

(平成 26 年度 研究実施報告)

国際科学技術共同研究推進事業 (戦略的国際共同研究プログラム)

(研究領域「低炭素のためのメタボロミクス」)

研究課題名「メタボロミクス:生理活性を持つ誘導性植物代謝物の同定」

平成26年度実施報告書

代表者氏名 奥本 裕
(京都大学大学院・教授)

1. 原著論文発表

(以下の記載要領にしたがって、平成 25 年度の論文実績について記載してください。)

1-1. 原著論文発表

① 発行済論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 0 件	(2 件)
計 0 件	(2 件)

※本共同研究の相手側チーム研究者との共著に限る

1. Murakami, S., Nakata, R., Aboshi, T., Yoshinaga, N., Teraishi, M., Okumoto, Y., Ishihara, A., Morisaka, H., Huffaker, A., Schemelz, E.A., Mori, N. Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves. *Metabolites*, 4, 532-546, 2014 (DOI: 10.3390/metabo4030532)

*2. Yan, J., Aboshi, T., Teraishi, M., Susan R. Strickler, S.R., Spindel, J.E., Tung, C.W., Temnykh, S., Takata, R., Matsumoto, F., McCouch, S.R., Okumoto, Y., Mori, N., Jander, G. The tyrosine aminomutase TAM1 is required for β -tyrosine biosynthesis in rice. *The Plant Cell*, 27, 1-14, 2015 (DOI: www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.15.00058)

本論文は植物から初めて β -tyrosine を検出し、その生合成遺伝子として tyrosine aminomutase 1 を同定した報告である。この生合成が植物ホルモンの一種ジャスモン酸により活性化された現象は植物の代謝研究に新しい視点を持ち込む成果と位置づけられる。

② 未発行論文数

(受理前のもは含めないでください。受理後、掲載巻・号・ページ等が未定の場合は“accepted”、決定しているものは“in press”と付記してください。)

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 0 件	(0 件)
計 0 件	(0 件)

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る

A 終了報告書

研究課題	メタボロミクス:生理活性を持つ誘導性植物代謝物の同定
日本側研究代表者(所属組織)	奥本 裕(京都大学大学院)
アメリカ側研究代表者(所属組織)※カタカナ	ジョージ ジャンダー(ボイス・トンプソン植物科学研究所)
支援期間	H23年12月-H27年3月
日本チームの研究費(直接経費)	円

日本チームの主たる共同研究者(研究担当者/組織名)	森直樹/京都大学大学院農学研究科
	石原亨/鳥取大学農学部
	吉永直子/京都大学大学院農学研究科

低環境負荷を目指した植物保護技術の確立:メタボロミクスの視点から探る昆虫の食害、糸状菌の感染で誘導されるイネ・トウモロコシ・ダイズの防御反応

イネ・トウモロコシ・ダイズにおける新規な抵抗性の探索:昆虫の食害や糸状菌の感染で誘導される代謝物の解析とその生合成に関わる遺伝子の同定

低分子量の代謝物は、植物の栄養成長、生殖成長、生物的・非生物的ストレスに対する防御応答など様々な局面で影響を及ぼす。これらの複雑な生理機構がいかに制御、統合されているかを理解することは植物メタボロミクス研究において重要な課題である。日本人研究者(奥本、森、吉永、石原)とアメリカ人研究者(ジャンダー、シュメルツ、ホフフェカー)による国際共同研究チームは、イネ・ダイズおよびトウモロコシにおいて病害虫により誘導される低分子量物質の同定を目指してきた。植物代謝物として未報告な化合物の同定を目指すとともに、その生合成に関わる遺伝子が染色体上のどの位置に存在するかについて検討した。

本研究は以下の4つの理論に基づき実施された。(i) 代謝物の中でも防御応答性の化合物に的を絞ることで、重要な生理活性を持つ代謝物を効率的に見つけられること(ii) 植物の防御物質の合成において、少なからぬ種内多型が存在しうること(iii) 遺伝子マッピング技術は代謝産物に関する量的形質遺伝子座(QTL)の単離に利用できること(iv) 得られたQTLの多くが生合成関連遺伝子であるため、そこから植物の二次代謝物を産生する未知酵素遺伝子を容易に同定できること、である。本研究は、分析化学・植物育種学・分子生物学・生化学各種学問領域および遺伝子マッピング技術や昆虫による生物試験技術など多様な専門技術の融合により、成功を収めることができた。今後、バイオ燃料用作物も含めた植物の食害防

御関連遺伝子や代謝物質を更に同定することで、低炭素社会の実現に向けたメタボロミクスの活用に貢献することができる。

用いた技術、手法

イネ・トウモロコシ・ダイズが潜在的に持つ防御システムを最大限に利用した環境低付加型植物保護法の確立:天然物化学、育種学、バイオテクノロジーの融合研究

本研究で用いた植物材料は、それぞれの植物コミュニティが公開している交配集団および遺伝資源に加え、自前で開発した交配集団を活用した。

植物の防御応答を誘導するために、それぞれの植物種の実生に、①ジャスモン酸処理、②昆虫による食害、③病原菌感染、などによるストレスを与えた。その後、一定期間培養させた植物体から得た抽出液を、アミノ酸分析計、液体クロマトグラフィー／マススペクトル(LC-MS)およびガスクロマトグラフィー／マススペクトル(GC-MS)などによって分析し、新たに蓄積してくる化合物を探索した。誘導性の未知化合物の化学構造を明らかにするために、化合物の誘導体化を行うとともに、高分解能マススペクトルや核磁気共鳴スペクトル(NMR)など様々なスペクトルを駆使した。

同一種内の様々な品種や系統を用いて、誘導性化合物の蓄積量における遺伝的多様性を調査した。同一種内において、大きな遺伝的多様性が見られた場合には、その原因遺伝子を決定するため、染色体断片置換系統ならびに組換え自殖系統を供試してQTL(量的形質遺伝子座)解析を行い、原因遺伝子が座乗する候補領域を絞り込むとともに、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。これらの解析をもとに、公開されている全ゲノム情報データベースを活用して、誘導性の防御物質の蓄積の原因となる候補遺伝子を推定した。最後に、候補遺伝子を大腸菌やタバコ野生種などで異種発現させ、生化学的な手法で機能を解析することによって、新たな防御関連遺伝子を同定することができた。

植物種や刺激の種類によって日本側とアメリカ側で分担して実験を行ったが、サンプルの分析などは日本側が、分子生物学的解析はアメリカ側が中心となった。日米間のサンプルの移動のみならず、密接なコミュニケーションにより技術とアイデアを相互に移転しあうことによって、所期の成果を果たすことができた。

研究成果と社会的インパクト

本研究プログラムでの大きな成果の一つは、①ジャスモン酸処理した日本晴(ジャポニカ)において(3*R*)- β -tyrosine を同定したこと、安定同位体を用いた取り込み実験から、(3*R*)- β -tyrosine は(2*S*)- α -tyrosine からアミノ基転移によって変換されること、その生合成に関わる遺伝子として日本晴の第12染色体上のLOC_Os12g33610を未知の tyrosine 2, 3-aminomutase (TAM)として同定したことである。本報告は、植物が β -tyrosine を生産する初めての報告であり、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る(研究成果物、参考文献 1)。

この発見を契機に、今後は植物中の(3*R*)- β -tyrosine や tyrosine 2, 3-aminomutase が注目されると予想される。また、イネの種子中にも(3*R*)- β -tyrosine は存在し、その濃度は他の天然 α -アミノ酸と大きな差はないことを考慮すれば、人間における(3*R*)- β -tyrosine の代謝研究も重要になろう。

また、(3*R*)- β -Tyrosine は日本晴の根から滲出されること、および(3*R*)- β -Tyrosine はシロイヌナズナや他の双子葉植物の根の伸長を阻害するが、イネを含めた単子葉植物には活性を示さないことを確認した。

この他にも、②イネの抗菌物質サクラネチンの生合成に関わる遺伝子の日本晴と Kasalath での比較、③昆虫の食害で誘導されるダイズのイソフラボン類の同定(研究成果物、参考文献2 および3)、④糸状菌の感染によってトウモロコシで誘導される新規物質の同定など、日米の共同研究の成果が得られている。

この様に、植物の保護に応用可能な代謝物、その生合成に関わる遺伝子の同定を通して、低炭素社会を目指したメタボロミクス研究を展開した。

アメリカチームとの相乗効果に基づく特記成果

(3*R*)- β -Tyrosine の同定は、日米の両研究グループで活発にサンプル・アイデアを交換しながら、達成された成果である。

日本側はイネの材料提供に強みがあり、米国側は以前から非天然アミノ酸の研究を行っていた。そこで、国際共同研究を展開するに当たって、ジャスモン酸で処理したイネの非天然アミノ酸に注目した。日本でジャスモン酸処理したイネのサンプルを米国へ送り、米国で日本晴に特異的に増加する化合物を見出した。日本側は、この化合物を(3*R*)- β -tyrosine と同定した。これを受けて、日本では染色体断片置換系統(Kasalath の染色体断片を有する日本晴の置換系統)を用い、第 12 染色体のある領域に(3*R*)- β -tyrosine 生合成遺伝子が存在することを見出した。本遺伝子は、(i) tyrosine 2, 3-aminomutase であること、(ii) ジャスモン酸処理によって活性化されることから、この領域にある約 100 の遺伝子中から LOC_Os12g33610 を同定した。 β -Tyrosine 生合成遺伝子の同定後、米国では同遺伝子を *Nicotiana benthamiana* や *Escherichia coli* に導入した。これらの抽出物から得られたサンプルは日本で分析され、 β -tyrosine の生合成を確認した。

本プロジェクトでは、上述の様に日米の得意分野を互いに活かすことが出来た。特に、サンプルの送付を積極的に進め、お互いに得意な研究を進めながら、得られた情報を交換し、効率的に本研究を進めた結果である。間違いなく、一国のチームではなし得なかった成果であり、ハード面だけでなく、ソフト面の高い協力関係の結果、成し得たものである。

また、共同研究の期間を通して、京都大学の修士の学生 2 名を Boyce Thompson 植物科学研究所に 1 ヶ月間短期留学させた。

研究成果物

日米共同での論文は 3 報執筆し、現在 2 報(The Plant Cell, 27: 1265–1278, 2015; Metabolites, 4: 532–546, 2014) がアクセプトされ、病原性糸状菌に感染したトウモロコシに誘導される新規代謝物についての論文 1 報は、修正版を再提出した。

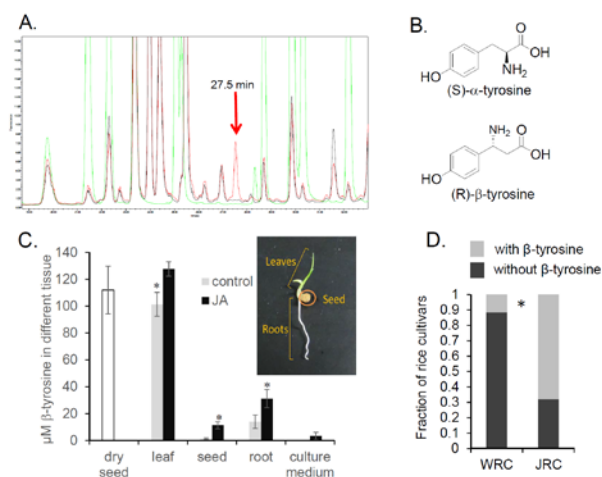
1. The tyrosine aminomutase TAM1 is required for β -tyrosine biosynthesis in rice. J Yan et al., The Plant Cell, 27: 1265–1278 (2015).

2. Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves. S Mutrakami et al., *Metabolites*, 4: 532-546 (2014).

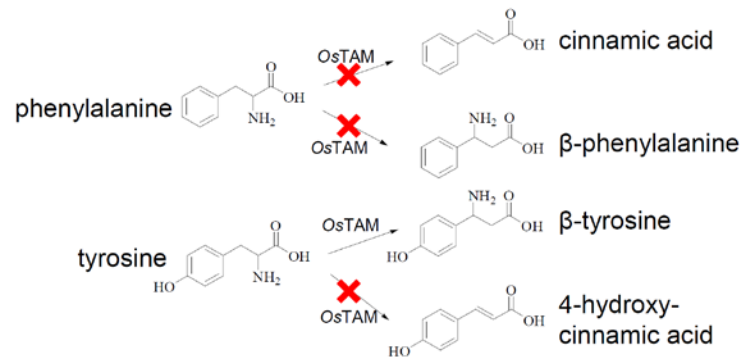
その他、国際学会で 2 件、国内学会で 4 件の共同発表をした。このうち、国際化学生態学会 (8/19-23、メルボルン オーストラリア) では、修士 2 回生がポスター賞を獲得した。

3. Secondary metabolites of soybean induced by gut contents of *Spodoptera litura*. S Murakami et al., *International Chemical Ecology Conference*, Melbourne, 19-23 August 2013

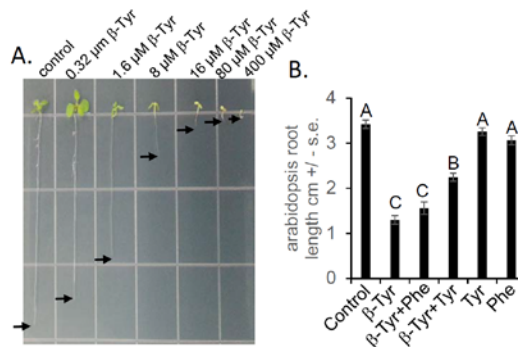
また、日本農芸化学会関西支部の援助を受けて、Jander 博士と Schmelz 博士の講演会を京都大学 (2013 9/17、9/24) で開催した。



日本晴における β -tyrosine の検出。(A) 抽出されたアミノ酸誘導体の HPLC クロマトグラム (excitation 250 nm; emission 395 nm)。赤、日本晴; 黒、Kasalath; 緑、標品。矢印は (3R)- β -tyrosine。(B) (2S)- α -tyrosine と (3R)- β -tyrosine の構造。(C) 日本晴の乾燥タネ、ジャスモン酸処理・無処理の実生各部位における (3R)- β -tyrosine 相対量。(D) World-wide collection (WRC、69 品種) と Japanese collection (JRC、50 品種) における (3R)- β -tyrosine の有無。



今回同定した OsTAM1 の tyrosine aminomutase としての活性。他の生成物が生じないことにより、本酵素は phenylalanine aminomutase、tyrosine aminolyse、phenylalanine aminolyase として作用しないことがわかる。



(3*R*)- β -tyrosine のシロイヌナズナ根の伸長抑制活性。(A) 濃度が増加するに従って、根の伸長が抑制される。(B) 根の伸長阻害活性は、(2*S*)- α -tyrosine の添加によって部分的に軽減される。

B FINAL REPORT (DIGEST FOR PUBLIC)

Project Title	Metabolomics: Identification of induced bioactive plant metabolites
Research Leader in Japan (Organization)	Yutaka Okumoto (Kyoto University)
Research Leader in the U.S. (Organization)	Georg Jander (Boyce Thompson Institute for Plant Research)
Funding Period	Dec. 2011 – Mar. 2015

List of Co-researchers	Naoki Mori (Kyoto University)
	Atsushi Ishihara (Tottori University)
	Naoko Yoshinaga (Kyoto University)

Main Title

Development of Environmentally-Friendly Plant Protection Techniques by using potential plant resistance to herbivores and pathogens from a metabolomic point of view

General Objects and Main Issues

Investigations of Plant Resistance to Herbivores and Pathogens in Rice Corn and Soybean Plants: Identifications of induced metabolites and genes that could be used to protect crops.

Small molecule metabolites influence all aspects of plant biology, including vegetative growth, reproduction, and protection against biotic and abiotic stresses. Understanding how these complex physiological processes are regulated and coordinated represents the ultimate challenge for plant metabolomics. Through international collaborations between Japanese (Okumoto, Mori, Yoshinaga, and Ishihara) and US (Jander, Schmelz, and Huffaker) researchers, we have specifically targeted the identification of small molecules that are elicited in rice, maize, and soybean in response to insect and pathogen attack. Moving beyond the identification of previously unknown plant metabolites, our groups have collaborated to identify the underlying biosynthetic enzymes using genetic mapping approaches.

Several underlying principles have guided the overall progress of our research: (i) By focusing our efforts on inducible defense-induced compounds, we can find those with important biological functions; (ii) Plants show considerable within-species variation in the production of defensive metabolites; (iii) Genetic mapping can be used to identify metabolic quantitative trait loci (QTL); and (iv) Many QTL are at biosynthetic genes, with facilitates the identification of previously

unknown enzymes that produce plant secondary metabolites. The combined expertise of our research groups in analytical chemistry, plant breeding, genetic mapping, molecular biology, biochemistry, and insect bioassays has contributed greatly to our success with this approach. By identifying genes and metabolites that can be used to protect plants, including biofuels crops, against insect herbivory, we contribute to the goals of Metabolomics for a Low Carbon Future.

Methods and Technologies

Combined research of natural chemistry, plant genetics and biotechnology towards the establishment of environmental-friendly plant protection by making best use of potential defense systems in rice, corn and soybean plants

Genetic resources and crossing populations, provided from research communities of each plant species, were used in this study, in addition to crossing populations produced by ourselves.

To elucidate new inducible defense responses of plants, we analyzed plant seedlings that were treated with jasmonic acid, infested by herbivorous insects and infected by pathogenic fungi. After an incubation, we prepared extracts of the plant seedlings, and analyzed them by an amino acid analyzer and by liquid and gas chromatography connected to mass spectrometry to find new inducible metabolites. For the analysis of chemical structures of unknown metabolites, we carried out derivatization of the compounds, and employed various spectroscopic techniques including high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry.

We found wide genetic variations in the accumulated amounts of the inducible metabolites among the various varieties in a species. To address the cause of genetic variation, we estimated the chromosome regions responsible to the genetic variation with CSSLs (Chromosome Segment Substitution Lines) and RILs (Recombinant Inbred Lines), which generated by crossing two varieties that showed differential induction of the metabolites. Based on these results, candidate genes were picked up from published information for whole genome sequence data. The ectopic expression of the candidate genes in *E. coli* and *Nicotiana Benthamiana* and biochemical analysis of the gene products finally proved their function.

Japanese and American sides performed different part of experiments depending on the plant species and stress treatments, but Japanese side mainly performed chemical analysis and American side performed biological and molecular biological analyses. We exchanged samples as well as techniques and idea by close

communication, which led us to the successful identification of new defense related genes.

Results and Social Impacts

One of the biggest achievements of this project was (1) identification of (3*R*)- β -tyrosine in Japanese rice, Nipponbare, treated with jasmonic acid. Stable isotope trace experiments clearly showed (3*R*)- β -tyrosine were converted from (2*S*)- α -tyrosine by transamidation, and we identified the gene associated with the biosynthesis of (3*R*)- β -tyrosine by functional annotation of LOC_Os12g33610 located on the 12th chromosome as a new tyrosine 2, 3-aminomutase (TAM). This was the first report of β -tyrosine synthesis by plants and the identification of the gene could have an impact on plant sciences (reference 1).

Our finding focus spotlight on (3*R*)- β -tyrosine and 2, 3-aminomutase in plants and will lead to entirely new research projects. As an example, human metabolism of (3*R*)- β -tyrosine will be necessary, considering the fact that (3*R*)- β -tyrosine is contained in a rice grain at an equally high level to other natural α -amino acids.

We also found that (3*R*)- β -tyrosine was secreted from the roots and that relevant concentration of (3*R*)- β -tyrosine inhibited root growth of *Arabidopsis thaliana* and other dicots, but had less of an effect on monocots, including rice.

In addition to this result, we reported (2) the comparison of the gene related to biosynthesis of antimicrobial substance, sakuranetin, between Nipponbare and Kasalath, (3) identification of induced isoflavones in soybeans attacked by herbivores (reference 2), and (4) identification of new metabolites induced by corn plants infected by filamentous fungus.

These are results of our collaboration research of Metabolomics for a Low Carbon Future through identification of metabolites and related genes applicable to plant protection technologies.

Synergies between US and Japanese Teams

Identification of (3*R*)- β -tyrosine was a fruit of collaboration between the US (Jander team) and Japan (Okumoto team) with mutual backup making a strong showing of each expertise.

Japanese group had genetically established rice varieties and US group had expertise in non-natural amino acid research, which brought us to work together on non-natural amino acid accumulation in rice plants induced by jasmonic acid. First, the Japanese group prepared rice samples treated with jasmonic acid and the US group found an unknown compound induced specific to Nipponbare. The compound was identified as (3*R*)- β -tyrosine in Japan and the synthetic gene was also identified in the 12th chromosome in CSSLs (Nipponbare lines carrying chromosome segments of Kasalath which does not produce β -tyrosine) by Japanese

group. The chromosome 12 QTL localized the presumed (3*R*)- β -tyrosine synthetic gene to LOC_Os12g33610. The US group expressed this candidate gene in *Nicotiana benthamiana* and *Escherichia coli* and the product of in vitro enzyme assays were analyzed by the Japanese group. In vitro synthesis of β -tyrosine by this enzyme was clearly confirmed and this gene was annotated as tyrosine 2, 3-aminomutase (TAM).

Thus, each group's area of expertise was effectively used in this project. Especially, the active exchange of sample materials, sharing tasks in one's respective realms of expertise, together with constant exchange of information and result reports let us pursue the research and get the result above in such a short term. No doubt it was more than a single group could have accomplished alone.

Also during the program, two master course students of Kyoto University studied abroad for a month at Boyce Thompson Institute.

Achievements

In collaboration we co-authored 3 papers. Currently two of them has been accepted (The Plant Cell, 27: 1265-1278, 2015; Metabolites, 4: 532-546, 2014) and the other one about the new metabolites in corn plants induced by fungal infections has been revised and resubmitted.

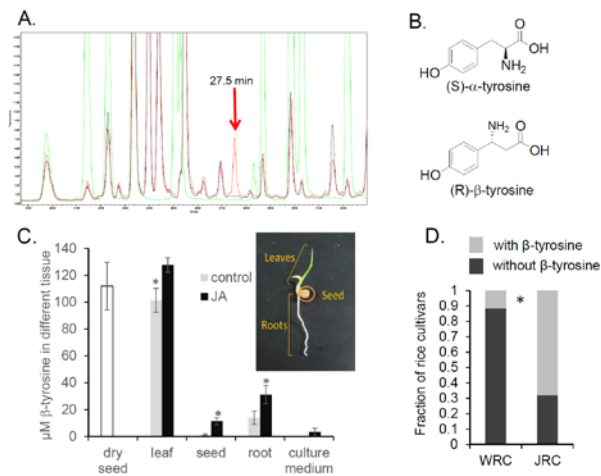
1. The tyrosine aminomutase TAM1 is required for β -tyrosine biosynthesis in rice. J Yan et al., The Plant Cell, 27: 1265-1278 (2015).
2. Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves. S Mutrakami et al., Metabolites, 4: 532-546 (2014).

In addition, we co-authored 2 presentations at the international conference and 4 presentations at the domestic conference. Among this, 1 poster presented by student won the poster award at the International Chemical Ecology Conference (August 19-23, Melbourne, Australia).

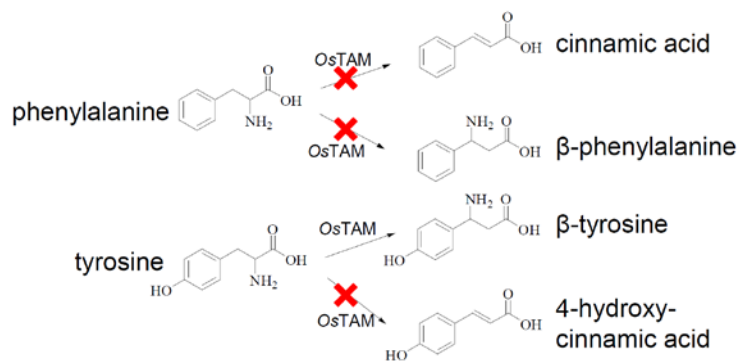
3. Secondary metabolites of soybean induced by gut contents of *Spodoptera litura*. S Murakami et al., International Chemical Ecology Conference, Melbourne, 19-23 August 2013

Also we hosted two lectures inviting Dr. Jander and Dr. Schmelz at Kyoto University (September 17, 24, 2013) with the support of JSBBA-Kansai.

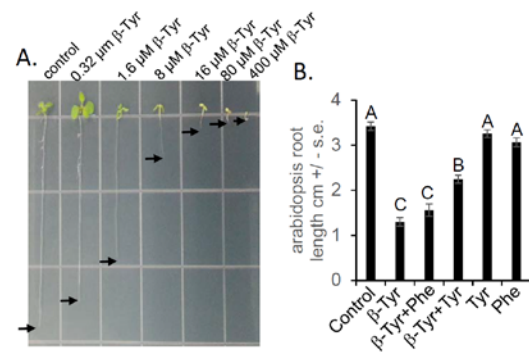
Illustrations



Detection of (3R)- β -tyrosine in rice. (A) HPLC-fluorescence detection (excitation 250 nm; emission 395 nm) chromatogram of derivatized rice foliar aminoacids. Red, Nipponbare; Black, Kasalath; Green, amino acid standards. (B) Structures of (3S)- α -tyrosine and (3R)- β -tyrosine. (C) Relative abundance of (3R)- β -tyrosine in dry rice seeds and rice seedlings, with and without jasmonic acid-treated samples. (D) Cultivars that contain (3R)- β -tyrosine are relatively more abundant in a collection of 50 Japanese rice cultivars (JRC) than in a world-wide collection of 69 rice cultivars.



OsTAM1 functions as a tyrosine 1, 2-aminomutase. The lack of other products indicates that the enzyme does not act as a phenylalanine aminomutase, tyrosine aminolyase, or phenylalanine aminolyase.



Inhibition of Arabidopsis root growth of (3*R*)-β-tyrosine. (A) Root elongation is inhibited by increasing (3*R*)-β-tyrosine concentration. (B) Root growth inhibition by 5 μM (3*R*)-β-tyrosine is partially rescued by exogenous addition of (2*S*)-α-tyrosine.