

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19039032

研究課題名（和文）植物オルガネラにおけるヌクレオシド 2-リン酸類縁体の代謝

研究課題名（英文）Metabolisms of nucleoside 2-phosphate derivatives in plant organelles

研究代表者

重岡 成 (SHIGEOKA SHIGERU)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：80140341

研究成果の概要：

本研究から、植物における Nudix hydrolase (AtNUDX) は多様な生理的役割を果たしていることが明らかになった。すなわち、シロイヌナズナ細胞質局在型の AtNUDX1 は酸化ヌクレオチド浄化、AtNUDX2 は ADP-リボースのリサイクル、AtNUDX7 は NADH 代謝を介した PAR 反応制御により酸化ストレス防御に機能していることを明らかにした。また、推定オルガネラ局在型の AtNUDX15、14、19、および 23 の細胞内局在性および特異的基質も明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	2,300,000	0	2,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	4,600,000	0	4,600,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：特定領域研究・オルガネラ分化

キーワード：Nudix hydrolase, ヌクレオシド 2-リン酸, DNA 突然変異, 酸化ストレス, 酸化ヌクレオチド, ポリ (ADP-リボシル) 化, ADP-ribose, NADH

1. 研究開始当初の背景

Nudix hydrolase は、酸化ヌクレオチド (8-oxo-dGTP, 2-OH-dATP など)、ADP-ribose、NADH、FAD、CoA などの生体分子が含まれるヌクレオシド 2-リン酸類縁体に対する加水分解活性を有する酵素ファミリーである。高等植物のシロイヌナズナ (At) には 27 種類の Nudix hydrolase 相同遺伝子 (細胞質型：AtNUDX1～11, 25、ミトコンドリア型：

AtNUDX12～18、葉緑体型：AtNUDX19～24, 26, 27) が存在している。したがって、それらはミトコンドリア、葉緑体、細胞質などの種々のオルガネラで多様な代謝反応の制御に深く関与していると推測される。しかしこれまでに、本酵素が酸化ヌクレオチド以外のヌクレオシド 2-リン酸類縁体の代謝に関与することの生理的意義については全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

Nudix (Nucleoside Diphosphate linked some moiety X) hydrolase は、ヌクレオシド 2-リン酸類縁体に対する加水分解活性を有する酵素ファミリーである。高等植物シロイヌナズナには細胞質 (12 種)、ミトコンドリア (7 種)、葉緑体 (8 種)などに計 27 種類もの Nudix hydrolase が局在していると推測されることから、各オルガネラでの種々のヌクレオシド 2-リン酸類縁体の代謝が酸化ストレス応答や代謝調節などの多様な細胞応答に大きな影響を与えていることが示唆される (図 1)。そこで本研究では、ミトコンドリア型 (AtNUDX12~18) および葉緑体型 (AtNUDX19~24, 26, 27) AtNUDX の分子特性、および各オルガネラにおける AtNUDX による種々のヌクレオシド 2-リン酸類縁体 (特に、酸化ヌクレオチド, ADP-ribose, NAD(P)H, FAD, CoA など) の代謝制御の全容を明らかにすることを目的とする。

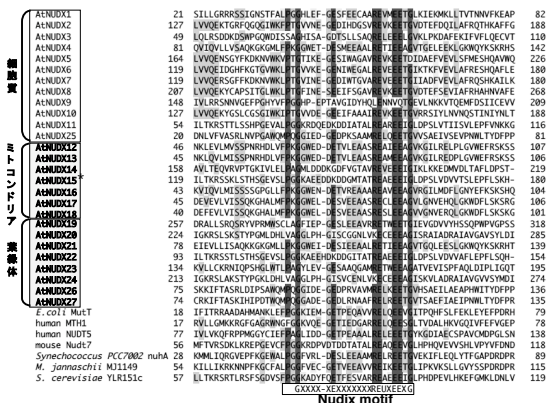


図 1. シロイヌナズナ Nudix hydrolase ファミリーの Nudix モチーフ近傍のアライメント
* 選択的スプライシングによりペルオキシソーム (PTS1) 局在型

3. 研究の方法

シロイヌナズナにおける推定ミトコンドリア型 (AtNUDX12~18) および葉緑体型 (AtNUDX19~24, 26, 27) AtNUDX の分子特性を明らかにするために、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を生成した。得られたリコンビナントタンパク質は Ni アフィニティークロマトグラフィーにより単一に精製した。

AtNUDX の細胞内局在性を明らかにするために、GFP 融合タンパク質発現プラスミドを構築した。得られたプラスミドはアグロバクテリアを用いて植物培養細胞 (タバコ BY-2 株、シロイヌナズナ緑色培養細胞 T-87 株) に形質転換した。

AtNUDX1, 2, 6, 7, 19, 23 の生理機能を明らかにするために、それぞれの遺伝子破壊株を SALK より入手した。また、それらの過剰発現株は CaMV プロモーターを用いた定法に従って作製した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ全 Nudix hydrolase (AtNUDX1~27) の分子特性の解析

これまでに我々は、細胞質局在型 AtNUDX の分子特性を明らかにしている (Ogawa et al. *J. Biol. Chem.* 280: 25277-25283, 2005)。すなわち、それらは酸化ヌクレオチド (AtNUDX1)、ADP-ribose および NADH (AtNUDX2, 6, 7, 10)、CoA (AtNUDX11)、ApoA (AtNUDX25) に対して特異的な加水分解活性を有していた。そこで、推定ミトコンドリア型 (AtNUDX12~18) および葉緑体型 (AtNUDX19~24, 26, 27) AtNUDX の分子特性を明らかにするために、それらのリコンビナントタンパク質を用いた酵素学的性質の解析を行った。その結果、AtNUDX14 は ADP-ribose、AtNUDX15 は CoA および種々の CoA 誘導体、AtNUDX19 は NADPH、AtNUDX 23 は FAD を特異的基質とすることが分かった (図 2)。

次に、これらの AtNUDX の細胞内局在性を GFP 融合タンパク質を用いて解析した。その結果、AtNUDX15 はミトコンドリア、AtNUDX14、AtNUDX19 および 23 は葉緑体に局在することが確認された (Ogawa & Yoshimura et al. *Plant Physiol.* 2008)。

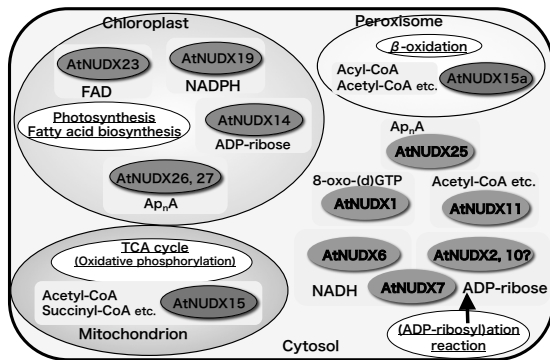


図 2. AtNUDX の細胞内局在性と推定される機能

(2) 種々のヌクレオシド 2-リン酸類縁体代謝の生理的意義の解明

① DNA/RNA 酸化傷害に対する防御機構

AtNUDX の分子特性から、シロイヌナズナには細胞質局在型の AtNUDX1 が唯一の酸化ヌクレオチド加水分解酵素として存在することが示された。大腸菌を用いた相補試験の結果、AtNUDX1 は大腸菌 *mutT* 欠損株における DNA の突然変異および mRNA の転写エラー発生頻度を抑制した。また、シロイヌナズナ *nudix1* 破壊株では、正常および酸化ストレス条件下での酸化塩基 (8-oxo-dG) 量が顕著に増加していた (図 3)。これらのことから、AtNUDX1 は細胞質のヌクレオチドプールの浄化により、酸化ヌクレオチドの核、ミトコンドリアおよび葉緑体ゲノムへの取り込みを防いでいることが示された (図 4) (Yoshimura et al. Plant Cell Physiol. 2007)。

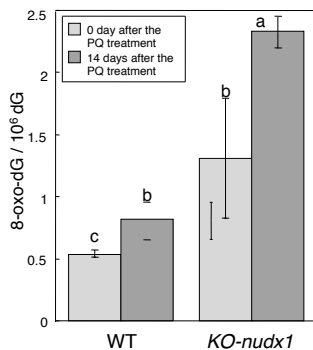


図 3. AtNUDX1 破壊株 (*KO-nudx1*) の酸化ストレス下でのゲノム中の 8-oxo-dG 蓄積
播種 7 日後の植物体を 3 μM パラコートを含む培地で 7-14 日間栽培した。

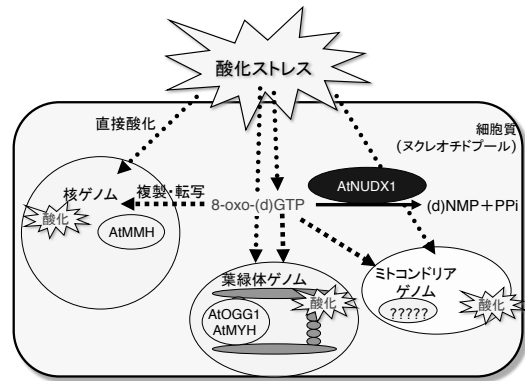


図 4. シロイヌナズナにおけるヌクレオチドおよび DNA の酸化損傷とその修復機構
AtMMH, AtOGG1, AtMYH: 酸化塩基除去修復酵素

② ADP-ribose/NADH 代謝によるヌクレオチドリサイクルおよび poly (ADP-ribose)ation 反応の制御

シロイヌナズナには ADP-ribose および NAD(P)H pyrophosphatase 活性を示す Nudix hydrolase アイソザイム (細胞質型 AtNUDX2, 6, 7, 10、ミトコンドリア型 AtNUDX14、葉緑体型 AtNUDX19) が存在することを示した。興味深いことに、ADP/NADH 特異的 AtNUDX (AtNUDX2 および 7) の発現は酸化ストレス耐性能と相関していた (図 5)。過剰発現株および発現抑制株における ADP-ribose, NADH, NAD⁺, ATP, poly (ADP-ribose) 量の解析の結果 (図 6, 7)、AtNUDX2 はポリ (ADP-リボシル) 化サイクルから生成する遊離 ADP-リボースのリサイクルにより、細胞内エネルギー状態を維持することで酸化ストレス耐性に寄与していることが示された (図 8) (Ogawa et al. Plant J. 2009)。

また、AtNUDX7 は生体内で AtNUDX2 とは異なり ADP-ribose だけでなく、NADH 代謝を介した PAR 反応制御にも関与することで酸化ストレス防御に機能していることが示唆された (図 8)。さらに、その PAR 反応制御により、DNA 一本鎖損傷および DNA 相同組換え修復因子の発現量が制御されていた (Ishikawa et al. in preparation)。

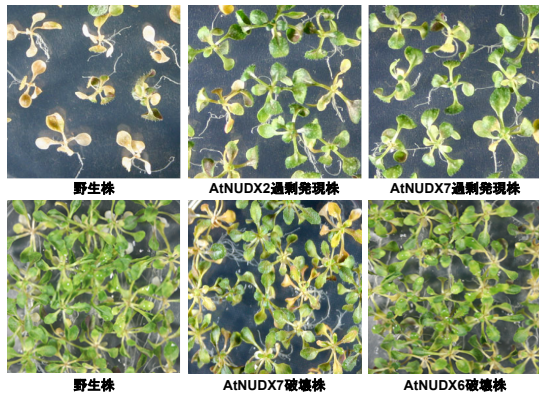


図 5. AtNUDX2, 7 過剰発現株および AtNUDX6, 7 破壊株のパラコート耐性能
上段: 播種 7 日後の植物体を 3 μ M (上段) もしくは 2 μ M (下段) パラコートを含む培地で 7 日間栽培し、その後通常培地でさらに 7 日間栽培した。

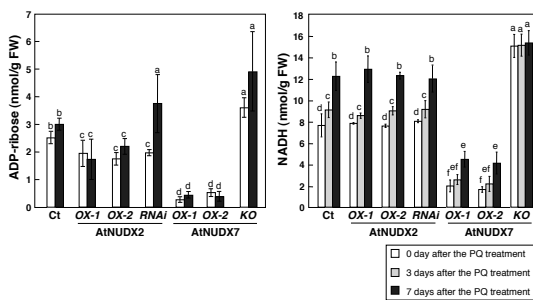


図 6. 酸化ストレス下における ADP-ribose/NADH 量の変化
播種 7 日後の植物体を 3 μ M パラコートを含む培地で 3-7 日間栽培した。

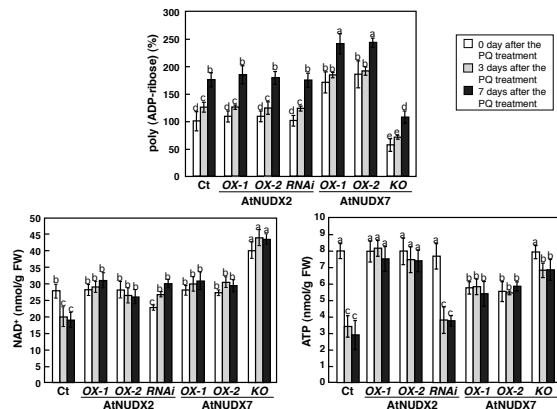


図 7. 酸化ストレス下における poly(ADP-ribose)、NAD⁺および ATP 量の変化
播種 7 日後の植物体を 3 μ M パラコートを含む培地で 3-7 日間栽培した。

む培地で 3-7 日間栽培した。

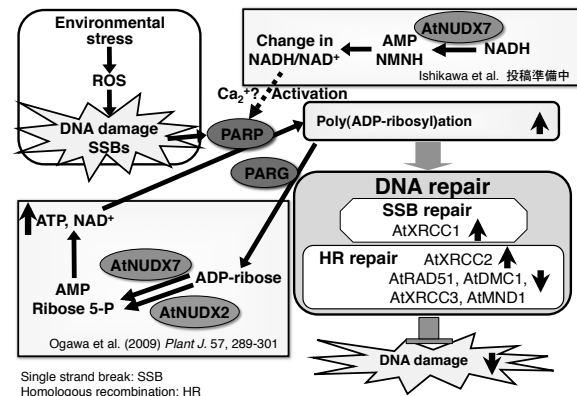


図 8. 酸化ストレス下における AtNUDX2 および 7 の役割

③ NADPH、CoA および FAD の代謝制御

・シロイヌナズナ野生株の葉において AtNUDX19 に由来する NADPH pyrophosphohydrolase 活性が認められた。また、*nudix19* 破壊株では細胞内 NADPH 量が増加していた (図 9)。

・シロイヌナズナ遺伝子破壊株の解析から、AtNUDX11 および AtNUDX15 は全 CoA pyrophosphohydrolase 活性の約 20%および 50%に寄与していることが示された (図 10)。

・シロイヌナズナ葉の粗酵素液において、FAD pyrophosphohydrolase 活性 (135.3 \pm 5.8 nmol/min/mg protein) が検出された。また、イオン交換クロマトグラフィーにより、リコンビナントタンパク質と同様の活性を示す、単一のピークが認められた。AtNUDX23 発現抑制株 (KD-*nudx23*) および過剰発現株 (OE-*NUDX23*) における FAD 加水分解活性は、コントロール株と比較してそれぞれ 60%および 150%であった (図 11)。そこで、RF、FMN および FAD レベルを測定したところ、OE-*AtNUDX23* 株のみではなく、KD-*nudx23* 株においても各々の化合物レベルが減少していた。

これらの結果から、AtNUDX11, 15, 19, 23 は細胞内での CoA, NADPH, FAD の代謝制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

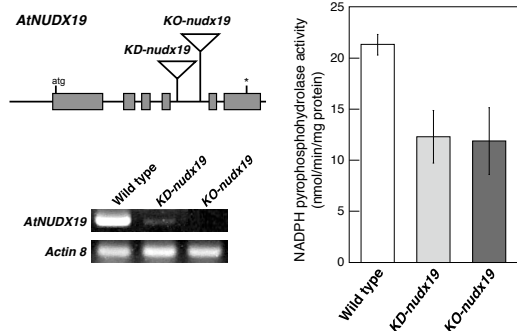


図 9. AtNUDX19 遺伝子破壊株 (KO-nudx19) の作出
T-DNA 挿入位置 (左上)、RT-PCR (左下段)、活性 (右)

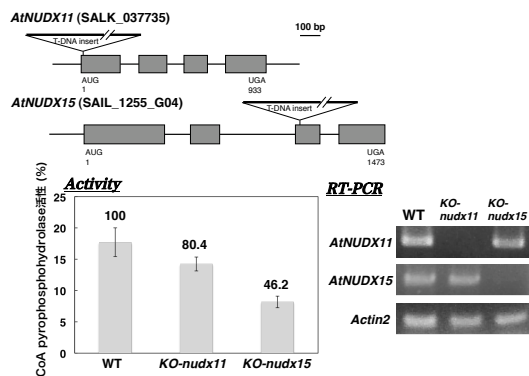


図 10. AtNUDX11 および 15 遺伝子破壊株 (KO-nudx11, 15) の作出
T-DNA 挿入位置 (左上)、活性 (左下段)、RT-PCR (右)

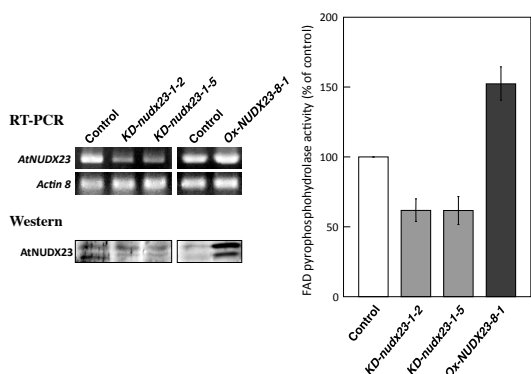


図 11. AtNUDX23 遺伝子発現抑制株 (KD-nudx23) の作出
RT-PCR (左上段)、ウエスタンブロット (左下段)、活性 (右)

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 8 件)

- Ogawa, T., Ishikawa, K., Harada, K., Fukusaki, E., Yoshimura, K. and Shigeoka, S. (2009) Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, *AtNUDX2*, confers enhanced tolerance to oxidative stress on *Arabidopsis* plants. (有) *Plant J.* 57, 289-301
- Ogawa, T. *, Yoshimura, K. *, Miyake, H., Ishikawa, K., Ito, D., Tanabe, N. and Shigeoka, S. (2008) Molecular characterization of organelle-type Nudix hydrolases in *Arabidopsis thaliana*. (有) *Plant Physiol.* 148, 1412-1424 *: These authors contributed equally.
- Ogawa, T., Yoshimura, K., Shigeoka, S. (2008) Functional analysis of an 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, *AtNUDX1*, involved in repair of oxidative DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. (無) *Photosynthesis*. Energy from the Sun 1323-1326
- Yoshimura, K., Ogawa, T., Ueda, Y. and Shigeoka, S. (2007) *AtNUDX1*, an 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, is responsible for eliminating oxidized nucleotides in *Arabidopsis*. (有) *Plant Cell Physiol.* 48, 1438-1449
- Tanabe, N., Yoshimura, K., Kimura, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. (2007) Differential expression of alternatively spliced mRNAs of *Arabidopsis* SR protein homologues, *atSR30* and *atSR45a*, in response to environmental stress. (有) *Plant Cell Physiol.* 48, 1036-1049
- Yabuta, Y., Mieda, T., Rapolu, M., Nakamura, A., Motoki, T., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2007) Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in *Arabidopsis*. (有) *Journal of Experimental Botany* 58, 2661-2671
- 吉村和也、薮田哲行、石川孝博、重岡 成 (2007) レドックス制御に関わるアスコルビン酸およびスクレオシドニリン酸類縁体 (Nudix) (無) ビタミン 81, 83-93
- 薮田行哲、小川貴央、吉村和也、重岡 成 (2007) 植物のレドックス制御機構と環境ストレス応答への関与. (無) 蛋白質 核酸 酵素 52, 578-584

[学会発表] (計 22 件)

1. 石川和也ら シロイヌナズナ Nudix hydrolase, AtNUDX23 による FAD 代謝の制御機構 2009 年 3 月 27-29 日 農芸化学学会 2009 年度大会 (福岡)
2. 吉村和也ら 2009 年 3 月 27-29 日 植物における酸化ヌクレオチド蓄積の防御機構の解明 農芸化学学会 2009 年度大会 (福岡)
3. 石川和也ら シロイヌナズナ ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase, AtNUDX7, による poly (ADP-ribosyl)ation 反応の制御が酸化ストレス耐性に及ぼす影響 2009 年 3 月 21-24 日 第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋)
4. 伊藤大輔ら CoA 及びその誘導体の代謝における CoA pyrophosphohydrolase の役割 2009 年 3 月 21-24 日 第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋)
5. 伊藤大輔ら シロイヌナズナ CoA pyrophosphohydrolase による CoA 及びその誘導体の代謝制御 2008 年 12 月 8-12 日 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)
6. 石川和也ら 酸化ストレス下でのシロイヌナズナ ADP-ribose/NAD(P)H pyrophosphatase による poly (ADP-ribosyl)ation 反応の制御 2008 年 12 月 8-12 日 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)
7. 伊藤大輔ら シロイヌナズナ CoA pyrophosphohydrolase が CoA 及びその誘導体の代謝に及ぼす影響 2008 年 9 月 13 日 日本農芸化学会 関西支部大会 (京都)
8. 吉村和也ら オルガネラにおけるヌクレオシド-2 リン酸類縁体の代謝制御 日本ビタミン学会 第 60 回大会 2008 年 6 月 13-14 日 (仙台)
9. 石川和也ら 植物 ADP-リボース/NADH ピロホスファターゼの酸化ストレス下における生理機能 2008 年 6 月 13-14 日 日本ビタミン学会 第 60 回大会 (仙台)
10. 小川貴央ら シロイヌナズナ葉緑体局在型 Nudix hydrolase によるヌクレオシド-2 リン酸類縁体の代謝 2008 年 3 月 26-29 日 農芸化学学会 2008 名古屋大会 (名古屋)
11. 吉村和也ら シロイヌナズナミトコンドリア局在型 Nudix hydrolase によるヌクレオシド-2 リン酸類縁体の代謝 2008 年 3 月 26-29 日 農芸化学学会 2008 名古屋大会 (名古屋)
12. 石川和也ら 酸化ストレス下におけるシロイヌナズナ Nudix hydrolase による ADP-リボース/NADH の代謝制御 2008 年 3 月 26-29 日 農芸化学学会 2008 名古屋大会 (名古屋)
13. 吉村和也ら シロイヌナズナ ADP-リボース/NADH ピロホスファターゼの酸化ストレス耐性への寄与 2008 年 3 月 20-22 日 第 49 回日本植物生理学会年会 (札幌)
14. 小川貴央ら シロイヌナズナ葉緑体での Nudix hydrolase による NADPH および FAD の代謝制御 2008 年 3 月 20-22 日 第 49 回日本植物生理学会年会 (札幌)
15. 伊藤大輔ら シロイヌナズナ CoA pyrophosphohydrolase の分子特性と機能解析 2008 年 3 月 20-22 日 第 49 回日本植物生理学会年会 (札幌)
16. 吉村和也ら シロイヌナズナ AtNUDX1 による DNA/RNA 酸化損傷に対する防御機構 2007 年 12 月 11-14 日 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) ワークショップ
17. 小川貴央、伊藤大輔、石川和也、吉村和也、重岡成 2007 年 12 月 11-14 日 植物におけるオルガネラ局在型 Nudix hydrolase によるヌクレオシド-2 リン酸類縁体の代謝 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (横浜)
18. 小川貴央ら シロイヌナズナ 8-oxo-(d)GTP pyrophosphohydrolase, AtNUDX1 によるヌクレオチドプールの浄化 2007 年 9 月 21-22 日 日本農芸化学会 関西支部中部支部合同大会 (愛知)
19. Yoshimura, K. et. al. Functional analysis of *Arabidopsis* Nudix hydrolases under oxidative stress. ROS in Plants 2007. A SFFR Plant Oxygen Group meeting on reactive oxygen and nitrogen species. 2007. 9.12-14 Signalling & Metabolism, Oxidative stress, Antioxidants (September 12, 13 & 14 2007, Ghent, Belgium)
20. Ogawa, T. et. al. Functional analysis of an 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, AtNUDX1, involved in repair of oxidative DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. 2007. 7. 22-27 14th Photosynthesis Congress (22nd to 27th July 2007, at the SECC in Glasgow UK)
21. 吉村和也ら シロイヌナズナのオルガネラ局在型 Nudix hydrolase によるヌクレオシド-2 リン酸類縁体の代謝 2007 年 5 月 24-25 日 日本ビタミン学会 第 59 回大会 (長崎)
22. 小川 貴央ら シロイヌナズナ細胞質型 ADP-リボース/NADH ピロホスファターゼの生理機能の機能解析 2007 年 5 月 24-25 日 日本ビタミン学会 第 59 回大会 (長崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重岡 成 (SHIGEOKA SHIGERU)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：80140341

(2) 研究分担者

吉村和也 (YOSHIMURA KAZUYA)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：90379561