

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07404

研究課題名(和文) イネのモミラクトン排出輸送体の探索と排出活性調節機構に関する研究

研究課題名(英文) cDNA cloning and characterization of momilactone transporter

研究代表者

豊増 知伸 (TOYOMASU, Tomonobu)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：60272085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イネにおいて病害抵抗性に関与するフィトアレキシンとしてだけでなく、周辺雑草に対するアレロパシー物質として振る舞うモミラクトンの排出輸送体遺伝子の同定を試みた。モミラクトン高生産条件で目的遺伝子発現量が高まると仮定して候補遺伝子を選別し、現在、機能解析、局在解析など特徴付けを試みているところで、目的遺伝子を同定するまでには至らなかった。また、筆者が独自に考えた14-3-3タンパク質による活性調節機構という全く新しいメカニズムについても実証を挑戦したが、ポジティブな結果は得られなかった。

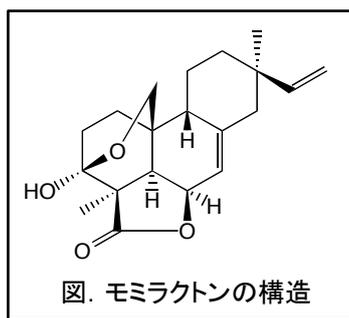
研究成果の概要(英文)：Momilactones serve as phytoalexins, which are responsible for disease resistance, and allelopathic substances against lowland weed. This study attempted identification of the momilactone transporter gene; screening through gene expression pattern from rice genome genes, functional analyses and other characterization of the candidate genes. However, characterization of the candidate genes has been in progress, and then identification of the targeted gene has not been accomplished. Moreover, a challenge to verify hypothesis on regulation of transporter activity through 14-3-3 interaction has been unsuccessful.

研究分野：生物有機化学

キーワード：輸送体 モミラクトン イネ アレロパシー物質 フィトアレキシン

1. 研究開始当初の背景

モミラクトン (下図参照) は、イネ *Oryza sativa* が生産するジテルペノイドの一種で、病害抵抗に関与するフィトアレキシンとしてだけでなく、周辺雑草との生存競争のためのアレロパシー物質としても働く。そもそもモミラクトンは、イネのモミ殻より植物生長阻害物質として単離・同定されたが、その後、フィトアレキシンやアレロパシー物質として認識されるようになった。モミラクトンの生合成研究は、それがジテルペノイド植物ホルモンのジベレリンの生合成と類似することから、ジベレリン生合成遺伝子研究を基に知見が蓄積してきた。モミラクトンを含むジテルペノイドは、共通のプレニル基質ゲラニルゲラニル2リン酸が環化して生成するジテルペンを基本炭素骨格として、それが化学修飾されて生合成されるが、それら生合成遺伝子はいくつか機能同定された。筆者らのグループにより最初に炭素骨格形成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子 **OsCPS4** と **OsKSL4** が見出され、それをきっかけとして4番染色体において化学修飾関連のシトクロム **P450** 酸化酵素遺伝子とともに遺伝子クラスターを成すことも示されてきている。さらに筆者らのグループにより野生イネを用いた比較ゲノム解析によりジベレリン生合成遺伝子との進化的関係も報告された。このように、生合成遺伝子に関する知見は蓄積している一方で、いもち病菌を含む病原菌や水田雑草などの外敵と戦うために必要な二次代謝物であるモミラクトンの排出など動態に関する分子レベルでの知見は皆無であった。つまり、イネの根から土壤中に浸出されることは示されてはいたものの、その排出輸送に関わる輸送体遺伝子も不明のままで、さらにその輸送体による排出活性制御機構も知見はなかった。



2. 研究の目的

本研究では、モミラクトン排出に関与する輸送体遺伝子を cDNA クローニングと機能解析を含む特徴付けによりイネゲノムから同定することを主な目的とした。目的遺伝子が同定されれば、その機能喪失突然変異体を用いて、アレロパシー作用発現のための輸送の意義を証明できるだけでなく、葉におけるいもち病菌耐病性におけるモミラクトンの細胞外排出の意義も示すことができる。また、候補遺伝子は、輸送体の中の ATP Binding

Cassette (ABC) 輸送体ファミリーをコードしたが、そのアミノ酸配列中に 14-3-3 結合モチーフがあることを筆者が独自に見出した。14-3-3 タンパク質は、真核生物に普遍的に存在し、他のクライアントタンパク質にリン酸化依存で結合し、その機能を調節することが知られている。そこで、それを介した新規な ABC 輸送体活性調節機構の可能性を挑戦的に追究した。

3. 研究の方法

(1) 目的遺伝子の探索

本研究着手時に唯一ジテルペノイド輸送体として機能同定されていたタバコのスクラレロール輸送体のアミノ酸配列相同性によりイネゲノムから候補遺伝子を選択した。さらに、モミラクトン排出輸送体は、モミラクトン高生産条件において遺伝子発現量が高まると推定して、それを指標にして候補遺伝子を絞り込んだ。また、別角度のセカンドアプローチとして、モミラクトン生合成遺伝子、ならびにそれらの発現を制御する転写因子遺伝子と発現パターンが似た遺伝子をイネゲノムから探索し、候補遺伝子とした。それらは、RT-PCR により cDNA クローニングした。

(2) 特徴付け

① 異種細胞を用いた機能解析

高等双子葉植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) や分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は、モミラクトンにより生育阻害されるので、それらに候補遺伝子 cDNA を組み込み、モミラクトン耐性が得られるかどうかで排出活性を検定した。

② 候補遺伝子、タンパク質の発現部位

組織特異的遺伝子発現については、候補遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子 β -グルクロニダーゼ (GUS) を接続したコンストラクトを組み込んだ組換えイネを調製し、それらを用いて解析を行った。また、地上部と根部での遺伝子発現解析を定量 RT-PCR により行った。細胞内局在解析については、緑色蛍光タンパク質 (GFP) と融合させてシロイヌナズナプロトプラストにおいて発現させ、蛍光顕微鏡観察によりその蛍光を指標として細胞内局在を調べた。

③ 候補遺伝子のノックアウト実験

イネゲノムにおける候補遺伝子を CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集技術によりノックアウト体を複数種類調製した。ガイド RNA 配列は 2 箇所選抜し、1 箇所ずつ、あるいは 2 箇所ともで遺伝子変異導入した。変異の確認は、当該領域をゲノム PCR で増幅した断片について、クローニングせず、ダイレクトシーケンシングし、2 対のゲノム配列を同時に調べることで行った。

(3) 活性調節機構

ABC 輸送体のアミノ酸配列の中で、14-3-3 結合モチーフを含むペプチドを用いて *in vitro* プルダウンアッセイ、酵母 2-ハイブリッド (Y2H) 法により 14-3-3 結合能を検討した。プルダウンアッセイに用いた組換えタンパク質は、大腸菌用発現ベクターに候補遺伝子 cDNA を組み込み、菌体内で発現、精製したものを用いた。Y2H では、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼを用いてアッセイした。また、ABC 輸送体フルサイズ型には 14-3-3 結合モチーフは 2 箇所みられることから、その 2 箇所と 14-3-3 二量体との相互作用の可能性を追究するため酵母 3-ハイブリッド (Y3H) 法で検討することを計画した。Y2H と Y3H は、クロンテック社のキットを利用した。

4. 研究成果

(1) 目的遺伝子の探索

まず、ジテルペノイド輸送体として唯一タバコより cDNA が得られている遺伝子 (ABC 輸送体遺伝子の一種) の推定アミノ酸配列を query としてイネゲノムを BLAST 検索し、その上位 8 遺伝子について UV 処理 (モミラク トン生合成遺伝子発現誘導条件) の影響を調べた。その結果、ABC 輸送体をコードする 2 種の候補遺伝子が選抜された。しかし、RT-PCR により取得した候補遺伝子 cDNA は、後述する機能解析により目的輸送体をコードする可能性が低いと考えられたので、別の方法で候補遺伝子を選抜することにした。モミラク トン生合成遺伝子やそれらの制御に関わる転写因子 DPF の遺伝子発現との共発現を指標にイネゲノムをスクリーニングしたところ、上位 50 位に含まれる輸送体関連は ABC 輸送体をコードする 1 種だけだったので、それを第 3 の候補遺伝子として特徴付けした。

(2) 特徴付け

最初に選抜した ABC 輸送体に属する 2 種の候補遺伝子については、それらの cDNA を組み込んだ組換えシロイヌナズナを調製した。しかしながら、その組換え体をモミラク トン含培地で生育させたところ、野生型と同様に生育阻害され、モミラク トン耐性が付与されなかったことから、目的輸送体遺伝子の可能性は低いと考えた。これらの遺伝子発現は、地上部と根部でともに十分量発現していた。プロモーター GUS 解析では、組換え体での GUS 染色がみられなかった。プロモーター領域は 2 種用いたが、適切な DNA 領域ではなかったと考えられた。また、GFP 融合タンパク質を一過的に発現させたシロイヌナズナプロトプラスト細胞を用いた細胞内局在解析も不明瞭な結果しか得られなかった。

そこで第 3 の候補遺伝子について特徴付けを行った。この遺伝子については、クローニグベクター、複数の発現ベクターに cDNA

を組み込んだプラスミドを大腸菌に導入すると毒性がみられ、cDNA クローニングが妨げられた。そこでそれを回避する方法を検討し、無事 cDNA クローニングに成功した。詳細に配列を解析し、日本とアメリカのイネゲノムデータベースにおける当該遺伝子のアノテーションが誤っていることを見出した。ABC 輸送体は、複数回膜貫通タンパク質で、細胞内ドメインと膜貫通ドメインで構成されるが、それが単一のハーフサイズ、それが 2 連タンデム連結したフルサイズが知られる。この候補輸送体は、ゲノムデータベースではハーフサイズとしてアノテーションされていたが、本研究によりフルサイズであることを明らかにした。さらに、ER 膜関連の細胞内局在をすると予想されたことから、詳細に cDNA の非コード領域を解析し、N 末端についても明らかにした。

その cDNA を組み込んだ組換えシロイヌナズナの T3 世代が得られたので、それを組み込んだ分裂酵母とともにモミラク トン耐性試験を行う予定。なお、モミラク トンは、出芽酵母では生育阻害は示さなかったが、分裂酵母の生育は阻害することを連携研究者の岡田憲典博士が見出したので、本研究では分裂酵母を用いた。予備実験を行ったところでは、耐性付与のポジティブな結果は得られていない。この候補遺伝子のプロモーター GUS の組換え体も得られたので、それを用いた組織特異的発現も行う予定。

この第 3 の候補遺伝子がコードするタンパク質のシロイヌナズナプロトプラスト細胞を用いた細胞内局在解析では、本来は、細胞膜、あるいは液胞膜のどちらかと想定していたが、予想外に色素体での局在がみられた。この結果は、イネ特有の ABC 輸送体を異種細胞のシロイヌナズナで発現させたことによるアーティファクトである可能性も考えられた。そこで、この局在について詳細に慎重に追究するために、イネ自身のプロトプラスト細胞を用いた解析、あるいはプロトプラストではなく、タマネギの表皮細胞を用いた解析を行う必要がある。仮に、イネ細胞中でも色素体に局在することが事実であることが示されれば、この輸送体はモミラク トンを細胞外に放出するものではなく、別の機能を有することになる。元々は、モミラク トン誘導生産に協調的に発現する遺伝子として選抜してきたことを考えると、色素体内でジテルペン環化酵素により形成された基本炭素骨格の環状炭化水素の色素体からの細胞質への輸送に関与する輸送体である可能性も考えられる。今後の検証が待たれる。

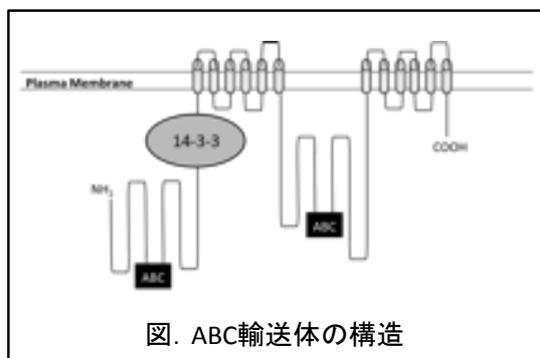
ゲノム編集ノックアウト体は、1 箇所ずつ、あるいは 2 箇所ともでのガイド RNA 領域、3 種類全てにおいて目的遺伝子変異体が複数系統得られた。現在は、その種子から繁殖させ、実験に用いることができる種子数の確保を目指している。今後は、このノックアウト体を用いたモミラク トン排出量測定実験、病

害抵抗試験、雑草共栽培実験などを行う予定。モミラクトン排出量については、イネ試料を水耕栽培し、その水耕液を LC-MS/MS 分析に供して定量する計画である。

このように、現在までのところ目的遺伝子は同定できていないが、ABC 輸送体の色素体局在などこれまでに例のない予想外の結果も得られ、今後の特徴付けの結果が待たれる。

(3) 活性調節機構

ABC 輸送体は、複数回膜貫通タンパク質で、細胞内ドメインと膜貫通ドメインで構成されるので、14-3-3 との相互作用は、細胞内ドメインでの部分配列ペプチドを用いて検討した。14-3-3 結合モチーフは、モード 1~モード 3 まで知られており、本輸送体ではモード 1 モチーフがみられたが、それは ABC モチーフを含む細胞内ドメインにみられた (下図参照)。



そこで、そのドメインについていくつかの長さのペプチド (全域、あるいは両モチーフを含む部分、14-3-3 結合モチーフのみを含む部分など) を利用して検討した。3 種の候補遺伝子の中で 1 種に絞って実験を行った。そのアミノ酸配列の中の N 末端側の 14-3-3 結合モチーフを含むいくつかの長さのペプチドをコードする cDNA を PCR により増幅し、それを大腸菌用発現ベクターに組み込み、大腸菌体内発現組換えタンパク質を調製した。テスト断片ペプチドにはグルタチオン S-トランスフェラーゼをタグとして付加し、14-3-3 に付加した His タグをニッケルカラムでプルダウンして、共沈を SDS-PAGE により調べた。このような *in vitro* プルダウンアッセイによっては、組換え 14-3-3 と共沈は検出することはできなかった。また、それらと同じペプチドコード cDNA と 14-3-3 の cDNA を用いて、GAL4 の Bait と Prey を付加して、レポーター遺伝子としてヒスチジン合成遺伝子、あるいは β -ガラクトシダーゼ遺伝子を用いて、それぞれのアッセイを行った。しかしながら、この Y2H 法によっても、14-3-3 相互作用を示す結果は得られなかった。

また、この候補 ABC 輸送体は、フルサイズであり、2 箇所細胞内ドメインについて 14-3-3 結合モチーフがみられたが、前述の N 末端側の 14-3-3 結合モチーフだけでなく、C 末

端側のモチーフも含めて、Y3H 法を計画した。14-3-3 タンパク質は、二量体化し、その標的クライアントも二量体化するタンパク質であると考えられている。ABC 輸送体は、膜に複数貫通しながら環状構造をとって物質を輸送する穴を形成する。その際に、2 箇所の細胞内ドメインも空間的に接近し、14-3-3 結合モチーフが二量体構造をとることも推定された。そこで、その N 末端モチーフと C 末端モチーフを含むペプチドが寄り合い、そこに二量体 14-3-3 が結合する可能性も考えられたので、その 2 箇所の細胞内ドメインを Bait と Prei とし、14-3-3 を第 3 因子として、Y3H 法を行うことを計画したが、ポジティブコントロール実験においても実験系が機能しなかったため、中座した。今後は、組換えペプチドを用いた三者混合共沈実験を行う必要は残されている。

ABC 輸送体では、輸送活性制御にタンパク質リン酸化が関与することは示唆されているものの、そのリン酸化部位をターゲットとする 14-3-3 の関与は示されていない。今後、筆者が提唱した仮説モデルが実証されることを期待する。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 湊 志帆、松浦 嵩、黒田昌治、菅野裕理、瀬尾光範、長谷川守文、三橋涉、岡田憲典、豊増知伸 (2017) : イネにおけるモミラクトン輸送体遺伝子の探索 -第 2 報-、植物化学調節学会第 52 回大会 (鹿児島)
- ② 松浦嵩、千葉光浩、菅野裕理、瀬尾光範、岡田憲典、黒田昌治、長谷川守文、三橋涉、豊増知伸 (2015) イネににおけるモミラクトン輸送体遺伝子の探索、植物化学調節学会第 50 回大会 (東京)

[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 : 論文採択後に成果はホームページで公表する予定。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊増 知伸 (TOYOMASU, Tomonobu)
山形大学・農学部・教授

研究者番号：60272085

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

岡田 憲典 (OKADA, Kazunori)
東京大学・生物生産工学研究センター・准教授
研究者番号：20312241

瀬尾 光範 (SEO, Mitsunori)
独立法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー
研究者番号：00512435

黒田 昌治 (KURODA, Masaharu)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター作物開発研究領域・主任研究員
研究者番号：30355581

(4)研究協力者

なし