

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07553

研究課題名(和文) イネのPAL遺伝子ファミリーの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of PAL gene family in rice

研究代表者

寺石 政義 (Teraishi, Masayoshi)

京都大学・農学研究科・講師

研究者番号：80378819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネ品種日本晴には9個のPAL様配列が存在するが、それぞれの機能を明らかにするため、大腸菌でタンパク質を発現させ、チロシンまたはフェニルアラニンを基質として反応を行い、液体クロマトグラフ質量分析計で生成物を解析した。染色体11および12に座乗するPAL様配列を除いて、PAL(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)活性およびTAL(チロシンアンモニアリアーゼ)活性が観察された。染色体12に座乗するPAL様配列はTAM(チロシンアミノムターゼ)活性のみが観察され、フェニルアラニンを合成する酵素は1個のみであることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物におけるベータアミノ酸の生合成経路は、関与している遺伝子など不明な点が多いが、本研究によりベータチロシンの合成に関与しているのは染色体12に座乗するPAL様遺伝子のみであることが判明した。ベータアミノ酸は周囲の植物の成長を抑制する効果などが報告されており、ベータアミノ酸の活用に向けて生合成に関わる遺伝子が明らかになったことは意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The Japonica rice cultivar, Nipponbare, possesses nine of PAL(phenylalanine ammonia-lyase)-like sequences. To understand these characters of the PAL-like genes, the encoded proteins were produced in E.coli. Products, which were obtained from reactions with phenylalanine or tyrosine as substrate, were analysed using LC/MS apparatus. Almost PAL-like genes except those on Chr.11 and Chr.12 had the activities of PAL and TAL(tyrosine ammonia-lyase). The PAL-like gene located on Chr.12 had only the activity of TAM(tyrosine aminomutase). These result indicated that beta tyrosine was synthesized by the unique gene located on Chr.12. However no genes responsible for beta phenylalanine were not found.

研究分野：育種学

キーワード：イネ フェニルアラニン チロシン アンモニアリアーゼ アミノムターゼ

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、数多くの二次代謝物を生産・蓄積するが、その多くは環境ストレスや病虫害に対する防御反応に関連する機能をもつ。アミノ酸は、植物の二次代謝物の一種である非タンパク質性アミノ酸である。炭素から隣接する炭素にアミノ基がシフトして生成され、非リボソームペプチド、細菌性抗体、抗がん薬などに少量ながら含まれることが判明している。特に、チロシンとフェニルアラニンはいくつかの医学関連代謝物の生合成に関する基本的要素として研究されてきた。フェニルアラニンは腸内細菌抗体に対する抗生物質であり、イチイ由来の抗がん剤タキソールの成分であるのに対し、チロシンはいくつかの細菌に対する抗生物質の生合成過程の中間産物であることが知られている。

我々は、ジャスモン酸処理した日本晴の葉身から、チロシンを検出し、その生合成にかかわる遺伝子として第12染色体に座乗するPAL様配列LOC\_OS12g33610 (Os12g0520600)の関与を明らかにした(Yanら PlantCell 2015 27: 1265)。本報告は、チロシンの生合成経路を植物で初めて明らかにしたものであり、その生合成遺伝子の同定は植物科学において大きなインパクトを与えた(Mach J. PlantCell 2015 27:949)。また、チロシンは、根からも滲出していて、双子葉植物の根に対して生育阻害活性を有しているが、単子葉植物に対しては阻害活性を示さず、その選択的な阻害機構の解明が注目されている。

持続可能な農業を可能にする一つの提案として、環境負荷の低減が求められる。植物が産出する代謝物、特に二次代謝物の中には、病原菌や害虫に対する防御機能をもつものが多い。これらを活用すれば、植物自らがもつ自己防御機構を高めることができ、病虫害の被害を抑えることができる。アミノ酸もそのひとつであり、本研究での遺伝子の同定が端緒となる。

チロシンの合成にかかわるLOC\_OS12g33610はイネに9個存在するPAL様配列のひとつである(図1)。PAL(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)は、TAL(チロシンアンモニアリアーゼ)、PAM(フェニルアラニンアミノムターゼ)、TAM(チロシンアミノムターゼ)およびHAL(ヒスチジンアンモニアリアーゼ)をコードする遺伝子とアミノ酸レベルで高い相同性を有しており、全て“PAL like gene”のアノテーションが付与されている。本研究ではこれらPAL様配列の機能解析を行い、それぞれの特異性を明らかにすることを目的とする。

### 2. 研究の目的

植物が産出する二次代謝物の中には、病原菌や害虫に対する防御機能をもつものが多い。これらを活用すれば、植物自らがもつ自己防御機構を高めることができ、病虫害の被害を抑えることができる。アミノ酸もそのひとつであり、我々は、PAL(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)様配列の一つがチロシンの合成酵素であることを、植物で初めて明らかにした(Yanら PlantCell 2015)。PAL様配列はイネに9個存在するが、それぞれの詳細な機能については未解明である。本研究では、PAL様配列の機能を解明するとともに、チロシンと類似した酵素反応で生じるであろうフェニルアラニンの合成酵素遺伝子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### PAL遺伝子ファミリーの単離

ゲノム解析の完了した日本晴のデータベースを調べたところ、イネには9個のPAL様配列が存在している。まず、日本晴からPAL様配列をRT-PCRで増幅し単離する。単離した配列についてはベクターにサブクローニングする。

#### 大腸菌発現系での発現解析

実験1で単離したPAL様配列を大腸菌発現ベクターに導入する。ベクターについては汎用性の高いHISタグのベクターを使用し、不溶性ならGSTタグ等親水性の高いベクターに変更する。可溶性画分として精製されたPAL様タンパク質は、フェニルアラニンもしくはチロシンを基質として酵素反応させ、生成物をAQC(6-アミノキノリル-N-ヒドロキスクシンイミジルカルバメート)で誘導体化してHPLCまたはLC/MSで検出する。さらに感度を求める場合はGC/MSを使用する。また、PAL様配列がアンモニアリアーゼとして働いた場合は、フェニルアラニンおよびチロシンからそれぞれ桂皮酸およびp-クマル酸が合成されるので、これら物質の検出もHPLCで行う。

#### 植物形質転換体の作成

実験1で単離したPAL様配列を植物形質転換ベクターに導入し、アグロバクテリウム法によってイネ品種日本晴に導入し、過剰発現体とサイレンシング体の作成を試みた。

### 4. 研究成果

イネジャポニカ品種である日本晴およびインディカ品種であるカサラスの組織からRNAを抽出しそれぞれ9つのPAL様配列をサブクローニングした後、pColdベクターに導入した。大腸菌宿主で発現した組換えタンパク質を用いて、フェニルアラニンもしくはチロシンを基質として酵素反応を行い、反応物を液体クロマトグラフ質量分析計で解析した(表1)。

日本晴由来のPAL(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)様配列のうち、染色体11および

12に座乗するPAL様配列を除いた7つの配列で、フェニルアラニンを基質として桂皮酸の合成が確認できたことから、PAL活性をもつことが判明した。また、染色体4、11、12に座乗するPAL様配列を除いた6つの配列で、チロシンを基質としてp-クマル酸の合成が確認できたことから、TAL(チロシンアンモニリアーゼ)活性をもつことが判明した。また、染色体12に座乗するPAL様配列のみで、チロシンを基質としてチロシンの合成が確認できたことから、TAM(チロシナーミノムターゼ)活性をもつことが判明した。

カサラスのPAL様配列については、欠失している染色体12のPAL様配列を除いて、PAL活性およびTAL活性に関して日本晴の対応するそれぞれの配列と同等の活性を確認することができた。

以上のことから、イネのPAL様配列は、多くがPAL活性とTAL活性をともに有していることが判明した。また、TAM活性は染色体12に座乗するPAL様配列のみで確認でき、Yanら(2015)の結果を追認することができた。

PAM(フェニルアラニナーミノムターゼ)活性は調整した組換えタンパク質で確認することは出来なかった。PAM活性をもち、フェニルアラニンを生合成する遺伝子の特定を行うことは出来なかったが、染色体12のPAL様配列はPAL活性およびTAL活性をもち、TAM活性のみを有することが明らかとなった。

日本晴のPAL様配列について、アミノ酸配列を比較した(図1)。(A)および(B)の位置のアミノ酸残基はPALおよびPAMの機能分化に関わる部位である(Heberlingら2015)ことが知られており、イネにおいては染色体11および12に座乗するPAL様配列は他の配列と異なることから、イネにおいてもこの部位がアンモニリアーゼ活性とアミノムターゼ活性の機能分化に関わっていることが示唆された。(C)および(D)の領域はヘリックス構造の部位であるが、この領域が染色体12のPAL様配列では欠失しており、TAM活性には影響を及ぼさないことが推察された。(E)および(F)の領域はターン構造に関わる部位であり、タンパク質構造には大きな影響を及ぼさない領域であると推察された。アミノ酸配列の比較と立体構造学的な知見から、PALとTAMの機能分化は(A)および(B)のアミノ酸残基の相違によることが示唆された。今後はこの領域の詳細な解析を行い、PAL様配列の機能分化について明らかにしたい。

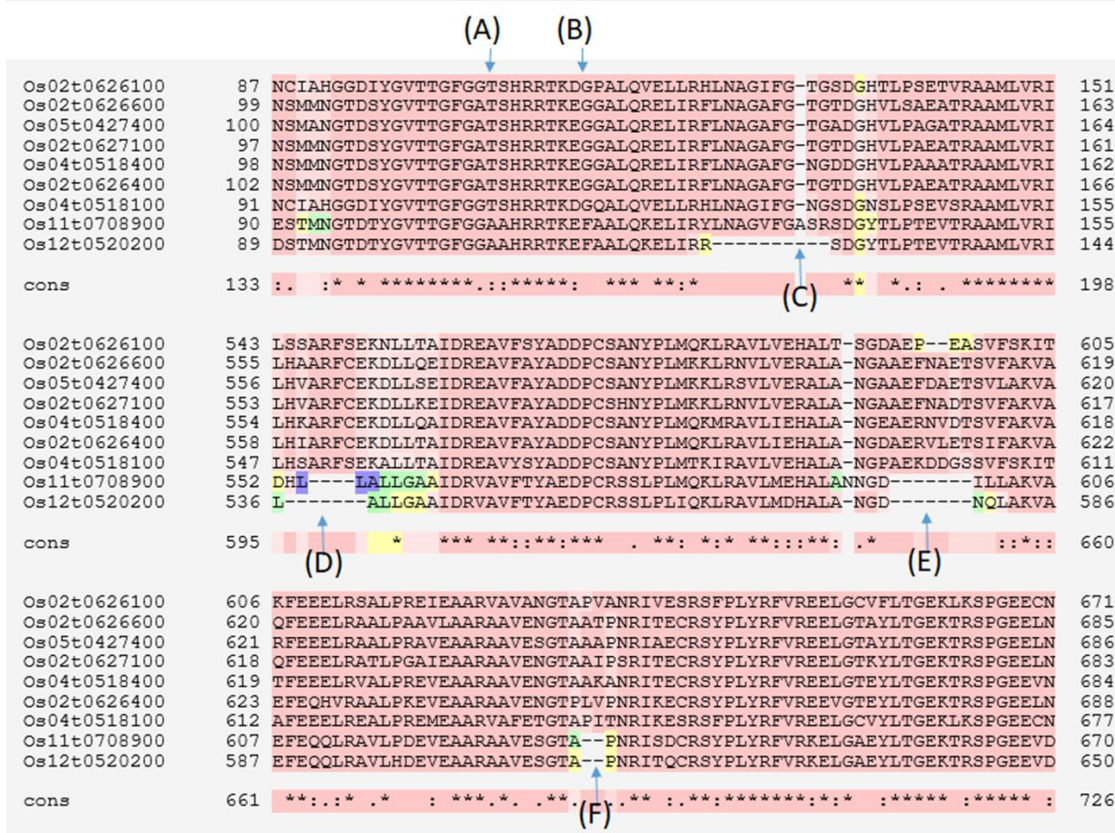
また、PAL様配列をP35Sプロモーターによる過剰発現ベクターおよびRNAi用遺伝子サイレンシングベクターに導入し、アグロバクテリウム法でイネ品種日本晴に導入を行ったが、種子を得ることができず、代謝物の解析を行うに至らなかった。

表1 . PAL様配列の活性

遺伝子名	Nipponare			Kasalath		
	PAL活性	TAL活性	TAM活性	PAL活性	TAL活性	TAM活性
Os02g0626100	○	○	×	○	○	×
Os02g0626600	○	○	×	○	○	×
Os05g0427400	○	○	×	○	○	×
Os02g0627100	○	○	×	○	○	×
Os04g0518400	○	○	×	○	○	×
Os02g0626400	○	○	×	○	○	×
Os04g0518100	○	×	×	○	×	×
Os11g0708900	×	×	×	×	×	×
Os12g0520200	×	×	○	ND	ND	ND

○は活性あり、×は活性なし、NDは相当する遺伝子がないことを示す

図1. アミノ酸配列のアライメント比較 (大きく異なる箇所のみ抜粋)



〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ikushu.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：奥本 裕

ローマ字氏名：Okumoto Yutaka

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：90152438

研究分担者氏名：森 直樹

ローマ字氏名：Mori Naoki

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：30293913

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。