

平成21年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780249

研究課題名 (和文) 植物からのモノハロメタン放出の環境応答性と生理学的意義の解明

研究課題名 (英文) A study of the physiological roles of methyl halide synthesis in plants

研究代表者

中村 達夫 (NAKAMURA TATSUO)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・講師

研究者番号：50334636

研究成果の概要：成層圏オゾンの破壊に関与する塩化メチルは、ほぼ全てが自然由来である。近年、熱帯植物が大量の塩化メチルを放出するとの報告があり、植物が塩化メチルの重要な発生源であることが明らかにされた。しかし、塩化メチル等のモノハロメタンの合成機構やその生理学的役割に関する知見は不明であった。本研究では、シロイヌナズナをモデル系とし、モノハロメタン合成に関わる *AtHOL1* 遺伝子の分子生理学的解析を行った。シロイヌナズナの *AtHOL1* 遺伝子は病害抵抗性に関与するという仮説モデルを提唱することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：大気—植物相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

対流圏のハロカーボンの中で最も量の多い塩化メチル( $\text{CH}_3\text{Cl}$ )は、成層圏オゾンの減少に関わる化合物であり、その大気への放出量は年間約1,700–13,600 Ggにも及ぶと見積もられている。塩化メチル放出源の大部分が自然起源であり、海洋、バイオマスの燃焼、糸状菌や塩性沼地が放出源として知られているが、放出量の約1/2以上もの発生源が不明であり問題となっていた。近年、熱帯および亜熱帯域の森林からの塩化メチル放出が報告された。アジア熱帯林のフタバガキ科植物だけでも、全放出量の約1/4に相当する塩化

メチル放出が見積もられている。また、熱帯植物からの塩化メチル発生量が、全放出量の3割から5割に相当することが明らかにされた。したがって、植物が大気中の塩化メチルの大きな放出源であると考えられる。成層圏オゾン破壊物質のほとんどがフロン類など人為起源であるのに対し、塩化メチルは唯一の自然起源の塩素系オゾン破壊物質である。モントリオール議定書の採択以降、人為起源のフロンやハロンが減少傾向にある現在、成層圏オゾンの消長における自然起源塩化メチル等のモノハロメタン( $\text{CH}_3\text{X}$ )の寄与度は増加すると推測されている。したがって、大気

におけるモノハロメタン収支の理解において、植物からのモノハロメタン放出に関わる機構やその生理学的意義を理解することは重要である。

塩化メチル等のモノハロメタン合成機構の研究としては、糸状菌、紅藻およびアイソプラントの細胞抽出液において初めて、S-adenosyl-L-methionine (SAM) 依存的な、Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> に対するメチル基転移活性の存在が *in vitro* において示された。塩生植物 *Batis maritima* において Methyl chloride transferase (MCT) の酵素精製および cDNA クローニングが報告され、精製した MCT や大腸菌により発現させた融合 MCT タンパク質がハロゲン化物イオンに活性を示すことから、その生理学的役割として細胞内の Cl<sup>-</sup> 調整による耐塩性の付与を仮説として挙げている。また、*Brassica oleracea* においてハロゲン化物イオンおよび HS<sup>-</sup> に活性を持つ酵素 Thiol methyltransferase (TMT) が精製された。精製した TMT や大腸菌により発現させた TMT は、ハロゲン化物イオンだけでなくグルコシノレートの分解産物として知られている NCS<sup>-</sup> や HS<sup>-</sup> に活性を持つことが *in vitro* において示された。よって、グルコシノレート分解産物の解毒に関わる可能性が推測されている。しかし、TMT および MCT いずれにおいても、生理学的役割に関する仮説について *in vivo* における直接的な証明はなされていない。これらの酵素群の生理学的意義の解明には、ゲノム配列が解読されている植物において酵素および遺伝子の全アイソフォームについて解析する必要がある。

ゲノム配列が解読されているシロイヌナズナにおいて MCT の相同遺伝子が単離された。遺伝子破壊株において CH<sub>3</sub>Cl, CH<sub>3</sub>I, CH<sub>3</sub>Br 合成の大部分が抑制されたことから、この遺伝子がモノハロメタン合成に関与することが遺伝学的に示され *HARMLESS TO OZONE LAYER/HOL* と命名された。しかしながら、シロイヌナズナ *HOL* の生化学的特徴および *HOL* 相同遺伝子の生理学的意義は示されていない。

## 2. 研究の目的

### (1) *HOL* 遺伝子の分子系統解析

既往研究より、さまざまな植物からモノハロメタンが放出されていることが明らかとなっている。モノハロメタン合成に関与すると考えられている *HOL* 遺伝子の植物における分布を、分子系統解析により明らかにすることを目的とした。

### (2) *HOL* タンパク質の酵素化学的解析

*HOL* タンパク質の基質特異性等の酵素化学的性質を明らかにすることにより、*HOL* タン

パク質の機能に関する知見を得ることを目的とした。

### (3) *HOL* 遺伝子の逆遺伝学的解析

*HOL* 遺伝子やその相同遺伝子の生理学的役割に関しては、いくつかの仮説が提唱されているものの、直接的な証拠は示されていない。シロイヌナズナの 3 相同遺伝子 (*AtHOL1*, *AtHOL2*, *AtHOL3*) について、遺伝子破壊株等を用いた逆遺伝学的解析を行い、*HOL* 遺伝子の生理学的役割に関する知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *HOL* 遺伝子の分子系統解析

植物における *HOL* 遺伝子の分布と、*HOL* 遺伝子の系統関係を明らかにするために、全ゲノム配列が決定されている植物種を対象として、塩基配列データベースを用いた相同性解析を行い、*HOL* 相同遺伝子を探索した。また、各 *HOL* 相同遺伝子の分子系統を明らかにするために、Clustal W を用いて系統樹を作製した。

### (2) *HOL* タンパク質の酵素化学的解析

シロイヌナズナの *HOL* 遺伝子 (*AtHOL1*, *AtHOL2*, *AtHOL3*) の cDNA を単離し、これら大腸菌において融合タンパク質として発現させ、精製することにより、各 *AtHOL* タンパク質を得た。これらを用いて、種々の基質に対する親和性や反応速度を、液体クロマトグラフを用いた測定系により、明らかにした。

### (3) *HOL* 遺伝子の逆遺伝学的解析

シロイヌナズナの 3 *HOL* 遺伝子 (*AtHOL1*, *AtHOL2*, *AtHOL3*) の生理学的役割に関する知見を得るために、各 *AtHOL* 遺伝子が破壊された T-DNA 挿入シロイヌナズナを単離した。また、各 *AtHOL* 遺伝子について、過剰発現シロイヌナズナを作製し、これらを用いて種々の生化学的解析、生理学的解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *HOL* 遺伝子の分子系統解析

シロイヌナズナの *AtHOL1* 遺伝子が、モノハロメタン放出に関与することがこれまでに報告されている。我々は、シロイヌナズナのゲノム配列を解析することにより、相同遺伝子である *AtHOL2*, *AtHOL3* を同定した。また、これまでにゲノム配列が決定されている植物の DNA 配列情報を解析したところ、これらの全ての植物に相同遺伝子が存在することを明らかにした。コケ植物から高等植物まで、*HOL* 相同遺伝子が植物に普遍的に存在することを、初めて示唆した (図 1)。この結果は、

モノハロメタン放出が植物に普遍的に観察されるというこれまでの知見と矛盾しないものである。また、系統樹の特徴として、フウチョウソウ目に属する植物に存在する *HOL* 相同遺伝子は、大きく 2 個のクラスター (Cluster I, Cluster II) に分かれることを示した。このことから、フウチョウソウ目植物は、植物に普遍的な機能を持つ *HOL* 遺伝子に加え、フウチョウソウ目植物に特異的な機能を持つ *HOL* を有することが示唆された。

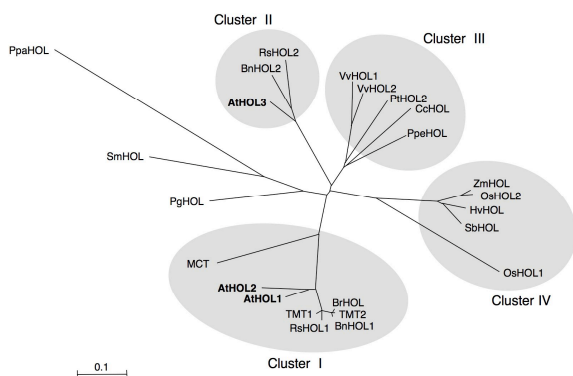


図1 *HOL* 相同タンパク質の分子系統  
多細胞植物における *HOL* 相同遺伝子の予測されるアミノ酸配列を基に Njplot program (unrooted) を用いて系統樹を作製した。Bar = 0.1 amino acid substitution/site. *Arabidopsis thaliana* (AtHOL1, AtHOL2, AtHOL3), *Brassica oleracea* (TMT1, TMT2), *Raphanus sativus* (RsHOL1, RsHOL2), *Brassica rapa* (BrHOL1), *Brassica napus* (BnHOL1, BnHOL2), *Batis maritima* (MCT), *Vitis vinifera* (VvHOL1, VvHOL2), *Populus trichocarpa* (PtHOL), *Coffea canephora* (CcHOL), *Prunus persica* (PpeHOL), *Oryza sativa* (OsHOL1, OsHOL2), *Zea mays* (ZmHOL), *Hordeum vulgare* (HvHOL), *Sorghum bicolor* (SbHOL), *Picea glauca* (PgHOL), *Selaginella moellendorffii* (SmHOL1), *Physcomitrella patens* (PpaHOL).

## (2) *HOL* タンパク質の酵素化学的解析

シロイヌナズナの *AtHOL1* 遺伝子がモノハロメタン放出に関わることが、逆遺伝学的解析により明らかにされているが、タンパク質レベルでの生化学的解析の報告はまだない。そこで、我々はシロイヌナズナの 3 個の *HOL* 遺伝子について、大腸菌を用いて融合タンパク質を調製し、酵素化学的解析を行った。3 個の *HOL* タンパク質ともに、S-アデノシルメ

チオニン依存的なメチル基転移酵素活性を有することを初めて生化学的解析により示した。また、反応速度論的解析により、*AtHOL1* タンパク質が、擬ハロゲン化物イオンであるチオシアン酸イオンや硫化水素イオンに対する活性が高いことを示した (図2)。モノハロメタン放出に関わることが示されている *AtHOL1* 遺伝子であるが、塩化物イオンに対する活性が非常に低いことを示した。この結果は、*AtHOL1* タンパク質の生理学的基質は、ハロゲン化物イオンではないことを示唆した。

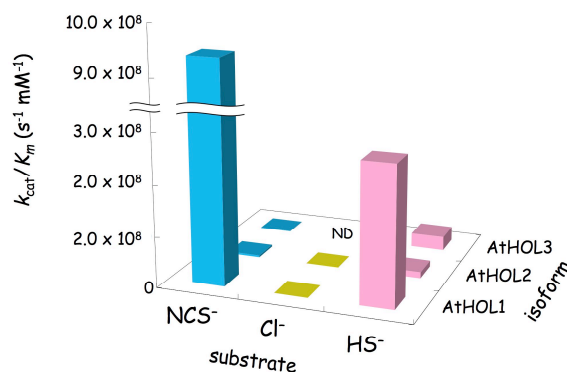


図2 *AtHOL* タンパク質の酵素活性  
シロイヌナズナの各 *HOL* タンパク質の反応速度論的解析により明らかにした  $k_{cat}$  および  $K_m$  値より、各タンパク質の各基質 ( $NCS^-$ ,  $Cl^-$ ,  $HS^-$ ) に対する活性を示した。

## (3) *HOL* 遺伝子の逆遺伝学的解析

シロイヌナズナの各 *HOL* タンパク質の酵素化学的解析より、*AtHOL1* がチオシアン酸イオンに対し、高い活性を示すことを明らかにした。In vivo 系において、さらなる解析を行うために、各 *AtHOL* 遺伝子を破壊したシロイヌナズナを単離した。これらのシロイヌナズナ株は、通常の培養条件下では、野生型シロイヌナズナとは形態に違いは観察されなかった。これらの遺伝子破壊株について、チオシアン酸イオンに対する感受性を解析した。その結果、*AtHOL1* が破壊されたシロイヌナズナのみが、チオシアン酸イオンに対する感受性を上昇させた (図3)。このことは、生体内においてもチオシアン酸イオンが *AtHOL1* の基質となり、毒性を示すチオシアン酸イオンをメチル化することにより解毒していることを示した。また、チオシアン酸イオンが *AtHOL1* の生理学的基質であることを示唆した。

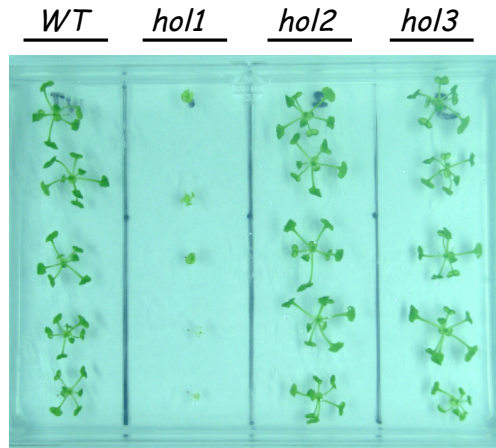


図3 *AtHOL* 遺伝子破壊シロイヌナズナの NCS 感受性  
培地に添加した 1 mM KSCN に対する野生株 (WT) および各 *AtHOL* 遺伝子破壊株 (*hol1*, *hol2*, *hol3*) の感受性を解析した. 1/2 MS 培地に播種した約 2 週間目の幼苗を 1 mM KSCN 添加 1/2 MS 培地に移植後約 3 週間目の生育を示した.

遺伝子破壊シロイヌナズナを用いた生化学的解析により, *AtHOL1* 依存的にチオシアン酸がメチル化され, チオシアン酸メチルが合成されることを示した. また, シロイヌナズナにおけるチオシアン酸イオンの合成は, 酵素タンパク質であるミロシナーゼに依存することを示した. *AtHOL1* により合成されるチオシアン酸メチルは, 植物病原菌を含む複数の微生物に対する生育阻害活性を持つことを *in vitro* 系において示した. さらに, *AtHOL1* 遺伝子を破壊したシロイヌナズナは, 植物病原菌である *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* に対する抵抗性を低下させることを示した (図4).

これらの結果より, *AtHOL1* の生理学的役割として, 次のようなモデルが考えられる (図5). シロイヌナズナが蓄積するグルコシノレートが, 傷害や病害により, ミロシナーゼ依存的に分解され, チオシアン酸イオンが生じる. このチオシアン酸イオンは, *AtHOL1* 依存的にメチル化され, チオシアン酸メチルが合成される. 合成されたチオシアン酸メチルは, 傷害部位より感染する病原菌に対する抵抗性に寄与することが示唆された.

*HOL* 相同遺伝子は, グルコシノレートを蓄積する植物以外にも, 植物に広く存在する. このことから, 本研究により明らかにした *AtHOL1* の機能は, 系統樹 (図1) の Cluster I に属する *HOL* 相同遺伝子に特異的な機能である可能性が考えられ, その他の *HOL* 相同遺

伝子は, 植物に普遍的な機能を有することが示唆される.

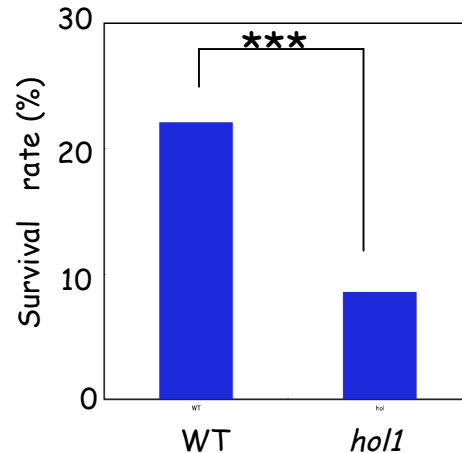


図4 *AtHOL1* 破壊シロイヌナズナの病害抵抗性  
*P. syringae* 接種シロイヌナズナ野生株および *AtHOL1* 遺伝子破壊株 (*hol1*) における生存率の比較を行った. 本葉を指標として, 生存個体をカウントした. 生存率は, コントロールの生存率を反映させて算出した.  $n =$  (WT: 452, *hol1*: 428). WT と *hol1* は, 生存率において有意差が確認された ( $P < 0.001$  by chi-square test)

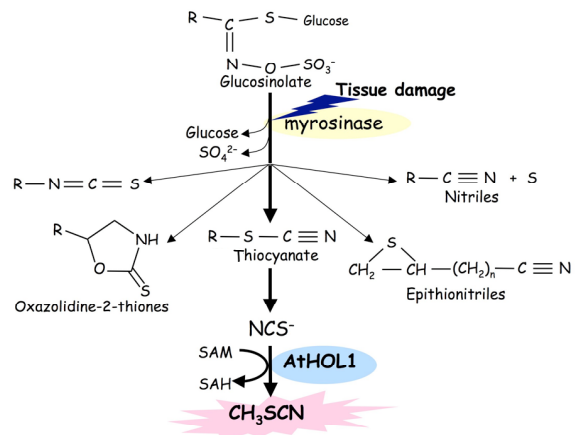


図5 *AtHOL1* の生理学的役割に関する仮説モデル

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3件）

- ①永利友佳理, 中村達夫, *Arabidopsis* AtHOL1 protein methylates a glucosinolate breakdown product and functions in resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. , Journal of Biological Chemistry, 印刷中, 2009年, 査読有り
- ②緑川景子, 永利友佳理, 中村達夫, A selection system for transgenic *Arabidopsis thaliana* using potassium thiocyanate as the selective agent and *AtHOL1* as the selective marker. , Plant Biotechnology, 印刷中, 2009年, 査読有り
- ③永利友佳理, 中村達夫, Characterization of three halide methyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. , Plant Biotechnology, 24, 503-506, 2007年, 査読有り

〔学会発表〕（計5件）

- ①永利友佳理, シロイヌナズナ *AtHOL1* 遺伝子の病害抵抗性への関与, 第50回日本植物生理学会年会, 2009年3月22日, 名古屋大学
- ②永利友佳理, シロイヌナズナ *AtHOL1* 遺伝子のチオシアン酸イオン代謝への関与, 第26回日本植物細胞分子生物学会大会, 2008年9月2日, 大阪大学
- ③永利友佳理, シロイヌナズナ *AtHOL1* 遺伝子のグルコシノレイト分解産物代謝への関与, 第49回日本植物生理学会年会, 2008年3月22日, 札幌コンベンションセンター
- ④緑川景子, シロイヌナズナの *AtHOL1* 遺伝子を利用した遺伝子組換え植物選抜技術の開発, 第49回日本植物生理学会年会, 2008年3月21日, 札幌コンベンションセンター
- ⑤古屋恵, マコンブ (*Laminaria japonica*) のフロタンニン合成に関わる因子の解析, 第49回日本植物生理学会年会, 2008年3月20日, 札幌コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 達夫 (Nakamura Tatsuo)  
横浜国立大学・大学院環境情報研究院・講師  
研究者番号：50334636

(2) 研究協力者

永利 友佳理 (Nagatoshi Yukari)  
横浜国立大学・大学院環境情報学府・博士課程後期3年

(3) 連携研究者