

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23780345  
 研究課題名（和文） 植物における生体内ポリアミン制御システムの解明と新規ポリアミン型機能分子の探索  
 研究課題名（英文） Analysis of polyamine regulation systems in plants and exploration of functional molecules based on polyamine structure  
 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、植物の生長過程のみならず様々な環境ストレス耐性にも関与する機能分子である事が知られている。そこで本研究では、植物の生体内ポリアミン制御調節機構を明確化する事を目的とし、ポリアミン分解に関わるポリアミンオキシターゼ（PAO）の理解に取り組んだ。そして、イネの3種類の主要 PAO はペルオキシゾームに局在し、バックコンバージョン活性を保持している事を発見した。また、スペルミンの構造異性体であるサーモスペルミンは、スペルミン同様、病原菌抵抗性反応に重要である事を明らかとした。

## 研究成果の概要（英文）：

Polyamines are important not only for developmental processes but also for various environmental stress responses in plants. In order to elucidate the regulatory system responsible for polyamine homeostasis and action, I focused on polyamine degradation enzyme, polyamine oxidase (PAO), and identified three different genes coding for main PAOs in rice. These proteins were localized to peroxisomes and catalyzed polyamine back conversion. Moreover, it was found that one of the common tetraamines, thermospermine, is involved in disease resistance as a signal molecule like spermine.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学、応用分子細胞生物学

キーワード：代謝工学

## 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つ以上含む脂肪族炭化水素の総称であり、代表的なポリアミンとして、ジアミンのブトレッシン、トリアミンのスペルミジン、テトラアミンのスペルミンが挙げられる。これらのポリアミンは動植物問わず幅広く存在しており、核酸と相互作用してタンパク質・核酸合成を促進

する細胞増殖因子として働くほか、植物においては、形態形成、花器官の発育促進、老化の抑制など、植物の生長を司る様々な生理過程に影響を与える重要分子である。また、近年の研究から、ポリアミンは病原菌感染時の防御反応、塩、乾燥などの様々な環境ストレス耐性にも寄与する事が明らかとされている。その為、こうした多岐にわたるポリアミ

ンの高機能をより理解する事は、農作物の生産性や品質向上に応用出来る大きな可能性を秘めている。そこで本研究では、植物におけるポリアミン個々の機能と生体内ポリアミン制御調節機構の理解に取り組む事を目的とした。

## 2. 研究の目的

ポリアミン合成系に関する機能解析は古くから行われており、それぞれの反応に関わる酵素科学的特徴やモデル植物シロイヌナズナの遺伝子欠損変異体を用いた様々な知見が蓄積している。一方、ポリアミン分解に関わる因子、ポリアミンオキシターゼ (PAO) に関する知見は乏しく、スペルミンやスペルミジンを直接低分子物質に分解する反応や、スペルミンをスペルミジンへ、スペルミジンをプトレッシンへと前駆物質に戻すバックコンバージョン反応を触媒する酵素の存在が知られている物の、依然多くの PAO に関する特徴は明らかとされていない。そこで本研究の目的の1つとして、植物の生体内ポリアミン制御調節機構を理解する上では避けては通れないポリアミン分解に関わる PAO 個々の機能を明らかとする。

また、これまでの研究によって、スペルミンは病原菌に対する抵抗性反応時のシグナル分子として、多数の防御応答関連遺伝子群の発現を制御する事を発見している。一方、同様の機能はスペルミンの前駆物質であるスペルミジンやプトレッシンにおいては確認されない。近年、スペルミン合成に関わると考えられていた Ac15 タンパク質が、実際にはスペルミンの構造異性体であるサーモスペルミン合成に関わる事が明らかとされ、サーモスペルミンは植物に幅広く存在するテトラアミンであると認識されるようになった (スペルミンとサーモスペルミンの構造を図 1 に示す)。そこで、スペルミンが保持するシグナル分子活性は、テトラアミン全般に見られる共通機能であるかを検証する事をもう一つの目的とする。

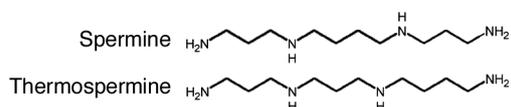


図 1. スペルミンとサーモスペルミンの構造。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料、処理および遺伝子発現解析

実験には、シロイヌナズナおよびイネを用いた。分子生物学・生化学的解析に用いる様々な組織やポリアミンを処理した植物葉は、サンプリング後直ちに液体窒素で凍結し、

使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。植物体サンプルからの RNA 抽出には、ナカライ社のキットを用いた。抽出 RNA は DNase 処理後、リアルタイム PCR 法による発現遺伝子群の定量を含む様々な分子生物学的解析に使用した。

### (2) ポリアミン測定

5%過塩素酸にて抽出、もしくは、反応を停止したポリアミン溶液は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、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 解析に供した。ベンゾイル化ポリアミンは 42%アセトニトリル条件下、ODS カラムにて分離し、254nm を計測した。

### (3) 酵素化学的解析

PAO 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、もしくは、それと類似する株を用いてタンパク質発現を行った。回収した菌体を超音波で処理する事で可溶性タンパク質を抽出し、ヒスチジンタグが付与している発現タンパク質をニッケルカラムにて精製した。精製タンパク質は SDS-PAGE によって純度を確認後、酵素化学的解析に供した。ポリアミン分解産物の同定には HPLC を用い、基質特異性の解析にはポリアミンが分解される際に副産物として生じる過酸化水素量を分光高度計により定量した。

### (4) 細胞内局在性の解析

N 末端に緑色蛍光タンパク GFP をコードする遺伝子を付与した PAO 遺伝子を、35S プロモーター下流にクローニングした。こうして作製したコンストラクトをパーティクルガンにてタマネギの表皮細胞に打ち込み、一定時間インキュベーションしたのち、発現遺伝子産物の局在性を蛍光顕微鏡にて観察した。

### (5) その他

その他、生物検定や生化学・分子生物学的手法を用いて、それぞれの特徴と機能にあわせた機能解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) PAO の機能解析

データベース上に存在する様々な PAO 遺伝子群を元に系統樹解析を行った結果、双子葉植物の PAO のみから構成されるグループ I、単子葉植物のみから構成されるグループ II、そして双方の因子が混在するグループ III と IV の計 4 つのグループに分類分けされる事が明らかとなった (図 2)。一部のシロイヌナズナ PAO の酵素科学的特徴は先行研究によって明らかとされている為、残りの因子の特徴

付けを行った結果、シロイヌナズナの全 PAO タンパク質は全てバックコンバージョン活性を有していた。一方、単子葉植物であるトウモロコシから単離された PAO の 1 つは、ポリアミンを直接低分子に分解する特徴を有する事が明らかとなっている。また、系統樹解析の結果から、単子葉植物のみのグループが存在する為、単子葉植物および双子葉植物それぞれの PAO の共通点・相違点を理解する事を目的とし、イネの全 PAO 遺伝子に着目した。イネには 7 つの PAO 遺伝子が保存されており、グループ II と IV にはそれぞれ 3 種類ずつ、グループ III には 1 種類が分類される (図 2)。そこで、茎、葉、根、花器官など様々な組織から抽出した RNA を用いて、それぞれの遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR にて定量した所、イネの各組織で常に一定以上の発現を示す主要 PAO は、グループ IV に属する *OsPAO3*、*OsPAO4*、*OsPAO5* の 3 種類のみである事が明らかとなった。そこで、この 3 種類の PAO を、イネの主要 PAO としてさらなる解析を行った。

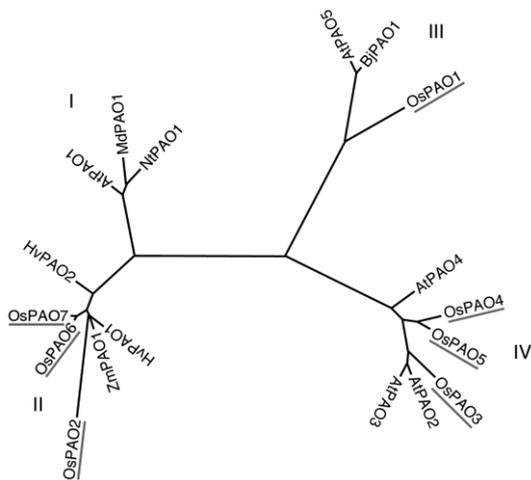


図 2. データベース上に存在する PAO アミノ酸配列を用いた系統樹解析。イネの PAO は下線にて示している。

At: *Arabidopsis thaliana*  
 Bj: *Brassica juncea*  
 Hv: *Hordeum vulgare*  
 Md: *Medicago truncatula*  
 Nt: *Nicotiana tabacum*  
 Os: *Oryza sativa*  
 Zm: *Zea mays*

酵素科学的特徴を理解する為、リコンビナントタンパク質を用いてポリアミン分解活性および基質特異性を検討した結果、*OsPAO3* はスペルミジンをプトレッシンへと、*OsPAO4* および *OsPAO5* は、スペルミンおよびサーモスペルミンをスペルミジンへと分解するバ

ックコンバージョン活性を有する事を明らかとした (図 3 およびデータ省略)。また、これらの PAO は全てペルオキシゾームに局在する事を観察した。

動物細胞におけるポリアミン分解機構は、スペルミンもしくはスペルミジンがアセチル化され、アセチル化ポリアミンが PAO によってスペルミジンもしくはプトレッシンへと分解される二段階反応である事が知られている。一方植物では、過剰に生産されたポリアミンはペルオキシゾームに運ばれた後、ダイレクトに前駆物質へと分解される効率の良いポリアミンリサイクルシステムによって生体内ポリアミン量が厳密に調節されている事が示唆された。本研究にて明らかとされたイネのポリアミン分解系に関する特徴を図 4 に示した。

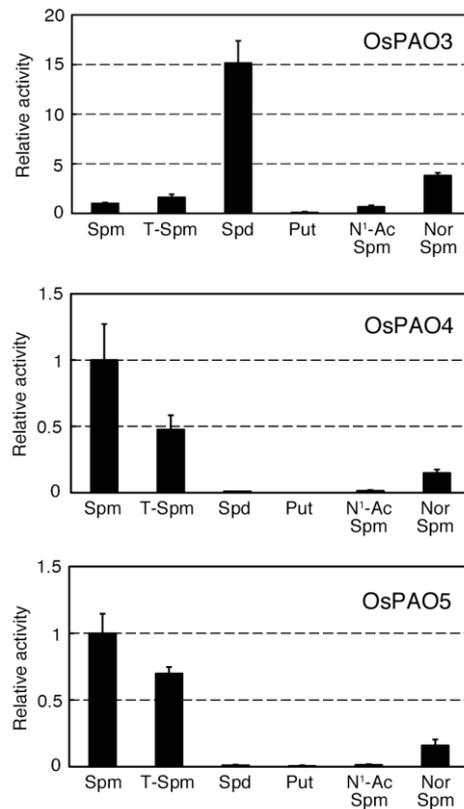


図 3. イネの主要 PAO の基質特異性。スペルミンに対する活性を 1 とした場合の相対値で示している。

Spm: スペルミン  
 T-Spm: サーモスペルミン  
 Spd: スペルミジン  
 Put: プトレッシン  
 N1-AcSpm: N1-アセチルスペルミン  
 NorSpm: ノルスペルミン

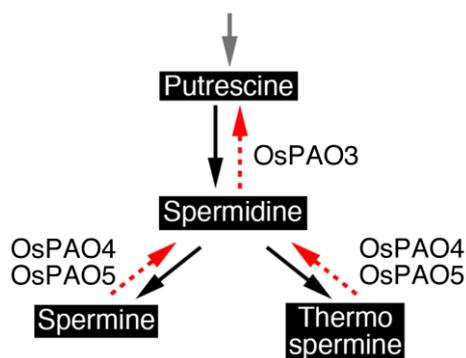


図4. イネの主要 PAO の分解機構のまとめ。黒矢印は合成経路、赤矢印は分解経路を示しており、OsPAO4 と OsPAO5 はテトラアミン分解に、OsPAO3 はトリアミン分解に寄与している。

#### (2) ポリアミン型機能分子の解析

近年、維管束分化に関与する新たなテトラアミンとして、スペルミンの構造異性体であるサーモスペルミンが発見された。これまでの研究から、スペルミンは病原菌に対する抵抗性反応に関与する様々な遺伝子群の発現を制御するシグナル分子としての効果が確認されている。そこで、サーモスペルミンがスペルミンと同様の機能を保持するのかを検討した結果、サーモスペルミンも多数の生体防御関連遺伝子群の発現を引き起こし、また、ウイルス感染した植物葉にサーモスペルミンを処理すると、ウイルスに対する抵抗性能力が高まる事を発見した。これらの結果から、ポリアミン合成の最終産物であるテトラアミンは環境ストレス応答に関わる高機能分子である事が示唆された。

#### 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3件)

(1) Sagor, G. H. M., Takahashi, H., Niitsu, M., Takahashi, Y., Berberich, T. and Kusano, T. Exogenous thermospermine has an activity to induce a subset of the defense genes and restrict cucumber mosaic virus multiplication in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep. 査読有, Vol. 31, 2012, pp. 1227-1232.

DOI: 10.1007/s00299-012-1243-y

(2) Ono, Y., Kim, D. W., Watanabe, K., Sasaki, A., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T. and Takahashi, Y.

Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion. Amino Acids, 査読有, Vol. 42, 2012, pp. 867-876.

DOI: 10.1007/s00726-011-1002-3

(3) Sagor, G. H. M., Yamaguchi, K., Watanabe, K., Berberich, T., Kusano, T. and Takahashi, Y. Spatio-temporal expression analysis of *Arabidopsis thaliana* spermine synthase gene promoter. Plant Biotech. 査読有, Vol. 28, 2011, pp. 407-411.

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.11.0704a

〔学会発表〕(計3件)

(1) Sagor GHM, Berberich Thomas, 高橋芳弘, 新津 勝, 草野友延. スペルミンは熱ショック関連遺伝子群の発現を高めることによりシロイヌナズナを熱ショック傷害から保護する. 日本ポリアミン学会第4回年会, 2013年1月25日, 宮城

(2) 土橋隼人, Sagor GHM, 新津 勝, 高橋芳弘, Thomas Berberich, 草野友延. T-DNA挿入 pao 変異体植物の外部投与ポリアミンへの反応性に基づくシロイヌナズナのポリアミン酸化酵素の基質特異性への考察. 日本ポリアミン学会第3回年会, 2012年1月26日, 埼玉

(3) 金 東煜, 小野裕介, 渡辺佳奈子, 佐々木彩乃, 新津 勝, Berberich Thomas, 草野友延, 高橋芳弘. イネにおけるポリアミン酸化酵素の特徴づけ. 第146回日本農芸化学会東北支部会, 2011年10月8日, 山形

#### 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科・准教授  
研究者番号: 20390891