

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 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580080

研究課題名（和文）

異質倍数性植物コムギにおけるステロール代謝パスウェイの特性解析

研究課題名（英文）

Analysis of sterol metabolic pathway in hexaploid wheat

研究代表者

村中 俊哉 (MURANAKA TOSHIYA)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60342862

研究成果の概要（和文）：コムギにおけるステロール類のプロファイル（質ならびに量）を改変することにより、コムギに新たな機能性を付与することが期待できる。ところがコムギは異質六倍体であること、形質転換植物の作成が困難であることなどから、コムギにおけるステロール代謝パスウェイに関する知見は皆無に等しかった。本研究によりコムギにおけるステロール代謝パスウェイに係わる推定酵素遺伝子 13 種を同定した。さらに、機能性ステロールであるスティグマステロール生合成に係わるステロール C-22 不飽和化酵素をコードする 3 種のコムギ P450 である CYP710A サブファミリーを単離し、ゲノムマッピングにより同祖遺伝子 *TaCYP710A8-A*, *TaCYP710A8-B*, *TaCYP710A8-D* を明らかにするとともに、発現解析ならびにシロイヌナズナを用いた機能解析によりその機能差異を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Wheat (*Triticum aestivum*) is one of the three major crops. It is expected to add value to the crop by the modification of sterol profiles. However, because of the complicated genome (hexaploid) and difficulty of transgenic work, there have been no information of sterol pathway in the crop. In this study, 13 genes for putative sterol metabolic pathway was identified. Among these genes, we elucidated the *CYP710A8* encoding sterol C-22 desaturase as a key characteristic for the higher level of stigmaterol. The gene was mapped on chromosome 3 (3A, 3B, and 3D) and difference of the function of the genes was confirmed by overexpression of each gene in *Arabidopsis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学／植物栄養学・土壌学

キーワード：ステロール、代謝工学、コムギ、P450、同祖遺伝子

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

植物ステロール類を摂食すると、血中コレステロールの低下、免疫力の向上などが見られることが知られている。これらの効果は、植物ステロール類の種類によって異なると考えられている。主食のパン、うどんなどに用いられるコムギにおけるステロール類のプロファイル（質ならびに量）を改変することにより、コムギ種子に新たな機能性を付与することが期待できる。以下に示す困難さがあるために、コムギにおける食品科学的知見はあるものの、コムギにおける代謝パスウェイ解析はほとんど進展していない。

- (1) **コムギは異質六倍体である**：コムギ（パンコムギ）は、AABBDD の 3 ゲノムから構成されている。そのため単一遺伝子であっても、A, B, D 各ゲノム由来の 3 遺伝子が存在する（これらを同祖遺伝子と呼ぶ）。ところが必ずしも各ゲノムに存在する同祖 3 遺伝子が発現しているわけではない。また同祖 3 遺伝子産物が実質的に同等の機能を有するかどうか不明の場合が多い。また、一遺伝子が破壊されたとしても他の遺伝子が補うため変異体の取得が困難であり遺伝学的手法が困難である。
- (2) **コムギ形質転換体の作成が困難である**：コムギは GeneGun による形質転換が報告されているものの形質転換に適した品種は Bob White などに限られており、他の穀物（イネ、トウモロコシ、オオムギ）と比して、ルーチンな形質転換体作成が困難である。そのため逆遺伝学的手法が困難である。

このようにコムギでは、遺伝学的解析、逆遺伝学的解析の両方が困難であるため、コムギのステロール代謝解析を、コムギ植物自身を用いて解析することは現実的であると言えない。これに対し、コムギのゲノムリソースについて、ここ数年の間に充実した。研究申請者が所属している横

浜市立大学木原生物学研究所（以下、木原生研と略）と理学研究所（以下、理研と略）が中心となって約 100 万のコムギ EST のクラスタリングによる遺伝子セットの構築、および、約 8 万の完全長 cDNA の端読み配列が行われた。

2. 研究の目的

(1) コムギにおけるステロール生合成遺伝子の機能を明らかにする

横浜市大木原生研と理研が中心となって整備したコムギ EST ならびに完全長 cDNA 情報から、ステロール生合成の鍵となる酵素に相当する cDNA を抽出し、シロイヌナズナで過剰発現させ、その遺伝子機能を明らかにする。

(2) コムギにおける同祖遺伝子間における遺伝子の機能差異を明らかにする

コムギにおけるステロール生合成遺伝子について同祖遺伝子間における機能差異を明らかにするとともに、コムギステロール代謝パスウェイの特性を明らかにする。

3. 研究の方法

コムギ Chinese Spring を用いた。遺伝子発現解析には、RT-PCR、および、Agilent 社の custom wheat 38k oligo-DNA microarray を用いた。コムギにおけるステロール生合成経路の酵素遺伝子の特定には、シロイヌナズナ、イネの配列を元に、tBLASTn により、[Koumgi Database](http://www.koumgi.org/) (<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>), [TriFLDB](http://trifldb.psc.riken.jp/index.pl) (<http://trifldb.psc.riken.jp/index.pl>) を解析した。コムギ CYP710A8(Ta-A), -(Ta-B), -(Ta-D)ならびに、コムギ TaDWF5 をそれぞれ CaMV 35S プロモータでドライブした配列を有するバイナリーベクターを作成し、アグロバクテリウムを用いたフローラルディップ法によりシロイヌナズナを形質転換した。ステロールの抽出、定量分析は、Suzuki et al. (2004) Plant J. 37: 750 に従い、GC-MS により解析した。シークエンスデータは、以下の通り、DDBJ に登録した。CYP710A8(Ta-A), AB6200024; CYP710A8 (Ta-B), AB6200025; CYP710A8 (Ta-D), AB6200026; TaDWF5

4. 研究成果

(1) コムギにおけるステロール含量

発芽 2 週間後のシードリングにおけるステロール量を測定した。組成比は、それぞれ、シトステロール 59%、カンペステロール 21.4%、スティグマステロール 15.6% の順であった。一方、オオムギのシードリン

グでは、順に、42.1%, 18.5%, 34.3%であり、コムギでは、機能性ステロールであるステイグマステロール量がオオムギより量比が少ないことがわかった。

(2) コムギにおけるステロール生合成経路に係わる酵素遺伝子の推定

シロイヌナズナ、イネの配列を元に、tBLASTnにより、KOUMGI Database ならびに TriFLDB から、コムギにおけるステロール生合成に係わる酵素遺伝子を抽出した。その結果、HMGR, FPS, CAS1, SMT1, CPI1, CYP51G1, FACKEL, DYD1, SMT2, DWF7, DWF5, DWF1 のコムギホモログと推定される cDNA を単離し、シードリングにおける発現を確認することができた。

(3) コムギにおけるシトステロールからステイグマステロールへの変換酵素遺伝子 (ステロール C-22 不飽和化酵素遺伝子) CYP710A ホモログのクローニングとゲノムマッピング

コムギ‘チャイニーズスプリング(CS)’より3種の CYP710A サブファミリーをクローニングした。CS の nullisomic-tetrasomic 系統を用いて、各遺伝子についてゲノム PCR を行った。その結果、3種の遺伝子はそれぞれ、A, B, D ゲノムに存在することがわかり、*TaCYP710A8-A*, *TaCYP710A8-B*, *TaCYP710A8-D* と命名した。*TaCYP710A8* に共通な PCR プライマーで RT-PCR を行った結果、9/13 が *TaCYP710A8-A* であったことから、コムギ CS において *TaCYP710A8-A* が優先的に発現していることがわかった。

(4) シロイヌナズナにおける CYP710A ホモログの機能解析

ステロール C-22 不飽和化酵素遺伝子である3種のコムギ P450(CYP710A サブファミリー) *TaCYP710A8-A*, *TaCYP710A8-B*, *TaCYP710A8-D* の植物体での機能を調べるために、各遺伝子をシロイヌナズナで高発現させた。その結果、いずれの分子種を過剰発現したものでは、炭素数 29 のシトステロールの C-22 不飽和化されたステイグマステロール含量が 10~20 倍上昇した。さらに *TaCYP710A8-A* あるいは *TaCYP710A8-D* を高発現したシロイヌナズナのみで 24-メチレン- Δ 22 ステロールレベルが増加したことから、A, D タイプの分子種は、炭素数 28 のステロールの不飽和化にも機能することがわかった。以上、コムギにおけるステロール生合成遺伝子において、コムギ同祖遺伝子間における遺伝子機能の差異が明らかとなった。

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 8 件)

- ① Tang J, Ohyama K, Kawaura K, Hashinokuchi H, Kamiya Y, Suzuki M, Muranaka T and Ogihara Y (2011) A new insight into application for barley chromosome addition lines of common wheat: Achievement of stigmaterol accumulation. *Plant Physiol.* 157: 1555-1567 (査読有)
- ② Heintz D, Gallien S, Compagnon V, Berna A, Suzuki M, Yoshida S, Muranaka T, Dorselaer AV, Schaeffer C, Bach TJ, Schaller H (2012) Phosphoproteome exploration reveals a reformatting of cellular processes in response to low sterol biosynthetic capacity in Arabidopsis. *J. Proteome Res.* 11: 1228-1239 (査読有)
- ③ 村中俊哉: 有用物質をつくる植物の開発に向けて *生産と技術* 63, 2011, 81-83 (査読無)
- ④ 關光、村中俊哉: 組換え酵母を用いた植物トリテルペノイドの生産 *生物工学* 89, 2011, 656-659 (査読無)
- ⑤ Mano Y, Nemoto K, Suzuki M, Seki H, Fujii I and Muranaka T (2009) The AMI gene family: Indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 61: 25-32 (査読有)
- ⑥ Suzuki M, Nakagawa S, Kamide Y, Kobayashi K, Ohyama K, Hashinokuchi H, Kiuchi R, Saito K, Muranaka T, and Nagata N (2009) Complete blockage of the mevalonate pathway results in male gametophyte lethality. *J. Exp. Bot.* 60: 2055-2064 (査読有)
- ⑦ Tang J, Kobayashi K, Suzuki M, Matsumoto S and Muranaka T (2010) The mitochondrial PPR protein LOVASTATIN INSENSITIVE 1 plays regulatory roles in cytosolic and plastidial isoprenoid biosynthesis through RNA editing. *Plant J.* 61: 456-466 (査読有)
- ⑧ 大山清、村中俊哉: 植物トリテルペンの代謝多様性 植物の生長調節 査読無, 44 2009 56-66 (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

- ① Seki H and Muranaka T: Molecular basis for structural diversity of legume triterpenoids 第53回日本植物細胞分子生物学会年会シンポジウム (招待講演) 2012年3月16日京都
- ② 村中俊哉: 植物細胞における一次代謝

／二次代謝経路の動的制御機構の解明
に向けて第53回日本植物細胞分子生物
学会年会シンポジウム（招待講演）
2012年3月16日京都

- ③ Tang J他: A New Insight into Application for Barley Chromosome Addition Lines of Common Wheat for Study on Metabolic Pathways, the Plant and Animal Genome XX Conference The Plant and Animal Genome XX Conference 2012年1月 14日 サンディエゴ (米国)
- ④ Fukushima EO 他: CYP716A12: A multifunctional enzyme in triterpenoid biosynthesis TERPNET 2011 2011年5月 24日 カルマル (スウェーデン)
- ⑤ Suzuki M他: The Potential Regulatory Mechanism of Plastid Differentiation and Function by Sterols 19th International Symposium on Plant Lipids (ISPL) 2010.7.11 Cairns, Australia
- ⑥ Tang J他: Molecular Analysis of Sterol Biosynthesis-Related Genes in Barley Chromosome Addition Lines of Common Wheat 21st International Conference on Arabidopsis Research (ICAR) 2010.6.10横 浜
- ⑦ Muranaka T: Metabolic diversity and its application to combinatorial biosynthesis in plant The Chem-Bio Information (CBI) 2010 2010.9.15東京
- ⑧ 村中俊哉: 植物P450の多様性と生合成 デザイン第33回日本分子生物学会年会 2010.12.7神戸
- ⑨ 大山清 他: オオムギ染色体導入による コムギのステロールプロファイル改変 第27回日本植物細胞分子生物学会大 会・シンポジウム 2009.7.30 藤沢

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/pl/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村中 俊哉 (MURANAKA TOSHIYA)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 60342862

(2)連携研究者

永田 典子 (NAGATA NORIKO)
日本女子大学・理学部・准教授
研究者番号: 40311352

一色正之 (ISSHIKI MASAYUKI)
横浜市立大学・木原生物学研究所・准教
授
研究者番号: 10314543

川浦 香奈子 (KAWAMURA KANAKO)
横浜市立大学・木原生物学研究所・助教
研究者番号: 60381935

大山 清 (OYAMA KIYOSHI)
東京工業大学・助教
研究者番号: 203911899