

# バイオケミカルリソース研究チーム

## Laboratory for Biochemical Resources

チームリーダー 村中俊哉  
MURANAKA, Toshiya

当研究チームでは、種々の生理活性物質（バイオケミカル）を産生する酢酸-メバロン酸経路を中心に、遺伝子発現制御解析および代謝工学研究を行っている。特に、生合成阻害剤や遺伝子破壊植物を用いて、酢酸-メバロン酸経路の遺伝子発現解析・メタボリックプロファイリング・表現型解析を行うことにより、本経路で生合成されるステロイドやトリテルペノイドの生理学的意義を明らかにする。さらに、形質転換毛状根培養系などを用いて、植物ステロイド、トリテルペノイド生合成に関わる新規遺伝子の単離、代謝工学技術の駆使などにより、新規有用生理活性物質産生植物創製のための基盤技術の確立を目指す。

### 1. ファンクショナルトリテルペノミクスの基盤研究

(1) HMG-CoA レダクターゼ変異体を用いたトリテルペンの機能解析研究（鈴木，大山，上出，村中）

植物は動物に比べ多様なトリテルペンを産生する。これは様々な環境に適応していかなければいけない植物が獲得した1つの特徴と考えられるが、個々の化合物の生理的な役割についてはブラシノステロイドを除きほとんど解明されていない。スクアレンは細胞質のイソプレノイド合成経路であるメバロン酸経路で合成される直鎖状トリテルペンであり、その後ステロイド（ステロールおよびブラシノステロイド）とそれ以外のトリテルペノイドに代謝される。当研究チームでは、多岐にわたるトリテルペンの機能を明らかにするためにメバロン酸経路の鍵酵素である HMG-CoA レダクターゼ (HMGR) の T-DNA 挿入変異体を単離、解析している。昨年度までにトリテルペンが伸長・老化・稔性に関わることを明らかにしている。本年度、それぞれの生理現象にどのような分子種がどのように関わっているのかについて検討した。HMGR, スクアレン合成酵素, スクアレンエポキシダーゼ, C-14 レダクターゼ (FACKEL), CYP90B1 (DWF4) の阻害剤である lovastatin, squalenstatin, terbinafine, fenpropimorph, brz220 を野生型植物に処理し、どの阻害剤処理が *hmg1* 変異体と似た形質を示すかを調べた。実験は老化、および細胞伸長のマーカー遺伝子として *SAG12*, *XTR9*, *extensin-like protein* の発現を RT-PCR 法で調べることにより行った。また、同様の実験を *hmg1-1*, *smt1-3*, *fk-DCLJ5*, *det2* の各変異体についても行った。その結果、老化にはスクアレンが、細胞伸長にはブラシノステロイド以外の 24 位がアルキル化された植物ステロールが関与することが強く示唆された。スクアレンは過酸化脂質の蓄積やゲノム DNA の損傷を押さえることで老化防止に役立っているのではないかと考えている。また植物ステロールは細胞膜を構成する成分として細胞伸長に関わるのではないかと考えた。

また、昨年度までに、*hmg1* 変異体では、野生型に比べ、ステロールが減少していることを報告している。本年度、トリテルペノイドのプロファイルを調べるため、GC-MS を用いた定量分析に必要な同位体標識化合物を合成した。 $\beta$ -アミリン、 $\alpha$ -アミリン、ルベオールの重水素標識体を合成し、これらを内部標準物質として用い、定量分析を行った。

その結果、*hmg1* 変異体は、ステロールと同様にトリテルペノイドの含有量も減少した変異体であることが明らかになった。一方、*hmg2* 変異体は形態的な表現型は観察されないが、ステロール、トリテルペノイドの定量分析の結果、*hmg1* に比べトリテルペンの減少率が低い変異体であることが明らかになった。

(2) HMG-CoA レダクターゼ変異体における不稔形質とステロールの関連についての研究（永田 \*1, 鈴木, 上出, 村中; 木内 (PSC 生長制御物質研究チーム)）

*hmg1* 変異体は、通常の栽培条件で不稔形質を示した。不稔形質の原因を探るために、まず *hmg1* の花粉を柱頭につけ *in vivo* での花粉管伸長試験を行った。その結果、アニリンブルー染色による観察により、*hmg1* 花粉は発芽しないことが分かった。さらに、掛け合わせ実験からも、*hmg1* は雄性不稔変異体であることが明らかになった。しかしながら、花粉管伸長培地上で発芽試験を行ったところ、発芽率や伸長率は低下するものの、*hmg1* 花粉には発芽能があることが分かった。

花序における *HMG1* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で観察した。*HMG1* は花芽の分裂組織で発現していた。花粉形成過程の若い時期では (1 細胞期頃まで)、小胞子とタペータムで強い発現が観察された。タペータムの崩壊が始まる少し前頃 (2 細胞期頃) には、発現は見られなくなった。続いて、野生型と *hmg1* の葯 (花粉 2 細胞期) を、ステロールを含む脂質類が染色されるナイルレッド液で染色した。その結果、野生型ではタペータムが強く染色されたのに対し、*hmg1* では弱い染色を示した。また、成熟花粉 (葯開裂後) も染色したところ、Pollen coat の蛍光が、*hmg1* では微弱であった。

加圧凍結固定法を用いて固定した葯を、透過型電子顕微鏡で観察したところ、タペータム特異的な脂質に富んだオルガネラの 1 つであるタペトソーム (リピッドボディの一形態) が、*hmg1* では著しく縮小していた。もう 1 つの脂質に富んだオルガネラであるエライオプラスト (色素体の一形態) は、*hmg1* では若干縮小のみではあったが、タペトソームほどの異常はなかった。さらに、タペータムが消失する 3 細胞期頃において、野生型では花粉の Pollen coat の蓄積が見られるが、*hmg1* では蓄積が全く見られなかつ

た。なお、化学固定では、タベトソームもエライオプラストも、内部に電子密度の高い同様の物質が観察できるのに対し、加圧凍結固定ではその物質の蓄積が、エライオプラストにおいては観察できなかった。この結果は、両オルガネラの脂質組成の違いを反映している可能性がある。今後、この違いを利用して、Pollen coat の物質が、タベトソーム由来であるのか、エライオプラスト由来であるのかを、明らかにできるかもしれない。

以上のことから、*hmg1* では、ステロール生合成能力が低下し、タペータムにおけるステロール不足がタベトソーム形成不全を引き起こし、その結果 Pollen coat へのステロールの供給ができず、雄性不稔となったと予想される。このように、タベトソームというオルガネラの形成には、ステロール合成が重要であり、さらにタベトソームから Pollen coat へのステロール供給が、正常な花粉発芽、若しくは、花粉と柱頭との認識機構などに重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(3) HMGR 阻害剤耐性変異体に関する研究 (唐 \*2, 小林 \*3, 鈴木, 村中)

昨年度までに、HMGR 阻害剤耐性変異体 *loi1* の原因遺伝子を調べた結果、PPR (Pentatricopeptide repeat) モチーフを有する機能未知のタンパク質 LOI1 の欠損変異であることが分かっている。PPR モチーフを有するタンパク質は高等植物に 400 種類以上存在し、オルガネラ (ミトコンドリアかプラスチド) に極在して RNA プロセッシング、翻訳等の機能を有することが報告されている。本研究では、組み換え LOI1 タンパク質を用いて、LOI1 の機能解析を行った。

まず、大腸菌で発現させた組み換え LOI1 タンパク質を用いて、核酸結合能の検討を行った。North/South-Western 法を用いた実験の結果、LOI1 は RNA および一本鎖 DNA 結合能を有し、二本鎖 DNA とは結合しないことが明らかとなった。次に、アガロース粒子に固定化したホモリポリマーを用いた RNA 結合アッセイの結果、LOI1 と PolyG, U との結合能は、他の 2 種類 (polyA, C) より強いことが分かった。さらに、RNA プローブを用いたゲルシフトアッセイの結果、LOI1 は、80 ヌクレオチドの RNA プローブと結合できることが分かった。

続いて、LOI1 の RNA 結合配列の探索を行った。大腸菌で発現させた LOI1-His 組み換えタンパク質を用いて、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法により、LOI1 の RNA 結合配列の同定を行った。その結果、G, U に富む、コンセンサス性が高い RNA 配列が得られた。さらに、SELEX 前後の RNA プローブを用いたゲルシフトアッセイの結果、LOI1 と SELEX 前の RNA プローブとの結合は、コンペティターとして加えた酵母 tRNA により競争的に抑制されたが、LOI1 と SELEX 後の RNA プローブとの結合は酵母 tRNA 添加により抑制されなかった。

(4) ステロイドサボゲニン配糖化酵素遺伝子の解析 (小原, 中嶋, 村中)

これまでにクローニングしたナス科植物由来の推定配糖化酵素遺伝子の部分配列 (10 種) および全長配列 (3 種) をデータベースに登録し公開した。アクセッション番号は次の通りである: AB182375 (egp#1-1), AB182376 (egp#1-4),

AB182377 (ptt#1-53), AB182378 (ptt#2-1), AB182379 (ptt#5-4), AB182380 (ptt#5-30), AB182381 (Sa#4-5), AB182382 (Sa#6-15), AB182383 (Sk#7-4), AB182384 (Sk#7-5), AB182385 (SaGT4A), AB182386 (SaGT4R), AB182387 (SaGT6)。

大腸菌で発現させたキンギンナスビ SaGT4A タンパクの配糖化酵素活性について、分光光度計で測定可能な非 RI アッセイ系を確立し、酵素活性を定量的に測定した。その結果、SaGT4A のステロイド基質に対する特異性が明らかになり、本来の基質であるヌアチゲニンよりもジオスゲニンやトマチジン、ソラソジンに対してより高い活性を持つことが分かった。これらのステロイド基質の化学構造の比較より、基質中の官能基や原子の立体配位が酵素活性に与える影響を考察した。また、酵素活性の定量値からアミノ酸置換変異体の野生型に対する相対活性を決定し、置換残基の活性への関与の程度を明らかにした。

次に、SaGT4A の機能改変を目的として、ジャガイモ由来のアルカロイド配糖化酵素 StSGT とのキメラ酵素を構築した。StSGT は SaGT4A と一次構造上 75% の高い相同性を示し、ステロイド基質に対し同じ特異性を持つが、グルコース転移活性だけでなく SaGT4A には見られないガラクトース転移活性も有している。そこで、このガラクトース活性を SaGT4A に付与することを試みた。糖の認識に関与していると考えられている配糖化酵素の C 末端側において両タンパク質間で相同性の低い領域を見だし、それらの配列を交換した様々なキメラ変異体を作成した。キメラ酵素の糖特異性を解析した結果、糖選択性が変化したものはなく、いくつかのキメラ体では酵素活性そのものが失われていることが分かった。以上の結果より、本酵素の機能を改変するためにはアミノ酸配列情報のみでは不十分であると考えられた。そこで SaGT4A タンパク質の構造形成に関わる残基を同定するために、システイン残基を置換した変異体を作成し、酵素活性を調べた。その結果、SaGT4A の 5 個のシステイン残基のうち 3 個が活性に大きく影響していることが分かり、そのうちの 2 個がジスルフィド結合に関わっていることが示唆された。また、これらのシステイン残基は StSGT 配列上でも保存されており、SaGT4A と StSGT は一次構造だけでなく高次構造の類似性も高いことが予想された。しかしながら糖選択性に関わる局所的な立体構造には両者で相違があり、今後これら配糖化酵素の構造-機能相関を明らかにするためには、三次元構造の解析が不可欠である。

(5) 有用ステロイドを産生するナス科薬用植物の組織培養 (高上馬 \*1, 村中)

Vitamin D<sub>3</sub> 化合物 (25 (OH) vitamin D<sub>3</sub>, 1a, 25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> など) はヒトを含む脊椎動物においてカルシウムやリンの恒常性に重要な役割を持つホルモン様物質である。これらの化合物は骨粗鬆症やくる病への治療薬として用いられ、さらには白血病などのがん治療薬としての可能性が注目されるようになってきている。Vitamin D<sub>3</sub> 化合物は化学合成反応行程が複雑などの理由から非常に高価なものとなっているのが現状である。しかしながら、これまで動物にしか存在しないと考えられていた vitamin D<sub>3</sub> 化合物がナス科を主とした数種の植物にも含まれることが近年明らかとなった。そこで本研究では植物を原材料として vitamin D<sub>3</sub> 化合物を

安価に生産する方法を開発することを目標とした。南米原産のナス科植物 *Solanum malacoxylon*, *Nicotiana glauca*, *Cestrum diurnum* の3種を新たに導入した。これらの植物においては従来形質転換方法が確立されていなかった。そこで本研究において *N. glauca* 培養細胞から *Agrobacterium rhizogenes* を介して毛状根の誘導を確立した。さらに GFP を指標マーカーとして外来遺伝子の発現が可能であることを確認した。以上は植物細胞による有用物質の大量生産の実現に貢献すると考える。

(6) カンゾウ組織培養によるトリテルペノイド生産 (大山, 高上馬<sup>\*1</sup>, 村中)

カンゾウ属植物は、薬用植物資源の中でも医薬品原料や食品添加物として需要が高い。カンゾウの活性成分は、トリテルペノイドの一種であるグリチルリチンであり、ストロンに高蓄積することが知られている。当研究チームではこれまでにカンゾウの無菌植物を用いて、ストロン様組織を作出、増殖する条件ならびに植物体への再生条件を確立している。本培養系を用いたグリチルリチンの生合成研究の一環として、培養物のトリテルペノイドのプロファイルを行った。その結果、植物体ストロンと同様、グリチルリチンの前駆体と考えられる  $\beta$ -アミリンと共に、ルペオール、オレアノール酸、ベツリン酸を同定した。

## 2. ファンクショナルゲノミクス研究のための新規組織培養技術の開発

(1) 毛状根培養系の新規基盤技術開発 (關, 西澤<sup>\*4</sup>, 村中)

形質転換毛状根培養系は、多数の独立した形質転換植物根クローンを経由して迅速に得ることができる優れた手段であると考えられる。この特性から、多数の形質転換クローンを必要とするジーンディスカバリーに利用できると期待される。また、培養が可能であり、かつ、有用二次代謝産物の生産の場としての側面を持つ毛状根の特性から、代謝産物の質的・量的変化を指標とした遺伝子の機能評価および物質生産の場としての利用が期待できる。

形質転換毛状根を用いたジーンディスカバリーの一手法として、「毛状根アクティベーションタギング法」の確立を試みた。4 コピーの CaMV35S エンハンサーと、毛状根誘導に必要とされる *rol* 遺伝子クラスターを同一 T-DNA 上に持つバイナリーベクター (pHR-AT) を構築した。シロイヌナズナ、タバコ、ジャガイモを用いたモデル実験から、本ベクターを持つ *Agrobacterium tumefaciens* の感染により、外植片からの形質転換根の効率的な誘導および挿入 T-DNA の近傍に位置する植物ゲノム遺伝子のアクティベーションタグが可能であることを実証した。

次に、毛状根での遺伝子の機能評価を目的として、任意遺伝子高発現および RNAi による発現抑制を行うための各種バイナリーベクター (それぞれ pHR-OX, pHR-RNAi とする) の構築・評価を行った。任意遺伝子の発現カセットと *rol* 遺伝子クラスターを同一 T-DNA 上にパッケージ化すると同時に、GATEWAY<sup>TM</sup> クローニングシステムに対応させることにより、プラスミド構築の迅速・簡便化を図った。シロイヌナズナのステロール生合成経路において重要な役割を担う3種のステロールメチル基転移酵素遺伝子 (*SMT1*, *SMT2*, *SMT3*) をそれぞれ高発現あるいは発現抑制したシロイヌナズナ培養根ラインを作出し、ステ

ロール代謝プロファイルを解析した。その結果、SMT1 の過剰発現で、基質のシクロアルテノールがコントロールの約13倍高蓄積する等、地上部組織とは大きく異なる、根組織特異的なステロールプロファイルの変動を検出した。さらに、上記遺伝子高発現ベクターは GATEWAY<sup>TM</sup> クローニング法による cDNA の網羅的な組込みを行うことが容易であり、ハイスループットな形質転換根作出系と組み合わせることで、外来遺伝子高発現毛状根ライブラリーの作出が可能である。本系の実行可能性を検証すべく、本ベクターを用いてシロイヌナズナの cDNA 高発現ライブラリーの作成および評価を行った。

これら *rol* 型ベクターシステムでは、形質転換植物体の作出が困難な実用植物種については、リーフディスク等の外植片からの形質転換毛状根の効率的な誘導が期待できると同時に、シロイヌナズナでは、通常用いられるフローラル・ディップ法での形質転換が可能であった。得られる T1 植物では、*rol* 遺伝子クラスターの発現により地上部の矮化と同時に根のバイオマスの増加が観察される。シードリングの根の部分だけを切り取り、液体培地に移すことにより容易に増殖のよい根培養系を確立できた。あるいは、形質転換体の8割以上で開花・結実するため、「根培養系を種子で維持する (リソース化)」ことが可能になった。本システムを用いることにより、これまでシロイヌナズナで困難だった根のバイオマスの大量取得が容易となり、メタボローム解析等による代謝関連遺伝子の機能評価に有用な材料を提供するものと期待される。

(2) *Agrobacterium rhizogenes* によって形質転換したタバコ BY-2 細胞の特性 (真野<sup>\*1</sup>, 根本<sup>\*3</sup>, 鈴木, 關, 村中)

タバコ BY-2 細胞に *A. rhizogenes* を感染させて形質転換細胞を作成し、分化機能やホルモンフリーで生育できる性質について検討した。BY-2 に *A. rhizogenes* 15,834 株を接種し、形質転換細胞株を多数得た。その中の代表株 (BYHR-3, BYHR-7 細胞) を用いて検討した結果、それらはオーキシン非存在下でも BY-2 と同等もしくはそれ以上の速度で生育した。また、BYHR-7 は BY-2 の生育を促進する因子を細胞外に分泌していたが、BYHR-3 では認められなかった。一方、Ri T-DNA の *rol* 遺伝子群を導入した形質転換細胞を作成したが、ホルモンフリーで生育できる細胞は得られなかった。サザン解析の結果、BYHR-7 は Ri TL-DNA と TR-DNA のほぼ全領域を持っていた。一方、BYHR-3 は Ri TL-DNA を持たず、TR-DNA の左端側も一部を欠いていると考えられる。ノーザン解析の結果、BYHR-3 でもオーキシン誘導型遺伝子の発現が認められた。

<sup>\*1</sup> 共同研究員, <sup>\*2</sup> 協力研究員, <sup>\*3</sup> 研修生, <sup>\*4</sup> 協力技術員

Plants produce and accumulate various metabolites. Of these, steroids and triterpenoids have potential application to functional foods, medicines and industrial materials. To understand the metabolic system of steroids and triterpenoids in plants, we chose a strategy combining the comprehensive-analytical chemistry and molecular genetics approaches.

### 1. Study on 'functional triterpenomics'

Plants produce a wide variety of triterpenes (compounds derived from squalene). However, except for brassinosteroid, the physiological role of each compound has not yet been well understood. Squalene is an uncyclic triterpene, biosynthesized via the mevalonate (MVA) pathway in the cytoplasm, and is metabolized to two kinds of cyclic triterpenes; one is steroid (sterol and brassinosteroid) and the other is triterpenoid. To understand the physiological roles of various triterpenes, we have characterized *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants for *HMG1* and *HMG2*, that encode HMG-CoA reductase. The previous work of *hmg1* suggests that triterpenes are involved in cell elongation, senescence and fertility. The analyses of the expression of the marker gene of the wild-type (WT) plant treated with various inhibitors of the MVA pathway suggest that squalene is involved in the inhibition of senescence progression, and 24-acylated sterols are involved in cell elongation. These findings correspond to the gene expression analyses in the various mutants downstream of *hmg1* in the MVA pathway. Squalene may contribute to the inhibition of senescence by the prevention of lipid peroxidation. 24-alkyl sterols may contribute to cell elongation as components of the plasma-membrane.

Lovastatin is a specific inhibitor of HMGR. The *LOI1* gene, isolated as a causative gene from a recessive *lovastatin insensitive 1* mutant of *Arabidopsis*, was identified to encode a pentatricopeptide repeat (PPR) protein. The biological function of the LOI1 protein is unclear. The *Arabidopsis* genome contains more than 400 genes encoding PPR proteins, most of which are believed to be imported into chloroplast and mitochondria, taking part in the RNA processes. In this study, we tested the RNA-binding activity of recombinant LOI1 protein. The North/South-Western blotting assay demonstrated that LOI1 bound RNA and ssDNA, but did not bind dsDNA. The RNA binding assay using Agarose-bound homoribopolymers showed that LOI1 preferentially bound polyG and polyU homoribopolymers. We also used the method of systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) to identify the sequence specificity of the potential LOI1 targets. The post-SELEX RNA obtained after 16 rounds of selection exhibited a significant increase in binding affinity for LOI1. The post-SELEX RNA shared a high consensus sequence characterized by a GU-rich region.

We established a non-RI assay system based on the spectrophotometric method to determine glycosyltransferase activities. Specific activities of wild type and mutant SaGT4As were determined, and the characteristics of this enzyme revealed. In order to elucidate the function-structure relationship of glycosyltransferases, we constructed several SaGT4A/StSGT chimera proteins according to amino acid sequence and enzymatic character information obtained through biochemical experiments. SaGT4A and StSGT share high sequence homology and substrate specificity toward steroidal compounds, however, they display separate and distinct sugar selectivities. No chimera enzyme altered its original sugar selectivity, nor were specific domains or residues responsible for sugar selectivity identified. The fact that some of the chimera proteins totally ceased activity suggests that proper folding may have been impaired during construction. Site-directed mutagenesis targeted on cysteine residues revealed that three cysteines influence SaGT4A activity, and indicated, that two of them are involved in disulfide bonds formation. These three residues are also conserved in StSGT, suggesting that SaGT4A and StSGT share similar folding. These

results suggest that three-dimensional structure analysis is necessary to design novel functional enzymes.

## 2. Development of tissue culture systems for functional genomics

*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation (induction of hairy roots) is thought to be a high-throughput system for obtaining large numbers of independent transgenic clones. It can be a powerful tool for gene discovery attempts such as the activation tagging approach. Other features of the hairy root culture system are (1) root biomass can be readily obtained under tightly controlled sterile conditions and (2) hairy root cultures are generally considered to allow synthesis of the same compounds as the roots of the intact plant. These advantages provide attractive materials for functional analyses of the genes of interest by metabolic profiling and large-scale production of valuable secondary metabolites.

*Development of the hairy root-activation tagging (HR-AT) system:* We developed binary vectors for HR-AT which contain a cluster of *rol* (rooting locus) genes together, the right border facing four tandem repeats of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S enhancer element on the same T-DNA. Transformation experiments using *Arabidopsis*, potato, and tobacco as model plants revealed that upon inoculation of plants with *Agrobacterium tumefaciens* harboring these vectors, a large number of independently transformed roots could be induced from explants within a short period of time, and root culture lines were subsequently established. Molecular analyses of the transformed *Arabidopsis* lines showed that expression of the gene immediately adjacent to the CaMV 35S enhancer repeats was significantly increased. This system may facilitate application of the activation-tagging approach to plant species that are recalcitrant to the regeneration of transgenic plants.

*Development of HR-OX and HR-RNAi vectors:* We have developed binary vectors, using the same *rol* gene cluster used for the pHR-AT vectors, for over-expression (pHR-OX) and RNA interference (pHR-RNAi) of the target gene in transformed hairy roots. To evaluate the pHR-OX and pHR-RNAi vectors, we established hairy root culture lines over-expressing or with reduced expression of the each of three *Arabidopsis* genes encoding sterol-C24-methyltransferases (SMTs) involved in sterol biosynthesis. Sterol profiling data revealed that these vectors work efficiently to provide "root specific" changes in sterol composition by modulating *SMT* gene expression, i.e., dramatic accumulation of cycloartenol which increased on average 13-fold in SMT1 over-expressing lines when compared to control lines. We designed both pHR-OX and pHR-RNAi vectors as GATEWAY<sup>TM</sup> destination vectors suitable for high-throughput functional genomic research. We recently, created an *Arabidopsis* cDNA over-expression library with the pHR-OX vector.

Interestingly, the "floral dip" transformation method worked for these HR-vectors to generate transgenic *Arabidopsis* plants. The transformants showed typical morphological phenotypes represented by an overabundance of roots and dwarfism due to the expression of *rol* genes. We found that root cultures can be readily established by simply separating the roots from an individual seedling and transferring to a liquid medium. Although the transformants grown on the soil had significantly reduced fertility, more than 80% of the primary transformants set seed. This is important from a technical perspective, because it indicates that a large collection of root culture lines

can be maintained as seeds, without regular subculturing. We have started to establish “HR-AT” and “cDNA over-expressing” transformed *Arabidopsis* lines using the floral dip transformation method. High-throughput metabolic profiling of “activation-tagged” or “cDNA over-expressing” root culture lines will offer opportunities for identifying regulatory or biosynthetic genes for the production of valuable secondary metabolites of interest.

## Staff

### Laboratory Head

Dr. Toshiya MURANAKA

### Research Scientist

Dr. Atsuko KOHARA

Dr. Hiraru SEKI

Dr. Masashi SUZUKI

### Research Associate

Mr. Kiyoshi OHYAMA

### Technical Staff

Ms. Yukiko KAMIDE

Ms. Chiharu NAKAJIMA

### Contract Researcher

Dr. Jianwei TANG

### Contract Technical Scientist

Ms. Tomoko NISHIZAWA

### in collaboration with

Ms. Reiko KIUCHI (Lab. Growth Regul., PSC)

### Visiting Members

Dr. Mareshige KOJOMA (Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Prof. Yoshihiro MANO (Sch. High-Tech. Human Welfare, Tokai Univ.)

Dr. Noriko NAGATA (Dept. Chem. Biol. Sci., Japan Women's Univ.)

### Trainees

Ms. Keiko KOBAYASHI (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

Mr. Keiichiro NEMOTO (Sch. High-Tech. Human Welfare, Tokai Univ.)

元吉, 牧野由紀子: “大麻 *Cannabis sativa* L における cannabinoid 生合成遺伝子の解析”, DNA 多型 **12**, 60–63 (2004). \*

## 口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nagata N., Suzuki M., Kiuchi R., Kamide Y., Seki H., Ohyama K., Takagi T., Sato M., Yoshida S., and Muranaka T.: “Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to male sterility, contributed to by sterol reduction in tapetal cells”, 8th Asia-Pacific Conf. on Electron Microscopy (8APEM) in conjunction with 60th Ann. Meet. of the Japanese Society of Microscopy, (The Japanese Society of Microscopy), Kanazawa, June (2004).

Seki H., Ohyama K., Yoshida S., and Muranaka T.: “Development of a novel technology platform for root culture systems for functional genomics”, 3rd Int. Congr. on Plant Metabolomics, (Iowa State University), Ames, USA, June (2004).

Ohyama K., Suzuki M., Masuda K., Yoshida S., and Muranaka T.: “Synthesis of deuterated triterpenes for metabolomics studies of triterpenoids”, 3rd Int. Congr. on Plant Metabolomics, Ames, USA, June (2004).

Kohara A., Nakajima C., Tanaka H., Shoyama Y., Ikenaga T., Hashimoto K., Yoshida S., and Muranaka T.: “Cloning and characterizing a novel glucosyltransferase acting on steroidal saponin from *Solanum aculeatissimum*”, 14th Congr. of the Federation of European Soc. of Plant Biology (FESPB 2004), Cracow, Poland, Aug. (2004).

Suzuki M., Kamide Y., Nagata N., Seki H., Ohyama K., Kiuchi R., Yoshida S., and Muranaka T.: “Sterol deficiency affects cell elongation, senescence and fertility”, 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), Canberra, Australia, Sept. (2004).

Kohara A., Nakajima C., Hashimoto K., Ikenaga T., Tanaka H., Shoyama Y., Yoshida S., and Muranaka T.: “A novel glucosyltransferase involved in steroid saponin biosynthesis in *Solanum aculeatissimum*”, Germany-Japan Sem. on Molecular Regulation of Plant Secondary Metabolism, (DFG, Chiba University, and others), Kisarazu, Sept. (2004).

Muranaka T.: “Functional genomics and metabolic engineering of plant terpenoids”, Germany-Japan Sem. on Molecular Regulation of Plant Secondary Metabolism, (Chiba University), Kisarazu, Sept. (2004).

Ohyama K., Suzuki M., Masuda K., Yoshida S., and Muranaka T.: “Synthesis of deuterated triterpenes for metabolomics studies of triterpenoids”, Germany-Japan Sem. on Molecular Regulation of Plant Secondary Metabolism, Kisarazu, Sept. (2004).

Mano Y., Nemoto K., Suzuki M., Oka A., and Muranaka T.: “Characterization of tobacco BY-2 cells transformed

## 誌上发表 Publications

### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

高上馬希重, 村中俊哉, 吉田茂男, 飯田修, 関田節子, 佐竹

- by *Agrobacterium rhizogenes*”, Int. Workshop on Cell and Molecular Biology of Tobacco BY-2 Cells, (RIKEN PSC and others), Yokohama, Sept. (2004).  
(国内会議)
- 鈴木優志, 永田典子, 木内玲子, 上出由希子, 關光, 大山清, 吉田茂男, 村中俊哉: “シロイヌナズナ配偶子形成におけるステロールの重要性”, 第 14 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会, 弘前, 7 月 (2004).
- 永田典子, 鈴木優志, 上出由希子, 木内玲子, 關光, 大山清, 吉田茂男, 村中俊哉: “シロイヌナズナ HMG-CoA レダクターゼ遺伝子破壊株におけるタペータム形成異常と雄性配偶子形成異常”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 小林啓子, 鈴木優志, 永田典子, 關光, 大山清, 木内玲子, 上出由希子, 唐建偉, 吉田茂男, 村中俊哉: “シロイヌナズナにおける HMG-CoA レダクターゼ阻害剤に対する耐性変異体 *lovastatin insensitive 1* の解析”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 鈴木優志, 上出由希子, 永田典子, 關光, 大山清, 木内玲子, 吉田茂男, 村中俊哉: “シロイヌナズナの生長における種々のトリテルペンの役割”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 村中俊哉: “植物におけるメバロン酸経路とステロール生合成”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 高上馬希重, 大山清, 關光, 吉田茂男, 村中俊哉: “薬用植物カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) の代謝機能研究へ向けた培養システム開発”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 永田典子, 矢野美咲, 山崎千穂, 鈴木優志, 上出由希子, 木内玲子, 關光, 大山清, 吉田茂男, 村中俊哉: “シロイヌナズナ HMG-CoA レダクターゼ遺伝子破壊株における雄性配偶子形成異常”, 日本植物形態学会第 16 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 鈴木優志, 永田典子, 上出由希子, 木内玲子, 大山清, 吉田茂男, 村中俊哉: “*hmg1* 変異体を示すトリテルペンの新しい機能”, 植物化学調節学会第 39 回大会, 秋田, 10 月 (2004).
- 小林啓子, 鈴木優志, 永田典子, 關光, 大山清, 木内玲子, 唐建偉, 吉田茂男, 村中俊哉: “シロイヌナズナの HMG-CoA レダクターゼ阻害剤に対する耐性変異体 *loi1* の解析”, 植物化学調節学会第 39 回大会, 秋田, 10 月 (2004).
- 大山清, 鈴木優志, 増田和夫, 吉田茂男, 村中俊哉: “重水素化トリテルペノイドの合成と *hmg1* 変異体におけるトリテルペノイドの定量分析”, 植物化学調節学会第 39 回大会, 秋田, 10 月 (2004).
- 小林啓子, 鈴木優志, 永田典子, 關光, 大山清, 木内玲子, 唐建偉, 吉田茂男, 村中俊哉: “シロイヌナズナ HMG-CoA レダクターゼ阻害剤耐性変異体の解析”, 第 17 回植物脂質シンポジウム, (日本植物脂質研究会), つくば, 11 月 (2004).
- 鈴木優志, 大山清, 上出由希子, 永田典子, 關光, 吉田茂男, 村中俊哉: “トリテルペン合成におけるシロイヌナズナ HMG-CoA レダクターゼ遺伝子の果たす役割”, 第 17 回植物脂質シンポジウム, (日本植物脂質研究会), つくば, 11 月 (2004).
- 根本圭一郎, 關光, 鈴木優志, 岡穆宏, 村中俊哉, 真野佳博: “*Agrobacterium rhizogenes* によって形質転換したタバコ BY-2 細胞の特性”, 日本農芸化学会 2005 年度大会, 札幌, 3 月 (2005).
- 真野佳博, 根本圭一郎, 關光, 鈴木優志, 岡穆宏, 村中俊哉: “タバコ BY-2 毛状根細胞におけるオーキシン生合成酵素遺伝子の解析”, 日本農芸化学会 2005 年度大会, 札幌, 3 月 (2005).
- 鈴木優志, 上出由希子, 大山清, 郷田秀樹, 嶋田幸久, 吉田茂男, 村中俊哉: “シロイヌナズナ *hmg1* 変異体の早期老化形質の解析”, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 3 月 (2005).
- 永田典子, 鈴木優志, 上出由希子, 木内玲子, 關光, 大山清, 吉田茂男, 村中俊哉: “タペータム形成と雄性配偶子形成に関わる脂質に富んだオルガネラの分化転換”, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 3 月 (2005).
- 高上馬希重, 丹下健, 關光, 吉田茂男, 村中俊哉: “ナス科 *Solanum malacoxylon* における vitamin D3 化合物生産に関する研究”, 第 116 回日本森林学会大会, 札幌, 3 月 (2005).
- 村中俊哉: “‘Functional triterpenomics’ 多様な植物メタボリックシステムにどう取り組むか?”, 第 13 回農芸化学 Frontiers シンポジウム, 小樽, 3 月 (2005).