

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580151

研究課題名(和文)植物のD-アミノ酸毒性防御戦略機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of protection strategy for toxicity of D-amino acid in plant

研究代表者

老川 典夫(Oikawa, Tadao)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：80233005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：双子葉モデル植物であるシロイヌナズナのセリンラセマーゼ遺伝子破壊株、過剰発現株の調製に成功した。これらの株を用い、さまざまなD-アミノ酸やL-アミノ酸を培地に添加し、それぞれのアミノ酸がシロイヌナズナセリンラセマーゼ遺伝子破壊株、過剰発現株、および野生株の発芽や生育に及ぼす影響を評価した。D-セリン添加時には、セリンラセマーゼ過剰発現株では耐性向上傾向が認められ、セリンラセマーゼのD-セリン分解活性によることが明らかとなった。また、L-セリン添加時には、セリンラセマーゼ過剰発現株およびセリンラセマーゼ遺伝子破壊株の両株において耐性の向上が認められることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to construct the serine racemase gene-disruption mutant and overexpressed mutant of Arabidopsis thaliana. By using these mutants and wild-type strain of Arabidopsis thaliana, we evaluated the effects of various D- and L- amino acids on germination and growth of these strains. In case of D-serine, the serine racemase gene overexpressed mutant showed higher tolerant than other strains. This probably attributed to the D-serine degradation activity of serine racemase. In case of L-serine, both serine racemase gene-disruption mutant and overexpressed mutant showed higher tolerant than wild-type strain.

研究分野：酵素科学

キーワード：D-アミノ酸 アミノ酸ラセマーゼ シロイヌナズナ D-セリン L-セリン

1. 研究開始当初の背景

(1) D-アミノ酸の学術的認識の変化

一般にアミノ酸は、グリシンを除いて少なくとも2つの光学異性体、D体及びL体を有する。これらの光学異性体は、同一の官能基を有するが、右手と左手の関係にあり、互いに重ね合わせることはできない。これらの光学異性体の沸点、融点、溶解度などの物理的性質は同一であるが、生理的性質は異なる。これまでD-アミノ酸は、非天然型アミノ酸であり、生体に不必要な物質と考えられてきたが、近年分析技術の向上に伴い、高感度でD-アミノ酸の検出が可能となり、自然界に広くD-アミノ酸が存在することが明らかになってきた。その結果、D-アミノ酸に対する認識は、大きく変わりつつある。国内では、2005年、D-アミノ酸研究会が組織され、関係諸分野の研究者が連携し、D-アミノ酸の研究が推進されている。2008年4月、日本生化学会誌4月号では、「D-アミノ酸制御システムのニューバイオロジー」という特集が組まれている。また、2009年7月、「1st International Conference of D-Amino Acid Research」が開催され、D-アミノ酸の研究は国際的に展開されている。しかしながら、D-アミノ酸の生体内での機能やその代謝に関する酵素の研究は、対極的位置にあるL-アミノ酸代謝に比して乏しく、その多くはヒトの脳内に存在するD-セリンに関する研究など、医学・薬学領域での研究例である。

(2) 植物アミノ酸ラセマーゼの発見

研究代表者は、世界で初めて植物アミノ酸ラセマーゼ(アルファルファのアラニンラセマーゼ)の存在を報告し¹⁾、その後シロイヌナズナのセリンラセマーゼ²⁾及びイネのセリンラセマーゼ³⁾などの植物アミノ酸ラセマーゼの研究を精力的に行い、現在、国の内外を問わず植物アミノ酸ラセマーゼの研究を先導する立場にある。シロイヌナズナのセリンラセマーゼは、*in vitro*では、補酵素としてピリドキサル5'-リン酸存在下、D-セリンとL-セリンの相互変換とL-セリンのピルビン酸とアンモニアへの脱水反応を触媒する。しかしながら、本酵素の植物体内での機能は、未だ不明のままであった。

(3) D-アミノ酸の植物生長阻害活性

D-セリンが植物細胞によるL-セリン、L-アラニン、L-ロイシン、グリシンなどのL-アミノ酸やK⁺、SO₄²⁻などの無機塩類の取り込み阻害を引き起こし、植物の生長阻害を引き起こすことが報告されていた⁴⁾。

2. 研究の目的

本研究はこのような背景を基盤にして、植物セリンラセマーゼの生理的機能の解明、特に本酵素がD-セリンが引き起こす植物生長阻害に対する防御物質である可能性を究明することを目的とする。

シロイヌナズナのセリンラセマーゼは、*in vitro*では、セリンのラセミ化よりもD-及びL-セリンの脱水反応の触媒効率が高く、D-セリンの生合成よりもむしろ分解・解毒に関与している可能性が示唆される。特にD-セリンは、シロイヌナズナに対して0.5 mMで発芽及び生育阻害を引き起こすことが報告されており⁵⁾、毒性が強いことから、セリンラセマーゼが、シロイヌナズナ体内で、D-セリンの分解・解毒に関与する可能性が高い。そこで本研究では、研究期間内に、2つの研究手法でシロイヌナズナのセリンラセマーゼの機能を解明することを目的とする。1つ目は、シロイヌナズナのセリンラセマーゼ破壊株の構築である。シロイヌナズナのセリンラセマーゼ破壊株を構築し、野生株とD-セリンに対する感受性を比較する。本破壊株の種子が野生株の種子に比べ、より低濃度のD-セリンで発芽や生育阻害を受ければ、セリンラセマーゼは、シロイヌナズナ体内でD-セリンの分解・解毒に関与することが実証できる。2つ目は、シロイヌナズナのセリンラセマーゼの過剰発現株の構築である。本過剰発現株の種子が、野生株の種子に比べ、より高濃度のD-セリンで発芽や生育阻害を受ければ、セリンラセマーゼは、シロイヌナズナ体内でD-セリンの分解・解毒に関与することが実証できる。これらの研究結果から、シロイヌナズナのセリンラセマーゼの植物体内での機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナのセリンラセマーゼ遺伝子破壊株及びセリンラセマーゼ過剰発現株の構築

シロイヌナズナのセリンラセマーゼ遺伝子破壊株は、シロイヌナズナT-DNAタグラインを用いて構築した⁶⁾。またシロイヌナズナのセリンラセマーゼ遺伝子過剰発現株は、常法に従いアグロバクテリウムを用いて調製した。セリンラセマーゼ過剰発現株、セリンラセマーゼ遺伝子破壊株、野生株(Columbia-0)の3株のシロイヌナズナを実験に用いた。

(2) MS平板培地の調製

0.5 g/L MES-KOH (pH 5.7)、10 g/L スクロース、4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、20 mg/L チアミン塩酸塩、1 mg/L ニコチン酸、1 mg/L ピリドキシン塩酸塩、100 mg/L イノシトール、3 g/L Phytigel となるように調整した溶液をオートクレーブ滅菌(121°C、20分間)し、ピオチン(終濃度1 mg/L)を添加した後に丸型シャーレ(2号)に40 mLずつ分注して調製した培地を標準MS平板培地とした。各種アミノ酸は終濃度0.1、0.3または1 mMとなるように添加し、必要に応じて培地のpHを5.7に調整した。

(3)シロイヌナズナ種子の滅菌

1.5 mL 容エッペンドルフチューブを用いて約 500 粒のシロイヌナズナ種子を、1 mL の 0.1% (v/v) Triton X-100 で 40 分間、1 mL の 0.1% (v/v) Triton X-100 を含有する 70% (v/v) エタノールで 30 秒間、1 mL の 0.1% (v/v) Triton X-100 を含有する 33.3% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウムで 15 分間インキュベートした。その後、クリーンベンチ内にて無菌的に 1 mL の滅菌水を用いて 6 回洗浄することで滅菌種子を調製した。

(4)シロイヌナズナの培養試験

滅菌後のシロイヌナズナ種子を、標準 MS 平板培地および各種アミノ酸を含有する MS 平板培地に無菌的に播種した。発芽時期を揃えるために播種後の培地を低温処理(4°C で 2 日間)した後、室温 25°C、湿度 40-60%の環境下で培養した。10 日間培養した後の芽生えの胚軸長、第一本葉の長さおよび植物体の重量を測定することでアミノ酸添加がシロイヌナズナ生育へ与える影響を評価した。

4. 研究成果

セリンラセマーゼ過剰発現株、セリンラセマーゼ遺伝子破壊株、野生株 (Columbia-0) の 3 株のシロイヌナズナを用いて、外因性アミノ酸が生育に及ぼす影響を定性的に評価した。アミノ酸はそれぞれ終濃度 1 mM となるように添加し、10 日間培養した後に各アミノ酸の影響を評価した。アミノ酸添加時の生

分類	アミノ酸
既報のアミノ酸	D-Ala (++++), D-Ser (++++), L-Ser (++)
塩基性アミノ酸	D-Arg (++)、L-Lys (++++)、L- and D-His (+)
含硫アミノ酸	L-Met (++)
分岐鎖アミノ酸	L-Leu (++++)、L-allo-Ile (++++)、L-Val (++)、L-Ile (+)
芳香族アミノ酸	L- and D-Tyr (++)、L- and D-Trp (++)、L-Phe (++)、D-Phe (+)

阻害強度: +, 弱い; ++, 中程度; +++, 強い; +++, 非常に強い; +++, 非常に強い

育の様子を撮影した代表的な写真を図 1 に、allo-体を含む L-体および D-体の標準アミノ酸全 42 種の結果を表 1 にそれぞれまとめた。阻害効果を示すことが既知である L-、D-セリンおよび D-アラニンに加えて、塩基性アミノ酸、含硫アミノ酸、分岐鎖アミノ酸そして芳香族アミノ酸を含む 18 種のアミノ酸により生育阻害が引き起こされた一方で、如何なるアミノ酸においても顕著な生育促進は認められなかった。表 1 に分類したように、アミノ酸による生育阻害にはある一定の規則性が認められた。ヒスチジンを除く塩基性アミノ酸は L-体または D-体のどちらか片方のみが、芳香族アミノ酸は L-体および D-体が同程度に、そして分岐鎖アミノ酸および含硫アミノ酸は L-体のみが生育阻害効果を示した。すなわちこの結果から、外因性アミノ酸によるシロイヌナズナの生育阻害においてアミノ酸側鎖の性質がエナンチオマーに対する選択性に反映されることが示唆され、極めて興味深い結果が得られた。

シロイヌナズナに対する阻害効果が認められたアミノ酸のうち、L-、D-セリン、D-アラニン、L-リジンおよび D-アルギニンの 5 種

について、その阻害効果の濃度依存性を定量

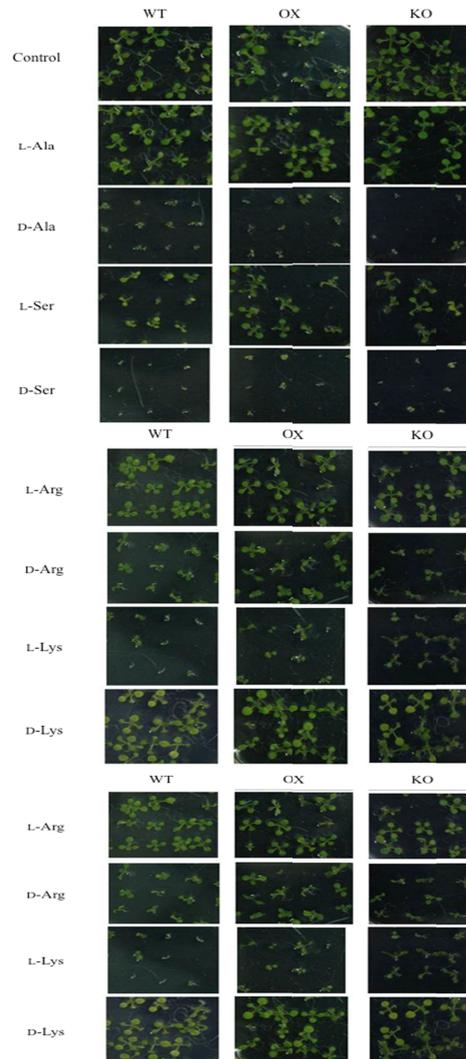


図 1

的に評価した。各アミノ酸を終濃度 0.1、0.3 または 1 mM となるように添加し 10 日間培養した後に、植物体の胚軸長、第一本葉長および重量を測定した。その結果、5 種全てのアミノ酸において、胚軸長 (図 2A) および第一本葉長 (図 2B) の伸長、重量の増大 (図 2C) という全ての要素で濃度依存的な阻害が認められ、外因性アミノ酸による阻害は特定部位の発達に対して特異的ではなく、植物体全体の生育に作用することが示唆された。アミノ酸による生育阻害が引き起こされる機構は不明であるが、D-セリン添加によって根からのイオン取り込みが阻害されることが報告されている⁴⁾。根による栄養源の取り込み能が損なわれるとすれば、植物体全体の生育に負の影響を及ぼすことは合理的な帰結である。しかしながら、性質や代謝経路の異なる複数のアミノ酸による阻害が全て同じ機構で引き起こされるとは考えづらく、個々のアミノ酸による影響をイオン取り込みという観点も含めて検証する必要がある。また、実際にアミノ酸が取り込まれた結果として生育阻害が起こるのかどうか、という点も興味深い疑問点である。多くの D-アミノ酸がシ

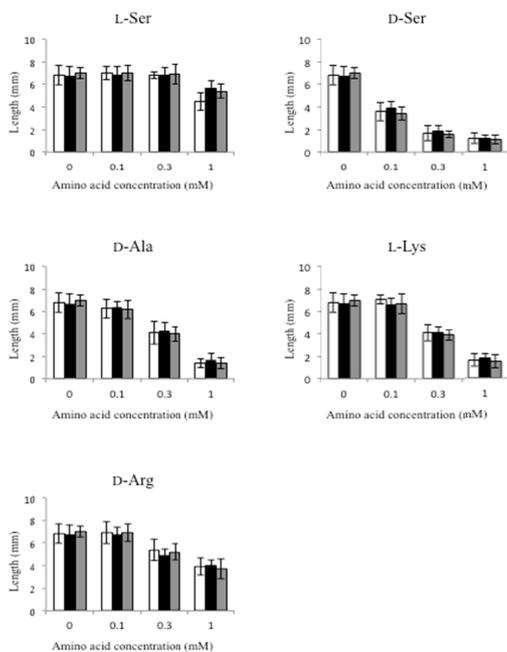


図 2A

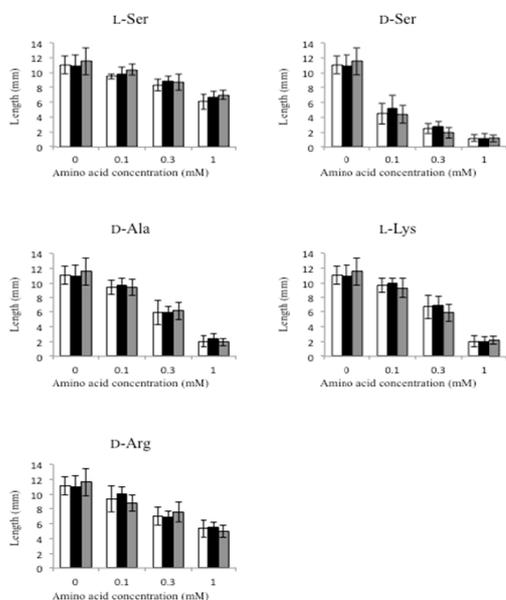


図 2B

ロイヌナズナによって取り込まれるとの報告も為されてはいるが^{7, 8)}、これらは高濃度 (10 mM オーダー) の D-アミノ酸含有培地に浸漬することで検証されており、阻害効果が認められる濃度に即した条件下 (100 μ M オーダー) での検証もまた必要となるであろう。

D-セリン添加時には、セリンラセマーゼ過剰発現株において若干の耐性向上傾向が認められ、セリンラセマーゼの D-セリン分解活性よるものと考えられた。また、L-セリン添加時には、セリンラセマーゼ過剰発現株およびセリンラセマーゼ遺伝子破壊株の両株において耐性の向上傾向が認められた。現在のところ L-セリンによる生育阻害機構は不明であるが、セリンラセマーゼの有するラセミ化活性により D-セリンが生合成されるために引き起こされると仮定すれば、セリンラセ

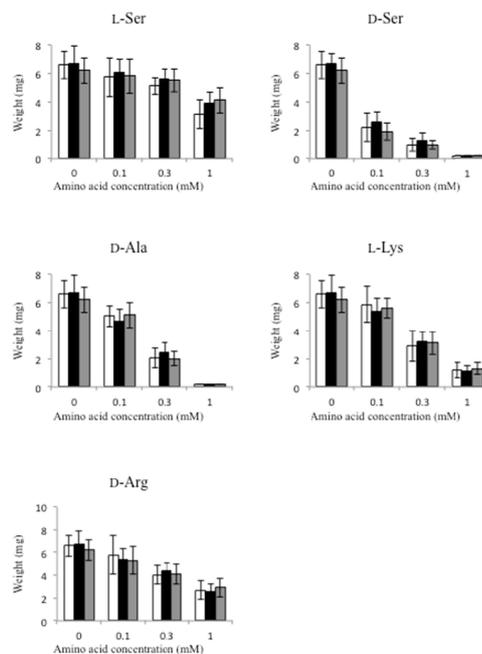


図 2C

マーゼ遺伝子破壊株においては D-セリン生合成能の欠如のために L-セリンに対する耐性が向上し、セリンラセマーゼ過剰発現株においてはセリンラセマーゼがラセミ化活性と同時に L-、D-セリンに対する分解活性を有するために耐性が向上した、と推測できる。他のグループの報告によると、より高濃度 (10 mM オーダー) の条件下においては D-アスパラギン酸もまたシロイヌナズナに対する生育阻害を引き起こすこと、および D-アスパラギン酸代謝に D-アミノ酸アミノ基転移酵素が関与することが示唆されている⁹⁾。本研究では、各アミノ酸を終濃度 0.1 ~ 1 mM となるように添加した際の影響を評価した結果、L-、D-セリンに対する耐性に若干の差異が見られたものの、他のアミノ酸については実験に用いた 3 株間で顕著な差異は認められなかった。添加アミノ酸濃度をより幅広い領域で検証することで株間差異が見出される可能性もあり、今後の検討課題である。

< 引用文献 >

1. T. Oikawa et al., Alanine racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): first evidence for the presence of an amino acid racemase in plants, *Phytochemistry* 67: 856-860 (2006).
2. T. Oikawa et al., Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry* 67: 668-674 (2006).
3. T. Oikawa et al., Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase, *Phytochemistry* 70: 380-387 (2009).
4. R.J. Ellis, Effects of D-serine and chloramphenicol on amino acid metabolism, *Phytochemistry*, 3: 221-228 (1964).
5. O. Erikson et al., A conditional marker

gene allowing both positive and negative selection in plants, *Nature Biotechnol.* 22: 455-458 (2004).

6. 老川典夫、シロイヌナズナセリンラセマーゼ遺伝子の欠損株及び過剰発現株の調製と性質、*ビタミン* 87 : 211 (2013).

7. D. Gördes et al., Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Amino acids* 40 : 553-563 (2011).

8. D. Gördes et al., Analyses of *Arabidopsis* ecotypes reveal metabolic diversity to convert D-amino acids. *SpringerPlus* 2 : 559-569 (2013).

9. M. Funakoshi et. al., Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase-D-aspartate behavior during germination. *FEBS J* 275 : 1188-1200 (2008).

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1件)

加藤 志郎、安原 裕紀、老川 典夫、Effect of exogenous D- and L-Amino Acids on *Arabidopsis thaliana* Growth, *Trace Nutrients Research*, 31, 1-5 (2014).

[学会発表](計4件)

加藤 志郎、安原 裕紀、老川 典夫、*Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育と外因性アミノ酸取り込みとの関連、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都)。

加藤 志郎、安原 裕紀、老川 典夫、アミノ酸添加が *Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育に及ぼす影響、第 31 回日本微量栄養素学会学術集会、2014 年 6 月 7 日、関西大学 100 周年記念会館(大阪)。

老川 典夫、シロイヌナズナセリンラセマーゼ遺伝子の欠損株及び過剰発現株の調製と性質、日本ビタミン学会第 65 回大会、2013 年 5 月 17 日、一橋大学一橋講堂(東京)。

郷上 佳孝、安原 裕紀、老川 典夫、シロイヌナズナのセリンラセマーゼの生理的機能の解明、第 8 回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2012 年 9 月 7 日、滋賀医科大学臨床講義棟(滋賀)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

老川 典夫(OIKAWA, Tadao)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号 : 80233005