

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07770

研究課題名(和文) イネ(日本晴)が生産するベーター-アミノ酸の生理的・生態学的機能の解析

研究課題名(英文) Physiological and ecological functions of beta-tyrosine produced by *Oryza sativa*

研究代表者

森 直樹 (Mori, Naoki)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：30293913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：(1) (3R)-体および(3S)- -tyrosineはシロイヌナズナの根の伸長阻害活性を示したが、m-(3R)- -tyrosineやo-(3R)- -tyrosineにその活性はなかった。(2) イネの各生育段階(第3, 5, 7葉完全展開期)における蓄積量を比較すると、第5葉完全展開期以降に(3R)- -tyrosineが蓄積した。次に、第5葉完全展開期イネにおけるその蓄積量の日周変動を調べると、他のアミノ酸とは異なり、一定であった。(3R)- -tyrosine蓄積量の動態は他のアミノ酸とは異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本晴(イネ、ジャポニカ種)は非タンパク性アミノ酸(3R)- -tyrosineを産生する。(3R)- -Tyrosineは双子葉植物の根の伸長を特異的に阻害するが、イネ等の単子葉類には活性を示さない。(3R)- -tyrosineおよびその類縁体を用いて構造と活性を比較したところ、活性発現には -位のアミノ基とベンゼン環中のp-位の水酸基の共存が必要であった。イネには無害で、双子葉雑草に効果を示す薬剤のシーズ開発につながる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：(1) (3R)- and (3S)- -tyrosine showed inhibitory activity on Arabidopsis root elongation, whereas neither m-(3R)- -tyrosine nor o-(3R)- -tyrosine showed any inhibitory activity. The coexistence of an amino group at the -position and a hydroxy group at the p-position in the benzene ring was required for the activity. (2) The accumulation of (R)- -tyrosine in rice plants at different growth stages (3rd, 5th and 7th leaf stage) showed that (3R)- -tyrosine accumulated after the 5th leaf stage. The highest accumulation of (3R)- -tyrosine was observed in the fifth leaf of the fully expanded rice plants. The diurnal variation of (3R)- -tyrosine accumulation in the fully expanded fifth leaf of rice was constant, unlike that of other amino acids. This result indicates that the dynamics of (3R)- -tyrosine accumulation is different from those of other amino acids.

研究分野：化学生態学

キーワード：非天然アミノ酸 根の伸長阻害 アレロパシー活性 beta-tyrosine

1. 研究開始当初の背景

アミノ基が α -位から β -位に転移した β -アミノ酸は、微生物由来の非リボソームペプチドや抗生物質の構成成分として同定されている。また、針葉灌木の一種セイヨウイチイ由来の抗がん剤タキソール中にも β -phenylalanine が含まれる。しかし、セイヨウイチイ以外の植物から β -アミノ酸が同定された報告はなかった。

このような状況下で、申請者らは、イネ品種、日本晴 (ジャポニカ) の葉および根の滲出液から (3*R*)- β -tyrosine を検出し、その生合成酵素 tyrosine 2,3-aminomutase (TAM1) も同定した (The Plant Cell, 2015)。本研究は、植物から β -tyrosine およびその生合成遺伝子 (OsTAM1と命名) を同定した世界で初めての報告である。

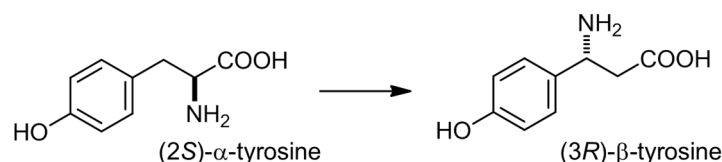


図1 イネ (日本晴) と (3*R*)- β -tyrosine の生合成過程

さらに、我々は (3*R*)- β -tyrosine が双子葉植物のシロイヌナズナ・タバコ・タルウマゴヤシ・ヤセイカンランに対して、根の伸長阻害活性 (アレロパシー活性) を示すことを見出した。その一方で、単子葉植物のイネ・オオムギ・アワ・ミナトカモジグサには活性を示さないことも明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究の目的を以下に示す。

(1) シロイヌナズナに対する (3*R*)- β -tyrosine のアレロパシー活性の作用機序

我々が調べた限り、(3*R*)- β -tyrosine は双子葉植物の根の伸長阻害活性 (アレロパシー活性) を示すが、単子葉植物の根に対しては活性を示さない。そこで、双子葉植物と単子葉植物に対する (3*R*)- β -tyrosine の活性の違いを生物有機化学的な観点で明らかにするために、 α -tyrosine、 β -tyrosine、 α -phenylalanine、 β -phenylalanine の *R*-体、*S*-体および類縁体として *m*-(3*R*)- β -tyrosine や *o*-(3*R*)- β -tyrosine を用いて、それらのアレロパシー活性を比較した。

さらに、 β -tyrosine 処理による PAL 活性、POD 活性およびリグニン量の変化をコントロールと比較し、双子葉植物に対する β -tyrosine のアレロパシー活性発現機構のメカニズムを解明する。

得られた成果をもとに、単子葉植物のイネに無害であるが、双子葉の水田雑草に特異的に効果を示す新しい除草剤のシーズ開発を目指す。

(2) 日本晴における (3*R*)- β -tyrosine の生理的・生態的役割の解明

傷害応答の植物ホルモンであるジャスモン酸処理により、日本晴の (3*R*)- β -tyrosine 量は増加する。そこで、日本晴における (3*R*)- β -tyrosine の生理的・生態的役割の解明のために、チョウ目幼虫をターゲットにして (3*R*)- β -tyrosine を摂食させた場合、幼虫の生育に与える影響を調べた。

さらに、日本晴の各生育段階で、部位別に蓄積される (3*R*)- β -tyrosine 量を他の天然アミノ酸と比較することで、天然アミノ酸とは異なる β -tyrosine 特有の植物体中での動態を探った。

上記の2点の観点から、日本晴における β -tyrosine の生理的・生態的役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナに対する (3*R*)- β -tyrosine のアレロパシー活性の作用機序

α -Tyrosine、 β -tyrosine、 α -phenylalanine、 β -phenylalanine の *R*-体および *S*-体を用い、根に対するアレロパシー活性を比較した。さらに、 β -tyrosine 類縁体として、 β -tyrosine からアミノ基を除いた構造を持つフロレット酸、*m*-(3*R*)- β -tyrosine や *o*-(3*R*)- β -tyrosine のアレロパシー活性も調べた。

まず、生物試験法を下記のように確立した。1/2 MS 培地をシャーレに調製し、滅菌したシロイヌナズナ種子を各 10 粒播種後、4 で 4 日間静置した。インキュベーター (16 h/light/26 °C, 8 h/dark/18 °C) で 3 日間生育させた後、供試化合物を添加した 1/2 MS 培地に移植し、4 日間生育させた。4 日後のシロイヌナズナの根の長さを画像解析ソフト ImageJ で測

定し、根の伸長阻害活性を比較した。

さらに、(3*R*)-β-tyrosine で処理したシロイヌナズナの根における phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 活性、peroxidase (POD)活性そしてリグニンの量を調べた。

(2) 日本晴における (3*R*)-β-tyrosine の生理的・生態的役割の解明

二次代謝物には、その機能に応じて蓄積量が時間的に変動する場合がある。そこで、日本晴における (3*R*)-β-tyrosine 蓄積量の生育段階での変動および日周の変動を調べた。日本晴の地上部を凍結破碎し、その 80% MeOH 抽出液をアミノ酸誘導体化試薬 AQC と反応させて LC/MS 分析に供した。

はじめに、各生育段階（第 3、5、7 葉完全展開期）の (3*R*)-β-tyrosine 蓄積量を全身で比較した。また、第 5、6、7 葉完全展開期イネを用いて、葉ごとに (3*R*)-β-tyrosine 蓄積量を定量した。さらに、第 5 葉完全展開期イネにおける (3*R*)-β-tyrosine 蓄積量の日周変動も調べ、他のアミノ酸と比較した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナに対する (3*R*)-β-tyrosine のアレロパシー活性の作用機序

「シロイヌナズナを用いた根の伸長阻害活性を評価する試験系を確立」し、その実験系を用いて「(3*R*)-β-tyrosine 類縁体のうちシロイヌナズナ根の伸長阻害活性を示すのは何か」を調べた。

その結果、(3*R*)-β-tyrosine と (3*S*)-β-tyrosine がシロイヌナズナ根の伸長を阻害する一方、(3*R*)- および (3*S*)-β-phenylalanine は活性を示さないこと、β-tyrosine からアミノ基を除いた構造を持つフロレート酸にも根伸長の阻害活性は認められなかった。さらに、*m*-(3*R*)-β-tyrosine や *α*-(3*R*)-β-tyrosine にも根の伸長阻害活性は認められなかった。したがって、(3*R*)-β-tyrosine の根伸長阻害活性の発現には、β-位のアミノ基とベンゼン環の *p*-位の水酸基の共存が必要と結論した。

また、処理時に (3*R*)-β-tyrosine の 16 倍量の天然の (*S*)-α-tyrosine (50 μM) を加えると根の伸長阻害活性が緩和されることも新たに見出した。興味深いことに、非天然型の (*R*)-α-tyrosine や天然型の (*S*)-α-phenylalanine では、この緩和効果は観察されなかった。

さらに、(3*R*)-β-tyrosine で処理したシロイヌナズナ根における phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 活性、peroxidase (POD) 活性そしてリグニンの量を調べた結果、コントロールと比較すると(3*R*)-β-tyrosine 処理により PAL 活性、POD 活性が上昇する一方、リグニン量が減少した。特に、リグニン量の減少と根の長さの対数値が有意に相関し、リグニン量の減少に伴い根の伸長が阻害された。

双子葉植物と単子葉植物の顕著な差として、双子葉植物に特異的な一次細胞壁成分として tyrosine dimer が知られている。単子葉植物の一次細胞壁は糖鎖で構成されているのに対し、双子葉植物では糖鎖と塩基性タンパク質（エクステンシン）で構成される。このエクステンシンの架橋に tyrosine dimer が関与している。上述した β-tyrosine 処理により PAL 活性、POD 活性の上昇とリグニン量の減少が tyrosine dimer の架橋にどのように影響するかが、本研究における一つのポイントになるかも知れない。

以上の結果は、双子葉植物に対する (3*R*)-β-tyrosine の作用機序の解明につながる結果である。

(2) 日本晴における (3*R*)-β-tyrosine の生理的・生態的役割の解明

当初、植食性昆虫に対する (3*R*)-β-tyrosine の生理活性に着目し、研究を展開してきたが、現時点でチョウ目害虫に対し明確な活性は確認できていない。そこで、視点を変え、日本晴体内における (3*R*)-β-tyrosine の動態に着目した。

各生育段階（第 3、5、7 葉完全展開期）の蓄積量を全身で比較すると、第 5 葉完全展開期以降に (3*R*)-β-tyrosine が蓄積した。また、第 5、6、7 葉完全展開期イネを用いた部位別の検討では、いずれも最上位葉（新葉）にもっとも多く (3*R*)-β-tyrosine が蓄積した。次に、第 5 葉完全展開期イネにおける (3*R*)-β-tyrosine 蓄積量の日周変動を調べた。他のアミノ酸（α-tyrosine と α-phenylalanine 等）が概日リズムに合わせて一定周期で変動するのに対して、(3*R*)-β-tyrosine の濃度はほぼ一定であった。すなわち、(3*R*)-β-tyrosine 蓄積量の動態は他のアミノ酸とは異なっていた。

これは、日本晴における (3*R*)-β-tyrosine の生理的・生態的役割の解明につながる重要な知見である。

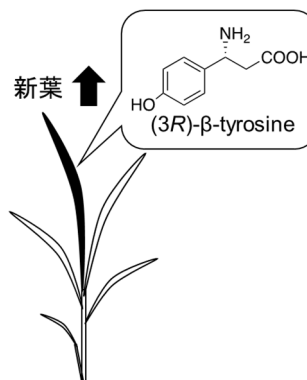


図 2 日本晴における (3*R*)-β-tyrosine の新葉における蓄積

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 森直樹, 阪本駿太, 網干貴子, 吉川貴徳, 寺石政義, 吉永直子, 奥本裕	4. 巻 -
2. 論文標題 イネ（日本晴）における(3R)- α -チロシンの生合成	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori N, Noge K	4. 巻 85
2. 論文標題 Recent advances of chemical ecology: complex interactions mediated by molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 33-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阪本駿太, 井上貴斗, 吉永直子, 小林優, 寺石政義, 奥本裕, 森直樹
2. 発表標題 (R)- α -tyrosine がシロイヌナズナ根の細胞壁形成酵素に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中道雅貴, 中田隆, 吉永直子, 小林優, 寺石正義, 奥本裕, 森直樹
2. 発表標題 イネが生産する(R)- β -tyrosineのシロイヌナズナにおける根の生育阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阪本駿太, 吉川貴徳, 寺石政義, 吉永直子, 小野肇, 森直樹
2. 発表標題 イネがもつ(R)- -tyrosine量の時間的変動
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2021年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yoshinaga N, Mori N (edited by Tabata J)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 CRC Press, Taylor & Francis Group	5. 総ページ数 296
3. 書名 Chemical Ecology of Insects, Applications and Associations with Plants and Microbes	

1. 著者名 森直樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版社	5. 総ページ数 367
3. 書名 蟲瞰学：持続可能な農業を創生するバイオミメティクスにおける農学・自然史学・工学連携 バイオミメティクス・エコノミクス（下村政嗣監修）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学農学研究科応用生命科学専攻化学生態学分野HP http://www.chemeco.kais.kyoto-u.ac.jp/publications.html http://www.chemeco.kais.kyoto-u.ac.jp/ 京都大学農学研究科応用生命科学専攻化学生態学分野 http://www.chemeco.kais.kyoto-u.ac.jp/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	寺石 政義 (Teraishi Masayoshi) (80378819)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California at San Diego			