

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 植物が作る未解明窒素化合物の構造と作用

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

森川 弘道 (広島大学大学院理学研究科 特任教授)

主たる共同研究者

鈴木 仁美 (佐藤 格)(関西学院大学理工学部 非常勤特別研究員)(~平成17年3月)

佐藤 格 (関西学院大学理工学部 講師)(平成16年4月~平成17年3月)

藤田 耕之輔 (広島大学大学院生物圏科学研究科 教授)

橋本 隆 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 教授)(平成17年3月~)

3. 研究内容及び成果:

3-1. 研究内容

植物に吸収された窒素酸化物や硝酸由来の全窒素の約3割が、未解明の窒素代謝物(UN化合物)に変換されることを発見したことから、UN化合物の構造、生成機構、生理作用、分解機構など、その全容を解明し、新規窒素代謝経路の提案を目指した。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

3-2. 研究成果

3-2-1. UN化合物とはどのような化合物か

UN化合物は、「ケールダール法では定量的回収が困難な窒素を含む化合物」である。具体的には、別の窒素あるいは1個または2個の酸素と結合している窒素(例えば、N-N, N=N, N=O, NO<sub>2</sub>基など)を含む化合物であると推定される。ケールダール分解中に、窒素の一部が、N<sub>2</sub>またはNO<sub>x</sub>などとして損失するためと考えられ、確認を行った。

○有機ニトロソ、ニトロ化合物のケールダール分解排ガスをアルカリトラップし、全窒素の最大20%近く(NO<sub>x</sub>由来と考えられる)がトラップ中に回収されることを確認した。(森川グループ)

3-2-2. 二酸化窒素の作るUN

大気中の窒素酸化物(実質的には、NOとNO<sub>2</sub>からなるNO<sub>x</sub>)は、都市大気の中心的汚染物質で、車が主な発生源であるが、我々は、植物が大気中NO<sub>x</sub>のシンクとなりうると考え、植物による大気中の窒素酸化物の低減除去(ファイトレメディエーション)を研究してきた。具体的には、自然界の植物の二酸化窒素同化能の調査、NO<sub>x</sub>の窒素を唯一の窒素源として生育する“NO<sub>x</sub>を好む植物”の開発などを検討した結果、

○街路樹など217タクサの二酸化窒素同化能には、657倍の差異があることを見出した。(森川グループ)

○植物体内に取り込まれたNO<sub>x</sub>の代謝的運命を調査する目的で、重窒素ラベルしたNO<sub>2</sub>をシロイヌナズナなどに取り込ませ、全窒素、ケールダール窒素および無機窒素に分けて元素分析した。その結果、全窒素=(ケールダール窒素)+(無機窒素)とならず、全窒素の約1/3は、ケールダール窒素でも無機窒素でもない、UNとなることが初めて分かった。その他10種以上の植物でもUNが実証された。(森川グループ)

3-2-3. 硝酸の作るUN

当初、UNは二酸化窒素に固有のもので、硝酸由来の窒素(代謝が充分理解されており)からUN生成はありえ

ないと思われていた。野生株タバコと亜硝酸還元酵素遺伝子発現を野生株の5%以下に抑制した形質転換タバコ(クローン271)を用いて、硝酸由来のUN量を測定した。

○野生株もクローン271も共に(硝酸塩を与える条件によっては)全窒素の30%以上がUNとなることを明らかにした。(森川グループ)

○シロイヌナズナを含め、種々の植物でも、硝酸由来の窒素から同様にUNが作られることが分かった。さらに、動物もUNを作ることを明らかにし、UN生成の生物普遍性を提起した。(森川グループ、藤田グループ)

#### 3-2-4. UN化合物の構造

○シロイヌナズナで生成される主なUN化合物として、新規骨格を有するチアジアゾール化合物、ニトロソピロール、ニトロカロチン、ニトロソチオール類を明らかにし、またタンパク質性UNの存在も明らかにした。(鈴木グループ、森川グループ)

○新規な骨格を有するチアジアゾール化合物として、 $\Delta$ 2-1,2,3-チアジアゾリン誘導体1とそのオキシド2がその候補として推定した。FAB-MASSやアニオン-MASSの測定結果も、1の構造を支持するものであった。しかし化合物1は非常に不安定な化合物で、濃縮した溶液状態では冷暗所に保存しても徐々に変質し、1ヶ月ほどで完全に分解した。加熱および化学的処理では容易に分解するため、通常の方法で単離、精製を行なうことは困難であった。また、化合物2でないかと推定した物質は量的に少なく、分離を試みる過程で失われて、濃縮状態で得ることはできなかった。(鈴木グループ)

○チアジアゾール誘導体から $\Delta$ 2-1,2,3-チアジアゾリン誘導体への変換を植物の酵素を利用して試みた。酵素液の調整にはタバコBY-2細胞を用いた。チアジアゾール誘導体および酵素反応生成物の検出には感度をあげるため、蛍光標識およびメチルエステル化を行った。分析は高速液体クロマトグラフィーにより行い、ピークを測定した。その結果、酵素反応の補酵素としてNADHを加えた場合に特異的なピークが観察され、LC-MSの結果から目的とする $\Delta$ 2-1,2,3-チアジアゾリン誘導体である可能性が高いことが明らかとなった。(橋本グループ)

#### 3-2-5. UN生成に関与するタンパク質

○シロイヌナズナにおけるUN代謝に関連するタンパク質として、ペルオキシナイトライト還元酵素(2-Cys ペルオキシレドキシシン)、S-ニトロソグルタチオン還元酵素(GSNOR)、非共生型ヘモグロビン(GLB)、ジャーミン様タンパク質(GLP)、キサンチン脱水素酵素(XDH)の遺伝子のクローニング、生化学的解析を実施した結果、植物におけるUN生成経路、活性窒素(RSNO)代謝および無機窒素同化の間に代謝クロストークが存在することを明らかにした。(森川グループ、鈴木グループ)

#### 3-2-6. UNを生成する新しい窒素代謝系

○新規な窒素代謝系を提唱した。具体的には、Pathway1の二酸化窒素からの硝酸生成は、工業的硝酸生産法(オストワルド法)の反応式に相当する。同様な反応が植物内外で生ずると考えられる。生成したNOは、スーパーオキシド( $O_2^-$ )と反応してペルオキシナイトライト(ONOO-)を作り、 $NO_2$ 自体、NO、ONOO-が生体成分と反応し、ニトロソ、ニトロ化合物を作るものと考えられる。(森川グループ、鈴木グループ)

○Pathway 2は、硝酸還元経路である。硝酸還元経路で生成した亜硝酸は、細胞内で酸化され、 $NO_2$ を生成、代謝されNOやONOO-を生成すると考えられる。亜硝酸イオンの酸化は例えば植物の非共生型ヘモグロビンによって触媒されると考えられる。NO合成酵素の働きで生成した内因性NOも同様な代謝的運命を辿るものと考えられる。最近我々は、S-ニトロソグルタチオン(GSNO)還元酵素(GSNOR)を過剰発現させるとUNレベルが顕著に減少することを見出している。(森川グループ)

### 3-2-7. NO<sub>x</sub>の植物バイタリゼーション作用とUN化合物の作用

○大気中のNO<sub>x</sub>は植物の成長、全般的養分吸収の促進、全般的代謝を活性化するシグナル作用をもつことを見出した(「植物バイタリゼーション・シグナル作用」)。植物(Nicotiana plumbaginifolia、シロイヌナズナなど)を大気中のNO<sub>x</sub>濃度をほぼゼロにした空気(-NO<sub>x</sub>区)とNO<sub>x</sub>濃度を都市大気汚染レベル程度に高めた空気(+NO<sub>x</sub>区)で栽培(4週間~2.5月)すると、+NO<sub>x</sub>区で栽培した植物のバイオマス生産量は、-NO<sub>x</sub>区の1.5-2.0倍であった。全葉面積、植物当たりの主養分含量(C, N, S, P, K, Ca, Mg)や遊離アミノ酸量および粗タンパク質量は、いずれも+NO<sub>x</sub>区が-NO<sub>x</sub>区比で、1.5-2.0倍高かった。(森川グループ)

○さらに、重窒素ラベルNO<sub>x</sub>で曝露し、根からN源として非ラベル硝酸を与えて同期栽培し、植物の窒素分析したところ、NO<sub>x</sub>由来のNの全Nに対する貢献度はごく僅か(3~5%)であり、NO<sub>x</sub>はN源としてではなく、シグナルとして作用することが分かった。(森川グループ)

○リアルタイムPCR解析により、NO<sub>2</sub>処理は、シロイヌナズナのサイクリン遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)遺伝子、エクспанシン遺伝子を活性化することが分かった。(森川グループ)

## 4. 事後評価結果

### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待・口頭・ポスター		報道	特許	
国内	国外	国内	国外		国内	海外
24	34	144	21	2	14	2

○論文発表された雑誌(IF)に関しては、必ずしも全てが高いとは言えないが、各々の成果は論文として、また口頭発表として着実に纏められ発表されていると評価する。

○国内出願14件と十分な出願数ではあるが、さらに実用的に利用されるための工夫が必要である。特に、NO<sub>x</sub>のバイタリゼーションは、実用化の可能性を持っていることから今後の進展を期待する。

### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

○総合的には、これまで見逃されてきた未解明窒素化合物に光を当て、多くの化合物の構造解析を達成したことの意義は高い。また、UNを生成する新しい窒素代謝系を提案するなど、研究のオリジナリティもあり、植物生理学的にインパクトを与えたと考える。また、NO<sub>x</sub>の生理活性(バイタリゼーション効果)を発見したことは評価できる。しかし、相対的に未解明窒素化合物の大きな部分を占めるチアジアゾール誘導体の実態をΔ2-1,2,3-チアジアゾリン誘導体1とそのオキシド2がその候補として推定し構造解析を試みたが、化合物の極度の不安定さにより同定できなかったこと、ならびに植物の酵素を利用して生物変換を試みたが、本プロジェクトへの参加が遅れたことにより、特定することが出来なかったことは極めて残念である。また、未解明窒素化合物の生理活性についても、その発現機構の解明にまで至らず今後に残された。

○科学技術の貢献に関しては、これまで未解析であった未解明窒素化合物の同定およびその動態に着目し、多くの未解明窒素化合物の構造解析を達成し、そこから、UNを生成する新しい窒素代謝系を提案するなど植物生理・代謝学分野への貢献は評価できる。また、NO<sub>x</sub>のバイタリゼーションに関する知見などNO<sub>2</sub>シグナル伝達機構の分野が拓けてきたことは興味深い。このような研究は世界的になく、特異的な分野と判断され、新しい分野を拓く可能性がある。

○今後の展開としては、未解明窒素化合物の存在ならびにその特定、窒素代謝およびそれら化合物の有する生理活性作用を明らかにした点は評価されるが、実際にそれら化合物が生体内でどのように機能しているか、多くの未解明の課題を抱えており、一度問題を整理する必要がある。今後それらの課題が解明されることが不

可欠であるが、その内容によっては、食糧増産、環境修復の基盤技術開発に繋がる可能性がある。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

○未解明窒素化合物の構造解析における大きな部分を占めるチアヂアゾール誘導体の実態を  $\Delta$  2-1,2,3-チアヂアゾリン誘導体1とそのオキシド2がその候補として推定し、果敢に同定を試みたが、時間的な制約で完結できなかったことは残念であるが、その他の未解明窒素化合物の同定に寄与した点は、本プロジェクトの進展に大きく寄与したと判断する。