09
ストレス後 8 日	1.79±0.26	1.44±0.25	1.59±0.19	1.75±0.61	1.45±0.14	1.47±0.09
(b) 低温 (4℃) ストレス						
サンプリング区分	日本晴	GABA-T1 (14)	GABA-T1-RecA (11)	GABA-T1ΔTP (9)	GLYR1 (3)	GLYR2 (21)
ストレス直後	1.07±0.17	0.91±0.11	0.95±0.10	1.01±0.03	1.02±0.02	1.02±0.08
ストレス後 9 日	1.32±0.24	2.33±0.24**	1.52±0.43	1.67±0.12*	1.75±0.06**	2.21±0.14**
(c) 乾燥ストレス						
サンプリング区分	日本晴	GABA-T1 (14)	GABA-T1-RecA (11)	GABA-T1ΔTP (9)	GLYR1 (3)	GLYR2 (21)
ストレス後 8 日	1.53±0.07	1.77±0.26	1.71±0.27	1.81±0.05**	1.96±0.04**	1.64±0.19

\* P<0.05 \*\* P<0.01

\*\* P<0.01

#### ストレス試験 (その 1)

まず、予備実験として低温に 4 日間、湿重量が 30% 以下になるまで乾燥処理、250 mM NaCl を含む MS 寒天培地に 3 日間置き、その後一定期間非ストレス条件下で生育させた。湿重量比をストレス直後とストレスから 8 か

ら9日間非ストレス条件で栽培したのを見ると、塩ストレスでは野生型と有意な差が見られなかったのに対し、低温と乾燥ストレスでは、*GABA-T1-RecA*株を除き、どの過剰発現組換え体でもバイオマスの増加が見られた(表1)。

#### ストレス試験(その2)

上記のストレス処理と150 mMの過酸化水素処理を加えたもので、一定期間ストレスをかけた後に、土に植え替えて1ヶ月以上恒温室にて栽培を行い、生存率を求めた。野生型日本晴では10個体中全てが枯死したのに対し、もっとも顕著な傾向を示した*GABA-T1-RecA*株では、酸化ストレスに対して10個体中5個体が、低温ストレスについては、10個体中9個体が生存した。

#### ストレス試験(その3)

酸化的ストレス(100 mM過酸化水素で3日間処理)に着目し、ストレス前後でのバイオマスの変化を調べた。この結果、*GABA-T1-RecA*株と*GLYR1*株ともに野生型に比べてバイオマスの増大が観察された。

これらの植物体から遊離アミノ酸を抽出し、GABAを含めてGABA経路に関連の深いアミノ酸(Ala, Gly, Ser, Glu, Gln, GABA)の定量を行なった。この結果、非ストレス条件下では、野生型と作出した組換えイネ系統ではGluが野生型に比べて高い傾向を示す以外に差は見られなかった。しかし、酸化的および低温ストレスのいずれにおいてもこれらアミノ酸のレベルは上昇していた。これに対して、同じストレスを加えた*GLYR1*ではこれらストレスにより、ややアミノ酸レベルの低下が観察された。*GABA-T1-RecA*においては多くのアミノ酸でそのレベルが30~50%減少していた。

#### (4) 今後の展望

様々な非生物的ストレスにダイズが晒されたとき、細胞内のGABAレベルが上昇することを1984年にWallaceらが報告して以来、現在まで様々な植物種でストレスに応答したGABAの蓄積が報告されてきた。しかし、ストレスに応答したGABAの動態にGABA経路がどう関わっているのか、また、植物が示すストレス耐性能がどのように発揮されているのか明らかにはされていない。本研究ではGABA経路の異化系に関わる重要な遺伝子、すなわち、GABAアミノ基転移酵素(*GABA-T*)とグリオキシル酸還元酵素(*GLYR*)に着目して研究を進めた。これらはストレスに応答して細胞内に蓄積するアルデヒドの除去に関わっているとの興味深い仮説がShelp *et al* (2011)に提唱され、その検証を含めて今回研究を行なった。

イネにおいてもっとも酵素活性が高い*GABA-T1*を葉緑体で過剰発現した場合に、酸化的ストレス、低温ストレスに対して、その

生存率が高まった。興味深いことに、これらストレスによって、野生型ではGABAを含めてGABA経路に関わる遊離アミノ酸は全て上昇していたのに対して、*GABA-T1-RecA*過剰発現株ではGlnを除く、GABA経路関連アミノ酸の低下傾向が観察された。葉緑体での*GABA-T1*の過剰発現とアミノ酸レベルの低下がどう関わるのか推測の域を出ないが、少なくとも葉緑体の機能に影響するであろう酸化的ストレス、低温ストレスに緩和をもたらす、その結果として、アミノ酸代謝バランスの動態に影響を与えたものを考えられる。

今回は代謝レベルの分析はアミノ酸のみであり、解析が必要であったコハク酸セミアルデヒド、グリオキシル酸、グリコール酸などの動態を調べることができなかった。また、ストレス前後で遺伝子発現レベルの変動を調べることもまだ進んでおらず、今後これらの解析を通じて、*GABA-T1-RecA*過剰発現株が示したストレス耐性能の分子機構を明らかにすることができるものと期待される。

#### <引用文献>

- Baum *et al.* (1993) *J Biol Biochem*, 268:19610-7  
Akama *et al.* (2001) *Biochim Biophys Acta*, 1522:143-150  
Akama and Takaiwa (2007) *J Exp Bot*, 58:2699-2707  
Shimajiri, Akama *et al.* (2013a) *J Plant Physiol*, 170:196-201  
Shimajiri, Akama *et al.* (2013b) *Plant Biotechnol J*, 11: 594-604  
Wallance *et al.* (1984) *Plant Physiol*, 75:170-5  
Shelp *et al.* (2011) *Trends Plant Sci*, 17:57-9

#### 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)

Brikis CJ, Zarei A, Trobacher CP, DeEll JR, Akama K, Mullen RT, Bozzo GG, Shelp BJ. (2017) Ancient Plant Glyoxylate/Succinic Semialdehyde Reductases: GLYR1s Are Cytosolic, Whereas GLYR2s Are Localized to Both Mitochondria and Plastids. *Frontiers in Plant Science* 8:601. doi: 10.3389/fpls.2017.00601.

Kowaka E, Shimajiri Y, Kawakami K, Tongu M, Akama K. (2015) Field trial of GABA-fortified rice plants and oral administration of milled rice in spontaneously hypertensive rats. *Transgenic Research* 24:561-9. doi: 10.1007/s11248-014-9859-z.

〔学会発表〕(計9件)

赤間一仁, 金崎雅子, 三上雅史, 遠藤真咲, 土岐精一: CRISPR/Cas システムによるイネ GAD1 制御領域の機能解析. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 18 日, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

赤間一仁, 金崎雅子, 三上雅史, 遠藤真咲, 土岐精一: CRISPR/Cas9 によるイネグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD1) のカルモジュリン結合ドメインの欠失とその分子育種育種への応用. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 1 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

赤間一仁, 金崎雅子, 河合壯彦, 三上雅史, 遠藤真咲, 土岐精一: ゲノム編集による GABA を安定的に蓄積する機能性米開発の試み. 第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会, 2016 年 9 月 1 日, 信州大学繊維学部 (長野県・上田市)

赤間一仁, 金崎雅子, 三上雅史, 遠藤真咲・土岐精一: CRISPR/Cas9 システムによるイネグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子 (GAD1) の C 末端領域の欠失. 第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 20 日, 岩手大学 (岩手県・盛岡市)

赤間一仁, Barry Shelp: イネにおける GABA 経路関連遺伝子のエクソピク的な発現とその環境ストレス応答への影響. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

赤間一仁, Barry Shelp: イネの GABA-T と GLYR のエクソピク的な発現はストレス耐性能を植物体に付与するか? 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 18 日, 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都・世田谷区)

赤間一仁, Barry Shelp: イネ GABA 経路を構成する酵素群のユニークな特性と組換えイネを用いた機能解析の試み. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

赤間一仁, Barry Shelp: 様々なストレスに応答するイネ GABA 経路の機能解析. 第 32 回日本植物細胞分子生物学会, 2014 年 8 月 22 日, 岩手県民情報交流センター (岩手県・盛岡市)

Brikis CJ, Bajwa VS, Trobacher CP, Zarei A, Mullen RT, Akama K, Bozzo GG, Shelp BJ: Single and dual localization of plant glyoxylate/succinic semialdehyde reductases in the cytosol, plastid and mitochondrion. Plant Biology 2014 (Portland, USA, July 12-16, 2014)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.ipc.shimane-u.ac.jp/akama-lab/>

サイエンス・カフェ:

「今、遺伝子組換え作物・食品について考えよう」第 6 6 回島根大学サイエンスカフェ, 赤間一仁, くにびきメッセ (松江市) (2016 年 9 月 23 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤間 一仁 (AKAMA, Kazuhito)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 5 0 2 5 2 8 9 6