

令和 2 年 11 月 20 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07704

研究課題名(和文)植物における新規アセチルコリン合成酵素遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文)A novel choline-O-acetyltransferase from plant

研究代表者

村田 純 (Murata, Jun)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・主席研究員

研究者番号：90500794

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)：神経伝達物質アセチルコリンは様々な植物にも蓄積しているが、動物で知られるアセチルコリン合成酵素を植物は持たない。そこでイラクサ(*Urtica thunbergiana*)を材料に、アセチルコリン合成活性を指標にタンパク質精製を行った。質量分析による部分アミノ酸配列決定を経て、同タンパク質が植物に固有の新規な酵素であることを見出した。これにより、植物は動物とは独立にアセチルコリン合成能を獲得した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで植物からアセチルコリンの検出について報告例はあったが、植物自身がアセチルコリンを生合成しているのか、確定していなかった。本研究でイラクサのアセチルコリン合成酵素を部分精製し、決定したペプチド配列から判断すると、動物で高度に保存されているアセチルコリン合成酵素とイラクサのアセチルコリン合成酵素とは相同性が非常に低く、植物は動物とは独立にアセチルコリン合成酵素を獲得した可能性が考えられた。今後、大部分が未解明な、植物におけるアセチルコリンの生物学的役割の解明に向けて有用な知見となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Acetylcholine (ACh), a neurotransmitter in animals, has been widely found in plants. However, since plants have no genes with apparent homology to choline-O-acetyltransferase (ChAT), molecular basis for the biosynthesis of ACh remains elusive. Here we biochemically purified ChAT from *Urtica thunbergiana* (nettle) through enzyme assays. Partial amino acid sequence identification by peptide MS fingerprinting demonstrated that the nettle ChAT constitutes a novel clade of acyltransferase gene family with unassigned function. These results suggest that plants have plant-specific ChAT genes and that plant ChAT might have occurred independently from animal ChAT during evolution.

研究分野：植物生化学

キーワード：アセチルコリン イラクサ アシル基転移酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の代表的な神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) は、神経を持たない植物にも存在することが近年明らかになってきた。植物における ACh の生理機能は、薬理学的実験から根毛伸長や重力屈性などへの関与が示唆されているものの、詳細は不明である。加えて植物の ACh 合成酵素 (choline-*O*-acetyltransferase; ChAT) が未同定で、そもそも植物自身が ACh を合成している証拠が無かった。これは、植物には動物 ChAT の明瞭な相同遺伝子が存在せず、配列相同性からの植物 ChAT の類推が困難なことが大きな要因であった。

2. 研究の目的

植物において ChAT 活性を示す酵素タンパク質を、イラクサ (*Urtica thunbergiana*) を材料にして探索・同定することを目的とした。動物 ChAT と一定の相同性を示す遺伝子は植物界全体のなかでも見いだされないため、得られた植物 ChAT と動物 ChAT との相同性を比較し、植物 ChAT の分子進化過程についても考察することとした。

3. 研究の方法

イラクサ組織における ACh 含量の測定、および ChAT 活性の測定は LC-TripleQ-MS にておこなった。イラクサ ChAT 活性測定は、動物 ChAT 活性測定条件に準じた条件でおこなった (基質は choline と acetyl-CoA)。イラクサ組織からのアセチルコリン合成酵素精製はゲルろ過担体および陰イオン交換樹脂を充填したカラムを用いた FPLC によりおこなった。部分アミノ酸配列の同定は、LC-Orbitrap-MS を用いたペプチド MS フィンガープリンティングにより実施した。

4. 研究成果

イラクサ植物体は、奈良女子大理学部・佐藤宏明准教授から提供を受けた。まずイラクサの茎を材料にタンパク質を粗抽出し、これを酵素溶液とし、choline と acetyl-CoA を基質として、ChAT 活性の有無を検証した。酵素反応終了後、LC-MS により ACh の検出を試みた結果、ACh が生成することを確認した。前もって煮沸により不活性化した酵素溶液を用いた場合には、ACh は生成されなかった。次いで、イラクサ茎組織よりゲルろ過と陰イオン交換により同酵素を部分精製した。各画分を SDS-PAGE にて分離し、ChAT 活性の消長と一致するタンパク質バンドを切り出し、トリプシンによる in gel 消化後、LC-MS を用いたペプチド MS フィンガープリンティングを行い、アミノ酸配列の同定を試みた。公共データベースに収載された既知植物遺伝子のアミノ酸配列と照合した結果、機能未知の新規タンパク質の部分配列と非常に高い相同性を示した。分子進化解析の結果、同遺伝子は acyltransferase スーパーファミリーに属し、新規な clade を構成すること、単子葉、双子葉植物に広く保存されることが判明した。同 clade の植物 acyltransferase は動物には見いだされないため、植物は動物の ChAT は共通の祖先遺伝子から分子進化したと考えるよりも、それぞれ独立に収斂進化した可能性が示唆された。

一方、植物における ACh の生理機能を明らかにするうえで、ACh が植物体のどの組織・細胞に局在しているかは有益な周辺情報だが、ACh の局在について組織レベルの詳細な解析例はない。イラクサの茎や葉の表面には刺毛 (しもう) と呼ばれるトライコームの一種が密生しており、ここに ACh が蓄積することが知られているが、具体的に刺毛にどの程度 ACh が蓄積しているのか、詳細な定量データは報告されていなかった。そこで刺毛のみを集める、ACh を定量することを試みた。1.5 cm 長程度に切除し液体窒素中で凍結したイラクサ葉柄を 2 ml チューブ内に

複数入れ、ピーズと共に振とうすることで、葉柄本体から刺毛のみを回収することに成功した。次いで刺毛のみ、刺毛+葉柄本体、葉柄本体のみ、およびこれらに葉を加えた合計4種のサンプルから抽出液を得て、LC-MS/MS分析に供した。その結果、ACh含量は葉に比べて葉柄本体で数倍程度であるのに対し、刺毛のみからの抽出液では数十倍程度高い濃度のAChを含有することが明らかとなった。以上より、イラクサはほぼ葉や茎の表面に密生する刺毛に特異的にAChを蓄積していることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

○村田純、渡辺健宏「植物のアセチルコリン合成」 日本農芸化学会 2019年度年会、2019年3月

○村田純「古くて新しい植物の特化代謝物、アセチルコリン」 植物特化代謝研究の新潮流 於東北大学、2018年12月

○村田純「植物にもアセチルコリンが存在する? ~植物におけるアセチルコリンの機能解析に向けて~」けいはんな植物科学懇談会 於 奈良先端大、2017年7月

〔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:

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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤宏明

ローマ字氏名：SATO, hiroaki

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。