

機関番号 : 11301

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21780087

研究課題名 (和文) 植物の高温耐性機構の解明と高機能生体防御分子の探索

研究課題名 (英文) Analysis of high-temperature tolerance mechanism and exploration of functional molecule(s) in heat response of higher plant

研究代表者

高橋 芳弘 (TAKAHASHI YOSHIHIRO)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号 : 20390891

研究成果の概要 (和文) :

ポリアミンは、植物の生理過程に必須の機能分子であるばかりでなく、様々な環境ストレス応答にも関与することが示唆されている。本研究では、植物の高温耐性機構にポリアミンの一種であるスペルミンが重要な役割を果たすことを明らかとした。また、植物の主要テトラアミンであるスペルミンとサーモスペルミンの分離定量法を確立すると共に、スペルミンの分解に関与するポリアミン酸化酵素の特徴付けを行った。

研究成果の概要 (英文) :

Polyamine is important for various physiological processes as well as several environmental stress responses in plant. In this study, I demonstrated that one of the polyamine, spermine, is involved in high-temperature tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Moreover, I established a quantification method of the two tetraamine, spermine and thermospermine, and also performed characterization of polyamine oxidases in *Arabidopsis*.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 : 農学

科研費の分科・細目 : 農芸化学・応用生物化学

キーワード : 植物生化学

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは第 1 級アミノ基を 2 つ以上持つ脂肪族炭化水素の総称であるが、植物において主要な成分はジアミンのプトレッシ

ン、トリアミンのスペルミジン、そしてテトラアミンのスペルミンである。また、近年スペルミンの構造異性体であるサーモスペルミンが植物の主要ポリアミンの一つとして同定された。これらのポリアミンは、植物の

胚発生、細胞分裂、形態形成、花器官の発育促進など、様々な生理過程に関与していることが知られているが、そればかりでなく、様々な環境ストレスに曝されると生体内ポリアミン濃度が急激に変動することが知られている。また、ポリアミン合成系の酵素遺伝子を過剰発現した植物は、こうした環境ストレスに対して強い耐性を示すことから、ポリアミンは生体防御にも深く関わることが示唆されている。しかし、ストレス耐性機構におけるポリアミンの作用点や耐性メカニズムに関しては全く明らかとされていない。そこで本研究では、将来懸念されている地球温暖化による植物の高温ストレスを少しでも軽減すべく、植物の高温耐性機構におけるポリアミンの役割に着目した。

2. 研究の目的

源泉などの高温特殊環境に生育する高度好熱菌は、スペルミンよりも長鎖型のポリアミンや分岐型ポリアミンを保持しており、こうした高温特殊環境で生育するためには、これらのポリアミンが必須であることが示唆されている。また、至適生育温度が少し低い中度好熱菌は、上記のような特殊ポリアミン類は保持していないものの、スペルミンを豊富に生産している。そのため、ポリアミンは高温に対する細胞の保護機能に富む分子であり、その機能は長さに比例して高くなると推察し、植物における主要ポリアミンの中では最も長鎖ポリアミンであるテトラアミンの生体内量を制御することで高温ストレスを軽減できる可能性を推察した。そこで本研究では、高温ストレス耐性機構におけるポリアミンの役割を明確化すると共に、高温ストレス耐性植物体作出へ向けた分子基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料および遺伝子発現解析

実験にはシロイヌナズナ植物を用いた。遺伝子発現解析では、シロイヌナズナ植物体から抽出したRNAを用いて、ノーザンハイブリダイゼーション法、もしくはqRT-PCR法により発現遺伝子量を定量した。

(2) 生体内ポリアミン測定法

5%過塩素酸にて抽出したポリアミン抽出物、もしくは標準溶液をアルカリ条件下で

ベンゾイル化し、ベンゾイル化ポリアミンをジエチルエーテルによって回収・濃縮後、HPLC解析に供した。ベンゾイルポリアミンは4%アセトニトリル溶液下、ODSカラムで分離し、254 nmを計測した。

(3) 酵素化学的解析

ポリアミン酸化酵素遺伝子をタンパク質発現ベクターにクローニングし、大腸菌BL21株を用いてタンパク質発現後、発現タンパク質をニッケルカラムで精製し、酵素化学的実験に供した。基質特異性の解析では、ポリアミン分解の副産物として生じる過酸化水素量を定量化した。

(4) その他

その他、それぞれの特徴にあわせた機能解析を、生物検定や分子生物学的手法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) ポリアミン合成酵素遺伝子群の高温応答性

多くの植物では、ポリアミンはアルギニンもしくはオルニチンから合成されるが、モデル植物シロイヌナズナを含むアブラナ科植物では、オルニチンを介した合成経路が欠損している。しかし、シロイヌナズナはポリアミン合成経路に関わる酵素遺伝子群が明らかとされており(図1左)、様々な変異体を利用出来るメリットがある。そこで本研究ではシロイヌナズナを研究材料として用いた。まず、ポリアミン合成酵素遺伝子群の高温応答性を調査するため、シロイヌナズナを高温処理した際のサンプルを用いてそれぞれの遺伝子発現量を解析した結果、スペルミン合成酵素遺伝子 *SPMS* のみが、高温処理の早い段階から強い応答性を示した。また、スペルミジン合成酵素遺伝子である *SPDS1* と *SPDS2* は高温処理後期過程においての誘導が確認された。

これらの結果から、シロイヌナズナは高温を感知すると生体内主要ポリアミンの中では最も長鎖型のポリアミンであるスペルミン合成を盛んに行い、その後、スペルミン合成の基質となることで減少したスペルミジン量を補っていることが推察された。

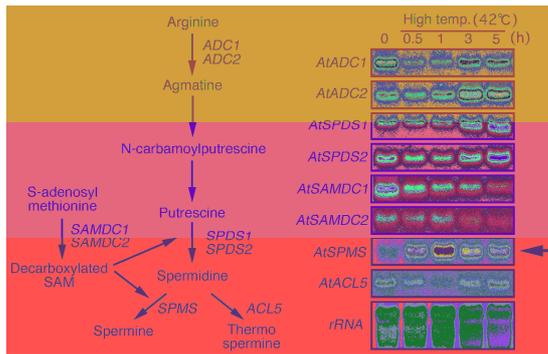


図1. シロイヌナズナのポリアミン合成経路及び合成に関与する遺伝子群 (左) と、シロイヌナズナを高温処理 (42°C) した際の遺伝子発現量の変化 (右)。矢印は、スペルミン合成酵素遺伝子発現量を示している。

(2) 生体内ポリアミン量の変化

上記結果をうけ、シロイヌナズナ植物体におけるポリアミン量の経時的変化の測定を試みた。通常のポリアミンの定量には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる。しかし近年、スペルミンの構造異性体であるサーモスペルミンが植物の主要ポリアミンの一つとして同定されたが、サーモスペルミンを HPLC によって分離定量する測定法が確立されていなかった。そこでまず、生体内ポリアミン量、特に、植物中の主要テトラアミンを正確に測定する技術確立を目指し、分離溶液やカラムを検討し、サーモスペルミンとスペルミンを正確に測定する条件を確立した (図2及び発表論文文献②)。次に、この条件を用いて、高温条件下でのシロイヌナズナのポリアミン蓄積量を計測した結果、高温処理によってスペルミンは顕著に蓄積するものの、サーモスペルミン蓄積量にはあまり変化が無いことが示された。

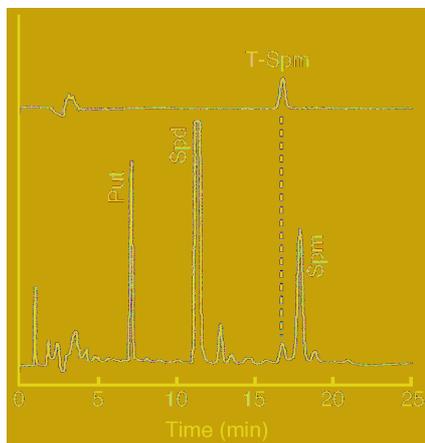


図2. HPLCによるスペルミンとサーモスペルミンの分離。上チャート：サーモスペルミンのスタンダード。下チャート：シロイヌナズナ植物体から抽出したポリアミン。Put: プトレッシン、Spd: スペルミジン、T-Spm: サーモスペルミン、Spm: スペルミン。

(3) 高温耐性機構におけるスペルミンの役割

スペルミンがシロイヌナズナ植物体の高温耐性能獲得に重要である可能性を、スペルミン合成酵素遺伝子過剰発現植物体 (スペルミン高蓄積植物体) を用いて調査した結果、野生型と比較して強い高温耐性能を示した。さらに、スペルミン合成酵素遺伝子欠損変異体 (スペルミンを生産出来ない変異体) では、野生型と比較して、高温耐性能が欠損していることが明らかとなった。(本研究項目を含む高温耐性機構に関する結果は学会発表①において発表しており、現在投稿論文準備中である。)

(4) ポリアミン酸化酵素の特徴付け

スペルミン高蓄積植物体作出には、スペルミン合成系を高めつつ、スペルミン分解系を抑えることが重要である。しかし、ポリアミン分解経路は合成経路に比較して不明な点が多い。そこで次に、ポリアミン分解経路に着目し、スペルミン分解に関わるポリアミン酸化酵素の特徴付けを行った。

シロイヌナズナ植物体には、全部で5種類のポリアミン酸化酵素遺伝子 (PA01~PA05) が存在する。それぞれの酵素遺伝子を単離し、大腸菌を用いたタンパク質発現系を用いて酵素を調製した。その結果、PA01~PA04のタンパク質が単離できたため、これらのタンパク質を用いて基質特異性の検討を行った。PA01はサーモスペルミンに対して、PA02及びPA03はスペルミジンに対して、そして、PA04はスペルミンに対して高い基質特異性を保持していることが示された (図3)。さらに、遺伝子発現量やプロモーター::GUS植物を用いた発現部位の解析から、スペルミン分解に積極的に関わるポリアミン酸化酵素としてPA04を同定した (発表論文文献①)。

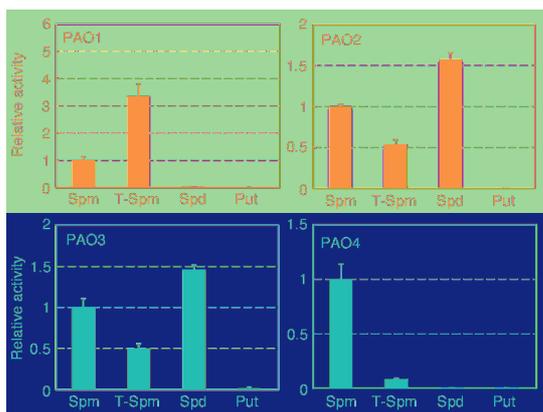


図3. ポリアミン酸化酵素の基質特異性。ポリアミン分解時に生じる過酸化水素量を定量し、スペルミンに対する活性を1とした際の相対値にて示している。

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2件)

① Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G.H.M., Niitsu, M., Berberich, T. and Kusano, T. Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep. 査読有, (2010) 29, 955-965.

② Naka, Y., Watanabe, K., Sagor, G.H.M., Niitsu, M., Pillai, M.A., Kusano, T. and Takahashi, Y. Quantitative analysis of plant polyamines including thermospermine during growth and salinity stress. Plant Physiol. Biochem. 査読有, (2010) 48, 527-533.

[学会発表] (計4件)

① Sagor GHM, 新津勝, 草野友延, 高橋芳弘. シロイヌナズナにおける熱ショックストレスに対するスペルミンの防御的役割. 日本ポリアミン学会第2回年会 2011年1月27~28日 帝京大学

② Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G.H.M., Niitsu, M., Berberich, T. and Kusano, T. Molecular biological and biochemical characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. 2010 国際ポリアミン会議 2010年6月14~

18日 静岡県御殿場高原リゾート時の栖

③ 渡邊佳奈子, 仲友紀恵, Sagor GHM, 新津勝, Pillai MA, 草野友延, 高橋芳弘. サーマスペルミンの植物からの定量的検出法. 日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会 2010年3月27~30日 東京大学

④ 仲友紀恵, 渡邊佳奈子, Sagor GHM, 新津勝, Pillai MA, 草野友延, 高橋芳弘. 二つのテトラアミン異性体であるスペルミンとサーモスペルミンのHPLCによる定量分析法の確立. 植物化学調節学会第44回大会 2009年10月29~30日 東北大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/outou/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 芳弘 (TAKAHASHI YOSHIHIRO)
 東北大学・大学院生命科学研究所・准教授
 研究者番号: 20390891