

転写因子MYB12を過剰発現させた高フラボノイドダイズの作出

山田 哲也 [北海道大学大学院農学研究院／助教]

背景・目的

ダイズ種子は、良質なタンパク質や油脂のほか、機能性成分として知られている多数の二次代謝化合物を含む。中でも、インフラボンは更年期障害の予防、がん抑制作用および骨粗鬆症予防など様々な薬理活性があり、その利用性が注目を浴びている。インフラボンを含めフラボノイドの生合成に関連する酵素遺伝子の発現は環境変動に影響を受けることが多く、これらの遺伝子発現を一括制御することがフラボノイド含量の高位安定化に繋がると考えられる。そこで、形質転換技術を利用してダイズにフラボノイドの生合成に関連する転写因子を導入し、種子におけるフラボノイド組成の改変を試みる。

内容・方法

(1) ミヤコグサにおける転写因子遺伝子の単離とその機能解析

フラボノイドの生合成に関する基礎的研究は、シロイスナズナで先行している。一方、マメ科植物にはインフラボンなど特有のフラボノイドを生合成する経路が存在し、その生合成の制御機序は不明な点も多い。よって、ダイズにおける機能性を考慮して、マメ科植物からフラボノイドの生合成に関わる酵素遺伝子の発現を制御すると考えられる転写因子の単離を試みた。現在、マメ科で最もゲノム研究が進んでいるモデル植物のミヤコグサから、フラボノイドの生合成に関わる酵素遺伝子の発現を制御すると考えられる転写因子の一つMYB12をコードする遺伝子の単離を試みた。さらに、*MYB12*遺伝子を過剰発現するミヤコグサの形質転換体を作出し、当転写因子の機能解析を行った。特に、フラボノイド生合成に関連する酵素遺伝子の発現制御との関係を精査した。

(2) *MYB12*遺伝子を種子で過剰発現するダイズ形質転換体の作出

ダイズの種子において目的遺伝子が強発現できるようベクターを構築した。ダイズの形質転換は、アグロバクテリウムを介して行った。なお、その方法は申請者らが開発した「ダイズ品種カリユタカを用いた簡便かつ迅速な形質転換方法」を利用して、形質転換体の作出を試みた。本方法はカリユタカが培養中に花芽をつける性質を利用したもので、短期間に形質転換体系統を育成できる利点がある。

結果・成果

アラビドプシスの *AtMYB12* 遺伝子配列を基にして、ミヤコグサから目的遺伝子を単離した。単離した遺伝子

の推定アミノ酸配列に、*AtMYB12* に見られる特有のモチーフが認められた。単離した遺伝子は *LjMYB12* 遺伝子として遺伝子データベースに登録した(登録番号: AB 334529)。次に、*LjMYB12* 遺伝子を恒常に強発現させることができるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御下にもつ、ミヤコグサ形質転換系統を多数作出了した。これらの系統における *LjMYB12* 遺伝子の発現解析結果から、*LjMYB12* 遺伝子を強発現する数系統を選抜した。選抜した系統とコントロール系統の各遺伝子の発現を比較することで、*LjMYB12* 転写因子がどういった酵素遺伝子の発現に関与しているか機能解析を行った。その結果、*LjMYB12* 遺伝子を強発現する形質転換系統はコントロール系統と比べ、4-Coumarate: CoA ligase (4CL)、chaIcone synthase (CHS)、chaIcone isomerase (CHI)、Flavanone 3-hydroxylase (F3H) と Flavonol synthase (FLS) をコードする遺伝子の発現が高まる傾向にあった。これらの酵素遺伝子はフラボン、フラボノール、インフラボン及びアントシアニン等の生合成に関わると考えられる。しかしながら、*LjMYB12* 遺伝子強発現系統で茎部や葉柄部におけるアントシアニンによる着色が認められなかったことから、アントシアニンの生合成には別の大きな律速要因があると考えられた。また、ミヤコグサには CHS と CHI において複数の isoforms が存在し、その中でも *LjMYB12* は特定のものだけの発現を制御していることも明らかとなった。これは、isoform 間でより細分化した発現制御が行われていることを示唆している。これらのことから、*LjMYB12* はフラボノイド生合成に関わる酵素遺伝子の発現制御を行っており、これらの遺伝子発現の一括制御が可能であることが明らかになった。

ミヤコグサの形質転換実験結果を受けて、ダイズ品種カリユタカの種子における *LjMYB12* 遺伝子の過剰発現を試みた。*LjMYB12* 遺伝子をダイズの貯蔵タンパク質 11S グロブリン遺伝子のプロモーター制御下におき、アグロバクテリウムを介して目的遺伝子を導入した。外植片にアグロバクテリウム感染してから約 2~4 ヶ月後に、形質転換不定芽を得た。これら全ての不定芽において培養中に花芽形成が認められた。形質転換不定芽はその伸長や発根等の各段階で、枯死したものもあったが独立した 5 系統において次世代の種子を得ることができた。

現在、これらの系統における導入遺伝子の固定化は図るため世代を進めている。

今後の展望

形質転換ミヤコグサならびに形質転換ダイズとともに、世代を進め導入遺伝子の固定化を図った後、詳細な解析を行う。形質転換ミヤコグサに関しては、基礎的知見を得るための供試材料として扱うことができる。また、形質転換ダイズに関しては、形質転換ミヤコグサの実験で得た成果と同様に 4CL、CHS、CHI、F3H および FLS 遺伝子の発現が高くなることが予想される。また、4CL

はフラボノイド生合成の極めて前段階に位置する反応を触媒する酵素であり、フラボノイド総量の増大が期待される。さらに、フラボン、インフラボンおよびフラボノール組成が従来の種子における組成と大きく異なることも予想される。これら一連の研究から、酵素遺伝子の発現を一括制御することで、ダイズ種子に含まれるフラボノイド含量の高位安定化が期待される。