
高等植物におけるオイルボディの生化学

(課題番号 11694086)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 平田敏文

(広島大学大学院理学研究科教授)

はじめに

植物は香料や医薬となりうる有用な物質を生産し、蓄積しており、人類はそのような機能を直接的あるいは間接的に活用している。これまでに植物における有用物質の生産過程については多くの知見が得られている。しかしながら生体物質の蓄積や細胞外分泌の過程については未解決の部分が多い。それは植物細胞内で物質の蓄積・分泌をつかさどるオルガネラ（オイルボディ、プロテインボディ、液胞など）の超分子構造や機能が不明であることに起因している。特にオイルボディは、発芽、成長、登熟などの植物の生活環において活発に変動するオルガネラであり、植物細胞による物質生産機能の全容を明らかにするためには、このオイルボディとの関連において生体物質の生成・代謝およびその調節機構を解明することが必須と考えられた。また、高度に疎水場であるオイルボディ内で展開される個々の反応を総合的に組み合わせ調節することにより、化学合成が困難な生体高分子の合成への発展も望まれる。このような観点から、「オイルボディの生化学」のプロジェクトを立ち上げた。このプロジェクトは平成9-10年度に日本学術振興会 日英科学協力事業の援助を受けてスタートしたが、引き続いて基盤研究 (B) (国際学術研究から移行) の援助を受けて研究にあたった。

本研究では特に、植物細胞のオイルボディの機能解明として、特にオイルボディ複合体の構造の解明、オイルボディ内へのストレス応答物質の蓄積機構の解明、およびオイルボディに内在する蛋白質の構造と機能の解明を計った。

平成13年(2001年)3月
研究代表者 平田敏文

平成11年度－12年度 科学研究費補助金 基盤研究(B)(2) 研究成果報告書

1. 研究課題

高等植物におけるオイルボディの生化学

2. 課題番号

11694086

3. 研究代表者

平田敏文 (広島大学大学院理学研究科・教授)

4. 研究分担者

泉俊輔 (広島大学大学院理学研究科・助教授)

太田伸二 (広島大学機器分析センター・助教授)

5. 研究経費

平成11年度 2,500 千円

平成12年度 2,100 千円

計 4,600 千円

6. 研究発表

(ア) 学会誌等

- (1) A 20-kDa Protein with the GTP-Binding and Trypsin Inhibitory Activities from *Glycine max*
T. Hirata, S. Izumi, and S. Tsuji, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63** (10), 1816-1818 (1999).
- (2) Isolation of a cDNA Encoding for a Carboxypeptidase, having Leucine Zipper Structure at the N-terminal Region, from the cultured Shoot Primordia of *Matricaria chamomilla*
C. Kochi, M. Yasuda, and T. Hirata, *Plant Biotechnology*, **16** (5), 409-412 (1999).
- (3) Geraniol Is a Potent Inducer of Apoptosis-like Cell Death in the Cultured Shoot Primordia of *Matricaria chamomilla*
S. Izumi, O. Takashima, and T. Hirata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 519-522 (1999).
- (4) ミドリムシに対する強磁場の影響 (Effects of High Magnetic Field upon *Euglena gracilis*)
Y. Tanimoto, S. Izumi, K. Furuta, T. Suzuki, Y. Fujiwara, T. Hirata, G. Yamada, and K. Itoh, *環境科学会誌*, **13** (1), 61-67 (2000).
- (5) Isolation and Sequencing of a cDNA Clone Encoding a 20-kDa Protein with Trypsin Inhibitory Activity
Y. Ashida, A. Matsushima, Y. Tsuru, T. Hirota, and T. Hirata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64** (6), 1305-1309 (2000).
- (6) Cloning of cDNA Encoding Ethylene-Responsive Element Binding Protein-5 in the Cultured Cells of *Nicotiana tabacum*
Y. Ashida, N. Yokobatake, C. Kochi, K. Shimoda, and T. Hirata, *DNA Sequence*, **11** (1-2), 125-129 (2000).
- (7) Biotransformation of Hydroxycoumarins by the Cultured Cells of *Nicotiana tabacum*
T. Hirata, K. Shimoda, T. Fujino, and S. Ohta, *J. Mol. Cat. (B): Enz.*, **10**, 477-481 (2000).

- (8) Isolation and Structure Determination of a cDNA Encoding a Thiol Protease from the Cultured Shoot Primordia of *Matricaria chamomilla*
C. Kochi, M. Yasuda, and T. Hirata, *Plant Biotechnol.*, **17** (3), 253-257 (2000).
- (9) Isolation and Identification of Cell Hypertrophy-Inducing Substances in the Gall-Forming Aphid *Colopha moriokaensis*
S. Ohta, N. Kajino, H. Hashimoto, and T. Hirata: *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30** (10), 947-952 (2000).
- (10) Facile Syntheses of [8,9-²H₂]- and [8-²H]-Digeranyl
O. Nakagawa, K. Shimoda, S. Izumi, and T. Hirata, *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **43**, 1301-1309 (2000).
- (11) A 37-kDa Peroxidase Secreted from Liverworts in Response to Chemical Stress
T. Hirata, Y. Ashida, H. Mori, D. Yoshinaga, and L. J. Goad, *Phytochemistry*, **55**, 197-202 (2000).
- (12) A 38 kDa Allylic Alcohol Dehydrogenase from the Cultured Cells of *Nicotiana tabacum*
T. Hirata, Y. Tamura, N. Yokobatake, K. Shimoda, and Y. Ashida, *Phytochemistry*, **55**, 297-303 (2000).

(イ) 口頭発表

- (1) Ryoichi Utsumi, Shunsuke Izumi, and Toshifumi Hirata
Enantioselective hydrolyses of α -alkylated cyclohexanol acetates by the cultured cells of *Marchantia polymorpha*
4th Int. Symp. Biocat. Biotrans., Giardini Naxos-Taormina (Italy) (1999年9月26日-10月1日).
- (2) 権代隆行, 下田 恵, 平田敏文
生体触媒による不斉反応—クロレラ培養細胞によるエノン類の不斉還元
第43回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 大分 (1999年10月1日-2日).
- (3) 吉田貴之, 泉 俊輔, 平田敏文
ゼニゴケ培養細胞における非メバロン酸経路でのカロチノイド合成
第43回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 大分 (1999年10月1日-2日).
- (4) 安田 仁, 河内千恵, 平田敏文
植物細胞の生体防御—カミツレ培養細胞に存在するプロテアーゼ類
日本化学会中国四国・九州支部合同大会, 徳島 (1999年10月9日-10日).
- (5) 泉 俊輔, L. J. Goad, 西尾陽介, 平田敏文
高等植物はモノテルペノイドでアポトーシスを引き起こす—その初期過程の解明
第41回天然有機化合物討論会, 名古屋 (1999年10月13日-15日).
- (6) 平田敏文
生体触媒によるオレフィン類への酸素官能基導入
第32回酸化反応討論会, 倉敷 (1999年11月8日-9日).
- (7) 松嶋亮人, 芦田嘉之, 平田敏文
ダイズ培養細胞に存在する新規なトリプシンインヒビター(p20)のクローニングおよびその発現
第22回日本分子生物学会年会, 福岡 (1999年12月7日-10日).
- (8) 芦田嘉之, 松嶋亮人, 渡辺淳子, 平田敏文
ダイズおよびカミツレ培養細胞におけるゲラニオール応答因子
第22回日本分子生物学会年会, 福岡 (1999年12月7日-10日).
- (9) 平田敏文
化学的ストレスによる植物細胞のアポトーシス
第36回植物化学シンポジウム, 香川 (1999年12月11日).

- (10) 横畠直征, 下田 恵, 芦田嘉之, 平田敏文
タバコ培養細胞のアリルアルコール脱水素酵素の構造
第3回生体触媒化学シンポジウム, 熱海 (2000年1月20日-21日) .
- (11) 藤野 威, 山根真也, 下田 恵, 太田伸二, 平田敏文
ニチニチソウ培養細胞による不斉配糖化
第3回生体触媒化学シンポジウム, 熱海 (2000年1月20日-21日) .
- (12) 山根真也, 藤野 威, 下田 恵, 太田伸二, 平田敏文
タバコ培養細胞由来の UDP-glucosyltransferase
第3回生体触媒化学シンポジウム, 熱海 (2000年1月20日-21日) .
- (13) 内海良一, 泉 俊輔, 平田敏文
リパーゼによる加水分解の鏡像体選択性の MULDI-TOF MASS による解析
第3回生体触媒化学シンポジウム, 熱海 (2000年1月20日-21日) .
- (14) 芦田嘉之, 松嶋亮人, 渡辺淳子, 平田敏文
カミツレ培養細胞のグラニオール応答性遺伝子群のクローニングとその発現
日本化学会第78春季年会, 舟橋 (2000年3月28日-31日) .
- (15) 吉永大介, 芦田嘉之, 平田敏文
ゼニゴケ培養細胞が分泌する 37-kDa peroxidase の構造と特性
日本化学会第78春季年会, 舟橋 (2000年3月28日-31日) .
- (16) 泉 俊輔, 平田敏文, 須藤祥一, 中村昇太
リゾチームのオリゴ糖認識能の ESI MASS による解析
日本化学会第78春季年会, 舟橋 (2000年3月28日-31日) .
- (17) 芦田嘉之, 松嶋亮人, 渡辺淳子, 平田敏文
ダイズにおけるグラニオール応答性遺伝子群の発現機構
日本農芸化学会 2000 年度大会, 東京 (2000年3月31日-4月2日) .
- (18) 芦田嘉之, 西本真樹, 松嶋亮人, 渡辺淳子, 平田敏文
高等植物におけるグラニオール応答性遺伝子群の発現機構
第18回日本植物細胞分子生物学会大会, 静岡 (2000年7月24日-25日) .
- (19) 平田敏文, 泉 俊輔, 猶木理沙, 多賀通子, 富田 誠
高等植物における生体防御-蛋白質のリン酸化を引き金とするアポトーシス実行カスケード
科研「未解明生物現象」第1回公開シンポジウム, 名古屋 (2000年9月27日-28日) .
- (20) 松嶋亮人, 渡辺淳子, 芦田嘉之, 泉 俊輔, 平田敏文
高等植物におけるシグナル伝達機構-GTP 結合能を有する新規トリプシンインヒビターの単離と
その機能

- 第42回天然有機化合物討論会，沖縄県宜野湾市（2000年11月6日－8日）。
- (21) 渡辺淳子，松嶋亮人，芦田嘉之，平田敏文
ダイズ由来のG蛋白質様活性を有するプロテアーゼインヒビター
第23日本分子生物学会，神戸（2000年12月13日－16日）。
- (22) T. Hirata and K. Shimoda
Formation of chiral ketones by the hydrogenation of the C-C double bond of enones with reductases from *Nicotiana tabacum*
The 2000 Int. Chem. Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, U. S. A. (2000年12月14日-19日)。
- (23) S. Izumi and T. Hirata
Monoterpenoids—A potent inducer of apoptosis in cultured plant cells
The 2000 Int. Chem. Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, U. S. A. (2000年12月14日-19日)。
- (24) 平田敏文，泉 俊輔
化学ストレスによる植物細胞のアポトーシス
科研「植物－病原微生物」公開シンポジウム，名古屋（2000年12月22日）。
- (25) 山根真也，平川秀忠，下田 恵，太田伸二，平田敏文
タバコ培養細胞由来の配糖化酵素の単離とその特性
第4回生体触媒化学シンポジウム，仙台（2001年1月18日－19日）。
- (26) 川野 剛，山口圭一，下田 恵，平田敏文
ゼニゴケ培養細胞からのエノールアセテート化水分解酵素の単離とその特性
第4回生体触媒化学シンポジウム，仙台（2001年1月18日－19日）。
- (27) 中川 治，下田 恵，泉 俊輔，平田敏文
タバコ培養細胞によるジゲラニルの変換
日本化学会第79春季年会，神戸（2001年3月28日－31日）。
- (28) 下田 恵，権代隆行，平田敏文
タバコ培養細胞のエノン還元酵素による不斉誘起的還元反応
日本化学会第79春季年会，神戸（2001年3月28日－31日）。
- (29) 泉 俊輔，猶木理沙，多賀通子，平田敏文
ゲラニオールによる植物細胞のアポトーシス—アポトーシスによって変化する細胞内蛋白質
日本化学会第79春季年会，神戸（2001年3月28日－31日）。
- (30) 多賀通子，猶木理沙，泉 俊輔，平田敏文
ゲラニオールによる植物細胞のアポトーシス—クロマチンの凝縮に伴う核内蛋白質の構造変化
日本化学会第79春季年会，神戸（2001年3月28日－31日）。

7. 研究成果

(1) オイルボディの超分子構造の解明

カミツレ苗条原基のオイルボディはトリアシルグリセロールを主成分とし、その他にジ- およびモノアシルグリセロール、遊離脂肪酸、リン脂質、ステロール系脂質、および微量の蛋白質を含有していた。このことより、苗条原基オイルボディは内部の貯蔵脂質を取り囲む単膜として存在していることが推測された。一方、カミツレ種子のオイルボディもトリアシルグリセロールを主成分としていたが、その脂肪酸組成にはかなりの差異が見られ、苗条原基の方がより高度に不飽和化されていた。また、苗条原基と種子のオイルボディは、膜成分としてステロール系脂質を含有しており、これにより膜内の浸透圧を調整していると考えられる。なお、酵母にステロイド類の生合成阻害剤を投与した場合、そのオイルボディ中に特異な構造のステロイド類が検出されたが、細胞膜中のステロイド類には変化が見られなかった。植物で同様な投与実験を行なったところ、オイルボディ内のステロイド類にも細胞膜中のステロイド類にも変化が見られなかった。このことは高等植物と酵母のステロイド生合成の機構が異なることを示しており興味深い。

一方、オイルボディに内在されている蛋白質のトポロジー解析をすると、この蛋白質は約 2kDa の部分をオイルボディの外部に突き出して存在していることが明らかになった。

(2) オイルボディ内へのストレス応答関連物質の蓄積機構の解明

通常、植物に含まれる精油成分はオイルボディなどの細胞小器官に蓄積されると言われている。しかし、カミツレ苗条原基のオイルボディ中には香気成分の蓄積は見られなかった。一方、この研究の過程で、カミツレ苗条原基細胞に外からゲラニオールなどの

モノテルペノイドを投与したところ、アポトーシス様の細胞死が引き起こされることがわかった。このようなモノテルペノイドによるアポトーシス誘導は蛋白質合成の阻害剤であるシクロヘキシミドや RNA 合成の特異的阻害剤であるアクチノマイシンDによりいずれも阻害されなかった。このことはアポトーシス誘導に際しては新たな蛋白質合成も RNA 合成も必要としないことを示しており、アポトーシス誘導に関連する特定の蛋白質が細胞内の小器官に前もって蓄積されている可能性を示唆している。オイルボディに内在する蛋白質について調べると、苗条原基と種子とではその含有量および分子量に違いが見られ、その機能面で差異があることが予想された。発芽時の種子オイルボディ中の蛋白質がリパーゼ活性を示したことから、種子では明らかに内在蛋白質が内部の貯蔵脂質を分解し、自らの生長のエネルギー源として役立てているものと考えられる。しかし、苗条原基のオイルボディにおいて貯蔵脂質の利用にオイルボディ内在蛋白質が関与しているのか、他のオルガネラの蛋白質に依存しているのかの明快な解明には至らなかった。

(3) オイルボディに内在する蛋白質の構造と機能の解明

カミツレ苗条原基細胞のオイルボディ中に、33kDa のカルボキシペプチダーゼが含まれることを見出した。一方、上記(2)の研究の遂行過程で、カミツレ培養細胞にモノテルペノイドを投与すると、細胞外へカルボキシペプチダーゼが分泌されることが見出された。アミノ酸配列の相同性から、このカルボキシペプチダーゼはオイルボディに存在するカルボキシペプチダーゼと同一であることがわかった。また、オイルボディからのカルボキシペプチダーゼの分泌には細胞膜画分と細胞質画分が共に必要で、細胞質画分を GTP γ S で処理するとその分泌が促進されること、分泌には補因子として ATP を必要とすることが明らかになった。この分泌は ATP アーゼの阻害剤で阻害されることより、ATP はオイルボディからカルボキシペプチダーゼを分泌させるためのエネルギー源とし

て利用されていることが示された。

次に、カミツレ培養細胞に存在するペプチダーゼ (CPase と TPase) の遺伝子クローニングを行い、これらタンパク質の1次構造を解明した。CPase は 501 アミノ酸で構成され、セリンカルボキシペプチターゼの活性サイトを持ち、特徴的な構造としてN末端にロイシンジッパー構造を有していることがわかった。なお、この CPase のアミノ酸配列と他の植物のセリンカルボキシペプチターゼのアミノ酸配列との相同性は、約 63%であった。一方、TPase は 501 アミノ酸で構成され、チオールプロテアーゼの活性サイトを持ち、特徴的な構造としてプロリンリッチな部分を持っていた。また、培養細胞にゲラニオールを添加して化学的ストレスをかけると、CPase 関連の mRNA が 2 倍程度に増加することがわかった。このことは、この CPase が植物の生体防御または情報伝達過程に関与している可能性を示唆しており興味を持たれる。

これらの研究の一部はすでに学会誌等に発表しているので、以下に関連した論文のコピーを添付する。