

アイズプラントのピニトール生合成経路の解析 — ピニトール高蓄積アイズプラントの作出をめざして —

Analysis of the Pinitol Biosynthesis pathway in *Mesembryanthemum crystallinum*

安田 直樹¹・上杉 晃作¹・久保 健一^{1,2}・蔡 晃植^{1,2}・今村(陣田) 綾^{1,2}

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部フロンティアバイオサイエンス学科

²長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Naoki Yasuda¹, Kosaku Uesugi¹, Kenichi Kubo^{1,2}, Fang-Sik Che^{1,2}, Aya Imamura-Jinda^{1,2}

¹Department of Frontier Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

²Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

要旨

アフリカ原産のアイズプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は、耐乾燥性、耐塩性をもつ植物でストレスに応答してピニトールなどの適合物質を蓄積することが知られている。我々はピニトールを高蓄積するアイズプラントの作出を目標としてその生合成経路に着目した。*myo*-イノシトールを基質とするイノシトールメチルトランスフェラーゼ (IMT) の下流の酵素の候補遺伝子を取得し、乾燥・塩ストレスに応答した発現プロファイルを確認し、本研究では McIMT を高発現するアイズプラントカルス細胞を作成した。この McIMT 過剰発現カルス細胞における IMT の下流の候補遺伝子の発現パターンからアイズプラントの IMT より下流の経路候補を推定するに至った。HPLC による分析を行いその現状についても報告する。

Mesembryanthemum crystallinum (*Mc*), ice plant, is known as drought and salt tolerant plant which accumulate osmo-protectants including *D*-ononitol (ononitol) and *D*-pinitol (pinitol). To establish the pinitol overexpressed transgenic ice plant, we focused its first step of biosynthetic enzyme, inositol methyl transferase (IMT) which catalyze the converse of *myo*-inositol to ononitol. We found that only McIMT overexpression is not enough to accumulate pinitol in plant and ononitol epimerase (OEP) catalyzing steps is similar to that of *Glycine max* (*Gm*).

1. アイズプラント *McIMT1* 過剰発現体の作成

アイズプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) はアフリカ原産の多肉植物で、表皮組織に塩分を隔離する塩囊細胞を発達させ高塩濃度土壌でも生育できる。この植物に乾燥や塩などの環境ストレスを与えると光合成型を C3 型から CAM 型へ変換し、同時にピニトールなどの環境適合物質を生合成し適応する。ピニトールは *myo*-イノシトールの類縁体で、人体では中性脂肪の増加抑制や内臓脂肪の低減、血糖値を正常化する等の効果が期待されている¹⁾。そこで、アイズプラントのピニトール生合成経路に着目

してピニトールを高生産・高蓄積が可能か検討した。

1. 1 ピニトール生合成経路について

ピニトールが確認されている植物としてアイスプラントの他にマメ科のタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) やダイズ (*Glycine max*) がある²⁾。これまでに *myo*-イノシトールはイノシトール

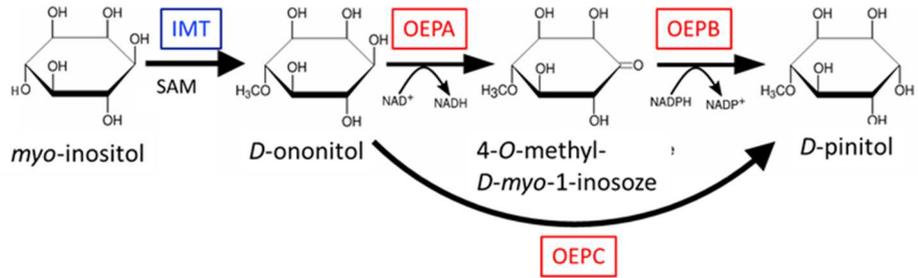


図1 ピニトール合成経路

ールメチルトランスフェラーゼ(IMT)によるメチル基の転移によりオノニトールに、その後オノニトールエピメラーゼ(OEP)によりピニトールが合成されることが明らかにされた。アイスプラント *McIMT* は同定されていたが、その下流については不明であった³⁾。ダイズではピニトール合成経路における *GmIMT*, *GmOEP* の活性も *in vitro* で確認され、これらの過剰発現に伴う耐塩性、耐乾燥性の増加もシロイヌナズナで確認された⁴⁾⁵⁾⁶⁾。タルウマゴヤシでは2種類の OEP が2段階でピニトール合成することも明らかにされている⁷⁾。

1. 1. 1 アイスプラント OEP の cDNA 取得と発現パターン

タルウマゴヤシ、ダイズの各種 OEP の配列をもとにプライマーを設計し、ストレス条件下で栽培したアイスプラントの cDNA ライブラリーから PCR による増幅を試み、プラスミドにクローニングしてその塩基配列を決定した⁸⁾。その結果アイスプラントにはタルウマゴヤシ 2 種類の *MtOEP* それぞれと約 60% 相同性のある *McOEPAL1/L2*, *McOEPB1*、およびダイズ *GmOEP* と約 70% 相同性のある

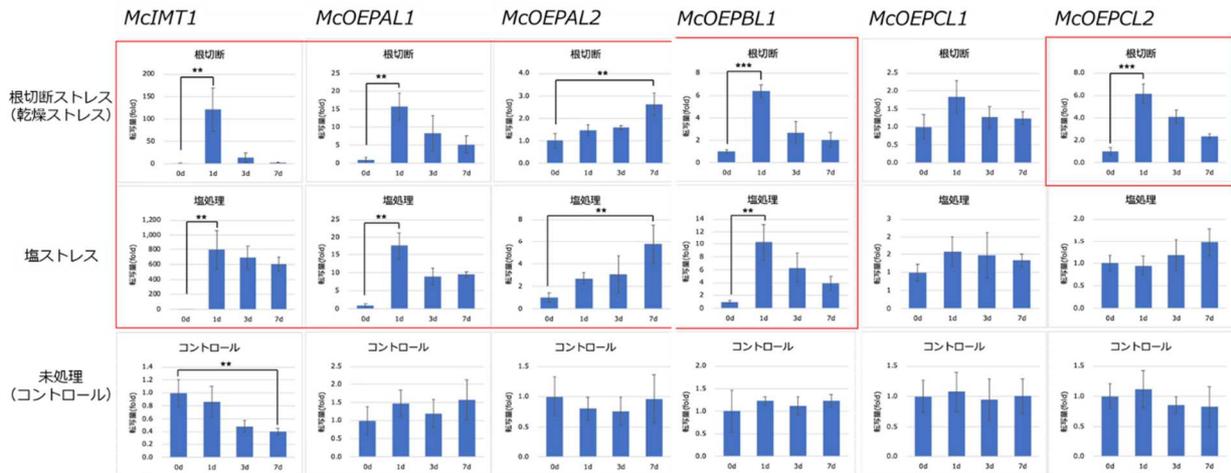


図2 根切断ストレス、塩ストレス条件におけるピニトール合成経路候補遺伝子の発現誘導

McOEPCL2 の存在が確認できた。そこで *McIMT* と *McOEP* 遺伝子群の根の切断による乾燥ストレスおよび塩ストレス条件下(0、1、2、3時間後)での遺伝子発現を定量 PCR で解析した(図2)。その結果、*IMT1*、*OEPAL1*、*OEPAL2*、*OEPBL1* については根の切断および塩ストレスによって転写誘導され、

OEPCL2 は根切断ストレスのときのみ転写誘導された。ただし、*OEPAL1* と *OEPAL2* では、その誘導パターンが異なり *OEPAL1* のほうが *IMT1* と同様のパターンを示した。*OEPCL1* については転写誘導は見られなかった⁹⁾。以上のことから、アイスプラントのピニトール生合成では *IMT* と *OEP* によってピニトールが合成されている可能性が示唆できたが、*OEP* の過程は2種類とも遺伝子発現はみられ2つの経路が機能していることが推測された。*myo*-イノシトールを基質とする初段階の *McIMT* は最も転写量の変化が大きかったため、この経路の律速段階なのではないかと考えた。

1. 2 *McIMT* 過剰発現アイスプラントの作成

1. 2. 1 アイスプラント形質転換条件について

アイスプラントで *IMT* (イノシトールメチルトランスフェラーゼ)タンパク質を過剰に発現させて、ピニトールが野生型よりも高蓄積するかどうかを検証するために、*McIMT1* および *GST-McIMT1* をアイスプラントで過剰発現させることを計画した。これまでに報告されているアグロバクテリウムを用いたアイスプラント組織片の遺伝子組換え法をもとに、組織片をカルス誘導培地 (MS 培地, 2.3 μM 2,4-D, 4.4 μM BAP) で前培養を行った後、アグロバクテリウム濃度 OD600=0.2 でカルス誘導組織片を 10 分間共培養後、アセトシリンゴン濃度 50 μM を含む MS 培地に数日間置床し、その後シュート誘導培地 (MS 培地, 0.5mg/L チジアズロン (TDZ), 1.0 mg/L ナフタレン酢酸 (NAA), 80mM NaCl, 100 nM ファイトスルフオカイン (PSK), 100 mg/L カルベニシリン) に選抜マーカーとして 100 mg/L カナマイシンを用いて 2 週間ごとに置床しなおして選抜培養を行った^{4) 10)11)12)13)14)15)16)17)18)}。

1. 2. 2 *McIMT1* 過剰発現アイスプラント形質転換体の作出

シュート誘導培地で培養を続けた結果、シュートの再分化は見られなかったが、カナマイシン (Km) 耐性を示したカルス細胞の増殖がみられた (図 4)。Km 耐性を示したカルス 1~10 について、*McIMT1* および *GST-McIMT1* の形質転換による T-DNA 挿入を、ゲノム PCR によって確認した (図 3)。*McIMT1* はアイスプラントゲノム上の遺伝子の増幅を示し、*McIMT1(ox)* は過剰発現させた

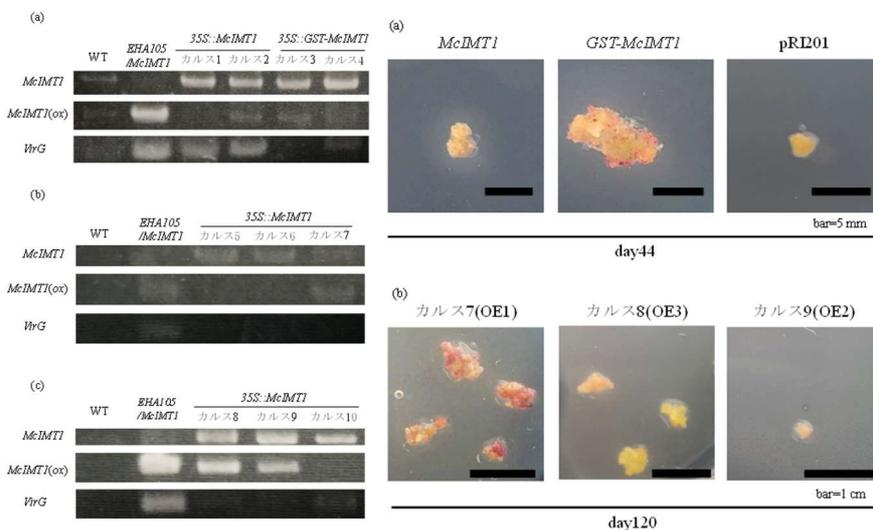


図 3 Km 耐性カルス系統の T-DNA の挿入確認

図 4 Km 耐性カルス

遺伝子の増幅結果を示す。*VirG* は形質転換に用いたバイナリーベクターに存在する感染関連遺伝子を示す。その結果 120 日間培養したカルス 8 (OE3), カルス 9 (OE2) で強く *McIMT1* が発現していることが確認できた (図 5)。

1. 2. 3 *McIMT1* 過剰発現させたときの OEP の発現パターンについて

120 日間培養して *McIMT1* の過剰発現が確認できたカルス (カルス 7:OE1、カルス 9:OE2、カルス 8:OE3) について発現量は OE1, OE2, OE3 の順に高い傾向がみられた (図 5a)。これらのラインについてピニトール合成経路の OEP 遺伝子群の発現量を確認したところ、*McOEPAL1*、*McOEPAL2*、*McOEPBL1* は IMT の発現量に反比例して少なくなる傾向がみられた (図 5b-d)。一方、*McOEPCL1*、*McOEPCL2* については OE2 のみ野生型より高い発現量がみられたが、他の 2 系統については発現量が増加していなかった (図 5e, f)。このことから、アイスプラントはタルウマゴヤシと同様に 2 種類の OEP (*McOEPAL*、*McOEPBL*) によるピニトール合成経路が主に機能しているのではないかと推察される。

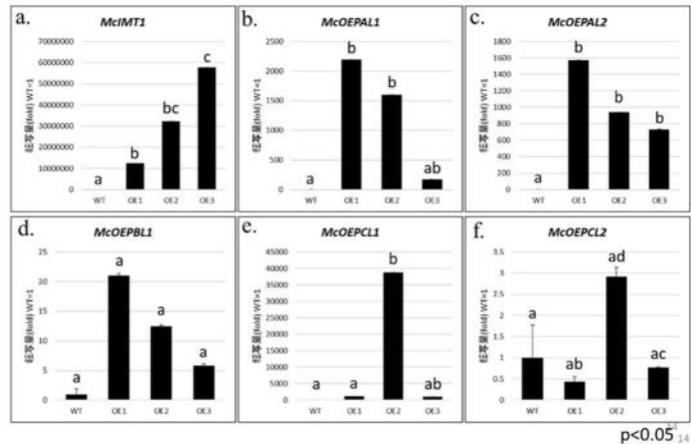


図 5 *McIMT1* 過剰発現カルスのピニトール合成経路候補遺伝子の発現量

2. *McIMT* 過剰発現アイスプラントのピニトール蓄積量の測定

形質転換したアイスプラントカルスで、*McIMT1* 遺伝子の過剰発現が確認できたので OE3 系統についてピニトールの分析を行うことにした

2. 1 HPLC によるピニトールの分析

アイスプラントカルスについて、ピニトール合成の基質:イノシトール、中間産物であるオノニトール、最終産物であるピニトールについて Sugar sp0810(shodex)カラムを用いて RI デテクター付きの HPLC (JASCO) で分析した¹⁹⁾。各標品: 特級 *myo*-イノシトール (Waco)、97 % D-オノニトール (BLD pharm)、98 % D-ピニトール (東京化成工業株式会社) 等量を混合して分析してみたところ、イノシトールは 12.717 min に独立したピークで検出できたが、オノニトールとピニトールのピークは 9.813 min に重なった。そこで、イノシトール、オノニトールとピニトールについてそれぞれ検量線を作成した。今回はこの条件で、イノシトールを基質とした IMT の酵素活性に注目することにした。

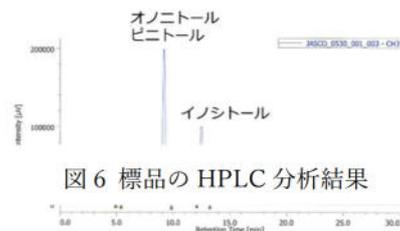


図 6 標品の HPLC 分析結果
 カラム: SP810 (8.0 mm x 300 mm), 検出: 示差屈折率計
 溶媒: 純水, 流速: 0.8 mL/min, 温度: 80°C
 分析時間: 30分間
 注入量: 30 μ L (イノシトール、オノニトール、ピニトール各100 μ g含む)

2. 2 McIMT 過剰発現アイスプラント (OE3) のオノニトール・ピニトール蓄積量からの課題

アイスプラント WT カルス(a)、*McIMT1* 過剰発現アイスプラントカルス(b)から、サンプルを調整して分析した(図7)。その結果図7のようにピークが検出されたので、イノシトールのピーク、オノニトールとピニトールのピークそれぞれの積分値から、2種のカルスサンプル 1mg あたりのイノシトール含有量、オノニトールとピニトールの含有量を求めた(図8)。その結果、イノシトールの含有量はわずかに減少したが、オノニトールとピニトール含有量は *McIMT1* 過剰発現カルスよりも、WT カルスの方が約 3.5 倍多かった。オノニトールとピニトールの合計量なのでこのうちのピニトールの割合が興味深い点だが、*McIMT1* を過剰発現させただけでは顕著に下流の代謝産物が蓄積されない可能性が示された。OE3 カルス系統以外の系統についても分析するとともに、ピニトール合成経路において *IMT* だけが律速になっているわけではない可能性も十分考えられ、下流の *OEP* にも注目するべきと考える。

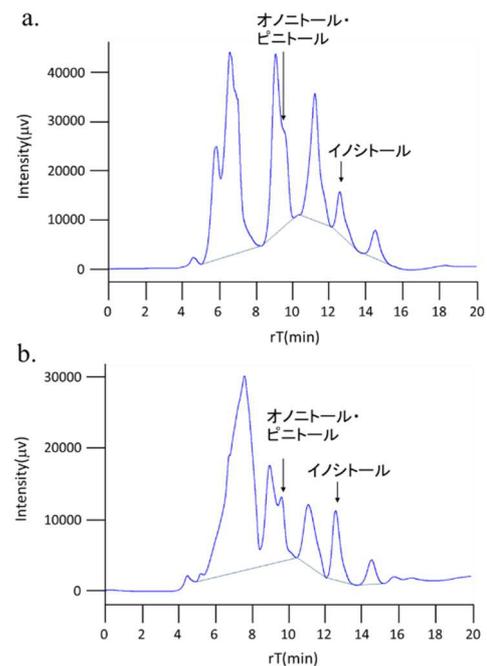


図7 OE3 系統の HPLC 分析結果
アイスプラント WT カルス(a)、*McIMT1* 過剰発現カルス(b)

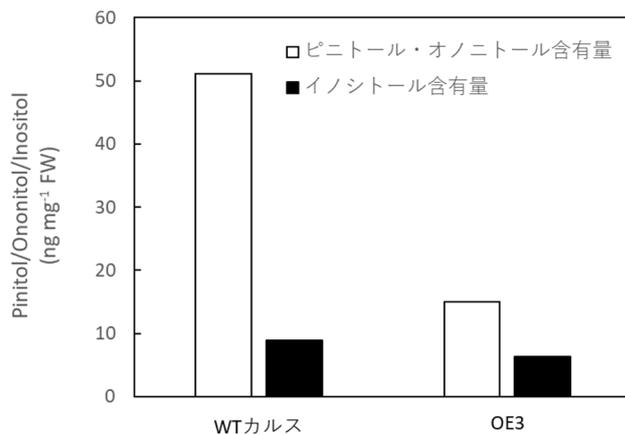


図8 カルス 1 mg あたりのピニトール・オノニトール含有量とイノシトール含有量

参考文献

- 1) 日本アドバンストアグリ株式会社, アイスプラント(ツブリナ)栽培技術 <https://advanced-agri.com/jp/about/iceplant/>, (2017)
- 2) Agarie S., Kawaguchi A., Kodera A., Sunagawa H., Kojima H., Nose A., Nakahara T, Potential of the Common Ice Plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a New High-Functional Food as Evaluated by Polyol Accumulation, *Plant Prod Sci.*, 12, 37-46, (2009)
- 3) Vernon D.M., and Bohnert H.J..A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*, *The EMBO Journal*.11, 2077-2085, (1992)
- 4) Chulhyun Ahn, Uhmee Park, Phun Bum Park, Increased salt and drought tolerance by *D*-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415,669-674. (2011)
- 5) Ahn C, Hossain M.A., Lee E, Kanth B.K, Park P.B..Increased salt and drought tolerance by *D*-pinitol production in

- transgenic *Arabidopsis thaliana*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 504,315-320, (2018)
- 6) Li C.H., Tien H.J., Wen M.F., Yen H.E.. Myo-inositol transport and metabolism participate in salt tolerance of halophyte ice plant seedlings, **Physiologia Plantarum** 172, 1619-1629, (2021)
- 7) Pupel P, Piernik J.S, Lahuta L.B, Two-step D-ononitol epimerization pathway in *Medicago truncatula*., **The Plant Journal**. 100, 237-250, (2019).
- 8) 武内里樹, 植物のピニトール生合成系遺伝子の探索 卒業論文(長浜バイオ大学), (2022)
- 9) 大石開世, 植物のピニトール生合成系遺伝子の解析 卒業論文(長浜バイオ大学), (2023)
- 10) Agarie S, Umemoto M, Sunagawa H, Anai T, Cushman J.C, An Agrobacterium-mediated transformation via organogenesis regeneration of a facultative CAM plant, the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L., **Plant Prod Sci**, 23:3, 343-349, (2020)
- 11) Tran D.Q, Konishi A, Morokuma M, Toyota M, Agarie S, NaCl-stimulated ATP synthesis in mitochondria of a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L., **Plant Prod Sci**, 23:1, 129-135, (2020).
- 12) Arima Y, Agarie S, Factors involved in transformation of the common ice plant(*Mesembryanthemum crystallinum*). Verification of in planta transformation and expression of shoot regeneration related genes. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcsproc/237/0/237_394/pdf/-char/ja, (2014)
- 13) Chhabra G, Chaudhary D, Sainger M, Jaiwal P, Genetic transformation of India isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic Plants, **Physiol Mol Biol Plants**, 17, 129-136, (2011)
- 14) 小川直輝, アイスプラントの形質転換方法の確立-有効成分高蓄積アイスプラントの作出-. 卒業論文(長浜バイオ大学), (2020)
- 15) Matsubayashi Y.. Peptide plant hormone, phytosulfokine: Biological functions and receptors, **Regulation of Plant Growth & Development**, 39, 67-73, (2004)
- 16) 岡部千大, アイスプラントの再分化方法の確率-. 卒業論文(長浜バイオ大学), (2023)
- 17) Tran D.Q., Konishi A., Cushman J.C., Morokuma M., Toyota M., Agarie S.. Ion accumulation and expression of ion homeostasis-related genes associated with halophilism, NaCl-promoted growth in a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L., **Plant Prod Sci**, 23, 91-102, (2019)
- 18) Sunagawa H., Agarie S., Umemoto M., Makishi Y., Nose A, Effect of Urea-Type Cytokinins On The Adventitious Shoots Regeneration From Cotyledonary Node Explant in The common Ice Plant, *Mesembryanthemum Crystallinum*, **Plant Prod Sci**., 10, 47-56, (2015)
- 19) Li C.H., Tien H.J., Wen M.F., Yen H.E., Myo-inositol transport and metabolism participate in salt tolerance of halophyte ice plant seedlings, **Physiologia Plantarum**, 172, 1619-1629, (2021)