

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420798

研究課題名(和文) ゲノム編集を用いた多重変異体の作出による機能未知配糖体化酵素の生理的役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of physiological roles of UGTs through multiple knock-out by genome editing

研究代表者

岡澤 敦司 (Okazawa, Atsushi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10294042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物中の有用二次代謝産物であるリグナン類については、その代謝関連遺伝子に関する情報が未だ十分に得られていない。研究代表者等はリグナン類の網羅的定量系を確立し、シロイヌナズナに適用した。本研究では、近年注目を集めているゲノム編集技術 TALEN (transcription activator-like effector nuclease) を用いて、シロイヌナズナ中のリグナン類の配糖体化酵素を明らかにすることを目的とし、このための形質転換体の取得を行なった。変異体などの解析からシロイヌナズナの UGT71C1 はリグナン類のピノレジノールとラリシレジノールを基質とすることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lignan is a class of useful plant secondary metabolites. The information on genes involved in lignan biosynthesis is limited even in the model plant species Arabidopsis to date. We had established lignan profiling method and evaluated lignans in Arabidopsis. In this study, transcription activator-like effector nuclease (TALEN) was used to knock-out multiple UGT genes to reveal UGTs involved in glucosylation of lignans in Arabidopsis. It was revealed that UGT71C1 is able to transfer glucose from UDP-glucose to lignans, pinoresinol and lariciresinol in vitro. Less amount of lignan glucosides and more aglycones in mutants indicated that UGT71C1 is involved in lignan glucosylation in Arabidopsis.

研究分野：植物代謝工学

キーワード：リグナン シロイヌナズナ 配糖体化酵素 配糖体 TALEN UGT ピノレジノール ラリシレジノール

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム編集技術の一つである TALENs (transcription activator-like effector nucleases) は, Science 誌の 2012 年のブレークスルーに選ばれた技術であり, 多くの生物でゲノム編集に用いられている (図 1). 植物ではシロイヌナズナ, タバコ, オオムギ, イネなどでの実施例が報告されている.

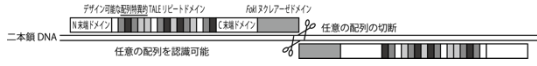


図 1. TALENs による遺伝子配列切断

(2) リグナン類は植物の二次代謝産物であり, 健康維持効果に優れたセサミンや抗ガン活性を示すアルクチゲニンなどの有用物質が存在するが, これまで代謝工学研究はあまり行われておらず, その代謝についての知見も得られていない. 研究代表者らはモデル植物であるシロイヌナズナ中のリグナン類の網羅的定量系を確立し, その代謝工学研究を可能にした.

2. 研究の目的

(1) 植物の二次代謝産物の代謝工学においては配糖体化酵素の制御が重要である. しかし, シロイヌナズナでは, リグナン類の配糖体化酵素は明らかにされておらず, その詳細が不明であった. そこで本研究では TALENs を用いて候補遺伝子である UGT71C ファミリーの多重遺伝子破壊を行うことで, リグナン類の配糖体化酵素を明らかにすることを目的とした. なお, シロイヌナズナの染色体上では, 候補遺伝子がタンデムに座位しており (図 2), この遺伝子破壊にはゲノム編集技術が必須である.



図 2. 配糖体化酵素遺伝子の染色体上の座位

(2) また, 当初は予定になかったが, 企業や研究機関からの依頼があり, リグナン類を含む植物中のフェノール性化合物の代謝工学研究を行った.

3. 研究の方法

(1) 配糖体化酵素遺伝子を大腸菌にて発現させ, リグナン類に対する糖転移活性を評価した. 糖供与体として UDP-グルコース, 糖受容体としてシロイヌナズナ中に比較的多量に存在するピノレジノールおよびラリシレジノールを用いた (図 3).

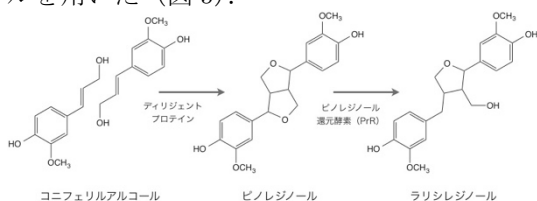


図 3. シロイヌナズナ中の主要リグナン代謝経路

(2) TALENs には広島大学の山本研究室で開発されたプラチナム TALEN を大阪大学の村中研究室で植物用に改変したものをを用いた. また, UGT71C1 に特異的な配列を標的とするもの, および, UGT71C1 と UGT71C2 に共通の配列を標的とするものの 2 種のベクターを設計した. これらのベクターをアグロバクテリアを介した花序接種法にてシロイヌナズナに導入した.

(3) フェノール性化合物のプロファイリングは高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器 (HPLC-PDA) を用いて行った. 植物サンプルを液体窒素で凍結し, ボールミルにて粉碎した後, 凍結乾燥を行なった. 80% メタノール溶液にて抽出を行い, 遠心分離およびフィルター濾過を行ったものを HPLC-PDA に供した.

4. 研究成果

(1) UGT171C1 を大腸菌にて発現させそのリグナン類に対する糖転移活性を調べたところ, この酵素が UDP-グルコースをピノレジノールおよびラリシレジノールに転移させる活性をもつことが明らかになった (図 4). なお, この際の分析には超高速液体クロマトグラフ-トリプル四重極質量分析器を用いた.

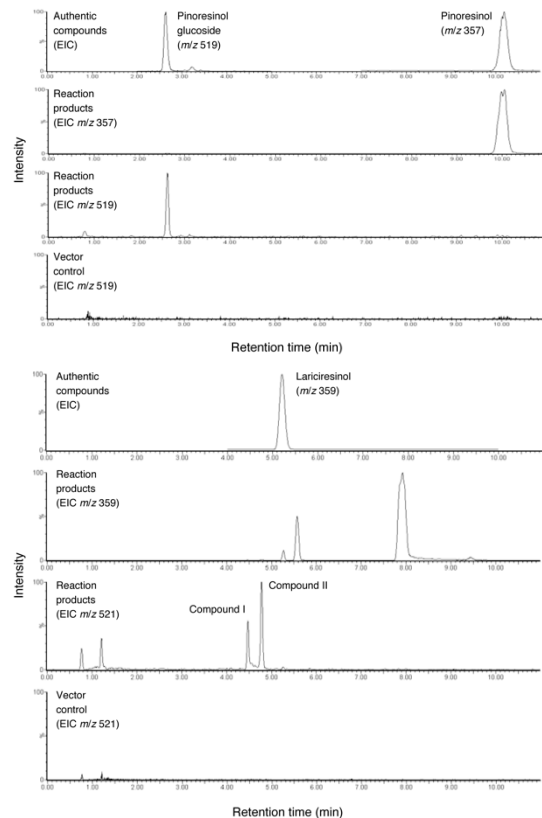
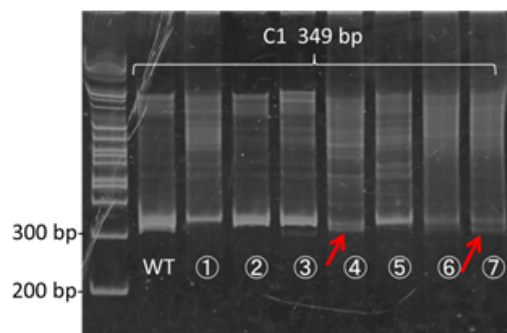


図 4. UGT71C1 によるピノレジノールおよびラリシレジノールの配糖体化

(2) 薬剤選抜マーカーによってそれぞれの TALEN を導入した形質転換体を取得した. そのうち UGT71C1 を標的とした形質転換体に

ついてゲノムを鋳型とした PCR による変異を確認した (図 5).



(B) *ugt71c1* 変異検出

図 5. UGT71C1 を標的とした TALEN 形質転換体の変異検出

並行して別途取得した *ugt71c1* 変異体についてそのリグナン類のプロファイリングを行った。その結果、変異体でピノレジノール量が顕著に増加しており、逆にそのグルコース配糖体の減少が確認できた。さらに、ラリシレジノールの配糖体の顕著な現象も確認された (図 6)。

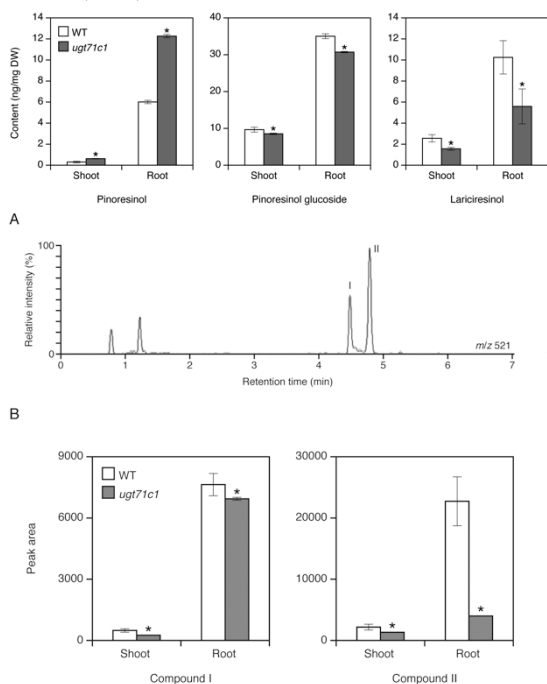


図 6. *ugt71c1* 変異体中のリグナン含有量の変化

以上の結果より、UGT71C1 がシロイヌナズナ中のピノレジノールおよびラリシレジノールの配糖体化を触媒することを明らかにした。

(3) リグナン類などのフェノール性化合物の含有量が高めるための代謝工学研究を行った。HPLC-PDA を用いてフェノール性化合物のプロファイリング系を構築した (図 7)。この系を用いて、特定の栽培条件化で機能性のフェノール性化合物の量が顕著に増加することを発見した (図 8)。

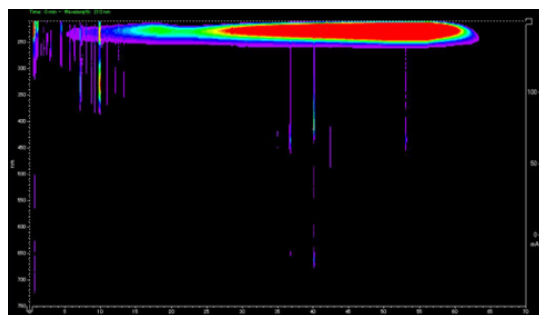


図 7. HPLC-PDA によるフェノール性化合物のプロファイリング

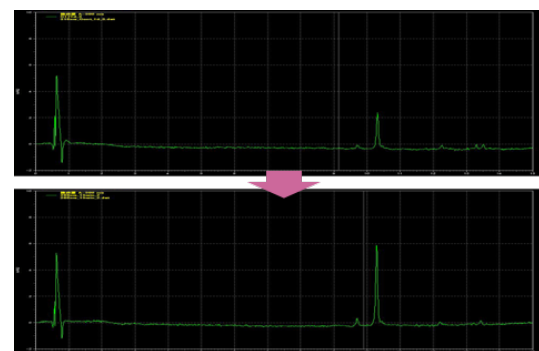


図 8. 特定栽培環境下での機能性フェノール性化合物の増加

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 Okazawa, A., Kusunose, T., Ono, E., Kim, H. J., Satake, H., Shimizu, B., Mizutani, M., Seki, H., Muranaka, T., Glucosyltransferase activity of *Arabidopsis* UGT71C1 towards pinoresinol and lariciresinol, *Plant Biotechnol.*, 査読有, Vol. 31, 2014, 561-566
DOI:10.5511/plantbiotechnology.14.0910a
- ② Tamura, M., Tsuji, Y., Kusunose, T., Okazawa, A., Kamimura, N., Mori, T., Nakabayashi, R., Hishiyama, S., Fukuhara, Y., Hara, H., Sato, K., Muranaka, T., Saito, K., Katayama, T., Fukuda, M., Masai, E., Kajita, S., Successful expression of a novel bacterial gene for pinoresinol reductase and its effect on lignan biosynthesis in transgenic *Arabidopsis thaliana*, 査読有, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 98, 2014, 8165-8177
DOI:10.1007/s00253-014-5934-x

[学会発表] (計 2 件)

- ① 寺正行, 小山知嗣, 村田純, 古川亜矢子, 森翔子, 東鋭明, 渡辺健宏, 堀遂人, 関

澤敦司, 佐竹炎, 小埜栄一郎, 堀川学,
セサミン結合タンパク質の同定とその機能, 日本ケミカルバイオロジー学会第 12
回年会, 2017 年 6 月 7 日-9 日, 北海道大学クラーク会館, 札幌

- ② Okazawa, A., Kusunose, T., Ono, E.,
Kim, H. J., Satake, H., Shimizu, B.,
Mizutani, M., Seki, H., Muranaka, T.,
Glucosyl transferase activity of
Arabidopsis UGT71C1 towards lignans,
12th International Symposium on
Cytochrome P450 Biodiversity and
Biotechnology, 2014 Sep. 24-28, Kyoto
International Community House, Kyoto
(国際学会)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 植物中のフェノール性化合物の増量方法

発明者: 岡澤敦司, 藤川康夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-090020

出願年月日: 平成 29 年 4 月 28 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://cell-metabolism.sakura.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡澤 敦司 (OKAZAWA Atsushi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 10294042

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

村中 俊哉 (MURANAKA Toshiya)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号: 60342862

(4) 研究協力者

()