

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560038

研究課題名(和文)分岐鎖アミノ酸代謝シグナル制御による機能性大豆の作出

研究課題名(英文)Improvement of nutritional properties in soybean by branched amino acid signaling

研究代表者

湯浅 高志 (Yuasa, Takashi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：40312269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ芽生えにオートファジー誘導を引き起こす糖飢餓処理においてBCAAやプロリンを分解するBCAA特異的アミノ基転移酵素BCATとプロリン脱水素酵素ProDHが顕著に誘導された。また新規bZIP型転写因子の二つのダイズオルソログのうち一方のみが糖飢餓処理時に発現誘導された。BCATとbZIP53転写因子に対する抗ペプチド抗体を作成した。イムノプロットにより、糖飢餓処理ではBCATとbZIP転写因子のタンパク質レベルが共に顕著に増加した。BCATプロモーターにはbZIP53との結合コンセンサス配列が見つかることから、bZIP53転写因子がBCAT発現を転写レベルで調節することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sucrose starvation treatment significantly enhanced the expressions of GmbZIP53A, but not GmbZIP53B asparagine synthase (GmASN), proline dehydrogenase (GmProDH), and branched chain amino acid transaminase (GmBCAT). GmbZIP53-related immunoreactive signals were upregulated under severe starvation with sucrose starvation and protease inhibitors, while sucrose and sucrose starvation had no or marginal effects on the signal. Profiles of induction of GmASN, GmProDH and GmBCAT3 under various nutrient conditions were consistent with the profiles of GmbZIP53 protein levels but not with those of GmbZIP mRNA levels. These results indicate that GmbZIP53 proteins levels are regulated by posttranslational mechanism in response to severe starvation stress and that the increased protein of GmbZIP53 under severe starvation accelerates transcriptional induction of GmASN, GmProDH, and GmBCAT.

研究分野：作物分子生物学

キーワード：アミノ酸 栄養シグナル オートファジー ダイズ 転写因子 ATG8 BCAT bZIP型転写因子

1. 研究開始当初の背景

BCAA 合成系と分解系のどちらにも関与する重要な酵素として、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT : Branched-chain aminotransferase)がある。合成経路では最終段階で α -ケト酸をアミノ酸に変換する反応を、分解経路では最初の段階でそれぞれのアミノ酸を α -ケト酸へと分解する反応を触媒する。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*(L.) Heynh.)では、合成系 BCAT は葉緑体、分解系 BCAT はミトコンドリアに局在することが知られている (Diebold et al.2002, Schuster et al. 2005)。シロイヌナズナ BCAT は、6 つの AtBCAT 遺伝子ファミリーによってコードされ、AtBCAT-1 はミトコンドリア、AtBCAT-2,3,5 は葉緑体、AtBCAT-4, 6 は細胞質に局在する酵素であることが知られている (Schuster et al. 2005)。植物における BCAT の研究は、シロイヌナズナの他に、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.)やトマト (*Solanum lycopersicum* L.)などごく少数の植物で行われている (Binder et al. 2007, Maloney et al. 2010)。近年、BCAT やアミノ酸代謝酵素の遺伝子発現をマスター調節する糖飢餓誘導性 bZIP 転写因子が報告されており、発生段階や外環境シグナルにより BCAT が複雑に制御される可能性が示唆された (Dietrich et al. 2011, Kaneko et al. 2013)。

2. 研究の目的

ダイズ子実のタンパク質含有率は約 35%と、植物としては非常に高く、栄養価の高い作物として、また健康維持に有効な機能性食品として近年注目されてきた。タンパク質は 20 種類の L-アミノ酸から構成されており、生体内において各アミノ酸にはそれぞれ異なる多様な生理機能があることが知られている。なかでも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) と呼ばれ、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 (Kimball et al. 2006)。ダイズの子実における BCAA 含量を増加することで食品の機能性栄養強化と飼料の畜肉生産効率増大が期待される。

ダイズ BCAT はダイズの栄養機能性に重要な働きをしていることが期待されるものの、その遺伝子発現、細胞内局在や生化学的性質についてほとんど報告されていない。そこでダイズの BCAA 含量増大に向けた遺伝的改良に必要なダイズ BCAT 遺伝子およびアミノ酸動態に着目し、まず子実肥大期のダイズ子実の分岐鎖アミノ酸含量の変動と、ダイズの BCAT 遺伝子の探索および発現レベルの解析を行った。

3. 研究の方法

3-1 栽培条件

供試作物としてダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) 'フクユタカ' を用い、九州大学貝塚

圃場において基肥として苦土石灰と豆化成分を 1a 当り各 15kg 施し、2012 年 7 月 23 日に種子深度が 3cm になるように 2 粒ずつ播種し覆土した。播種後、土壌の表面が適度に湿る程度に灌水を行った。灌水と除草、農薬 (スミチオン、マラソン) 散布は適宜行った。

3-2 摘葉, 摘莢処理

ソース-シンクバランスを変化させるために自然条件下で栽培したコントロール区と、処理区として、各本葉において 3 枚の小葉のうち 2 枚を切除した摘葉区、節ごとに莢の数が半分になるように莢を切除した摘莢区を設けた。国際的に使用されているダイズの生育時期の表示 (Hashimoto 1980) に従い、処理開始は子実肥大始 (R5) とし、摘葉区では 10 月 8 日に、摘莢区では 10 月 9 日に処理を行った (Fig. 1)。

3-3 サンプルング

子実肥大開始 (R5) から子実肥大盛 (R6) の間でサンプルングを行った。子実肥大期に入る前に、成長速度が同じ個体を選抜してラベリングした。粒長が 3mm 以上に達した時点の子実肥大開始 0 日目として、7 日おきに計 6 回、2 個体 1 株を 1 反復としてサンプルングを行った。コントロール区は 5 反復、摘葉区と摘莢区はそれぞれ 3 反復行った。

1 株内のすべての莢から種子を取り出し、粒数と粒重を量った後、1 粒あたりの重さの平均を算出した (Fig. 2)。その平均値に近い種子をランダムに選んで 1g 前後になるように量り取り、素早くアルミホイルでサンプルを覆い、液体窒素で瞬間凍結させ -80 で保存した。

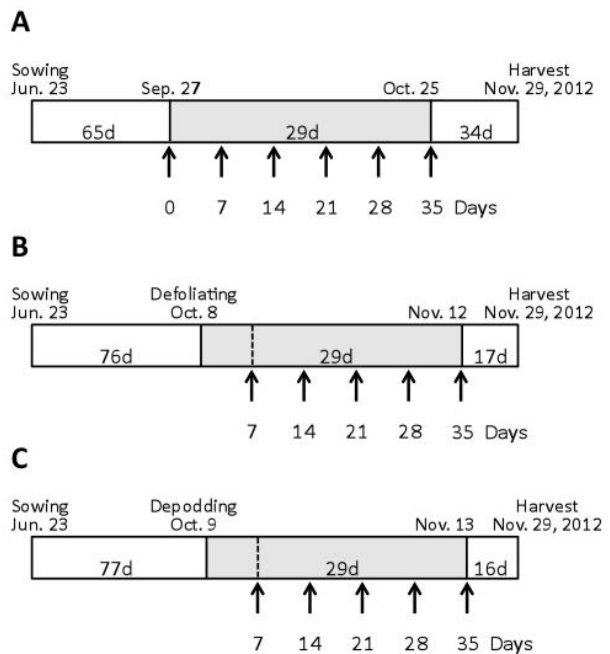


Fig. 1 Treatments and sampling intervals of soybean (A) Control, (B) Defoliation, (C) Depodding.

3-4 全アミノ酸,遊離アミノ酸の調製

滅菌済みの乳鉢を氷上に置き、-80 に保存しておいたサンプルと 10×サンプル重量 (mL)の 20mM リン酸バッファー(等量の 20mM NaH₂PO₄·2H₂O + 20mM Na₂HPO₄)を入れ、液体状になるまで乳棒で破碎する。破碎液を、2本のフタ付 2mL チューブに 0.4mL ずつ入れ、一方を Total アミノ酸分析用、もう一方を Free アミノ酸分析用の試料とした。0.4mL の破碎液が入ったチューブに、0.6mL の 10M HCl を加え素早くフタをし、110 に設定したインキュベーター内で 12 時間保温し完全に塩酸加水分解した。12 時間後チューブを取り出し、4, 13,000rpm, 15 分遠心分離した。浮遊物が混入しないように上清を吸い取ってフタ付 2mL チューブに移し、10M NaOH で pH7 付近になるように調節したものを全アミノ酸分析用とした。0.4mL の破碎液が入ったチューブに、0.5mL 滅菌水、100% 0.1mL トリクロロ酢酸を加え素早くフタをし、-4 で 12 時間冷却した。12 時間後チューブを取り出し、4, 13,000rpm, 15 分遠心分離した。上清をフタ付 2mL チューブに移し、Total アミノ酸試料全量の 10%量の 400mM リン酸バッファーを加え、Total アミノ酸試料と等量になるように滅菌水でメスアップした。このとき 10M NaOH で pH7 付近になるように調節したものを遊離アミノ酸分析用とした。

3-5 アミノ酸分析

HPLC 機器は、アミノ酸分析システム ACQUITY UPLC(Waters 社)を用いた。カラムは ODS カラムを使用し、流速は 0.25mL/min に設定して、OPA/NAC 法によってアミノ酸分析を行った。バイヤル(Waters 社)にサンプル試料 25μL, OPA/NAC の混合溶液(0-フタルアルデヒド(OPA)と N-アセチルシスチニン(NAC)をそれぞれの濃度が 16g/L, 20g/L になるようにメタノールに溶解し, OPA : NAC = 1 : 1 の割合で混合した溶液) 50μL, 0.4M ホウ酸ナトリウムバッファー 175μL を入れ、18 で 2 分間放置した後、分析機器にセットした。なお標準サンプルとして各 1mM スタンダードアミノ酸 mixture を用いた。

3-6 遺伝子発現解析

AtBCAT1 と相同性を持つダイズ遺伝子候補を、Phytozome v6.0 (<http://www.phytozome.net>) と DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>)の植物ゲノムデータベースを用いて検索した。ダイズ BCAT 候補遺伝子について CLUSTALW(<http://align.genome.jp/>)を用いてアミノ酸レベルの相同性を比較し系統樹を作製した。発現解析に用いたプライマーは PCR 産物が 500~600bp 程度になるように設計した。プライマーは 25~30 塩基, T_m 値 60~67, %CG を 45%前後の範囲で設計した。3'-プライマーは 3'-UTR で設計し、特異性がより高くなるようにした (Yuasa et al. 2013)。

常法に従い SDS-フェノール-LiCl 法によりトータル RNA 抽出を行った。鑄型 RNA 量 1μg に 5pmol アニーリング後, ReverTra Ace キット(逆転写酵素) (TOYOBO 製)による cDNA を合成した。cDNA, 標的遺伝子の 5'-プライマーと 3'-プライマー(Table 1)と Go Taq Green Master Mix(Promega)およびサーマルサイクラ (PC816, ASTEC)を用いて PCR 反応を行った。反応条件は, 94 : 2 分, [94 : 10 秒, 54~58 : 10 秒, 72 : 40 秒]×24~36 サイクル, 72 で 5 分の温度サイクルプログラムを使用した。増幅された DNA 産物をアガロース電気泳動, 臭化エチジウム染色の後, 冷却 CCD 微量光/蛍光分析器 AlphaInnotech (ASTEC 社)により DNA シグナルを解析した。

3-7 免疫化学的解析

BCAT の遺伝子発現に加えてダイズ BCAT の機能を調べるには植物内在性 BCAT タンパク質を検出する方法が必要である。そこで高等植物の BCAT のアミノ酸配列を比較した。その結果, BCAT タンパク質において "H₂N-LANKRWVPPGKGSLSLYLRP-COOH" の良く保存された 19 アミノ酸から成るペプチド配列を見だし, それを抗原として抗ペプチド抗体を作成した(シグマアルドリッツ)。ダイズ種子発芽後 7 日間培養した芽生えに対して 3% ショ糖処理, 栄養飢餓+プロテアーゼ阻害剤(ロイペプチン, E-64d, キナクリン)処理を行い 12, 24, 48 時間にそれぞれサンプリングして -80 凍結保存した。それらのサンプルを用いて遺伝子発現変動を RT-PCR で分析すると共に BCAT タンパク質レベルの変動を ECL 法によるイムノプロットにより AlphaInnotech を用いて解析した。

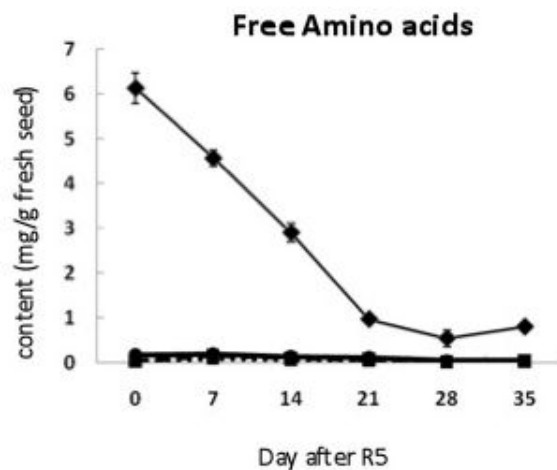


Fig. 2 Profiles of free glutamine and free BCAA contents and free BCAA contents in soybean seeds during the seed filling stage (Control). BCAA(Branched chain amino acids) () Glutamine, () valine, () leucine, () isoleucine.

4. 研究成果

4-1 ダイズ子実肥大期のグルタミンおよびBCAAの全アミノ酸,遊離アミノ酸の含量の変動

転流アミノ酸の一つとされるグルタミンの含量(遊離アミノ酸含量)を測定した(Fig. 2). その含量は子実肥大初期で最も高い値を示し,子実肥大開始 21 日目までは急激に減少し,21 日目以降あまり変化は見られなかった. いずれの処理区においても,子実肥大に伴ってバリン,ロイシン,イソロイシンの全アミノ酸含量は増加し,遊離アミノ酸含量は減少傾向にあった(Fig. 3B,D,F).

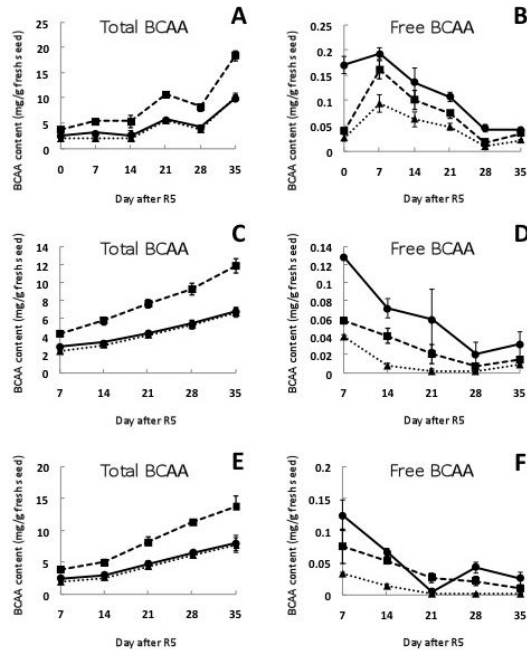


Fig. 3 Profiles of total BCAA contents (A,C,E) and free BCAA contents (B,D,F) in soybean seeds during the seed filling stage. (A,B) Control, (C,D) Defoliation, (E,F) Depodding. (○) valine, (□) leucine, (△) isoleucine.

BCAAの全アミノ酸含量に着目すると,子実肥大初期ではあまり変化は見られなかったが,子実肥大開始 14 日目以降より増加が見られた(Fig. 3A). 一方,BCAAの遊離アミノ酸含量は,子実肥大開始 7 日目を境に増加から減少に転じた(Fig. 3B). BCAAのそれぞれのアミノ酸種に着目すると全アミノ酸含量としてはどのステージにおいてもロイシンが最も多く,バリン,イソロイシンは各ステージでほぼ同量ずつ含まれることがわかった(Fig. 3A). 一方,遊離アミノ酸含量ではバリンが最も多く,次いでロイシン,イソロイシンとなったが,子実肥大開始 35 日目には3種のBCAAの遊離アミノ酸含量に有意差はなかった(Fig. 3B).

それぞれの処理区間で3種のBCAAアミノ酸含量を比較すると,全アミノ酸含量はほとんど差がなく,いずれのアミノ酸においても

子実肥大開始 35 日目ではコントロール区で最も多くなった. 遊離アミノ酸含量では,コントロール区では 0-7day にかけて一過的に上昇した後,徐々に低下したのに対し,摘葉区と摘莢区では 0day に最大値を示し,徐々に低下した. いずれの BCAA アミノ酸分子種においてもコントロール区で最も含量が多く,子実肥大初期(0-7day)での差が最も大きく,子実肥大に伴って差は小さくなった(Fig. 3B,D,F).

分岐鎖アミノ酸(BCAA)は,このグルタミンなどから供給されるアミノ基と,主にショ糖由来の有機酸をもとに子実で合成される. 遊離アミノ酸含量は,いずれの BCAA も子実肥大開始 7 日目を境に,増加から減少へと転じている(Fig. 3B). このことより,子実肥大開始とともに,葉やその他のソース器官から子実へと供給された転流アミノ酸であるグルタミン,アスパラギンやウレイドを材料に速やかに BCAA の合成が始まり,やがて BCAA はタンパク質合成に使われるため,子実肥大開始 7 日目以降は遊離アミノ酸含量は減少していると考えられる. 加えて,子実肥大開始 7 日目から子実重の増加が始まり,またいずれの BCAA においても子実肥大中期より顕著に全アミノ酸含量が増加していることから,この時期から貯蔵物質であるタンパク質の合成を開始したのではないかと考えられる. 4-2 ダイズ子実肥大に伴う BCAT 遺伝子の発現変動

コントロール区において,成長ステージごとに子実で 4 つの候補遺伝子: GmBCAT2 (Glyma04g05190.1), GmBCAT3 (Glyma01g40420.1), GmBCAT4 (Glyma08g06750.1), GmBCAT5 (Glyma01g34580.1) の発現解析を行った. その結果,2 種類の発現パターンがあることが明らかとなった(Fig. 4). GmBCAT3 は子実肥大初期に最も発現が高く,次第に低くなった. 一方,残りの GmBCAT 遺伝子は子実肥大開始 0 日目ではほとんど発現しておらず,子実肥大

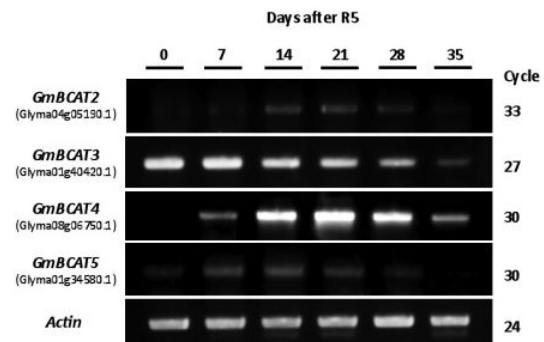


Fig. 4 The expression profiles of GmBCATs in soybean seeds during the seed filling stage

中期に最も発現が高くなり、その後低くなった。

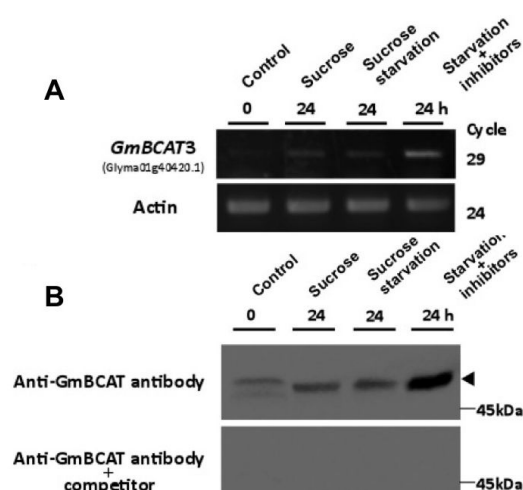


Fig. 5 Induction of *GmBCAT3* of soybean seedlings in response to starvation treatment. (A) RT-PCR, (B) Immunoblot with anti-BCAT antibody (ECL)

BCAA 含量の結果と子実での遺伝子発現パターンから、まず子実肥大初期に *GmBCAT3* が働き、葉やその他のソース器官から転流されてくるアミノ酸から盛んに BCAA を合成し、子実内のアミノ酸プールに蓄えられた BCAA は細胞分裂を促進する因子として機能しているのではないかと考えられる。その後タンパク質合成が盛んになり遊離アミノ酸レベルが低下してくる子実肥大 7 日目以降、*GmBCAT3* の働きを補うため残りの *GmBCATs* が働き始めると考えられる。このことは、Total BCAA 含量が子実肥大 14 日目以降急激に増加していることから説明できる (Fig. 3A)。

4-3 栄養飢餓処理に伴う *GmBCAT3* の遺伝子・タンパク質レベルの変動

栄養飢餓ストレス処理に応答したオートファジー活性化に伴ってダイズ芽生えの BCAA 特異的アミノ基転移酵素 (*GmBCAT3*) が顕著に発現誘導されることが示された (Fig. 5)。このことより *GmBCAT3* は栄養飢餓ストレス処理の違いにより転写レベル・タンパク質レベルで複雑な調節を受けることが示唆された。ダイズ子実の BCAA 含量調節において子実肥大に伴う発生レベルの調節に加えてソースからシンクへの糖転流シグナルが BCAT 遺伝子の発現調節に機能していることが示唆された。

4-4 要約

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 BCAA 含量の高いダイズの作出を将来的な研究目標として、本研究

ではダイズ子実における BCAA 合成の制御機構を解明することを目的とした。

まず肥大に伴う子実内の BCAA 含量の推移を明らかにするためアミノ酸分析を行った。また 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した。AtBCATs との高い相同性が認められた Glyma04g05190.1 (*GmBCAT2*), Glyma01g40420.1 (*GmBCAT3*), Glyma08g06750.1 (*GmBCAT4*), Glyma01g34580.1 (*GmBCAT5*) の 4 つを候補遺伝子として選抜し、発現解析を行った。

子実の BCAA 含量の推移と BCAT 遺伝子発現パターンから、まず子実肥大初期に *GmBCAT3* が発現し、葉やその他のソース器官から転流されてくるアミノ酸から盛んに BCAA を合成していると考えられる。子実を大きくするため細胞分裂が盛んに行われる時期にかけて遊離の BCAA 量を増加させていることより、BCAA が細胞分裂を促進するシグナルとして働いている可能性が示唆された。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る。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、栄養飢餓に応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 3 件)

- (1) YUASA T, IMAMURA M, Ayami KANEKO, NOGUCHI E, SAKAMOTO T, UCHIBAE A, HASHIGUCHI Y, KURAUCHI E, ARIMURA M, ISHIBASHI Y, IWAYA-INOUE M, "Molecular mechanisms of flowering suppression of a drought tolerant legume, cowpea, in response to water deficient stress", Proceedings of the 50th Conference on the Biology of Halophilic Microorganisms, vol. 50 p11-14, (2014) 【査読なし】
- (2) Yuasa T, Nagasawa Y, Osanai K, Kaneko A, Tajima D, Nang MPSH, Ishibashi Y, Iwaya-Inoue M. "Induction of a bZIP type transcription factor and amino acid catabolism-related genes in soybean seedling in response to

starvation stress, Journal of Botany, Volume 2013 (2013), Article ID 935479. (2013)【査読あり】

- (3) Kaneko A, Noguchi E, Ishibashi Y, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. " Sucrose starvation signal mediates induction of autophagy- and amino Acid catabolism-related genes in cowpea seedling ". American Journal of Plant Sciences, vol. 4, pp.647-653. (2013) 【査読あり】

〔学会発表〕(計 6件)

国際学会発表:

- (1) Yuasa T, Kaneko A, Nagasawa Y, Matsuo M, Ishibashi Y, Iwaya-Inoue M. " A Novel bZIP Transcription Factor Is Involved in Induction of Autophagy- and Amino Acid Catabolism-Related Genes in Soybean Seedling under Starvation Stress ", The 18th International Congress on Nitrogen Fixation (査読有り), vol. 18, P244(PTS-08-085), 宮崎市国際コンベンションセンター. (2013) October 14-18, 2013

国内学会発表:

- (1) 湯浅高志, "マメ科作物ササゲの乾燥に
応答した花芽形成抑制の分子メカニ
ズム", 第36回植物バイオテクノロジー
～園芸学の今～, 京都府農林水産技術セ
ンター, 2015年2月6日【招待講演】
- (2) 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, 湯浅高志, "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 第237回講演会, 千葉大
学西千葉キャンパス, 2014年3月29-30
日
- (3) 湯浅高志, 今村雅和, 金子彩実, 野口英
里, 坂本貴浩, 内八重愛, 橋口祐也, 倉
内英梨子, 有村恵, 石橋勇志, 井上眞理
"マメ科作物ササゲの乾燥に
応答した花芽形成抑制の分子メカニ
ズム"第50回好塩微生物研究会, 島根大学 2013年12
月7日
- (4) 湯浅高志, 長澤友里, 金子彩実, 石橋勇
志, 井上眞理, "ダイズのオートファジー
活性化に
応答した bZIP 型転写因子とア
ミノ酸代謝関連遺伝子の発現誘導" 第31
回日本植物細胞分子生物学会大会, 北海
道大学, 2013年9月10日～12日
- (5) 湯浅高志, 金子彩実, 長澤友里, 田島大
地, 石橋勇志, 井上眞理, "ダイズの栄
養飢餓に
応答したオートファジー活性化
とアミノ酸代謝系関連遺伝子の発現誘
導" 第8回トランスポーター研究会, 熊
本大学薬学部, 2013年6月15日～6月
16日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
宮崎大学農学部植物生産環境科学科作物学
研究室 web ページ URL:
[http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/mmatsuo/
croplab_index.html](http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/mmatsuo/croplab_index.html)
宮崎大学研究者情報:湯浅高志
[https://srhumdb.miyazaki-u.ac.jp/webope
n/search?method=view&id=100001044](https://srhumdb.miyazaki-u.ac.jp/webopen/search?method=view&id=100001044)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 高志 (Yuasa Takashi)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号: 40312269

(2) 研究分担者

井上 眞理 (Iwaya-Inoue Mari)
九州大学・農学研究科点教授
研究者番号: 60001394

(3) 連携研究者

()

研究者番号: