

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658101

研究課題名(和文) 新たなビタミンE生合成遺伝子の同定と、そのトコトリエノール生産への応用

研究課題名(英文) Identification and application of vitamin E synthesis gene for tocotrienol production.

研究代表者

木村 映一 (Kimura, Eiichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産基盤研究領域・主任研究員

研究者番号：40391461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンEは、トコフェロールとトコトリエノールの2種類の分子を総称した名称である。両者はビタミンEとして一括りにされているが、トコトリエノールとトコフェロールの機能性には大きな違いがあることが明らかになっている。トコトリエノールは、特にイネに特徴的に多く含まれていることが知られている。我々は新規なビタミンE生合成遺伝子を同定して、その遺伝子の発現を制御することで、トコフェロールを生産せずトコトリエノールだけを生産するイネカルスを作製した。従来トコトリエノールを精製する際には、トコフェロールの夾雑が問題になっていたが、トコフェロールを含まない原料からであれば、トコトリエノールを簡便に精製できる。

研究成果の概要(英文)：Vitamin E is a common designation of tocopherol and tocotrienol. The molecular structures of tocopherol and tocotrienol resemble with each other, but the functions of both molecules are very different. Rice is rich source of tocotrienol. We identified novel gene that control biosynthesis of vitamin E. By regulating expression levels of novel gene, we generated rice callus that produces tocotrienol but not tocopherol. It is difficult to purify tocotrienol because tocopherol mixed into tocotrienol in the course of purification. By using the generated callus, it becomes easier to purify tocotrienol because that dose not contain tocopherol.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 応用生物化学

キーワード：トコトリエノール

1. 研究開始当初の背景

ビタミン E は、トコフェロールとトコトリエノールの 2 種類の分子を総称した名称であり、トコフェロールとトコトリエノールのそれぞれについて、 α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種類の同族体が存在する。トコフェロールは光合成植物で生合成されているのに対して、トコトリエノールは一部の植物でのみ生合成されており、特にイネには特徴的に多く含まれていることが知られている。

両者はビタミン E として一括りにされているが、その機能性には大きな違いがあることが明らかになりつつある。トコトリエノールには、トコフェロールと同様に抗酸化活性があるだけではなく、トコフェロールにはない機能性である強力な血管新生抑制作用があることが明らかになっている。そのため、血管新生が起こる様々な疾病の予防や治療等に利用されることが期待されている。また、トコトリエノールの機能性には、コレステロール低下作用、神経保護作用、動脈硬化抑制作用、テロメラーゼ阻害作用等、様々な報告がなされており、トコトリエノールの有効活用が求められている。

トコフェロールとトコトリエノールは分子構造や物理的性質が類似しているため、トコトリエノールを精製しようと試みた場合に、トコフェロールの夾雑が生じ、分離精製が非常に困難であるという課題があった。

また、ビタミン E の発見は今から 90 年余年前の 1922 年の栄養学的研究にまでに遡る。しかし、植物のビタミン E 生合成経路で働く遺伝子のクローニングが始まったのは、意外にも 2000 年以降で、今なお未同定の生合成酵素の遺伝子が存在しており、ビタミン E の生合成経路の全貌は明らかにされていない。

2. 研究の目的

新規な遺伝子がイネにおいてビタミン E の生合成に関与している可能性があるという知見を得つつあった。そのため、ビタミン E 生合成を担う可能性のある新規な遺伝子について、その存在の有無を検討するための探索を行い、新たなビタミン E 生合成遺伝子を同定することを目指した。

もし新規遺伝子がビタミン E の生合成に関与していれば、新規遺伝子の働きを抑えることにより、トコフェロールを合成せずに、トコトリエノールのみを合成するイネ細胞を作出することを目的とした。精製原料にトコフェロールを含まずに、トコトリエノールのみを含む材料を用いることができれば、煩雑な分離工程を経ずに、トコフェロールとトコトリエノールを分離することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) ビタミン E 生合成遺伝子欠損イネの解析

ビタミン E を生合成する酵素をコードすることが知られている遺伝子が欠損したイネについて、そのビタミン E 含量を定量した。ビタミン E 生合成遺伝子欠損イネの葉を、ビーズ式細胞破碎装置を用いて粉碎し、イソプロピルアルコールを加えて、ボルテックスと超音波処理を行うことで、ビタミン E を抽出した。抽出サンプルを遠心分離後にフィルター過し、ヘキサンの 5 倍希釈したものを定量解析に用いた。分析は 4000QTRAP LC-MS/MS を用いて行った。分離カラムには Inertsil SIL 100A-3 4.6×250mm を用いた。移動層には、ヘキサン : 1,4-ジオキ酸 : 2-プロパノール = 100 : 4 : 0.5 の溶媒を用いて 40 の条件下で分析を行った。Multiple Reaction Monitoring は、 α -トコフェロール = 430.7, 165.1、 β -トコフェロール = 416.7, 151.2、 γ -トコフェロール = 416.7, 151.0、 δ -トコフェロール = 402.7, 137.2、 α -トコトリエノール = 424.7, 165.3、 β -トコトリエノール = 410.7, 151.1、 γ -トコトリエノール = 410.7, 151.0、 δ -トコトリエノール = 396.7, 137.1 の条件で行った。

(2) 新規遺伝子の発現の有無の確認

イネカルスより Total RNA を調製し、混入しているゲノム DNA を取り除くため、所定量の RNase-free DNase を 37 で 30 分間作用させることでゲノム DNA を分解した。DNase を再精製で除去した後、精製 RNA をテンプレートとして逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。予想される新規遺伝子の配列から、新規遺伝子に特異的なプライマー配列を設計して、合成した cDNA をテンプレートにして、PCR による増幅を行った。PCR のポジティブコントロールには、ハウスキーピング遺伝子である eEF1- α 遺伝子を用いた。また、ゲノム DNA の混入がないことを確認するために、ネガティブコントロールとして、DNase 処理後の RNA をテンプレートとしたサンプルでも PCR を行った。

(3) 新規遺伝子発現抑制イネの作製

新規遺伝子の 5' 非翻訳領域と翻訳領域の一部をターゲット領域として用い、RNAi を用いた遺伝子抑制法を用いて、イネカルスにおける新規遺伝子の発現抑制を行った。ターゲット領域を PCR 法で増幅した後、TOPO isomerase を用いた反応で pENTER/D-TOPO ベクターにクローニングした。さらに LR 反応を用いてターゲット領域を pANDA ベクターに組み入れ、イネカルスを形質転換する際のコンストラクトを作成した。

次に既知のビタミン E 合成遺伝子が欠失したイネの種子をからカルスを誘導した。その

カルスに対して、pANDA ベクターコンストラクトでトランスフォーメーションしたアグロバクテリウムを感染させて、ターゲット領域をイネゲノムへ導入した。感染後のカルスは3日間共存培地上で培養した後、ハイグロマイシンを含む選択培地上で培養することで、遺伝子導入されたカルスのセクションを行った。ターゲット領域が導入されたカルスは、さらに培養増殖させることで、カルス中のビタミン E 含量を前述のように4000QTRAP LC-MS/MSを用いた方法で定量分析を行った。

4. 研究成果

(1) ビタミン E 生合成遺伝子欠損イネの解析

従来から知られていたビタミン E 生合成遺伝子が欠失したイネでは、ビタミン E が合成されないと考えられたため、葉のビタミン E 含量を分析しても、ビタミン E は検出されないことが予想された。従来から知られていたビタミン E 合成遺伝子が正常にはたらくイネの葉では、7mg/100g 程度の α -トコフェロールを含んでいた。一方、従来から知られているビタミン E 生合成遺伝子をはたらないイネの葉のビタミン E 含量を定量したところ、予想に反して 1.5mg/100g 程度の α -トコフェロールが存在していることが明らかになった(図1)。従来から知られていたビタミン E 合成遺伝子を正常に持つイネと比べると、ビタミン E 含量は少ないものの、この結果はこれまでに考えられていたビタミン E 生合成遺伝子の他にも、さらに新規なビタミン E 生合成遺伝子が存在していることを示唆していた。

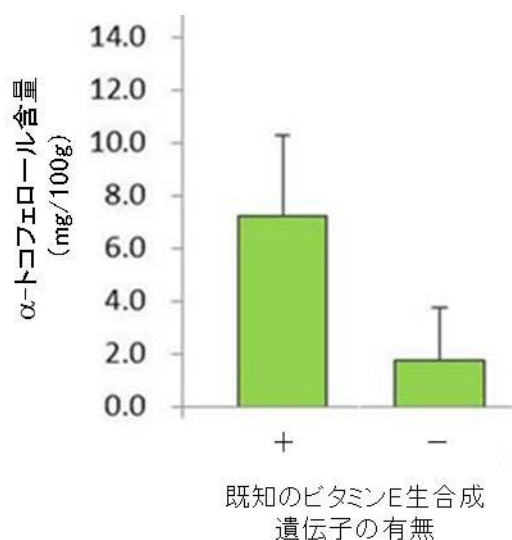


図1. 従来から知られているビタミン E 生合成遺伝子をもつイネと、欠失したイネの葉のビタミン E 含量の違い

(2) 新規遺伝子の発現の有無の確認

新規なビタミン E 生合成遺伝子の候補を、イネの遺伝子の中から推定した。そしてその遺伝子が実際にイネにおいて mRNA として発現しているのかを解析した。野生型のイネカルスより調製した cDNA をテンプレートとして、新規遺伝子に特異的な配列のプライマーを4組用いてPCRを行った。その結果、新規な遺伝子がイネのカルスにおいて実際に発現していることを確認した(図2)。得られた増幅産物が、ゲノム DNA が混入したことによるものでないことを確認するため、cDNA 合成前の RNA サンプルをテンプレートとして行った PCR では、これらのバンドは増幅されないことも確認した。

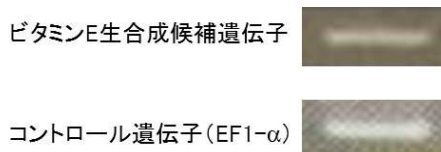


図2. イネカルスにおけるビタミン E 生合成候補遺伝子とコントロール遺伝子 (EF1- α) の PCR による発現確認

(3) 新規遺伝子発現抑制イネの作製

WT イネカルスにおいては、トコフェロールが存在しているが、従来知られていたビタミン E 生合成遺伝子が欠損したイネカルスに対して、さらに新規なビタミン E 合成遺伝子に対して RNAi を用いた遺伝子発現抑制を行ったカルスのビタミン E 含量を定量した。そうしたところ、野生型のイネカルスにおいては、トコフェロールとトコトリエノールの両方のビタミン E が生産されているのに対して、従来のビタミン E 生合成遺伝子と新規なビタミン E 生合成遺伝子の両方の遺伝子が働かない遺伝子組換えカルスにおいては、トコフェロールは生産されず、トコトリエノールのみが生産されることが明らかになった(図3)。これは新規な遺伝子がビタミン E の生合成に関与していることを示している。

前述のように、トコトリエノールを分離精製しようとした場合、トコフェロールの夾雑が問題となり、高純度品を得るためには多くの精製ステップを踏まなければならなかった。しかし作出したトコトリエノールフリーのイネカルスを用いれば、当初からトコフェロールが含有されていないため、トコフェロールとの分離工程を省くことができるため、高純度トコトリエノール生産のための原料として有用である。この遺伝子改変技術によるトコフェロールを含まないトコトリエノールイネカルスの作製方法については、特許出願を行った(図4)。

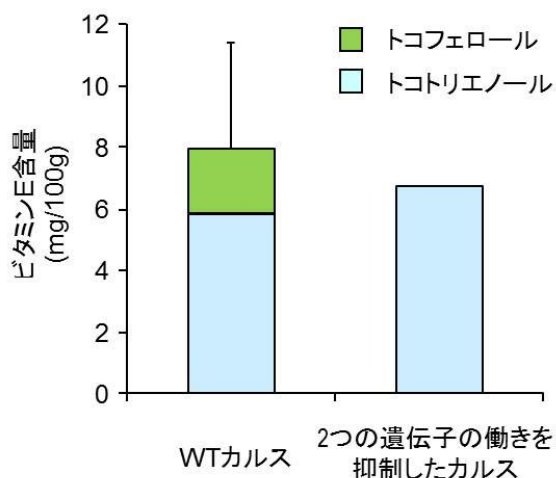


図3. 野生型(WT)と従来から知られているビタミン E 生合成遺伝子と新規遺伝子の働きを抑制したイネカルスのトコトリエノールとトコトリエノール含量の比較



図4. トコフェロールを生産せずに、トコトリエノールのみを生産するイネカルス

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1件)

K. Matsuzuka, E. Kimura, K. Nakagawa, K. Murata, T. Kimura, T. Miyazawa. Investigation of tocotrienol biosynthesis in rice. *Food Chem.* (2013) 140. 91-98 (査読有) DOI:10.1016/j.foodchem.2013.02.058

〔学会発表〕(計3件)

阿部伎、木村映一、木村俊之、村田和優、仲川清隆、宮澤陽夫：米におけるビタミン E の新しい生合成酵素の探索と機能解析. 日本油化学会第 52 回年会 2013 年 9 月 4 日。(宮城県仙台市)

阿部伎、木村映一、木村俊之、村田和優、仲川清隆、宮澤陽夫：新規ビタミン E 合成酵素の解明. 第 16 回 Vitamin E アップデートフォーラム 2013 年 8 月 19 日。(東京都千代田区)

阿部伎、木村映一、木村俊之、村田和優、仲川清隆、宮澤陽夫：米におけるビタミン E の新しい生合成酵素の探索と機能解析. 第 55 回日本脂質生化学会 2013 年 6 月 6 日. 松島大観荘(宮城県松島町)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：トコトリエノールの製造方法及びそのための植物

発明者：木村映一、吉田泰二、木村俊之、村田和優、阿部伎、仲川清隆、宮澤陽夫
権利者：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、国立大学法人東北大学、富山県

種類：特許

番号：特許願 2013-218669

出願年月日：平成 25 年 10 月 21 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 映一 (KIMURA, Eiichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産基盤研究領域・主任研究員

研究者番号：40391461

(2) 研究分担者

木村 俊之 (KIMURA, Toshiyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター生産体系研究領域・主任研究員

研究者番号：70355303

仲川 清隆 (NAKAGAWA Kiyotaka)

国立大学法人東北大学・大学院・農学研究科・准教授

研究者番号：80361145

村田 和優 (MURATA, Kazumasa)

富山県農林水産総合技術センター(農業研究所、森林研究所)・農業バイオセンター・主任研究員

研究者番号：80500793