

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 6月 1日現在

機関番号： 15101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ~ 2012
 課題番号： 22580385
 研究課題名 (和文) 窒素センサータンパク質 P-II による
 抗酸化性アミノ酸シトルリンの代謝制御
 研究課題名 (英文) Metabolic regulation of amino acid citrulline
 by nitrogen sensor protein P-II
 研究代表者
 明石 欣也 (AKASHI KINYA)
 鳥取大学・農学部・准教授
 研究者番号： 20314544

研究成果の概要 (和文) : 乾燥強光耐性の野生種スイカは、ストレスに際して抗酸化性アミノ酸であるシトルリンを高蓄積させる。シトルリン生合成経路の鍵酵素である AGK は、窒素センサー P-II タンパク質と相互作用することで、アルギニンによるフィードバック阻害が緩和されることを示した。また、シトルリン生合成の窒素源として、光合成タンパク質の大規模な分解が乾燥ストレス下において誘導され、その代謝変動にストレス誘導性プロテアーゼが関与することが示された。

研究成果の概要 (英文) : Wild watermelon is a drought-resistant plant and accumulates antioxidative amino acid citrulline under stress condition. It is revealed that feedback regulation of AGK by arginine is relaxed by the nitrogen sensor P-II protein. Massive degradation of photosynthetic proteins is enhanced under stress, which serves as the nitrogen source for citrulline biosynthesis. Stress-induced proteases are involved in this degradation process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 農学
 科研費の分科・細目： 境界農学・応用分子細胞生物学
 キーワード：シトルリン、抗酸化性、窒素代謝、P-II タンパク質

1. 研究開始当初の背景

環境ストレス下の植物では、光合成が抑制されると共に、防御物質の大規模な生合成が誘導される。しかしこれら一連の代謝変動を統合的に制御する司令塔の分子の実体は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内の炭素・窒素比(C/N)センサーである PII タンパク質が、アフリカ・カラハリ砂漠に自生する野生種スイカにおいて、環境ストレスに応答して蓄積する抗酸化性アミノ酸であるシトルリンの生合成の鍵酵素を活性制御するメカニズムを解明する。これらの解析を通して、環境ストレス

下の植物における炭素・窒素代謝の制御の全体像を理解する。

3. 研究の方法

植物材料として、アフリカ・カラハリ砂漠に自生する野生種スイカ *Citrullus lanatus* sp. 101117-1 を用いた。シトルリン代謝経路の各段階の酵素活性の測定では、我々が過去に確立した酵素カップリング系による活性測定法(Takahara et al (2007) Anal. Biochem., 368, 138-147)を用いた。活性測定に用いた野生種スイカ AGK 酵素および P-II タンパク質は、大腸菌での組換え酵素として合成し、His タグを用いてアフィニティー精製した酵素標品を用いた。野生種スイカの葉表面のワックス含量は、ガスクロマトグラフィーにより定量した。ATP 合成酵素複合体およびその ϵ サブユニットの分解パターンは、二次元電気泳動および特異的抗体を用いたウェスタン法により解析した。

4. 研究成果

乾燥強光ストレスに耐性を持つ野生種スイカは、ストレスに際してシトルリンを高蓄積させる。シトルリンはアルギニン代謝経路の中間体である。野生種スイカの葉の粗抽出液を用いた活性測定解析により、シトルリン代謝系の 12 種の代謝酵素群のうち、経路のボトルネックである AGK 酵素は、ストレスに伴い活性が増加するだけでなく、アルギニンによるフィードバック阻害が解除されることが示された。

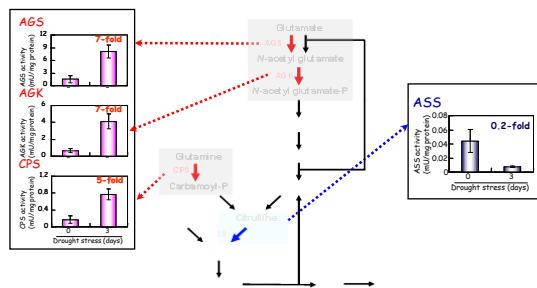


図1. 乾燥ストレス下の野生種スイカ葉組織におけるシトルリン合成経路の酵素活性の変化。ストレス0日目と3日目について示す。

組換え体タンパク質を用いた生化学的解析により、野生種スイカ由来の AGK 酵素は通常は経路の最終産物であるアルギニンにより顕著なフィードバック阻害を受けるが、P-II が共存する場合は、このフィードバック阻害が緩和されることが判明した。また、P-II タンパク質が、乾燥ストレス下の野生種スイカ葉において顕著な発現誘導を受けることが示された。すなわち、シトルリン蓄積において、ストレス誘導性の P-II タンパク質が代謝流量を維持する役割を果たすことが示唆

された。

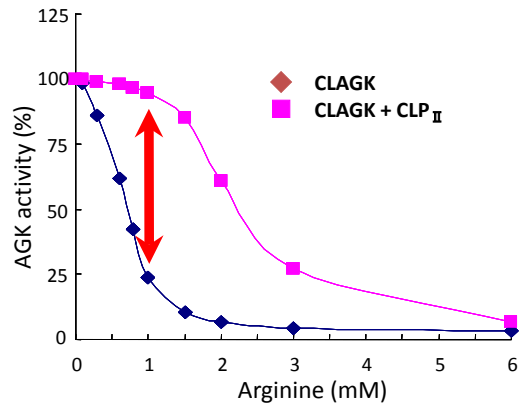


図2. P-IIタンパク質によるAGK酵素のアルギニン・フィードバック阻害の緩和。ストレス下の野生種スイカ葉組織のアルギニン濃度は約1 mMと見積もられる。野生種スイカAGK酵素(CLAGK)は、単独で存在する場合には1 mMアルギニンにより24%まで活性が低下する。一方、野生種スイカP-IIタンパク質の共存下では、約95%の活性を維持する。

また、P-II は油脂合成経路の初発酵素である ACCase とも相互作用し触媒活性を増大させるが、野生種スイカでは、乾燥ストレスに伴い葉の表皮におけるクチクラワックスの蓄積量が、顕著に増大することが示された。

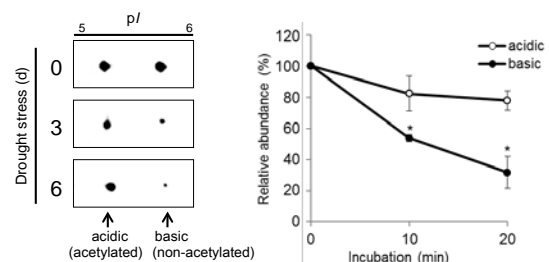


図3. 乾燥ストレス下におけるATP合成酵素 ϵ サブユニットの特異的分解。左図は二次元電気泳動とウェスタンプロテティング解析結果を指し、N末端がアセチル基修飾を受けた分子種は分解をほとんど受けないが、未修飾の分子種はストレス下で選択的に分解される様子を示す。右図は、in vitroでの ϵ サブユニットの特異的分解を示したもので、メタロペプチダーゼ酵素により、未修飾の ϵ サブユニット分子種が顕著に分解されることを示す。

さらに、乾燥ストレス下において、光合成タンパク質のうちチラコイド膜において存在量が多いATP合成酵素複合体が、分解することが示された。この分解過程においては、構成因子の一つである ϵ サブユニットの分解を引き金に、複合体全体の分解が引き起こされることが示された。また、葉緑体に存在する ϵ サブユニット分子の約半分のN末端がアセチル化の翻訳後修飾を受けており、分解過程においては、翻訳後修飾を受けていない分子種が優先的に分解を受けることが示さ

れた。さらにこの分解には、ストレス誘導性プロテアーゼが関与する可能性が示された。これら一連の研究結果により、環境ストレスに際して植物葉の窒素および炭素代謝を協調的に制御する仕組みについて、新規な分子的现象を見出すことができた。

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4件)

- ① Hoshiyasu, S., Kohzuma, K., Yoshida, K., Fujiwara, M., Fukao, Y., Yokota, A., Akashi, K.: Potential involvement of N-terminal acetylation in the quantitative regulation of the ϵ subunit of chloroplast ATP synthase under drought stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in print. 2013.
- ② Akashi, K., Yoshida, K., Kuwano, M., Kajikawa, M., Yoshimura, K., Hoshiyasu, S., Inagaki, N., Yokota, A.: Dynamic changes in the leaf proteome of a C3 xerophyte, *Citrullus lanatus* (wild watermelon), in response to water deficit. *Planta*, 233, 947-960. 2011.
- ③ Sanda, S., Yoshida, K., Kuwano, M., Kawamura, T., Munekage, Y-N., Akashi, K., Yokota, A.: Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiol. Plant.*, 142, 247-264. 2011.
- ④ Kajikawa, M., Morikawa, K., Abe, Y., Yokota, A., Akashi, K.: Establishment of a transgenic hairy root system in wild and domesticated watermelon (*Citrullus lanatus*) for studying root vigor under drought. *Plant Cell Rep.*, 29, 771-778. 2010.

[学会発表] (計11件)

- ① 明石欣也: アフリカ原産の野生種スイカ: 基礎研究から産業展開へ. 地方独立行政法人鳥取県産業術センター, 食品開発と健康に関する研究会, 第7回農・畜産物加工分科会, 倉吉, 鳥取. 2012. 8. 31.
- ② 星安紗希・吉田和生・藤原正幸・深尾陽一朗・横田明穂・明石欣也: N末端アセチル化修飾による葉緑体ATP合成酵素 ϵ サブユニットの量的制御, 日本農芸化学会本大会, 京都. 2012. 3. ① Akashi, K.: Involvement of carbon/nitrogen sensor P-II protein in the metabolic

adaptation to drought in a xerophyte *Citrullus lanatus*. Gordon Research Conference on Salt and Drought Stress, Les Diablerets, Switzerland. 2010. 6. 13.

- ③ Akashi, K.: *Citrullus* and *Jatropha*: Harnessing plant genetic resources for biomass production in Botswana. 28th IPSR International Symposium (co-sponsored by JSPS-AASPP). "Crop Production in East Africa and Innovative Plant Stress Science". Kurashiki, Okayama. 2011. 10. 7.
- ④ 星安紗希・吉田和生・上妻馨梨・藤原正幸・深尾陽一朗・横田明穂・明石欣也: 強光・乾燥ストレス下における葉緑体ATP合成酵素 ϵ サブユニットの量的制御. 日本植物細胞分子生物学会本大会, 福岡. 2011. 9. 6.
- ⑤ 明石欣也・渋谷安未・星安紗希・吉田信行・横田明穂: 強光乾燥下の野生種スイカにおけるクチクラ層ワックスの蓄積強化. 日本農芸化学会, 京都. 2011. 3. 27.
- ⑥ 星安紗希・吉田和生・上妻馨梨・深尾陽一朗・横田明穂・明石欣也: 翻訳後修飾による葉緑体ATP合成酵素 ϵ サブユニットの量的制御. 日本植物生理学会, 仙台. 2011. 3.
- ⑦ 明石欣也・三輪和哉・高原健太郎・高原(芳野)杏利・横田明穂: 適合溶質シトルリン生合成の鍵酵素 N-acetylglutamate kinase の解析. 日本農芸化学会関西支部大会, 奈良. 2010. 10. 3.
- ⑧ 明石欣也・三輪和哉・高原健太郎・高原(芳野)杏利・横田明穂: 砂漠植物における適合溶質シトルリンの生合成メカニズム. 日本植物細胞分子生物学会, 仙台. 2010. 9. 2.
- ⑨ Hoshiyasu, S., Yoshida, K., Kohzuma, K., Fukao, Y., Yokota, A., Akashi, K.: Involvement of post-translational modification in the quantitative regulation of ϵ subunit of chloroplast ATP synthase in a xerophyte, wild watermelon. 15th International Congress of Photosynthesis, Beijing, China. 2010. 8. 22.
- ⑩ Akashi, K.: Citrulline metabolism and physiological responses in a drought-tolerant wild watermelon (*Citrullus lanatus*) inhabiting in the Kalahari Desert, Africa. Exceptional Microbiological Colloquium. Interfakultares Institut fur Mikrobiologie und infektionsmedizin,

Tubingen University, Tubingen,
Germany. 2010. 6. 21.

- ⑪ Akashi, K.: Involvement of carbon/nitrogen sensor P-II protein in the metabolic adaptation to drought in a xerophyte *Citrullus lanatus*. Gordon Research Conference on Salt and Drought Stress, Les Diablerets, Switzerland. 2010. 6. 13.

[その他]

ホームページ等

<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/akashi/hikinya/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明石 欣也 (AKASHI KINYA)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：20314544

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし