

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06725

研究課題名(和文)植物ウレイド研究の新展開：アラントインのストレスシグナリング作用と分子機構の解明

研究課題名(英文)The stress signaling effect of allantoin and its molecular mechanism of action: a new avenue to plant ureide research

研究代表者

坂本 敦 (Sakamoto, Atsushi)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授

研究者番号：60270477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なウレイド化合物であり、植物において窒素栄養の貯蔵や運搬を担うが、過酷環境下では蓄積することが知られるアラントインが、非生物ストレスやアブシシン酸に関わる遺伝子応答や細胞内応答を亢進することを示した。その作用機序として、アラントインの蓄積は小胞体系の動態変化を誘導することでそこに局在するアブシシン酸配糖体の加水分解酵素を活性化し、この植物ホルモンの生成を促進することを明らかにした。さらに、その作用発現には五員複素環構造が重要であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、既知の代謝化合物が有する別機能の発見が相次いでおり、特に植物では多様な低分子量の代謝物質が生理機能の調節や活性化に関わっていると推定される。植物生理におけるアラントインの役割が窒素栄養の有効利用に留まらず、ストレス応答の活性化を通じ環境適応にも関わることを示した本研究の成果は、代謝の多機能性の例証を通じ、固着性が故に代謝を機軸として植物が進化させてきた生存戦略の理解に貢献するものである。アラントインは安価で生物分解性に優れたファイトケミカルであり、植物環境応答のケミカルコントロールに適用可能なため、農業生産や作物栽培などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have shown that allantoin, a representative ureido compound that serves in nitrogen storage and transport in plants but accumulates under hostile environments, stimulates gene and subcellular responses involved in abiotic stress and related to abscisic acid. Increased allantoin levels caused dynamic changes in the endoplasmic reticulum system, which activated a specific hydrolytic enzyme localized there to generate abscisic acid from its physiologically inactive glucose conjugate. Furthermore, we suggested that the heterocyclic ring structure is critical for its action on these molecular and subcellular processes.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：ストレス応答 遺伝子発現 小胞体動態 アブシシン酸 ウレイド プリン代謝 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

ウレイドは尿素 ($(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{O}$) の水素原子がアシル基に置換された化合物の総称で、生物界ではアデニンやグアニンなど、核酸やヌクレオチドを構成するプリン塩基の代謝過程で生じる。その代表例として複素環式化合物であるアラントインや、その開環産物であるアラントイン酸が知られている。C/N 比 (炭素率) が低いウレイドは窒素の貯蔵や輸送に適しており、植物ではアミノ酸合成の基質となるアンモニアまで分解されるため、窒素栄養の体内再利用に寄与する。また、ダイズなど一部のマメ科植物は根粒で固定した大気由来の窒素を一旦プリン塩基に取り込み、これをアラントインやアラントイン酸に変換後、地上部に転流して窒素源として利用する。このように、これまでウレイドの植物生理学的役割は、専ら窒素栄養のリサイクルや根粒共生の観点から論じられてきた。

他方、生理学的意義は不明なものの、乾燥や塩分などのストレスに曝された植物や作物ではウレイド動態が変化し、アラントインが蓄積する現象が古くから知られていた。申請者はこの生理現象に注目し、代謝中間体の蓄積という一見阻害的な現象に、巧妙な植物の環境適応戦略を見出した。即ち、ウレイド生成能の喪失はシロイヌナズナの乾燥や酸化ストレスに対する耐性を著しく低下させることから環境適応に関わるウレイド分子の存在を想定し、アラントインの蓄積が乾燥や高浸透圧などのストレスへの耐性を高めることを示した。生理活性な代謝中間体を一時的に蓄積し、その作用を巧みに利用する戦略は、喫緊の環境変動への即応性が高く、ストレス下で無駄な代謝コストを抑えるなどの意義を持つと考えられる。

では、この代謝中間体に秘められた機能と作用機序はどのようなものなのか? 申請者らの報告以降、アラントインの蓄積が塩ストレスや重金属への適応や耐性を高める報告が相次いでなされたが、これらの研究ではストレスに伴い発生する活性酸素の消去剤として働くと考えられている。しかし、アラントインは試験管内で抗酸化活性を示さないという報告があり、この仮説は些か説得力を欠く。これに対し申請者らは、分解酵素アラントイナーゼ (ALN) の遺伝子破壊 (*aln* 変異) や野生株への投与など、内因性・外因性を問わず、アラントインの蓄積はアブシシン酸 (ABA) やジャスモン酸などのストレスホルモンを亢進し、シロイヌナズナのトランスクリプトームを変動させ、ストレスにプライミングした生理応答を誘導することを明らかにした。これらの独自の研究成果をもとに、申請者は抗酸化物質説に代わる説得力ある仮説として、ストレス下で蓄積するアラントインは植物の適応応答を活性化する低分子生理活性物質であるという考えを提示するに至った。

2. 研究の目的

植物では、既知の種類を遙かに凌ぐ多様な低分子量の代謝物がシグナル様の作用を有し、その生理機能の調節や活性化に関わっていると推定される。不断の環境変化に対峙する植物の生存成長戦略を理解するうえで、その実体や作用機序の解明は焦眉の課題である。本研究では、アラントインをこのような低分子生理活性物質と位置づけ、ストレス下におけるその作用が抗酸化に限定された機能にとどまらず、遺伝子発現を含めたストレス応答の活性化にあることを示すことで、窒素栄養利用とは峻別されるウレイド代謝の新奇な植物生理学的役割を明らかにすることを目的とした。これにより、生育環境に応じて単一代謝系が全く異なる生理機能を発揮する「代謝の多機能性」を例証し、動けない植物が代謝を機軸としながら進化させてきた巧妙な生存戦略の理解に貢献することを企図した。

3. 研究の方法

(1) アラントインによって活性化される遺伝子応答および細胞内応答

通常条件下で、ストレス応答性の遺伝子発現や細胞内応答が、アラントインによって誘導されるかどうかを指標にその作用を検証した。前者については、ALN を標的としたデキサメタゾン (DEX) 誘導的 RNA 干渉系の導入により、ストレス非依存的に分解抑制によるアラントインの蓄積を誘導できる形質転換シロイヌナズナを作製し、DEX 処理に応答する遺伝子を同定した。後者については、シロイヌナズナではストレス応答の一環として小胞体系の動態変化、特に小胞体ボディの数が増加する現象を見出したので、非ストレス条件下でアラントイン或いはアラントインを恒常的に蓄積させる *aln* 変異がこの現象を誘導できるか否かを調査した。

(2) 分子構造と生理作用の相関および因果関係

アラントインは光学活性を有し、天然のエナンチオマーは (S)-体であることから、その作用が何れの異性体に帰属するのかわかり、上記 (1) で同定した遺伝子の発現応答や細胞内応答 (小胞体ボディの増加) を指標に用いて明らかにすることを試みた。また、アラントインとの類似性にもかかわらず、ストレス応答の活性化作用を呈さないアラントイン酸との構造比較から、アラントインが保持する複素環構造 (ヒダントイン基) の重要性を同様の手法で検証した。

(3) 作用を媒介する因子の同定

アラントイン応答性遺伝子のプロモーターと LUC の融合遺伝子を導入した形質転換体を作製し、これを親株とした変異株ライブラリーから発光に異常をきたした変異株の取得を試みた。ま

た、ヒダントイン構造を固定した磁性ビーズを用い、アラントインの重要構造と相互作用するタンパク質の存在を調査した。

(4) 未知アラントイン合成酵素の探索

シロイヌナズナのゲノム情報から、アラントイン生成の基質である 5-ヒドロキシイソ尿酸 (5-HIU) に対して代謝活性を有するタンパク質の遺伝子候補を、既知配列との相同性や細胞内局在予測、発現プロファイルなどに基づき絞り込み、その遺伝子破壊をゲノム編集により実施した。

4. 研究成果

(1) アラントインによって活性化される遺伝子応答および細胞内応答

本課題に先立ち、*aln* 変異株の網羅的遺伝子発現解析から候補遺伝子を多数同定しているが、本株はアラントインを恒常的に蓄積するため、そのなかには二次的な影響などで発現応答するものも含まれると考えられた。そこで DEX による転写後発現抑制系を適用し、シロイヌナズナにおいて非ストレス条件で誘導的にアラントインを蓄積させる実験系を構築した。2 週齢の形質転換植物では、DEX 噴霧から 24 時間以内に *ALN* の転写産物量が急激に減少するとともに、96 時間以内にアラントインが著しく蓄積したが、野生株ではそのような変化は観察されなかった。この条件の下で遺伝子発現を評価した結果、DEX 処理に対して *RD29B* などのストレス関連遺伝子の発現が有意に上昇しており、アラントインの主要な作用部位は ABA が関わるストレス応答系であるという *aln* 株を用いた先行研究の報告と矛盾しない結果であった。また、*Zat12* などの酸化ストレスに対するマーカー遺伝子の発現も誘導されたことから、直接的な抗酸化能を保持していなくとも、抗酸化系遺伝子の活性化を介してアラントインは酸化ストレス耐性を高めることができることが示唆された。

最近、乾燥や塩、高浸透圧などの非生物ストレスにより誘導された小胞体の動態変化が、ABA 配糖体からの ABA 生成を活性化することを報告したが、非ストレス条件下において *aln* 変異や外因性のアラントインがこのような細胞内応答を引き起こすと同時に、ABA レベルを亢進することを明らかにした。したがって、アラントインはストレスに対する細胞内応答も活性化することが示された。アラントインはペルオキシソームで生成し小胞体で代謝されるが、ストレスに応答して *ALN* の発現は抑制されるため、小胞体で蓄積すると考えられている。したがって、アラントインによるストレス応答の活性化機構として、その蓄積が小胞体の動態変化を誘導し、小胞体に局在する ABA 配糖体加水分解酵素を活性化すると考えられる。この成果は国際誌の掲載号におけるハイライトとして巻頭で詳しく解説された（「その他」の項を参照）。

(2) 分子構造と生理作用の相関および因果関係

市販ラセミ混合体からキラルカラムクロマトグラフィーにより分離した (R), (S) 各エナンチオマーに対する *RD29B* などの遺伝子の発現応答を調査した。しかし、植物体への処理時間内に異性体の自動ラセミ化が生じていることが判明し、光学活性と生理作用の関係を明確に示すことはできなかった。そこで生理活性を有するアラントインと持たないアラントイン酸の構造上の差異が「複素環基(ヒダントイン基)が開環しているか否か」のみである点に注目し、この環状構造がアラントインによるストレス応答の活性化に重要かどうかを検証した。その結果、ヒダントインはアラントインと同様な遺伝子応答や細胞内応答を誘起したが、その開環体であるヒダントイン酸やヒダントイン環をメチル化修飾した誘導体にそのような効果は見られなかった。したがって、アラントインが有するこの複素環構造が、そのストレス応答の活性化作用に密接に関わることが強く示唆された。

(3) 作用を媒介する因子の同定

アラントインの作用を介すると思われる因子の同定を目的に、ストレス応答を指標としてアラントインに応答しない突然変異体の選抜を実施したが、有力な候補株を得るには至らなかった。そこで、アラントインと直接相互作用する因子を探索するために、ヒダントイン基を磁性ビーズに化学的に固定し、これと親和性を示すタンパク質の検出を試みた。植物体からの可溶性抽出物をビーズとインキュベートし、洗浄後のビーズからの溶出画分を SDS-PAGE に供し銀染色を行った結果、実生の根抽出物においてこの分子構造に結合する因子の存在が示唆された。

(4) 未知アラントイン合成酵素の探索

上記(1)の解析で使用予定であったアラントイン合成酵素 (AS) の遺伝子破壊株 (*as* 変異株) が、驚くべきことにその生成能力を保持していることを見出し、シロイヌナズナには未同定のアラントイン合成経路が存在することが強く示唆された。この想定外の結果の重要性を鑑み、当初の研究計画にはなかったが、未知のアラントイン生成経路を担う酵素の探索を試みた。シロイヌナズナ・ゲノムに AS は 1 コピーしか存在しないため、これとは異なる酵素が未知経路を構成すると考えられた。アラントインの前駆体は、尿酸がウリカーゼによって酸化された 5-HIU である。AS とは構造を異とするが、5-HIU の代謝活性を有するタンパク質が、アラントインを盛んに生成する共生マメ科植物の根粒で唯一報告されていた。そこで、このタンパク質のシロイヌナズナ・オーソログを検索し、細胞内局在予測や遺伝子発現プロファイルなどから最終的に 2 つの候補に絞り込んだ。ゲノム編集を用いてこれらの候補遺伝子の遺伝子破壊を *as* 変異株において実施し、未知経路の解明に資する形質転換体を複数得た。遺伝子破壊の確認後、アラントインの定量結果によりする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yiping Han, Shunsuke Watanabe, Hiroshi Shimada, Atsushi Sakamoto	4. 巻 71
2. 論文標題 Dynamics of the leaf endoplasmic reticulum modulate -glucosidase-mediated stress-activated ABA production from its glucosyl ester	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 2058-2071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erz528	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 坂本 敦	4. 巻 5
2. 論文標題 アラントイン 植物のストレス応答や耐性に関わる古くて新しい窒素代謝物	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 74-78
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taiki Fujibayashi, Yuhi Hashiguchi, Yiping Han, Hiroshi Shimada & Atsushi Sakamoto
2. 発表標題 Comparison of the effect of allantoin and allantoic acid on stress gene expression in Arabidopsis
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Method for cultivating plants and coloring accelerator for grape berries	発明者 Sakamoto et al.	権利者 Hiroshima Univ., Kaneka Corp.
産業財産権の種類、番号 特許、W02019216302A1	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 植物における高温ストレス向上剤，高温ストレス体制を向上させる方法，白化抑制剤，及びDREB2A遺伝子発現促進剤	発明者 坂本 敦，他6名	権利者 国立大学法人広島大学，株式会社力ネカ
産業財産権の種類、番号 特許、第6532026号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

【研究成果の講評】

Journal of Experimental Botany で公表した研究論文は、30編の原著論文を収録する掲載号(71巻6号)のハイライトとして巻頭で唯一とりあげられ、下記の解説記事において4頁にわたり紹介された。

Saad Hussain, Benjamin Paul Brookbank and Eiji Nambara (2020)

Hydrolysis of abscisic acid glucose ester occurs locally and quickly in response to dehydration

Journal of Experimental Botany, Vol.71, No.6, 1753-1756 (doi:10.1093/jxb/eraa026)

【研究成果の発信】

所属機関HPから以下のタイトルで上記公表論文の研究成果が発信された。

「環境の変化に植物が素早く応答し適応するためのホルモン生成制御」(<https://www.hiroshima-u.ac.jp/ilife/news/57346>)

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
---------	---------