

D- 及び L- アミノ酸添加が *Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育に及ぼす影響

加藤 志郎¹⁾, 安原 裕紀²⁾, 老川 典夫^{1,2)}
 (1) 関西大学 先端科学技術推進機構*, (2) 関西大学 化学生命工学部*)

Effect of Exogenous D- and L- Amino Acids on *Arabidopsis thaliana* Growth

Shiro KATO¹⁾, Hiroki YASUHARA²⁾ and Tadao OIKAWA^{1,2)}
¹⁾ High Technology Research Core, Kansai University

²⁾ Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

Summary

In the present study, the effect of exogenously supplemented amino acids on growth of *Arabidopsis thaliana* was comprehensively studied. After cultivation at 25°C for 10 days in the presence or absence of various amino acids, the inhibitory effect of each amino acid was analyzed qualitatively and quantitatively by taking photographs and by measuring body weight and lengths of hypocotyl and first true leaf of *A. thaliana* seedling, respectively. D-Ala, L- and D-Ser, L-Lys, D-Arg, L- and D-His, L-Met, L-Leu, L-allo-Ile, L-Ile, L-Val, L- and D-Tyr, L- and D-Trp and L- and D-Phe exhibited inhibitory effect. Other amino acids showed no inhibitory effect. The results suggested that, in the event of growth inhibition, the hydrophobicity, hydrophilicity, basicity and aromaticity of the amino acid side chain reflected in terms of enantioselectivity to some extent. The degree of the inhibitory effect depended on kinds of amino acid. These D- and L-amino acids repressed the increase of body weight and the elongation of hypocotyl and first true leaf of *A. thaliana* seedling concentration-dependently, and these results suggested that they inhibited the growth of whole plant body, not particular part of *A. thaliana*.

天然に存在するアミノ酸には、鏡像異性体の関係にある L-アミノ酸と D-アミノ酸の 2 種類が存在するものがある。両者は旋光性を除く全ての物理化学的性質を共有しているにも関わらず、タンパク質等の生物の構成要素には主として L-アミノ酸が用いられている。一方で D-アミノ酸は、細菌細胞壁や抗生物質の構成要素として利用されていることは古くから知られている。真核生物においては、数種の D-アミノ酸の存在が微量ながらも認められていたものの長らく不明なままであったその生理的役割の一端が、近年になって解き明かされつつある。D-セリンは哺乳動物脳内において N-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体のコアゴニストとして作用し、神経伝達プロセスにおいて重要な役割を担うことが¹⁾、D-アスパラギン酸は種々のホルモンの合成または分泌の制御に関与すること²⁾が知られている。哺乳類以外の真核生物においても D-アミノ酸は生理的役割を担うことが示されており、D-アラニン水生動物において浸透圧調節を担うオスモライトとして作用する³⁾。

様々な真核生物における D-アミノ酸の生理作用が明らかにされつつある一方で、植物における明確な生理機能の

報告は未だ為されていない。しかしながら、多くの植物に数種の D-アミノ酸が微量ながらも含有されることが報告されており⁴⁾、高等植物における D-アミノ酸の生理的役割に興味を持たれる。本研究で対象とするシロイヌナズナにおいては、外因性の D-セリンがその生育を阻害することが報告されている⁵⁾。また、D-アミノ酸代謝関連酵素として、L-セリンと D-セリンのラセミ化および両者の脱水反応を触媒するセリンラセマーゼ⁶⁾、D-アミノ酸と α -ケト酸との間のアミノ基転移を触媒する D-アミノ酸アミノ基転移酵素⁷⁾の同定も為されており、シロイヌナズナは高等植物における D-アミノ酸の生理的役割を探索する上で優れたモデルであると考えられる。そこで本研究では、L-体および D-体の様々な外因性アミノ酸がシロイヌナズナの生育に与える影響の網羅的な検証を行った。

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

実験方法

実験材料

野生株 (Columbia-0), セリンラセマーゼ過剰発現株⁸⁾ およびセリンラセマーゼ遺伝子破壊株⁸⁾ の3株のシロイヌナズナを実験に用いた。

MS 平板培地の調製

0.5 g/L MES-KOH (pH 5.7), 10 g/L スクロース, 4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類, 20 mg/L チアミン塩酸塩, 1 mg/L ニコチン酸, 1 mg/L ピリドキシン塩酸塩, 100 mg/L イノシトール, 3 g/L Phytigel となるように調整した溶液をオートクレーブ滅菌 (121°C, 20 分間) し, ビオチン (終濃度 1 mg/L) を添加した後に丸型シャーレ (2号) に 40 mL ずつ分注して調製した培地を標準 MS 平板培地とした。各種アミノ酸は終濃度 0.1, 0.3 または 1 mM となるように添加し, 必要に応じて培地の pH を 5.7 に調整した。

シロイヌナズナ種子の滅菌

1.5 mL 容エッペンドルフチューブを用いて約 500 粒のシロイヌナズナ種子を, 1 mL の 0.1% (v/v) Triton X-100 で 40 分間, 1 mL の 0.1% (v/v) Triton X-100 を含有する 70% (v/v) エタノールで 30 秒間, 1 mL の 0.1% (v/v) Triton X-100 を含有する 33.3% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウムで 15 分間インキュベートした。その後, クリーンベンチ内にて無菌的に 1 mL の滅菌水を用いて 6 回洗浄することで滅菌種子を調製した。

シロイヌナズナの培養試験

滅菌後のシロイヌナズナ種子を, 標準 MS 平板培地および各種アミノ酸を含有する MS 平板培地に無菌的に播種した。発芽時期を揃えるために播種後の培地を低温処理 (4°C で 2 日間) した後, 室温 25°C, 湿度 40 - 60% の環境下で培養した。10 日間培養した後の芽生えの胚軸長, 第一本葉の長さおよび植物体の重量を測定することでアミノ酸添加がシロイヌナズナ生育へ与える影響を評価した。

結果と考察

野生株 (Columbia-0), セリンラセマーゼ過剰発現株およびセリンラセマーゼ遺伝子破壊株の3株のシロイヌナズナを用いて, 外因性アミノ酸が生育に及ぼす影響を定性的に評価した。アミノ酸はそれぞれ終濃度 1 mM となるように添加し, 10 日間培養した後に各アミノ酸の影響を評価した。アミノ酸添加時の生育の様子を撮影した代表的な写真を Fig. 1 に, allo- 体を含む L- 体および D- 体の標準アミノ酸全 42 種の結果を Table 1 にそれぞれまとめた。阻害効果を示すことが既知である L-, D- セリンおよび D- アラニンに加えて, 塩基性アミノ酸, 含硫アミノ酸, 分岐

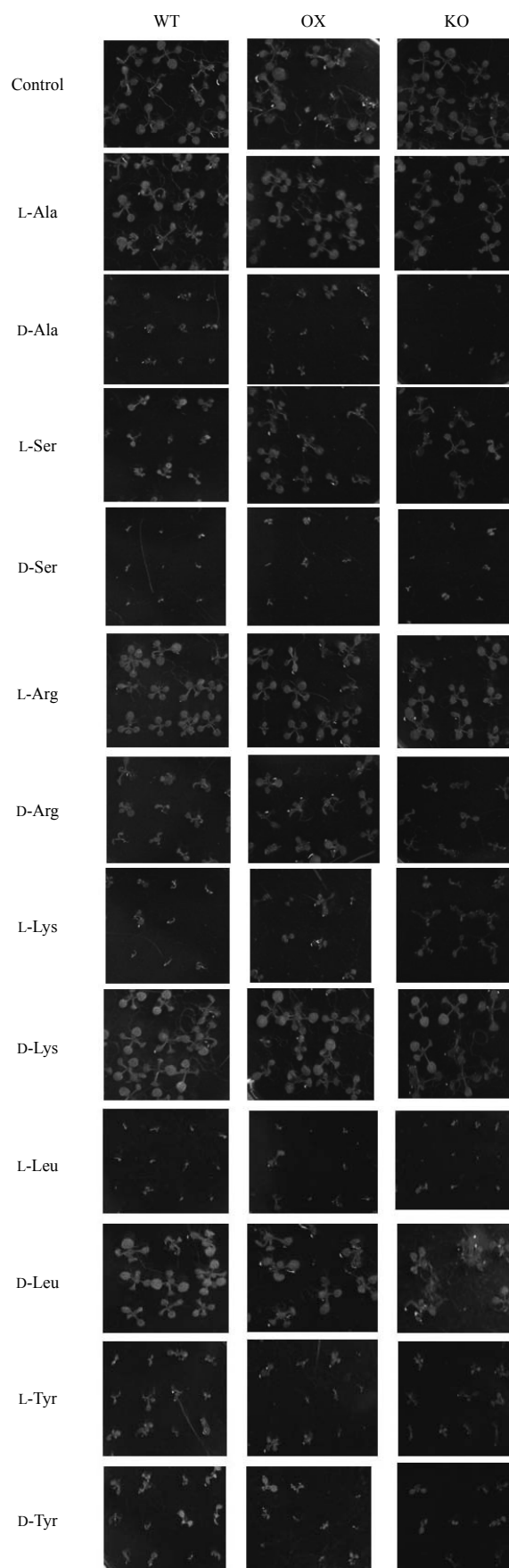


Fig. 1 Photographic analysis of *A. thaliana* seedling. Inhibitory effects of typical amino acids were shown by photographic images. Each amino acid was added to MS medium at 1 mM except control. WT, OX and KO mean wild-type, serine racemase overexpressing and serine racemase gene knock-out strains, respectively.

Table 1 Effect of exogenous amino acids on *A. thaliana* growth

Group	Amino acid
Already reported	D-Ala (++++), D-Ser (++++), L-Ser (++)
Basic amino acid	D-Arg (++) , L-Lys (++++), L- and D-His (+)
Sulfur containing amino acid	L-Met (++)
Branched chain amino acid	L-Leu (++++), L-allo-Ile (++++), L-Val (+++), L-Ile (+)
Aromatic amino acid	L- and D-Tyr (+++), L- and D-Trp (+++), L-Phe (++) , D-Phe (+)

Other amino acids exerted no effect on *A. thaliana* growth.

Number of plus mark (+) means degree of inhibitory effect (++++, very strong; +++, strong; ++, medium; +, weak).

鎖アミノ酸そして芳香族アミノ酸を含む18種のアミノ酸により生育阻害が引き起こされた一方で、如何なるアミノ酸においても顕著な生育促進は認められなかった。Table 1に分類したように、アミノ酸による生育阻害にはある一定の規則性が認められた。ヒスチジンを除く塩基性アミノ酸はL-体またはD-体のどちらか片方のみが、芳香族アミノ酸はL-体およびD-体が同程度に、そして分岐鎖アミノ酸および含硫アミノ酸はL-体のみが生育阻害効果を示した。すなわちこの結果から、外因性アミノ酸によるシロイヌナズナの生育阻害においてアミノ酸側鎖の性質がエナンチオマーに対する選択性に反映されることが示唆され、極めて興味深い結果が得られた。

シロイヌナズナに対する阻害効果が認められたアミノ酸のうち、L-, D-セリン, D-アラニン, L-リジンおよびD-アルギニンの5種について、その阻害効果の濃度依存性を定量的に評価した。各アミノ酸を終濃度0.1, 0.3または1 mMとなるように添加し10日間培養した後に、植物体の胚軸長、第一本葉長および重量を測定した。その結果、5種全てのアミノ酸において、胚軸長 (Fig. 2A) および第一本葉長 (Fig. 2B) の伸長、重量の増大 (Fig. 2C) という全ての要素で濃度依存的な阻害が認められ、外因性アミノ酸による阻害は特定部位の発達に対して特異的ではなく、植物体全体の生育に作用することが示唆された。アミノ酸による生育阻害が引き起こされる機構は不明であるが、D-セリン添加によって根からのイオン取り込みが阻害されることが報告されている⁵⁾。根による栄養源の取り込み能が損なわれるとすれば、植物体全体の生育に負の影響を及ぼすことは合理的な帰結である。しかしながら、性質や代謝経路の異なる複数のアミノ酸による阻害が全て同じ機構で引き起こされるとは考えづらく、個々のアミノ酸による影響をイオン取り込みという観点も含めて検証する必要がある。また、実際にアミノ酸が取り込まれた結果として生育阻害が起こるのかどうか、という点も興味深い疑問点である。多くのD-アミノ酸がシロイヌナズナによって取り込まれるとの報告も為されているが^{9, 10)}、これらは高濃度 (10 mM オーダー) のD-アミノ酸含有培地に浸漬することで検証されており、阻害効果が認められる濃度に即した条件下 (100 μM オーダー) での検証もまた必要となるであろう。

D-セリン添加時には、セリンラセマーゼ過剰発現株において若干の耐性向上傾向が認められ、セリンラセマーゼ

のD-セリン分解活性よるものと考えられた。また、L-セリン添加時には、セリンラセマーゼ過剰発現株およびセリンラセマーゼ遺伝子破壊株の両株において耐性の向上傾向が認められた。現在のところL-セリンによる生育阻害機構は不明であるが、セリンラセマーゼの有するラセミ化活性によりD-セリンが生合成されるために引き起こされると仮定すれば、セリンラセマーゼ遺伝子破壊株においてはD-セリン生合成能の欠如のためにL-セリンに対する耐性が向上し、セリンラセマーゼ過剰発現株においてはセリンラセマーゼがラセミ化活性と同時にL-, D-セリンに対する分解活性を有するために耐性が向上した、と推測できる。他のグループの報告によると、より高濃度 (10 mM

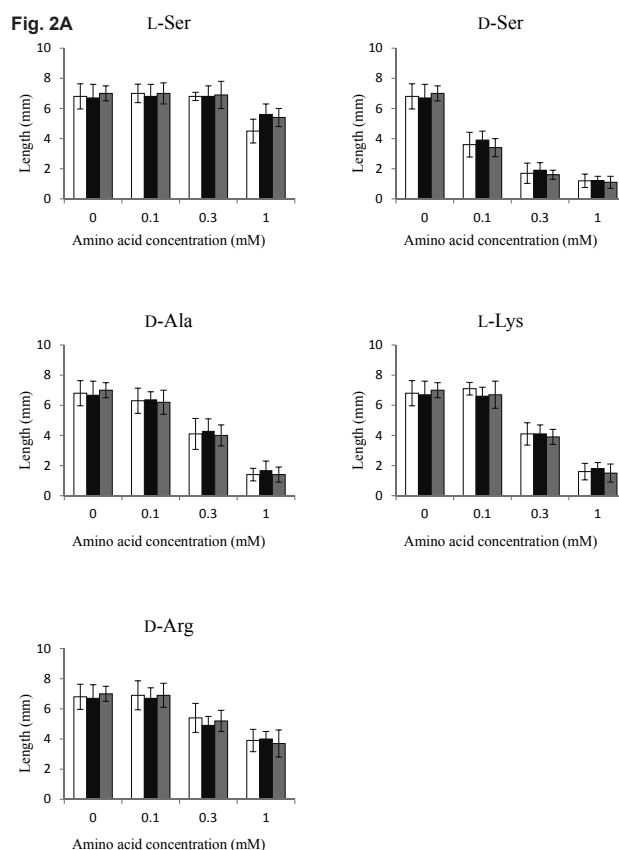
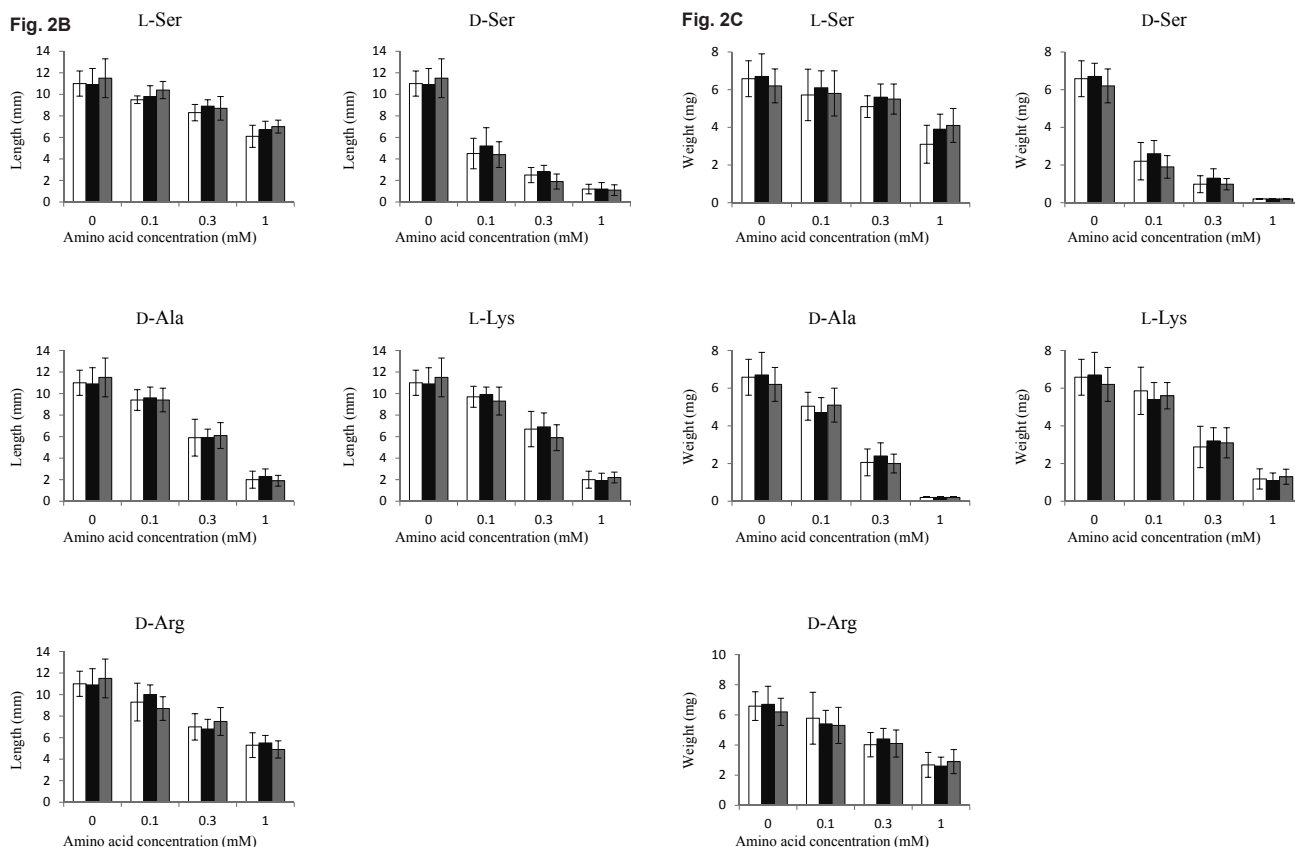


Fig. 2 Quantitative analysis of inhibitory effect of exogenous amino acid.

Lengths (mm) of hypocotyl (A) and first true leaf (B) and body weight (mg, C) of *A. thaliana* seedling were measured after cultivation at 25°C for 10 days (n = 5). White, black and gray bars mean wild-type, serine racemase overexpressing and serine racemase gene knock-out strains, respectively.



オーダー) の条件下においてはD-アスパラギン酸もまたシロイヌナズナに対する生育阻害を引き起こすこと、およびD-アスパラギン酸代謝にD-アミノ酸アミノ基転移酵素が関与することが示唆されている⁷⁾。本研究では、各アミノ酸を終濃度0.1～1 mMとなるように添加した際の影響を評価した結果、L-, D-セリンに対する耐性に若干の差異が見られたものの、他のアミノ酸については実験に用いた3株間で顕著な差異は認められなかった。添加アミノ酸濃度をより幅広い領域で検証することで株間差異が見出される可能性もあり、今後の検討課題である。

謝 辞

本研究は文部科学省の科研費(課題番号24580151)および文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(平成25年～平成29年)により実施している研究である。

参考文献

- 1) Leeson PD, Iversen LL (1994) The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *J Med Chem* 37: 4053-4067.
- 2) D'Aniello A (2007) D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res Rev* 53: 215-234.
- 3) Abe H, Yoshikawa N, Sarower MG, Okada S (2005) Physiological function and metabolism of D-alanine in aquatic animals. *Biol Pharm Bull* 28: 1571-1577.
- 4) Brückner H, Weathauer T (2003) Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids* 24: 43-55.
- 5) Elis RJ, Joy KW, Sutcliffe JF (1964) The inhibition of salt uptake by D-serine. *Phytochemistry* 3: 213-219.
- 6) Fujitani Y, Nakajima N, Ishihara K, Oikawa T, Ito K, Sugimoto M (2006) Molecular and biochemical characterization of a serine racemase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 67: 668-674.
- 7) Funakoshi M, Sekine M, Katane M, Furuchi T, Yoshida M, Yoshikawa T, Homma H (2008) Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase - D-aspartate behavior during germination. *FEBS J* 275: 1188-1200.
- 8) 老川典夫 (2013) シロイヌナズナセリンラセマーゼ遺伝子の欠損株及び過剰発現株の調製と性質. *ビタミン* 87: 211.
- 9) Gördes D, Kolukisaoglu Ü, Thurow K (2011) Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Amino acids* 40: 553-563.
- 10) Gördes D, Koch G, Thurow K, Kolukisaoglu Ü

(2013) Analyses of *Arabidopsis* ecotypes reveal metabolic diversity to convert D-amino acids. SpringerPlus 2: 559-569.