

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570054

研究課題名(和文)5-アミノレブリン酸の新規分子機能の解明

研究課題名(英文)Search and clarification of a novel molecular function of 5-aminolevulinate

研究代表者

金丸 研吾 (Kanamaru, Kengo)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90260025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：5-アミノレブリン酸(ALA)はほぼ全ての生物が合成できる一次代謝物で、代謝産物のテトラピロール類は血液や各種酵素中のヘム、窒素・硫黄同化酵素中のシロヘム、植物の葉緑素(クロロフィル)、ビタミンB12などとして生体内で重要な働きをする。しかも植物では、ALAを与えることで環境ストレス耐性増強を惹起することが現象的に知られていた。本研究では、ALAはヘム機能の回復に寄与するがクロロフィルの増大には直結しないこと、ALAによる直接的な酵素活性制御、トマトとシロイヌナズナにおけるALA誘導性転写因子の同定、の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：5-aminolevulinic acid (ALA) is a primary metabolite which almost all living organisms produce by themselves. Its metabolic products, tetrapyrrole compounds, play critical roles as heme in blood and various oxidases, siroheme in N/S assimilation enzymes, chlorophyll in plant, and vitamin B12. Furthermore, external ALA-feeding confers increase of resistance to environmental stress to plants. In this study, we examined carefully the phenomena and tried to clarify the molecular mechanisms. We found that exogenous ALA contributes recovery of heme but not directly of chlorophyll and identified ALA-inducible transcription factors from tomato and Arabidopsis.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：5-アミノレブリン酸

1. 研究開始当初の背景

食糧問題、エネルギー問題、環境問題を解決するキーワードのひとつが「植物」であり、単位収量の飛躍的向上や環境耐性強化による可耕地拡大、バイオエタノール等の生産原料としての活用、より多くの二酸化炭素削減などを旨とした研究開発が世界中で進行中である。現在、全世界の耕地面積は 13.7 億 ha と陸地のわずか 10%に過ぎないが (2001 年)、耕作可能な面積はその 4 倍の約 51.6 億 ha であると推定されている。しかし、このうち約 70%の約 36 億 ha は砂漠化や塩害などの影響を受けており、実際の耕作や生産性向上には困難が伴い、特にアジア (中国、中東国) とアフリカで顕在化している。植物 (作物) の生育をプラスにコントロールする主要な方策が肥料を含めた農薬類の活用である。化学肥料は、世界で年間約 1.5 億トン (窒素 約 9000 万 t, リン 約 3600 万 t, カリウム 約 2400 万 t) 生産され、我が国の農業で盲目的に善と誤認されている。しかし、現在世界で抱える諸問題はこれらを施用するだけでは解決できず、植物 (作物) に生産性向上と環境ストレス耐性の両方を付与できる「植物強化剤」や「植物活性化剤」の開発がブレークスルーとなる。

このポテンシャルをもつ化合物のひとつが 5-アミノレブリン酸(ALA)である。ALA は微生物から動物までおよそ生物すべてが一次代謝系で合成している構造もしごくシンプルな天然化合物である。この ALA が呼吸、解毒、窒素同化系酵素の活性中心であるヘムや、光合成のための集光色素クロロフィルといったテトラピロール類の合成基質であることは教科書的事実である。一方、ALA はヘムやクロロフィルの合成基質としての必要量を下回る微量を外部から与えて植物にプラスの効果をもたらす現象や、テトラピロールの合成基質と捉えたのでは説明できない環境耐性能の向上現象が観察されている。近年の植物科学分野の成果としても、葉緑体でのテトラピロール合成は単なる一次代謝系としてだけでなく、葉緑体遺伝子発現系や個体全体の窒素・炭素同化系の動態、さらには葉緑体と核の DNA 複製や細胞増殖との連動機構にも関与しているのではないかと考えられ始めていた。

したがって ALA には単なるテトラピロール類の合成基質としての役割だけでなく、まだ未解明の分子機能があり、それを同定できれば ALA の用途拡大と付与の最適化が可能になり、現在地球規模で直面する農環境問題の解決に少なからぬ貢献できると期待された。

2. 研究の目的

ALA による環境耐性増強等について現象論の精査をしつつ、分子生物学的手法で遺伝子やタンパク質の量的動態、質的变化からその分子機構に迫り、ALA の植物における新規機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 長期的塩ストレス下のトマトに ALA が与える遺伝子発現への影響

栽培トマトの苗を購入し、土に移植して、①そのまま生育させるコントロール群、② 150 mM NaCl を与えて塩ストレスをかけた群、③ 150 mM NaCl を与えて塩ストレスをかけつつ、週に一度地上部に 1 mM の ALA 溶液をスプレーした群に分けて生育し、一ヶ月後に第 8 葉と 9 葉を回収し、液体窒素で凍結した。これらのサンプルをマルチビーズショッカー (安井機械) で凍結粉砕し、総 RNA を抽出、定量した。この総 RNA から合成した cDNA を用いて 28 種類のトマト塩ストレス関連遺伝子について定量 RT-PCR 解析を 480 システム (Roche) で行った。

(2) 直接的 ALA 投与がトマト葉に与える遺伝子発現への影響

栽培トマトの苗を購入し、土に移植して、2 週間後に葉軸に裁縫針でこよりを通し、①水 (コントロール)、② 1mM ALA 溶液を入れたエッペンチューブに差し込み、0、2、4、8、2、24 時間後に葉をサンプリングして、液体窒素で凍結した。これらのサンプルをマルチビーズショッカー (安井機械) で凍結粉砕し、総 RNA を抽出、定量した。この総 RNA から合成した cDNA で 28 のトマト塩ストレス関連遺伝子について定量 RT-PCR 反応を 480 システム (Roche) で行った。

(3) ALA によるテトラピロールの合成促進

モデル植物シロイヌナズナの葉緑体転写系 *sig2* 変異株と野生株の種をそれぞれ滅菌処理し、シャーレ内の MS 培地をしみこませた濾紙と ALA を含む MS 培地をしみこませた濾紙上にまき、24 時間の低温処理後、遠赤色光 LED 下で一週間栽培した。

D) 直接的 ALA 効果の硝酸還元酵素(NR)を用いた検証

MS プレート上で生育させたシロイヌナズナ野生株と *sig2* 変異株をエッペンチューブ

にとり液体窒素で凍結後、NR 抽出バッファを加え、ベッスル棒ですりつぶした。遠心して上清を移し、定量と常法による NR 活性測定を行った。その際、反応液に適量の ALA またはその誘導体を加えて活性への効果を調べた。またトマトにこよりを使って ALA を直接的に与えた場合の NR 活性の変化も測定した。

(4) シロイヌナズナにおける ALA 投与時の遺伝子発現の濃度、経時的变化

シロイヌナズナ野生株の種をそれぞれ滅菌処理し、MS 培地に播種し、発芽二週間目の個体の地上部を異なる濃度の ALA 水溶液に浸し、24 時間後まで適宜サンプリングし、総 RNA を精製、cDNA を合成して、テトラピロール合成系遺伝子などの発現を Roche 社 480 システムと TOYOBO の THUNDERBIRD を用いて解析した。

(5) ALA 誘導性トマト転写因子のシロイヌナズナホモログの探索と機能

(2)で抽出されたトマト遺伝子情報をもとに TAIR のデータベースからシロイヌナズナホモログを検索し、定量 RT-PCR 用プライマーを合成した。ALA 蓄積シロイヌナズナ変異株でこれらの遺伝子発現を Roche 社 480 システムと TOYOBO の THUNDERBIRD を用いて解析した。絞り込まれたシロイヌナズナホモログ遺伝子についてさらに野生株での発現、塩ストレス応答性を解析した。

4. 研究成果

(1) 長期的塩ストレス下のトマトに ALA が与える遺伝子発現への影響

植物に長期的な塩ストレスを根から与えながら、葉に ALA をスプレーすることによって起こる正の効果=地上部の生育促進と環境耐性能の増強が、いかなる遺伝子の発現を伴っているかを既知の塩ストレス誘導性遺伝子について調べた。実験にはゲノム情報が得られ、葉だけでなく実の解析も可能なトマトを選択した。

解析対象の 28 遺伝子は、トマトですでに転写レベルの塩ストレス応答性が報告されているものや、他の植物や微生物で塩ストレスでの誘導性が知られるプロリンなどオスモプロテクトン合成系や活性酸素消去系の遺伝子のホモログなどを選んだ。

サンプリングは塩ストレス下で ALA の有無で生育差が顕在化する約一ヶ月後に、遺伝子発現が盛んと期待される若い葉について行った。その結果、28 遺伝子については塩ス

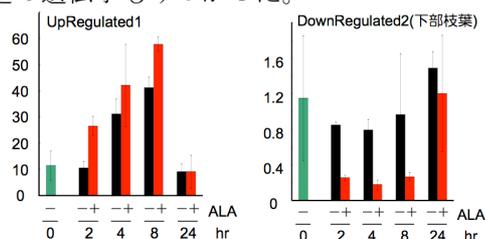
トレスなし、塩ストレスのみ、ALA を与えながら塩ストレス、の 3 条件間で有意差がなかった。cDNA 合成に使用した RNA ではシグナルは検出されず (DNA がコンタミしているとそれを鋳型にシグナルが出る場合がある)、3 連でおこなった測定値は標準偏差がきわめて小さく各平均値の 1%以下であった。

この結果は、ALA による遺伝子発現誘導はおそらく ALA を与えて短時間で起こり、馴化し生育差として現れる時点では平常レベルに戻っていることが示唆された。また本法による RNA 精製と定量 RT-PCR 解析がきわめて高精度かつ高感度であることが確認できた。

(2) 直接的 ALA 投与がトマト葉に与える遺伝子発現への影響

(1)の結果から ALA の遺伝子発現への影響は短期間で起こると考えられたので、より直接的に ALA 単独での効果を検証するため、枝葉にこよりを通し、ALA 溶液を吸わせ、短時間(最長 24 時間)のサンプリングを行った。

その結果、28 遺伝子のうちテトラピロール合成系の ALAD1 や CHLH 遺伝子(いずれも ALA 合成より下流)の発現が 2 時間後に一過的に上昇し、24 時間後にはコントロールと有意差がないレベルに戻っていた。さらに 8 時間後までコントロールより 1.3~2.5 倍高い発現を示す遺伝子(UpRegulated1)や逆に低くなる遺伝子(DownRegulated2)もみつかった。またこれらの植物体は屋外のハウスで栽培しているため、明暗変化による日周変動がコントロールで認められ、DownRegulated2 のように上部と下部の葉でパターンが全く逆の遺伝子もみつかった。

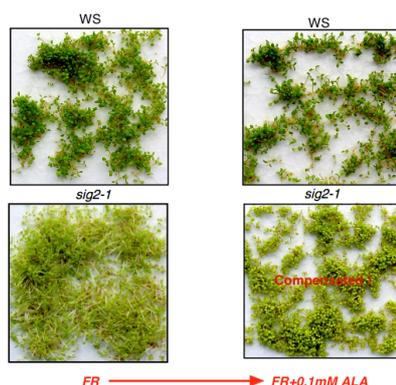


(3) ALA による成長促進の分子機構

ALA はヘムやクロロフィルなどテトラピロールの基本骨格であり、ALA 添加はこれらを増やすことで呼吸や光合成活性、代謝系の酵素活性を活性化が起こり、生育促進に寄与する。しかし代謝経路上、外から ALA を与えたときに、プロトポルフィリン IX (Proto) に鉄が配位してヘム、マグネシウムが配位して Mg-プロトポルフィリン IX (Mg-Proto)、プロトクロロフィライド(Pchl)を経てクロロフィルとなる分岐点でどのように配分されるのか、どちらにより効果的なのかは不明であった。そこで我々は、植物葉緑体での ALA

合成に不可欠なグルタミル tRNA 量が著しく減少し、ヘムもクロロフィルも大きく減少している *sig2* 変異株と野生株に ALA を外から与えた際の影響を見ることで、ヘムとクロロフィルのどちらに優先的に配分されるかを観察した。この *sig2* 変異株ではクロロフィルの減少による緑化不全と、赤色/遠赤色光センサーフィトクロームの活性中心のヘム減少による遠赤色光下での胚軸伸長が起こる。変異株に低濃度の ALA を添加することで胚軸長は完全に相補され、光情報伝達系の機能は回復したが、クロロフィル量は ALA 量を上げても増加せず、緑化不全は相補されなかった。HPLC 解析からこのとき *sig2* 変異株細胞では Proto, Mg-Proto, Pchl 量が野生株程度まで回復していた。しかし野生株では、Proto と Pchl 量は ALA 添加で数倍に増えたが Mg-Proto は最大 2 倍までしか増加せず、クロロフィル量も増加しなかった。

これらの結果から植物に外から与えた ALA は動物同様に Proto の増加を引き起こすが、そのあとヘム機能の回復に優先的に寄与し、クロロフィルについては前駆体は増加するもののクロロフィルへの変換と増大に直結するわけではないことが示唆された。



(4) 直接的 ALA 効果の硝酸還元酵素(NR)を用いた検証

「ALA はヘムやテトラピロールとなって間接的に効く」のは教科書的治験から容易に想起でき、これを支持するデータは複数報告されている。しかし、ALA が微量でも植物に正の効果をもたらす「現象」や、テトラピロールの合成基質と捉えたのでは説明できない環境耐性能の向上「現象」を理解するには、従来の考えにこだわらず「ALA は直接的に特定酵素に効く」可能性を検討すべきである。そこで我々は硝酸還元酵素(NR)について検証した。NR は活性中心にテトラピロール合成系のシロヘムをもつ。したがって細胞抽出液中の NR に ALA を加えて直後に活性変化を測定して活性上昇が起これば、ALA が直接的に NR を活性化する因子として働いていることを示すデータとなりうる。

実験の結果、反応液への ALA の直接添加

によって *in vitro* で野生株粗抽出液中の NR 活性は 1.5 倍程度上昇した。一方 ALA を過剰蓄積変異株の NR では活性化効果はわずかで、逆に ALA 量が激減している *sig2* 株からの NR では 6 倍もの活性上昇が認められた。

また、実験室で栄養欠乏条件で育てたトマトについてこより法で ALA を与えて NR 活性を測定したところ、投与 2 時間後に NR 活性が検出されはじめ、24 時間後も野生株の 6 倍の高さを維持していた。

これらの結果は ALA が NR の活性を直接的かつ持続的に活性化している可能性を示唆する。

(5) シロイヌナズナにおける ALA 投与時の遺伝子発現の濃度、経時的变化

低濃度 ALA によって、自身が基質となるテトラピロール合成系路の酵素遺伝子の発現がどのような経時的变化を辿るか、切り取り成熟葉を ALA 溶液に浮かべてサンプリングして解析した。その結果、投与からごく短時間でピークを示す TypeI, 直後はむしろ発現が低下し、4 時間後に一過的に上昇する TypeII, そして直後と 4 時間後の 2 回ピークが現れる TypeIII に分類された。このうち一番数が多かったのは TypeI で、ALA からの代謝物としては離れている Proto 以降の代謝酵素遺伝子が全てこのタイプであり、Proto 以前の代謝酵素遺伝子に TypeII が散在していた。このことから、Proto 量の上昇が後半の遺伝子を活性化しているというよりも ALA 自身がシグナルとして機能している可能性が示唆された。また ALA を PBG に代謝する ALAD1 のみが 2 つのピークをもつ TypeIII であったことから、ALAD1 の発現には ALA そのものに対応して誘導されるシステムと ALA 代謝物など二次的な要因で誘導されるシステムがあることが示唆された。

(6) ALA 誘導性トマト転写因子のシロイヌナズナホモログの探索と機能

トマトを用いた実験から塩ストレス応答性転写因子の一つに ALA 誘導性が確認され、そのホモログをシロイヌナズナで検索し、さらにマイクロアレイデータベースで塩ストレス応答性を調べ候補を 8 遺伝子に絞り込んだ。そこで、これらについて、野生株と ALA 蓄積変異株から精製した RNA を用いて転写量を調べた。候補遺伝子がコードする転写因子のいずれかが内在性 ALA に応答して発現上昇しているなら高い転写量を示すはずである。その結果、8 遺伝子のうち 4 遺伝子で有意な転写量増加がみられ、うち 1 遺伝子は野生株の 150 倍以上の転写上昇が認められた。そこでこの遺伝子の解析をさらに進めた。

次にこの転写因子の発現が ALAD1 の拮抗阻害を惹起するレブリン酸によって上昇するかどうかを野生株で確認したところ、3 時間後には 30 倍の発現量に達した。さらに塩ストレス誘導性についても精査したところ、塩処理 2 時間後から上昇を始め、プラトーに達することなく 24 時間後には 700 倍という極めて高い転写量に達した。

さらにこの遺伝子が低濃度 ALA と高濃度 ALA にそれぞれどう応答するかを調べたところ、低濃度、高濃度に関わらず、投与 1 時間以内に 2 倍以上に転写が上昇後、一旦すみやかに減少、2 時間後に再び上昇が見られた。その後、低濃度 ALA では発現上昇が見られなかったのに対し、高濃度 ALA では 16 時間目をピークに上昇し、その転写量は投与前の 25 倍まで達し、24 時間後でも 10 倍以上で推移していた。

これらの結果から当該転写因子は ALA および塩に強く応答して発現する性質をもち、高濃度 ALA に対して少なくとも 2 段階の応答を示すことが示唆された。

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 2 件)

① Takenouchi, Y., Kanamaru, K., Takumi, S. (2011) : Comparison of three *hemA1* cDNA sequences putatively encoding a glutamyl tRNA reductase in common wheat. *eWIS*-2011-0017. 「査読有」

② Takenouchi, Y., Nakajima, H., Kanamaru, K., Takumi, S. (2011) : Characterization of three homoeologous cDNAs encoding chloroplast-targeted aminolevulinic acid dehydratase in common wheat. *J. Interact. Plant Biol.*, 53: 942-50. 「査読有」

[学会発表] (計 2 件)

① A study of the molecular function of 5-aminolevulinic acid for enhancement of salt-stress tolerance in higher plants. Hironari Nomura, Haruka Nakajima, Jun Li, Shigeyuki Funada, Seiji Nishikawa, Tomohide Uno, Hiroshi Yamagata, Kengo Kanamaru
第 54 回日本植物生理学会年会(岡山)
2013/3/21-23

② 5-アミノレブリン酸による植物塩ストレス耐性向上と遺伝子発現応答

金丸研吾, 中島晴香, 山口泰広, 李潤, 船田茂行, 宇野知秀, 山形裕士, 野村裕也
第 85 回日本生化学会大会(福岡)
2012/12/14-16

[図書] (計 1 件)

Kengo Kanamaru and Mamoru Sugita
“Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence” Chapter 10
“Dynamic Features of the Plastid Genome and its Transcriptional Control in Plastid Development” (共著)
Vol. 36, 189-213. Springer 出版, 2013 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~unotom/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

金丸 研吾 (KANAMARU KENGO)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90260025

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし