

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 5月23日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570043

研究課題名（和文）

プリン分解代謝の二元的な植物生理機能の解明とその制御に関する研究

研究課題名（英文）

Dual role for plant purine catabolism and its regulation

研究代表者

坂本 敦（SAKAMOTO ATSUSHI）

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60270477

研究成果の概要（和文）：

植物のプリン分解代謝は、空中固定窒素の利用に必須の代謝経路であるため、主にウレイド型マメ科植物を対象に長い研究の歴史を持つ。しかし、大多数を占める根粒共生とは無関係な植物においては、その確たる存在意義や重要性は不明である。本研究では汎植物的な視点からプリン分解の生理学的役割を解明することを目指し、当該代謝が植物の持続的成長とストレス適応という全く異なる二元的な生理的役割を担う多機能代謝である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Plant purine catabolism has a relatively long history of physiological and biochemical studies particularly in ureide-type leguminous species, because it constitutes an integral part of the storage and translocation of symbiotically fixed nitrogen. In contrast, for the vast majority of plants that do not utilize a symbiotic association with *Rhizobium* bacteria, the general role and physiological significance of purine degradation remains elusive. We found that dysfunction of purine catabolism impaired the plant growth under normal conditions and enhanced the stress sensitivity in harsh environment, indicating a dual role in maintaining the growth and contributing to adaptation to stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：プリン分解，成長生理，ストレス，シロイヌナズナ，イネ

1. 研究開始当初の背景

プリン化合物は、核酸やヌクレオチドの主成分として、遺伝、代謝、エネルギー変換など多岐にわたる生命現象に関わるが、その細胞レベルは、*de novo* 合成、サルベージおよび分解の三つの代謝プロセスにより巧妙に制御されている。即ち、プリン化合物はヌク

レオチドとして新生されるが、遊離のプリン体はサルベージを経てヌクレオチドに再生されるか、キサンチンに代謝収束されたのちに酸化分解を受ける。サルベージによるヌクレオチド再生は、物質およびエネルギー収支の両面で高コストな *de novo* 合成を回避する手段として生物普遍的であるのに対し、

様々の代謝中間体を生成する分解経路は進化的に保存されていない。このため、最終産物は尿酸、アラントインなど生物種によって異なり、陸棲の高等生物では植物のみが無機窒素 (NH_4^+) を生じる。従来の植物プリン分解研究は、根粒で固定した空中窒素の貯蔵と輸送にアラントインやアラントイン酸を利用するウレイド型マメ科植物を中心に行われてきた。しかし、大多数の植物は共生的窒素固定とは無縁であり、極めて合目的なサルベージ経路に拮抗して分解経路が備わる必然性も分明ではない。植物プリン分解の最終産物は NH_4^+ であるため、現時点では窒素リサイクルの一端を担うと理解されているが、その実証的研究例はない。したがって、プリン分解は最も植物生理学的理解が遅れている一次代謝の一つといえる。

研究代表者は当該代謝の存在意義を解明する糸口として、その初発反応であるキサンチンから尿酸への酸化を触媒するキサンチン脱水素酵素 (XDH) を標的とした逆遺伝学的解析に着手した。シロイヌナズナにおける XDH の発現抑制は、生育遅延、果実の縮小、稔性低下、葉老化の早期促進などの多面的な変異表現型をもたらすことを明らかにし、その原因がキサンチンの蓄積ではなく、尿酸の欠乏に因ることを示した。これはプリン分解代謝がマメ科植物に限定されず、広く植物の成長生理に重要な役割を担うことを遺伝子レベルで示した最初の例である (Nakagawa *et al.*, 2007)。さらに最近、XDH の発現抑制の影響は通常条件下の成長にとどまらず、乾燥ストレスに対する適応応答にも支障をきたすことを示唆する結果を得ている。これらの研究成果に基づき研究代表者は、プリン分解代謝が単にサルベージを免れたプリン体の除去に機能するマイナーな代謝ではなく、通常およびストレスの両条件下で植物の持続的成長や生産性を支える隠された重要な生理学的役割を持つのではないかと考えた。

2. 研究の目的

植物のプリン分解代謝が、通常生育条件下では持続的成長を支える栄養代謝系として、またストレス条件下では環境適応代謝系として、生育条件に応じて本質的に異なる二元的な機能を担うことを提起し、これらの推定機能の実証的な検証を通じて、曖昧であったプリン分解代謝の植物生理学的位置づけを明確にするとともに、その普遍的存在意義を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 通常生育条件下での持続的成長におけるプリン分解の普遍的役割を検証するために、

モデル単子葉植物イネを対象に、プリン分解の破綻が与える成長生理への影響を調査した。

(2) 変動環境への適応におけるプリン分解の重要性を検証するために、XDH ノックダウンによりプリン分解が破綻したシロイヌナズナ変異株を用いて、特に乾燥ストレスに対する感受性を詳細に調査した。また、XDH 以降の代謝酵素のノックアウト株を用いて、代謝中間体の蓄積をもたらすストレス感受性への影響を調査した。

(3) プリン分解の二元的な機能発現を可能とする転写制御機構の存在を想定し、プリン分解酵素と転写因子の共発現解析から、プリン分解制御因子の探索を試みた。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナで観察されたプリン分解の破綻がもたらす成長障害が、植物に普遍的なものかどうかを知る目的で、単子葉モデル植物であるイネを対象に同様な解析を行った。まず、初発酵素 XDH の阻害剤であるアロプリノールを用い、XDH 活性の阻害がもたらすイネの成長に対する影響を調査した。アロプリノールを含む固形培地で無菌的にイネ種子を発芽させ 10 日間生育させた結果、発芽率には有意な差は検出されなかったが、阻害剤濃度に依存して成長量やクロロフィル含量が低下することが示された。そこで、プリン分解の破綻がイネの成長に与える影響をより明確に示すために、XDH をノックダウンした形質転換植物を作出した。得られた形質転換イネにおける XDH の発現抑制を mRNA と酵素活性レベルで確認後、通常栽培条件下における生育を野生株と比較調査した。その結果、XDH mRNA レベルが野生株の 10% 未満の複数の形質転換株では、バイオマスや種子稔性が顕著に低下していることが明らかとなった。以上の結果から、プリン分解はシロイヌナズナのような双子葉植物のみならず、単子葉植物においても成長量や生産性に影響を与える重要な一次代謝であることが示された。

(2) 変動環境に対するプリン分解の重要性を検証するために、シロイヌナズナの XDH ノックダウン株の乾燥感受性を評価した。無菌栽培した 2 週齢実生に 60 分間の乾燥ショックを与えた後、通常条件で 7 日間生育を回復させたところ、ノックダウン株では野生株と比較してクロロフィル含量およびバイオマスが有意に減少し、個体生長が抑制されていた。ノックダウン株では XDH の発現抑制に起因して尿酸が欠乏していたが、これを予め投与してから乾燥感受性を評価したところ、野生株との成長量の有意差は消失し、乾燥に対する適応能を回復した。XDH の発現抑制が乾燥ストレスへの感受性を増大させ

た生理的要因を明らかにするため、ストレス損傷の実態を調査したところ、ノックダウン株では乾燥処理により細胞死やH₂O₂レベルが有意に増大していることが明らかとなった。H₂O₂レベルの上昇はノックダウン株における活性酸素消去能の低下を意味し、これが乾燥に対して超感受性になる一因であることが示唆された。次に、土耕栽培系でXDHノックダウン株の乾燥感受性を検証した。3週齢植物に対して3週間の無給水処理を施した後に再給水した結果、野生株は生育を回復したが、ノックダウン株は全て枯死した。以上の結果により、プリン分解がシロイヌナズナの乾燥ストレス適応に必要な代謝であることが示された。

プリン分解の破綻がストレス感受性を亢進する事実は、ストレス適応に関与するプリン分解物の存在を示唆する。種々のプリン分解物の中でもウレイド化合物（アラントイン、アラントイン酸）は、ストレスに応答して蓄積することや、抗酸化能を具えることが報告されている。そこで、XDHの下流で働くアラントイン酸分解酵素（AAH）のシロイヌナズナノックアウト株を解析した。本変異株では、AAHの欠損によりアラントイン酸のみならず、その前駆物質アラントインの濃度も上昇し、主要な2つのウレイドが蓄積していることが判明した。また、本変異株の実生では、パラコート処理や高浸透圧条件下において、葉緑素含量やバイオマスの低下が有意に抑えられ、これらのストレスに対して野生株よりも耐性であることが示された。この観察と関連して、当該変異株では代謝や環境応答、ストレス適応に関わる遺伝子群の発現が有意に変動していることがマイクロアレイ解析により明らかとなった。以上の結果から、ストレス適応におけるウレイド蓄積の重要性が示唆された。

(3) ストレスに応答したプリン代謝の転写調節ネットワークの存在を想定し、シロイヌナズナの共発現データを用いて、当該代謝関連遺伝子群に一定の相関を示す転写因子の候補遺伝子を探索した。その結果、初発酵素XDHと次発酵素UOXに対して高い発現相関を示す転写因子様蛋白質遺伝子2種を見出した。タマネギ表皮細胞におけるGFP融合蛋白質の一過的発現解析から、いずれの遺伝子産物も核局在であることが示された。これらが実際にプリン分解酵素の転写制御に関与する可能性を検証するために、各々の遺伝子破壊株の単離を試みたが、両遺伝子とも変異遺伝子のホモ接合系統は胚性致死であることが判明し取得には至らなかった。

プリン代謝酵素遺伝子群の発現は、老化過程や乾燥などのストレスに応答して活性化さ

れることから、これらの生理現象の制御に密接に関わる転写因子がプリン分解系の転写制御に関わる可能性を検証した。候補選定した転写因子のシロイヌナズナ遺伝子破壊株におけるプリン分解系酵素遺伝子の転写産物レベルを調査した結果、老化制御に関わるORE1・ARF2やストレス応答の制御に関わるNAC19の遺伝子破壊が、一部のプリン分解酵素遺伝子のmRNAレベルを有意に変動させ、その発現に影響を与えることが示唆された。

イネ及びシロイヌナズナを用いた以上の研究成果は、プリン分解が植物の持続的成長や環境適応に役割を担うことを逆遺伝学的に示したものである。しかし、これらの二元的な生理機能の制御に関わる転写因子の同定には至らず、この点は今後の課題である。

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8件)

- ① **Nakano S, Takahashi M, Sakamoto A, Morikawa H, Katayanagi K.** X-ray crystal structure of a mutant assimilatory nitrite reductase that shows sulfite reductase-like activity. *Chemistry & Biodiversity* **9**: 1989-1999 (2012) 査読あり
- ② **Muranaka A, Watanabe S, Sakamoto A, Shimada H.** *Arabidopsis* cotyledon chloroplast biogenesis factor CYO1 uses glutathione as an electron donor and interacts with PSI (A1 and A2) and PSII (CP43 and CP47) subunits. *Journal of Plant Physiology*, **169**: 1212-1215 (2012) 査読あり
- ③ **Nakano S, Takahashi M, Sakamoto A, Morikawa H, Katayanagi K.** The reductive reaction mechanism of tobacco nitrite reductase derived from a combination of crystal structures and UV-Vis microspectroscopy. *Proteins* **80**: 2035-2045 (2012) 査読あり
- ④ **Morita S, Tsukamoto S, Sakamoto A, Makino H, Nakauji E, Kaminaka H, Masumura T, Ogihara Y, Satoh S, Tanaka K.** Differences in intron-mediated enhancement of gene expression by the first intron of cytosolic superoxide dismutase gene from rice in monocot and dicot plants. *Plant Biotechnology* **29**: 115-119 (2012) 査読あり
- ⑤ **Nakano S, Takahashi M, Sakamoto A, Morikawa H, Katayanagi K.** Structure-function relationship of assimilatory nitrite reductases from the leaf and root of tobacco based on the high resolution structure. *Protein Science* **21**: 383-395 (2012) 査読あり
- ⑥ **Takahashi M, Sakamoto A, Ezura H,**

Morikawa H. Prolonged exposure to atmospheric nitrogen dioxide increases fruit yield of tomato plants. *Plant Biotechnology* **28**: 485-487 (2011) 査読あり

- ⑦ **Shimada H, Obayashi T, Takahashi N, Matsui M, Sakamoto A.** Normalization using ploidy and genomic DNA copy number allows absolute quantification of transcripts, proteins and metabolites in cells. *Plant Methods* **6**: 29 (2010) 査読あり
- ⑧ **Watanabe S, Nakagawa A, Izumi S, Shimada H, Sakamoto A.** RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in Arabidopsis. *FEBS Letters* **584**: 1181-1186 (2010) 査読あり

[学会発表] (計 28 件)

- ① **渡邊俊介, 松本真由美, 鍛冶村光也, 箱守優毅, 高木 紘, 島田裕士, 坂本 敦.** ストレス適応における核酸塩基代謝の作用機序と代謝中間体の役割. 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21 日, 岡山.
- ② **高木 紘, 渡邊俊介, 島田裕士, 坂本 敦.** ウレイド化合物を蓄積するシロイヌナズナ変異株のストレス生理学的解析. 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 23 日, 岡山.
- ③ **Miyamoto M, Watabnabe S, Sakamoto A, Nishimori H, Awazu A.** Theoretical inference of the influence of metabolites on gene expression based on publicly available sets of microarray data. 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21 日, 岡山.
- ④ **室屋誠人, 伊東千賀子, 村中厚子, 西村浩二, 白上典彦, 岡村文音, 渡邊俊介, 坂本 敦, 島田裕士.** 酸素酸化によって不活性化したルビスコの CYO2 による再活性化機構の解析. 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21 日, 岡山.
- ⑤ **中原恭俊, 水谷春香, 村中厚子, 渡邊俊介, 坂本 敦, 島田裕士.** イネ CYO1 (子葉特異的葉緑体形成因子) ホモログの解析. 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 23 日, 岡山.
- ⑥ **高橋美佐, 坂本 敦, 塚谷裕一, 森川弘道.** 大気中二酸化窒素の植物ホルモン様作用による細胞増殖 and/or 拡大に関する遺伝子発現の解析. 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 23 日, 岡山.
- ⑦ **Sakamoto A, Watanabe S.** Revealing a hidden role of nucleobase metabolism in plant strategies coping with stress. 平成 24 年度鳥取大学乾燥地研究センター共同研究発表会, 2012 年 12 月 2 日, 鳥取.
- ⑧ **高木 紘, 渡邊俊介, 島田裕士, 坂本 敦.** 遺

伝子発現解析から検証したアラントインの生理作用について. 広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻第 4 回公開シンポジウム「数理生命科学の新展開 - 階層間で自発的に干渉しあう形・動き・機能-, 2012 年 9 月 6 日, 東広島.

- ⑨ **中原恭俊, 大林 武, 坂本 敦, 島田裕士.** 細胞 1 個あたりの mRNA 数・タンパク質数・代謝産物数の簡易定量法の開発. 広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻第 4 回公開シンポジウム「数理生命科学の新展開 - 階層間で自発的に干渉しあう形・動き・機能-, 2012 年 9 月 6 日, 東広島.
- ⑩ **高橋美佐, 坂本 敦, 塚谷裕一, 森川弘道.** 二酸化窒素の植物バイタリゼーションの研究 (4) 細胞拡大と核内倍加との間に相関関係がなかった. 第 30 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 2012 年 8 月 5 日, 生駒.
- ⑪ **渡邊俊介, 杉本高文, 呂 由, 島田裕士, 坂本 敦.** ストレス適応代謝としてのプリン分解の生理機能解析. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月 16 日, 京都.
- ⑫ **高野須由佳, 渡邊俊介, 山 敦美, 島田裕士, 坂本 敦.** シロイヌナズナにおいてプリン代謝産物に応答する遺伝子発現の網羅的解析. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月 16 日, 京都.
- ⑬ **村中厚子, 渡邊俊介, 坂本 敦, 島田裕士.** Protein disulfide isomerase 活性を有するシロイヌナズナ子葉特異的葉緑体形成因子 CYO1 の酵素学的解析. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月 18 日, 京都.
- ⑭ **室屋誠人, 伊東千賀子, 村中厚子, 水谷春香, 渡邊俊介, 坂本 敦, 島田裕士.** シロイヌナズナ葉緑体形成因子 CYO2 の解析. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月 18 日, 京都.
- ⑮ **高橋美佐, 坂本 敦, 塚谷裕一, 森川弘道.** 大気中二酸化窒素の植物バイタリゼーションによる細胞拡大は核内倍加が原因ではない. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月 16 日, 京都.
- ⑯ **Watanabe S, Sugimoto T, LV Y, Shimada H, Sakamoto A.** Purine ring catabolism is involved in plant drought protection. *International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change"*. 8-10 December 2011, Kurashiki, Japan.
- ⑰ **Watanabe S, Kounosu Y, Shimada H, Sakamoto A.** Can purine metabolites serve as a potential inducer of gene expression? - A transcriptome analysis of Arabidopsis in response to allantoin. *International Symposium*

"Strategies of Plants against Global Environmental Change". 8-10 December 2011, Kurashiki, Japan.

- ⑱ **坂本 敦, 渡邊俊介**. 核酸塩基代謝に隠された植物のストレス適応機構戦略の解明. 平成23年度鳥取大学乾燥地研究センター共同研究発表会, 2011年12月4日, 鳥取.
- ⑲ **中野祥吾, 高橋美佐, 坂本 敦, 森川弘道, 片柳克夫**. タバコ由来亜硝酸還元酵素 Nii3の X線照射による還元誘起を利用した反応機構解明. 第84回日本生化学会大会, 2011年9月24日, 京都.
- ⑳ **Nakano S, Takahashi M, Sakamoto A, Morikawa H, Katayanagi K**. The initial N-O bond cleavage mechanism of nitrite in assimilatory-nitrite-reductase from *Nicotiana tabacum*: effective utilization of X-ray structures and UV-Vis microspectroscopy. 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 7-12 August 2011, Vancouver, Canada.
- ▣ **渡邊俊介, 杉本高文, 前田智美, 島田裕士, 坂本 敦**. シロイヌナズナのストレス適応におけるプリン分解代謝の生理的役割. 第52回日本植物生理学会年会, 2011年3月20-22日, 仙台.
- ▣ **室屋誠人, 伊東千賀子, 村中厚子, 水谷春香, 坂本 敦, 島田裕士**. 緑色組織におけるシロイヌナズナ葉緑体形成因子 CYO2 の解析. 第52回日本植物生理学会年会, 2011年3月20-22日, 仙台.
- ▣ **島田裕士, 大林 武, 高橋直紀, 松井 南, 坂本 敦**. ゲノムコピー数と倍数性に基づいた ABCD (Analysis Based on Copy number of genomic DNA) 法による細胞1個当たりの mRNA 数, タンパク質数, 代謝産物数の絶対定量法の開発. 第52回日本植物生理学会年会, 2011年3月20-22日, 仙台.
- ▣ **高橋美佐, 坂本 敦, 塚谷裕一, 森川弘道**. 大気中二酸化窒素の植物バイタリゼーション作用による細胞拡大機構の解析. 第52回日本植物生理学会年会, 2011年3月20-22日, 仙台.
- ▣ **中野祥吾, 高橋美佐, 坂本 敦, 森川弘道, 片柳克夫**. タバコ由来同化型亜硝酸還元酵素群の構造機能解析による詳細な基質進入経路の解明. 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7-10日, 神戸.
- ▣ **高橋美佐, 柏原俊一, 古橋孝将, 坂本 敦, 江面 浩, 森川弘道**. 大気中二酸化窒素の植物バイタリゼーション効果の原因遺伝子. 第28回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 2010年9月3日, 仙台.

▣ **Watanabe S, Nakagawa A, Shimada H, Sakamoto A**. Physiological contribution of purine metabolism in drought acclimatization of Arabidopsis. 21st International Congress on Arabidopsis Research "2010 and Beyond." 6-10 June 2010, Yokohama, Japan.

▣ **Shimada H, Obayashi T, Sakamoto A**. ABCD, analysis based on copy number of genomic DNA, method reveals the number of transcripts, proteins and metabolites in a cell of Arabidopsis. 21st International Congress on Arabidopsis Research "2010 and Beyond." 6-10 June 2010, Yokohama, Japan.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: イネ形質転換体及びその作成方法

発明者: 島田裕士, 坂本 敦

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特許権

番号: 特願 2013-048259

出願年月日: 2013年3月11日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/mpb/index.html>

受賞

平成24年度科学研究費補助金審査委員表彰
(2012年10月31日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 敦 (SAKAMOTO ATSUSHI)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 60270477

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし