



植物 Nudix hydrolase ファミリーの生理機能に関する研究

中部大学応用生物学部食品栄養科学科 准教授 吉村和也

はじめに

Nudix hydrolase (NUDX) は、ヌクレオシド-2リン酸類縁体 (nucleoside diphosphate linked to some other moiety X: NDP-X) からヌクレオシド-1リン酸とリン酸-Xへの加水分解活性を持つ酵素ファミリーの総称である。2,500以上の本酵素遺伝子がウイルスからヒトに至る300以上の生物種から確認されており、大腸菌には13、ヒトには24と多数のアイソザイムが存在する。NUDXファミリーの潜在的な基質には、ヌクレオチド、ジアデノシンポリリン酸 (A_p_nA , $n=4\sim5$)、NAD(P)H、CoA、およびFADなどの、還元力/レドックスキャリアー、シグナル分子、もしくは代謝中間体や補酵素などの役割を有する重要な生体分子が含まれていることから、本酵素ファミリーの様々な代謝や細胞応答への関与が示唆されていた。しかしこれまで、大腸菌や動物におけるいくつかのNUDXについてのみ研究が進められているのが現状であった。

その様な状況下で筆者らは、植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて、初めて特定の生物が保有する全NUDXアイソザイムの分子特性や生理機能を網羅的に解析し、NUDXが多様なヌクレオシド-2リン酸類縁体の分解を介して、様々な細胞応答や代謝制御に関与していることを明らかにした。以下にそれらの概要について述べる。

1. 植物 NUDX ファミリーの分子特性

遺伝子データベース解析の結果、シロイヌナズナには28種類ものNUDX相同遺伝子 (*AtNUDX1\sim27*, *AtDCP2*) が存在した。それらの推定アミノ酸配列およびGFPを用いた細胞内局在性解析から、*AtNUDX1\sim11*, 25は細胞質、*AtNUDX12\sim18*はミトコンドリア、*AtNUDX19\sim24*, 26, 27は葉緑体型に局在することを明らかにした。さらに、組換えタンパク質を用いて基質特異性および速度論的解析を行った結果、8-oxo-(d)GTP (*AtNUDX1*)、ADP-リボース/NAD(P)H (*AtNUDX2*, 6, 7, 10), CoA (*AtNUDX11*, 15), ADP-グルコース (*AtNUDX14*), GDP-マンノース (*AtNUDX9*), A_p_nA (*AtNUDX13*, 25, 27), FAD (*AtNUDX23*), グアノシン-4リン酸 (ppGpp) (*AtNUDX26*) を特異的基質とする *AtNUDX* サブファミリーの存在が明らかになった。分子系統解析の結果、植物NUDXは他の生物種と同じ基質特異性を示すNUDXとは異なるブランチからクラスターを形成していたことから、植物に特有の進化過程を経て多様な基質特異性を獲得したことが示唆された。また、それらの基質特異性に必須のアミノ酸残基やモチーフを特定できた。さらに、*AtNUDX* の多くは、強光や乾燥などの非生物学的ストレス、および病原菌感染やサリチル酸 (SA) 処理などの生物学的ストレスにより顕著に発現誘導されることを示した。

2. 酸化ヌクレオチド浄化による酸化的DNA損傷の防御

活性酸素種 (ROS) によるヌクレオチドの酸化体はDNA複製やRNA転写の際に取り込まれると、塩基の誤対合により突

然変異や異常タンパク質の生成の原因となる。大腸菌を用いた相補試験や遺伝子破壊株を用いた生化学的および分子遺伝学的な解析から、*AtNUDX1* は酸化ヌクレオチドの一つである8-oxo-(d)GTPを細胞質ヌクレオチドプール中から分解 (浄化) することで、核、ミトコンドリアおよび葉緑体のDNAやRNAへの酸化ヌクレオチドの取り込みを抑制していることが示された。

3. ADP-リボースとNAD(P)H代謝による生物学的/非生物学的ストレス応答・防御の制御

ポリADPリボシル化 (PAR) はDNAの酸化損傷の修復を始めたとする様々な生体反応の制御に関わる重要なタンパク質修飾機構である。遺伝子破壊株および過剰発現株を用いた生理機能解析により、ADP-リボースおよびNAD(P)Hに対して加水分解活性を有する複数の *AtNUDX* (*AtNUDX2*, 6, 7, 10, 14, 19) の中で、*AtNUDX2* はPAR反応の分解過程から生成する細胞毒性物質であるADP-リボースを加水分解し、ヌクレオチドをリサイクルすることで、自然環境に起因する非生物学的ストレス下でのPARの活性化によるNAD⁺およびATPの枯渇を防いでいることを明らかにした (図1)。また、*AtNUDX7* はADP-リボースからのヌクレオチドのリサイクルに加え、NADHの加水分解によるそのレベルもしくはレドックス比の制御を介してPAR反応を調節し、DNA酸化損傷修復因子の発現を協調的に制御していた (図1)。一方、*AtNUDX6* はNADH代謝によるチオレドキシンの発現制御を介して、生物学的ストレスに対する植物独自の防御応答である全身獲得抵抗性のマスターレギュレーターであるNPR1の活性化を調節していた (図2)。さらに、*AtNUDX19* による葉緑体内でのNADPHレベルの調節は、

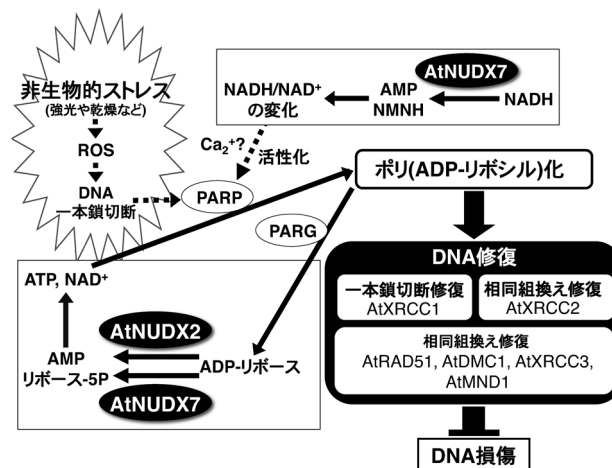


図1 *AtNUDX2* と *AtNUDX7* によるADP-リボースおよびNADH代謝を介した非生物学的ストレス応答の制御。NMNH, 還元型ニコチンアミドモノヌクレオチド; ROS, 活性酸素種; PARP, ポリADP-リボースポリメラーゼ; PARG, ポリADP-リボースグリコシラーゼ

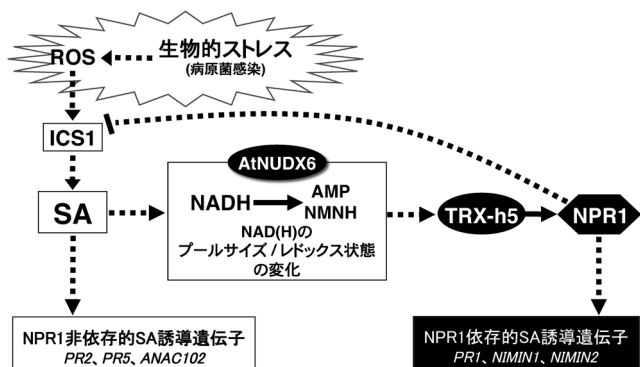


図2 AtNUDX6によるNADH代謝を介した全身獲得抵抗性の制御

ROS, 活性酸素種; ICS1, イソコリスミ酸合成酵素; TRX, チオレドキシン

葉緑体から核へのレトログレードシグナルを介した光合成とストレス応答の協調的な制御や、植物ホルモンシグナル経路の制御に機能していることを見出した。

4. その他のNUDXによる多様な代謝系の制御

AtNUDX26は、原核微生物の貧栄養時の緊縮応答に関与するppGppを葉緑体内で加水分解することにより、葉緑体遺伝子の転写調節に機能すると考えられた。また、AtNUDX23は葉緑体内でのFADの分解を介してフラビン生合成系をフィードバック調節することで、細胞内フラビンレベルの制御に機能することが明らかになった。さらに、AtNUDX11は細胞質に局在し、CoAだけでなく長鎖脂肪酸-CoAに対し高い親和性を示したことから、脂肪酸伸長や生合成の制御に機能していると考えられた。一方、AtNUDX15およびその選択的スプライシング産物であるAtNUDX15aはどちらもミトコンドリアに局在し、CoAよりもサクシニル-CoAなどに高い親和性を示したことから、TCAサイクルの制御に関与することが示唆された。

5. AtNUDXによる細胞内NAD(P)H代謝を介した遺伝子発現制御機構

NAD(P)Hは生物の主要なレドックスキャリアーであり、多様な代謝反応の駆動や生体反応の制御に必須である。したがって、その細胞内レベルやレドックス状態[NAD(P)H/NAD(P)⁺]の変化は多大な影響をもたらすと予想される。事実、細胞内NADHレベルが段階的に変化しているAtNUDX6およびAtNUDX7の単独および二重遺伝子破壊株を用いたトランスクリプトーム解析の結果、野生株および各遺伝子破壊株における発現量がNADHレベルと高い正および負の相関を示す遺伝子が多数同定され、それらには複数の転写因子およびシグナル伝達因子が含まれていた。これらの結果から、NAD(P)Hの分解による細胞内レドックスバランス制御の重要性、すなわちAtNUDX6およびAtNUDX7による細胞質でのNADH代謝が細胞内のレドックスシグナルを統括する「インテグレーター」としての役割を果たしていると考えられた(図3)。

以上より、植物は環境変化(非生物的ストレス)やウイルス/微生物の攻撃(生物的ストレス)に対する生存戦略として、NUDXによる種々の生体分子の分解経路を巧みに発達させて

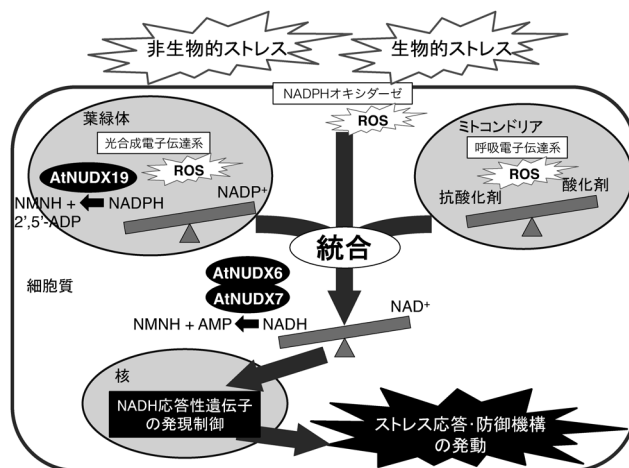


図3 NAD(P)Hのレドックス制御を介した生物学的および非生物的ストレス応答の統御

NMNH, 還元型ニコチンアミドモノヌクレオチド; ROS, 活性酸素種

きたと考えられる。さらに、FADやCoAなどビタミン補酵素型の代謝制御に関与するNUDXの存在は、生体有用分子の代謝制御が生合成経路だけでなく、分解経路との絶妙なバランスの上で成り立って、ホメオスタシスを維持していることを強く示すものである。今後、植物NUDXファミリーのさらなる機能解析に加え、それらの他生物種における普遍性を明らかにすることで、生物界の巧妙な代謝制御や生存戦略の理解の進展につながることを期待される。

謝辞 本研究は、近畿大学農学部バイオサイエンス学科植物分子生理学研究室(旧食品栄養学科栄養化学研究室および食品分子生理学研究室)および中部大学応用生物学部食品栄養科学科において行われたものです。本研究を行う機会を与えていただくとともに、公私にわたり終始ご指導、ご鞭撻をいただき、研究者としての礎をご教授いただいた近畿大学農学部教授重岡 成先生に心より感謝申し上げます。また、学生時代から長年にわたり、数々の激励と温かいご助言を賜りました大阪府立大学名誉教授 中野長久先生(現大阪女子短期大学学長)、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 横田明徳先生、名古屋大学生命農学研究科教授 堀尾文彦先生に深謝いたします。中部大学応用生物学部 中村研三先生、太田明徳先生および大羽和子先生には、多くの激励と温かいご助言をいただきました。また、共同研究者として多大なご協力をいただいた近畿大学農学部 田茂井政宏博士、小川貴央博士、田部記章博士、石川和也博士、伊藤大輔博士、作山治美女史、鳥根大学生物資源科学部 石川孝博教授、丸田隆典博士、鳥取大学農学部 藪田行哲博士、宮崎大学テニユアトラック推進機構 和田 啓博士に感謝いたします。さらに、本研究に関わりこれまで支えてくれた中部大学応用生物学部および近畿大学農学部の院修了生、卒業生ならびに現院生、学部学生諸氏に感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長・小鹿 一先生(名古屋大学生命農学研究科教授)ならびにご支援を賜りました中部支部の諸先生方に厚く御礼申し上げます。