

機関番号：33910
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21710217
 研究課題名 (和文) ハエトリソウ捕虫運動に見られる「記憶」現象に関与する「記憶物質」の化学的研究
 研究課題名 (英文) Chemical study on the “memory” phenomenon in the insectivorous plant, the Venus flytrap
 研究代表者
 岡田 正弘 (OKADA MASAHIRO) 中部大学・応用生物学部・講師
 研究者番号：40377792

研究成果の概要 (和文)：

ハエトリソウの捕虫運動は、葉の内側にある感覚毛への2回の刺激によって初めて引き起こされる。言い換えれば、ハエトリソウは1回目の刺激を覚えている。このハエトリソウの捕虫運動時に見られる「記憶」現象が「記憶物質」の段階的な蓄積により引き起こされると考え、ハエトリソウ捕虫運動に関与する「記憶物質」の探索を行った。ハエトリソウクローンを用いた生物検定法を指標にハエトリソウに含まれる低分子配糖体を精製し、構造を決定した。

研究成果の概要 (英文)：

“Memory” has been observed in the leaf closure of the insectivorous Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). The rapid closure of the traps requires two stimuli within 30 s on the sensory hairs of their internal surface. We found that *Dionaea* has two endogenous chemical factors that induce the closure of traps without stimuli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：天然物有機化学

1. 研究開始当初の背景

ハエトリソウ (*Dionaea muscipula*) は、分類学的に近縁種が存在しない食虫植物であり、その名の通り2枚の捕虫葉でハエなどを捕らえる素早い運動が最大の特徴である。19世紀の末には、進化論で有名なダーウィンもその特異な生態についての研究を行い、晩年には食虫植物について著書を出版し、その中でハエトリソウのことを世界で最も不思議

な植物と称している。また同時期に、バードン-サンダーソンの研究により、捕虫運動時に活動電位の発生が確認され、高等動物と類似の神経伝達機構が存在する可能性が提唱されている。以来、主として生理学者による電気生理学的研究が行なわれており、この運動がカルシウムチャンネルを介していることが示されたが、現在に至るまでその詳細は解明されていない。

一方で、この捕虫運動には大変興味深い現象が見られる。それは、この閉葉運動が、捕虫葉にある感覚毛に2回の刺激を受けた際に引き起こされ、1回の刺激では決して葉が閉じないという現象である。これは、ハエトリソウは1度目と2度目の刺激を明確に区別することができるということを示しており、言い換えればハエトリソウは1度目の刺激を覚えていることになる。

有機化学的な視点からこの現象に着目してみれば、この現象は内生の生理活性物質が段階的に放出され、2度目の刺激によりその生体内濃度が閾値を超えることで、活動電位の発生とともに捕虫運動が引き起こされる、すなわちハエトリソウの「記憶」は化学物質の段階的な蓄積によって制御されていると考えることもできる。化学物質の蓄積によって活動電位が発生する現象は高等動物の神経伝達や記憶にも見られる現象である。もし、独自の進化を遂げたハエトリソウ捕虫運動時に見られる「記憶」現象が、神経伝達物質様の化学物質によって制御されているのならば、高等動物の神経伝達や記憶と酷似するため、「記憶」現象のプロトタイプであることになる。

2. 研究の目的

既に市販のハエトリソウ捕虫葉抽出物中に接触刺激がなくても閉葉運動を引き起こす物質が存在すること、遺伝的に均等なハエトリソウのクローンを用いて生物検定を行うことで再現性を向上できることを示し。さらに、ハエトリソウの捕虫葉の抽出液中から、ハエトリソウのクローンの葉を接触刺激をすることなく、閉じさせることのできる高分子活性物質 (α -キシロピラノシド、 α -アラビノフラノシド、 α -ガラクトピラノシドを1:1:1の比率で含む新規多糖)、及び、低分子活性物質 (β -グルコピラノシドを有する配糖体) の2種類の「記憶物質」候補の存在を明らかにした。しかしながら、分離したこれらの量が極微量であったことから、これらの構造の完全解明には至っていない。

そこで申請者は、本研究において、これらの「記憶物質」の単離、構造決定を目的として研究を行うこととした。さらに、この「記憶物質」によってハエトリソウに活動電位が発生することを明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

まず、「記憶物質」探索の指標には、ハエトリソウそのものを用いた生物検定法を行った。しかしながら、市販のハエトリソウを用いた場合では個体差によるばらつきが大きい為、遺伝的に均一なクローンを用いることで個体差によるばらつきを抑え、再現性を向上させた。すなわち、無菌栽培したハエトリソウを株分けによって3か月ごとに継代することで、クローンを大量培養し、こうして得られたハエトリソウクローンを葉柄基部より切断後、いったん閉葉させ、1日後、完全に葉が開いた葉柄のみを用いて、検定サンプル 20 マイクロリットルを、切断部から吸わせることにより、刺激を与えなくても閉葉運動を引き起こさせた。

この生物検定法を指標に「記憶物質」の探索を行った。まず、約800鉢のハエトリソウを購入し、その捕虫葉を採集し、低温下10%メタノール水溶液で抽出した。続いて各種有機溶媒による分配により活性物質を含む水可溶成分を得た。これを限外濾過によって分画した。これらのうち、分子量3,000以下の低分子画分について精製を行った。

まず、TOYOPEARLを用いたゲルろ過クロマトグラフィー精製を行った。続いてODSを用いた中圧逆相クロマトグラフィーによる段階的溶出を行った。さらにODSを用いたHPLC精製を2回行い、活性物質を単離した。

続いて構造決定を行った。得られた活性物質は極微量であったが、理化学研究所の協力を得て、コールドプローブを装備した800 MHz NMRを用いて各種測定を行った。

また、各精製過程において、活性強度があまりあがらず、特に最終段階においては活性が弱くなってしまいうという現象が見られたため、この原因を解明するために各段階にお

けるカチオン量を測定することにした。測定にはキャピラリー電気泳動を用いた。最後には各種カウンターカチオンを変化させた活性物質を調製し、それぞれの活性を調べた。

4. 研究成果

ハエトリソウクロンを用いた生物検定法を指標に「記憶物質」の探索を行ったところ、水可溶成分にのみ顕著な閉葉活性が認められ、さらに分子量による分画後では、3,000以下の低分子画分と、3,000~10,000の高分子画分にそれぞれ閉葉活性が認められたが、分子量3,000以下の低分子画分が最も強い活性を示したため、分子量3,000以下の低分子画分についての精製を行った。

まず、TOYOPEARLを用いたゲルろ過クロマトグラフィー精製を行い、5 g/Lで活性を示す低分子画分4を得た。続いてODSを用いた中圧逆相クロマトグラフィーによる段階的溶出を行い、1 g/Lで活性を示す30%溶出活性画分を得た。さらにODSを用いたHPLC精製により、0.1 g/Lで活性を示す活性画分を得た。最後に溶媒条件を変えて再びHPLC精製を行い、活性は、0.3 g/Lと弱くなったもの高純度で活性物質を80 µg単離できた。(図1)。

得られた活性物質は極微量であったが、コールドプローブを装備した800 MHz NMRを用いて各種測定を行うことにより各スペクトルデータが満足のいく感度で得られたため構造決定を行うことができた(図2)。

また、キャピラリー電気泳動を用いた金属カチオン測定により、精製効率の悪い精製過程においては金属カチオン含有量が大幅に減少するという結果が得られ、活性が金属カチオンに大きく依存するということが示唆された。そこで、実際に活性物質のカウンターカチオンの種類による活性の変化を調べたところ、遊離カルボン酸の場合は最終精製物とほぼ同等の活性を示す一方、ナトリウム塩の場合は約10倍に、カリウム塩の場合は約100倍の活性を示し、カウンターカチオンの種類によって活性が大きく変化すると

いう興味深い結果が得られた。この原因については今の所よくわかっていないが、これらの結果から、もともとこの低分子「記憶」物質は植物体内においてカリウム塩の状態で存在しているのではないかと考えられた。

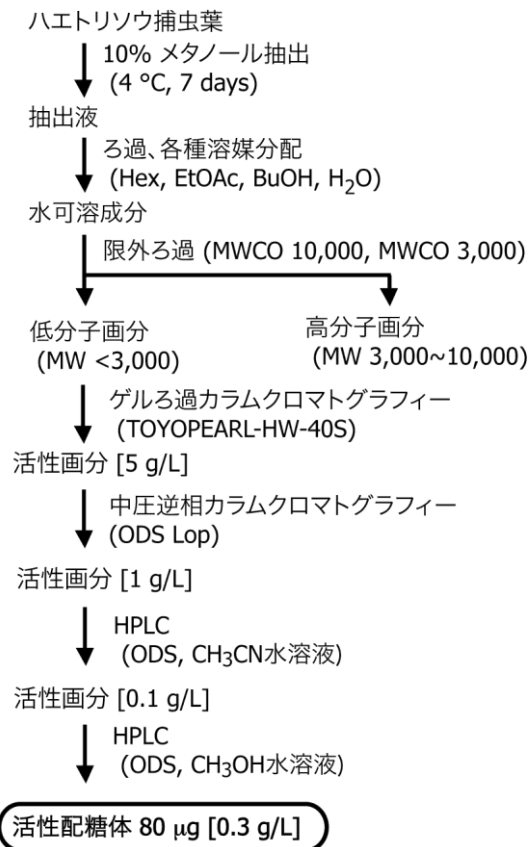
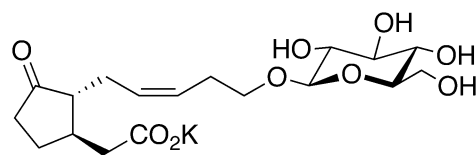


図1. ハエトリソウ活性物質の精製スキーム。カギカッコ内にある数値は活性濃度を示している。



Leaf-closing factor 1

図2. ハエトリソウ低分子「記憶」物質の化学構造。

さらに化学構造の類似性と活性の比較を行うために様々な類縁化合物についての閉葉活性を調べた。その結果、今回得られた低分子「記憶」物質の閉葉活性には糖部分が活性

発現に重要であることが判明した。また、鏡像体には閉葉活性が無く、この現象は、タンパク質を介した立体化学構造の認識を伴う運動であることが明らかとなった (図3)。

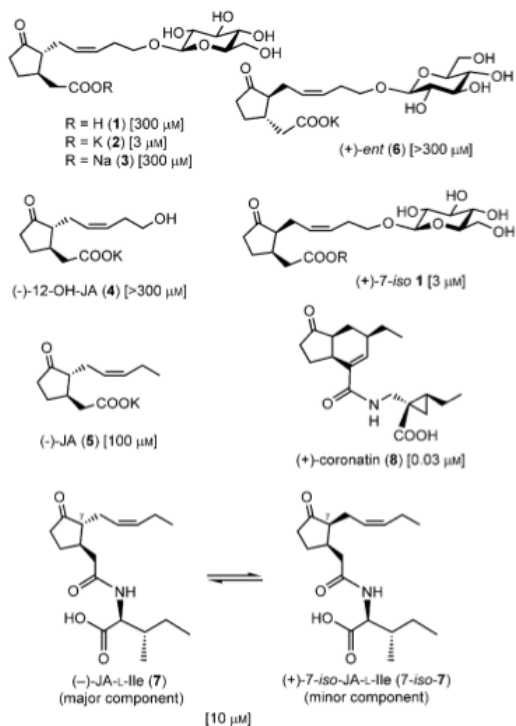


図3. 低分子「記憶」物質の構造類縁体と閉葉活性の相関。

今後は、すでに明らかとなっている高分子多糖 (図4) と、今回明らかとなった低分子配糖体の2種類の「記憶物質」候補の関係について明らかにする必要がある。また、それぞれの活性物質の内生量の変化と捕虫運動の相関関係を分析することで両物質の段階的蓄積がハエトリソウの「記憶」の正体であることを証明することが必要であると考えられる。

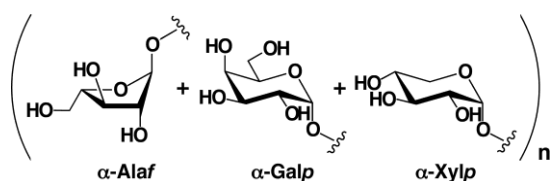


図4. ハエトリソウ高分子「記憶物質」の部分構造。
高分子活性多糖 (α -キシロピラノシド、 α -アラビノフラノシド、 α -ガラクトピラノシドを 1:1:1 の比率で含む新規多糖) の化学

構造

以上のようにして、ハエトリソウの閉葉運動に見られる「記憶」現象が、従来のハエトリソウの運動研究とは一線を画した新しく有機化学的な視点から、内生化学物質の段階的蓄積によると考え (図5)、そのチャネルの開閉に関わる生理活性物質を探索した結果、低分子配糖体の単離・構造決定を行うことができた。

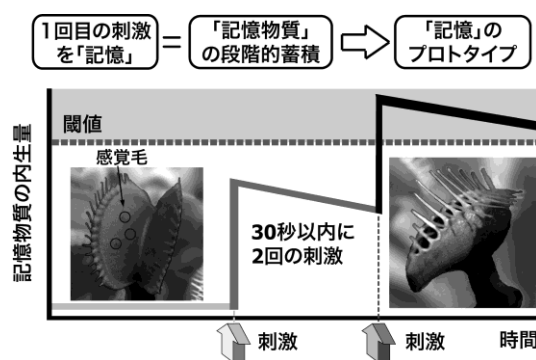


図5. ハエトリソウの「記憶」現象のメカニズム。

ハエトリソウは刺激によって「記憶物質」が蓄積され、2度目の刺激によりその内生量が閾値を超えるために葉が閉じる。

今後、内生量の変化と葉の開閉運動に相関が見られれば、一世紀以上もの間、謎であったハエトリソウの捕虫運動と記憶現象を分子レベルで解明したことになり、学術的にも大きなインパクトを与える研究となるであろう。

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1件)

Minoru Ueda, Takashi Tokunaga, Masahiro Okada, Yoko Nakamura, Noboru Takada, Rie Suzuki, Katsuhiko Kondo. Trap-Closing Chemical Factors of the Venus Flytrap (*Dionaea muscipulla* Ellis), *ChemBioChem*, Volume 11, Issue 17, pages 2378-2383, November 22, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計1件)

岡田正弘、日本農芸化学会 東北支部・北海道支部 合同支部大会 (東北支部第145回大会)、仙台、平成22年9月27日

6. 研究組織

研究代表者

岡田 正弘 (OKADA MASAHIRO)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：40377792