

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 4 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23850003

研究課題名（和文） 内因性生理活性物質の概日性レベル変動と生物現象

研究課題名（英文） Circadian rhythm changes and biological phenomenon by endogenous biological activator

研究代表者

石丸 泰寛 (Ishimaru Yasuhiro)

東北大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：80590207

研究成果の概要（和文）：

アメリカネムノキは就眠運動を行うが、その分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究では、アメリカネムノキの就眠物質の微量測定法を確立し、就眠運動に伴うその濃度変化を測定した。さらに、就眠運動に関わると考えられる遺伝子群の全長配列の単離を行い、qPCR法を用いて、それらの発現様式を解析した。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanism is hardly revealed in *Samanea saman* which shows nyctinastic movement. In this research, the measurement method of the smaller amount of the compounds for the nyctinasty was established in *Samanea saman*, and the concentration change according to nyctinasty was measured. In addition, the full length complete cDNAs, which would be related to nyctinasty, were isolated. Their gene expression patterns were also analyzed by qPCR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：有機化学

キーワード：生理活性・分子認識・植物・生体分子

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は、夜に葉を閉じて眠り朝には再び葉を開く就眠運動を行う。この運動は生物時計によって制御され、進化論のダーウィンら多くの研究者を魅了した。就眠運動の分

子機構に関する研究は、1900年代後半を中心に、多くの生物学者によって行われた (*FEBS Letters*, 2007, 581, 2337)。就眠運動の研究には、実験の簡便さからアメリカネムノキ (*Samanea saman*) が好んで用いられ、多くの生理学的知見が得られた。就眠運動は、葉

の付け根の葉枕に含まれる運動細胞が、概日性リズムに従って膨潤・収縮することで起こる現象である。運動細胞の体積変化は、細胞へのカリウムイオンの出入りが原因であり、カリウムチャンネルによって制御されることが明らかになっている。これまで、我々はその就眠運動を制御する就眠分子ジャスモン酸グリコシド (JAG)・覚醒分子を単離、構造決定している (*Angew. Chem. Int. Ed.*2000, 39, 1200)。JAG は、ジャスモン酸 (JA) を前駆体として、JAG 合成グルコース転移酵素によりアグリコンであるツベロン酸 (TA) から生合成される。他種植物においては、就眠物質の生合成・代謝は、生物時計によって制御され、酵素活性の制御によって生み出される就眠・覚醒両分子の生体内バランスの変化が、運動のリズムを作ることも明らかにされている。

また、JAG を分子プローブとした就眠運動の細胞レベルでの分子機構解明も試みられており、独自に開発したエナンチオ・ディファレンシャル分子プローブ法により、就眠運動をコントロールする JAG の標的膜タンパク質 Membrane target protein of glycosylated jasmonate (MTJG) が発見された (*Angew. Chem. Int. Ed.*2008, 47, 7289)。JAG を運動細胞プロトプラストに投与すると、細胞収縮が見られるが、鏡像体 *ent*-JAG には、このような活性が見られず、リガンドの立体化学を識別する MTJG がシグナル伝達を経て各種イオンチャンネルを駆動する (*Plant Physiol.*, 2011, 155, 1226)。また JAG は、葉の上面に位置する extensor 運動細胞の体積変化のみを誘導し、葉の裏側に位置する flexor 運動細胞には作用しなかった。JAG は、傷害ストレスで誘導される植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) の配糖体でもある。近年、JA の植物科学研究は急速に展開しており、その受容体は、細胞質内で機能する COI1-JAZ タンパク質複合体であることが最終的に決定された (*Nature*, 468, 2010, 400)。通常、JA およびその誘導体は、COI1-JAZ 受容体と結合して生物活性を発現するが、JAG は COI1-JAZ が関与する個体レベル、細胞レベル、遺伝子レベルでの応答を全く引き起こさない (*Plant Physiol.*, 2011, 155, 1226)。これは、植物体内でのグリコシル化によって、JA が全く異なる作用機構をもつ生理活性物質 JAG へと、スイッチを切り替えるように変化することを意味しており、"Glycosylation Switching"と名付けられている (化学工業, 2011, 62,17)。

このように、就眠運動に関する生理学的研究は、複数の研究グループによって行われているが、これらはいずれも葉の運動時に起こる細胞体積変化とイオンチャンネルの活性変化に関する電気生理学的研究に留まっている (*Plant Physiol.*, 2000, 123, 833; *Plant Physiol.*, 2000, 124, 911; *Plant Physiol.*, 2001, 127, 1310)。

しかしながら、これら以外の多くの因子が就眠運動に関わっていると考えられ、さらに植物全体での変化も捉える必要がある。アメリカネムノキでは数種類のアクアポリン、カルシウムチャンネル、カリウムチャンネルの遺伝子/アミノ酸配列情報しか明らかになっておらず、それ以外は全くの未知である (*Plant Cell*, 2002, 14,727; *Plant Physiol.*, 2002 128, 634)。

細胞レベルでの JAG の機能の一端が解明されつつあるが、アメリカネムノキの就眠運動に関わる遺伝子群の報告は数少ない。また、アメリカネムノキ個体レベルでの就眠・覚醒両分子の制御機構は明らかとなっていない。それゆえ、分子レベルで、就眠・覚醒両分子の合成、移行や制御する機構の解明や就眠運動を担うタンパク質の同定が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

植物の就眠運動は、生物時計によって厳密に制御されており、細胞外の就眠物質濃度に依存していることが明らかになっている (*Planta*, 1958, 51, 757)。言い換えれば、JAG の細胞外濃度は、生体時計に従い時間的・空間的に厳密に制御されている。これまで、この就眠運動を制御する就眠分子・覚醒分子が単離、構造決定され、さらに、これらの分子が、生物時計の制御下でグリコシル化・加水分解されることで、就眠や覚醒の制御が行われていることが明らかになっている。しかし、これらの分子の生理的知見は少なく、また、遺伝子レベルでの解析は行われていない。本研究では、植物全体で制御されているであろう就眠物質濃度変化を解析すると同時に、植物の就眠運動に必要な遺伝子群の単離・同定を行い、分子レベルで就眠運動のメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

アメリカネムノキの JAG の生合成部位を同定するために、就眠・覚醒時における様々な部位における JAG と TA 濃度変化を LC-MS を用いて確かめた (図 1)。

また、前述のように、アメリカネムノキは就眠運動研究のモデル植物にも関わらず、遺伝子情報はほとんど明らかになっていない。JAG の前駆体である

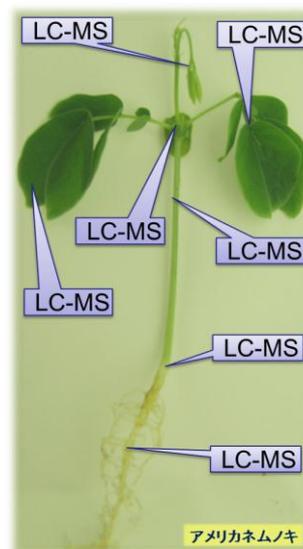


図 1. LC-MSによる就眠分子の局在性解析

JA は、ほぼあらゆる細胞で生合成されていることから、JAG もあらゆる細胞で生合成されうると考える。それゆえ、すべての細胞・部位が、就眠運動のための JAG 輸送経路の起点になると考えられることから、根、莖、枝、葉、第一葉枕、第二葉枕、第三葉枕と、細かく部位を分けてサンプリングを行った。特に、就眠運動に直接関わる第三葉枕は、生体リズムに合わせて経時的なサンプリングも行った。また、アメリカネムノキは幼植物から栄養成長期、生殖成長期いずれのステージでも就眠運動を行うため、様々なステージの植物サンプル全体を得た。これらのサンプルをもとに、RNA を精製して、cDNA ライブラリーを作製した。JAG と TA の濃度変化をもとに、運動細胞に輸送されるまでの経路を想定し、JAG 生合成部位や運動細胞で大きく発現変化する遺伝子、就眠運動に関わる遺伝子を、PCR を用いて単離した。さらに第 3 葉枕部位において経時的に、これらの遺伝子を qPCR 法により発現解析を行った。

4. 研究成果

JAG, TA と JA の ESI-LCMS/MS の条件検討を行い、同時検出法を確立した。また、内部標準物質として、これらの化合物の重水素標識体を使用した。

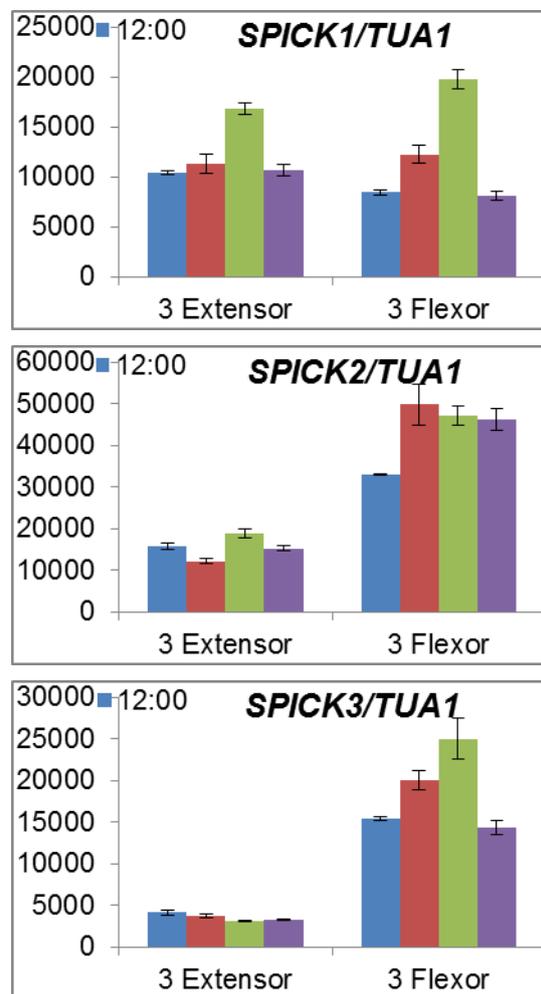
この測定法を用いて、アメリカネムノキの様々な部位の JAG, TA, JA 含量測定を試みた。これまで、アメリカネムノキの葉枕部分の細胞膜の外に、外部から投与した JAG が局在することが報告されている。まず、導管液中のような細胞外の JAG と TA 量の変化が重要だと考え、経時的に導管液を取り測定したが、これらを検出することはできなかった。そこで、幼植物の地上部全体の JAG, TA, JA を測定した。JAG のみ検出され、葉が閉じる時間に対応して濃度が増加することを見出した。

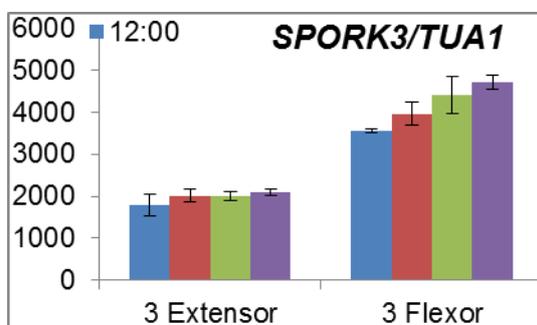
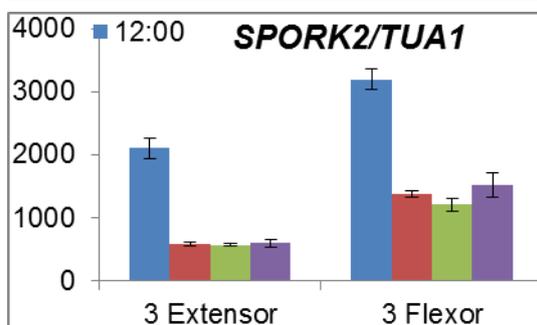
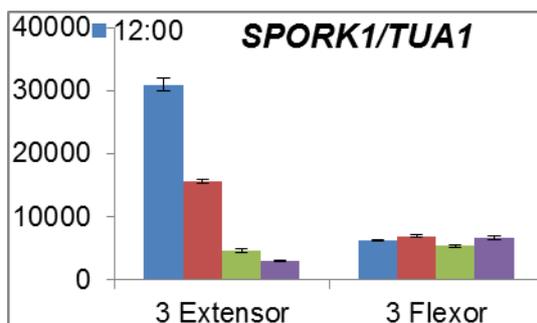
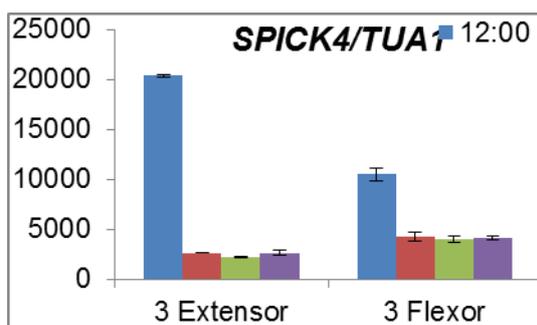
就眠運動の初期のシグナル伝達には、細胞内のカルシウムの濃度変化が重要である。これまで、細胞膜に局在するカルシウムチャンネルとして、シロイヌナズナの機械刺激応答カルシウムチャンネル MCA のみが報告されている。そこで、アメリカネムノキの SsMCA も、就眠運動のシグナル伝達に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、他の植物に保存されている MCA の DNA 配列情報をもとに、アメリカネムノキの SsMCA1 と SsMCA2 を単離した。

さらに、就眠運動の細胞収縮の実働を担うタンパク質はカリウムチャンネルであるが、SPICK1, SPICK2 と SPORK1 以外の分子の実態はあまり明らかになっていない。そこで、アメリカネムノキからカリウムチャンネルの単離も行った。これまでカリウム吸収型チャンネル SPICK1 と SPICK2, 放出型チャンネル

SPORK1 の全長配列が報告されている。今回我々は、SPICK1, SPICK2 と SPORK1 に加え、SPICK3, SPICK4, SPORK2 と SPORK3 の全長の単離に成功した。これらの遺伝子発現解析を行ったところ、カリウムチャンネルの中で SPICK2 の発現量が最も高く、アメリカネムノキの主要なカリウムチャンネルであることが示唆された(図 2)。また、収縮細胞では SPORK1 の発現量が高く、膨張細胞では SPICK2 と SPICK3 の発現が高いことを明らかにした。

図 2. アメリカネムノキのカリウムチャンネルの発現様式





Ueda, M.: Regulatory Mechanism of Plant Nyctinastic Movement: An Ion Channel-Related Plant Behavior. *Plant Electrophysiology*, Springer pp 125-142, 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

石丸 泰寛 (Ishimaru Yasuhiro)

東北大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：80590207

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Ueda, M., Yang, G., Ishimaru, Y., Itabashi, T., Tamura, S., Kiyota, H., Kuwahara, S., Inomata, S., Shoji, M., and Sugai, Y.: Hybrid Stereoisomers of a Compact Molecular Probe Based on a Jasmonic Acid Glucoside: Syntheses and Biological Evaluations. *Bioorg Med Chem* **20**: 5832-5843, 2012 (査読有)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089612006165>

〔図書〕 (計 1 件)

Ishimaru, Y., Hamamoto, S., Uozumi, N. and