

トリプトファン生合成系における 一次・二次代謝の制御と利用

東京農業大学農学部 教授 若狭 暁

1 研究実施の概要

代謝系の遺伝子操作, いわゆるメタボリックエンジニアリングは, 植物の機能改変をめざす植物バイオテクノロジーの重要な目標の一つである. 本チームではメタボリックエンジニアリングの可能性を実現するために, 栄養価を改善した飼料作物の開発と二次代謝化合物産生への影響, また二次代謝を制御するためのネットワーク解析まで幅広い課題に取り組んだ.

1)トリプトファンを蓄積する作物の利用

植物の代謝化合物の中で, 必須アミノ酸の一種であるトリプトファン(Trp)は, 産業的に見ても, 家畜の飼料添加物として, また, 医薬品の原料として重要性が高い. 飼料添加物用に発酵工業で生産されるアミノ酸としては, リジン, メチオニン, スレオニンについて Trp が重要であるが, Trp の生産はこれらのアミノ酸の中で最もコストが高い状況となっている. また, Trp は栄養的価値だけでなく, この不足は脳内物質のセロトニン合成の低下をもたらし, これにより餌の摂取量が低下するなどの影響を与える. このような背景から, Trp を蓄積した作物は飼料としての価値を高めるものと考えられる.

Trp 生合成系は, シキミ酸経路により合成されたコリスミ酸から出発する. コリスミ酸はアントラニル酸合成酵素(AS)によりアントラニル酸となり, さらに6段階を経て最終産物であるTrpが合成される. この時, 酵素ASは最終産物であるTrpによりフィードバック制御を受けるため, 細胞のTrp濃度は一定に保たれる. したがって, Trpの蓄積を図るためには, 本酵素をTrpによるフィードバック阻害に非感受性とするればよいと考えられる. ASは α と β サブユニットからなる4量体であり, フィードバック制御には α サブユニットが関与している. このため, イネのアントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子(*OASA*)をクローニングして塩基置換し, フィードバック阻害に感受性の低下した改変型酵素遺伝子, *OAS1D* を作製した. これを導入したイネのカルスの遊離 Trp 含量は100倍以上, 葉のそれは30倍以上蓄積することを報告した(Tozawa *et al.* 2002). 本プロジェクトでは, この遺伝子を導入したイネのTrpの蓄積が後代でもまた圃場栽培でも安定して認められるか, 高 Trp イネが作物として正常に発育するかどうか, 高 Trp イネ子実は実際に家畜に対して飼料価値を持つかどうかを明らかにすることを目的の一つとして, イネ2系統について環境に対する安全性評価試験を行い, 一般圃場栽培まで進めた. その結果, Trp の蓄積が親品種である「日本晴」のどのような形質に影響を与えるかを明らかにし, 得られた子実を用いたニワトリに対する飼養試験によって, 実際に飼料としての価値のあることを確認した.

代謝系遺伝子操作は必然的に目的以外の代謝化合物生成をもたらす可能性が高い. 家畜の餌として利用する場合でも食品安全性の面から目的としない化合物の生成は回避したい. 一方, 高等植物は有用な二次代謝化合物を合成する. これらの合成を制御できれば新たな技術開発が可能となる. そのため, 一つは安全性の面から, 他方は, 新たな代謝化合物生産を制御するための基礎的知見を得るために, 形質転換体の代謝プロファイリングを行った. その結果, *OAS1D* 遺伝子を導入して高 Trp となった形質転換体において Trp 以外の芳香族化合物の大きな変動は認められないことが明らかとなった. このことは, 安全性の面から非常に優れた特性として評価できる.

以上のように, イネを用いて実際の飼料価値を明らかにすると同時に, 本遺伝子が他の作物でも高濃度の Trp 蓄積を可能にするか, 代謝ネットワークへの影響は植物種で異なるかを検討するため, *OAS1D* 遺伝子をダイズ, アズキ, バレイショ, シロイヌナズナに導入した結果, すべての作物について, 高濃度 Trp の蓄積が確認できた. イネとは種子成分の大きく異なるダイズでは, 遊離 Trp 含量に加え固定態の Trp 含量の増加が認められることを明らかにした. これらの形質転換体についても代謝プロファイリング分析を行い, イネと同様に Trp 以外の化合物の大きな変動は認められず, 種による大きな差異はないことを明らかにした. この結果は, 後に述べるフェニルアラニン(Phe)蓄積の場合と大きく異なり, Trp を蓄積した場合に特異的であると考えられる. その理由を明らかにするため転写産物の解析を行った結果, トリプトファン脱炭酸酵素の活性が関係していると考えられた. さらに, Trp の細胞内蓄積部位との関係が予想されるが, これらについてはさらに解析する必要がある.

2)アントラニル酸合成酵素の解析と新たな変異型酵素の創成

Trp の蓄積は、以上のように改変型 *OAS1D* 遺伝子により達成されたが、AS α サブユニット遺伝子には発現特性の異なる2つの遺伝子がある。一つはここで用いた *OAS1* で、発現量は低いが恒常的に発現する。それに対して *OAS2* は発現量が高い上にエリクターによりさらに発現が誘導される。シロイヌナズナや *Ruta graveolens* においても同様に発現特性の異なる2つの α サブユニット遺伝子が報告されており、一つは Trp 合成、他は防御反応に関わるものと推測されている。そこで、2つのアイソザイムがどのように役割分担しているかを明らかにするため、イネ AS の α と β サブユニットの生化学的解析を行った。その結果、2つの α サブユニットの酵素特性は大きく異なることが明らかとなった。*OAS2* の特性の違いは、Trp によるフィードバック阻害に感受性を低下させる変異の導入実験にも反映され、これまで *OAS1* の場合と同様の一アミノ酸置換では目的の酵素を作製できなかった。そこで、新たに無細胞タンパク質合成系を用いた多数の変異酵素の作製とスクリーニング法を開発した。本方法を用いて、フィードバック阻害に感受性を低下させるアミノ酸変異と酵素活性を向上させるアミノ酸変異とを明らかにして複数のアミノ酸を置換した高効率の改変型 *OAS2* 酵素を作製することに成功した。これを導入したイネはカルスにおいて400倍の Trp を蓄積した。本遺伝子はトウモロコシでも Trp を蓄積することを確認した。ここで開発された *in vitro* での変異タンパク質の作製とスクリーニング法は他の酵素の創成にも適用できる優れたシステムである。

2つの α サブユニット遺伝子の機能に違いがあるかどうかを明らかにするために、RNAi 法の適用を試みた。*OAS1* あるいは *OAS2* の一方の発現を抑制したイネ形質転換体は正常に発育して種子を生産した。両遺伝子の発現を抑制した場合、カルスは正常に増殖するものの植物体の生育には Trp を要求した。このことは、一方を発現抑制しても植物体の Trp は正常に合成されることを示している。これは予測された結果でもあり、現在、病原微生物に対する防御反応の違いについて解析している。

3) 新たな代謝系突然変異体の探索と解析

以上のように AS に焦点を当てた解析と同時に、新たな代謝系の突然変異体の探索と解析をイネとシロイヌナズナについて行った。1989年に、5-メチル Trp (5MT) 抵抗性として報告した体細胞突然変異体イネ (MTR1) は Trp と Phe を蓄積する。既知の報告から AS α サブユニット遺伝子の変異が最も有力な変異の原因と考えられたが、解析の結果ではこの遺伝子に変異は存在しなかった。また、*OAS1D* を導入したイネでは Trp 以外の化合物が蓄積しないことから、MTR1 は新規の変異による可能性が期待された。MTR1 のカルスの代謝プロファイリングから、Trp、Phe とともにフェニルプロパノイド化合物が大きく増加していることが明らかとなった。さらに、この原因遺伝子をイネ染色体上にマップしたところ、推定プレフェン酸デヒドラターゼの遺伝子であるとの結果を得た。これは Phe 合成系の酵素であり、代謝プロファイリングの結果とも一致する。しかも、MTR1 変異体の本酵素遺伝子は、微生物においてフィードバック制御に重要なアミノ酸として報告されている領域のアミノ酸置換をもたらす変異が存在した。この遺伝子をイネに導入したところ、MTR1 変異体の持つ3つの特性、すなわち、5MT 抵抗性、Trp と Phe の増加、フェニルプロパノイド化合物の増加が認められたことから、推定プレフェン酸デヒドラターゼ遺伝子が原因遺伝子であることが明らかとなった。しかし、高等植物で本酵素が実際に Phe 合成に機能しているとの報告はない。そこで、無細胞タンパク質合成系を用いて本酵素遺伝子から酵素タンパク質を合成し、その機能を調べたところ、本酵素は基質としてプレフェン酸を利用することもできるが、アロゲン酸をより効率的に基質として利用し Phe を合成することを確認した。この変異体は一遺伝子の変異体でありながら、上述した複数のアミノ酸の増加と二次代謝産物の増加をもたらす。フェニルプロパノイド化合物の増加は Phe 由来と考えられるところから、Trp を蓄積した場合との違いが際だっている。また、この変異体は Phe 合成系酵素の変異を持つにもかかわらず、Trp が同時に蓄積している。現在のところ、これを説明できる機構は全く明らかとなっておらず、未知の代謝ネットワークの存在が示唆される。

シロイヌナズナについては、独自に作製した 12,000 系統以上のアクチベーション・タギングラインを用いて、5MT 抵抗性変異体をスクリーニングした。そのうち、1系統の変異体 (*rmt1*) について詳しく解析した。その結果、この変異体は2つの遺伝子変異を含んでいることが分った。この突然変異体 *rmt1* は Trp の蓄積は示さなかったが、代謝プロファイリングの結果、抗菌性二次代謝産物であるインドールグルコシノレート (IGs) の蓄積が野生型に比べて約20倍であった。IGs 合成系が活

性化されており、5MT がこの合成系に取り込まれる結果、細胞は抵抗性を示すことを明らかにした。これは、これまで知られた 5MT 抵抗性のメカニズムと異なる新しい機作である。

4) 形質転換体の代謝プロファイリング

Trp は多くのインドール化合物の前駆体として重要な位置を占めている。このことは、Trp の蓄積が栄養価を高めるだけでなく、関連二次代謝化合物の生合成ネットワークの変化をもたらす可能性を示している。Trp の蓄積による二次代謝合成系の変動は、これを飼料として利用するときにはマイナスとなるが、新たな化合物の合成を制御する技術の開発につながる可能性をも示している。これらの相反する側面を同時に明らかにするためには、芳香族化合物全体の変動をみる必要がある。このため、Trp を蓄積したイネその他の作物について代謝プロファイリングを行い、多数のピークを統計的に解析して Trp の増加と相関のある化合物を見いだした。その結果、Trp 以外の化合物に大きな変動は認められなかったが、変動する微量なインドール化合物を明らかにした。そのうちの一部の化合物については構造を決定した。また、インドール酢酸 (IAA) の測定法を開発して Trp の蓄積とともに IAA が増加することを見いだした。

OAS1D 遺伝子とともに、蓄積する Trp を下流の二次代謝化合物に流すために Trp 脱炭酸酵素 (TDC)、セコログニン合成酵素 (CrSLS) およびストリクトシジン合成酵素 (CrSTR) 遺伝子を組み合わせ導入した形質転換体を作製し、これらについても代謝プロファイリングを行った。TDC 導入の結果、Trp の蓄積は見られずトリプタミンを蓄積すること、さらに新規のインドールアルカロイドが合成されることなどを見いだした。現在、さらに多くのインドールアルカロイドの生成をめざして形質転換体を作製、解析中である。

形質転換体の代謝プロファイリングは多くの知見をもたらした。現在、これらの成果は国際誌にレビューとしてまとめを依頼されている。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

研究の開始時には、すでに得られていた高 Trp 含量イネを材料として、メタボリックエンジニアリングの可能性を明らかにすることをめざした。そのため、安全性評価試験と代謝プロファイリングを行い、*OAS1D* 遺伝子を選抜マーカー遺伝子として利用する方法、ダイズの形質転換体作製法を確立した。また、*OAS1D* 遺伝子をバレイショやシロイヌナズナに導入した。さらに、2つの AS α サブユニット遺伝子の役割を明らかにするため、2酵素遺伝子の生化学的解析、RNAi 個体の作製を行った。そのため、農研機構の2研究所 (若狭、石本グループ) を中心として形質転換体を作製し、研究材料を提供した。特に、若狭グループは形質転換体の圃場栽培まで行って実用的な観点から評価することができた。宮川グループは安全性の面から代謝プロファイリングを行う体制を組んだ。AS は取り扱いの難しい酵素の一つであるため、戸澤グループが得意な無細胞タンパク質合成系を駆使して AS の生化学的解析と酵素改変に取り組んだ。

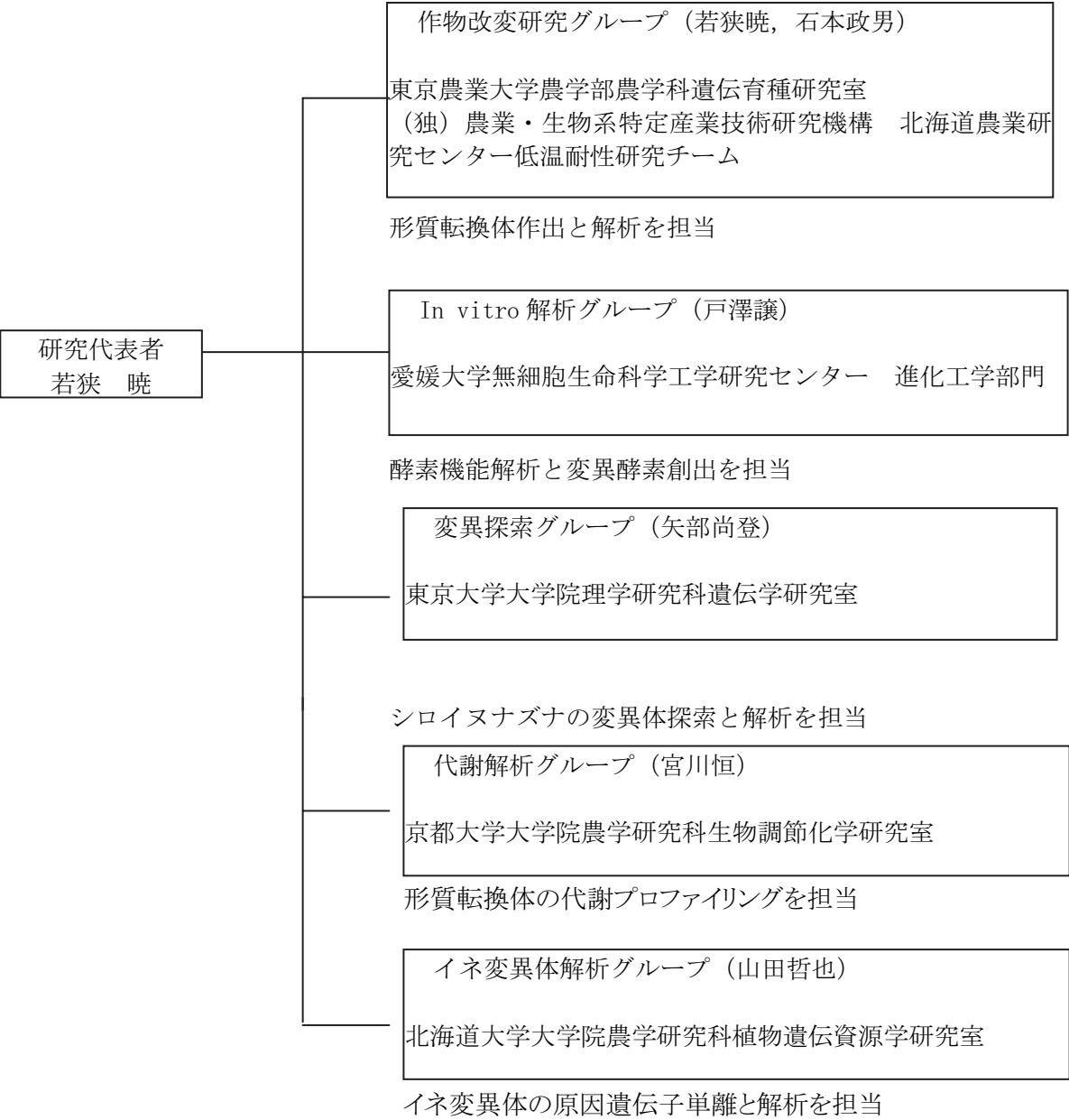
同時に、植物において代謝ネットワークを解析するためには基礎的知見の蓄積しているシロイヌナズナの研究が必要であるため、東京大学グループが新たな変異体の探索に取り組んだ。幸い、イネの代謝系突然変異体として MTR1 を若狭が確立しており、新規の代謝ネットワークの存在が予想されたのでこの解析に取り組んだ。後に、担当者の移動によって山田グループとして原因遺伝子の確定に到った。

後半の目標としては、上記の課題を継続するとともに、新たに、これらを基盤として、Trp を中心とした代謝系を植物の栄養、生長、病虫害防御反応などと関連づけて理解し、制御に結びつけることを意図した。その結果、突然変異体の原因遺伝子と機能をほぼ確定することができた (山田、戸澤、矢部、宮川グループ)。また、二次代謝化合物生産のための新たな形質転換体作製 (若狭、石本グループ)、Trp を蓄積した植物や Trp 合成系の病虫害防御反応における特性解析 (宮川グループ) をめざした。有用な二次代謝化合物の生産はかなり困難なためまだ研究途上であるが、これ以外の課題はほぼ達成できた。現在、後半の課題は論文として投稿準備中である。

いずれの課題もチーム内の全グループがディスカッションに参加し、協力分担しながら取り組ん

だ. 各グループ独自の成果もあるが, 大きなものはすべて複数のグループの成果である. 多様な専門分野の研究者が協力しつつ取り組むことができたことは得るものも多く, 非常に有意義であった.

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

- 3.1 形質転換作物作製と解析による Trp 生合成系の制御と利用法開発
(東京農業大学 若狭暁グループ)
((独) 農業・生物系特定産業技術研究機構 北海道農業研究センター 石本政男グループ)

(1)研究実施内容及び成果

- 1) Trp を蓄積したイネの飼料作物としての評価

OASAIID 遺伝子を導入したイネ2系統のホモ接合体, HW1 および HW5 を育成した. この2系統について閉鎖系温室, 非閉鎖系温室, 隔離圃場における環境への安全性評価試験と, 一般圃場栽培を実施した. これらの試験は2004年度まで研究実施場所のあった (独) 農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所で行った. その過程で, 導入遺伝子の効果を確認するとともに, Trp 蓄積の農業形質に対する影響を調査した. また, 一般圃場栽培により得られた HW1 および HW5 の子実をニワトリに与える飼養試験を行った. 飼料イネとしての評価は同上機構の「融合研究」プロジェクトとしての支援を受け, 成果は同プロジェクトの成果集にも記載されている.

OASAIID 遺伝子による Trp の蓄積は, 試験したすべての年度にわたって安定しており, 全 Trp 含量は対照品種である「日本晴」の2倍程度であった(図1). これは, 実際に飼料用トウモロコシ子実に Trp を添加した場合の 1.6g/kg 種子に相当する 2.4g/kg (HW1), 1.7g/kg (HW5) の Trp 含量となり, 実用的な量として十分である.

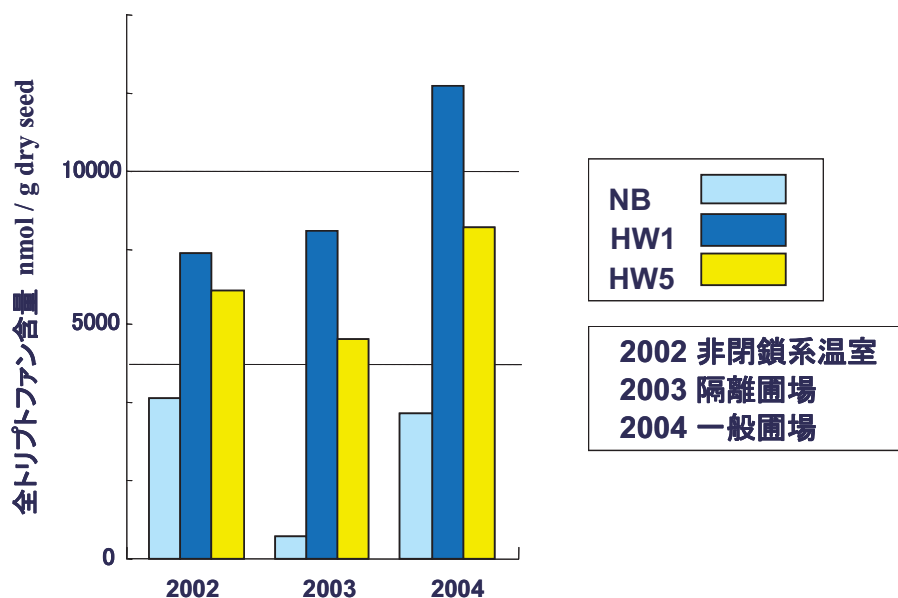


図1 全トリプトファン含量の年次変動

2003年の日本晴(NB)は一般圃場でも低い値となった. 天候の影響が考えられる.

Trp 含量の増加したイネの特性として, 当代の 100 系統余りを調査した結果から種子稔性が低下する傾向が認められた. HW1 および HW5 の当代の種子稔性はともに 50% 以上で, 隔離圃場では「日本晴」よりやや低い傾向を示したが, 温室と一般圃場ではあまり変わらなかった(図2). 特に HW5 は「日本晴」と同程度であった. 形態的には, 稈長で差が見られたが栽培条件で異なり一定の傾向はなかったことから, 栽培条件により変動すると考えられる. 種子生産に影響する1穂当たりの穎花数は HW 系統で有意に少なく, HW1 で「日本晴」の 59%, HW5 で 70% であった. また, 隔離圃場で栽培した HW 系統の種子の発芽率は「日本晴」より低下し, 発芽日数も遅れたが, 温室栽培あるいは一般圃場栽培した個体から収穫した場合は大きな差を示さなかった. この点でも栽培条件の影響があると考えられる. 結論として, HW 系統は安定した Trp 含量の増加を示し, 上記の点以外は「日本晴」と差が無く, 特に HW5 は「日本晴」とほぼ同じ特性を示すことが明らかとなった.

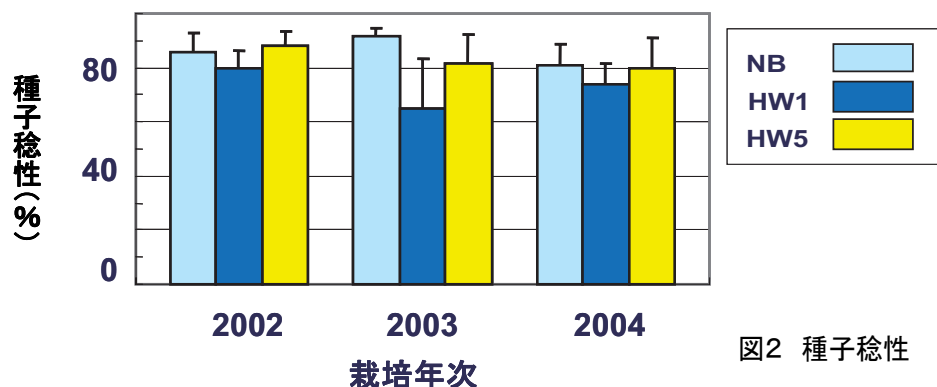


図2 種子稔性

畜産草地研究所の協力を得て、一般圃場栽培したHW系統子実を用いてニワトリ雛に対する飼養試験を行った結果、対照区の「日本晴」区に比べて有意な飼養効果が認められた。さらに、北興化学工業(株)の協力を得て行った予備的な毒性試験の結果、マウスに両系統の玄米粉末を21日間投与した場合も、対照区の「日本晴」に比べて有意な差はなく、毒性は認められなかった。

これらのことから、この改変遺伝子による Trp を蓄積したイネは家畜の飼料として有効であると結論した。

2) 緑葉特異的発現プロモーターの利用

HW 系統に見られた稔性、発芽特性の低下は用いたプロモーターの影響による可能性がある。ここではトウモロコシのユビキチンプロモーターを使用しており、これはストレス反応性のあることが報告されている。そこで、Trp を葉で効率的に合成し転流により種子の Trp 含量を高めることで種子稔性への影響を回避することを試みた。そのため、緑葉特異的に発現するプロモーターを農業生物資源研究所と協力して単離した。Rubisco activase は緑葉で強く発現する。このプロモーター領域約2kbを単離しGUS 遺伝子につないでイネに導入し発現を確認したところ、形質転換体の葉身、葉鞘、葯、花粉で強い発現が認められた。種子では、外穎、内穎、果皮などで発現が認められたが、胚乳や胚組織では発現が認められないか、微弱であった。このような特性を持つ RbcAc プロモーターを *OASA1D* 遺伝子につないで形質転換体を作製し、種子の Trp 含量を測定した。その結果、図3に示すように効率的な Trp の蓄積が確認できた。これらの系統の種子稔性は正常であった。

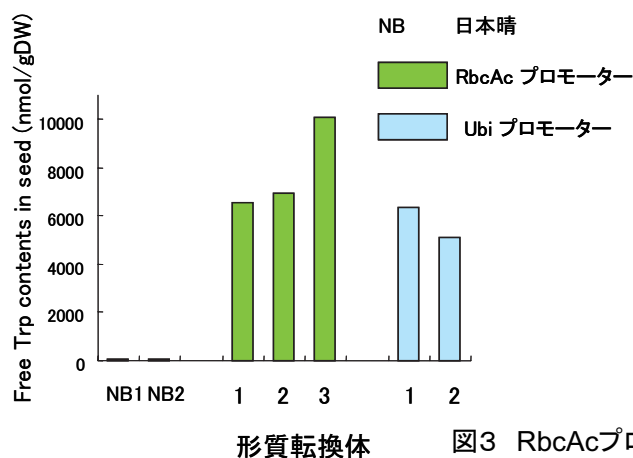


図3 RbcAcプロモーターによる*OASA1D*遺伝子を過剰発現したイネ種子のTrp蓄積

3) *OASA1D* 遺伝子の選抜マーカー遺伝子としての利用

改変型酵素 *OASA1D* は Trp によるフィードバック阻害に感受性が低下しているため、Trp アナログである 5-メチル Trp (5MT) に対しても感受性が低下し、抵抗性を示す。この特性を形質転換体細胞の選抜マーカーとして利用するために、イネ、バレイショ、シロイヌナズナ (後述) を用いて条件を検討した。その結果、イネはアグロバクテリウム法により *OASA1D* 遺伝子を導入した後、5MT0.3mM を用いて効率的に形質転換カルスを選抜し、そこから植物体を再分化させることができた。この効率は通常用いられるハイグロマイシンとハイグロマイシン抵抗性遺伝子の系とほぼ同等の効率であった。また、バレイショは、試験管内で培養した植物の茎切片にアグロバクテリウム法で *OASA1D* 遺伝子を導入し、5MT0.1mM で選抜することにより効率的に形質転換植物を得ることができた。この効率は通常用いられるカナマイシンとカナマイシン抵抗性遺伝子の系と同等の効率である。イネカルス選抜の様子を図4に示す。

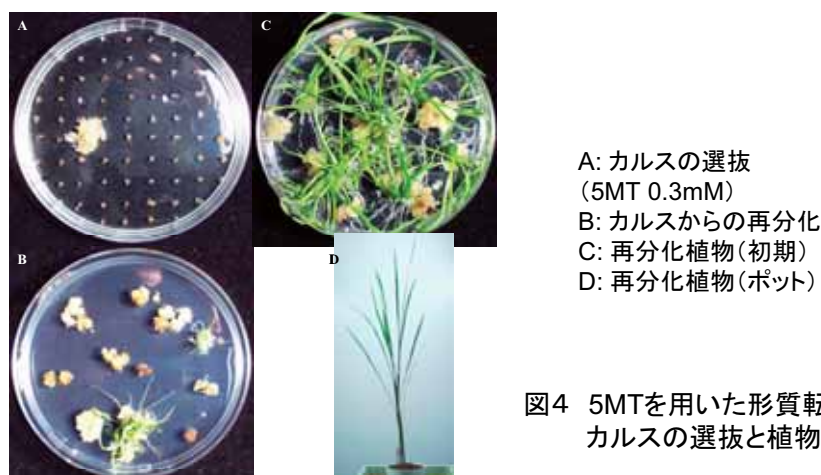
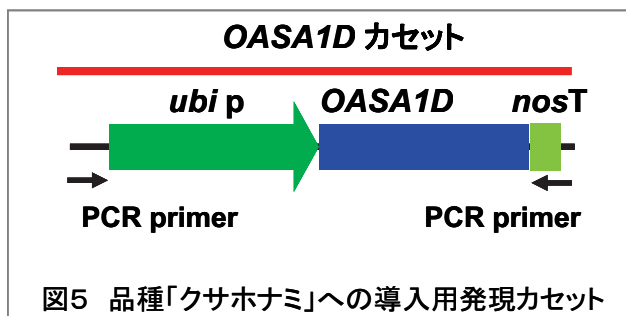


図4 5MTを用いた形質転換イネ
カルスの選抜と植物体再分化

4) 実用的イネ品種をめざした形質転換体作製

以上の結果から、*OASA1D* 遺伝子の導入により形質転換体の実用的な利用で常に問題となる選抜マーカー遺伝子を持たない高 Trp イネが作製できることが明らかとなったので、飼料イネ品種「クサホナミ」を用いて実用的な飼料イネ開発をめざした。選抜マーカーを持たない新たなベクターを構築して、図5に示す発現カセットのみを PCR により増幅、これを



直接遺伝子導入法により「クサホナミ」に導入した。選抜は5MT濃度をさらに低くした 0.15mM で行った。その結果、選抜マーカー遺伝子とプラスミドの骨格配列を持たず、導入遺伝子が 1 あるいは 2 コピーである形質転換体を多数作製できたので、稔性が高く Trp 含量の増加した系統を選び、特定網室での安全性評価を実施した。これらのイネ種子における

Trp 含量もこれまでの系統と同様に増加していた(表1)。

表1 葉と種子における遊離Trp含量

系統	葉の遊離Trp含量 (nmol/gFW)	種子の遊離Trp含量(nmol/seed)
KPD627 7-2*	2471.8 (×23)	9651.7 (×98)
KPD627 8-2*	2926.28 (×28)	14943.3 (×151.4)
KPD722 4-1	184.73 (×1.7)	7715.1 (×78.2)
クサホナミ	106.1 (×1)	98.7 (×1)

ウィスカー法で導入.

*は1あるいは2コピーの導入遺伝子を持つ系統.

5) マメ科作物における Trp 含量の増加

マメ科作物の種子は穀類と異なり、種子自体の Trp は不足していない。しかし、一般的にマメ科作物種子はイネ科作物種子と併用することにより栄養成分を高めている。また、マメ科作物は、化成肥料に大きく依存することなく空中窒素固定によりアミノ酸の生産が可能であること、種子の主成分はタンパク質であることなど、イネ科作物にない特徴を備えている。そこで、マメ科作物へ *OAS1D* を導入し、効果を確認するとともにイネと異なる影響の有無を調査した。

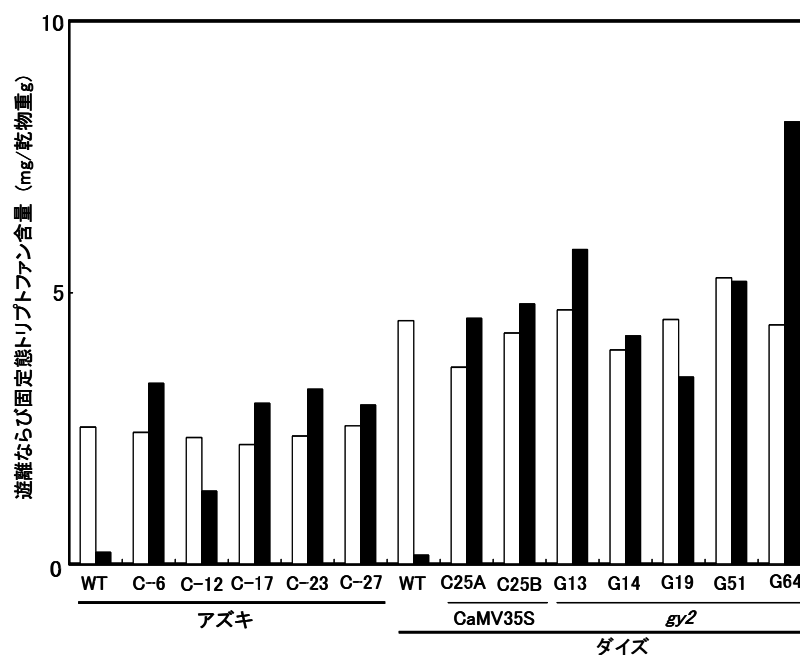


図6 *OAS1D* の導入による種子トリプトファン含量の増加

組換え体の固定系統ならびに非組換え体から得られた種子の遊離ならびに固定態トリプトファン含量を測定した。遊離トリプトファン含量を黒抜きの棒で、固定トリプトファン含量を白抜きの棒で示した。測定は3反復で行った。

マメ科作物、特にダイズの形質転換は効率が低いことから、まず、形質転換法の改良に取り組んだ。その結果、遺伝子銃法によって高い再現性で形質転換ダイズを作出する系を確立した。また、アズキについてはアグロバクテリウム法により効率的に形質転換体を得る系を確立した。これらの手法を用いて、ダイズとアズキへ *OAS1D* を導入し、特性を解析し

た. その結果, ダイズ, アズキとも種子中の遊離 Trp 含量が約 10~50 倍に増加し, 総 Trp 含量は非形質転換体の約 2 倍に達した(図6). アズキに比べてタンパク質含量が高いダイズの方が総 Trp 含量は高く, 乾物重の1%以上に及んだ. しかし, ダイズ, アズキとも固定態 Trp 含量は有意に変化することはない(図7), 他の遊離アミノ酸量もほとんど変化しなかった. また, 形質転換ダイズの種子について, LC-MS 等を用いた機器分析によりプロファイリングを行ったが, Trp を除く芳香族化合物に大きな変動はみとめられなかった(後述). これら *OASA1D* を導入した形質転換体は正常に生長し, 結実した. イネの場合と異なり種子稔性に問題はないようである. イネの場合と同様に, 形質転換体は 300 μ M の 5MT を含む培地上でも正常に発芽し, 生長した. *OASA1D* の導入により 5MT に対する感受性が低下したアントラニル酸合成酵素が発現し, 高濃度の 5MT によっても阻害されことなく Trp が生産されたためと推定される. したがって, イネやシロイヌナズナと同様に, ダイズにおいても *OASA1D* は選抜マーカー遺伝子として利用できる可能性が高い.

次に, 突然変異体である高遊離アミノ酸ダイズ系統への導入を図った. これらの変異系統は貯蔵タンパク質を欠失しており, 余剰となった窒素成分をアルギニン, アスパラギンやグルタミン酸などの遊離アミノ酸として蓄積している. したがって, 余剰窒素成分を Trp の合成へ向けることを目的とした. ダイズの遺伝子組換え効率は品種に依存するので, 遺伝子組換えに適した品種 Jack を戻し交配親として, 高遊離アミノ酸でかつ遺伝子組換えに適した系統 JQ1 と JQ6 を作出して, 遺伝子を導入した. *OASA1D* の発現を種子タンパク質グリニシン遺伝子 (*gy2*) のプロモーターにより制御した結果, 導入 JQ 系統では遊離 Trp が増加したが, その増加程度は正常品種 (Jack) へ導入した場合と同程度であった(図8). アルギニン, アスパラギンやグルタミン酸などの合成と Trp の合成は異なる制御を受けているものと思われる.

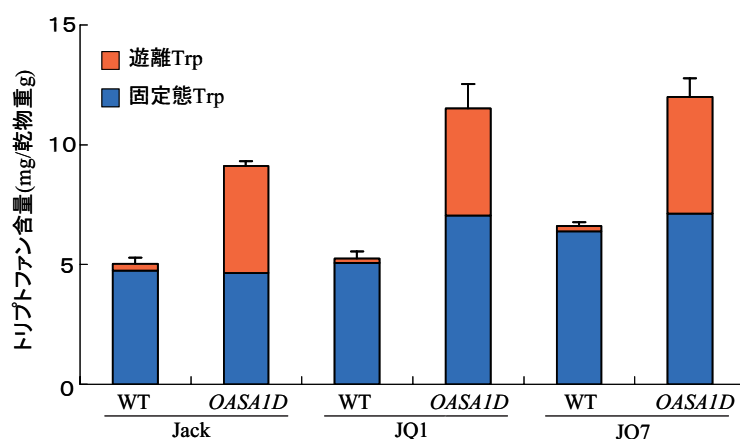


図7 *OASA1D*により蓄積する遊離および固定態トリプトファン

ここに示したイネ, アズキ, ダイズ以外にバレイショ, シロイヌナズナにも *OASA1D* 遺伝子を導入して解析した. 結果は 3-3 および 3-4 で示す.

OASA1D 以外に, 3-2 で述べる新たなアントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子 *OASA2* の改変型酵素遺伝子各種をイネに導入して形質転換体を育成した. カルスにおける Trp の蓄積については 3-2 で述べる. 現在, 種子の解析を行っている. 改変型のうち Trp によるフィードバック阻害に最も感受性が低く酵素活性も高い改変型 *OASA2SL* 遺伝子をトウモロコシに導入した. 予備的に測定したトウモロコシカルの遊離 Trp 含量はイネに導入した場合ほど高くないものの *OASA1D* を導入した場合より高かった. 今後, カルスの培養条件などの至適化を図り, 蓄積の効果を確認する. 最終的には形質転換体の種子での確認を行う.

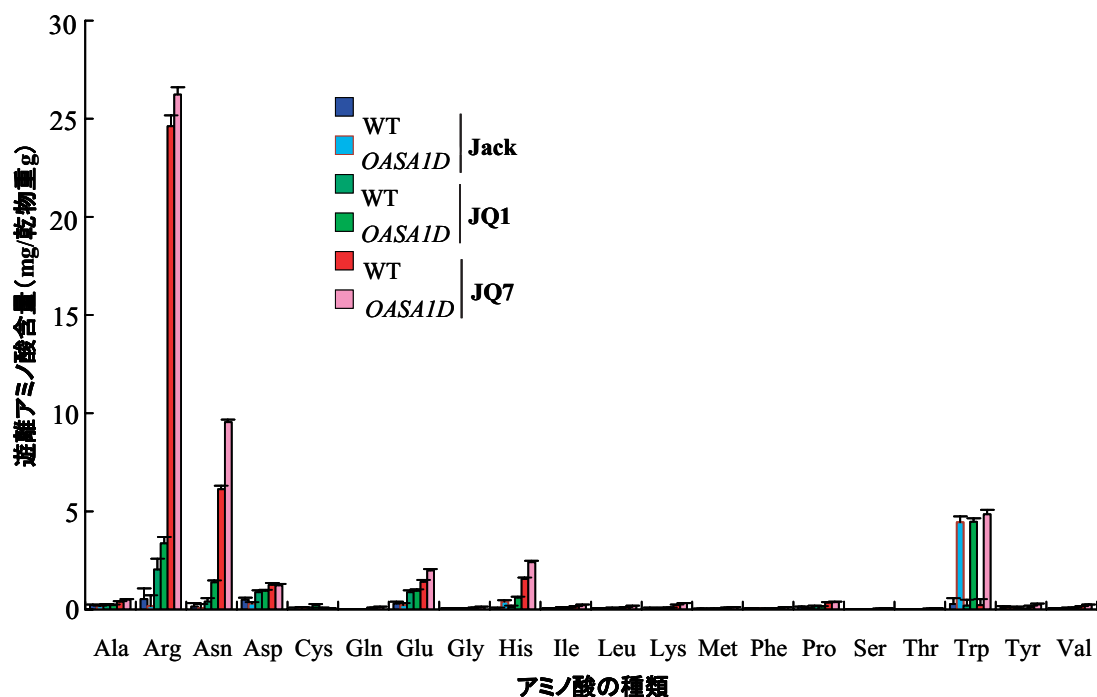


図8 *OAS1D*を導入した高遊離アミノ酸突然変異ダイズにおけるアミノ酸の変化

6) RNAi 法による AS の発現抑制

2つのアントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子の役割を明らかにするために、RNAi 法を用いて、*OASA1* および *OASA2* のそれぞれと両遺伝子の発現を抑制したイネを作製した。pHG8 を改変し、イネ用にハイグロマイシン抵抗性遺伝子を導入した。各遺伝子の3'側非翻訳領域を用いた場合、2つの遺伝子をそれぞれ発現抑制したカルスが得られ(図9)、再分化した植物体は正常に生長した。*OASA1* のコード領域を用いて2つの遺伝子を同時

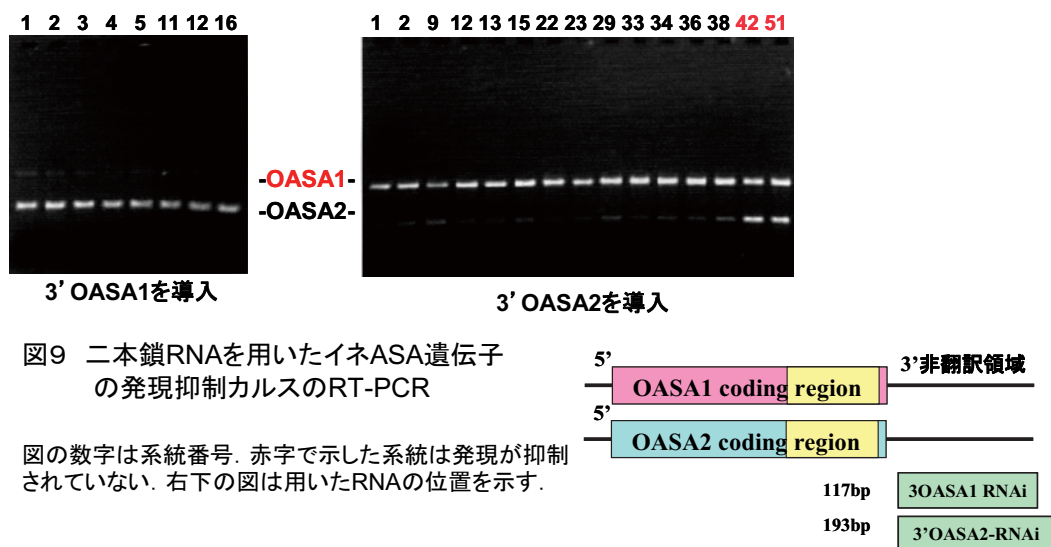


図9 二本鎖RNAを用いたイネASA遺伝子の発現抑制カルスのRT-PCR

図の数字は系統番号。赤字で示した系統は発現が抑制されていない。右下の図は用いたRNAの位置を示す。

に抑制することを図ったが、多くの系統で不完全な抑制が認められた。しかし、得られた植物体はTrp 要求性であった。このことは、抑制が不完全な場合、微量のTrp が合成され、その量はカルスの生育には十分であるが、植物体の生育には十分でないと考えられた。

OASA1 および *OASA2* のそれぞれを抑制したイネの生育は正常であったので、現在、病原菌に対する反応の違いを解析している。これによって、2つの遺伝子の防御反応における役割分担の有無が明らかになると考えられる。

7) 新たな二次代謝産物生成の制御

OAS1D 遺伝子による Trp の蓄積はこれまでになく安定して高度であることは、これを導入したすべての植物で確認された。この Trp を二次代謝化合物生成に振り向けることを目的に、Trp 合成の下流の酵素遺伝子を単離し、合わせて導入した。これまでに、Trp 脱炭酸酵素 (TDC) 遺伝子をイネより、セコログニン合成酵素 (CrSLS) およびストリクトシジン合成酵素 (CrSTR) の遺伝子をニチニチソウよりクローニングし、*OAS1D* 遺伝子とともにイネに導入した。TDC 遺伝子を導入したカルス、植物体はトリプタミンを蓄積して Trp の蓄積はみられない。また、Trp を蓄積した場合と違ってさらに下流のインドールアルカロイドを合成していた (3-4 参照)。この結果と Trp を蓄積する HW 系統のマイクロアレイの結果から、イネにおいて TDC 活性は強く制限されていることが示唆された。Trp が高濃度に蓄積するにもかかわらず、他の芳香族化合物が合成されない原因の一つと考えられる。TDC に加えて *CrSLS* および *CrSTR* を導入することで有用なテルペンインドールアルカロイドへの合成が可能になるかは大きな課題である。現在、これらを導入したカルスの解析を行っている。

8) まとめ

必須アミノ酸の増加を図る研究はリジンとメチオニンで報告がある。特にリジンの研究は進んでおり、すでに日本でもモンサント社の高リジントウモロコシの圃場試験が行われている。しかし、Trp については、作物での蓄積、種子での蓄積を確認した報告は本研究が初めてである。*OAS1D* に続いて作製した *OASA2* の改変型についてはさらに高濃度で Trp 蓄積が図れる可能性があり、すでにトウモロコシカルスで蓄積を確認した。今後、研究を継続して種子での蓄積を確認し、実用化をめざす。

(2)研究成果の今後期待される効果

遺伝子操作による必須アミノ酸の合成系の改変や貯蔵タンパク質の組成改変は、リジンやメチオニンなどを中心にこれまでも行われてきたが、実用的な品種の開発には到っていない。リジンの場合も種子稔性の低下などの問題が報告されているが、プロモーターの開発により実用的品種の開発に成功しつつある。*OAS1D* による Trp 生合成系の増強は総 Trp 含量の増加を実現した。形質転換体の特性も対照品種と大きく変わることはなく、サイズでも正常な生長が観察されている。3-4 で詳細に述べるように Trp 以外の二次代謝産物もほとんど変動しないことから、極めて安定した技術であることが確認された。今後、トウモロコシやオオムギなど世界的な飼料用作物における開発が期待できる。すでに、海外の技術移転企業から、本遺伝子による Trp の蓄積と選抜マーカーとしての利用に関して受託希望が提示されている。

3. 2 無細胞合成系を利用した遺伝子改変と in vitro 解析 (愛媛大学 戸澤譲グループ)

(1)研究実施内容及び成果

In vitro 解析グループは、イネに近縁であるコムギの胚芽抽出液を用いた試験管内タンパク質合成技術の技術開発に早期より取り組んできたことから、この新規技術を応用したタンパク質工学技術の開発も進め、イネの芳香族アミノ酸生合成経路に関与する鍵酵素の機能解析および機能改変を進めた。

Trp 含有量の増加技術については、既に *OAS1D* 変異酵素遺伝子の利用により可能となっている。しかしながら、イネにおけるアントラニル酸合成酵素 α サブユニットの主要アイソザイムは *OASA1* ではなく *OASA2* であることが確認されている。一次代謝系と二次代謝系のそれぞれに *OASA1* と *OASA2* が機能分担を果たしているのか、もしそうであるとすれば、

どちらが主要な二次代謝系に機能するのか、などの疑問を明らかにすることと、主要アイソザイムである OASA2 自体を改変して有用酵素を創出することを当初の目的として研究を開始した。

1) 試験管内酵素機能解析系の確立とアントラニル酸合成酵素改変

イネの Trp 生合成経路において律速となるアントラニル酸合成酵素は α および β サブユニットから成る。第一段階として、これらをコードするオーソログ遺伝子の機能解析を試験管内で行う酵素機能解析系を確立した。そのアウトラインを図10に示す。

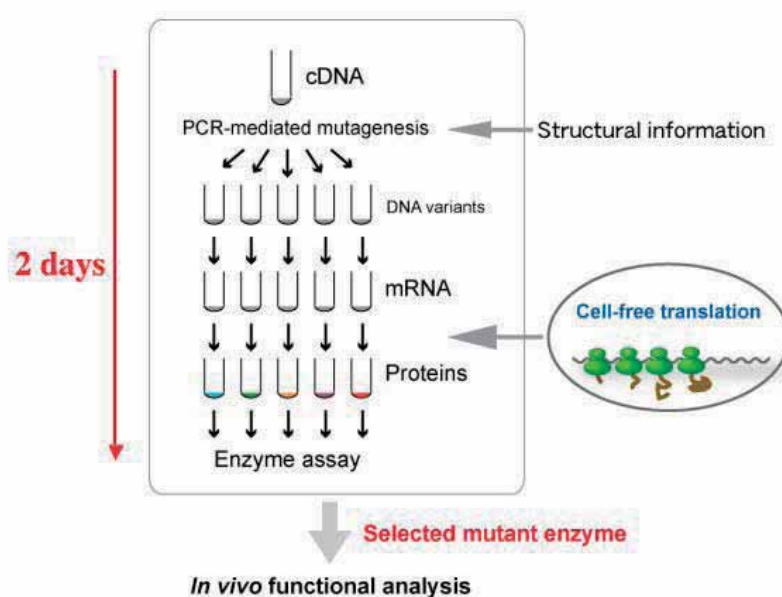


図10 酵素タンパク質の試験管内機能改変システムアウトライン

この系を用いて、アントラニル酸合成酵素 α および β サブユニットをコードするオーソログ遺伝子の機能解析を行ったところ、イネに見出した α サブユニット遺伝子2種 (OASA1 および OASA2) のうち、植物体で発現量の高い OASA2 は Trp に対し高い感受性を示し、 β サブユニット2種 (OASB1 および OASB2) のうち、発現の高い OASB1 とサブユニット構造を取って主要酵素として機能すると予想される結果を得た。

次いで、この OASA2/OASB1 型のアントラニル酸合成酵素の Trp によるフィードバック阻害機構を解除する新たな機能改変型のアントラニル酸合成酵素の創出を進めた。これまで OASA1 をもとにした改変型酵素を用いてきたが、これとは異なる酵素学的特性を持つ OASA2 の改変により、Trp 含量のより効率的な向上をめざすとともに、OASA1D とは異なる植物代謝系への影響を明らかにすることを目的とした。この技術開発に際し、PCR 法によるアミノ酸置換型点変異導入行程から変異タンパク質合成行程までを、全て試験管内において遂行可能なシステムの構築に成功した(図11)。

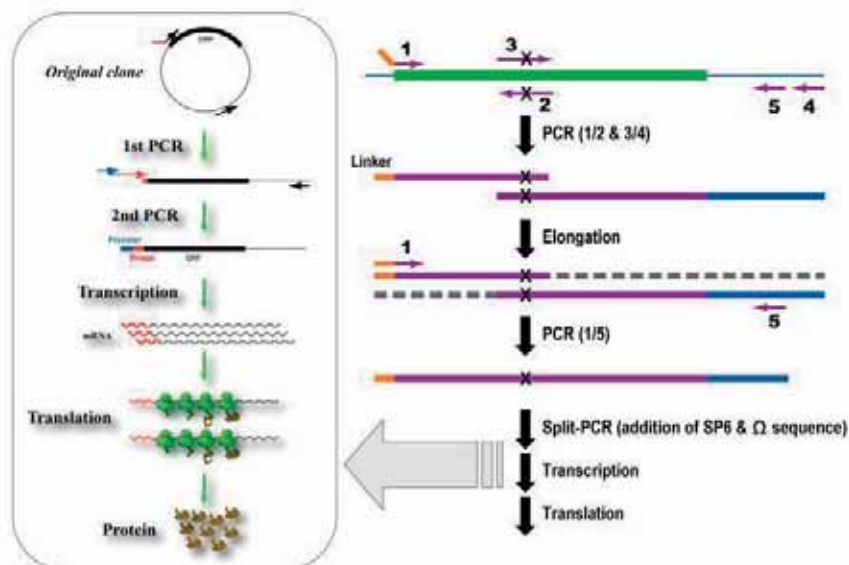


図11 試験管内でのタンパク質への変異導入からタンパク質合成

このシステムを利用してアントラニル酸合成酵素のフィードバックドメインを有する α サブユニットの機能改変を進めるため、立体構造から Trp と相互作用すると予測された合計27個のアミノ酸置換を行った(図12)。その結果、Trp によるフィードバック阻害の解除された変異型は5個得られたが、OASA1 の場合と異なり、これらの変異酵素の活性はいずれも低かった(図13の赤矢印)。しかし、フィードバック阻害の程度は野生型と同じであるが触媒活性自体が倍加した改変型変異酵素が6個得られた(図13の水色矢印)。

そこで、これら2種類のカテゴリーに分かれる機能変異、すなわち Trp 抵抗性変異および活性亢進型変異を生ずる変異アミノ酸をそれぞれ組み合わせた改変型酵素について活性を解析したところ、加算的にそれぞれの性質を一つの酵素に与えることに成功した(図14)。とりわけ、530 番目の残基がロイシンからアスパラギン酸に置換される事により、Trp 抵抗性変異酵素の活性が顕著に向上することが確認された。

ここまでの変異酵素のスクリーニングは、全てアントラニル酸合成酵素 α サブユニット単量体を用いたアッセイ系によりアンモニウムイオン存在下で行なわれたが、実際には細胞中酵素は β サブユニットと4量体を形成しグルタミンをアミノ供与体として利用する。従って、得られた機能改良型 OASA2 タンパク質の再構成酵素系における機能を確認するために、 β サブユニット OASB1 タンパク質と組合せたカイネティクス解析を行なった。図15に示すように、変異 OASA2 タンパク質は再構成酵素においても酵素活性の亢進と Trp 非感受性を維持していることが確認できた。特に S126F/L530D 変異 OASA2SL タンパク質は、従来報告されたどの変異酵素よりも高い Trp 抵抗性(非感受性)を示すことが明らかになった。

試験管内反応のみでスクリーニングしたこれらの複数アミノ酸を置換した改変型酵素遺伝子の機能を実際に植物細胞で確認するため、アグロバクテリア法を用いて、新規変異遺伝子をイネとトウモロコシに導入したところ、S126F/L530D 変異 OASA2 タンパク質を発現させたイネで400倍以上(図16)、トウモロコシでも30倍以上の遊離 Trp 蓄積を達成できた。これらの成果は特許2件(国際特許1件含む)と論文3報として報告した。

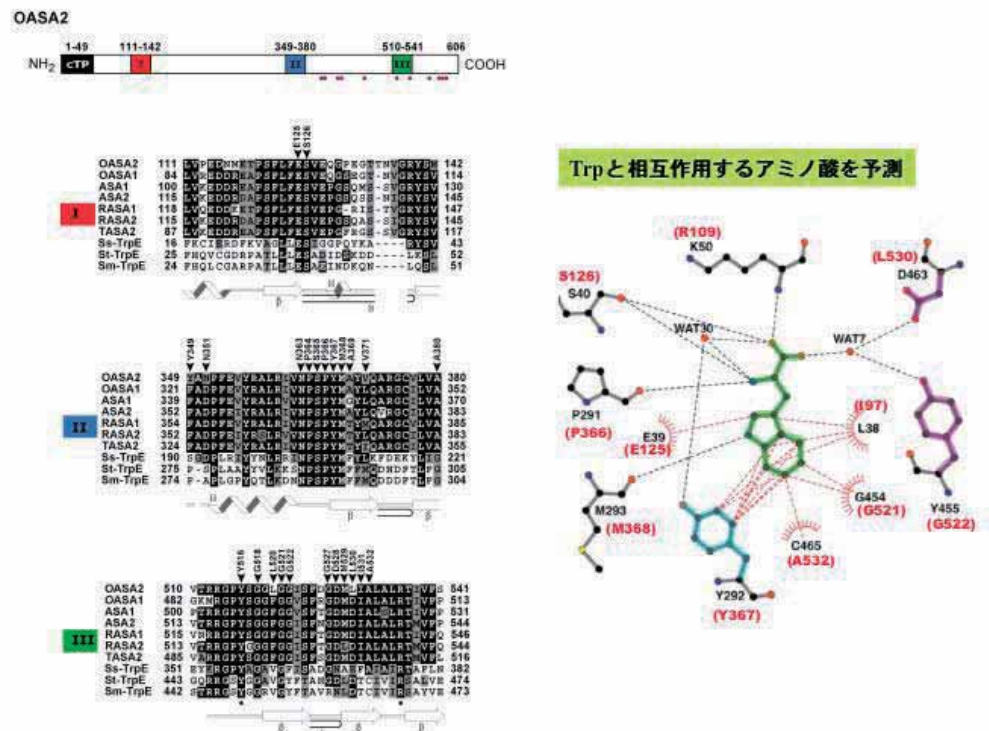


図12 OASA2とホモログタンパク質との配列比較に基づく変異アミノ酸部位の選別

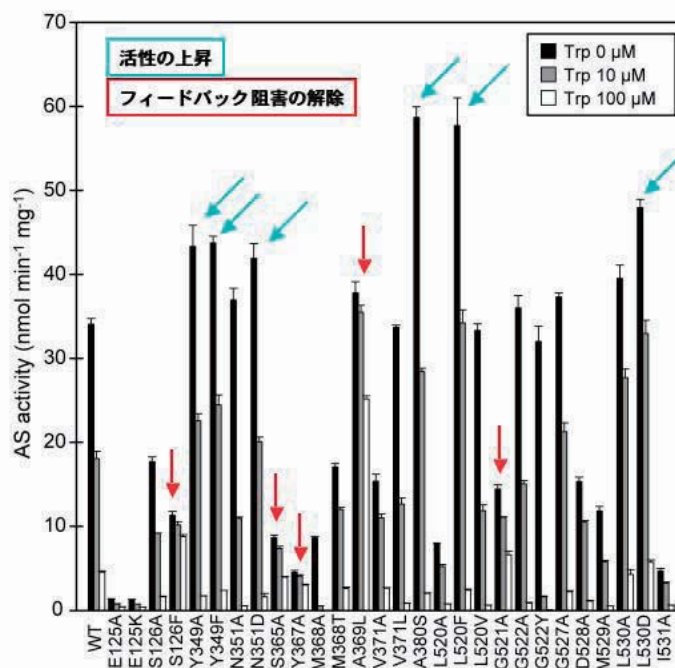


図13 変異酵素タンパク質の機能アッセイ



L530D 変異が効果的に Trp非感受性 酵素の活性を向上させることを確認

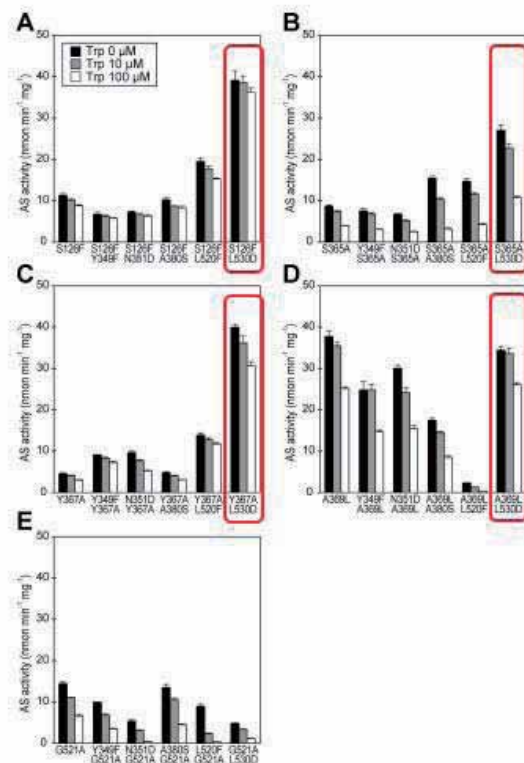


図14 異なる性質の変異の網羅的組合せ解析

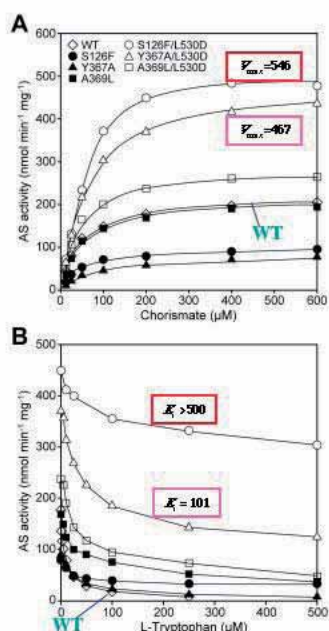


Table Kinetic parameters of Gln-dependent AS activity of the wild-type and mutants of OASA2, reconstituted with OASB1.

OASA2 derivatives	K_m (μ M)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	IC_{50} (μ M)
Wt	43 ± 3	215 ± 5	13.5	6.3
S126F	49 ± 3	103 ± 1	6.5	93.3
Y367A	76 ± 7	84 ± 3	8.5	31.6
A369L	43 ± 4	206 ± 7	13	74.9
S126F/L530D	62 ± 5	546 ± 12	34.4	>500
Y367A/L530D	58 ± 7	467 ± 22	29.4	101
A369L/L530D	39 ± 4	385 ± 15	24.3	58.3

変異型OASA2と β サブユニットOASB1を再構成してカネティクス解析を行った結果、再構成型酵素においても、 α サブユニット単独の場合同様に、倍以上の活性 (V) と高いTrp非感受性 (IC_{50}) が確認された。

図15 サブユニット再構成酵素のカネティクス解析

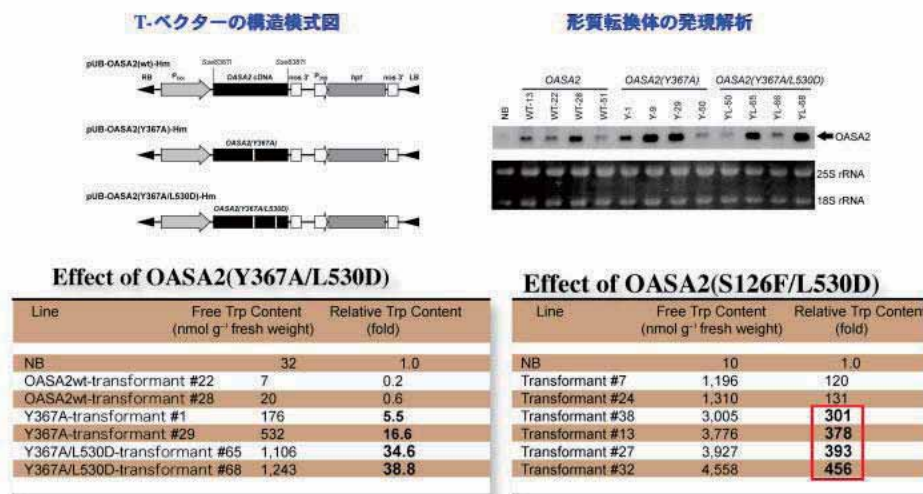


図16 形質転換イネカルス中のトリプトファン含量の変化

2) イネ変異体酵素の機能解析

作物研グループと北海道大学グループにより同定単離された5-メチル Trp (5MT) 抵抗性イネ変異体遺伝子は、これまでに報告のほとんどない Phe 合成系酵素で、これが変異の原因であることが明らかとなった。この遺伝子のイネゲノムにおけるアノテーションは高等植物では機能することが報告されていないプレフェン酸デヒドラターゼ遺伝子であるところから、先の項で述べたシステムを用いて、変異遺伝子より酵素タンパク質を合成しその機能を解析した。

変異遺伝子は、Trp 生合成経路と共通の生合成経路であるシキミ酸経路より分岐する Phe 生合成を制御する酵素、プレフェン酸デヒドラターゼと同定された。この原因遺伝子 (*OsPDTH1*, *Oryza sativa* prephenate dehydratase homolog 1) は他の生物のプレフェン酸デヒドラターゼに類似する葉緑体移行型タンパク質をコードしていたことから(図17)、葉緑体局在性ならびにプレフェン酸デヒドラターゼ活性について解析を行なった。

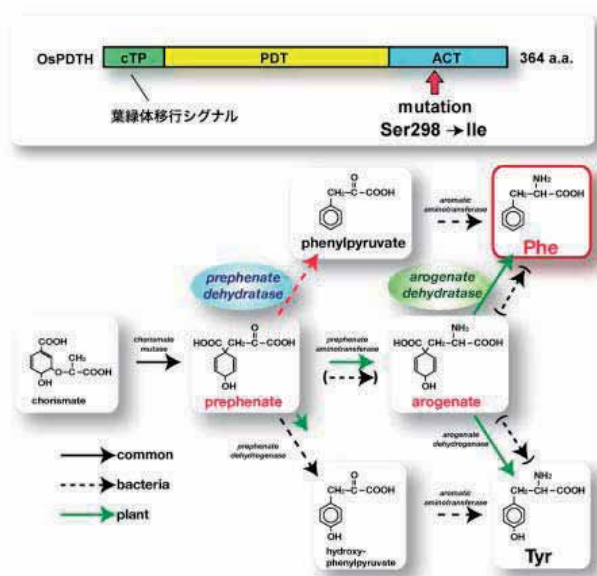


図17 OsPDTH1 の一次構造模式図と予想されている植物の Phe 生合成経路

まず、無細胞系で合成した ^{35}S -メチオニン/システイン標識した前駆体タンパク質を単離したエンドウマメの葉緑体と試験管内でインキュベートしたところ、図18に示すようにシグナル配列を利用した葉緑体移行が確認できた。このことから、変異酵素は他のプレフェン酸デヒドラターゼ遺伝子と同様に葉緑体で機能することが予測できる。

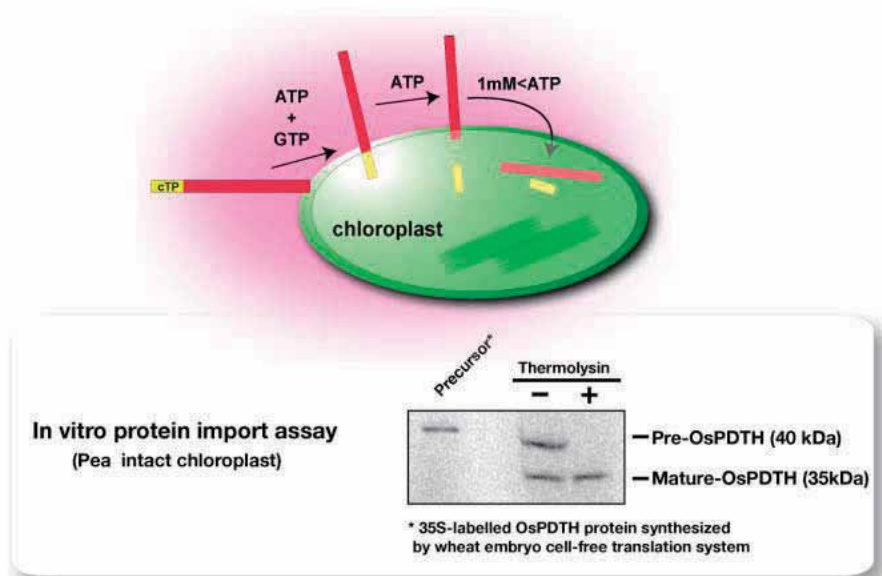


図18 OsPDTH1 タンパク質の葉緑体移行

続いて、変異酵素のプレフェン酸デヒドラターゼ活性を調べた。OsPDT1 タンパク質は、葉緑体移行実験により予想されたシグナルペプチドを除去し、この成熟領域タンパク質のカルボキシ末端にヒスチジンタグを付加したタンパク質を無細胞翻訳系にて合成し、これをコバルトカラムで精製した(図19)。酵素解析はこの精製タンパク質を用いて行なった。

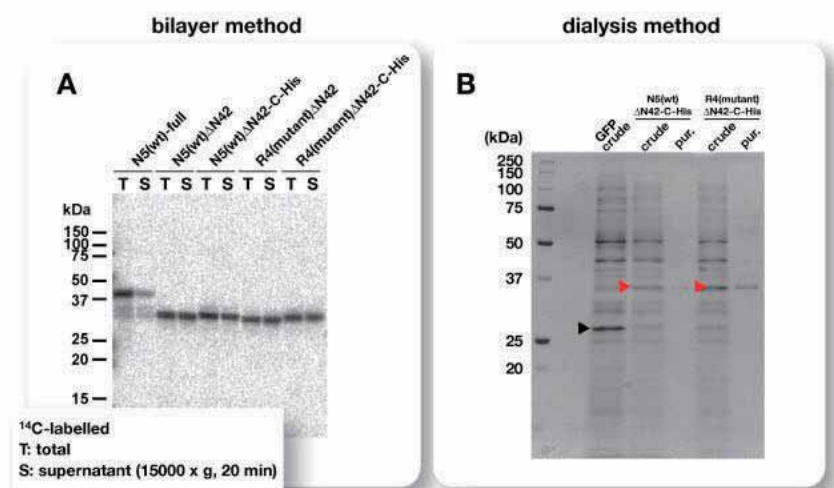


図19 無細胞翻訳系による OsPDT1 タンパク質合成と精製

その結果、野生型の OsPDTH1, 変異型 OsPDTH1 とともに、プレフェン酸デヒドラターゼ活性を有し、野生型酵素で確認された Phe によるフィードバック阻害が変異型では消失していることを確認できた(図20)。

しかし、現在まで、植物における Phe 生合成系路にはプレフェン酸デヒドラターゼではなくアロゲン酸デヒドラターゼが主な経路を成すと考えられている(図17)。そのため、変異酵素のアロゲン酸デヒドラターゼ活性を確認することとした。そのためには、反応基質をプレフェン酸からアロゲン酸に変更して酵素活性解析を進める必要があるが、アロゲン酸は市販されていない。そこで、まず、赤パンカビ(*Neurospora crassa*)の生育菌糸より文献に従ってアロゲン酸を精製した。これを用いて酵素反応を解析した結果、本酵素は、基質としてアロゲン酸に対する親和性がプレフェン酸に対する値の約14倍であることが明らかとなった。これにより、本酵素が植物で今まで知られていなかった Phe 生合成の最終行程に機能する酵素、アロゲン酸デヒドラターゼであることを確定できた(図21, 表2)。これらの結果は、従来の生化学的研究報告と矛盾せず、配列比較上ではバクテリアのプレフェン酸デヒドラターゼに類似しているイネの OsPDTH1 は、アロゲン酸を主要な基質とするアロゲン酸デヒドラターゼそのものであることを示している。本研究結果は、世界で初めてアロゲン酸デヒドラターゼをタンパク質レベルで同定した研究となった。

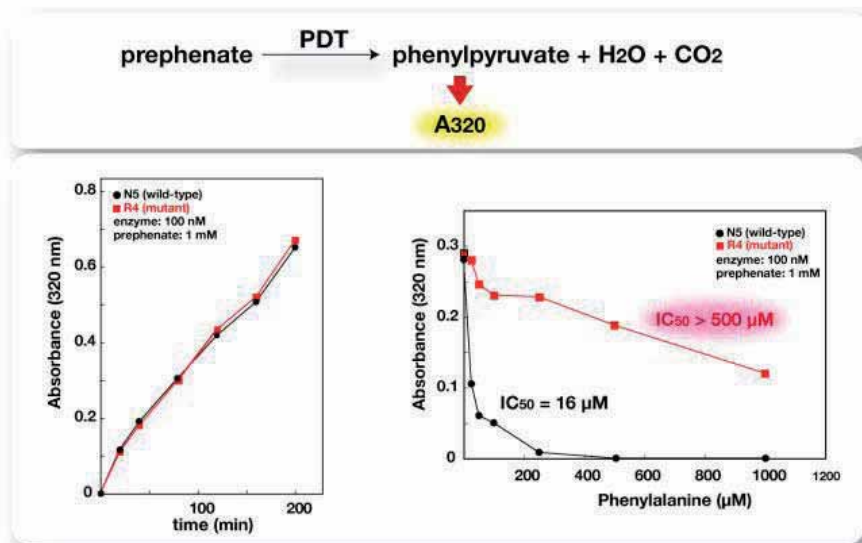


図20 OsPDTH1 のプレフェン酸デヒドラターゼ活性

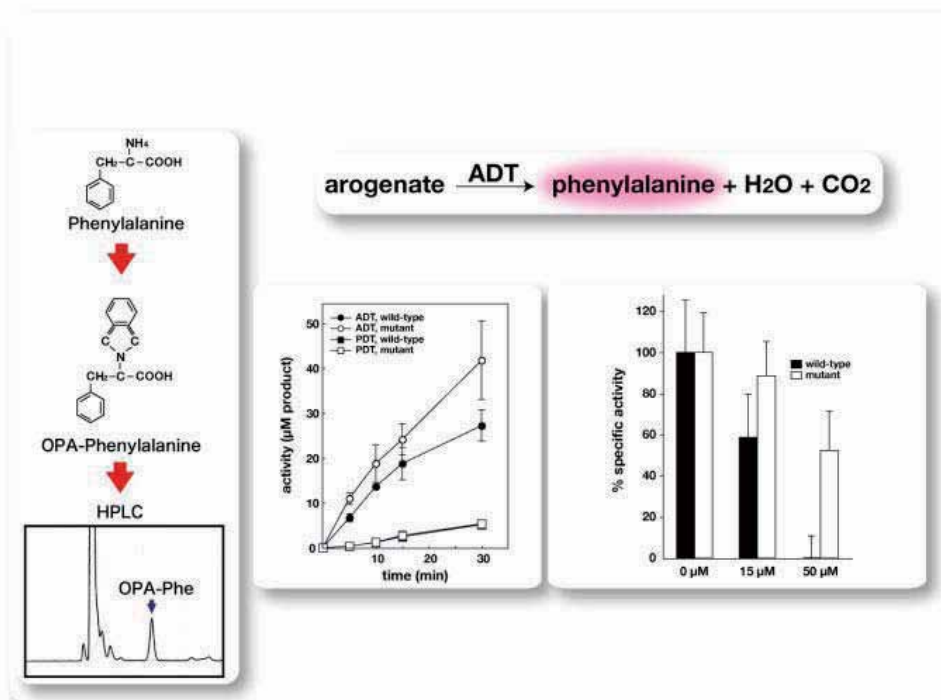


図21 OsPDTH1 のアロゲン酸デヒドラターゼ活性

表2 OsPDTH1の基質特異性比較

enzyme	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_i (μM)
wild-type	0.16	5.29	363	1.36×10^8	7.36
mutant (S298I)	0.12	5.99	411	2.06×10^8	61.5

Kinetic parameters of prephenate dehydratase activity					
enzyme	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	IC_{50} (μM)
wild-type	2.2	8.9	610	1.67×10^7	16
mutant (S298I)	4.2	13.5	933	1.33×10^7	>500

(2)研究成果の今後期待される効果

無細胞タンパク質合成技術を利用して創出することに成功した Trp に非感受性のアントラニル酸合成酵素遺伝子は、イネのみならず様々な作物中の遊離 Trp 含有量を向上させる分子育種技術に応用できるとともに、アントラニル酸を前駆体とする他の芳香族二次代謝化合物の生産制御にも幅広く利用することが可能である。また、一連の仕事により、無細胞系を利用して全行程を完全に試験管内で遂行できるタンパク質工学技術を確立でき(図22)、将来的に、他の様々な酵素タンパク質の機能改変についても広く応用可能な基盤技術として利用できるようになった。

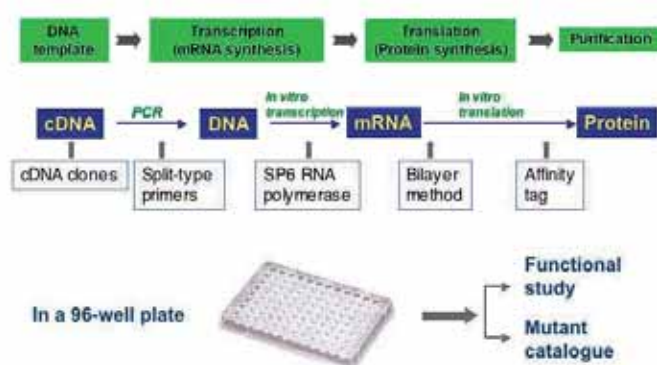


図22 無細胞翻訳系を利用した試験管内タンパク質解析システム

3.3 Trp 合成系の代謝制御に関わる新規因子の単離と機能解析(東京大学 矢部尚登グループ)

(1)研究実施内容及び成果

モデル植物シロイヌナズナを用い、分子遺伝学的な手法によりTrp合成系の一次・二次代謝制御に関わる新規遺伝子、新規変異遺伝子(対立遺伝子)の単離・同定を進めるとともに得られた知見を農作物へ応用、展開するための機能・発現制御機構の基礎的な解析を行う。

1)イネ由来ASA1D導入形質転換シロイヌナズナの解析

イネ由来AS α サブユニット遺伝子OASA1のTrpによるフィードバック欠損型変異遺伝子ASA1DをCaMV35Sプロモーター下で異所的に高発現させた形質転換植物を作製した。得

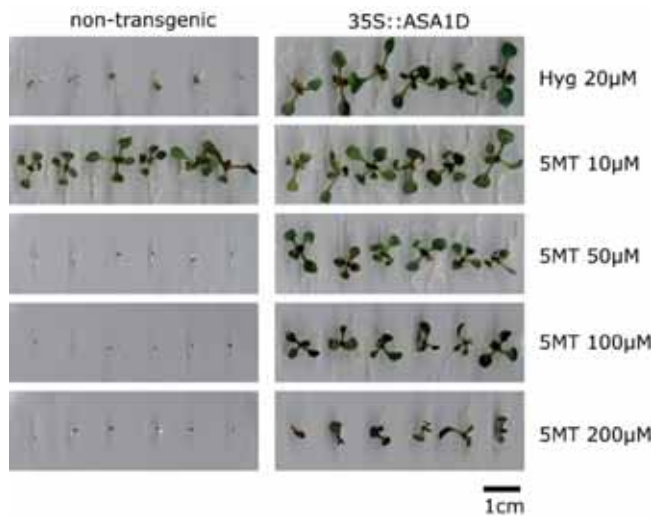


図23 フィードバック欠損型変異遺伝子ASA1Dの導入はシロイヌナズナに5MT抵抗性を付与する

られた形質転換植物体はイネ同様、シロイヌナズナでもフィードバック阻害の解除により高い5MT抵抗性を獲得していたが、その他の顕著な可視的表現型は示さなかった(図23)。形質転換体は最大で200 μ M 5MT上でも選抜が可能であり、非形質転換体は紫化して枯死するため、形質転換体との判別が極めて容易であった。よってOASA1D遺伝子は植物由来の遺伝子として抗生物質抵抗性遺伝子と同様に新規の形質転換植物の選抜マーカーとして利用できる事がシロイヌナズナでも示された。また、形質転換植物を花粉親とした交配実験

でも、優性のマーカーとして利用できることが示され、in planta法でも利用できる植物由来の有用な新規選抜マーカーとして評価できる。また、得られた形質転換系統のうち5MT抵抗性の異なる複数の形質転換系統についてTrpおよびインドールグルコシノレート、フラボノイド、フェニルプロパノイド等の二次代謝産物、代謝経路の一部を共有する芳香族アミノ酸であるPhe, Tyrの代謝変動解析を代謝解析グループと共同で進めた。さらに、二次代謝系操作の可能性について検討している。

2)シロイヌナズナ遺伝子挿入破壊変異株の検索の為のDNAリソースの整備

現在、ABRC、理研等でT-DNA挿入破壊変異体の入手が可能となっているが、全ての遺伝子は網羅されておらず、また複数の対立遺伝子が得られるかは多分に確率的である。RNAi法によるノックダウンも手段としては可能となって来ているが、効果の程度、スペクトル等に問題があり、加えて類似配列を持った変異遺伝子の導入の結果を解析できないことから、T-DNAによるノックアウト株の取得は遺伝子の機能解析の上で重要な位置を占めている。入手可能なリソースに加え、さらにノックアウト株の取得の可能性を高めるため、当グループで独自に構築した約12,000の独立なアクティベーション・タギングラインからスクリーニングの為のDNAリソースを構築した(図24)。形質転換ラインを100ラインごとにまとめて暗黒液体振盪培養を行い、バルクDNAプールの作製を行うとともに各プールを構成する1ライン毎のDNAも調製し、全ラインについて挿入破壊株の検索、同定が可能なシステムを完成し

た. また, 挿入破壊DNAプールの作製過程で開発した植物ゲノムDNAのハイスループット単離技術について2件の特許出願を行った. またこのリソースを利用し, いくつかの単離新規遺伝子の対立遺伝子の検索を行った.

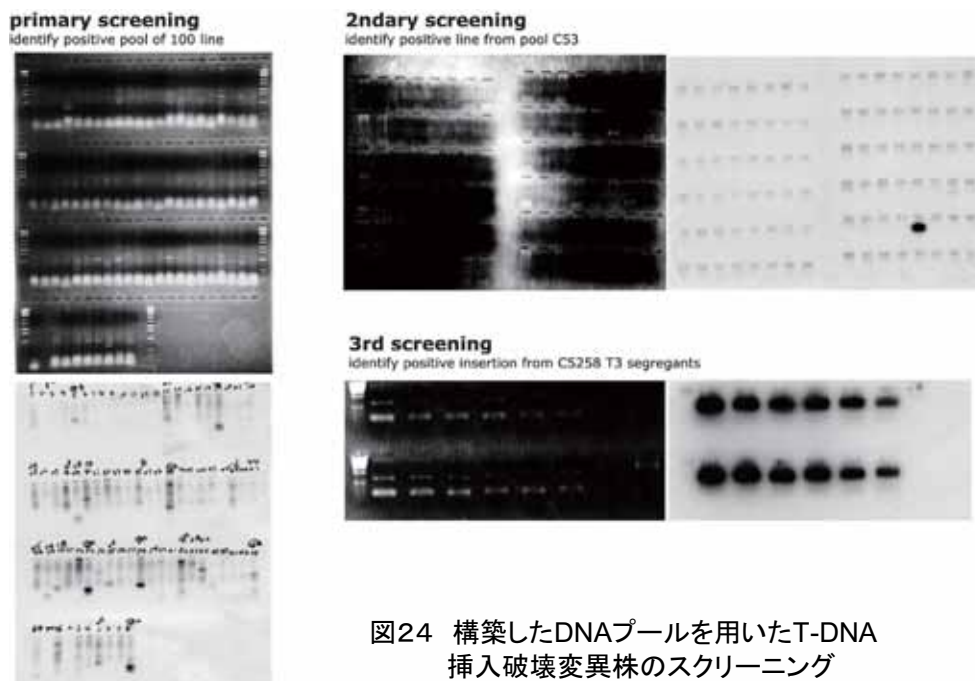


図24 構築したDNAプールを用いたT-DNA
挿入破壊変異株のスクリーニング

3) アクティベーション・タギングによる新規Trp合成系関連因子の単離

当グループで既に構築した約12,000の独立なアクティベーション・タギングラインをTrpアナログである5MT耐性でスクリーニングし, 抵抗性を獲得した変異体の単離をおこなった. シロイヌナズナの属するアブラナ科にはTrp代謝において特異的なP450遺伝子CYP79B2, B3が存在し固有の代謝経路を構成している. また, シロイヌナズナではTrpを出発物質とする植物ホルモン, オーキシンの合成経路, 代謝, 輸送に関連した多くの知見が蓄積しており, 新規遺伝子の単離は関連する一連の反応の全貌解明に大きく寄与するものと考えられる. 本スクリーニングではアクティベーション・タギングによる挿入部位近傍遺伝子の異所的な恒常的発現誘導により, 一次代謝として通常時のTrp合成に関わる因子以外に, 時間的・空間的に特異的に発現しTrp合成系を制御し, 二次代謝産物を産生する事で病虫害・ストレス応答等に関与する新規因子が単離できると期待できる. 100 μ M 5MTを含む培地上で発芽, 成育できる変異体のスクリーニングから優性変異*rmt1*変異体を単離した. *rmt1*では内生の遊離Trpの濃度に変化は無く, ASのTrp/5MTによるフィードバック阻害も正常であることから新規のクラスの変異であると推察された. 代謝プロファイリングを行った結果, Trp由来の抗菌性二次代謝産物インドールグルコシノレート類 (IGs) が野生型の約20倍蓄積していた. 原因遺伝子の作用機構を明らかにするためIGsの代謝に関わる遺伝子群の発現プロファイリング解析を行ったところ, ATR1遺伝子によって制御されることが知られていた一群の遺伝子に加えて, IGsの代謝に関わる一連の遺伝子群が協奏的に転写レベルで活性化を受けており, IGs蓄積, 5MT抵抗性表現型の一因と推測された. ATR1遺伝子ではその5'側非翻訳領域に存在するuORFに塩基置換が起こる事で転写産物蓄積量が上昇する優性変異*atr1D*が知られている (Bender and Fink 1998). *rmt1*とATR1の相関を調べるためATR1遺伝子上流域の塩基配列を全て決定したところ, 予想に反して*atr1D*変異と同一の塩基置換が認められ, *rmt1*は*atr1D*との二重変異であることが明らかとなった. ATR1とRMT1は共に

第5染色体に座乗する優性変異の為、二重変異が維持されたまま、5MT抵抗性を指標とした複数の戻し交雑を通過してしまったと考えられる。dCAPSマーカーによるジェノタイピング、T-DNAのボーダー配列を用いたPCR解析を戻し交雑とあわせて行い、それぞれの単独変異および二重変異を得ることができた。各々について5MT抵抗性を解析したところ*rmt1*、*atr1D*単独変異、二重変異体のいずれも5MT含有培地上での根の伸長および生重量の増加のいずれにおいても抵抗性表現型を示した(図25)。また二重変異体が単独変異の中間的な表現型を示したことから、これら二遺伝子座は直列の経路に位置するのではなく、一定の相関が有る並行した経路に位置すると推測できる。

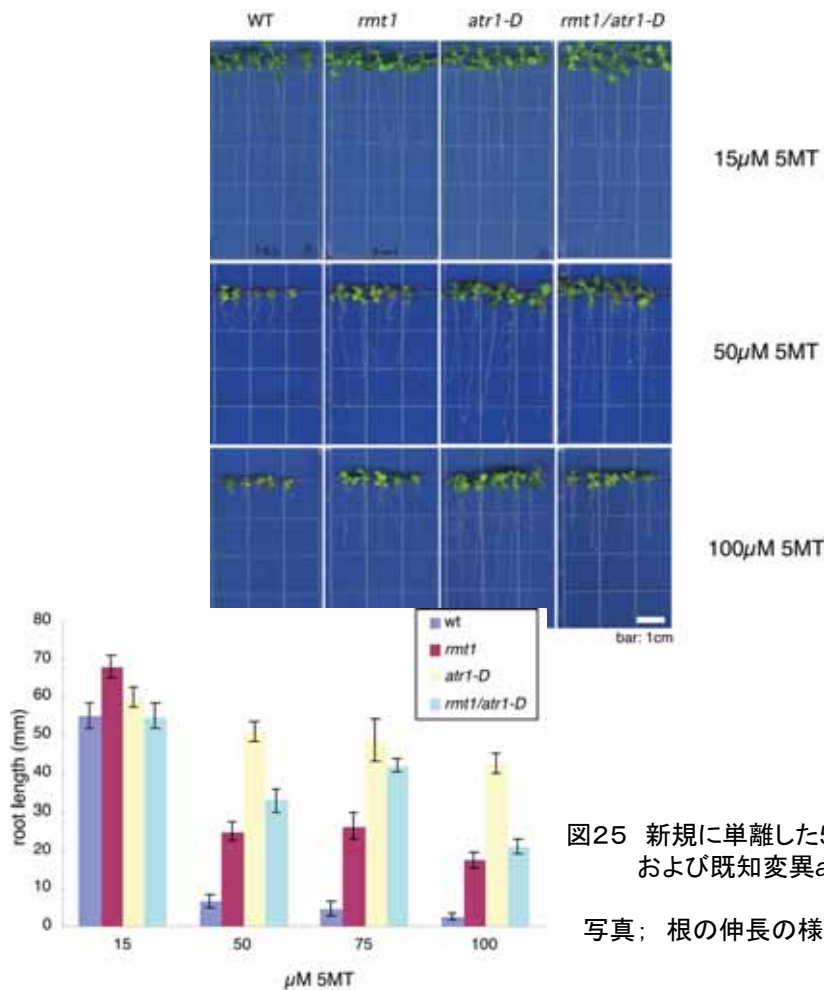


図25 新規に単離した5MT抵抗性変異株*rmt1*および既知変異*atr1-D*の5MT抵抗性

写真; 根の伸長の様子、グラフ; 根の長さ

*rmt1*変異はT-DNA挿入に起因する遺伝子の異所的発現に起因すると期待されたため、TAIL-PCR法により、原因遺伝子の同定を行ったところ、ZF-HD(zinc-finger/homeodomain)モチーフをもつ新奇の転写因子と推定される遺伝子が異所的に発現していた。当該遺伝子をCaMV 35Sプロモーター下で発現させた形質転換植物を作製したところ、5MT抵抗性を再現したことからこの遺伝子が原因遺伝子であると推測される(図26)。

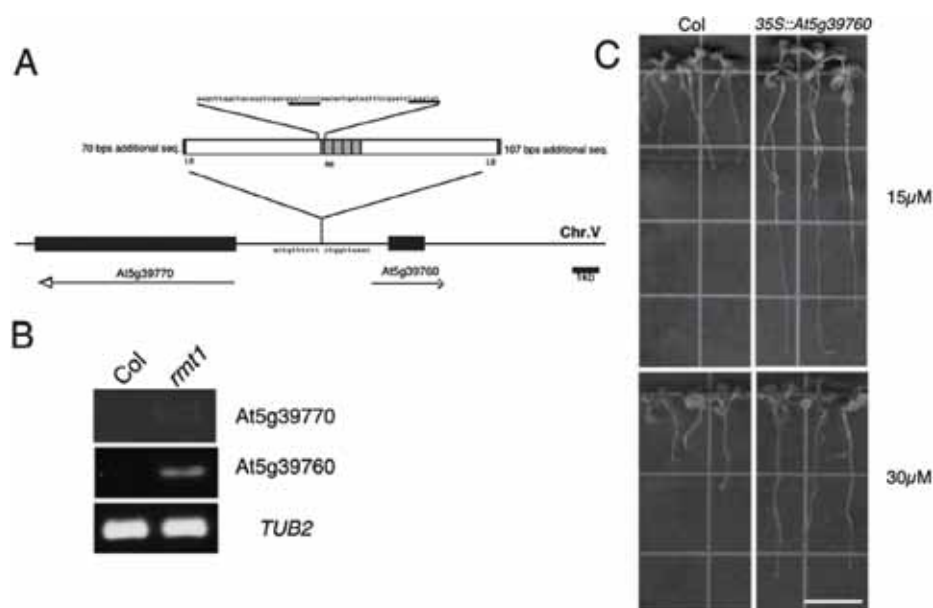


図26 A: *rmt1*におけるT-DNA挿入様式と周辺ORF
 B: *rmt1*においてAt5g39760の転写産物が特異的に蓄積している
 C: At5g39760の導入は5MT抵抗性を付与する

*atr1D*に関しては発現プロファイリングおよび代謝解析グループとの共同研究によりMYB様転写因子であるATR1が構成的に高蓄積することで、IGs合成系を形成する一連の遺伝子が直接あるいは間接的に転写レベルで活性化され、5MTが無毒な二次代謝産物である5MIGsに転換され、その結果5MT抵抗性を獲得するとともに、高レベルのIGsを蓄積することが示された(3-4参照)。*rmt1*に関しては二重変異体の表現型から関連する並行した経路を制御していると推定される。現在、転写産物プロファイリングにより、下流の制御ターゲット遺伝子群の同定を進めるとともに、代謝解析グループと共同で代謝産物の変動についても解析を進めている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究ではシロイヌナズナを材料として、Trp代謝を制御する新規因子が単離された。得られた新規因子は転写因子であると推定され、同様に転写因子であるATR1と関連する並行の経路でTrp代謝を司っていると推測される。シロイヌナズナではTrp関連代謝産物はTrpからCYP79B2,B3によりIAOXが合成されるの経路が主たる物であると考えられている。しかしながら、TDC(未同定)によりtryptamineを経由して合成される経路も提唱される(Geubb and Abel, 2006)ほか、これらの経路を調節すると推定される複数の因子が次々報告されてきている(Levy et al., 2005; Skirycz et al., 2006)。本研究で単離された因子が制御する下流の遺伝子群を、マイクロアレイなどを用いたより詳細な発現プロファイリング、あるいはメタボロミクス的アプローチにより明らかにするとともに、近年明らかとなった制御因子群との相互関係を解明すれば、より任意な二次代謝の制御が可能となると期待される。Trp由来二次代謝産物は植物本来の機能である抗菌性、防虫性物質としてだけでなく、人間の健康向上に有効な成分や医薬品としても有効な成分が多く有る。本研究の成果を応用することにより、植物に病害抵抗性を付与し、生産性を向上させるだけに留まらず、希少な有効成分の生産工場としての利用も現実的な物となると期待できる。

3. 3 形質転換体におけるTrp合成系代謝の解析(京都大学 宮川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1) *OAS1D* 導入植物における代謝変動の解析

イネの AS からデザインされた *OAS1D* 遺伝子を植物に発現させると、AS 活性が Trp のフィードバック阻害に対し非感受性となって遊離の Trp 含量が著しく増加することがイネを含む複数の植物で示された。一方で、アントラニル酸や Trp からはさまざまな植物の二次代謝成分が生合成されることが知られている。そこで当グループでは Trp 生合成系の活性化が代謝プロファイルに及ぼす影響を詳細に調べることにした。

a イネカルス

OAS1D 遺伝子を導入することによって遊離の Trp 含量が増加したイネカルスについて HPLC-UV により芳香族成分代謝プロファイル进行分析したが、Trp 以外に顕著な変化を示す成分は認められなかった。非主要成分のなかに含量が増加するものが一部あり、それらを単離、構造解析することにより、新規インドール化合物を同定した。

B イネ植物体

カルスから再生させた植物体を分析したところ、Trp の分布は不均一で、増加の程度は組織により異なっていた。もっとも大きな増加が見られたのは、新しく展開した葉身であり、次いで葉鞘部や根部でも顕著な増加が見られたが、展開後時間が経過した葉身の Trp 含量は非組換え植物とほとんど同等であった。組織ごとの AS 活性やフィードバック感受性に有意な差は認められず、分布の差は生長が活発な部分へのイネ体内における Trp の輸送によりもたらされたものと考えられた。

以上のような Trp 含量の変化にともなう代謝プロファイルの変動を分析した。ここでも主要な芳香族成分の含量に顕著な差はみられなかった。さらに LC/MS をより広範囲な分析をおこなったところ合計 1573 の成分ピークが検出され、それぞれのピーク強度を図27のように組換え植物と非組換え植物の間で比較した。大部分のピークが傾き 1 の直線付近に見られたことから、*OAS1D* の導入がイネの代謝プロファイルに大きな影響をもたらさないことが確認できた。強度の小さいピークの中に若干数の組換え体で増加するものが認められ、そのいくつかを構造決定した。うち一つはカルスで同定された成分と一致した(図28)。いずれも Trp あるいはその生合成中間体に関連したインドール化合物であった。それらは非組換え体でも Trp 生合成系上を流れる代謝物から派生して生成していたものと推定され、Trp 生合成系の活性化によりそれらの成分が増加したことは、十分納得できる結果である。ただし増加したとはいっても依然としてそれらの含量は低く、*OAS1D* が導入されてもアントラニル酸から Trp に至る生合成系は全体としては非常に厳密に制御されて Trp の蓄積をもたすことが明らかになった。

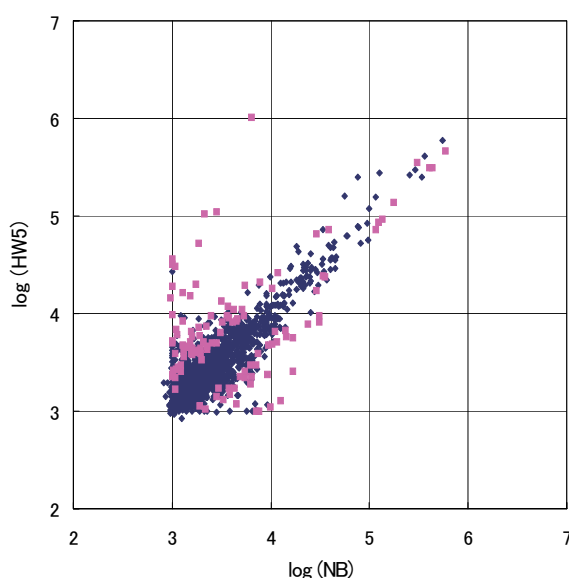


図27 イネ植物体で検出された代謝成分含量の比較

HPLC-MSで検出されたそれぞれのピーク強度の対数値をプロットした。横軸が日本晴、縦軸がHW5。

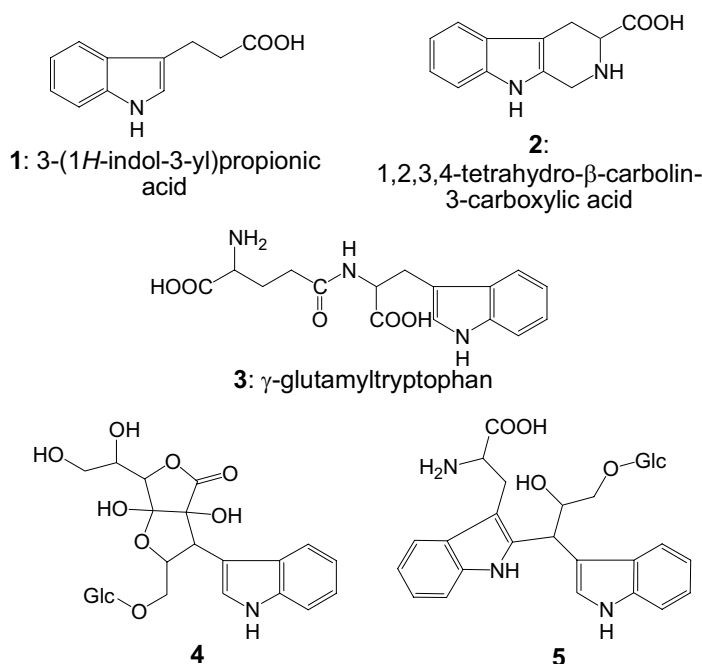


図28 *OAS1D*イネで増加していた成分

c バレイショ

OAS1D 遺伝子を導入したバレイショでは, Trp 含量が増加した. その他には, クロロゲン酸, フェルロイルプトレシン, フェルロイルオクトパミンなどの芳香族成分が2~3倍程度増加したのみであった. LC/MS, LC/MS/MS をもちいてより広範囲の成分を対象に分析した結果によっても, 有意に含量が変化する他の成分は見られなかった. 塊茎組織に傷害を与えた場合でも Trp 関連化合物の新たな生成は見られなかった.

d シロイヌナズナ

シロイヌナズナには, アントラニル酸に由来するインドールグルコシノレート(IG)やカマレキシンなどの二次代謝産物が含まれ *OAS1D* によりそれらの組成に何らかの変動が生じることが十分予想された(図29).

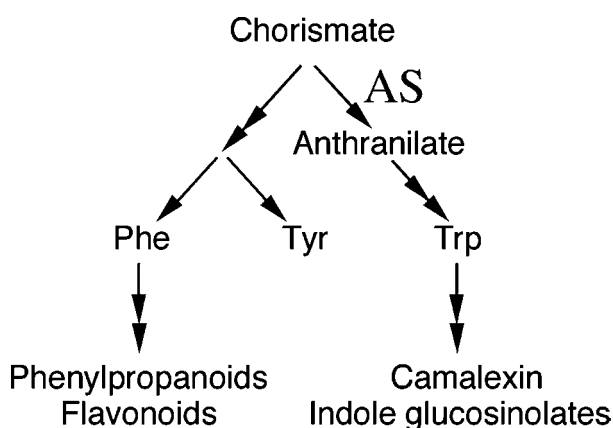


図29 シロイヌナズナにおけるAS関連代謝経路

の蓄積量を調べたところ, 高 Trp 蓄積系統では, 大きな変化は見られず構成的に存在するインドールグルコシノレートがやや増加していたのみであった. 病原菌の接種によって誘導

OAS1D 遺伝子を導入して Trp が増加した複数の系統の AS 活性を測定したところ, 活性強度には大きな違いはなかったが, Trp を多量に蓄積する系統ほどフィードバック阻害に対して AS の感受性が低いという相関があった. また高 Trp 蓄積系統は, Trp アナログで AS を阻害する 5-メチル Trp(5MT)にも高い耐性を示した. これにより, フィードバック制御が Trp の蓄積量の調節や 5MT に対する感受性に対して重要な役割を果たしていることがあらためて明らかになった.

OAS1D 形質転換系統におけるアントラニル酸由来の二次代謝産物

されるファイトアレキシン(カマレキシン)の蓄積量は変化しなかった. 一方で, 高 Trp 蓄積系統ではフェニルプロパノイドやフラボノイドが減少したが, その前駆体である Phe (Phe)には増加する傾向が見られた. このことから, Trp 合成経路と Phe 合成経路の間に何らかの相互作用があるものと想定された.

e ダイズ

*OAS1D*を導入したダイズ種子についてもLC-MSを用いて代謝変動を分析した. これまでの *OAS1D*形質転換体と同様, Trp 以外に顕著に変動する成分は認められなかった. イネと同様に検出された 1407 成分について形質転換体と非転換体の間で含量を比較したところ, Trp の他に有意に増加する微量成分をいくつか見いだした. MS/MS による構造解析から, そのなかの一分成分を *OAS1D*イネでも増加の認められた γ -glutamyltryptophan と同定した.

f インドール-3-酢酸(IAA)への影響

植物ホルモンオーキシンの一種であるインドール-3-酢酸(IAA)の生合成は Trp の生合成と密接に関連していると考えられている. IAA の含量は非常に低く, 上記の広範囲の成分を対象とする分析ではその変化を正確に知ることは困難である. そこで LC-MS/MS を利用した微量分析法を開発し, *OAS1D* 遺伝子を導入した植物における IAA 含量の変化を調べた. いずれの形質転換体においても Trp の増加に伴う数倍程度の IAA の増加が認められた. しかしいずれの場合も, 植物の形態や生育の様子に有意な変化は見られず, 増加した IAA はなんらかの形で作用部位から隔離されていてホルモンとしての機能は果たさないように制御されていると考えられた. しかし分析条件の検討の過程で, 混在する大量の Trp が IAA の定量値にかなりの影響を与えている可能性が考えられたため, 詳細について引き続き検討が必要である.

これに関連して IAA の植物体内における恒常性を保つ上で重要な因子となっている代謝について基礎的な検討を加えた. 従来いくつかの植物で IAA の代謝物が明らかにされているが, 定量的なデータは少なく, IAA 代謝の全体像については不明な点が多い. 本研究ではシロイヌナズナとイネを材料に, 新規な IAA 代謝物を探索した結果, 図30のような化合物を同定することができた. これらはいずれも生成量が多く, 今回対象とした植物において主要な IAA 代謝経路にかかわる成分であることが明らかになった.

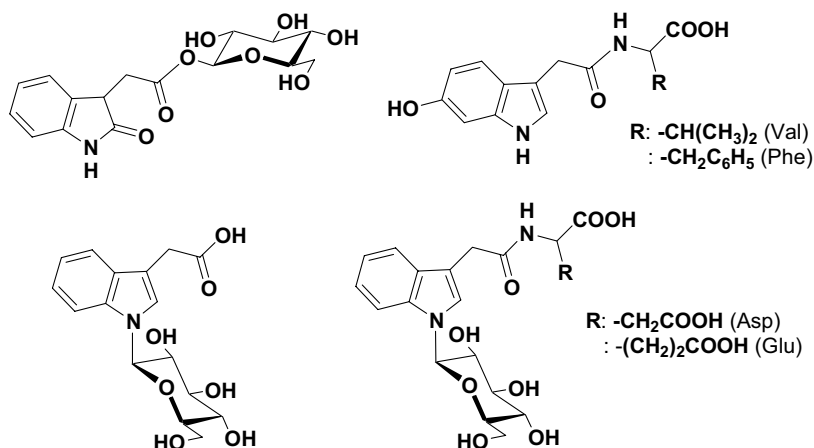


図30 新しく同定したIAA代謝物

アミノ酸合成に関わるメタボリックエンジニアリングは, Trp 以外には, リジン, スレオニン, メチオニンといったアスパラギン酸族アミノ酸を中心に行われており, 同様にフィードバック制御が最終産物であるアミノ酸の蓄積量の調節に重要であることが分かっている. これらのアミノ酸も, タンパク質合成に使われることに加え, 二次代謝成分の合成に深く関わってい

る。例えば、リジンはタバコの主要アルカロイドであるアナバシンの前駆物質であり、メチオニン¹はアブラナ科植物においてグルクシノレート²の側鎖に硫黄を含んだ基本骨格を供給する。しかし、アスパラギン酸族³アミノ酸⁴についてのメタボリックエンジニアリングでは個々のアミノ酸⁵に由来する代謝物⁶については全く考慮されていない。今回のように植物の Trp 生合成⁷活性化が他の代謝物組成に与える影響を網羅的に調べられた例はこれまでにない。結果としてアントラニル酸合成酵素⁸の機能改変は、Trp 以外の顕著な副産物の生成をもたらさない植物代謝工学上すぐれた技術であることを示すことができた。

2) *OAS1D* / TDC二重形質転換イネカルの代謝プロファイリング分析

OAS1D 遺伝子により蓄積したTrpをさらに有用物質に変換する可能性を検討するために、*OAS1D* 遺伝子とともにTrp脱炭酸酵素(TDC)遺伝子をイネカルスに導入

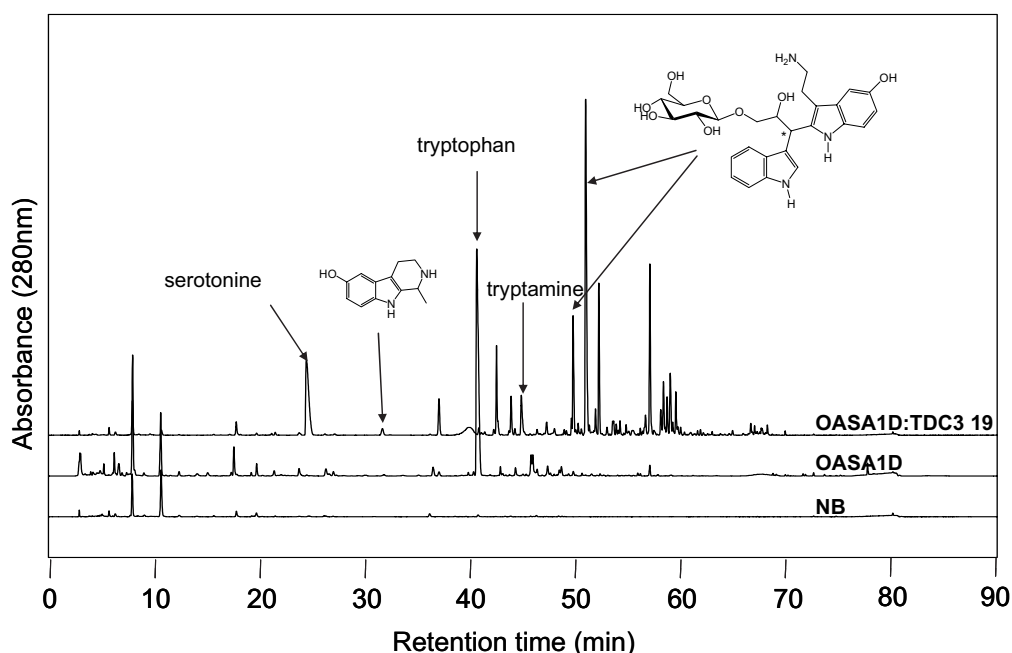


図31 *OAS1D*およびTDC酵素遺伝子導入イネカルス代謝プロファイル

し解析した。二つの酵素を過剰発現するカルスのTrp は大幅に減少し、脱炭酸生成物であるトリプタミンの含量が1000 倍以上に増大した。この形質転換体の成分組成を分析したところ、トリプタミン以外にも非形質転換体および*OAS1D* 導入カルスいずれにも見られなかった成分が多数増加しており、その代謝物プロファイルは非常に複雑に変化していた(図31)。主要な増加成分としてセロニンとトリプタミンに由来する2種の新規アルカロイドを同定あるいは推定したが、その他多くの成分が未同定のままである。以上の結果から、*OAS1D*の導入が実質的にTrp増加のみをもたらすのは、TDCの活性が低く抑えられているためであり、イネにおけるTrp由来二次代謝の制御にはTDC がきわめて重要な役割を果たしていることが明らかになった。

類似の研究としてTrp由来のインドールアルカロイド生産性の向上を図るため

*Catharanthus*の毛状根にシロイヌナズナ由来のフィードバック非感受性ASとTDCを発現させた例が報告されている。しかし目的とするアルカロイドの含量を増加させることには成功していない。本研究では、植物が通常はTrpからトリプタミンへの変換ステップをかなり「慎重に」制御しており、このステップの活性化は必ずしもねらいどおりの単純な効果をもたらさないことを明らかにした。この知見は今後のアルカロイド生産をめざした植物代謝工学技術の開発にとって重要である。

3) シロイヌナズナ 5MT 耐性突然変異体におけるグルコシノレート代謝の解析

5-メチル Trp (5MT) は Trp (Trp) アナログとしてアントラニル酸合成酵素を阻害し、毒性を発現する。アクチベーションタギングライブラリーのスクリーニングによって、5MT に強い耐性を示すシロイヌナズナ変異体が得られた。この変異体はインドールグルコシノレート (IG) を多量に蓄積していた。そこで、グルコシノレート代謝の活性化と 5MT 耐性との関連について検討した。

標識 Trp の IG への取り込みを LC/MS によって調べた。また、5MT を投与した植物体における 5MT および 5MT 由来の IG (5MI3M) の蓄積量を HPLC で分析した。

標識 Trp を投与すると、変異体では野生型に比べて標識 IG が速く蓄積したことから、IG 合成が活性化されていることがわかった。また 5MT を投与すると、5MI3M の蓄積量が大きく、5MT の蓄積量が小さいことが見いだされた。(図32)したがって、この変異体では IG 合成が活性化されているため、5MT が速やかに 5MI3M に代謝され、その結果、細胞内の 5MT 濃度が低下し 5MT 抵抗性となることが示唆された。これは、植物の二次代謝経路が外部からの異物に対して解毒機能を果たすことを示す新たな例で、他に類を見ない。

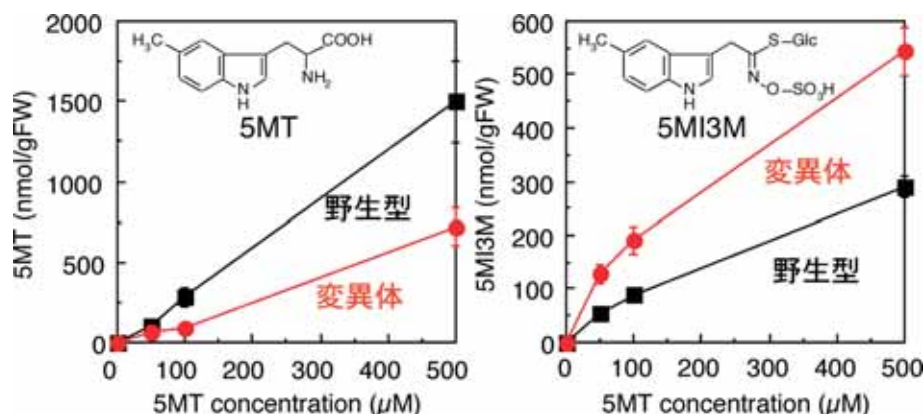


図32 5MTを投与したシロイヌナズナ植物体中の5MTおよび5MI3Mの蓄積

4) イネにおいて病原菌感染により誘導されるTrp代謝

多くの植物でTrp合成経路は二次代謝産物の生産を通して病害応答に関与している。しかし、イネでは病原菌の感染時にこの代謝経路を経て合成される二次代謝産物が同定されていないため、その役割は不明であった。イネの病害応答とTrp合成との関連を明らかにするため、病原菌の感染によるTrp生合成の変動について調べた。

イネの第3葉にイネごま葉枯れ病菌 (*Bipolaris oryzae*) の胞子を接種し、Trp 合成経路の鍵酵素である AS の活性を測定した。その結果、感染によって酵素活性が上昇することがわかった。また、AS α サブユニット遺伝子 (*OASA1* および *OASA2*) の発現量をqRT-PCR 法により測定したところ、*OASA2* の発現が活性化していた。さらに、LC-MS/MS を用いて、植物体中の Trp およびアントラニル酸の蓄積量を測定したところ、これらの化合物の蓄積量も感染により増加した。以上の結果より、イネでは病原菌の感染に応答して Trp 合成経路が活性化することが明らかになった。

イネごま葉枯れ病菌が感染するとTrp生合成が活性化されることから、イネでもTrp合成系に由来する二次代謝産物の蓄積が防御応答に関与していることが想定された。そこで、イネにおいて感染に応答して活性化される二次代謝経路を明らかにする事を目的とし、探索を行った。イネごま葉枯れ病菌の胞子を接種し、新たに蓄積する化合物の検出を試みた。その結果、イネごま葉枯れ病菌が感染した葉ではセロトニンやそのヒドロキシ桂皮酸アミドが多量に蓄積していることが見いだされた(図33)。また、フィードバック非感受性の *OASA1D*

遺伝子を導入した系統では、もともとTrpを多量に蓄積しているにもかかわらず、セロトニンの誘導量は増加しなかった。一方で、病斑にトリプタミンを蓄積することが知られている過敏反応自発誘導型*s*突然変異体ではセロトニンはほとんど蓄積しなかった。したがって、Trpからトリプタミンを経て合成されるセロトニンの蓄積がイネの主要な病害応答の一つであると推定された。

これまでにさまざまな植物でアミノ酸に由来するアミン類やヒドロキシ桂皮酸アミド化合物がみつかり、それらが病害虫に対する防御に関わっていることが示されている。しかし主要作物であるイネで同様の化合物が防御に関連して生成することを示した例は本研究が初めてである。またイネでは、過敏細胞死とともに細胞壁が褐変し、フェノリクスが集積することは広く知られているが、その化学的な実態は、まったく不明である。セロトニンはこの現象と深く関係して、病原菌の感染阻止に機能していることが想定される。

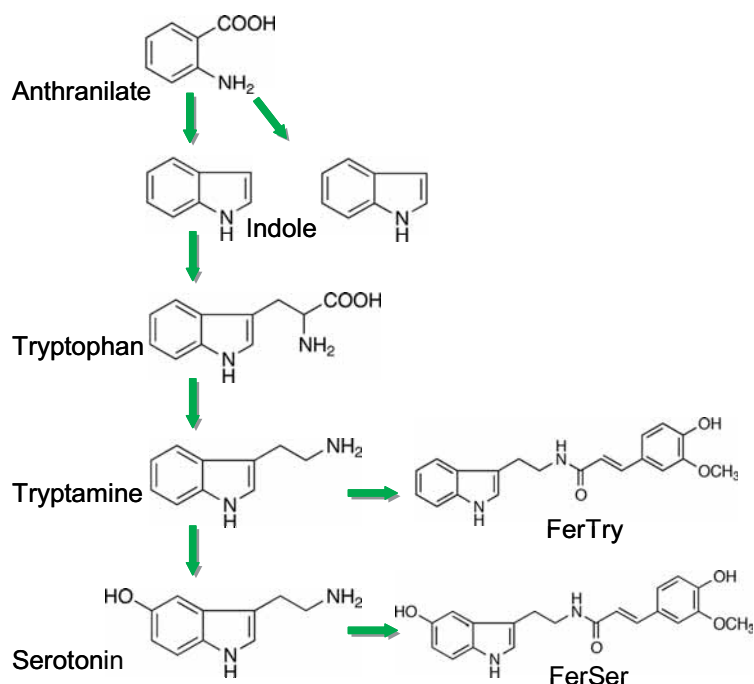


図33 イネにおいて病原菌の感染によって活性化されるトリプトファン代謝経路

(2)研究成果の今後期待される効果

*OAS1D*は、導入したいずれの植物においても Trp の顕著の増加をもたらしたが、他の成分に対しては大きな影響を与えなかった。このことは、植物の代謝機能の操作の観点から *OAS1D*はたいへんすぐれたツールであり、その利用は今後、蓄積した Trp をさらに有用性の高い二次代謝化合物へ導くための基盤的な技術となることを示している。一方 *OAS1D* の導入は、少量ではあったが Trp 生合成系に由来するいくつかの新しい二次代謝成分の存在を明らかにした。今回得られた新規インドール化合物はその量が限られていたため、十分に生理活性等その機能を検討できなかったが、有用物質として利用できる可能性がある。また *OAS1D* 導入シロイヌナズナの分析では、Trp の増加にともなって Phe や Tyr, さらには Phe に由来するフェニルプロパノイド類の濃度が若干影響をうけることが明らかになった。北大グループが明らかにしたイネの Trp アナログ耐性のメカニズムも、これまでに知られていない Trp 経路と Phe 経路間の代謝コミュニケーションの存在を示唆している。これまでに、Phe アンモニリアーゼの欠損したシロイヌナズナの突然変異体で Phe の増加と同時に Trp が増加することが報告されているが、この場合には、Phe 代謝の低下に伴い、Trp への基質の供給が増加したためと解釈することができる。しかし、本研究ではこのような単純なモデルでは説明できない新たな代謝コミュニケーションのメカニズムが存在すること

を明らかにしており、今後の大変興味深い研究課題である。

OAS1D を導入したイネ植物体では、Trp の分布が不均一であり、古い組織から新しい組織へ Trp が輸送されている可能性が示された。これまでにイネをはじめ他の植物体内においても Trp などアミノ酸の転流がくわしく検討された例はない。今日、代謝機能の改変により特定の成分の生合成を活性化させることが可能になりつつある。今後はその成分をねらどおりの部位に輸送・蓄積させる技術の開発が重要になると思われる。この点から見て *OAS1D* イネは Trp の植物体内輸送を研究するための興味深い実験材料とも言える。従来、多くの植物で Trp 合成経路が二次代謝産物の生産を通して病害応答に関与することが示されてきた。今回の分析の結果、重要作物であるイネにおいても Trp 生合成系が病原菌の感染に対する反応に関わっていることが明らかになった。特に、過敏反応自発誘導型変異体との比較から、セロトニンの蓄積が、イネの病斑形成において重要な役割を果たしていることを示唆するデータが得られたのは興味深い。本研究ではイネカルスに *OAS1D* に加えて *TDC* を導入することによって、セロトニンとともにその前駆物質であるトリプタミンの含量を増加させることができた。今後、この技術を応用しながらさらにセロトニンの蓄積とイネの病害応答の解析を進めることによって、植物の病斑の形成と抵抗反応の発現、さらにそれに関わる化学物質との関係を明らかにすることが可能になると考えられる。

3. 4 イネ変異体原因遺伝子の解析（北海道大学 山田哲也グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

1) 原因遺伝子のマッピングと単離

代謝系の突然変異体の解析は新たな代謝ネットワークの解明とその利用につながる点で興味深い。そのため、Trp のアナログである 5MT に抵抗性を示すイネ変異体 (*MTR1*) の遺伝解析を行い、原因遺伝子の単離を試みた。変異体とインド型イネカサラスとの間で育成したマッピング集団 (*F2* ならびに *F3* 集団) を用い、発芽時における 5MT に対する発根能力を指標として原因遺伝子 *MTR1* のマッピングを行った。SSR ならびに CAPS などの分子マーカーを用いてマッピングを行った結果、*MTR1* は第 7 染色体の長腕末端付近に座上がることが明らかとなった。特に、組換え個体の詳細な遺伝解析から、PAC クローン P0627E10 および OSJNOa136M23 に含まれる約 150kb の領域に *MTR1* が座上がることが推測された。当初、*MTR1* は Trp を蓄積すること (Wakasa & Widholm 1987) から、*MTR1* は Trp 生合成に関連する酵素遺伝子の変異と予測していたが、アノテーションデータベースでは *MTR1* が座上がる約 150kb の候補領域に Trp 生合成に関連する遺伝子を確認することはできなかった。そこで、*MTR1* によって影響を受けていると考えられる成分を同定するために、*MTR1* とそのドナーである農林 8 号 (N8) に由来するカルスの代謝プロファイリングならびにその化合物の同定を行った。その結果、*MTR1* 由来のカルスでは多くのフェニルプロパノイド化合物が増大していることが明らかとなった (図34)。これらのフェニルプロパノイド化合物は Phe を前駆体として生合成されているものであり、*MTR1* は Phe の生合成に関連する変異体であることが示唆された。

この結果を参考にして、マッピングにより *MTR1* が座上がると考えられる約 150kb の候補領域の中から Phe の生合成に関連する遺伝子をアノテーションデータベースより検索した。その結果、バクテリアに見られるプレフェン酸デヒドラターゼ類似遺伝子が当領域内に存在することが明らかとなった (図35)。そこで、当該遺伝子のクローニングを *MTR1* ならびに N8 において行った。当該遺伝子は *MTR1* において非同義を伴う一塩基置換が認められた。この変異はバクテリアのプレフェン酸デヒドラターゼにおいてその活性が Phe によってフィードバック制御を受ける部位に相当していた (図36)。

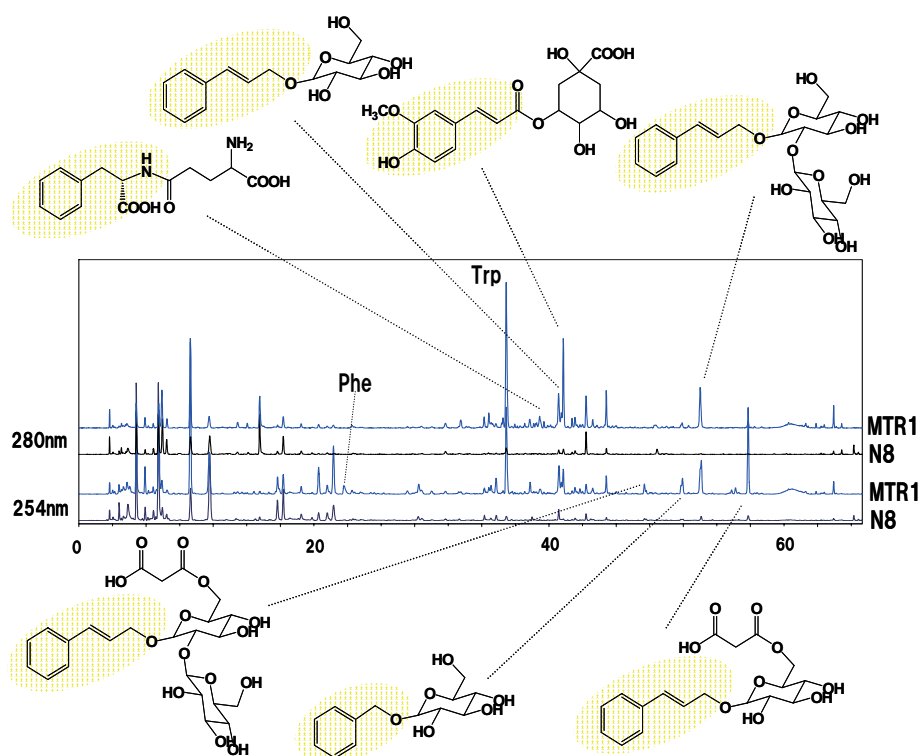


図34 変異体(MTR1)と野生型(N8)カルスにおける代謝プロファイリング

各化合物の構造式における黄色枠で囲まれた部分の特徴よりこれらの化合物はフェニルプロパノイド類である。

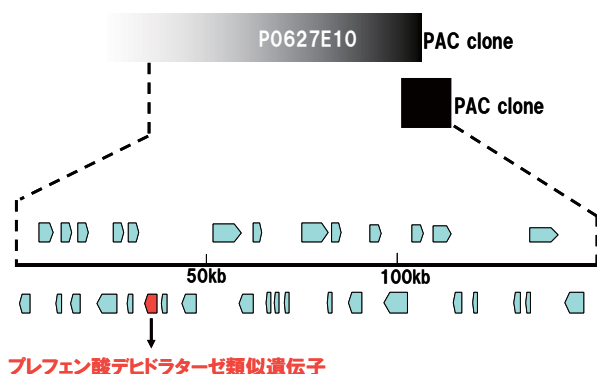


図35 *MTR1* 候補領域(約150kb)におけるアノテーションマップ

図中にある青矢印はそれぞれの推定のORFを示す。赤色矢印はバクテリアのプレフェン酸デヒドラターゼに類似する遺伝子を示す。

298

M E S R P

Wild-type : ..ATGGAAAGCCGTCCA..

Mutant-type : ..ATGGAAATCCGTCCA..

M E I R P

298

図36 変異個体におけるプレフェン酸デヒドラターゼ類似遺伝子の一塩基置換

青字のESRPはバクテリアで認められているフィードバック制御部位の一つに相当するアミノ酸配列を示す。赤字は非同義を伴う変異部位を示す。数字は開始コドンからのアミノ酸残基の数。

2) 変異遺伝子を導入した形質転換体の作製

当変異遺伝子の機能解析を行うため、トウモロコシユビキチンプロモーターの下流に MTR1 由来の変異型プレフェン酸デヒドラターゼ類似遺伝子 (*OsPDT298I*) と野生型遺伝子 (*OsPDT298S*) をそれぞれ繋ぎ、形質転換用の発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを持つアグロバクテリウムを用い形質転換「日本晴」カルスを作出した。ノザン解析により導入遺伝子の発現が認められた形質転換カルス系統において 5 MT 抵抗性試験を行った結果、*OsPDT298I* を持つ形質転換カルス系統のみで高度な抵抗性が認められた。また、芳香族アミノ酸分析を行ったところ *OsPDT298I* を持つ形質転換カルス系統のみが MTR1 と同様に Phe と Trp を高位に蓄積していることが明らかとなった(図37)。さらに、数倍程度ではあるがチロシンも増加することが明らかとなった(図37)。特に Phe と Trp の蓄積には密接な関係が認められ、Phe が高位に蓄積すると Trp もまた高位に蓄積する傾向にあった。MTR1 の代謝プロファイリングにより増加が認められたフェニルプロパノイドの一つである 6-マロニルロジンの定量を行ったところ、他の化合物と同様に *OsPDT298I* を持つ形質転換カルス系統のみ増加が認められた(図37)。

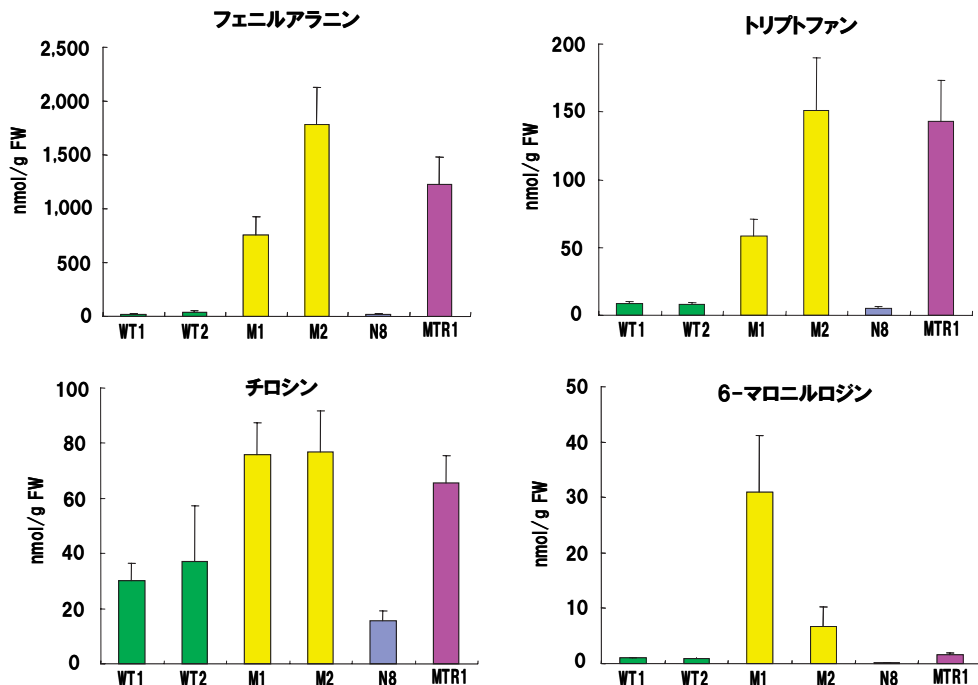


図37 カルスにおける芳香族アミノ酸ならびに6-マロニルロジン含有

WT, M, N8およびMTR1はそれぞれ*OsPDT298S*(野生型)導入系統、*OsPDT298I*(変異型)導入系統、農林8号およびMTR1を示す。

これらのことから、本研究で単離された遺伝子は Phe の生合成に深く関わる遺伝子であることが明らかとなった。また、本研究で認められた変異が Phe によるフィードバック制御の緩和に関与することも明らかとなった。さらに、Phe が増加することによって、他の芳香族アミノ酸が増加することも明らかとなった。特に、Trp に関しては MTR1 と同様に数十倍増加することが明らかとなった。Trp が高位に蓄積するメカニズムに関しては不明であるが、この過剰な Trp の蓄積が細胞内における 5 MT の影響を緩和するため、MTR1 に 5 MT 抵抗性がもたらされるものと考えられた。

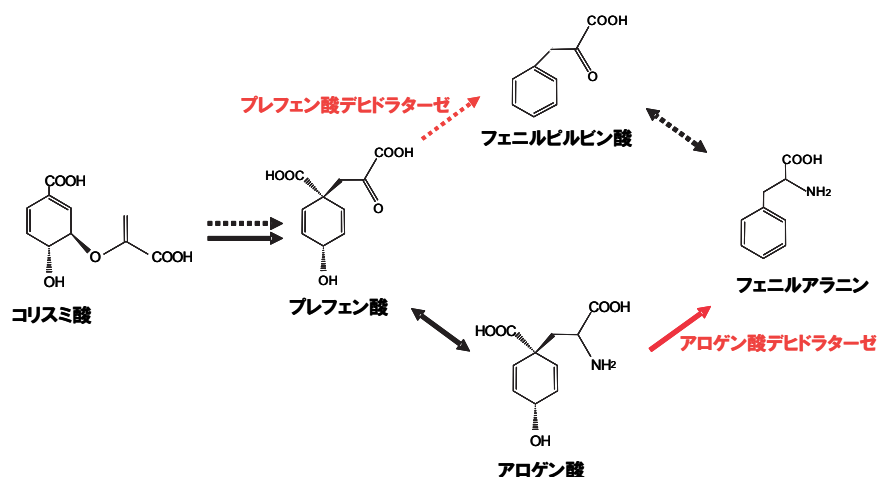


図38 フェニルアラニンの生合成における2つの経路

破線はバクテリアで主に行われている生合成経路を示す。

Phe の生合成には 2 つの異なる経路が存在する(図38). しかしながら, 高等植物における Phe の生合成制御に関しては未だ不明な点が多い. 過去の酵素学的研究から, 高等植物ではバクテリアで見られるプレフェン酸を経由する生合成経路とは異なり主にアロゲン酸を経由して Phe を生合成すると考えられている(Jung et al. 1986). そこで, in vitro でのタンパク合成系を用いて OsPDT298I(3-2 における OsPDTH1 S298I に相等)ならびに OsPDT298S(3-2 における OsPDTH1 wild-type に相等)の酵素活性測定を行った. その結果, 3-2 項に示すように当酵素はプレフェン酸ならびアロゲン酸のどちらも基質として利用できることが明らかとなった. しかしながらアロゲン酸において極めて高い基質特異性が見られた. 従って, 本酵素はアロゲン酸デヒドラターゼであることが明らかとなった(図 21 参照). また, OsPDT298I の変異型酵素では Phe によるそのフィードバック制御が著しく緩和されていることが明らかとなった(図 21 参照).

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究により, 5MT 抵抗性を示す変異体 MTR1 から高等植物における Phe 生合成の鍵酵素であるアロゲン酸デヒドラターゼ遺伝子を単離することに成功した. また, 当遺伝子に認められた変異は Phe によるフィードバック制御に関与するものであった. Phe を過剰に生産することによって他の芳香族アミノ酸である Trp ならびにチロシンの増加も認められた. 現在のところ, そのメカニズムは不明であるが芳香族アミノ酸生合成に未知の制御機構があることが明らかとなった. さらに, MTR1 では Phe に続く, その代謝物である多くのフェニルプロパノイド化合物が増大していた. このことは, 当変異遺伝子が芳香族アミノ酸を蓄積させるだけでなくフェニルプロパノイド化合物を過剰生産するための代謝工学的手法の一つとして利用できることを示している. 今後, 未知の芳香族アミノ酸生合成制御機構を解明することで画期的な成分改変に向けた応用的利用が期待される.

4 研究参加者

①作物改変研究グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
若狭 暁	農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所	研究室長	総括	平成13年12月～平成17年3月
(同上)	東京農業大学農学部	教授	(同上)	平成17年4月～平成19年3月
豊田 健太郎	(同上)	CREST 研究員	遺伝子単離, 改変作物解析	平成17年9月～平成19年3月
櫻井 美奈子	農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所	CREST 技術員	形質転換体作製・解析	平成14年4月～平成17年5月
(同上)	東京農業大学農学部	(同上)	(同上)	平成17年6月～平成19年3月
川井 頼子	(同上)	チーム事務員	チーム事務	平成18年6月～平成19年3月
小松 晃	農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所	主任研究員	形質転換体解析	平成13年12月～平成19年3月
川岸 万紀子	農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所	主任研究官	ベクター構築, 組織化学的解析	平成13年12月～平成18年3月
山田 哲也	農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所	CREST 研究員	改変作物作製, 変異体解析	平成14年2月～平成15年9月
J.G. Dubouzet	農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所	CREST 研究員	遺伝子単離, 改変作物解析	平成15年12月～平成17年7月
大武 美樹	農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所	CREST 技術員	形質転換体作製・解析	平成14年8月～平成17年8月
小林 智子	農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所	研究補助員	形質転換体作製・維持	平成14年10月～平成17年5月
大橋 順子	農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所	チーム事務員	チーム事務	平成13年12月～平成18年3月
石本 政男	農業・生物系特定産業技術研	主任研究官	遺伝子単離, 構築と導入	平成13年12月～平成16年3月

	究機構 近中四農研センター			
(同上)	農業・食品産業技術総合研究機構 北農研センター	上席研究員	(同上)	平成16年4月～平成19年3月
中本 有美	農業・生物系特定産業技術研究機構 近中四農研センター	CREST 技術員	形質転換体作製・解析	平成14年2月～平成16年3月
(同上)	農業・食品産業技術総合研究機構 北農研センター	(同上)	(同上)	平成16年4月～平成19年3月
長沼 裕美	農業・生物系特定産業技術研究機構 近中四農研センター	研究補助員	形質転換体作製・維持	平成14年8月～平成16年3月

② In vitro 解析グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
戸澤 譲	三菱化学生命科学研究所トランスレイショナル研究部	ユニットリーダー	改変遺伝子作製, In Vitro 解析	平成13年9月～平成15年3月
(同上)	愛媛大学無細胞生命科学研究センター	教授	(同上)	平成15年4月～平成19年3月
菅野 拓也	三菱化学生命科学研究所トランスレイショナル研究部	CREST 研究員	改変遺伝子作製, In Vitro 解析	平成13年12月～平成15年3月
(同上)	愛媛大学無細胞生命科学研究センター	助手	(同上)	平成15年4月～平成18年3月
笠井 光治	愛媛大学無細胞生命科学研究センター	CREST 研究員	改変遺伝子作製, In Vitro 解析	平成15年4月～平成18年9月

③変異探索グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
矢部 尚登	東京大学大学院理学系研究科生物学専攻	助手	変異体探索解析	平成13年12月～平成19年3月

土屋 瑞穂	(同上)	CREST 技 術 員	変異体スクリーニング	平成14年3月～ 平成18年3月
原田 祥世	(同上)	研究補助員	変異体維持	平成14年2月～ 平成15年6月

④代謝解析グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
宮川 恒	京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻	教授	代謝成分分析	平成13年12月～ 平成19年3月
石原 亨	(同上)	助手	シロイヌナズナ二次代謝 関連解析	平成13年12月～ 平成19年3月
松田 史生	(同上)	CREST 研 究 員	イネ二次代謝分析	平成15年4月～ 平成18年9月
島田 誉弘	(同上)	研究補助員	イネ代謝成分分析	平成18年10月～ 平成19年3月
森野 桂子	(同上)	大学院生	イネ等代謝成分分析	平成14年4月～ 平成16年3月
宮澤 春奈	(同上)	(同上)	オーキシン分析	平成15年4月～ 平成17年3月
浅田 洋平	(同上)	(同上)	シロイヌナズナ二次代謝 分析	平成15年4月～ 平成17年3月
甲斐 建次	(同上)	(同上)	オーキシン分析	平成16年4月～ 平成19年3月
長井 徹	(同上)	(同上)	オーキシン分析	平成17年4月～ 平成19年3月
高橋 香隆	(同上)	(同上)	シロイヌナズナ代謝物分 析	平成17年4月～ 平成19年3月
橋本 由美	(同上)	(同上)	イネストレス代謝解析	平成18年4月～ 平成19年3月

⑤イネ変異体解析グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
山田 哲也	北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻	助手	改変作物作成, 変異体 解析	平成16年4月～ 平成19年3月
宮川 友子	(同上)	研究補助員	変異体解析	平成16年7月～ 平成18年8月
太田沙由理	(同上)	大学院生	変異体維持	平成18年4月～ 平成18年9月
(同上)	(同上)	研究補助員	(同上)	平成18年10月～ 平成19年3月

5 招聘した研究者等
なし

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件, 国際誌 17 件)

1. H.A. El-Shemy, M.M. Khalafalla, K. Wakasa & M. Ishimoto
Reproducible transformation in two grain legumes – soybean and azuki bean – using different systems, *Cellular & Molecular Biology Letters* 7:709-719 (2002)
2. Kanno, T., K. Kasai, Y. Ikejiri-Kanno, K. Wakasa & Y. Tozawa
In vitro reconstitution of rice anthranilate synthase: distinct functional properties of the α subunits OASA1 and OASA2. *Plant Molecular Biology* 54: 11-23 (2004)
3. Kasai, K., M. Kawagishi-Kobayashi, M. Teraishi, Y. Ito, K. Ochi, K. Wakasa & Y. Tozawa
Differential expression of three plastidial sigma factors, *OsSIG1*, *OsSIG2A* and *OsSIG2B*, during leaf development in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 973-977 (2004)
4. Kasai, K., T. Kanno, K. Wakasa, Y. Endo, & Y. Tozawa
Guanosine tetra- and pentaphosphate synthetase activity in chloroplasts of a higher plant: association with 70S ribosomes and inhibition by tetracycline. *Nucleic Acids Res.* 32: 5732-5741 (2004)
5. Yamada, T., Y. Tozawa, Y. Ohkawa & K. Wakasa
Use of a feedback-insensitive α subunit of anthranilate synthase as a selectable marker for transformation of rice and potato. *Molecular Breeding* 14: 363-373 (2004)
6. Morino, K., F. Matsuda, H. Miyazawa, A. Sukegawa, H. Miyagawa and K. Wakasa
Metabolic profiling of tryptophan over-producing rice calli expressing the mutated rice anthranilate synthase α subunit (*OAS1D*) gene. *Plant Cell Physiol.* 46: 514-521 (2005)
7. Matsuda, F., K. Morino, R. Ano, M. Kuzawa, K. Wakasa and H. Miyagawa
Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue. *Plant and Cell Physiol.* 46: 454-466 (2005)
8. Matsuda, F., H. Miyazawa, K. Wakasa and H. Miyagawa
Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69: 778-783 (2005)
9. Kasai, K., T. Kanno, M. Akita, Y. Ikejiri-Kanno, K. Wakasa and Y. Tozawa
Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during floral organ development and of the catalytic activities of the encoded proteins. *Planta* 222: 438-447 (2005)
10. Matsuda, F., T. Yamada, H. Miyazawa, H. Miyagawa & K. Wakasa
Characterization of tryptophan-overproducing potato transgenic for a mutant rice anthranilate synthase α -subunit gene (*OAS1D*). *Planta* 222: 535-545 (2005)
11. Kanno, T., A. Komatsu, K. Kasai, J. G. Dubouzet, M. Sakurai, Y. Ikejiri-Kanno, K. Wakasa & Y. Tozawa
Structure-based *in vitro* engineering of the anthranilate synthase, a metabolic key enzyme in the plant Trp pathway. *Plant Physiology* 138: 2260-2268 (2005)
12. Khalafalla, M. M., R. S. Mizanur, K. Wakasa & M. Ishimoto

Optimization of Particle Bombardment Conditions by Monitoring of Transient sGFP (S65T) Expression in Transformed Soybean. *Breeding Science* 55: 257-263 (2005)

13. Kawagishi-Kobayashi, M., N. Yabe, M. Tsuchiya, S. Harada, T. Kobayashi, Y. Komeda and K. Wakasa

Rice OASA1D, a mutant anthranilate synthase α subunit gene, is an effective selectable marker for transformation of *Arabidopsis thaliana* *Plant Biotechnology* 22: 271-276 (2005)

14. Komatsu, A., M. Ohtake, H. Hasegawa, T. Terakawa and K. Wakasa

Transgenic rice for animal feed with high tryptophan content generated by a selectable marker- and vector backbone-free technology. *Plant Biotechnology* 23: 39-46 (2006)

15. Wakasa, K. H. Hasegawa, H. Nemoto, F. Matusda, H. Miyazawa, Y. Tozawa, K. Morino, A. Komatsu, T. Yamada, T. Terakawa, and H. Miyagawa

High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. *J. Exp. Botany* 57: 3069-3078 (2006)

16. Ishihara, A., Y. Asada, Y. Takahashi, N. Yabe, Y. Komeda, T. Nishioka, H. Miyagawa and K. Wakasa

Metabolic changes in *Arabidopsis thaliana* expressing the feedback-resistant anthranilate synthase α subunit gene *OASA1D*. *Phytochemistry* 67: 2349-2362 (2006)

17. Hanafy MS, Rahman SM, Khalafalla MM, El-Shemy HA, Nakamoto Y, Ishimoto M, Wakasa K. Accumulation of free tryptophan in azuki bean (*Vigna angularis*) induced by expression of a gene (*OASA1D*) for a modified α -subunit of rice anthranilate synthase. *Plant Science* 171: 670-676 (2006)

(2)その他の著作物(総説, 書籍など)

1. 若狭暁・宮川恒 トリプトファン生合成系における代謝の制御と利用 *化学工業* 54: 494-499 (2003)

2. 若狭 暁・戸澤 譲 トリプトファン生合成系における一次・二次代謝の制御と利用をめざして植物の生長調節 *38: 249-254* (2004)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 3 件, 国際会議 4 件)

② 口頭発表 (国内会議 29 件, 国際会議 0 件)

③ ポスター発表 (国内会議 27 件, 国際会議 12 件)

1. 小松晃¹, 吉川暁子¹, 長谷川久和², 川岸万紀子¹, 西澤洋子³, 杉本和彦³, 戸澤譲⁴, 若狭暁¹ (1. 作物研, 2. 北興化学工業, 3. 生物研, 4. 三菱化学生命研)

選抜マーカー開発のための各種プロモーターを用いたイネ改変アントラニル酸合成酵素遺伝子導入個体の解析

日本植物生理学会 (岡山県, 岡山大学) H14 年 3 月 29 日

2. H.A.El-Shemy¹, M.M.Khalafalla¹, 西澤けいと², 内海成², 石本政男¹ (1. 近中四農研, 2. 京都大院農)

遺伝子組み換えによるダイズタンパク質の改良

日本育種学会 第101回講演会 (東京, 玉川大学) H14 年 3 月 30 日

3. M.M. Khalafalla^{1,3}, H.A. El-Shemy^{1,3}, 石本政男¹, 若狭 暁^{2,3} (1. 近中四農研, 2. 作物研, 3 CREST)

Manipulation of tryptophan Synthesis in a grain legume, azuki bean by a modified Rice anthranilate synthase gene

第20回日本植物細胞分子生物学会大会（奈良県，帝塚山大学）H14年7月29日

4. H.A. El-Shemy^{1,4}, M.M. Khalafalla^{1,4}, 長谷川久和², 寺川輝彦², 若狭 暁^{3,4}, 石本政男^{1,4} (1. 近中四農研, 2. 北興化学・開発研, 3. 作物研, 4. CREST)

Nutritional improvement of lysine content for two grain legumes, soybean and azuki bean by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation systems

第20回日本植物細胞分子生物学会大会（奈良県，帝塚山大学）H14年7月29日

5. 小松晃^{1,2}, 西澤洋子³, 川岸万紀子^{1,2}, 長谷川久和⁴, 若狭暁^{1,2} (1. 作物研, 2. CREST, 3 生物研, 4. 北興化学工業)

イネ改変アントラニル酸合成酵素遺伝子を用いた選抜マーカー開発のためのプロモーターの検討
(2)選抜法の確立

日本育種学会第102回講演会（北海道，帯広畜産大学）H14年8月26日

6. 若狭暁^{1,2}, 山田哲也², 戸澤譲^{2,3}, 小松晃^{1,2}, 根本博¹, 長谷川久和⁴, 櫻井美奈子², 寺川輝彦⁴ (1. 作物研, 2. CREST, 3. 三菱化学生命研, 4. 北興化学工業)

トリプトファン含量を高めた形質転換イネの特性評価

日本育種学会第102回講演会（北海道，帯広畜産大学）H14年8月27日

7. H.A. El-Shemy^{1,3}, M.M. Khalafalla^{1,3}, Rahman S Mizanur^{1,3}, 中本 有美^{1,3}, 若狭 暁^{2,3}, 石本政男^{1,3} (1. 近中四農研, 2. 作物研, 3. CREST)

Transformation system toward stable transgene expression in soybean by particle bombardment.
Plant & Animal Genome XI（アメリカ，サンディエゴ市）H15年1月11日

8. 石原亨^{1,3}, 浅田洋平¹, 宮川恒^{1,3}, 若狭暁^{2,3} (1 京大院, 農, 応用生命, 2 農研機構, 作物研, 3 科技団 CREST)

エンバクにおけるavenacin 生合成の解析

日本農薬学会第28回大会(名古屋市，名城大学) H15年3月23日～24日

9. 松田史生^{1,3}, 山田哲也³, 宮川 恒^{1,3}, 若狭 暁^{2,3} (1 京大院農, 2 作物研, 3CREST)

トリプトファン高生産型遺伝子組み換えバレイショの代謝プロファイル分析

日本農芸化学会2003年度大会（横浜）H15年4月1～3日

10. 石本政男^{1,2}, H.A. El-Shemy^{1,2}, M.M. Khalafalla^{1,2}, R.S. Mizanur^{1,2}, 中本有美², 黒田昌治³, 若狭暁^{2,4} (1. 近中四農研, 2. CREST, 3. 中央農研, 4. 作物研)

バイナリーベクターを使用したダイズおよびアズキ形質転換系の開発

日本育種学会第103回講演会（千葉県，千葉大学）H15年4月3日

11. 中本有美¹, 山本直樹², 柴田大輔^{2,3}, 若狭暁^{1,4}, 石本政男^{1,5} (1. CREST, 2. 東北大院理学, 3. かずさ研, 4. 作物研, 5. 近中四農研)

ダイズ TAC ライブラリーの構築

日本育種学会第103回講演会（千葉県，千葉大学）H15年4月3日

12. 小松晃^{1,2}, 川岸万紀子^{1,2}, 浅野雅智¹, 小林智子², 長谷川久和³, 山田哲也², 大武美樹², 若狭暁^{1,2} (1 作物研, 2 CREST, 3 北興化学工業)

抗生物質抵抗性遺伝子を持たない形質転換イネの作出と特性解析

日本育種学会第103回講演会（千葉県，千葉大学）H15年4月2日～3日

13. K. Morino^{1,3}, H. Miyazawa^{1,3}, T. Yonemoto¹, F. Matsuda³, H. Miyagawa^{1,3}, K. Wakasa^{2,3}
(1 Kyoto University, 2 National Institute of Crop Science, 3 CREST)

Secondary metabolism in transgenic rice expressing feedback-insensitive anthranilate synthase gene
3rd Pan Pacific Conference on Pesticide Science (Honolulu, Hawaii, USA) H15 年 6 月 1～4 日

14. 山田哲也¹・櫻井美奈子¹・長谷川久和²・小松晃^{1,3}・川岸万紀子^{1,3}・若狭暁^{1,3} (1.CREST 2. 北興化学開発研, 3. 作物研) エンバクの再分化系及び形質転換法の確立
日本育種学会 104 回講演会 (兵庫県, 神戸大学) H15 年 9 月 19～20 日

15. S. M. Rahman^{1,2}, M. M. Khalafalla^{1,2}, H. A. El-Shemy^{1,2}, 中本有美², 黒田昌治³, 若狭暁^{2,4}, 石本政男^{1,2} (1. 近中四農研, 2. CREST, 3. 北陸研セ, 4. 作物研)
マメ科種子作物, ダイズおよびアズキにおける形質転換体の作出
日本育種学会第 104 回講演会 (兵庫県, 神戸大学) H15 年 9 月 19 日

16. M. M. Khalafalla^{1,2}, S. M. Rahman^{1,2}, 長谷川久和³, 寺川輝彦³, 若狭暁^{2,4}, 石本政男^{1,2} (1. 近中四農研, 2. CREST, 3. 北興化学開発研, 4. 作物研)
ウイスカ法によるダイズ形質転換体の作出
日本育種学会第 104 回講演会 (兵庫県, 神戸大学) H15 年 9 月 19 日

17. 菅野 拓也^{1,2,3}, 笠井 光治², 菅野(池尻) 泰子¹, 若狭 暁^{2,4}, 戸澤 譲^{1,2,3} (1 愛媛大・CSTRC, 2 科技団・CREST, 3 三菱化学生命研, 4 農研機構・作物研)
小麦胚芽無細胞系を用いたイネアントラニル酸合成酵素 α サブユニットの機能解析
第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸国際会議場他) H15 年 12 月 10 日～13 日

18. 川岸万紀子^{1,3}, 矢部尚登^{2,3}, 土屋瑞穂³, 原田祥世³, 小林智子³, 戸田恭子¹, 若狭 暁^{1,3} (1 農研機構・作物研, 2 東大院・理, 3 CREST)
イネ由来新規選択マーカー遺伝子のシロイヌナズナ *in planta* 法における利用
第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸国際会議場他) H15 年 12 月 10 日～13 日

19. 小松 晃^{1,3}, 斎藤靖史², 大武美樹³, 山田哲也³, 若狭 暁^{1,3} (1 農研機構・作物研, 2 岩手大・寒冷バイオシステム研, 3 科学技術振興機構・CREST)
3'UTR 領域をターゲットにした RNAi による 2 つのアントラニル酸合成酵素 α サブユニット遺伝子の特異的発現抑制
第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸国際会議場他) H15 年 12 月 10 日

20. 浅田洋平^{1,4}, 石原亨^{1,4}, 宮川恒^{1,4}, 矢部尚登^{2,4}, 若狭暁^{3,4} (1 京大院, 農, 東大院, 理, 3 農研機構, 作物研, 4 科技振機構, CREST)
フィードバック非感受性アントラニル酸合成酵素を導入したシロイヌナズナにおける代謝変動の解析
日本農薬学会 第 29 回大会 (神戸市 神戸大学) H16 年 3 月 25～26 日

21. 松田史生¹, 宮沢春奈^{1,2}, 山田哲也¹, 宮川恒^{1,2}, 若狭暁^{1,3} (1 CREST, 2 京大院・農, 3 作物研)
トリプトファン過剰生産型遺伝子組換えバレイショの性状解析
日本植物生理学会 2004 年度東京年会 (東京) H16 年 3 月 27～29 日

22. 宮沢春奈^{1,3}, 松田史生³, 若狭暁^{2,3}, 宮川恒^{1,3} (1 京大院農 応用生命科学, 2 農研機構 作物研究所, 3 CREST)
LC/MS/MS を用いた indole-3-acetic acid の定量法
日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島) H16 年 3 月 29～31 日

23. 森野桂子^{1,3}, 松田史生³, 若狭暁^{2,3}, 宮川恒^{1,3} (1 京大院農 応用生命科学, 2 農研機構

作物研究所, 3 CREST)

改変アントラニル酸合成酵素遺伝子導入イネカルスが生産する新規インドール化合物

日本農芸化学会 2004 年度大会 広島 H16 年 3 月 29～31 日

24. 戸澤譲^{1,2}, 菅野拓也^{1,2}, 平野信孝³, 高井和幸¹ (1 愛媛大, 無細胞セ, 2CREST, 愛媛大ベンチャービジネスラボ)

Wheat-Embryo Cell-Free Protein Expression System for Protein Engineering

The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science 神奈川県横浜市, 平成 16 年 4 月 15 日

25. Morino, K.^{1,2}, H. Miyazawa^{1,2}, T. Yonemoto^{1,2}, F. Matsuda², H. Miyagawa^{1,2} & K. Wakasa^{2,3} (1 京大院農, 2CREST, 3 作物研)

Secondary metabolism in transgenic rice expressing feedback-insensitive anthranilate synthase gene
3rd Pan Pacific Conference on Pesticide Science ハワイ 平成 16 年 6 月

26. Kanno¹, T., K. Wakasa² & Y. Tozawa¹ (1 愛媛大, CREST, 2 作物研, CREST)

Functional analysis of rice anthranilate synthase by wheat germ cell-free system

7th Intl. Congress of Plant Molecular Biology バルセロナ市 平成 16 年 6 月 23 日～28 日

27. Wakasa, K.^{1,2}, Y. Tozawa^{1,2}, H. Hasegawa³, T. Terakawa³, H. Nemoto¹, A. Komatsu^{1,2}, T. Yamada², K. Morino^{2,4} & H. Miyagawa^{2,4} (1 作物研, 2CREST, 3 北興化学工業, 4 京大院農)

Transgenic rice carrying the feedback-insensitive anthranilate synthase α subunit gene leads to high tryptophan content in seeds

7th Intl. Congress of Plant Molecular Biology バルセロナ市 平成 16 年 6 月 23 日～28 日

28. Komatsu, A.^{1,2}, M. Kawagishi-Kobayashi^{1,2}, Y. Nishizawa³, H. Hasegawa⁴, T. Yamada², K. Sugimoto³ & K. Wakasa^{1,2} (1 作物研, 2CREST, 3 生物研, 4 北興化学工業)

Evaluation of the mutated rice anthranilate synthase gene as a novel selection marker

7th Intl. Congress of Plant Molecular Biology バルセロナ市 平成 16 年 6 月 23 日～28 日

29. 戸澤譲 (愛媛大, 無細胞セ, CREST)

Wheat-Embryo Cell-Free Protein Expression System for Post-Genome Research

2004 International Conference on Aminoacyl-tRNA Synthases 韓国ソウル市, 平成 16 年 7 月 8 日

30. 矢部尚登^{1,4}, 土屋瑞穂⁴, 浅田洋平^{2,4}, 石原亨^{2,4}, 米田好文¹, 若狭暁^{3,4} (1 東大院・理, 2 京大院・農, 3 農研機構・作物研, 4 科技振機構・CREST)

Isolation and characterization of a novel 5-MT resistant mutant accumulating high level of indole glucosinolates.

Gordon Research Conference on Plant Molecular Biology, USA 平成 16 年 7 月 18 日～23 日

31. 石本政男^{1,2}, 若狭 暁^{2,3} (1. 北農研, 2. CREST, 3. 作物研)

ダイズへの遺伝子導入技術とアミノ酸代謝制御による種子アミノ酸組成の改変

2004 年日本土壌肥料学会 福岡大会 植物栄養部門シンポジウム 平成 16 年 9 月 14～16 日

32. 喜多洋一¹, 北山雅彦¹, 高橋将一², 若狭暁^{3,4}, 石本政男^{4,5} (1. 愛媛女子短大, 2. 九農研, 3. 作物研, 4. CREST, 5. 北農研)

不定胚を用いた形質転換系に適したダイズ系統の育成と組換え体の作出

日本育種学会第 106 回講演会 平成 16 年 9 月 21～22 日

33. 石本政男^{1,2}, 中本有美², 若狭 暁^{2,3} (1. 北農研, 2. CREST, 3. 作物研)

OASA1D の導入による高 Trp 含有ダイズの作出

日本育種学会第 106 回講演会 平成 16 年 9 月 21～22 日

34. 小松 晃^{1,3}, 長谷川久和², 大武美樹³, 寺川輝彦², 若狭 暁^{1,3} (1.農研機構・作物研, 2. 北興化学開発研, 3.CREST)

ウイスカ直接導入法による改変 *OASAI* 遺伝子導入形質転換イネの特性解析

日本育種学会第 106 回講演会 平成 16 年 9 月 21～22 日

35. 戸澤 譲^{1,2}, 笠井光治², 菅野拓也^{1,2}, 若狭 狭^{2,3}, 遠藤彌重太¹ (1 愛媛大・CSTRC, 2JST/CREST, 3 農研機構・作物研)

植物葉緑体における 70S リボソーム依存型(p)ppGpp 合成酵素活性の生化学的解析

第 27 回日本分子生物学会年会 H16 年 12 月 8 日～11 日

36. 笠井光治¹, 菅野拓也^{1,2}, 池尻(菅野)泰子², 若狭 狭^{1,3}, 戸澤 譲^{1,2} (1JST/CREST, 2 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 3 農研機構・作物研究所)

小麦無細胞タンパク質合成系を用いたイネシキミ酸経路酵素群の機能解析 II

第 27 回日本分子生物学会年会 H16 年 12 月 8 日～11 日

37. 菅野拓也^{1,2}, 笠井光治², 菅野(池尻)泰子¹, 小松 晃^{2,3}, 若狭 暁^{2,3}, 戸澤 譲^{1,2} (1 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター, 2JST・CREST, 3 農研機構・作物研)

小麦無細胞タンパク質合成系を用いたイネシキミ酸経路酵素群の機能解析 I

第 27 回日本分子生物学会年会 H16 年 12 月 8 日～11 日

38. 矢部尚登^{1,4}, 土屋瑞穂⁴, 浅田洋平^{2,4}, 石原亨^{2,4}, 米田好文¹, 若狭暁^{3,4} (1 東大院・理, 2 京大院・農, 3 農研機構・作物研, 4 科技団・CREST)

シロイヌナズナ新奇 5MT 抵抗性変異体 *rmt-1* の単離と解析

第 27 回日本分子生物学会年会 H16 年 12 月 8 日～11 日

39. 喜多洋一¹, 北山雅彦¹, 高橋将一², 若狭暁^{3,4}, 石本政男^{4,5} (1. 愛媛女子短大, 2. 九農研, 3. 作物研, 4. CREST, 5. 北農研)

不定胚を用いた形質転換系に適したダイズ系統の育成と組換え体の作出

第25回種子生理生化学研究会 平成16年12月10日

40. 石本政男^{1,2}, 中本有美², 山本直樹³, 柴田大輔⁴, 若狭暁^{2,5} (1. 北農研, 2. CREST, 3. 東北大院理学, 4. かずさ DNA 研, 5. 作物研)

ダイズ BAC ライブラリーの構築と遺伝子単離への利用

第25回種子生理生化学研究会 平成16年12月10日

41. 山田 哲也^{1,2}, 喜多村 啓介¹, 若狭 暁^{2,3} (1 北大大学院, 2 科技振機構, 3 作物研)

植物の芳香族アミノ酸合成経路の解明とその利用

第 2 回十勝農学談話会講演会 平成 17 年 2 月 7 日

42. 浅田洋平^{1,4}, 石原亨^{1,4}, 宮川恒^{1,4}, 矢部尚登^{1,4}, 土屋瑞穂⁴, 若狭暁^{3,4} (1 京大院, 農, 2 東大院, 理, 3 農研機構, 作物研, 4 科技構 CREST)

シロイヌナズナ 5MT 耐性突然変異体 *rmt1* における代謝変動の解析

日本農薬学会第 30 回大会 平成 17 年 3 月 19～20 日

43. 小松 晃^{1,3}, 大武美樹³, 杉本和彦², 川岸万紀子^{1,3}, 若狭 暁^{1,3} (1.農研機構・作物研, 2. 生物研, 3.CREST)

イネ Rubisco activase プロモーターの発現特性解析と形質転換体による物質生産への利用

第46回日本植物生理学会年会 平成17年3月24～26日

44. 松田史生¹, 山田哲也^{1,2}, 宮川恒^{1,3}, 若狭暁^{1,4} (1CREST, 2北大院・農, 3京大院・農, 4作物研)

Trp アナログ耐性変異体(MTR1)イネカルの代謝プロファイル分析

第46回日本植物生理学会年会 平成17年3月24～26日

45. 甲斐建次^{1,3}, 松田史生³, 若狭暁^{2,3}, 宮川恒^{1,3} (1京大院農, 2作物研, 3CREST)
シロイヌナズナにおける IAA 代謝物の定量分析および新規代謝物の検索 第46回日本植物生理学会年会 平成17年3月24～26日

46. Joseph Dubouzet^{1,2}, 若狭 暁^{1,2} (1.農研機構・作物研, 2. CREST)

Trp 蓄積イネのメチルジャスモン酸処理による代謝系遺伝子のマイクロアレイ解析

第46回日本植物生理学会年会 平成17年3月24～26日

47. 松田 史生¹, 宮川 恒^{1,2}, 若狭 暁^{1,3} (1CREST, 2京大院・農, 3作物研)

Trp 生合成系改変イネカルの代謝プロファイル分析への HPLC-ESI-Q-MS の利用

日本農芸化学会 2005 年度大会(札幌) 平成17年3月28～30日

48. 神山亜鐘¹, 平竹 潤¹, 宮澤春奈^{2,3}, 松田史生^{2,3}, 宮川 恒^{2,3}, 坂田完三¹ (1京大化研, 2京大院農・応用生命, 3CREST)

IAA-アミノ酸複合体の重水素ラベル体の合成

日本農芸化学会 2005 年度大会(札幌) 平成17年3月29～30日

49. 甲斐建次^{1,3}, 松田史生³, 若狭暁^{2,3}, 宮川恒^{1,3} (1京大院農, 2作物研, 3CREST)

イネにおける IAA 代謝物の定量分析および新規代謝物の検索

日本農芸化学会 2005 年度大会(札幌) 平成17年3月29～30日

50. 宮澤 春奈^{1,2}, 松田 史生², 若狭 暁^{2,3}, 宮川 恒^{1,2} (1京大院農, 2CREST, 3作物研)

改変アントラニル酸合成酵素遺伝子を導入した Trp 高生産性イネにおけるインドール-3-酢酸の定量

日本農芸化学会 2005 年度大会(札幌) 平成17年3月29～30日

51. 松田 史生 (科学技術振興機構)

Metabolic profiling analysis of tryptophan-analog resistant rice calli

Metabolomics2005: The First International Conference of the Metabolomics Society

山形県鶴岡市 平成17年6月21日

52. M.S. Hanafy^{1,2}, M.M. Khalafalla^{2,3}, R.S. Mizanur^{2,3}, 中本有美², 石本政男^{1,2}, 若狭 暁(1.北農研, 2. CREST, 3. 近中四農研, 4. 作物研)

Enhancement of tryptophan accumulation in two grain legumes, azuki bean and soybean, expressing a modified rice anthranilate synthase α subunit (OASA1D)

Plant Biology 2005 (The Annual Meeting of The American Society of Plant Biologists) 平成17年7月17日

53. 若狭 暁(農研機構作物研・東京農業大学)

高トリプトファン遺伝子組換えイネとその一般ほ場栽培

第23回日本植物細胞分子生物学会シンポジウム 京都市京都大学 平成17年8月5日

54. 松田 史生 (科学技術振興機構)

第 23 回日本植物細胞分子生物学会シンポジウム 京都市京都大学 平成 17 年 8 月 6 日

55. 山田哲也^{1,2}, 福岡修一³, 松田史生², 櫻井美奈子², 宮川友子², 喜多村啓介¹, 宮川恒^{2,4}, 若狭暁^{2,5,6} (¹北大院農, ²CREST, ³生物研, ⁴京大院農, ⁵作物研, ⁶東京農大)

5MT 抵抗性イネ突然変異体の遺伝解析

日本育種学会第 107・108 回講演会 平成 17 年 8 月 19 日～21 日

56. 長井 徹^{1,4}, 甲斐建次^{1,4}, 宮澤春奈^{1,4}, 松田史生⁴, 矢部尚登^{2,4}, 若狭暁^{3,4} 宮川^{1,4} (¹京大院農, ²東大院理, ³東農大, ⁴科技構 CREST)

トリプトファン高生産型形質転換シロイヌナズナにおける IAA の定量

日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会 平成 17 年 10 月 1 日

57. 甲斐建次^{1,4}, 堀田順子², 若狭暁^{3,4}, 宮川恒^{1,4} (¹京大院農, ²京大・農, ³東農大, ⁴JST/CREST)

シロイヌナズナの新規インドール-3-酢酸代謝物の探索および同定

植物化学調節学会第 40 回大会 平成 17 年 10 月 31 日

58. 松田史生¹, 宮沢春奈^{1,2}, 若狭 暁^{1,3}, 宮川 恒^{1,2} (¹JST/CREST, ²京大院農, ³東農大)

トリプトファンの過剰蓄積がイネのインドール-3-酢酸含量に及ぼす影響

植物化学調節学会第 40 回大会 平成 17 年 10 月 31 日

59. 岡田淳¹, 山田哲也^{1,2}, 石本政男^{2,3}, 喜多洋一¹, 若狭暁^{2,4}, 喜多村啓介¹ (¹北大院農, ²CREST, ³北農研, ⁴東京農大)

変異型イネ推定プレフェン酸デヒドラターゼ遺伝子を発現するダイズ形質転換体の作出

種子生理生化学研究会 平成 17 年 12 月 2 日～3 日

60. 甲斐建次^{1,2}, 堀田順子¹, 若狭暁^{2,3}, 宮川 恒^{1,2} (1.京大 2.CREST/JST, 3.東農大)

New metabolites of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*

環太平洋国際化学会議 Pacifichem2005 平成 17 年 12 月 16 日

61. 松田史生¹, 高梨功次郎^{1,2}, 森野桂子^{1,2}, 宮川恒^{1,2}, 若狭暁^{1,3} (1CREST/JST, 2 京大院・農, 3 東農大農)

トリプトファン過剰生産型遺伝子組換えイネ植物体の代謝プロファイル分析

第 47 回日本植物生理学会年会 平成 18 年 3 月 19～21 日

62. 笠井光治 (科学技術振興機構)

無細胞タンパク質合成技術を用いた植物酵素の機能改変

日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都女子大 他 平成 18 年 3 月 25 日～3 月 28 日

63. 高梨功次郎¹, 松田史生², 石本政男^{2,3}, 若狭暁^{2,4}, 宮川恒^{1,2} (1 京大院農, 2 科技構 CREST, 3北海道農研センター, 4 東農大農)

トリプトファン高生産形質転換ダイズの代謝プロファイリング

日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都女子大 他 平成 18 年 3 月 25～28 日

64. 甲斐 建次^{1,2}, 堀田 順子¹, 若狭 暁^{2,3}, 宮川 恒^{1,2} (¹京大院農・応用生命, ²科技構 CREST, ³東農大農)

シロイヌナズナの新規 IAA 代謝物 6-hydroxyindol-3-ylacetic acid

日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都女子大 他 平成 18 年 3 月 25～28 日

65. 松田史生¹, J. Dubouzet¹, 宮川 恒^{1,2}, 若狭 暁^{1,3} (1. CREST, 2. 京大院農, 3. 東京農大)
OASA1D:TDC3 形質転換イネの代謝変動解析
日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都女子大 他 平成 18 年 3 月 25~28 日
66. 高橋香隆^{1,4}, 石原亨^{1,4}, 宮川恒^{1,4}, 矢部尚登^{2,4}, 若狭暁^{3,4} (1 京大院, 農, 2 東大院, 理, 3 東京農大, 農, 4 科技構 CREST)
シロイヌナズナ 5MT 耐性突然変異体 *rmt1* におけるグルコシノレート代謝の解析
日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都女子大 他 平成 18 年 3 月 27 日
67. 中本有美¹, M.S. Hanafy^{1,2}, S.M. Rahman^{1,3}, 藤原 徹⁴, 若狭 暁^{1,5}, 石本政男^{1,2} (1. CREST, 2. 北農研, 3. 近農研, 4. 東大, 5. 東農大)
シロイヌナズナのシスタチオニン γ -合成酵素遺伝子を導入したダイズとアズキにおける遊離メチオニンの増加
日本育種学会第 109 回講演会, 東京農工大学 平成 18 年 3 月 29~30 日
68. 山田哲也^{1,2}, 松田史生², 櫻井美奈子², 宮川友子², 宮川恒^{2,3}, 喜多村啓介¹, 若狭暁^{2,4,5} (1 北大院農, 2 CREST, 3 京大院農, 4 作物研, 5 東京農大)
フェニルアラニンを過剰に生産するイネ形質転換体の作出
日本育種学会第 109 回講演会, 東京農工大学 平成 18 年 3 月 29~30 日
69. 石本政男^{1,2}, 喜多洋一¹, 中本有美², 高橋将一³, 若狭 暁^{1,4} (1. 北農研, 2. CREST, 3. 九農研, 4. 東農大)
Seed protein deficiency does not affect levels of tryptophan accumulation in transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], expressing the feedback-insensitive anthranilate synthase gene (*OASA1D*)
The 8th International Congress on Plant Molecular Biology 平成 18 年 8 月 21~25 日
70. 山田哲也^{1,2}, 松田史生², 笠井光治², 戸澤 譲^{2,3}, 櫻井美奈子², 宮川友子², 宮川恒^{2,4}, 喜多村啓介¹, 若狭暁^{2,5} (1 北大院農, 2 CREST, 3 愛媛大, 4 京大院農, 5 東京農大)
A feedback-insensitive rice enzyme in phenylalanine biosynthesis causes accumulation of phenylalanine and tryptophan.
The 8th International Congress on Plant Molecular Biology 平成 18 年 8 月 21~25 日
71. 佐藤洋¹, 岡田淳¹, 山田哲也^{1,2}, 石本政男^{2,3}, 喜多洋一¹, 若狭暁^{2,4}, 喜多村啓介¹ (1 北大院農, 2 CREST, 3 北農研, 4 東京農大)
フェニルアラニンを蓄積する形質転換ダイズの作出 (平成 18 年)
日本育種学会第 110 回講演会 愛媛大学 平成 18 年 9 月 22~23 日
72. 戸澤譲 (愛媛大, 無細胞セ, CREST)
Applications of Cell-Free Technology to Metabolic Engineering
The 4th International Symposium on Cell-Free Sciences 愛媛県松山市, 平成 18 年 10 月 6 日
73. 甲斐健次^{1,3}, 若狭暁^{2,3}, 宮川恒^{1,3} (1 京大院農, 2 東農大, 3 JST/CEST)
イネの新規 IAA 代謝物 *N*-glucosyl IAA およびそのアミノ酸結合体
植物化学調節学会第 41 回大会 平成 18 年 10 月 30~31 日, 大阪
74. 甲斐健次^{1,3}, 堀田順子², 中村俊介², 若狭暁^{3,4}, 宮川恒^{1,3} (1 京大院農, 2 京大農, 3 東農大, 4 JST/CEST)
トウモロコシの *N*-glucosyl IAA のエステル体の探索と同定
植物化学調節学会第 41 回大会 平成 18 年 10 月 30~31 日, 大阪

75. 若狭 暁（東農大）

High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile

Ecological and Environmental Biosafety of Transgenic Plants Proceedings, 163-190 (2006) 台北市
平成 18 年 12 月 8 日

(4)特許出願

① 国内出願(10件)

1. 発明の名称:カルス特異的発現プロモーターを含むプラスミド及び形質転換された植物細胞カルスの選抜方法

発明者:若狭暁・小松晃・西澤洋子

出願人:科学技術振興事業団・農業技術研究機構・農業生物資源研究所

出願日:平成 14 年 3 月 18 日

出願番号:特願 第 2002-073951 号

2. 発明の名称:植物 DNA 溶出試薬及び植物 DNA キット

発明者:矢部尚登・若狭暁

出願人:科学技術振興事業団・農業技術研究機構

出願日:平成 15 年 3 月 26 日

出願番号:特願 第 2003-084164 号

3. 発明の名称:植物 DNA 抽出キット及び植物 DNA の抽出方法

発明者:矢部尚登・若狭暁

出願人:科学技術振興事業団・農業技術研究機構

出願日:平成 15 年 3 月 26 日

出願番号:特願 第 2003-084168 号

4. 発明の名称:緑色組織特異的プロモーター

発明者:若狭暁・小松晃・杉本和彦

出願人:科学技術振興事業団・農業技術研究機構・農業生物資源研究所

出願日:平成 15 年 6 月 2 日

出願番号:特願 第 2003-156655 号

5. 発明の名称:変異タンパク質の機能変化のスクリーニング方法およびその利用

発明者:戸澤譲・菅野拓也・若狭暁

出願人:科学技術振興機構・三菱化学株式会社・農業・生物系特定産業技術研究機構・戸澤譲

出願日:平成 16 年 3 月 4 日

出願番号:特願 第 2004-061415 号

6. 発明の名称:イネのアントラニル酸合成酵素遺伝子 OASA2 の新規改変遺伝子およびその利用

発明者:戸澤譲・菅野拓也・若狭暁

出願人:愛媛大学・科学技術振興機構・農業・生物系特定産業技術研究機構

出願日:平成 16 年 4 月 13 日

出願番号:特願 第 2004-118430 号

7. 発明の名称:Trp 含有ダイズ, およびその利用

発明者:石本政男・若狭暁・中本有美

出願人:科学技術振興機構・農業・生物系特定産業技術研究機構

出願日:平成 16 年 9 月 17 日
出願番号:特願 第 2004-272540 号

8. 発明の名称:IGs 合成に関与する遺伝子, およびIGsを高レベルに蓄積する変異植物
発明者: 矢部尚登・若狭暁・石原亨・土屋瑞穂
出願人:科学技術振興機構・京都大学・農業・生物系特定産業技術研究機構
出願日:平成 16 年 10 月 25 日
出願番号:特願 第 2004-310232 号

9.発明の名称:イネのアントラニル酸合成酵素遺伝子 OASA2 の新規改変遺伝子及びその利用
発明者:戸澤譲・菅野拓也・若狭暁
出願人:愛媛大学・科学技術振興機構・農業・生物系特定産業技術研究機構
出願日:平成 17 年 2 月 28 日
出願番号:特願 第 2005-055165 号

10.発明の名称:フェニルアラニンの合成に関与する遺伝子, および, フェニルアラニンを高レベルに蓄積する変異植物
発明者:若狭暁・山田哲也・松田史生
出願人:農業・生物系特定産業技術研究機構・北海道大学・科学技術振興機構
出願日:平成 17 年 10 月 25 日
出願番号:特願 第 2005-309408 号 (特願 2004-310230 の国内優先権主張出願)

② 海外出願(1 件)

1. 発明の名称:イネのアントラニル酸合成酵素遺伝子OASA2の新規改変遺伝子及びその利用
発明者:戸澤譲・菅野拓也・若狭暁
出願人:愛媛大学・科学技術振興機構・農業・生物系特定産業技術研究機構
出願日:平成 17 年 7 月 29 日
出願番号:PCT/JP2005/01888708
国内出願番号:特願 第 2005-055165 号 (平成 17 年 2 月 28 日出願)

(5)受賞等

①受賞

石原 亨(京都大学グループ)
日本農薬学会奨励賞(平成 16 年)「アベナンスラミド類の生合成誘導機構に関する研究」

②新聞報道

日経バイオテク 2006.3.10「コムギ無細胞たんぱく質合成技術を応用した全工程 in vitro システムで植物酵素機能を改良, イネの Trp 含有量を数百倍に向上」

③その他

(6)その他特記事項

7 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成13年 12月3日	第1回研究チーム内 研究成果発表会	作物研究所(つく ば市)	7人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成14年 3月11日	第2回研究チーム内 研究成果発表会	作物研究所(つく ば市)	9人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成14年 7月1日	第3回研究チーム内 研究成果発表会	横浜市立大学 木原生物学研究 所(横浜市)	15人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成14年 11月11日 ～12日	第4回研究チーム内 研究成果発表会	メルパルク横浜 (横浜市)	14人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成15年3 月12日	第5回研究チーム内 研究成果発表会	農業技術研究機 構 作物研究所 (つくば市)	11人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成15年7 月16日	第6回研究チーム内 研究成果発表会	「植物の機能と制 御」研究事務所 (東京都)	17人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成15年 11月18日 ～19日	第7回研究チーム内 研究成果発表会	愛媛大学 無細 胞生命科学工学 研究センター(松 山市)	20人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成16年 3月18日～ 19日	第8回研究チーム内 研究成果発表会	農業・生物系特 定産業技術研究 機構 作物研究 所(つくば市)	17人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成16年 9月9日～ 10日	第9回研究チーム内 研究成果発表会	京都大学 (京都市)	16人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成17年2 月28日～3 月1日	第10回研究チーム 内 研究成果発表 会	農業・生物系特 定産業技術研究 機構 作物研究 所(つくば市)	15人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成17年9 月6日～7 日	第11回研究チーム 内 研究成果発表 会	東京農業大学 (厚木市)	16人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成18年3 月1日～2 日	第12回研究チーム 内 研究成果発表 会	東京農業大学 (厚木市)	13人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ
平成18年 9月25日 ～26日	第13回研究チーム 内 研究成果発表 会	「植物の機能と制 御」研究事務所 (東京都)	11人	研究成果発表と方向性 に関する取りまとめ

8 結び

初期の目標である Trp 含量を高めたイネの実用性を、遺伝子の効果、育種を意識した農業形質、代謝変動の面などから確認し、さらに他作物を対象とした場合の普遍性についても確認することができた。さらに、当初の酵素よりさらに効率のよい新規改変型酵素を創ることもでき、今後は、実際に飼料作物に導入して品種を開発することが残されている。実用化が実現するようライセンス化して企業の協力を得ていきたいと考えている。

後半の目標は二次代謝化合物の遺伝子操作の道筋をさぐることであった。そのため、新たな代謝系突然変異体の解析と Trp を蓄積したイネへ新たな酵素遺伝子の導入をはかった。突然変異体の解析は原因遺伝子を確定することができ、これまでに知られていない代謝系変異体であることが判明した。この過程で新たな代謝ネットワークの存在が示唆されており、今後、研究を継続していく予定である。新たな酵素遺伝子の導入は、チームリーダーの異動があったため、研究環境の再構築、メンバーの変更などから進展が遅れたことは残念である。また、後半の課題の多くは、現在論文投稿中あるいは準備中のため、論文成果としてここに示せない点も残念である。

本チームでは専門分野の異なるメンバーが Trp 代謝に関して多方面から取り組んだ。5年間の間には、主要メンバーほぼ全員の所属やポジションに変化があったが、常にチームがめざすものに全員が協力し合って進めることができた。年に2-3回行われた全員での討議は非常に有意義で楽しいものであった。博士研究員は非常にプロダクティブで、プロジェクト研究における役割の重要性を再認識させられた。概して、楽しく研究活動を進めることができたのは、メンバーの協力と本領域事務所の多大な配慮のお陰であると感謝している。我々が受けたような他戦略的創造研究推進事業のサポートは大変優れていたと思う。

このような研究の機会を与えて下さった科学技術振興機構と総括の鈴木昭憲先生、また、5年間多大なサポートをいただいた井上悟技術参事、事務参事の方々、高橋紀子さんに心から感謝いたします。



第7回研究チーム会議にて
日時：2003年11月18日（火）～19日（水）