

GABA強化米の開発

誌名	Journal of pesticide science
ISSN	1348589X
著者	赤間, 一仁
巻/号	35巻2号
掲載ページ	p. 157-159
発行年月	2010年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



GABA 強化米の開発

赤間 一仁*

島根大学生物資源科学部

(平成 22 年 2 月 15 日受理)

Keywords: ALS, glutamate decarboxylase, GABA, transgenic rice.

はじめに

運動不足や誤った食生活に起因する生活習慣病は先進国のみならず、発展途上国でも広がっている。その中でも、脳卒中や心筋梗塞などの潜在的な要因である、高血圧症患者は年々増加の一途をたどっており、2025 年までに成人の 3 割にも達すると WHO（世界保健機構）は予測している¹⁾。医食同源の言葉通りに、食習慣を改善することは予防医学的な観点から生活習慣病には最も効果的である。もし日本人の主食である米に健康に役に立つ生理活性物質やペプチドなどの機能性成分を富化させることができれば、より自然な形で摂取することができる。これはサプリメントにはない大きな利点である。また、米は長期の保存性、輸送性に優れており、栽培も容易なために大量に供給できる。米のこのような特性に着目し、現在国内ではアレルギー疾患や生活習慣病の予防と改善を目的とした、いわゆる「第 2 世代の健康機能性組換えイネ」の開発が活発に進められている²⁾。スギ花粉症を緩和する米を筆頭に、高血圧や糖尿病の予防効果を持つ米の開発など、国民の健康と生活の質の向上に資する米が作られている。しかし、国民の間では依然として遺伝子組換え作物（食品）に対する不安感は解消されていない。その原因の一つとして、異種の生物由来の遺伝子が組換え体を作成する過程で用いられることが上げられる。一般に遺伝子組換え体を作成する際に、細菌由来の遺伝子が抗生物質や除草剤に対する選抜マーカーとして汎用されている。食用になる作物の開発ではパブリック・アクセプタンス（PA）を得るためにも、これらに依存しない技術の確立が強く求められている。このために、植物細胞への遺伝子導入後に、選抜マーカーを部位特異的な組換え反応により人為的に取り除く方法（MAT ベク

ターシステム³⁾）や植物由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子（acetolactate synthase: ALS）を元にした選抜マーカー⁴⁾が開発されている。特に後者はイネを始めとして多くの食用作物で試験研究が進められており、遺伝子組換え作物を国内で実用化する上でなくてはならない技術になりつつある。本論では、健康機能性成分として注目されている γ -アミノ酪酸（ γ -aminobutyric acid: GABA）の植物における代謝系を概説し、筆者らが開発に成功している GABA 強化米の特性と機能性について解説したい。そして、イネ由来の変異 ALS 遺伝子^{5,6)} をマーカーにした GABA 高含有形質転換米の開発状況を説明する。

1. 健康機能性成分としての GABA

GABA は非タンパク質態のアミノ酸の一種であり、1950 年代に哺乳動物の脳から発見された。その後の研究により、GABA は中枢神経系の重要な抑制性神経伝達物質の一つであることが解明された⁷⁾。また、実験動物を用いた試験から血圧を下げる作用が早くから報告されている⁸⁾。近年では、中性脂肪の低減、ストレスの緩和、学習機能の改善などさまざまな効果が確認され、今最も注目されている健康機能性成分の一つである⁹⁾。GABA 自身は動物のみならず、細菌から植物まで全ての生物が普遍的に持つアミノ酸であり、GABA を富化した様々な加工食品や発酵による GABA 素材の開発が進んでいる¹⁰⁾。

植物ではトマト、ジャガイモ、ナスなどの野菜やミカン、ブドウなどの果実が元来高濃度の GABA を含む¹¹⁾。お米では玄米の胚芽の部分は GABA 含量が高いこと、玄米を炊飯の前に一定時間お湯に浸すことで、GABA 含量が更に高まることが発見され、この原理に基づいて加工された玄米は発芽米として広く流通している¹²⁾。筆者らは GABA をほとんど含まない白米の部分に GABA をためることを目的とし、イネにおける GABA 代謝系の研究に 1990 年代後半から着手した。GABA はグルタミン酸を基質としてその脱炭酸反

* 〒 690-8504 島根県松江市西川津町 1060
E-mail: akama@life.shimane-u.ac.jp
©Pesticide Science Society of Japan

応により合成される。この反応を触媒するのがグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase: GAD) である。GABA は GABA 経路と呼ばれる代謝経路により 2 段階の酵素反応によりコハク酸として TCA 回路に取り込まれる。興味深いことに、植物に様々なストレスを与えると細胞内に GABA が蓄積する¹³⁾。1993 年に Baum らはペチュニアから植物で初めて GAD をコードする遺伝子を単離してその構造を解析した¹⁴⁾。その結果、推定される GAD アミノ酸配列の C-末端部分にバクテリアや動物の GAD には見られない、約 30 アミノ酸残基のカルモジュリン結合部位 (calmodulin-binding domain: CaMBD) が見つかった。以後、タバコ、シロイヌナズナ、トマトなどから相同遺伝子が単離され、いずれも C-末端部分に CaMBD を持つことが分かった。これら GAD タンパク質の機能解析から、ストレスによる細胞内 GABA の蓄積はカルシウム/カルモジュリン ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) の情報伝達系を介した GAD 活性の制御に基づくことが示唆された¹⁵⁾。すなわち、植物ではストレスが引き金となり、細胞内の Ca^{2+} イオン濃度が高まり、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が GAD の CaMBD に結合することでその活性化を誘導し、GABA 含量が上昇すると言うものである。

2. イネ GAD2 の新規な構造と機能

現在イネゲノムには 5 つの GAD 遺伝子族の存在が確認されているが、筆者らはイネが C 末端領域に CaM 結合能を欠く新規な GAD を持つことを 2001 年に報告した¹⁶⁾。この酵素の機能解析を行うために、改変 GAD2、すなわち C 末端部分を欠失させた GAD2 Δ C を作出し、大腸菌発現系を用いて融合タンパク質を合成してその酵素活性を測定した。驚いたことに、改変 GAD2 は野生型のそれに比べて約 40 倍もの高い活性を示した。また、イネ細胞に導入して生体内で発現させた結果、100 倍以上もの高濃度な GABA の蓄積が観察された¹⁷⁾。このことから、新規な GAD2 の C-末端部分のペプチドは強力な自己阻害ドメイン (autoinhibitory domain) として機能することが判明した。イネ以外の植物で CaM 結合能を持たない GAD 酵素は知られておらず、なぜイネが CaMBD を欠く GAD 持つのか、その起源と生体内における機能に興味を持たれる。

3. 改変 GAD2 を用いた GABA 強化米の開発と臨床試験

我々がご飯として食べている白米は胚乳部分であり、比較的 GABA 含量が高い胚芽は精米過程でほとんどが取り除かれてしまう。胚乳部分に発芽米と同程度の GABA を蓄積させることが出来れば、普通のご飯を毎日食べることで健康維持に必要な GABA を摂取できる。これを実現するために、改変 GAD2 遺伝子をイネの貯蔵タンパク質であるグルテリンをコードする遺伝子プロモーターにつないで、キメ

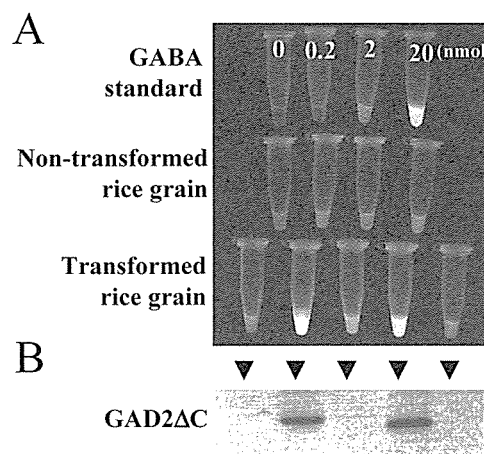


Fig. 1. Analysis of rice seeds from non-transformed and transformed plants. **A.** GABA content of the rice grain according as the fluorometric procedure with GABase (Sigma).¹⁸⁾ Samples containing GABA that concentration is shown on each tube were used as GABA standard. **B.** Western blot analysis of the seed proteins extracted from transformed grains with anti-GAD2 antibody. The same grain samples used for GABA and protein analyses are linked with arrowheads.

ラ遺伝子を日本晴のイネ細胞に導入した。再生させたイネは土に移植して生育させ、収穫後に玄米を一粒ずつ分析した。Fig. 1A は簡便な GABA 分析法を用いた、玄米一粒毎の分析結果を示している (この原理は酵素反応により GABA がコハク酸になる過程で NADP^+ の還元を伴うことに基づく)¹⁸⁾。GABA standard 反応サンプルの蛍光強度から判断し、遺伝子組換え玄米では非組換え玄米に比べてはるかに高濃度の GABA の蓄積が認められた。更に、玄米のタンパク質分析により、導入遺伝子産物の過剰発現が GABA 高含有をもたらしたことを検証した (Fig. 1B)。遺伝子組換えイネは、世代を進めて動物実験のために特定網室で中規模の栽培を行った。収穫した米の GABA 含量は T_4 世代まで調べて、高濃度の形質が保たれていることを確認している。精白米にしたものでも約 15 mg/100 g 白米の含量を示しており、これは市販されている発芽米にほぼ匹敵する¹⁹⁾。この GABA 強化米を粉砕して水に懸濁した液 (ラット体重 kg 当たり 0.5 mg の GABA を含む) を毎日一回、高血圧自然発症ラットに 6 週間経口投与した結果、約 20 mmHg の血圧上昇の抑制効果が認められた¹⁹⁾。

4. 良食味米品種をターゲットにした GABA 強化米の開発

日本晴品種を用いて作出した GABA 強化米は収量などの農業形質に影響を与えることなく、可食部に機能性成分である GABA を高濃度に蓄積したものである。この優れた性質を持つ GABA 米を商業栽培に移行させるためには、消費者の指向を考えて、コシヒカリなどの良食味米系統イネを

親株として GABA 強化形質を導入する必要がある。PA を念頭に置き、形質転換イネを作出する際に、選抜マーカーとしてイネ由来の変異 *ALS* 遺伝子を用いた^{5,6)}。導入は、改変 *GAD2* 遺伝子だけでなく、GABA の安定的な蓄積のためにその代謝系の下流に位置する分解酵素の GABA アミノ基転移酵素 (GABA transaminase: GABA-T) をコードする遺伝子の RNAi を介した発現抑制も同時に試みた。これら 2 つの遺伝子カセットをマルチゲートウエイベクターに導入し、コシヒカリ形質転換のプロトコールは Wakasa ら (2007) により改良されたものを用いた²⁰⁾。選抜は 1 μ M のピリミノバックを含む改良 DKN 培地で行った²⁰⁾。2 点変異 *mALS* 遺伝子はカルス特異的なプロモーターで制御されており、カルス段階でのみ選抜が可能である。候補となるクローンを PCR 選抜で絞り込み、組換え体は土に移植し、10 系統の解析を終えている。玄米の遊離アミノ酸分析の結果から、非組換えのコシヒカリに比べて GABA 含量が 100 倍以上に上昇したものが得られており、タンパク質レベルで改変 *GAD2* の高発現と GABA-T の発現抑制を確認している。生育途上のものも 100 系統以上あり、今後これらの分析が進めば、良食味米品種であるコシヒカリに対して安定的に GABA が蓄積したお米を近い将来に確立できるものと期待される。

おわりに

厚生労働省が発表した「国民健康・栄養調査の概要 (2006 年)」によると、40 歳以上の男性の 2 人に 1 人が、女性では 5 人に 1 人がメタボリックシンドローム (内臓脂肪症候群) の疑いがあるか、その予備群と考えられる²¹⁾。メタボリックシンドロームと判断されると、心疾患や脳卒中のリスクが一段と高まると言われている。日々の食生活からその予防を講じることは最も現実的な手段であり、そのために今後多くの機能性食品の開発が進められるであろう。その中で、遺伝子組換え技術により機能性成分を富化する手法は植物細胞への外来遺伝子の導入と選抜、特定の組織での発現と機能性成分の集積など、植物科学の研究成果の粋を集めたものである²²⁾。更に、植物遺伝子である *ALS* のような選抜マーカーの開発は、組換え体をスクリーニングする上での利用だけでなく、消費者の遺伝子組換え食品に対する不安感を軽減する上でも大きなメリットがある。今後その利用は多くの作物の遺伝子操作において益々進むと予想される。

引用文献

- 1) P. M. Kearney, M. Whelton, K. Reynolds, P. Muntner, P. K. Whelton and J. He: *Lancet*. **365**, 217-223 (2005).
- 2) L. Yang, Y. Wakasa and F. Takaiwa: *J. AOAC Int.* **91**, 957-964 (2008).
- 3) H. Ebinuma, K. Sugita, S. Endo, E. Matsunaga and K. Yamada: *Methods Mol. Biol.* **286**, 237-254 (2005).
- 4) 清水 力：農業と雑草の生態学，種生物学会編，文一総合出版，pp. 169-188, 2007.
- 5) K. Kawai, K. Kaku, N. Izawa, T. Shimizu, A. Fukuda and Y. Tanaka: *J. Pestic. Sci.* **32**, 89-98 (2007).
- 6) A. Okuzaki, T. Shimizu, K. Kaku, K. Kawai and K. Toriyama: *Plant Mol. Biol.* **64**, 219-224 (2007).
- 7) 茅原 紘，杉浦友美：食品と開発 **36**, 4-6 (2001).
- 8) H. Takahashi, M. Tiba, M. Iino and T. Takayasu: *Jpn. J. Physiol.* **5**, 334-341 (1955).
- 9) 横越英彦：ストレスと GABA，静新新書，2007.
- 10) 愛宕世高，戸田登志也，奥平武則：食品と開発 **36**, 12-14 (2001).
- 11) 松本恭郎，大野一仁，平岡芳信：愛媛工技研究報告 **35**, 97-100 (1997).
- 12) T. Saikusa, T. Horino and Y. Mori: *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 2291-2292 (1994).
- 13) W. Wallace, J. Secor and L. Schrader: *Plant Physiol.* **75**, 170-175 (1984).
- 14) G. Baum, Y. Chen, T. Arazi, H. Takatsuji and H. Fromm: *J. Biol. Chem.* **268**, 19610-19617 (1993).
- 15) B. J. Shelp, A. W. Bown and M. D. McLean: *Trends Plant Sci.* **4**, 446-452 (1999).
- 16) K. Akama, T. Akihiro, M. Kitagawa and F. Takaiwa: *Biochim. Biophys. Acta* **1522**, 143-150 (2001).
- 17) K. Akama and F. Takaiwa: *J. Exp. Bot.* **58**, 2699-2707 (2007).
- 18) 赤間一仁： *Biochemica* **3**, 14-15 (2005).
- 19) K. Akama, J. Kanetou, S. Shimosaki, K. Kawakami, S. Tsuchikura and F. Takaiwa: *Transgenic Res.* **18**, 865-876 (2009).
- 20) Y. Wakasa, K. Ozawa and F. Takaiwa: *Plant Cell Rep.* **26**, 1567-1573 (2007).
- 21) <http://www-bm.mhlw.go.jp/houdou/2008/04/h0430-2.html>.
- 22) F. Takaiwa: *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **2**, No. 041, 9 pp. (2007).

略歴

赤間一仁 (あかま かずひと)

生年月日：1961 年 8 月 30 日

最終学歴：1992 年 3 月 総合研究大学院大学生命科学研究科
博士課程修了，博士 (理学)

研究テーマ：イネ GABA 代謝系の解明とその応用，植物
tRNA の分子生物学

趣味：水彩画，卓球