

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：17102
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：24650479
研究課題名(和文) 燃焼系 D - アミノ酸増強トマト果実におけるキラル技術の応用

研究課題名(英文) Application for amiono acids of tomato fruit.....

研究代表者

井上 眞理 (Iwaya-Inoue, Mari)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60091394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：トマト果実のSIALaRacemase1およびSIALaRacemase2をクローニングし、塩基配列を決定し、ラセマーゼの予想分子量と一致する45kDaおよび47kDaのGST融合タンパク質を調製することに成功した。また、糖代謝制御に関わるSNF関連キナーゼが肥大期の果実で特異的に発現することを見出した。一方で、ダイズ子実における分岐鎖アミノ酸(BCAA)合成に関与する分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(BCAT)について、4候補遺伝子を選抜した。子実貯蔵タンパク質の合成が盛んになるにつれ全BCAA量が急激に増加し、もやしにおいても、栄養飢餓に応答して顕著に誘導されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Sequencing analysis of SIALaRacemase1 and SIALaRacemase2 for tomato fruit was determined. GST-fusion proteins for 45kDa 47kDa were also produced. In addition, semi-quantitative RT-PCR for tomato organs at the various developmental stages indicated that SICIPK2 was expressed specifically in the reproductive organs. An anti-CIPK specific antibody recognized the recombinant SICIPK2 specifically and cross-reacted to a CIPK-related polypeptide at a significant level in flower, particularly in stamen. The flower specific CIPK was tightly associated with the microsomes. In addition, expression profiles of branched chain amino acid transferase genes (BCATs) in soybean grains during pod filling stages were also indicated.

研究分野：作物学

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：アミノ酸 栄養 トマト ダイズ

1. 研究開始当初の背景

蔬菜類や果物中に含まれる D-アミノ酸の増強により味覚改良に繋がることが期待されるが、その生合成機構は明らかにされていない。疎水性アミノ酸のうちロイシン、イソロイシン、バリンは分岐鎖アミノ酸 (BCAA: Branched-chain amino acid) とよばれ、特にエネルギー代謝や細胞増殖、翻訳・転写活性を促進する効果がある。本研究で着目しているアラニンは、ロイシン、イソロイシン、バリンとともに燃焼系アミノ酸といわれ、身体のエネルギー代謝を促進することが知られている。これらは、体内で脂肪分解酵素リパーゼを活性化させるため、ダイエットやスポーツ産業から注目されている。本研究では、トマト果実やダイズ子実のアミノ酸生合成経路を中心に焦点をあてる。

2. 研究の目的

トマト果実およびダイズ子実に含まれる燃焼系アミノ酸に着目する。即ち、果実や子実の旨味アミノ酸成分に焦点を当て、燃焼系アミノ酸合成の向上、天然キラル化酵素による自然な甘味成分 D-体アミノ酸含有量の向上、アミノ酸との相互作用を検討する。

3. 研究の方法

トマト *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom 果実およびダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) cv. フクユタカ子実の成熟過程におけるアミノ酸の相互作用を調べた。アミノ酸は、HPLC, ACQUITY UPLC (Waters 社) を用いた。カラムは ODS カラムを使用し、流速は 0.25 mL/min に設定して、OPA/NAC 法によってアミノ酸分析を行った。既知のラセマーゼ

および *AtBCAT* 遺伝子ファミリーの情報に基づく保存性の高い配列部分を利用したプライマーの作製と遺伝子を特定した。

4. 研究成果

従来、高等植物には L-アミノ酸の重合したタンパク質が重要であり、D-アミノ酸はほとんど存在しないと考えられていた。D-アラニンを含むトマトを作出する目的で、これまでに藻類、酵母から報告されているアラニンラセマーゼ遺伝子と相同性の高い遺伝子候補をトマト EST データベースより探索した。既知のアラニンラセマーゼ遺伝子と相同性の高い 2 つのトマト EST 塩基配列を元に、常法に従いトマト cDNA ライブラリーを鋳型に 3'-RACE 法により、*SlAlaRacemase1* および *SlAlaRacemase2* をクローニングして塩基配列を決定した。さらにこれらの遺伝子を pGEX4T-1 ベクターに組み込み、グルタチオン S 転スフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を大腸菌において発現、精製することにより、予想分子量と一致する 45kDa および 47kDa の GST 融合タンパク質を調製することに成功した。また、トマト果実の糖度向上に着目し、糖代謝制御に関わる SNF 関連キナーゼが肥大期の果実で特異的に発現することを見出した。さらに、トマト果実および花は器官特異的に、Calcineurin B-like molecule (CBL) interacting protein kinase (CIPK) が発現していることについて、明らかにした。

一方で、アラニンと同様に、分岐鎖アミノ酸 (BCAA: Branched-chain amino acid; バリン、ロイシン、イソロイシン) は、タンパク質の合成やエネルギー源として利用されるだけでなく、タンパク質代謝を調節する因子として

も知られ、その機能性が注目されている。そこで、ダイズ子実における BCAA 合成の制御機構を解明した。BCAA 合成を行う重要な酵素とされる分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(BCAT : Branched-chain aminotransferase)について、既知のシロイヌナズナ BCAT の配列をもとにダイズでの BCAT ホモログをコードする遺伝子を探索した。AtBCAT との高い相同性が認められた GmBCAT2、GmBCAT3、GmBCAT4、GmBCAT5 の4つを候補遺伝子として選抜し、発現解析を行った。子実内のアミノ酸プールに蓄えられた BCAA はタンパク質合成に使われるため、BCAA 供給における GmBCAT3 の働きを補うため残りの GmBCAT2,4,5 が発現し、種子貯蔵タンパク質の合成が盛んになるにつれ全 BCAA 量が急激に増加していると考えられた。

また、ダイズ芽生えにおける GmBCAT3 の遺伝子発現および BCAT 関連タンパク質の解析を行ったところ、栄養飢餓に应答して顕著に誘導された。このことより、BCAT3 はエネルギー供給のための BCAA 分解にも関与していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Yuasa, T., Nagasawa, K., Osanai, A., Kaneko, A., Tajima, D., Nang, MPSH., Ishibashi, Y. and Iwaya-Inoue, M. (2013) Induction of a bZIP type transcription factor and amino acid catabolism-related genes in soybean seedling in response to starvation stress. *J. Bot.* 2013, Article ID 935479, 8 pages

doi.: 10.1155/2013/935479

Yusasa, T., Yushi Ishibashi, Mari Iwaya-Inoue (2012) A flower specific calcineurin B-like molecule (CBL)-interacting protein kinase (CIPK) homolog in tomato cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.), *Amer. J. Plant Sci.*,3,753-763

〔学会発表〕(計3件)

長澤友里, 清水泰博, 長内克真, 金子彩実, 田島大地, 土居克美, 大島敏久, 石橋勇志, 井上眞理, 湯淺高志. ダイズ子実の肥大成長に伴う分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(BCATs)遺伝子の発現変動 日本作物学会、2014.03.29. 千葉大学、千葉市

金子彩実, 長澤友里, 田島大地, 石橋勇志, 湯淺高志, 井上眞理. 糖飢餓シグナルに应答したダイズの bZIP 型転写因子とアミノ酸転流関連遺伝子の発現誘導, 植物生理学会大会, 2013.03.21. 岡山大学、岡山市

湯淺高志, 山口春香, 中村純也, 石橋勇志, 井上眞理. 高等植物のオリゴ糖合成遺伝子発現による環境ストレス耐性獲得メカニズム, 植物生理学会大会, 2013.03.21. 岡山大学、岡山市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/sakumotsu/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上眞理 (Mari IWAYA - INOUE)

研究者番号 : 60091394

(2)研究分担者

湯浅 高志 (Takashi YUASA)

研究者番号 : 40312269

(3)連携研究者 なし

研究者番号 :