

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 5 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510226

研究課題名（和文） 植物のNAD関連代謝とその生理学的意義

研究課題名（英文） NAD-related Metabolism and its Physiological Significance

研究代表者

芦原 坦 (ASHIHARA HIROSHI)

お茶の水女子大学・名誉教授

研究者番号：00017211

研究成果の概要（和文）：高等植物におけるピリジンヌクレオチド代謝と関連二次代謝について調べた。今回の研究から、植物に特有な7つの代謝物で構成されるピリジンヌクレオチドサイクルと2つのバイパス酵素が明らかにされた。ニコチン酸グルコシドの生合成は、シダ植物と一部の被子植物でのみ見られたが、トリゴネリンの生合成は、これら以外の多くの植物で見られた。ニコチン酸グルコシドのピリジン環はグルタル酸を中間産物とする他の生物にはみられない異化経路により分解された。ピリジン抱合体生成の生理学的意義について考察した。

研究成果の概要（英文）：The metabolism of pyridine nucleotides and related secondary metabolites in higher plants were investigated. A plant specific seven-membered pyridine nucleotide cycle and two bypass enzymes were discovered during the course of the study. Nicotinic acid glucoside formation was restricted to ferns and selected orders of angiosperms, whereas other plants synthesized trigonelline. The pyridine ring of nicotinic acid glucoside was degraded by a novel pathway which involved glutaric acid as an intermediate. The physiological function of pyridine conjugates formation is discussed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：植物・生化学・代謝経路・生合成・分解・酵素・細胞組織

1. 研究開始当初の背景

| ピリジンヌクレオチド（NADやNADP）は、補酵

素として必須の物質であるが、この生合成経路や、分解、再利用（サルベージ）経路は生物種により異なっている。研究の進展している微生物や哺乳動物に比べ植物における研究は極めて少ない。ピリジンヌクレオチドは、新生 (*De novo*) 経路によりキノリン酸を経て合成される。生成されたヌクレオチドが分解されると、ニコチンアミドやニコチン酸が生じるが、これは、いわゆるサルベージ経路により NAD(P) の再生に使われる。この分解、再生の過程は、ピリジンピリジンヌクレオチドサイクル (PNC) と呼ばれる。PNC は、構成される酵素の数で分類され、PNC III や PNC IV が哺乳類の肝臓や、大腸菌で機能していることが報告されている。植物では、PNC VI が機能していることが推論されていた (Wagner と Backer, 1992)。研究開始当初までに、著者らの研究から、これとは異なるサイクルがあることが示唆されていた (Ashihara ら, 2005)。また、植物には、ピリジンヌクレオチドから合成される二次代謝産物があるが、これらの研究もあまり行われていなかった。

2. 研究の目的

植物に見られるピリジン代謝、つまり、ピリジンヌクレオチドの生合成経路、分解経路、サルベージ経路と、これから派生するニコチン酸抱合体 (ピリジンアルカロイド) を調べる。さらに、植物におけるこれらの経路の多様性について検討し、ピリジンヌクレオチド代謝の調節機構、ピリジンアルカロイドの生理学的意義について考察することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ピリジンヌクレオチド代謝経路の解明
ピリジンヌクレオチドサイクルやピリジン抱合体の生合成経路を明らかにするために、標識化合物を植物組織あるいは細胞に投与して、その代謝を調べた。用いたものは、 ^{14}C および ^3H で特定の原子を標識した化合物 (ニコチン酸、ニコチンアミド、キノリン酸 など) である。植物体から、代謝物を過塩素酸可溶性分画と不溶性分画に分離し、可溶性分画は、中和、濃縮後、薄層クロマトグラフィー (TLC) により、 ^{14}C -標識代謝物を分離し、バイオイメージング・アナライザーで放射能の分布を調べた。物質の同定は、さらに、高速液体クロマトグラフィー・ライジオアナライザーで行った。適宜、パルス・チェイス実験、明・暗条件、投与物質の量の効果などの実験

を加え、それぞれの植物種、器官による特異性などを考慮しながら、代謝経路を特定した。

(2) 関連酵素の活性の検出

植物材料から、酵素標品を得て、代謝経路を構成する酵素活性を *in vitro* で確認した。粗酵素標品中には、液胞などに由来する非特異的な分解酵素なども混在するので、部分的精製や ATP 再生システムを導入するなど注意深い対応が必要であった。従来、報告されている酵素の他に、キナーゼやデアミナーゼなどの反応が理論上考えられたので、これらが実在するかどうか調べた。

(3) 代謝物の定量分析

植物に含まれる代謝物は、過塩素酸、メタノール、熱水などを用いて抽出し、高速液体クロマトグラフィー・ダイオードアレイ検出システムで行った。

(4) 代謝物の生長への影響

トリゴネリン、ニコチンアミドなどを、植物体 (芽生えなど) に投与して、各器官への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 植物のピリジンヌクレオチドサイクルの解明

本研究では、植物におけるピリジンヌクレオチドの *De novo* 生合成、分解、サルベージ経路からなるピリジンヌクレオチドサイクルについて、シロイヌナズナ、イネ、ミヤコグサなどのモデル植物のほか、生化学的研究がやりやすいジャガイモの塊茎や葉、チャ葉、ミトリササゲ発芽種子などを用いて検討した。植物のピリジンヌクレオチドサイクルの最も一般的なものは、7つの代謝物からなる PNC VII である。この経路は、NAD → ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) → ニコチンアミドリボシド (NR) → ニコチンアミド → ニコチン酸 → ニコチン酸モノヌクレオチド (NaMN) → ニコチン酸アデニンジヌクレオチド (NaAD) → NAD である (図 1)。今回の一連の研究から、一部の植物、器官には、これ以外にも、NR デアミナーゼによる NR → ニコチン酸リボシド (NaR)、NaR キナーゼによる NaR → NaMN の反応があることが示され、いくつかのバイパスもあることが明らかになった。植物の主要なピリジンヌクレオチドサイクルとそのバイパス反応は、哺乳類で報告されているものとは異なっており、植物に特有なものであると考えられる。

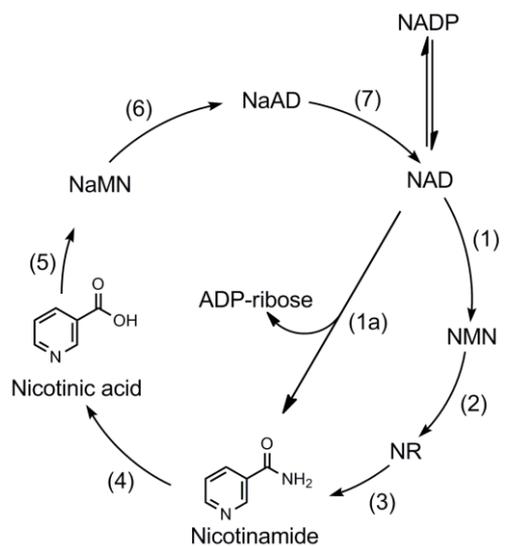


図 1. 植物のピリジンヌクレオチドサイクル

(2) ニコチン酸抱合体の合成

植物では、ニコチンアミドは、動物には存在しないニコチンアミダーゼにより、ニコチン酸になる。ニコチン酸は、サルベージ酵素により NaMN になり NAD 合成に使われるほか、ニコチン酸抱合体であるトリゴネリンとニコチン酸グルコシドになる (図 2)。¹⁴C-代謝実験から、投与したニコチンアミドは、植物体内でニコチン酸になり、直ちにトリゴネリンあるいはニコチン酸グルコシドに変換されることが示された。生成されるニコチン酸抱合体の種類は生物種や器官に特異的であった。たとえば、イネ、ミヤコグサではトリゴネリンが、シロイヌナズナではニコチン酸グルコシドが合成される。ジャガイモでは、塊茎ではニコチン酸グルコシドのみが生成されるが、葉ではトリゴネリンが合成される。これは、合成酵素活性のちがいであることが示された。

(3) 植物種によるニコチン酸抱合体合成の多様性

ニコチン酸代謝の多様性を見るために、58種の植物の葉の切片を使い¹⁴C-ニコチンアミドの代謝を調べた。すべての植物で、ニコチン酸抱合体合成が見られた。例外はあるものの、ニコチン酸グルコシドをつくる植物は、シダとキク亜綱以降の双子葉植物で多く見られた。マツバラからヤブソテツまで、10種のシダのすべてで、ニコチン酸グルコシドが合成された。一方、裸子植物では、両者が合成されるソテツ以外では、トリゴネリンが合成された。単子葉植物は、コミノクロツグ以外

はトリゴネリンがつけられた。双子葉植物では、39種中25種でトリゴネリンが、12種がニコチン酸グルコシドをつくった。どちらをつくるかの系統的境界は、例外もあるがマメ目とアブラナ目の間にあった。すべての植物で、抱合体合成能はあるが、これらの物質の蓄積は数種の植物に限られていた。

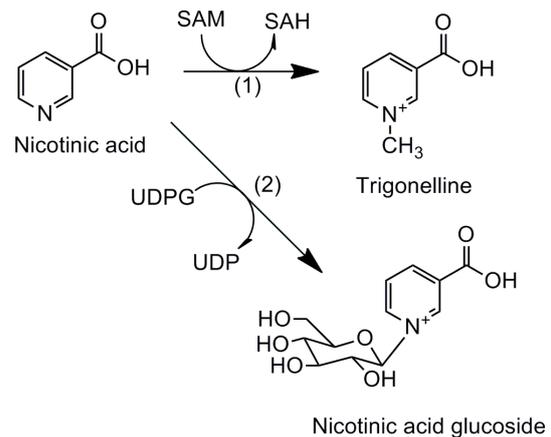


図 2. ニコチン酸抱合体の生合成

(4) ニコチン酸抱合体生合成の意義

トリゴネリンが、コーヒーやマメ科植物に蓄積することは知られていたが、蓄積しない植物にも、トリゴネリンあるいはニコチン酸グルコシドの生合成活性は検出された。ミトリスサゲの種子を、1 mM ニコチン酸、ニコチンアミドを含む寒天培地で発芽させると、芽生えの根の成長が著しく阻害されたが、トリゴネリンには阻害効果がなかった。これらの結果から、ニコチン酸抱合体生成の役割のひとつは、ピリジンヌクレオチドサイクルで生じたニコチン酸がサルベージされて NAD 合成に使われる量よりも過剰に作られた場合に生じる成長への阻害を除去すること、いわゆる解毒作用ではないかと思われる。一方、トリゴネリンを蓄積するマメ科植物では、ピリジンヌクレオチドサイクルを経由しない経路も明らかにされた。この場合、*De novo* 経路で生じたキノリン酸から、NaMN、NaR、ニコチン酸を経由して、トリゴネリンが生成される。しかし、この経路は、コーヒー葉、種子などでは見られない。一部のマングローブ植物ではトリゴネリンが浸透圧調節のための適合溶質のひとつとして機能している可能性がある。また、トリゴネリン蓄積植物では、トリゴネリンが窒素の貯蔵物質として

機能することも考えられるが、これについては、まだ明確な結論が得られていない。ニコチン酸グルコシドは、植物体には高濃度では存在していない。この物質は、ピリジン環分解経路の基質となると考えられる。

(5) ピリジン環の分解経路

ピリジンヌクレオチドのピリジン環は分解されぬまま、ヌクレオチドの再合成や抱合体生成に使われることが多い。しかし、いくつかの植物種ではピリジン環の分解が見られた。ニコチン酸のピリジン環の分解は、細菌ではすでに報告されており、*Pseudomonas putida* ではマレアミド酸経路で行われるが、植物にはこの経路は機能していなかった。チャ葉の切片に [2-¹⁴C]ニコチン酸を投与して、その代謝を詳しく調べた結果、ニコチン酸は、ニコチン酸グルコシド、グルタル酸を経由して、最終的には二酸化炭素にまで分解されることが明らかになった。この植物に特有なピリジンの異化経路は、他の生物には見られないものであり興味深い。この分解経路の詳細についてはさらなる研究が必要である。

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7件)

- ① Ashihara, H. and Deng, W. Pyridine metabolism in tea plants: Salvage, conjugate formation and catabolism. *Journal of Plant Research*, 査読あり, Vol. 125 (2012), pp. 781-791. doi: 10.1007/s10265-012-0490-x
- ② Yin, Y., Watanabe, S. and Ashihara, H. Metabolic fate of ¹⁴C-labelled nicotinamide and adenine in germinating propagules of the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*, *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 査読あり, Vol. 66 (2012), pp. 319-326.
- ③ Ashihara, H., Yin, Y., Katahira, R., Watanabe, S., Mimura, T. and Sasamoto, H. Comparison of the formation of nicotinic acid conjugates in leaves of different plant species, *Plant Physiology and Biochemistry*, 査読あり, Vol. 60 (2012), pp. 190-195. doi:10.1016/j.plaphy.2012.08.007
- ④ Yin, Y.; Sasamoto, H. and Ashihara, H. Pyridine metabolism and trigonelline

synthesis in leaves of the mangrove legume trees *Derris indica* (*Millettia pinnata*) and *Caesalpinia crista*, *Natural Product Communications*, 査読あり, Vol. 6 (2011), pp. 1835-1838.

- ⑤ Ashihara, H., Deng, W. and Nagai, C. Trigonelline biosynthesis and the pyridine nucleotide cycle in *Coffea arabica* fruits: Metabolic fate of [carboxyl-¹⁴C]nicotinic acid riboside, *Phytochemistry Letters*, 査読あり, Vol. 4 (2011), pp. 235-239. doi:10.1016/j.phytol.2011.04.005
- ⑥ Ashihara, H., Yin, Y. and Watanabe, S., Nicotinamide metabolism in ferns: Formation of nicotinic acid glucoside, *Plant Physiology and Biochemistry*, 査読あり, Vol. 49 (2011), pp. 275-279. doi:10.1016/j.plaphy.2010.12.008
- ⑦ Ashihara, H., Yin, Y., Deng, W. and Watanabe, S., Pyridine salvage and nicotinic acid conjugate synthesis in leaves of mangrove species, *Phytochemistry*, 査読あり, Vol. 71 (2010), pp. 47-53. doi:10.1016/j.phytochem.2009.09.033

[図書] (計1件)

- ① Ashihara, H., Crozier, A. and Komamine, A. Wiley, *Plant Metabolism and Biotechnology*, 2011, pp. 1-422 ISBN: 978-0-470-74703-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦原 坦 (ASHIHARA HIROSHI)

お茶の水女子大学・名誉教授

研究者番号: 00017211

(2) 研究分担者

なし