

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：37102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450124

研究課題名(和文)植物の生体防御機構におけるポリアミンの役割の解明

研究課題名(英文)Analysis of polyamine functions in plant defense mechanism

研究代表者

高橋 芳弘 (TAKAHASHI, Yoshihiro)

九州産業大学・工学部・准教授

研究者番号：20390891

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)：本研究では、植物の生体内ポリアミン制御調節機構を明確化する事を目的として、ポリアミン分解に関わるポリアミンオキシターゼ(PAO)の機能解析に取り組んだ。そして、ミヤコグサ、トマト、ミナトカモジグサから複数のPAO遺伝子を単離すると共に、これらのタンパク質はスペルミンをスペルミジンへ、もしくは、スペルミジンをブトレッシンへ分解する事を明らかとした。また、ポリアミンの一種であるホモカルドペンタミンやカルドヘキサミンは、病原菌抵抗性反応に関わる遺伝子群を強く誘導する高機能分子である事が示された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the regulatory system responsible for polyamine homeostasis and action, I focused on polyamine degradation enzyme, polyamine oxidase (PAO), and identified some kind of genes coding PAOs from *Lotus corniculatus*, *Solanum lycopersicum* and *Brachypodium distachyon*. These proteins catalyzed spermine to spermidine, or spermidine to putrescine. Moreover, it was found that defense-related gene's expression is strongly induced by uncommon polyamines, homocaldopentamine and caldhexamine.

研究分野：農学

キーワード：ポリアミン ポリアミンオキシターゼ

1. 研究開始当初の背景

プトレッシン、スペルミジン、スペルミン、サーモスペルミンを代表とするポリアミン (図 1) は、植物の胚発生、細胞分裂、形態形成、維管束分化、花器官の発育促進、老化抑制など、植物の生長を司る様々な生理過程に関与する重要分子である。また、ポリアミン合成経路に関わる酵素遺伝子を過剰発現した植物は、様々な環境ストレス (病気の感染、塩、浸透圧、異常温度など) に対して強い耐性を示すことから、ポリアミンは生体防御にも深く関わることが示唆されている。しかし、ストレス耐性機構におけるポリアミンの作用点や耐性メカニズムに関してはほとんど明らかとされていなかった。

私は過去の研究において、病原菌感染時のポリアミンの役割に関する研究を行い、ポリアミン合成経路の最終産物であるスペルミンが、多数の生体防御関連遺伝子群の発現を制御する「シグナル分子」として、病原菌抵抗性反応に大きく寄与することを明らかとした。さらにスペルミンは、イオンチャネルの制御能を併せ持つことで、塩や乾燥ストレスといった非生物的ストレス耐性機構にも重要であることを証明した。こうした結果は、植物の生体内ポリアミン制御機構を明確化する事で様々な環境ストレスに強い理想的な農作物作出に繋がる大きな可能性が示唆された。そこで本研究では、植物における生体内ポリアミン制御機構を理解する事を目的とした。

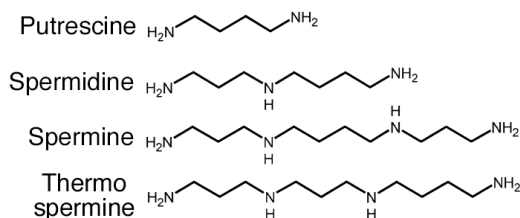


図 1. プトレッシン、スペルミジン、スペルミンおよびサーモスペルミンの構造。

2. 研究の目的

生体内で過剰に合成されたポリアミンは、ポリアミン分解に関わる主酵素である「ポリアミノオキシターゼ (PAO)」の働きによって分解される事から、PAO は生体内のポリアミン量を制御する鍵因子である可能性が高い。しかし、ポリアミン合成系に比較するとポリアミン分解系に関する知見は非常に少ないのが現状であった。そこで近年では、PAO に着目した研究を行っており、シロイヌナズナ全 PAO の酵素化学的特徴の理解と機能解析を通じて、植物の主要 PAO は、スペルミン、もしくはサーモスペルミンをスペルミジンへ、スペルミジンをプトレッシンへと分解するバックコンバージョン活性を有することを明らかとした (図 2)。そこで本研究では、引

き続きポリアミン分解機構に着目し、様々な植物中に保存されている PAO の特徴を明確化すると共に、これまでの知見と比較検討する事で幅広い植物種での共通機構・相違点を理解する事を目的の 1 つとする。

また、スペルミンは外から投与するだけでも植物体内へ吸収され、一定期間、病原菌抵抗性、塩、乾燥ストレス耐性能の向上を引き起こす事を明らかとしている。つまり、こうした機能を農薬的に利用する事で、農作物のストレス耐性能を一時的に強化できる大きな応用性も期待される。そこで本研究のもう一つの目的として、スペルミンよりも低濃度でストレス耐性能を向上させる可能性のある高機能ポリアミン型分子の探索と機能解析を行う。

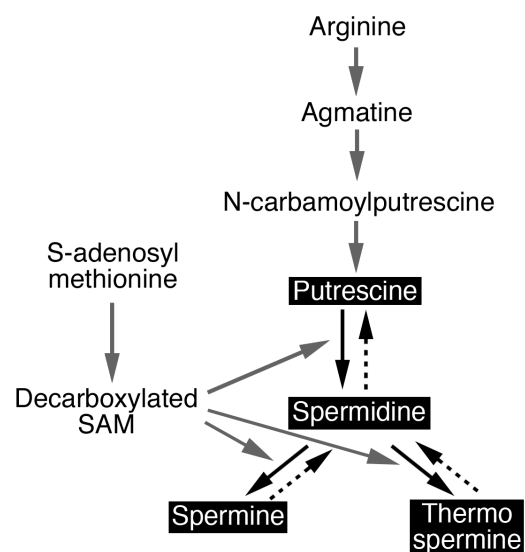


図 2. シロイヌナズナのポリアミン分解経路。黒実線が合成経路を示しており、黒点線が PAO による分解経路を示している。

3. 研究の方法

(1) 材料

実験には、シロイヌナズナ、ミヤコグサ、トマト、ミナトカモジグサを用いた。分子生物学的解析に用いる様々な組織やポリアミンを処理した植物葉は、サンプリング後直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで -80℃ にて保存した。植物体サンプルからの RNA 抽出には、キアゲン社の RNA 抽出キットを使用した。抽出 RNA は DNase 処理後、様々な分子生物学的解析に使用した。

(2) リアルタイム PCR

DNase 処理後の RNA は、TOYOBO 社のキットを用いて逆転写反応を行った。そして、逆転写反応によって生じた cDNA を鋳型として用い、リアルタイム PCR 解析に供した。反応には Roche 社の SYBR green master mix を用い、反応条件はキットに付随するプロトコール

に従った。また、反応後の PCR 産物は、電気泳動法を用いて単一バンドである事を確認した。

(3) ポリアミン測定

5%過塩素酸にて抽出、もしくは反応を停止したポリアミン溶液は、アルカリ条件下でベンゾイル化し、ベンゾイル化ポリアミンをジエチルエーテルによって回収・濃縮後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 解析に供した。ベンゾイルポリアミンは 42%アセトリル条件下、ODS カラムで分離し、254nm を計測した。

(4) タンパク質精製

PAO 遺伝子をタンパク質発現ベクターにクローニングし、大腸菌 B121 株、もしくは、それと類似する株を用いてタンパク質発現を行った。回収した菌体を超音波で処理する事で可溶性タンパク質を抽出し、ヒスチジンタグが付与している発現タンパク質をニッケルカラムによって精製した。精製タンパク質は SDS-PAGE によって純度を確認後、酵素化学的解析に供した。

(5) 酵素活性解析

基質特異性の解析には、ポリアミンが分解される際に副産物として生じる過酸化水素を、間接的に分光光度計にて定量する手法を用いた。

(6) その他

その他、それぞれの特徴にあわせた機能解析を、生物検定や分子生物学的手法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) PAO の機能解析

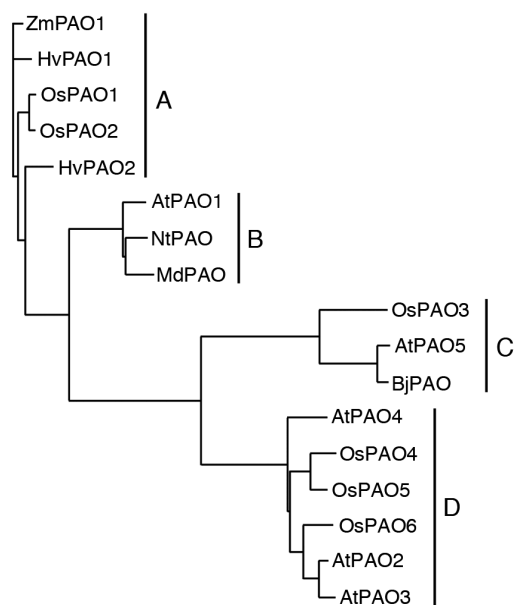


図 3. データーベース上に存在する PAO アミノ

酸配列を用いた系統樹解析。

At: *Arabidopsis thaliana*

Bj: *Brassica juncea*

Hv: *Hordeum vulgare*

Md: *Medicago truncatula*

Nt: *Nicotiana tabacum*

Os: *Oryza sativa*

Zm: *Zea mays*

データベース上に存在する様々な PAO 遺伝子群を元に系統樹解析を行った結果、植物の PAO は 4 つのグループ (A~D) (図 3) に分類される。シロイヌナズナおよびイネの一部の PAO の酵素化学的特徴は先行研究によって明らかとしている為、双子葉植物としてミヤコグサおよびトマトの、単子葉植物としてミナトカモジグサの PAO 遺伝子の単離を試みた。そして、それぞれの植物からグループ D に属する新規 PAO 遺伝子を単離した。そこで、これらの遺伝子配列を用いてリコンビナントタンパク質を作製し、酵素化学的特徴の理解を試みた。代表的な例としてミナトカモジグサの BdPAO4 に関する解析結果を図 4 に示すが、BdPAO4 リコンビナントタンパク質を分光光度計で測定した結果、フラビン結合タンパク質の特徴である 2 つのスペクトルピーク (380nm 付近と 460nm 付近) が確認された (A)。さらに、本タンパク質の基質特異性を調査した結果、シロイヌナズナ AtPAO4、イネ OsPAO4、OsPAO5 と同様、スペルミンに対する基質特異性が極めて高く、スペルミジンやプトレッシンに関してはほとんど活性が無い事が示された (B)。

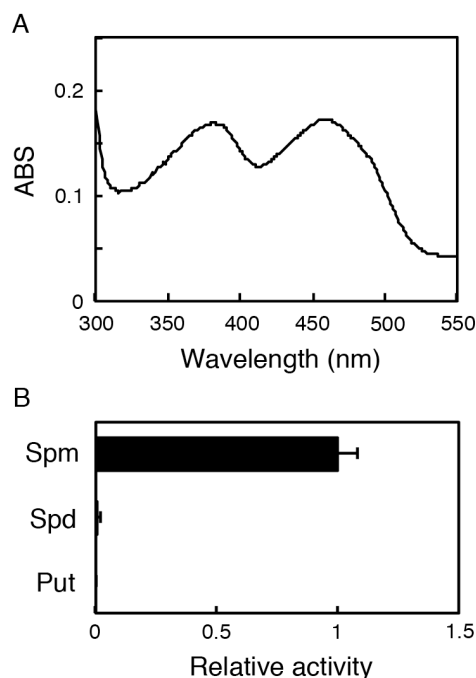


図 4. ミナトカモジグサ PAO リコンビナントタンパク質の吸収スペクトル (A) と基質特異性解析 (B)。

Spm: スペルミン
 Spd: スペルミジン
 Put: プトレッシン

他の複数の因子に関しても同様の調査を行い、グループDに属するPAOは、比較的相同性が高いもののテトラアミン分解を行う因子とトリアミン分解を行う因子の2つのタイプの存在が確認された。そこで、基質特異性の異なる因子群の比較解析および2つの遺伝子断片を1つにつなげたキメラタンパク質群の作製し、基質認識機構の詳細な解析を行った結果、ポリアミン認識に関わる可能性の高い一部領域を同定する事が出来た。

(2) ポリアミン型機能分子の探索

テトラアミンであるスペルミンおよびサーモスペルミンは、病原菌抵抗性反応に関わる複数の遺伝子群の発現を制御するシグナル分子としての機能が明らかとされている。そこで、これらのテトラアミン以上に効果の高いポリアミン型機能分子の探索を行うべく、高度好熱菌などの特殊な生物が生産する様々な長鎖・分岐型ポリアミンに着目した(図5に代表的な構造を示す)。

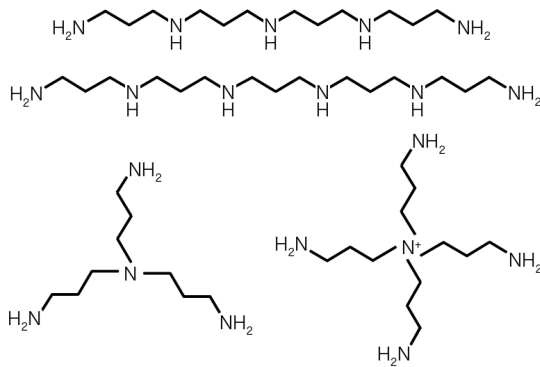


図5. 高度好熱菌が生産する特殊な形のポリアミン類。

そして、これらの特殊ポリアミンを含む計12種類のポリアミン類をシロイヌナズナ植物体に処理し、RNAを抽出後、リアルタイムPCRによって複数の病原菌抵抗性反応に関わる遺伝子群の発現量を比較した。その結果、通常の植物体では生産されないホモカルドペンタミン(HCPA)やカルドヘキサミン(CH A)等の長鎖型ポリアミンは、スペルミンに比較して数十倍~数百倍強い遺伝子発現誘導能を保持している事が示された(図6)。今後更なる検討を重ねる事で、ポリアミンを農薬的に用いた環境に優しい育種法に応用出来る可能性が示された。

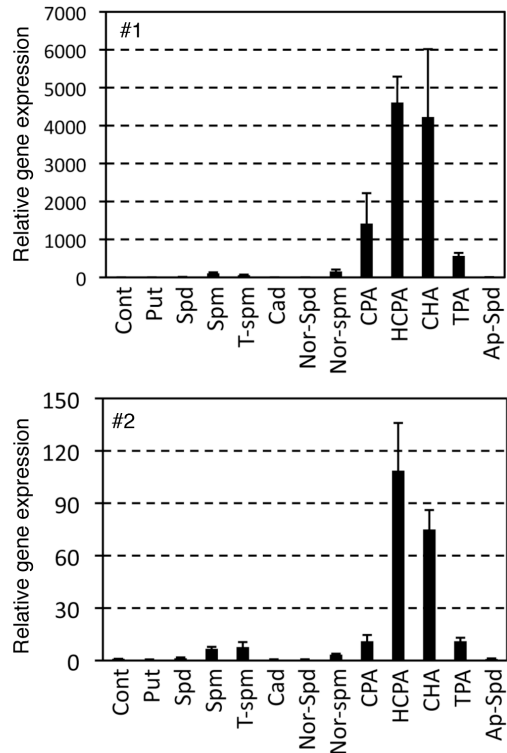


図6. 様々なポリアミン類を処理した際の病原菌抵抗性反応に関わる遺伝子群(#1および#2)発現量の変化。コントロールであるポリアミン未処理区を1として相対的に表示している。

Put: プトレッシン
 Spd: スペルミジン
 Spm: スペルミン
 T-Spm: サーモスペルミン
 Cad: カダベリン
 Nor-Spd: ノルスペルミジン
 Nor-Spm: ノルスペルミン
 CPA: カルドペンタミン
 HCPA: ホモカルドペンタミン
 CHA: カルドヘキサミン
 TPA: サーモペンタミン
 Ap-Spd: アミノプロピルスペルミジン

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3件)

- ① Takahashi Y. The role of polyamines in plant disease resistance. *Environmental Control in Biology*. 査読有. 54. 2016. 17-21. DOI: 10.2525/ecb.54.17
- ② Sagor GHM, Berberich T, Takahashi Y., Niitsu M, Kusano T. The polyamine spermine protects *Arabidopsis* from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic*

Research. 査読有. 22. 2013. 595-605.
DOI: 10.1007/s11248-012-9666-3

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 高橋芳弘, トーマスベルベリッヒ. 様々な植物種における生体内ポリアミン分析. 日本農芸化学会. 2016年3月28日. 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 芳弘 (TAKAHASHI Yoshihiro)
九州産業大学・工学部物質生命化学科・准教授

研究者番号：20390891