

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05854

研究課題名(和文)植物二次代謝産物の抗酸化活性と生体成分の酸化物

研究課題名(英文)Antioxidative activity of plant secondary metabolites and oxidation of biological components

研究代表者

清水 文一 (SHIMIZU, Bun-ichi)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：50324695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物は生育環境から種々のストレスを受けている。これらのストレスから身を守るために種々のストレス耐性メカニズムを植物は持っていると考えられている。その一つに抗酸化物質の抗酸化活性が挙げられる。この機能がどの生体成分の保護に関わっているのかを明らかにするため、本研究ではスコボレチン生合成能欠損株と野生株シロイヌナズナを用いた。ストレスを受けた植物体内に生じた生体酸化物、核酸、脂肪酸、そしてタンパク質に注目し、それぞれの酸化物を分析定量した。その結果、スコボレチンを蓄積できない植物体ではこれらの成分が野生株に比べより多く蓄積した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで植物の蓄積する抗酸化物質はその抗酸化活性から推測して、酸化ストレスに対する耐性に関わっていると考えられてきた。本研究はシロイヌナズナが蓄積するスコボレチンもしくはその関連物質が、酸化ストレス受容時に実際に核酸や脂肪酸、タンパク質の酸化を抑制していることを示した。本研究で得られた知見は、農作物や自然環境に自生する植物の定量的ストレスモニタリングのための基礎的知見となる。

研究成果の概要(英文)：Plants are subjected to various stresses from their growing environment. Plants are thought to have various stress tolerance mechanisms to protect themselves from these stresses. One of them is the antioxidative activity of antioxidants. In this study, we used scopoletin biosynthesis-deficient mutant and wild-type Arabidopsis to clarify which biocomponents is involved in protecting function by antioxidative activity of scopoletin. We focused on oxides of nucleic acids, fatty acids, and proteins generated in stressed plants. As a result, the plants that cannot accumulate scopoletin accumulated more of these components than the wild-type plants.

研究分野：植物生化学

キーワード：酸化ストレス シロイヌナズナ 抗酸化物質 脂質酸化物 核酸酸化物

## 1. 研究開始当初の背景

植物は光合成や環境から受けるストレスにより細胞内に酸化ストレスが生じている。植物は進化の過程で酸化ストレスに対してさまざまな耐性メカニズムを獲得してきたと考えられている。中でも植物の抗酸化物質は酸化ストレスや病害抵抗性に関与していると考えられてきた。また近年、金属イオンのキレートとしての機能を持つものも注目されている。しかしながら、抗酸化活性そのものに注目した例は少なく、かつその抗酸化活性によって保護される生体分子に関しては不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、抗酸化活性を示す二次代謝産物クマリン化合物などの生合成欠損株(主にシロイヌナズナ)における、膜脂質、タンパク質、核酸に注目し、種々の酸化ストレスを与えたときに生じる、生体分子の酸化物を定量し、二次代謝産物の抗酸化活性により保護される成分の特定を目指す。これらを通して、植物の生産する二次代謝産物の示す抗酸化活性の生理機能の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

シロイヌナズナ野生株および二次代謝産物クマリン化合物生合成欠損株(AtF6'H1)を用いた。栽培したこれらに、種々のストレスを与えた後、植物体から抽出した生体成分酸化物を LC/MS、GC/MS を用いて検出定量した。

注目した生体成分は、タンパク質、脂肪酸、核酸である。

タンパク質の酸化物分析においては、抽出したタンパク質溶液をトリプシン分解した後、ショットガン解析を LCMS にて行った。

核酸酸化物は核酸抽出液をヌクレアーゼ処理およびポスファターゼ処理の後、グアノシン酸化物である 8-oxoOHG を逆相 HPLC、電気化学検出器にて検出した

脂肪酸酸化物オキシリピンは溶媒抽出した組織抽出物をリパーゼ処理した後、UPLC-Q-TOF にて分析した。主に、9-HODE、13-HODE、9-KODE、13-KODE、13-HOTrE に注目した。

## 4. 研究成果

酸化ストレスとして除草剤成分であるパラコート処理をした後の植物体では、種々の酸化物が検出できた。

酸化タンパク質としては最も大きなシグナルを与えたのは、クロロフィル a,b 結合 タンパク質 CP29 であった。野生株においても相当量の蓄積が見られたが、このタンパク質は AtF6'H1 欠損株においては野生株の 1.2 倍程度蓄積が見られた。この他には、RuBisCO 大ユニット、ATP シンターゼ  $\beta$  サブユニットなど葉緑体局在のタンパク質が大きいシグナルを与えた(これらのうち蓄積量の大きいものを表 1 に示した)。これらのタンパク質の酸化は野生株でも見られるため、通常の生育環境でも酸化ストレスを受けやすく、かつ AtF6'H1 欠損によりその酸化がより進んだものと考えられる。このことからスコポレチンもしくはその誘導体はこれらのタンパク質の酸化を抑える仕組みに何らかの関与をしていることが示された。

1	Chlorophyll a-b binding protein 1, chloroplastic
2	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
3	ATP synthase subunit beta, chloroplastic
4	Photosystem II D2 protein
5	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic
6	Photosystem II CP43 reaction center protein
7	Photosystem II 22 kDa protein, chloroplastic
8	Myrosinase 2
9	Glutamate--glyoxylate aminotransferase 1
10	Chlorophyll a-b binding protein 2.1, chloroplastic

表 1 AtF6'H1 欠損株において蓄積量の大きかった酸化を受けたタンパク質（抜粋）

これらタンパク質の局在は、ミロシナーゼと Glutamate--glyoxylate aminotransferase 1 を除き葉緑体局在タンパク質であった。このことは、パラコート処理が葉緑体により大きな酸化ストレスを与えていることを示している。これは、その作用機構からも支持される結果であった。

1	Glutathione S-transferase F7
2	Indole glucosinolate O-methyltransferase 4
3	Glutamate--glyoxylate aminotransferase 2
4	Catalase-2
5	Cytochrome P450 83B1
6	Methionine aminotransferase BCAT4
7	Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 1, mitochondrial
8	Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic
9	Subtilisin-like protease SBT4.1
10	Beta-D-xylosidase 1

表 2 AtF6'H1 欠損株において野生株で酸化の見られなかったタンパク質（抜粋）

一方、検出されたシグナルの比に注目して酸化されたタンパク質を調べたところ、葉緑体だけでなく、ペルオキシソームやミトコンドリア、サイトゾル局在のタンパク質が確認された。これらのタンパク質は野生株では検出されなかったもので、AtF6'H1 欠損とパラコート処理により誘導されたものと考えられた。

以上の結果より、AtF6'H1 欠損株ではパラコート処理により葉緑体にとどまらず、ペルオキシソーム、ミトコンドリア、サイトゾルなどで、酸化ストレスがタンパク質に対して生じていることが示された。

ストレス処理後の 8-oxoOHG 内生量は比較的 low、定量には 0.5 g 新鮮重程度の組織を要した。変異株と野生株の比較では、変異株ではより多くの蓄積を認めたことから、核内においても何らかの酸化ストレスが生じていること、および抗酸化物質によってそのストレスが軽減されていることが示された。現在のところ、定量性に問題が残るため、今後より感度の高い検出および定

量法を確立する必要がある。

オキシリピン類の検出においてはこれまでの分析法に加えて、2-メトキシエチレングリコール（2MEE）を添加剤としてカラム分離後に加えることで、ESI法においてオキシリピン類の検出感度を3-4倍程度向上させることができた（図1）。これは陰イオンモードで検出する際のギ酸によるイオンサプレッションの軽減によるものと考えられた。この結果は、オキシリピン類のより高感度な定量を実現するものである。

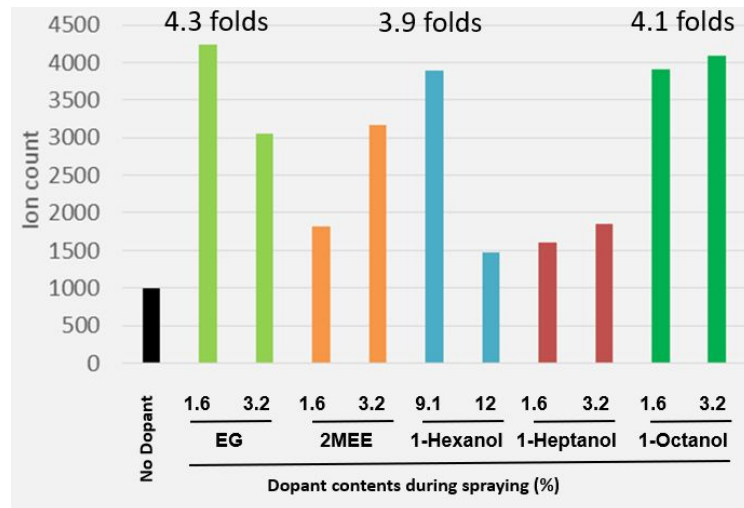


図1 添加剤の添加濃度とイオンカウント（9-HODE）

この方法にて、検出定量を進めたところ、欠損変異株において、野生株に比べ約2倍程度の9-HODEが蓄積することがわかった。その他のオキシリピンに関しても同様の傾向を示した。このことから、膜に生じる酸化ストレスにおいてもスコボレチンはその抑制効果を示すことがわかった。これらの脂質酸化物はストレス処理後、3日後に最大値を示し、その後、処理前のレベルに戻った。これは植物体内で膜脂質の更新が進み回復したことを示している。したがって、スコボレチンは初期の酸化ストレスを軽減することに関わっていると思われる。

本研究で得られた知見は、植物のストレス診断に、生体酸化物の蓄積量を用いることができることを示している。例えば、圃場に生育している作物のストレス診断とストイレスに対応した対処などの新たな栽培法開発のための基礎的知見になると期待できる。タンパク質の酸化物検索においては、光合成関連の葉緑体タンパク質に激しい酸化ストレスが生じており、*AtF6'HI*欠損による影響をこれらのタンパク質に限って進める必要がある。本研究は、植物の抗酸化物質の生理機能として、生体分子の酸化反応の抑制を実験的に示した。しかしながらそのメカニズムには不明な点が残されている。例えば、*AtF6'HI*遺伝子以外に植物が本来備えている、カタラーゼやグルタチオン酸化還元維持、スーパーオキシドジスムターゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼと、本遺伝子との関連などを検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 De Silva Devarahandhi Achini Melda, Jeewanthi Renda Kankanamge Chaturika, Rajapaksha Rajapakshage Heshani Navoda, Weddagala Weddagala Mudiyanseelage Tharaka Bilindu, Hirotsu Naoki, Shimizu Bun-ichi, Munasinghe Munasinghe Arachchige Jagath Priyantha	4. 巻 16
2. 論文標題 Clean vs dirty labels: Transparency and authenticity of the labels of Ceylon cinnamon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0260474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Haruhiko Taneda, Kenich Yazaki, Tokiyoshi Hiramatsu, Bunnichi Shimizu, Daisuke Sugiura, Yoshiyuki Miyazawa	4. 巻 35
2. 論文標題 A simple method to observe water distribution in tracheid-bearing wood of subalpine conifer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trees	6. 最初と最後の頁 697-707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00468-020-02070-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野雄, 柏田隼佑, 正木怜也, 種子田春彦, 清水文一
2. 発表標題 シラビソ ( <i>Abies veitchii</i> ) のクチクラアルカンに対する生育環境の影響
3. 学会等名 第65回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関口 茉樹, 清水 文一
2. 発表標題 クマリン骨格形成鍵酵素の基質認識における構造活性相関
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------