

令和元年6月24日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04869

研究課題名(和文) ゲノム情報を活用した代謝ピラミディングによる高油脂含有ダイズの作出

研究課題名(英文) Improvement of seed oil production in soybean by molecular genetic engineering

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズのゲノム情報からBCAAを分解するミトコンドリア局在型BCAAアミノ基転移酵素(GmBCATX)を同定した。ダイズ芽生え栄養飢餓処理および葉身の遮光処理に応答してGmATG8iおよびGmBCATXが顕著に発現増加した。ダイズ葉身のBCAA含量は遮光区では速やかに低下した。ダイズにおいても遮光処理による糖欠乏がBCAA分解とBCAAプール減少を介してオートファジーを活性化することが示唆された。ダイズと同様にイネにおける遮光に応答した葉身老化および乾燥に応答したササゲ葉身の老化においてもmtBCAT遺伝子誘導とBCAAの分解が老化とオートファジー誘導に関与す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

分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝とオートファジー(自食作用)の関係についてBCAA分解に働く老化応答性ミトコンドリア局在型BCAT(mtBCAT)遺伝子を同定したことは、今後ダイズの収量向上、アミノ酸栄養改善を目指した分子育種において極めて重要である。またBCAAプール減少がダイズを含む高等植物においてもオートファジー誘導のシグナルとなることを示したのも学術的に極めて重要な発見となった。Tilling技術を活用してダイズmtBCAT遺伝子変異体と油脂分解酵素SDP1の変異体ダイズを作出して、光合成機能の増強、BCAA栄養強化、油脂含量向上といったダイズの改良に繋がる重要な研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Soybean mtBCAT genes (GmBCATX, GmBCAT2) involved in branched chain amino acid (BCAA) degradation were identified by searching for BCAT orthologs in Soybean Genome database. GmATG8i and GmBCATX gene significantly up-regulated in transcript level in response to shading treatment of leaf and sucrose starvation of seedling, BCAA contents decreased in leaf under shading treatment. Those results suggest that shading-induced BCAT degraded intracellular BCAA and that the resultant reduction of BCAA exerted autophagy during senescence of soybean leaf. As soybean, induction of mtBCATs and reduction of BCAA pool appeared to be involved in autophagy induction in rice leaf under shading and cowpea at reproductive stage under drought stress.

研究分野：作物学

キーワード：オートファジー アミノ酸 ダイズ 老化 窒素転流 栄養飢餓 タンパク質分解 遺伝子発現

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は光合成を行う葉緑体の受光色素や炭酸固定酵素に大量の窒素栄養を必要としており、古い葉身のタンパク質を分解してリサイクルすることにより、受光しやすい上位の若い葉身へのアミノ酸を転流することで効率の良く光合成することが知られている。そして葉緑体のバルク分解の調節メカニズムにおいてオートファジー(自食作用)が重要な役割を果たしていることが近年の植物 ATG ホモログの解析と植物細胞のオートファジー検出系によって明らかとなってきた。我々は先行研究においてダイズ・トウゴマの WRI1 ホモログ遺伝子とその性質を解析し、ダイズの脂肪酸合成に関わる脂肪酸合成遺伝子プロモーターの GmWRI1 が特異的に結合することが示された(Tajima et al. 2013)。興味深いことに分岐鎖アミノ酸(BCAA)で活性化される栄養センサーの Target of Rapamycin (TOR) が Lipin1 をリン酸化して油脂合成を促進することが示された (Peterson et al. 2011)。我々は先行研究においてダイズの BCAA 分解に働く GmBCAT 分子種と栄養シグナル応答について報告している(Yuasa et al. 2013)。

### 2. 研究の目的

本研究は代表的油料作物であり全ゲノム情報を利用可能なダイズ(*Glycine max* (L.) Merr)に着目し、ダイズ子実における脂肪酸合成特異的マスター制御転写因子 WRI1, 種子特異的脂肪酸分解酵素(SDP1)および栄養・エネルギー代謝シグナル, 分岐鎖アミノ酸 (BCAA)→TOR→Lipin1 経路を介した油脂合成調節のメカニズムの解明することで、油脂含有増強ダイズ品種を分子育種することを目的としている。本研究の成果は、高品位の食用ダイズ油の生産力増強に適した高油脂含量ダイズ品種を育成すると共に、環境保全型の低炭酸ガス排出社会の実現と収益性に優れたダイズ新品種の育成に向けた実用性高い研究を目指す。

### 3. 研究の方法

【栽培およびサンプリング】ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) ‘フクユタカ’を用い、宮崎大学研究圃場において 1/5000 ポットに宮崎焼土および苦土石灰、豆化成を各 10g 施肥し、1-2 ヶ月間栽培した。アルミフォイルで葉身を包んだ遮光区で老化を誘導した。2 日ごとに、サンプリングした葉身は液体窒素で凍結し-70°Cで凍結保存した。

【遺伝子解析】シロイヌナズナのオートファジー、老化誘導性アミノ酸代謝酵素遺伝子と相同性を持つダイズ遺伝子候補を Phytozome v12.0 (<http://www.phytozome.net>)の植物ゲノムデータベースを用いて検索、同定した。ダイズ BCAT 候補を相同性解析ソフト 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、分子種特異的プライマーを設計した。PSORTWWW (<https://psort.hgc.jp>)において予想アミノ酸配列から細胞内局在予測をおこなった。常法により組織から全 RNA を調製した。ReverTraACE 逆転写酵素 (TOYOBO) および GoTaq (POmega)を用いて常法により半定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。

【アミノ酸解析】遮光区、コントロール区のダイズ葉身の BCAA 含量を BCAA アッセイキット (CBL)により測定した。組織を 5%TCA により破砕、10kxg 遠心分離により酸可溶性画分を調製し、全遊離アミノ酸および遊離プロリンの含量をニンヒドリン法により測定した。

【免疫化学的解析】ダイズ BCAT から PSORT により予想された葉緑体局在型 BCAT (ch1BCAT) とミトコンドリア局在型 BCAT (mtBCAT) の予想アミノ酸配列から-COOH 末端にそれぞれ特異的なアミノ酸配列を抽出して抗原エピトープとして抗ペプチド抗体を作成した (CosmoBio)。

【プロテアーゼ、アミラーゼ活性解析】 ザイモグラム法によりゼラチン含有 SDS-PAGE, CBB 染色により、プロテアーゼ活性を解析した。デンブリン含有 SDS-アクリルアミドゲルを作成して、SDS-PAGE とヨウドデンブリン染色により、サンプルのアミラーゼ活性を解析した。

【老化、光合成パラメーターの解析】葉身クロロフィル含量を AtLeaf により計測して老化をモニターした。mini-PAM (Walz)によりクロロフィル蛍光計測し光合成活性を解析した。

【Tilling 法による変異体スクリーニング】ダイズ変異型 BCAT 遺伝子候補を探索するための genomic PCR 用ゲノム特異的プライマーを設計した。佐賀大学農学部穴井豊昭教授からダイズ Tilling ライブラリーを用いた。

【ショ糖飢餓、除草剤処理によるオートファジー誘導実験】オートファジー誘導モデル実験系として、ダイズ実生を MS 培地 2%ショ糖で 1 日培養後、0%ショ糖+プロテアーゼ阻害剤添加による飢餓処理を行なって 24, 48, 72 時間でサンプリングした。BCAA 合成を律速するアセト乳酸合成酵素 (ALS) 特異的阻害剤ビスピルバックを処理してサンプリングした。

### 4. 研究成果

【ダイズのオートファジー、アミノ酸代謝、脂質代謝関連遺伝子の探索】出芽酵母と哺乳動物細胞で同定された大部分のオートファジー関連遺伝子 (ATG 遺伝子) について高等植物ゲノムでも相同遺伝子が良く保存されており、ダイズ (*Glycine max* Merr.) の GmATG7 (686aa) などは出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の ScATG7 (630aa) とほぼ同じ分子サイズを示し、ユビキチン化機構に類似したダイズの ATG8-PE 結合系は GmATG8, ATG4, ATG7, ATG7 はよく保存されていた。一方で mTOR のリン酸化標的となって ATG1 を介してオートファジーを誘導するダイズを含む ATG13 ホモログは非常に低いアミノ酸相同性を示した。興味深いことにオートファゴソーム形成に直接関わる ATG8 ホモログは出芽酵母では 1 個、哺乳動物では 3 個に対して、シロイヌナズ

ナでは9個、イネやトウモロコシでは5個、ダイズでは12個と高等植物は多数のATG8パラログ遺伝子を保有する。またATG8の-COOH末のフォスファチジルエタノールアミン(PE)脂質修飾系に着目するとシロイヌナズナやダイズのATG8パラログの一部には-COOH末端がグリシンとなるATG8分子種があり、システインプロテアーゼ活性を持つATG4によるプロセッシングを必要としない3) (図2)。またダイズGmATG8iは-NH2末領域にN-ミリスチル化シグナル配列を有しており、PE修飾無しでもミリスチル基修飾を介して小胞表面に結合している可能性がある。酵母や動物でmTORにより調節されるTAG合成を律速するホスファチジック酸脱リン酸化酵素(Lipin1)のダイズホモログとして11個のホスファチジック酸脱リン酸化酵素遺伝子候補が同定された。ダイズにはLipin1の入るクレードに2この遺伝子があり、残りの9個はLipin1の属さない別のクレードを構成していた。植物Lipin1に共通するアミノ酸配列エピトープ「NPFYAGFGNRDDELSEYRKC」を抗原とする抗-植物Lipin1抗体を作成したので、それを使用してダイズLipin1の解析を進行中である。シロイヌナズナ子実の貯蔵脂肪の分解に働くTAGリパーゼ遺伝子のダイズホモログを4個同定した。ダイズの子実肥大期に特異的に発現するGmSDP1分子種の発現プロファイルの解析と特異抗体を作成して生化学的解析を進めている。

【オートファジー誘導とBCAT遺伝子発現】

シロイヌナズナでは遮光処理に応答して発現誘導される複数のamino acid-AT遺伝子のうち分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素のBCAT2遺伝子も顕著な発現増加も生じていることが報告されている(20)。そこでダイズの老化・オートファジー誘導メカニズムにおける分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝について調査した。植物のBCAA代謝になう鍵酵素、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(BCAT)のうち葉緑体局在型BCATはBCAA合成を行い、一方でミトコンドリア局在型BCATはBCAA分解を触媒している。ダイズ葉身の遮光処理とダイズ芽生えへのスクロース飢餓処理に応答して2種類のBCAT遺伝子(GmBCAT1,

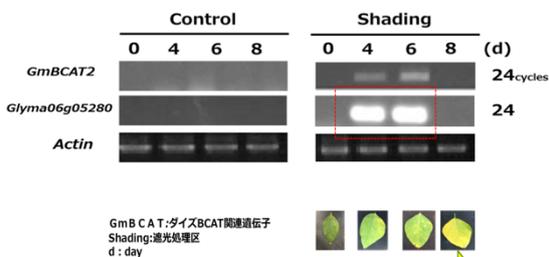


Fig. 1: 遮光によるダイズ葉身のBCATの発現誘導

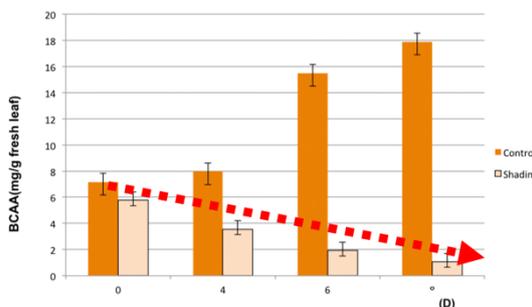


Fig. 2: 遮光によるダイズ葉身のBCAA含量の低下

GmBCATX, Glyma06g06280)の発現が顕著した増加が観察された(Fig. 1)。GmBCAT1とGmBCATXはどちらもミトコンドリア局在シグナルをN末に持つことからBCAA分解に働くことが予想された。

シロイヌナズナでエネルギー欠乏ストレスに応答した老化とアミノ酸代謝酵素遺伝子誘導に関わる転写因子としてbZIP53が報告されている。我々はダイズZIP53ホモログがGmBCAT2の誘導に関与することを報告したが、GmBCATXもGmbZIP53により調節されている可能性がある。次にダイズ葉身のBCAA含量はコントロール区では増加する一方、遮光区では速やかに低下した(Ishibashi, Yuasa, unpublished data, Fig. 2)。

この結果から葉身の光合成低下に伴いエネルギー供給を維持するためにミトコンドリア局在のBCATがBCAAを分解してミトコンドリアの呼吸基質を供給していることが示唆された。またBCAA分解に伴う細胞内BCAAプールの減少がダイズmTOR活性のキナーゼ低下させる。次に不活性化型mTORはその基質のATG13のリン酸化レベルを低下させた結果、ATG1・ATG13オートファジー誘導複合体の活性化をもたらすことでオートファジー誘導を引き起こすと推測される。このようにミトコンドリア局在型BCAT遺伝子が植物における糖飢餓シグナルに応答したオートファジー誘導を結びつける有力な候補シグナル分子として働く可能性が示された(石橋, 修士論文, 2018)。

ダイズ芽生えにシヨ糖飢餓処理を行なった際のオートファジー誘導モデル実験ではプロリンをグルタミン酸に変換するProDH遺伝子の誘導が観察された。シヨ糖飢餓のみでは一過的にプロリン含量は増加したが、シヨ糖飢餓+プロテアーゼ阻害剤処理ではプロリン含量の低下が生じた。このことからオートファジー誘導条件においてタンパク質分解によるアミノ酸プールの維持と同時にプロリンをソースとしグルタミン酸を供給して窒素代謝を活性化していることが示唆された(川口, 卒業論文, 2019)。

BCAA分解を担うミトコンドリア局在型BCAT遺伝子とTAG蓄積を負に調節するTAGリパーゼ候補遺伝子GmSDP1ホモログを同定し、ダイズTilling実験系を用いて1塩基置換変異体の探索に向けて準備を進めている。

【イネのオートファジー調節とBCAA】

イネの遮光、栄養飢餓がオートファジーを引き起こすかどうか解析した。イネでは4遺伝子のOsBCAT遺伝子候補が同定された。遮光処理に応答した老化誘導に伴ってOsATG8, ミトコンドリア局在が予想されるOsBCATホモログの発現誘導が示された。Tos17によるBCAT遺伝子破壊株の種子を農業生物資源研究所から恵与を受け解析を進行している。植物特異的除草剤であるピ

スピルバック処理が BCAA 合成低下とともにオートファジー誘導を引き起こすかどうか解析した。ビスピルバック処理は遮光処理と同様に OsATG8 遺伝子の発現が増加し、オートファジーが誘導した。さらにザイモグラム法により、両処理によりプロテアーゼとアミラーゼ活性が顕著に増加したことから、BCAA 減少はオートファジー誘導に加えて液胞加水分解酵素を発現誘導する可能性が示唆された(Yee, 修士論文, 2018)。

【ササゲの乾燥応答におけるオートファジーと BCAA】 栄養成長期のササゲは極度の乾燥に耐えられる、一方、子実肥大期には乾燥に応答して速やかに葉身を老化させ葉内の栄養を転流させて子実の肥大成熟を促進する。子実肥大期におけるササゲの葉身の老化に伴う葉緑体タンパク質の分解にはオートファジーが関与している。乾燥応答性老化に関与するアミノ酸代謝に着目した。また、サイトカイニン (CKs) がタバコの乾燥に応答した葉身老化を遅延するとの報告があり、ササゲのオートファジーにおける CKs の役割を調べた。さらに、乾燥に応答したプロリン含量の変化についてニンヒドリン法により解析を行った。摘葉した乾燥区と比較して、葉を残した乾燥区では SPAD 値が大幅に減少して葉身が速やかに老化した。オートファゴソーム形成に関与する VuATG8i と BCAA 分解型ミトコンドリア局在 BCAT, VuBCAT2 候補遺伝子の発現量が葉を残した乾燥区で早期に増加した。しかし、栄養成長期や摘葉区のササゲでは摘葉した乾燥処理においても VuATG8i や VuBCAT2 の発現増加は見られず老化進行も軽度だった。合成 CKs を含んだ栄養飢餓培地で培養した胚軸は、VuProDH との発現が上昇と VuATG8i の発現が抑制されたことから、CKs が窒素代謝産物の転流に関与していると考えた。以上の実験から、乾燥による光合成能の低下に伴う糖供給の低下と肥大期に増大する子実のシンク能が組み合わさり葉身の糖栄養レベルが低下することで、BCAT 活性増加によって引き起こされた細胞内 BCAA プール減少によるオートファジー誘導を引き起こすと考えられる。また、CKs により栄養レベルの減少で誘導されたオートファジーが抑制された。オートファジーと CKs に着目することで、ササゲの新たな乾燥耐性品種作出に繋がる知見が得られた。

#### 【まとめと展望】

今回、植物のオートファジーを調節する栄養シグナルについて、遮光処理やシンク能の作用を分解系 BCAT 誘導という単純なモデルで BCAA プール-TOR 経路を議論した(Fig. 3)。植物では糖シグナルには動物細胞の AMPK のオルソログに相当する SnRK1 複合体など複数の経路が機能していることが知られている。しかしそうした既知の糖シグナル経路と植物 TOR-ATG シグナルとのクロストークについては十分に解明されてはいない。また老化調節やプログラム細胞死について多数の植物ホルモンの複雑なクロストークが解明されつつあり、植物ホルモンシグナルと BCAA 代謝の関係について今後の研究の展開が期待される。

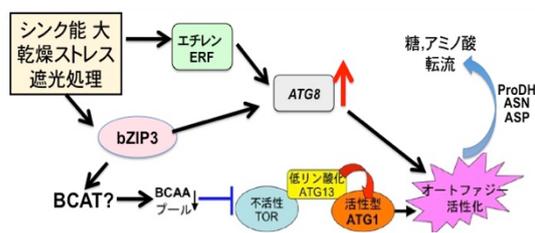


Fig.3 植物のオートファジー誘導と BCAA 代謝の役割。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

- (1) Ishibashi Y, Yuasa T, Iwaya-Inoue M (2018) Mechanisms of Maturation and Germination in Crop Seeds Exposed to Environmental Stresses with a Focus on Nutrients, Water Status, and Reactive Oxygen Species. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1081, p233-257.(査読有り)
- (2) Taniguchi T, Murayama N, Hasegawa M, Nakagawa ACS, Tanaka S, Zheng SH, Hamaoka N, Iwaya-Inoue M, Ishibashi Y. (2018) Vegetative growth after flowering through gibberellin biosynthesis regulates pod setting rate in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Signaling Behavior*. Vol.13(8):e1473668. (査読有り)
- (3) Ishibashi Y, Aoki N, Kasa S, Sakamoto M, Kai K, Tomokiyo R, Watabe G, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. (2017) The Interrelationship between Abscisic Acid and Reactive Oxygen Species Plays a Key Role in Barley Seed Dormancy and Germination. *Frontier in Plant Science*, vol. 8, p275-280. (査読有り)
- (4) Tanaka S, Ario N, Nakagawa ACS, Tomita Y, Murayama N, Taniguchi T, Hamaoka N, Iwaya-Inoue M, Ishibashi Y.(2017) Effects of light quality on pod elongation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Signaling Behavior*, vol.12(6):e1327495. (査読有り)
- (5) Kai K, Kasa S, Sakamoto M, Aoki N, Watabe G, Yuasa T, Iwaya-Inoue M, Ishibashi Y. (2016) Role of reactive oxygen species produced by NADPH oxidase in gibberellin biosynthesis during barley seed germination. *Plant Signaling Behavior*. vol. 11(5): e1180492. (査読有り)

- (6) EGASHIRA C, YAMAUCHI T, MIYAMOTO Y, YUASA T, ISHIBASHI Y, IWAYA-INOUE M (2016) *Cryobiology and Cryotechnology*, vol. 62, p69-75. (査読有り)
- (7) Islam MM, Ishibashi Y, Nakagawa AC, Tomita Y, Iwaya-Inoue M, Arima S, Zheng SH. (2016) Nitrogen redistribution and its relationship with the expression of GmATG8c during seed filling in soybean. *Journal of Plant Physiology*. vol.192, p71-74. (査読有り)
- (8) 湯浅 高志 (2016)ゲノム情報を利用した作物の老化・栄養転流の研究最前線, みやざき 農業と生活,vol. 50, p44-45. (査読無し)

〔学会発表〕(計 11件)

- (1) 藤巻 航, Naron Waramit, Sontichai Chanprame, Ratchanee Hongprayoon, 湯浅 高志, ササゲの乾燥ストレスに応答した栄養転流および老化の調節メカニズムの解析, 第 247 回日本作物学会講演会(筑波大学), 2019 年
- (2) Tung Tuan Do, Ryusuke Kawaguchi, Wataru Fujimaki, Takaaki Ishibashi, Shunsuke B. Inoue, Takashi Yuasa, Regulation Mechanism of Amino Acid Metabolism and Autophagy in response to senescence and nutrient starvation in Soybean,第 247 回日本作物学会講演会(筑波大学), 2019 年
- (3) 石橋 孝明, Yee Yee Tun, 緒方 華子, 川口 颯介, 瀧石 英雄, 湯浅 高志, ダイズ葉身の老化・オートファジー(自食作用)の誘導における分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(GmBCAT)の役割, 第 245 日本作物学会講演会(宇都宮大学), 2018 年
- (4) 藤巻 航, 川口 颯介, Do Tuan Tung, Yee Yee Tun, 瀧石 英雄, 石橋孝明, Naron Waramit, Sontichai Chanprame, Ratchanee Hongprayoon,湯浅 高志, マメ科作物の環境ストレス・栄養シグナルに応答した オートファジー誘導とアミノ酸代謝シグナル, 第 55 回好塩微生物研究会(東洋大、川越キャンパス), 2018 年
- (5) 川口 颯介,瀧石 英雄,石橋孝明,湯浅 高志, ダイズの老化・栄養飢餓に応答したアミノ酸代謝とオートファジー調節メカニズム, 三学会合同宮崎大会(宮崎大会), 2018 年
- (6) Yee Yee Tun, Takashi Yuasa, Involvement of abiotic stress-related bZIP transcription factors on the regulation mechanism of branched chain amino transferase in *Oryza sativa*, 日本農芸化学会 2018 年度名古屋大会, 2018 年
- (7) 石橋孝明,Yee Yee Tun,緒方華子,川口颯介,瀧石英雄,湯浅高志, ダイズ葉身の老化・オートファジー(自食作用)の誘導における分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(GmBCAT)の役割, 日本作物学会第 245 回講演会 2018 年
- (8) 柄原美咲,湯浅高志,三浦寧音,駒井玲花,辰巳由華,濱岡範光,石橋勇志,井上眞理,第 61 回低温生物工学会セミナーおよび年会 2017 年
- (9) 藤巻航,松田元太,谷口智哉,中島阜耀,松尾拓海, 緒方華子,近藤夏帆,高木啓輔,中村昂平,湯浅高志,子実肥大期のササゲ葉身における乾燥ストレスに応答した加水分解酵素の活性化 および老化促進メカニズムの解析,日本作物学会講演会(東京大学農学部) 2017 年
- (10) 藤巻航,松田元太,石橋貴明,YEE YEE TUN,谷口智哉,中島阜耀,松尾拓海,緒方華子,近藤夏帆,高木啓輔,中村昂平,湯浅高志,ササゲの乾燥ストレスに応答したオートファジー活性化とアミノ酸代謝関連遺伝子の発現誘導,第 9 回トランスポーター研究会九州部会,2016 年
- (11) 石橋孝明,緒方華子,湯浅高志,ダイズ葉身の暗処理に応答したアミノ酸代謝酵素遺伝子の発現誘導と老化調節メカニズムの解析,第 9 回トランスポーター研究会九州部会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：井上 眞理

ローマ字氏名：Iwaya-Inoue Mari

所属研究機関名：九州大学大学院

部局名：農学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：60091394

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：無し

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。