

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20380177

研究課題名（和文）イネ科におけるグリシンベタイン合成・輸送・蓄積機構に関する研究

研究課題名（英文） Study on the glycinebetaine synthesis, transport and accumulation in the Graminea

研究代表者

高倍鉄子（TAKABE TETSUKO）

名城大学・総合研究所・教授

研究者番号：60089852

研究成果の概要（和文）：

アカザ科では、浸透圧調節物質 グリシンベタイン(GB) の合成は、葉緑体でコリンからの 2 段階の酸化反応（葉緑体型 コリンモノオキシゲナーゼ（CMO）とベタインアルデヒド脱素酵素（BADH））で起こることが明らかにされた。申請者らは重要な穀物イネ科のオオムギから、新奇 GB 合成・輸送・蓄積機構を発見した。

研究成果の概要（英文）：

Osmoprotectant glycinebetaine synthesis enzymes from choline to glycine betaine was known only in Chenopodiaceae (spinach, sugar beet and halophytes), although glycinebetaine is synthesized and accumulated in several plant families. We tried to find out the glycinebetaine synthesis enzymes in Gramineae, one of the most important crop plants using barley as experimental plant. We succeeded to characterize barley novel colinemonooxygenase (HvCMO) and betaine aldehyde dehydrogenases (HvBADH1 and HvBADH2) and determined the intercellular localization of HvCMO (peroxisome), HvBADH1 (peroxisome) and HvBADH2 (cytosol). These findings are totally unique and different from those of the Chenopodiaceae glycinebetaine synthetic enzymes in chloroplasts. We also studied on a novel glycinebetaine/proline transporter gene expressed in the mestome sheath and lateral root cap cells in barley. This finding suggests that plants have complicated but impressive glycinebetaine long distance transport systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境、植物、ストレス、発現制御、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

アカザ科(ホウレンソウ、サトウダイコン、塩性植物)については、アメリカの Hanson のグループにより、グリシンベタイン (GB) の合成は、葉緑体でコリンからの2段階の酸化反応(葉緑体 Fd-dependent コリンモノオキシゲナーゼ (CMO) とベタインアルデヒド脱水素酵素 (BADH)) で起こることが明らかにされた。すなわち、アカザ科ではGBは葉緑体で合成され、葉緑体の浸透圧調節に関与すると考えられる。

一方、その他の科のグリシンベタイン (GB) 合成経路は全く明らかにされなかった。そこで、申請者らは Hanson のグループと並行して 30 年の長きに渡って、重要な穀物であるイネ科のオオムギ(Hv)の GB 合成経路について、研究を行った。研究を始めた頃は、アカザ科と同じ経路ではないかと考えてきた。

2. 研究の目的

イネ科のオオムギ(Hv)を実験材料として GB 合成経路について、研究を行った。研究を始めた頃は、アカザ科と同じ経路ではないかと考えてきたが、まずオオムギの BADH にはペルオキシソーム型の他にアイソザイムが存在することが判明した。このアイソザイムについて、詳しい研究を行った。さらに、オオムギの CMO については、全く分かっていなかったもので、これを明らかにすることを目的とした。オオムギの CMO と BADH を明らかにできたら、その細胞内局在性と組織発現部位を特定することを目的にした。さらに植物全体の中で、GB の長距離輸送が存在するかについても、GB/proline transporter をクローニングして、解析を行った。

3. 研究の方法

この研究を始める前にオオムギのペルオキシソーム型 BADH をクローニングしていた。そのたんぱく質は免疫ゴールド方により、ペルオキシソームに局在することが判明したのである。この結果は GB はそれまで葉緑体で合成されると考えられていたため、世界を驚かせた。次に、オオムギ BADH タンパク質を精製したところ、BADH にはアイソザイムが存在することが判明した。最初に発見したペルオキシソーム HvBADH を HvBADH1 と名付けた。実は HvBADH1 は量的にマイナーなタンパク質で、メジャーなタンパク質が存在することが判明した。これをクローニングし、HvBADH2 と命名した。GFP 蛍光ラベリング法により、HvBADH2 はサイトソルに局在した。この結果にも驚いた。

次に HvBADH1 と 2 のタンパク質をそれぞれ大腸菌で過剰発現させ、精製しキネティクス解析を行った。HvCMO の遺伝子は、アカザ科の CMO と低い相同性をかろうじて示す遺伝子をクローニングし、その遺伝子とタンパク質を解析した。In situ hybridization や抗体を用いた組織特異性の解析を行った。もっとも重要で、困難だったのは、クローニングした遺伝子の産物が CMO 活性を示すかどうかにあった。

4. 研究成果

オオムギのコリンモノオキシゲナーゼ (HvCMO) 遺伝子のクローニングに成功し、この遺伝子を大腸菌で過剰に発現させ、タンパク質を精製した。そのタンパク質がコリンから BA に変換する酵素活性があるかどうかを調べたところ、確かに CMO であることが判明した。コリンから BA にする本酵素は GFP 蛍光ラベリング法による解析で、ペルオキシソームに局在した。BA はペルオキシソームに存在する親和性の低い HvBADH1 により GB が合成されると考えられる。イネ科では BADH ばかりでなく CMO もペルオキシソームに存在することは、イネ科の GB の合成や役割がアカザ科のそれとは異なることを確信させた。さらに、BA は毒性が高いため微量でもペルオキシソームからサイトソルにあふれた BA は、BA に BADH1 より 1000 倍高い親和性を持つ HvBADH2 により GB になると考えられることを明らかにした。

ペルオキシソーム膜に BA や GB トランスポーターがあれば、イネ科ではサイトソルでの GB の蓄積が重要性が高いと考えられる。しかし、そのような輸送体はまだ発見されていない。現段階では、イネ科では GB はペルオキシソームとサイトソルを守っていると考えている。いずれにしろ、典型的な唯一の研究例となったアカザ科での、葉緑体での GB の働きとは、全く違う結果となった。さらに我々の発見したイネ科の HvCMO と HvBADH タンパク質は若い葉の葉肉細胞と維管束細胞に多く局在し、古い葉には少なかった。GB が若い組織を守っていることをあきらかにした。GB のオオムギにおける輸送機構も明らかにした。すなわち、オオムギから GB トランスポーターをクローニングした。本遺伝子の発現部位を In situ hybridization 法で調べたところ、物質輸送に関与する維管束組織のメストム細胞という機能のまだ判

明していない細胞で発現していることが判明した。この事実はGBの葉から根や古い葉から若い葉への長距離輸送の存在を示唆した。即ち、GBは若い組織で合成され、蓄積されるが、古くなって機能の低下した組織からの輸送もあるものと考えられる。大変理にかなった植物の成長戦略である。GBの輸送に関してはアカザ科でも遺伝子レベルでの研究はなされておらず、大変大きな発見である。また、アカザ科やイネ科以外にもGBを蓄積する他の植物についても現在研究を進め、植物はファミリーにより異なるGB合成・輸送・蓄積システムを持つことを示唆する結果も得ており、今後の研究が期待される。また、GBは、塩ストレスばかりでなく、乾燥ストレス、低温ストレス下でも重要なものであり、さらなる研究が今後も期待される。

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 12件)

① Mitsuya, S., Kozaki, K. and Takabe, Tetsuko (2013) Tissue localization of the glycine betaine biosynthetic enzymes in barley leaves. *Plant Prod. Sci.* 16, 117-122.

② Mitsuya, S., Kuwabara, J., Ozaki, K., Saeki, E., Fujiwara, T. and Takabe, Tetsuko (2011) Isolation and characterization of a novel peroxisomal cholinemonooxidase in barley. *Planta* 234, 1215-1226.

③ Fujiwara, T., Mitsuya, S., Miyake, H., Hattori, T., and Takabe, Tetsuko (2010) Characterization of a novel glycinebetaine transporter gene expressed in the mestome sheath and lateral root cap cells in barley. *Planta* 232, 22-30.

④ 三屋史朗、藤原崇志、服部侑、高倍鉄子 (2010) イネ科植物オオムギの耐塩性機構における巧みな適合溶質グリシンベタイン利用戦略、*化学と生物*、48、478-484.

⑤ Hattori, T., Mitsuya, S., Fujiwara, T., and Takabe, Tetsuko (2009) Tissue specificity of glycinebetaine synthesis in barley. *Plant Sci.* 176, 112-118.

⑥ Mitsuya, S., Yokota, Y., Fujiwara, T. Mori, N. and Takabe, Tetsuko (2009) OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde

oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Lett.*, 583, 3625-3629.

⑦ Ozaki, K., Uchida, A., Takabe, Tomoko, Shinagawa, F., Tanaka, Y., Takabe, Teruhiro, Hayashi, T., Hattori, A., Rai, A. K. and Takabe, Tetsuko (2009) Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment. *J. Plant Physiol.* 166, 569-578.

⑧ Ueda, A., Shi, WM., Shimada, T., Miyake, H. and Takabe, Tetsuko (2008) Altered expression of barley proline transporter causes different growth responses in *Arabidopsis*. *Planta* 227, 277-286.

⑨ Fujiwara, T., Hori, K., Ozaki, K., Yokota, Y., Mitsuya, S., Ichianagi, T., Mori, N., Hattori, T. and Takabe, Tetsuko (2008) Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. *Physiol. Plant.* 134, 22-28.

⑩ Uchida, A., Hibino, T., Shimada, T., Saigusa, M., Takabe, Teruhiro, Araki, E., Kajita, H. and Takabe, Tetsuko (2008) Overexpression of DnaK chaperon from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* increases seed yield in rice and tobacco. *Plant Biotechnology* 25, 141-150.

⑪ Xu, W., Shi, W., Liu, F., Ueda, A. and Takabe, Tetsuko (2008) Mechanism of salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* carrying a peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley. *Pedosphere* 18, 486-495.

⑫ Xu, W., Shi, W., Liu, F., Ueda, A. and Takabe, Tetsuko (2008) Enhanced zinc and cadmium tolerance and accumulation in transgenic *Arabidopsis* plants by constitutively overexpressing a barley gene (*HvAPX1*) that encodes a peroxisomal ascorbate peroxidase. *Botany* 86, 565-575.

[学会発表] (計 7件)

① 三屋史朗、藤原崇志、高倍鉄子：イネのペルオキシソームにおけるベタインアルデヒド脱水素酵素の機能解析、第229回日本作物学会講演会、平成22年3月30日、宇都宮

- ② 藤原崇志、三屋史朗、高倍鉄子： オオムギにおけるベタイン/プロリン輸送体の解析、第51回日本植物生理学会、平成22年3月18日 熊本
- ③ 藤原崇志、三屋史朗、高倍鉄子： オオムギにおけるベタイン/プロリン輸送体の解析、第51回日本植物生理学会、平成22年3月18日 熊本
- ④ 藤原崇志、三屋史朗、高倍鉄子： オオムギにおけるベタイン/プロリン輸送体の解析、第51回日本植物生理学会、平成22年3月18日 熊本
- ⑤ 藤原崇志、三屋史朗、高倍鉄子： オオムギにおけるベタイン/プロリン輸送体の解析、第51回日本植物生理学会、平成22年3月18日 熊本
- ⑥ Mitsuya, S. and Takabe, Tetsuko : Characterization of physiological function of plasma protein 3 in salt tolerance of rice and Arabidopsis plants. 平成21年7月18日 ハワイ Plant Biology 2009.
- ⑦ Fujiwara, T., Mitsuya, S., Hattori, T., and Takabe, Tetsuko: Functional characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenase in barley. 平成21年7月18日 ハワイ Plant Biology 2009.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：

番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
 無

6. 研究組織

(1)研究代表者
 高倍鉄子 (TAKABE TETSUKO)
 名城大学・総合研究所・教授
 研究者番号：60089852

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：