

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06339

研究課題名(和文) D-アミノ酸によるアカウキクサの分離拡散機構

研究課題名(英文) D-amino acids-induced root abscission in the water fern Azolla

研究代表者

山崎 秀雄 (Yamasaki, Hideo)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：40222369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：水性シダ植物であるアカウキクサAzollaは、環境変化を検知すると、根を自切して分離拡散する特異な生理応答を示す。アカウキクサに見られる根脱離応答は、植物では最速の器官脱離現象であり、未知の機構が関与していると考えられている。今回、各種アミノ酸の効果を検討し、D-システインとD-セリンに強い根脱離誘導活性がある事を見出した。D-システインは、硫化水素および活性硫黄生成の生理的基質になっている可能性が高いと考えられる。また、精神薬がD-アミノ酸誘導性の根脱離反応に作用することから、植物の環境応答とヒト神経伝達機構に機構上の類似性があることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物のタンパク質はL-アミノ酸で構成されており、光学異性体のD-アミノ酸は細菌ペプチドグリカンの構成成分などが例外的に知られているだけだった。近年、哺乳類を含めた様々な生物でD-アミノ酸が検出されており、多様な生理機能を示すことが明らかになってきている。今回、アカウキクサで効果が見出されたD-セリンは、ヒトでは統合失調症等の脳疾患に深く関与していることが知られている。本研究の実施によって、アカウキクサの環境応答現象と、ヒト脳神経系とで機構上の類似点があることが薬理的に示された。このことは、生物の外部刺激の検知応答メカニズムに共通性があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) have been proposed as universal signaling molecules in plant stress responses. There are a growing number of studies suggesting that hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) or Reactive Sulfur Species (RSS) are also involved in plant abiotic as well as biotic stress responses. However, it is still a matter of debate as to how plants utilize those RSS in their signaling cascades. Here we demonstrate that D-cysteine is a novel candidate for bridging our gap in understanding. We tested five H<sub>2</sub>S chemical donors, Na<sub>2</sub>S, GYY4137, 5a, 8l and 8o, and found that 5a showed a significant abscission activity. Root abscission also occurred with the polysulfides Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>. Rapid root abscission comparable to other known chemical inducers was observed in the presence of D-cysteine whereas L-cysteine showed no effect. We suggest that D-cysteine is a physiologically relevant substrate to induce root abscission in the water fern Azolla.

研究分野：環境生理学

キーワード：D-アミノ酸 環境応答 絶滅危惧種 信号伝達系 精神薬 Azolla

## 1. 研究開始当初の背景

### アカウキクサ学術研究

アカウキクサ *Azolla* は、緑肥や家畜の餌として東アジア地域では古くから用いられてきた。国際稲研究所 (IRRI) に 500 種以上の系統が保存されている有用植物である。アカウキクサは貧栄養環境下でも生育できるため、時に水面をマット上に覆うほど大発生する事がある (図 1)。欧米非稲作国では有害生物として駆除対象になっている。国内では、アイガモ農法で導入されたと推定される *A. cristata* (外来種) の繁殖が著しく、環境省の特定外来生物に指定されている。アカウキクサ防除は、経済的負担の大きい物理的駆除、あるいは環境影響の大きい除草剤使用に依存しており、各国ともアカウキクサに特化した効果的対応策が見出せていないのが現状である。



図 1 アカウキクサ (*Azolla*)

最近、北極海の海底から 5 千万年前のアカウキクサの化石が発見された。同位体分析の結果、全球規模で大発生したアカウキクサが大気  $\text{CO}_2$  濃度を低下させ、過去に地球寒冷化を引き起こした事が明らかになった (*Azolla event*)。大気環境を激変させるまでに大繁殖する能力があるアカウキクサについての生理学的知見は少なく、学術基盤の脆弱性が生物防除および環境保護上のリスク要因となっている。

### D-アミノ酸生理作用研究

生命現象の根幹となる酵素タンパク質はアミノ酸で構成されている。長らく、生体を構成するアミノ酸は L 体であり、光学異性体の D 体 (D-アミノ酸) は動植物の生理機能には無関係だと信じられていた。近年の分析技術の進歩により、D-アミノ酸が生物界に普遍的に存在しており、極めて重要な生理作用を示す事が次第に明らかになってきた。D-アミノ酸の生理作用研究は、脳神経科学での進展が著しい。統合失調症などの精神疾患に D-アミノ酸の欠乏が認められ、D-アミノ酸の一種である D-セリンが、神経細胞内にあるグルタミン酸受容体チャンネルに必須の制御因子である事が明らかになっている。植物にも D-アミノ酸が含まれていることは古くから知られていたが、生長抑制等の毒性効果しか分かっていなかった。最近、高等植物のグルタミン酸受容体様チャンネル (GLRs) に、哺乳類と同様な D-セリン感受性がある事が報告された。GLRs は、花粉管伸長や被食応答、傷害応答などの植物の速い生理応答に関与していることが示唆されている。植物における D-アミノ酸の作用機序、細胞内および細胞間での刺激伝播のメカニズム、多様な外部刺激情報を統合する仕組みは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

アカウキクサは、環境変化を検知すると根や葉を自切して分離拡散し、栄養生長によって分布域を拡大する性質がある。この環境応答特性がアカウキクサの大量発生と広域分散を可能にしていると考えられる。本研究の目的は、D-アミノ酸によって誘導されるアカウキクサ器官脱離のメカニズムを明らかにし、今後の生物防除・繁殖制御に資する学術基盤を提供する事である。

## 3. 研究の方法

沖縄自生の熱帯性アカウキクサ *Azolla pinnata* を野外より採取し、コバルトを添加した改変ホーグランド溶液 (pH 5.8) で培養した個体を試料とした。個体を 10 mM Hepes-KOH (pH 7.0) または、改変ホーグランド溶液に浮かべて、各種薬剤処理をおこない、脱離した根の比率を指標に評価した。

## 4. 研究成果

植物は外部環境刺激を検知し、生育と生長の代謝制御をおこなっている。動物の神経系のような構造をもたない植物が、多様な環境刺激を受容できるメカニズムは未だに明らかになっていない。気孔の開閉メカニズムに、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) が関与している事が明らかになっている。過酸化水素は、活性酸素 (ROS) の一種である。その後の研究で、活性酸素に類似した性質を持つ活性窒素 (RNS) や一酸化窒素 (NO) も気孔の開閉に関与していることが明らかになった。近年、活性硫黄 (RSS) も様々な生理現象に関与していることが見いだされ、活性酸素、活性窒素

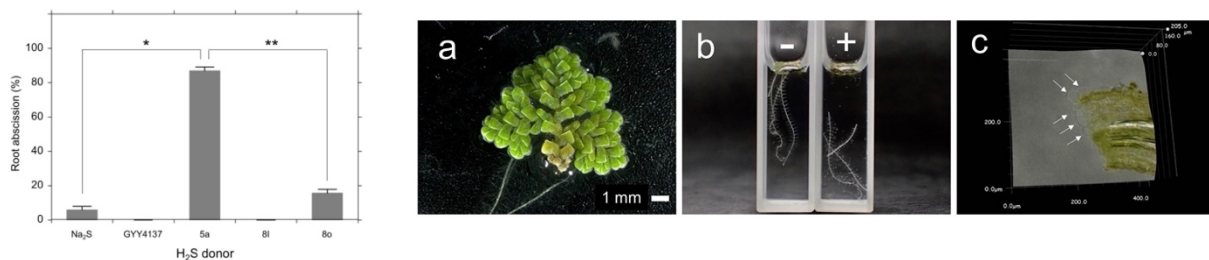


図 2 RSS による根脱離

と同様に、酸化ストレス障害やシグナル伝達系に関与していることが報告されている。しかし、植物における活性硫黄の作用報告は限られており、アカウキクサでは皆無である。そこで、根脱離現象における活性硫黄の関与を検討した。

硫化水素 ( $H_2S$ ) を自発的に発生させる 5 つの供与体について、根脱離反応の誘導性を検討したところ、新規  $H_2S$  供与化合物 5a に高い活性が見られ(図 2)、明確な濃度依存性を示した。5a 処理後の脱離根の表層細胞は膨潤しており、これまでに報告されてきた形態的特徴と一致した(図 2)。 $H_2S$  以外の活性硫黄の関与を確かめるために、ポリサルファイド  $Na_2S_n$  の添加効果を調べたところ、試験した 4 つのポリサルファイド全てに根脱離誘導効果が認められた。これらの化学的活性硫黄発生剤による根脱離効果は、既知の誘導化合物等と比べると、応答速度も遅く、最終的な根の脱利率も低かった。近年、生体中では D-システインが基質となり、 $H_2S$  が酵素的に合成されることが報告されている。そこで、アカウキクサの根脱離に対する D-システインの効果を調べた。図 3 は、アカウキクサ個体に 3mM の D-システイン (D-Cys) あるいは L-システイン (L-Cys) を加えた時の根脱離の経時変化である。L-システインでは全く変化が見られなかったが、D-システインを添加すると、10 分で根脱離が観察される速い生理応答がおきることを見出した。この D-システインによる根脱離も濃度依存性があり、応答速度および根脱利率は高濃度で上昇した。

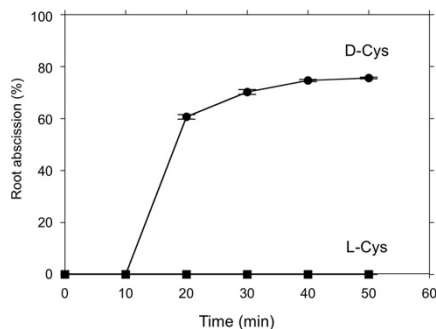


図 3 D-Cys による根脱離

D-セリンも、D-システイン同様に高い根脱離誘導活性を示した。哺乳類の脳において、D-セリンは NMDA 型グルタミン受容体 (NMDAR) のアゴニストとして同定されている。維管束植物でも類似の受容体の存在が示唆されており、グルタミン酸受容体様チャンネル (GLRs) と呼ばれているが生化学的実態は不明である。多くの精神薬は、ヒト脳細胞の NMDAR に作用することが知られている。そこで、精神薬 12 種類について根の脱離誘導効果を調べた。ハロペリドール (向精神薬)、リスペリドン (第二世代抗精神薬)、クエンチアピン (第二世代抗精神薬) において、高い脱離率を示す効果が認められた。次に、抗精神薬 (抗躁薬) の D-セリン誘導性根脱離応答への阻害効果を調べた。精神薬で前処理を行った後、D-セリン誘導性の根脱離応答反応に対する抑制あるいは阻害効果を観察したところ、デキストロメトर्फアン (抗躁薬)、クロロプロマジン (統合失調症治療薬)、ブロナンセリン (第二世代抗精神薬)、ミノサイクリン (統合失調症治療薬) に顕著な抑制効果が見られた。得られた薬理学的実験結果は、ヒト NMDA 型グルタミン酸受容体を活性化して向精神性を示す鬱病治療薬は根脱離の誘導効果を、興奮抑制効果のある抗精神薬は根脱離に対しても抑制阻害効果があることを示唆している。ヒト NMDA 型グルタミン酸受容体の作動薬 (ポリアミンのスペルミンとスペルミジン) も、ヒト神経系と同様な効果が見られることから、アカウキクサ根脱離応答機構に NMDAR 様の機能が深く関与していることが考えられる。

上記の結果は、活性酸素、活性窒素および活性硫黄に対する応答を含めて、植物と動物の外部刺激応答機構に共通の性質があることを強く示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakihama Y and Yamasaki H	4. 巻 -
2. 論文標題 Phytochemical Antioxidants: Past, Present and Future	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IntechOpen	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5772/intechopen.95627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hideo Yamasaki, Masahiro P. Ogura, Katsumi A. Kingjoe, Michael F. Cohen	4. 巻 8
2. 論文標題 d-Cysteine-Induced Rapid Root Abscission in the Water Fern Azolla Pinnata: Implications for the Linkage between d-Amino Acid and Reactive Sulfur Species (RSS) in Plant Environmental Respons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antioxdants	6. 最初と最後の頁 1, 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox8090411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 山崎秀雄	4. 巻 57
2. 論文標題 野菜に含まれる硝酸塩は毒か薬か？	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 665, 668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎秀雄, 小倉将弘, 金城克美
2. 発表標題 D-システインによるアカウキクサAzolla pinntaの根脱離応答
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------