

## 植物のモノハロメタン放出に影響を与える環境因子の探索

### 【構成員】

中村 達夫（横浜国立大学大学院環境情報研究院・講師）

永利 友佳理（横浜国立大学大学院環境情報学府・博士課程後期2年）

※大変恐縮ですが、未発表データを含むため本報告は非公開として頂きたいと思っております。

### 【概要】

大気中のモノハロメタン収支に影響を与えるほど大量の塩化メチルが熱帯の植物から放出されることが、最近明らかにされた。この現象は植物に広く観察されることから、植物に普遍的に存在する機構によることが示唆されている。モデル植物のシロイヌナズナより、モノハロメタン合成に関わる遺伝子 (*HARMLESS TO OZONE LAYER, HOL*) が単離されている。この *HOL* 遺伝子 (本研究では *AtHOL1* と呼ぶ) の生理学的役割や環境応答性を明らかにすることにより、植物からのモノハロメタン放出の動態についての知見が得られると私達は考えた。本研究では、シロイヌナズナにおける *AtHOL1* 遺伝子およびその相同遺伝子 (*AtHOL2*, *AtHOL3*) をタンパク質レベルで解析することにより、全てのアイソフォームがモノハロメタン合成酵素活性を持つこと、*AtHOL1* 遺伝子の発現が光によって誘導されること、モノハロメタン放出は *AtHOL1* 遺伝子の発現に依存すること、*AtHOL1* 遺伝子は病傷害応答に関わる可能性があること、を明らかにした。また、塩化物イオンは *HOL* タンパク質の生理学的な基質ではなく、植物から放出される塩化メチルは副反応産物であることを示唆する知見を得た。

### 【はじめに】

モノハロメタン ( $\text{CH}_3\text{X}$ ) は、成層圏オゾンの破壊に寄与するハロゲン化合物であるが、そのうち塩化メチル ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ) のオゾン層破壊における寄与率はフロン類の1/4にも達する。年間に約400万トンの塩化メチルが大気中へ放出されているが、このほぼ全てが自然由来であることが知られている。最近の研究により、約90万トンもの塩化メチルが、熱帯地域のフタバガキ科植物から放出されると算出され、植物が最大の発生源であることが明らかにされた (Yokouchi et al., *Nature* 403: 295-298 (2000); Yokouchi et al., *Nature* 416: 163-165 (2002))。植物からの臭化メチル ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ) 放出も含め、系統的に広範な植物においてモノハロメタン放出が確認されているため (Saini et al., *Plant Cell Environ.* 18: 1027-1033 (1995))、モノハロメタン放出は植物に普遍的な生理現象と考えられる。しかし、植物がどのような環境条件に反応してモノハロメタンを放出するのか、なぜモノハロメタンを放出するのかは不明であり、有力な仮説もない。モノハロメタン放出の環境応答性を明らかにすることは、急激に変動する地球環境において、大気中のモノハロメタン収支を理解するために必要不可欠である。本研究は、植物からのモノハロメタン放出の環境応答性を明らかにするための技術開発を行なうとともに、分子生物学的、生化学的、生理学的解析により、モノハロメタン放出の生理学的意義に関する知見を得ることを目的としている。得られた知見をさらに発展させ、いまだ解明されていないモノハロメタン収支の理解、ひいてはオゾン層動態の理解に貢献することを最終目的としている。

### 【HOL タンパク質の酵素化学的解析】

シロイヌナズナの *AtHOL1*, *AtHOL2*, *AtHOL3* の 3 遺伝子の全長 cDNA を単離した。アミノ酸配列のアライメントを図 1-A に示す。EST データベースの解析により、他の植物種における HOL 様遺伝子を同定し、それらのアミノ酸配列に基づいた分子系統樹を図 1-B に示した。HOL 遺伝子は下等植物から高等植物まで広く存在し、*AtHOL1*, *AtHOL2* は他のアブラナ科植物由来の *HOL* 遺伝子と同じクラスターに含まれることが分かった。これらのことから、*AtHOL3* は機能的に他の 2 アイソフォームとは異なる役割を果たす可能性が示唆された。マイクロアレイデータベースの解析により、3 遺伝子が実際に転写されており、中でも *AtHOL1* の mRNA 蓄積量が大きいことが明らかになった (図 1-C)。大腸菌を用いて調製した融合タンパク質を用いた解析により、3 個の遺伝子が S-アデノシルメチオニン依存性モノハロメタン合成酵素活性を持つことを示した (図 2-A, B, C)。3 個の融合タンパク質は、塩化物イオンに対する活性は低いことが分かった。*AtHOL1* が特にチオシアン酸イオンに対する活性が高いことを示した。

### 【HOL 遺伝子破壊株を用いた生理学的解析】

*AtHOL* 遺伝子の生体内における役割を明らかにするために、各遺伝子が破壊された遺伝子組換えシロイヌナズナを作製した。上述の解析により、*AtHOL1* がチオシアン酸イオンに対して高い活性を持つことを示しているが、アブラナ科植物において、二次代謝産物のひとつであるインドールグルコシノレートが傷害ストレスにより分解し、チオシアン酸イオンが生成することが知られている。野生型シロイヌナズナに傷害処理を施し、放出されるガス成分を解析したところ、チオシアン酸イオンのメチル化産物であるチオシアン酸メチルが検出された。一方、遺伝子破壊シロイヌナズナを同様の処理により解析したところ、*AtHOL1* 破壊シロイヌナズナのみにおいて、チオシアン酸メチルの放出が抑制されていた。このことにより、傷害処理により生成したチオシアン酸イオンが *AtHOL1* 依存的にメチル化され、チオシアン酸メチルが生成することを、*in vivo* において証明することができた (図 3)。生成したチオシアン酸メチルが、いくつかの植物病原菌の生育を抑制することも示すことができた (data not shown)。これらの結果は、*AtHOL1* が病傷害応答において機能することを示唆している。

### 【HOL 遺伝子の発現に影響を与える環境因子の検索】

マイクロアレイデータベースを解析することにより、シロイヌナズナの 3 個の *HOL* 遺伝子の発現に影響を与える環境因子を検索した (図 4, 表 1)。さまざまな波長の光によって *AtHOL1* および *AtHOL2* の遺伝子発現が誘導されること、またこの 2 遺伝子の発現パターンが光合成関連遺伝子群と同じ挙動を示すことを明らかにした。ホタル発光遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えシロイヌナズナを用いた解析により、実際に *AtHOL1* 遺伝子のプロモーターが光処理により活性化することを明らかにした (図 5)。上述の解析により、*AtHOL1* が病傷害応答に関わる可能性を示しているが、光条件が病傷害応答の制御に関わるという知見もある。さらなる解析により、これらの関連性を明らかにするとともに、得られた知見をもとに、*HOL* 遺伝子の発現に影響を与える環境因子の探索を試みる予定である。

### 【おわりに】

本研究により、シロイヌナズナの *AtHOL1* 遺伝子がグルコシノレートの分解産物であるチオシアン酸イオンを代謝し、抗菌活性を持つチオシアン酸メチルの合成に関わることを示した。*AtHOL1* は他のアブラナ科植物の *HOL* とアミノ酸配列に基づく分子系統樹上でクラスターを形成することから、グルコシノレート代謝において機能することが *AtHOL1* の生理学的

な役割であることが示唆された。しかし、*HOL* 遺伝子は、下等植物から高等植物まで、アブラナ科以外の植物にも広く存在している。このことから、植物に普遍的に存在する *HOL* 遺伝子の生理学的役割は、グルコシノレート代謝以外にあると考えられる。*HOL* 遺伝子の生理学的役割や、その環境応答性を明らかにすることにより、植物からのモノハロメタン放出の動態に関する知見を得ることが期待される。本研究成果の一部は、国際学術誌 *Plant Biotechnology* に掲載された。

**【発表論文】**

Yukari Nagatoshi and Tatsuo Nakamura, Characterization of three halide methyltransferases in *Arabidopsis thaliana*., *Plant Biotechnology* (2007) in press.

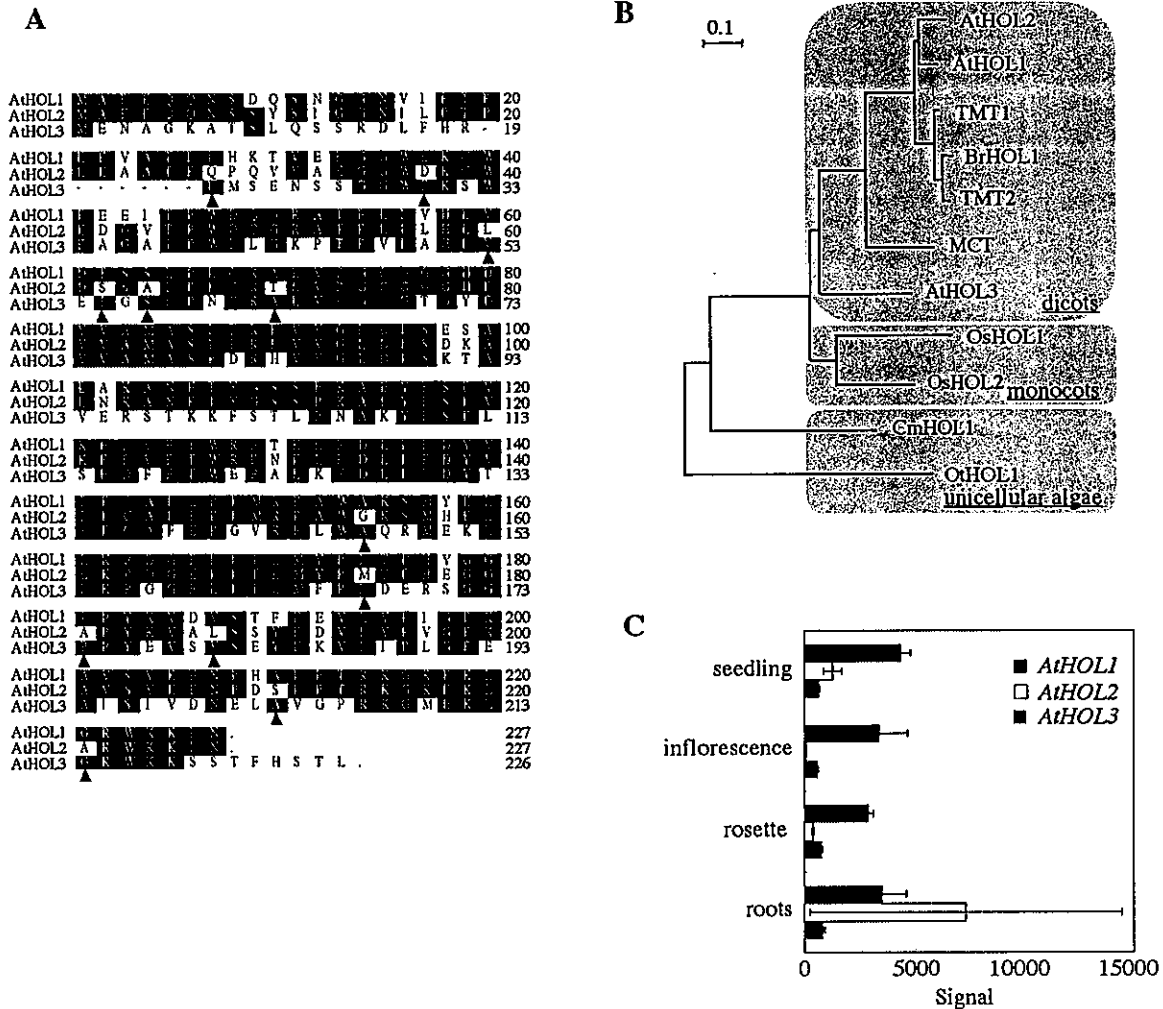


図 1. AtHOL 遺伝子の特性

A: AtHOL1, AtHOL2 および AtHOL3 のアミノ酸配列のアライメント. 各 AtHOL アミノ酸配列について ClustalW を用いて解析を行った. 同じアミノ酸残基を黒色の背景で示した. AtHOL1 と AtHOL2 は 82.9%, AtHOL1 と AtHOL3 は 54.2%の相同性を示した. B: AtHOL1 相同タンパク質の系統樹. AtHOL1 と相同性の高いアミノ酸配列を BLAST 検索により選抜し, ClustalW を用いて解析を行った. 各遺伝子の GenBank accession number を以下に示した. *Arabidopsis thaliana* (AtHOL1, AtHOL2, and AtHOL3; GenBank accession numbers NM\_129953, NM\_129954, and NM\_180072, respectively), *Brassica oleracea* (TMT1 and TMT2; GenBank accession numbers AAK69760 and AAK69761, respectively), *Brassica rapa* (BrHOL1; GenBank accession number ABL86248), *Batis maritima* (MCT; GenBank accession number AAD26120), *Oryza sativa* (OsHOL1 and OsHOL2; GenBank accession numbers NP\_001051867 and NP\_001056843, respectively), *Ostreococcus tauri* (OthOL1; GenBank accession number CAL52768), *Cyanidioschyzon merolae* (CmHOL1; GenBank accession number AP006501). C: AtHOL 遺伝子のデジタルノーザン解析 (マイクロアレイデータベース解析). GENEVESTIGATOR を用いて解析を行った.

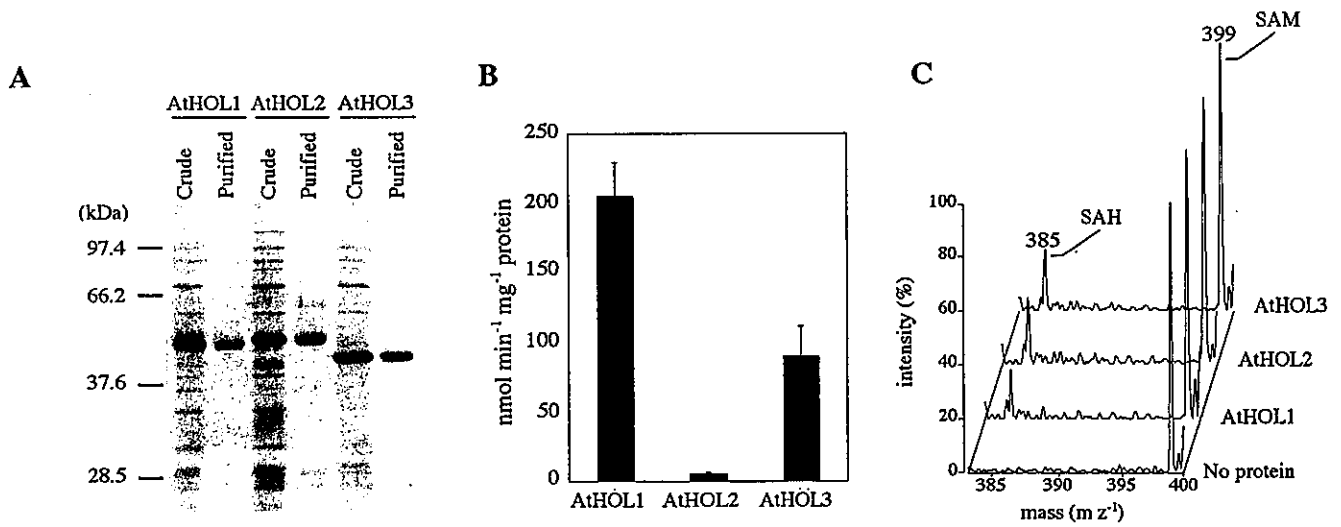
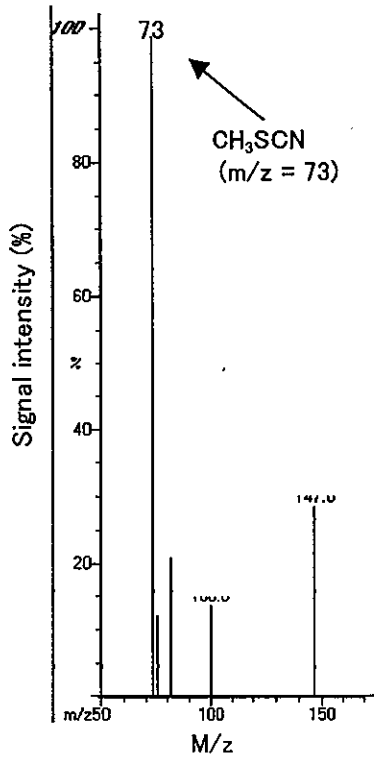


図 2. AtHOL 融合タンパク質の特徴付け

A: AtHOL1, AtHOL2 および AtHOL3 の GST 融合タンパク質の SDS-PAGE 解析. 大腸菌により合成した各 GST 融合タンパク質の推測される分子量はそれぞれ 53.5, 53.3 および 53.3kDa である. B: GC-ECD を用いた各 AtHOL 融合タンパク質のヨウ化物イオンに対するメチル基転移酵素活性. 各 AtHOL 融合タンパク質に基質である S-adenosyl-L-methionie (SAM) および KI を添加した反応液から合成される (CH<sub>3</sub>I) ヨウ化メチルを GC-ECD を用いて定量した. AtHOL1, AtHOL2, および AtHOL3 の活性値はそれぞれ 205 ± 24, 5.8 ± 0.8, and 90 ± 21 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein. AtHOL1 の活性が最も高いことがわかった. C: MALDI-TOF-MS を用いた各 AtHOL タンパク質の SAM 依存性メチル基転移活性の解析. 各 AtHOL 融合タンパク質に基質である SAM および KI を添加した反応液から SAM の消費により合成される S-adenosyl-homocysteine (SAH) を MALDI-TOF-MS を用いて検出した.

A



B

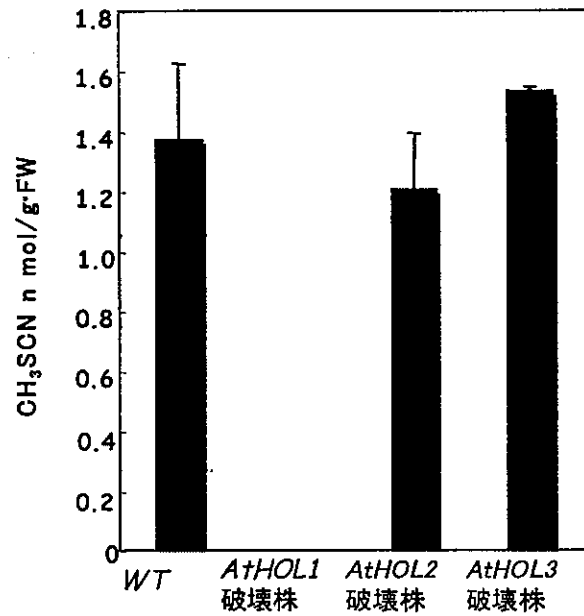
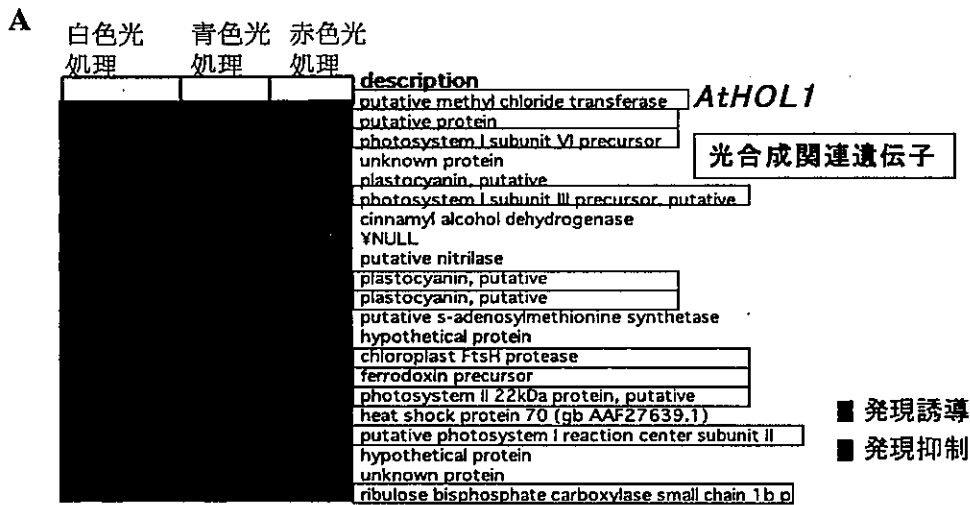
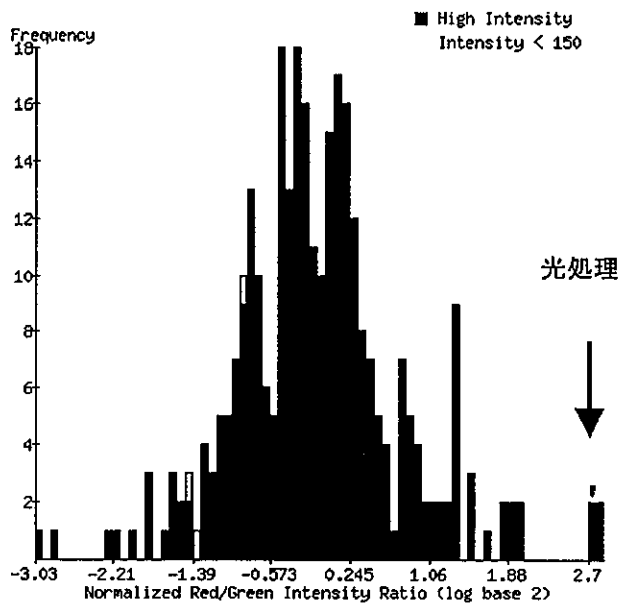


図3. シロイヌナズナの傷害処理によるチオシアン酸メチル (CH<sub>3</sub>SCN) 合成

A: 傷害処理を施した WT シロイヌナズナにおいて合成される CH<sub>3</sub>SCN の検出. GC-MS を用いた傷害処理したシロイヌナズナの気相成分より CH<sub>3</sub>SCN に由来するシグナル (m/z = 73) を検出した. B: 各 *Athol* 破壊株を用いた CH<sub>3</sub>SCN 合成の解析. 各 *Athol* 破壊株および WT に傷害処理を施し, 合成される CH<sub>3</sub>SCN を GC-ECD を用いて定量した.



**B** Survey of All Arrays (304 spots in 304 arrays)



Stanford Microarray Database  
(<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/data/spotHistory>.)

図 4. マイクロアレイデータベースを用いた AtHOL1 遺伝子発現解析

A: The Arabidopsis Information Resource (TAIR) の Expression Analysis Across All the Experiments による AtHOL1 遺伝子発現解析. AtHOL1 遺伝子の発現が誘導される条件および AtHOL1 遺伝子と共発現する遺伝子を検索した. B: TAIR の Spot History による AtHOL1 遺伝子発現解析. 遺伝子発現が最も誘導される条件が光処理であることが分かる.

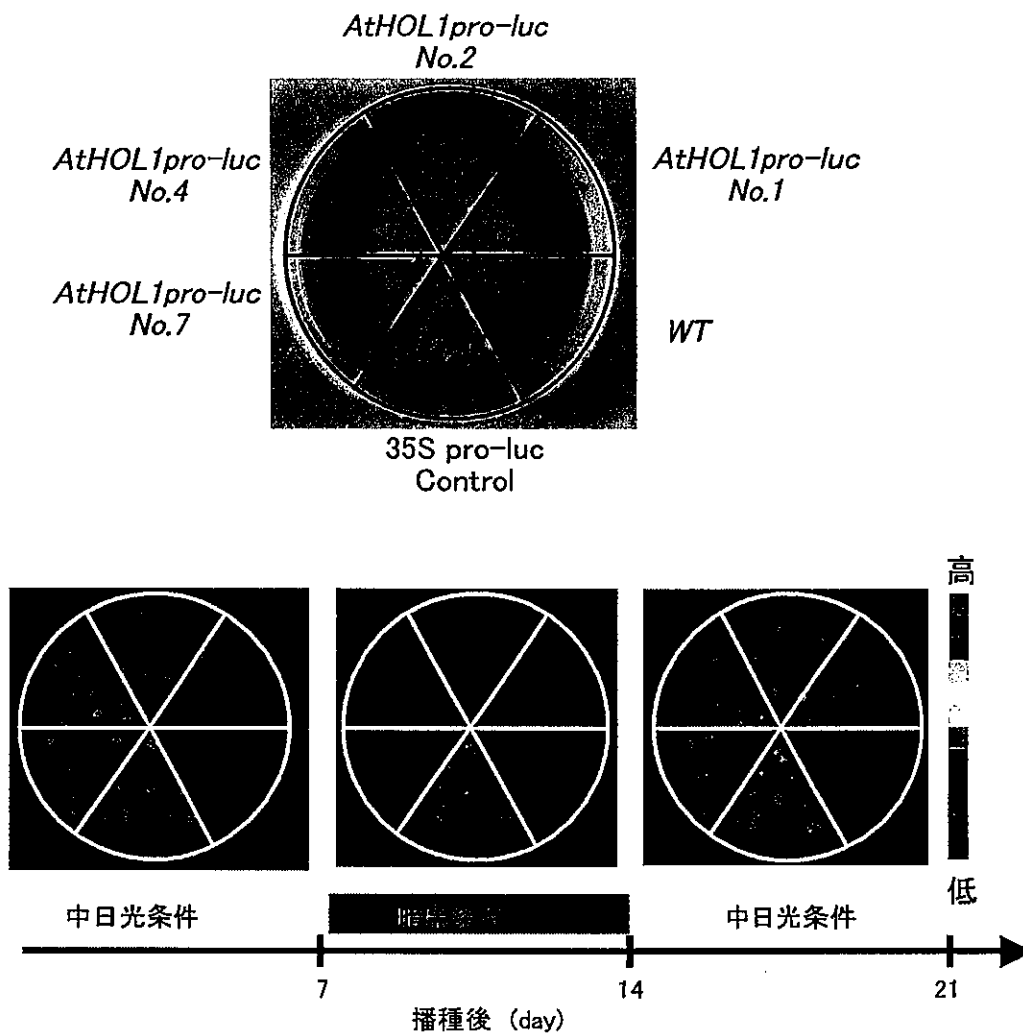


図 5. AtHOL1 promoter-luc 導入形質転換シロイヌナズナを用いた AtHOL1 遺伝子発現の解析  
 AtHOL1 promoter の下流にホタルの発光遺伝子(luc)を連結させたベクターを導入したシロ  
 イヌナズナ(AtHOL1pro-luc No.1, No.2, No.4, No.7)を用いて、ルシフェラーゼの発光を指  
 標として AtHOL1 遺伝子発現のモニタリングを行った。AtHOL1 遺伝子発現は、明条件により  
 誘導され、暗条件により抑制されることを明らかにした。



表 1

Gne	Ratio	Treatment
AtHOL1	0.05	Abscisic acid: 10uM ABA for 1h and 3h
AtHOL1	2.751	White light
AtHOL2	0.03	MS + sucrose liquid culture, no shaking
AtHOL2	0.21	Cycloheximide (protein synthesis inhibitor): 10uM CHX for 3h
AtHOL2	0.24	Nutrient: K (-)
AtHOL2	0.31	Tumour tissue induced at the base of an inflorescence stalk with <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AtHOL2	0.45	Infiltrated into fully expanded leaves with 107 cfu/ml <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 for 12h and 24h
AtHOL2	0.46	Infiltrated with 10e8 cfu/ml <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000
AtHOL2	1.66	Nutrient: Nitrate_low
AtHOL2	1.75	Nutrient: P (-)
AtHOL2	1.79	UV-A
AtHOL2	1.98	UV-AB
AtHOL2	2.05	Red light
AtHOL2	2.05	Arabidopsis thaliana ecotype Columbia glabra were grown for 4 days in the dark at 23°C in multiwell plates containing half-strength murashige skoog medium without added sucrose. Sample was subsequently kept for 6h under anoxia.
AtHOL2	2.53	Blue light
AtHOL2	2.56	White light
AtHOL2	2.92	Far red light
AtHOL3	0.53	Cells were transferred into medium that included 1 uM brassinolide and 10 mM H3BO3 for 6d, 8d and 10d
AtHOL3	1.82	Arabidopsis plants were grown in vitro and were exposed to 1 mM 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) for 1 h,

表 1. マイクロアレイデータベースを用いた AtHOL1, AtHOL2 および AtHOL3 遺伝子発現に影響を与える因子の検索.

GENEVESTIGATOR database (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) の Response Viewer を用いた様々な処理条件における

各 AtHOL 遺伝子発現レベルの解析. 様々な波長の光処理により AtHOL1, AtHOL2 および AtHOL3 遺伝子の発現が誘導されていることがわかる.