

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22日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780010

研究課題名（和文）遺伝子ターゲティングを利用したトリプトファン高蓄積イネの開発

研究課題名（英文）Molecular breeding of tryptophan-fortified rice via gene targeting

研究代表者

雑賀 啓明（SAIKA HIROAKI）

独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム機能改変研究ユニット・主任研究員

研究者番号：20435613

研究成果の概要（和文）：遺伝子ターゲティング（gene targeting; GT）は、標的遺伝子だけを狙い通りに改変することができる有用な技術である。本研究では、GTによってトリプトファン（Trp）合成の鍵酵素遺伝子 *OAS2* を計画的に改変し、Trp 高蓄積イネを作出することに成功した。メタボローム解析の結果、このイネでは、各種アミノ酸、Trp から合成されるセロトニン、ビタミンB群やインドールアルカロイドなども高蓄積していることが明らかになった。したがって、GTによる計画的変異導入技術は代謝改変作物の分子育種に利用できることが実証された。

研究成果の概要（英文）：Gene targeting (GT) via homologous recombination is a powerful transformation technology because it enables to modify the endogenous target gene as expected. In this study, we succeeded in the production of novel tryptophan (Trp)-fortified rice plants by GT-mediated targeted mutagenesis of *OAS2* gene that encodes a key enzyme in Trp biosynthesis of rice. In the GT plant, other amino acids except for Trp and the metabolites synthesized from Trp such as serotonin, vitamin B and indole alkaloid accumulated at a higher level also. Thus, we demonstrated that GT-mediated targeted mutagenesis is applicable to metabolic engineering in crops.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：遺伝子ターゲティング・点変異・代謝改変・トリプトファン・相同組換え・遺伝子組換え植物・アミノ酸アナログ

1. 研究開始当初の背景

ゲノム中のランダムな位置に外来 DNA が挿入される従来の遺伝子組換え技術とは異なり、遺伝子ターゲティング（gene targeting; GT）は標的遺伝子だけを狙い通りに改変することができる技術である。本研究を開始するまでに、モデル作物であるイネ

において複数の遺伝子座で再現性のある GT の成功例が数例報告されていた。

ヒトや家畜の必須アミノ酸であるトリプトファン（tryptophan; Trp）は、家畜の飼料添加物や医薬品の原料としても重要であるが、Trp は穀物における制限アミノ酸の 1 つであるため、その高蓄積化が望まれている。

アントラニル酸合成酵素 (anthranilate synthase; AS) は Trp 合成経路の鍵酵素であり、その α サブユニットは Trp によってフィードバック阻害を受ける。イネ *OASA2* 遺伝子は AS の α サブユニットをコードする遺伝子である。*OASA2* のタンパク質工学による研究から、高濃度 Trp に対する感受性や AS 酵素活性に変化を与えるアミノ酸置換が見出されており、変異型 *OASA2* を過剰発現させたイネカルスでは、Trp が高蓄積することが示されていた。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質工学的解析から得られた情報を基に、GT によってイネ内在性の *OASA2* 遺伝子に目的の変異を導入した GT イネの作出を試みた。特に、GT イネの Trp 含量を評価することで機能付加米育種への応用を探るとともに、GT による標的遺伝子の部位特異的改変技術と従来の外来遺伝子過剰発現技術の2つのアプローチの相違を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

GT 用ベクターとして、目的の変異を導入した *OASA2* 遺伝子のゲノム断片をバイナリーベクターにクローニングした。GT 用ベクターはアグロバクテリウム法によってイネカルス (品種日本晴) に導入した。GT に成功した細胞は Trp アナログである 5-methyl-Trp を用いて選抜した。得られた GT イネについては、分子生物学的解析を行うとともに、CE-MS 及び LC-MS を用いて代謝産物の蓄積量を調べた。

4. 研究成果

(1) GT による *OASA2* 遺伝子改変イネの作出と分子生物学的解析

AS 活性を増強する複数の変異を内在性の *OASA2* 遺伝子に導入する GT 実験を行った。その結果、実験に供試したカルスの 0.16~0.4% から、目的の変異が導入されると予想されるカルスをクローン化することに成功した (表 1)。また、これらのカルスを再生し、植物体を得ることに成功した。これらの系統のうち、S126F/L530D を導入した系統 #3-4、Y367A を導入した系統 #5-11 に着目して解析を進めた。

表1 本研究におけるGT効率

導入した変異	S126F/L530D	Y367A/L530D
GT候補カルスの系統数(A)	2系統	8系統(Y367A/L530D) 6系統(Y367Aのみ)
<i>Agrobacterium</i> 感染カルス数(B)	1275系統(20.4 g)	3475系統(55.6 g)
GT効率(A/B, %)	0.16 %	0.40 %

#3-4、#5-11 について、サザンブロット解析を行った結果、いずれの系統も true GT が

生じていた (すなわち *OASA2* 遺伝子を予想通りに改変することに成功した) ことが明らかになった (#3-4、図 1)。また、#3-4 を用いて発現解析を行ったところ、分離した野生型、変異型ホモ、ヘテロいずれの系統においても、*OASA2* 遺伝子の mRNA 蓄積量に差がみられないことが示された。この結果から、GT は従来の過剰発現アプローチとは異なり、サイレンシング等による標的遺伝子の不活化は生じにくいことが考えられた。

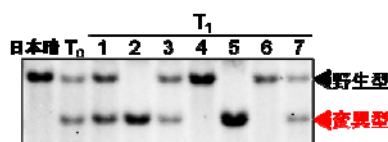


図1 #3-4におけるサザンブロット解析
T₁世代の#2と#5は変異型ホモ個体であった。

(2) 変異イネにおけるメタボローム解析

#3-4、#5-11 では、カルス、幼苗、完熟種子のいずれにおいても遊離 Trp 含量が増加していた。特に、#3-4 の完熟種子では非形質転換個体の 230 倍もの遊離 Trp が蓄積していた (図 2)。また、改変型 *OASA2* 遺伝子をホモで有する個体はヘテロ個体より Trp 含量が高いこと、変異酵素における *in vitro* での活性と Trp 蓄積量に正の相関があること、完熟種子では幼苗より Trp 蓄積量の増加率が高いことが明らかになった。

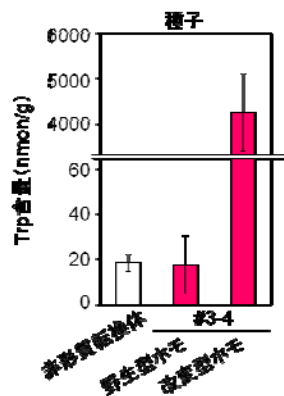


図2 #3-4の完熟種子におけるTrp量

また、#3-4 については、草丈や分げつ数など栄養生長器官の生長には大きな違いは見られなかった。以上の結果から、Trp が茎葉部で徐々に合成されて種子に転流したため、種子で Trp が高蓄積したというモデルが考えられた。

Trp が高蓄積していた #3-4 の完熟種子において、Trp 以外の代謝産物の蓄積を調べた。その結果、Trp 以外の遊離アミノ酸が野生型の 2~10 倍程度増加していることが明らかとなった。さらに、Trp を基質として合成されるセロトニン、ビタミン B 群やインドールア

ルカロイドなども高蓄積していることが明らかになった (図3)。この結果は、変異型酵素遺伝子の過剰発現アプローチで作出されたイネのメタボローム解析で報告されている結果と同様であった。以上の結果から、GTは過剰発現アプローチと同様に代謝改変イネを作出するのに利用できることが実証された。

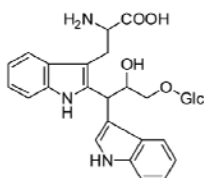


図3 #3-4の完熟種子で高蓄積していたインドールアルカロイドの推定構造式

本研究においては、GTによってOASA2に目的変異を導入することで、OASA2遺伝子の発現パターンを大きく変えることなく、Trpが高蓄積したイネを作出することに成功した。また、GTによる標的酵素の改変によって、代謝改変作物を作出することが可能であることを示した。以上の結果は、タンパク質工学から得られた情報を基にGTを利用して標的遺伝子の計画的改変を行うという、新たな分子デザイン育種の有効性を実証するものである。

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9件)

- ① Saika H, Oikawa A, Matsuda F, Onodera H, Saito K, Toki S
Application of gene targeting to designed mutation breeding of high-tryptophan rice
Plant Physiology 査読有 Vol. 156 No. 3 2011 1269-1277
(DOI; 10.1104/pp.111.175778)
- ② Saika H, Toki S
Gene targeting applied to designed-mutation breeding of high-tryptophan rice
ISB News Report 査読無 No.12 2011 3-6
(<http://www.nbiap.vt.edu/news/2011/Dec11.pdf>)
- ③ 雑賀啓明, 遠藤真咲, 土岐精一
遺伝子ターゲティング技術を利用したBS耐性イネの分子育種
日本農薬学会誌 査読無 Vol.35 2010 172-175
(DOI; 10.1584/jpestics.W10-17)
- ④ Saika H, Toki S
Towards a highly efficient gene targeting system in higher plants

Japan Agricultural Research Quarterly 査読有 Vol.43 No.2 2009 81-85
(<http://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/jarq/43-2/43-02-01.pdf>)

[学会発表] (計24件)

- ① 雑賀啓明, 中林亮, 及川彰, 松田史生, 小野寺治子, 斉藤和季, 土岐精一
遺伝子ターゲティングによる代謝改変イネの作出と解析
第53回日本植物生理学会年会 2012年3月16日 京都産業大学
- ② Saika H, Oikawa A, Matsuda F, Onodera H, Saito K, Toki S
Tryptophan-fortified rice produced by designed mutation breeding via gene targeting
Plant Biology 2011 2011年8月9日 米国・ミネアポリス
- ③ 雑賀啓明, 遠藤真咲, 土岐清一
遺伝子ターゲティングによる新規変異体作出とその利用
第8回農薬バイオサイエンス研究会 2010年12月3日 京都大学
- ④ 雑賀啓明, 及川彰, 松田史生, 小野寺治子, 斉藤和季, 土岐精一
遺伝子ターゲティング技術を利用したトリプトファン高蓄積イネの開発
第28回日本植物細胞分子生物学会 2010年9月3日 東北大学
- ⑤ 雑賀啓明, 及川彰, 松田史生, 小野寺治子, 斉藤和季, 土岐精一
遺伝子ターゲティングを利用した計画的変異育種—トリプトファン強化米の作出
NIAS シンポジウム「イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2010」 2010年7月3日 つくば国際会議場
- ⑥ Saika H, Oikawa A, Matsuda F, Onodera H, Saito K, Toki S
Molecular breeding of a tryptophan fortified rice via homologous recombination mediated gene targeting based on protein engineering
The 12th World Congress of the International Association for Plant Biotechnology 2010年6月8日 米国・セントルイス
- ⑦ 雑賀啓明, 及川彰, 松田史生, 小野寺治子, 斉藤和季, 土岐精一
計画的な変異導入によるトリプトファン高蓄積イネの作出 育種学研究
日本育種学会第117回講演会 2010年3月27日 京都大学
- ⑧ 雑賀啓明, 小野寺治子, 土岐精一
タンパク質工学に基づいた遺伝子ターゲティングによるトリプトファン強化イネの作出

第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月
12 日 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 1 件)

① Saika H, Onodera H, Toki S
Humana Press Transgenic Plants: Methods
and Protocols (Methods in Molecular
Biology) 2012 497 ページ (67-74 ページ)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 相同組換えを利用したイネアントラ
ル酸合成酵素の改変

発明者: 土岐精一, 雑賀啓明

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許出願 2009-177959

出願年月日: 2009 年 7 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雑賀 啓明 (SAIKA HIROAKI)

独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム

機能改変研究ユニット・主任研究員

研究者番号: 20435613

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし