- mic dentinogenesis in the rabbit incisor: circadian, ultradian, and infradian periods, *Calcif Tiss Int*, **32**, 29-44.
- 15) Schour I, 1953. Noyes' Oral Histology and Embryology, with Laboratory Directions, Lea & Febiger, Philadelphia, 389-399.
- 16) 脇田稔, 2006. 象牙質の構造, 「口腔組織・発生学」 脇田稔, 前田健康, 山下靖雄, 明坂年隆(編), 医歯薬出版, 東京, 104-134.

植物におけるメラトニンの機能を探る モデルシステムの構築に向けて

江 面 浩¹、岡 崎 正 晃²

(¹筑波大・院生命環境、²岡山大・異分野融合先端研究コア)

E.mail: ezura@gene.tsukuba.ac.jp

1. はじめに

植物におけるメラトニン(N-アセチル-5-メトキシトリプタミン)の存在は、1995年に初めてDubbelsらとHattoriらによってそれぞれ報告され^{1,2)}、以降、様々な植物種や器官に数pg〜数μg(/g FW)程度存在することが明らかにされている(表1)。種・属を問わず多くの植物が微量ながらもメラトニンを含み、様々な器官や発達過程において種々の蓄積パターンを示すことから、動物同様に植物においても何らかの機能を担っていると考えられている。植物発達におけるメラトニンの生理機能に関する報告として、表2のような影響がこれまでに観察されている。脊椎動物のような概日リズムに関与する報告はなく、植物ホルモンのオーキシンの一種であるインドール酢酸との構造の類似性やメラトニンの強い還元能力に見られる化学的性質から予測されるような、オーキシン様活性や抗酸化活性への関与が示されている。

しかし、これまで行われてきたこれらの機能解析の方法は、大量のメラトニンを植物体に直接または根からの吸収によって投与するものであり、外生的な影響も強く出ていることが懸念される。実際、メラトニン処理により内生のポリアミンやインドール酢酸が増加していたことが報告されており^{3,4)}、メラト

ニン投与による副次的な影響が現れることも考慮しなくてはならない。このような理由から、植物におけるメラトニンの直接的な生理機能は未解明のままであり、我々はその解決策として分子遺伝学的アプローチによるメラトニン研究を推進している。メラトニンの生合成経路やシグナル伝達経路を遺伝的に改変することができれば、特異的な生理機能を観察することが可能となる。

我々は、植物の内生メラトニン量を改変することにより、機能過剰株もしくは欠損株を作出し、メラトニンの直接的な生理機能を探ることを検討した。脊椎動物において、メラトニンはトリプトファンから4つの連続する反応を経て合成され、主な経路としてホルミル-N-アセチル-5-メトキシキヌレナミンへと代謝される(図1)。植物においても同様な生合成代謝経路が存在する可能性が示されているが、合成・代謝を担う鍵酵素については不明であった。そこで我々は、果実発達のモデル植物であるトマト品種マイクロトムを用いて、メラトニンの器官における分布、植物発達に伴う蓄積量の詳細な調査を行い、メラトニン生合成経路の検証を行った⁵⁾。さらに、その知見に基づいてメラトニン生合成関連遺伝子を植物から単離し、それらの機能解析を行うとともに、遺伝子組換え技術を活用して

表1 高等植物におけるメラトニンの内生量

Plant species	Organs	Concentration	Method of melatonin determination	Reference
5 edible species tobacco	edible parts leaves	2-510 pg/g FW 40-100 pg/g FW	RIA; GC-MS	Dubbles et al. 1995
24 edible plants	edible parts	10-5,300 pg/g FW	RIA; HPLC-FD	Hattori et al. 1995
<i>Chenopodium rubrum</i>	shoots	up to 250 pg/g FW	LC-MS/MS; RIA	Kol_r et al. 1997
feverfew	leaves and flowers	1.4-2.5 μ g/g DW	not reported	Murch et al. 1997
St. John's wort	leaves and flowers	1.8-4.4 μ g/g DW		
<i>Scutellaria species</i>	leaves	0.1-7.1 μ g/g DW		
15 species of edible plants	seeds	2-190 ng/g DW	RIA; HPLC-ECD	Manchester et al. 2000
morning glory	shoots	up to 12 pg/g FW	GC-MS; RIA	Van Tassel DL et al. 2001
<i>Chenopodium rubrum</i>	shoots	100 pg/g FW	LC-MS/MS	Wolf et al. 2001
tart cherries	fruits	2-13 ng/g FW	HPLC-ECD	Burkhardt et al. 2001
St. John's wort	developing flowers	up to 4,000 nmol/g FW	HPLC-ECD; LC-MS/MS; RIA	Murch and Saxena 2002
Chinese medicinal herbs	various organs	up to 3,800 ng/g DW	HPLC-FD; LC-MS/MS	Chen et al. 2003
huang-qin	shoots	9-44,000 nmol/g DW	HPLC-ECD; LC-MS/MS; RIA	Murch et al. 2004
lupin	hypocotyls	9-28 ng/g FW	HPLC-ECD; LC-MS/MS	Hernandez-Ruiz et al. 2004
purslane	leaves	19 ng/g FW	GC-MS	Simopoulos et al. 2005
tomato	fruits	up to 1.4 ng/g FW	HPLC-FD, ELISA	Pape and Luning 2006
grapes	berry skins	up to 965 pg/g FW	HPLC-FD; ELISA	Iriti et al. 2006
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	roots, leaves, seeds	0.3-34 μ g/g FW	HPLC-FD	Afreen et al. 2006
water hyacinth	leaves, flowers	4-306 ng/g FW	LC/ESI/MS-MS	Tan et al. 2007
lupin barley	roots, leaves, cotyledons, hypocotyls, seeds	0.5-38 ng/g FW 0.1-9.6 ng/g FW	LC-TOF/MS	Hernandez-Ruiz and Arnao 2008
tomato	leaves, stems, roots, flower, fruits, seedlings, seeds	2-39.4 ng/g FW	ELISA	Okazaki and Ezura 2009
cucumber	seeds	11 ng/g FW	HPLC-EC	Posmyk et al. 2009
<i>Datura metel</i>	developing flowers and fruits	up to 50 ng/g FW	HPLC-MS/MS	Murch et al. 2009

FW: fresh weight, DW: dry weight, HPLC: high-performance liquid chromatography, ECD: electrochemical detection, FD: fluorescence detection, LC-MS/MS: liquid chromatography - tandem mass spectrometry, GC-MS: gas chromatography - mass spectrometry, RIA: radioimmunoassay, LC-TOF/MS: liquid chromatography with time-of-flight/mass spectrometry.

表2 植物発達におけるメラトニンの影響

Melatonin's function	Plant species	Reference
regulation of mitosis	African blood lily	Jackson 1969
mitotic arrest	onion	Banerjee and Margulis 1973
delaying flower induction	<i>Chenopodium rubrum</i>	Kol_r et al. 2003
stimulation of hypocotyls growth	lupin	Hernandez-Ruiz et al. 2004
attenuation of cold-induced apoptosis	carrot suspension cells	Lei et al. 2004
stimulation of coleoptile and root growth	canary grass, wheat, barley and oat	Hernandez-Ruiz et al. 2005
adventitious and lateral root regeneration	lupin	Arnao and Hernandez-Ruiz 2007
protection against chlorophyll degradation	barley	Arnao et al. 2008
protection of seeds germination against toxic copper ions	red cabbage	Posmyk et al. 2008
stimulation of root growth	mustard	Chen et al. 2008
protection of seeds germination against chilling stress	cucumber	Posmyk et al. 2009

図1 動物および植物におけるメラトニン合成・代謝経路

TPH: tryptophan 5-hydroxylase, AADC: aromatic amino acid decarboxylase, AANAT: arylalkylamine *N*-acetyltransferase, HIOMT: hydroxyindole-*O*-methyltransferase, TDC: tryptophan decarboxylase, IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase, T5H: tryptamine 5-hydroxylase.

マイクロトムの内生メラトニン量の改変を試みた^{6, 7)}。以下、これらの結果について紹介する。

2. 果実発達のモデル植物である矮性トマト品種マイクロトム

マイクロトムは、ガーデニング用にアメリカで開発された小型矮性トマト品種で、小面積で多数の個体を栽培できること、蛍光灯の下でも栽培できること、世代時間が短いこと(播種から70~90日で果実収穫可能)など、実験植物として有利な特徴を有する(図2)。文部科学省が実施するナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)の対象生物の1つに選定され、機能ゲノム研究のための基盤情

報とツール整備が我が国の研究者により強力に進められており、世界的に注目を集めている次世代モデル植物である。トマトNBRPでは、このマイクロトムを基盤とした変異体、完全長cDNAクローンおよびBACライブラリーの整備、統合データベースの構築を実施している^{8, 9)}。これらのリソースに加えて、マイクロトムの高効率形質転換技術の開発¹⁰⁾や高効率変異体選抜技術であるTILLING (Targeting induced local lesions in genomes) プラットホーム開発(未発表)などのツール開発も行われ、これらの技術がルーティンで使用できる状態になっている。

図2 モデルトマト品種マイクロトムのモデル植物としての利点

3. 植物におけるメラトニンの生合成経路

トマトおよびその近縁種 *Solanum pimpinellifolium* ではその一部の器官でメラトニンの存在が示されているが¹⁾、基本情報として、マイクロトム各器官におけるメラトニンの分布(表3)と果実発達に伴う蓄積量の変化を調査した(図3)。メラトニンはマイクロトムの全ての器官で検出され、特に種子や実生において多く蓄積していることが明らかとなった。

また、果実では発達に伴ってメラトニンを蓄積していた。

続いて、トマトにおけるメラトニン生合成能の検証を行った。メラトニンの前駆物質と考えられる基質、すなわち、トリプトファン、トリプタミン、5-ヒドロキシトリプトファン、セロトニン、*N*-アセチルセロトニン(NAS)をトマト実生に添加してメラトニン内生量を測定した。その結果、いずれの基質を加えた場合でも、何も加えない場合と比べてメラト

表3 トマト(品種マイクロトム)の様々な器官におけるメラトニン内生量

Organs	Melatonin(ng/g FW)
Leaflets	4.6±1.6
Leafstems	2.0±0.3
Stems	5.3±1.5
Roots	3.1±1.0
Flowers	2.8±1.2
Red fruits	2.5±0.5
Seedlings	22.7±2.0
Seeds	39.4±2.5

The values shown are the means of at least 2 parallel measurements±SEM.

図3 マイクロトムの果実発達に伴うメラトニン蓄積量の変化
P<0.05 by Fisher's PLSD test.

ニン内生量が増加し、特にNASを添加した実生においてメラトニン内生量が大幅に増加した(試料未掲載)。これらの結果から、マイクロトムにおいても動物と同じメラトニン生合成経路が存在し、セロトニンをアセチル化しNASを生成する酵素、アリルアルキルアミン *N*-アセチル基転移酵素(AANAT)がメラトニン生合成の鍵酵素である可能性が示唆された。

4. 遺伝子組換えによる内生メラトニン量の制御

マイクロトムでのメラトニン生合成経路が示唆されたことによって、関連遺伝子の発現制御によりメラトニン内生量を制御する研究に取り組んだ。NASがメラトニン生合成に重要であることが明らかとなったので、AANATをコードする遺伝子を植物から探し、トマトで過剰発現させてメラトニン内生量を増加させることを試みた。また、動物でメラトニン代謝を担うインドールアミン酸素添加酵素(IDO)についても同様に植物から探し、遺伝子導入によりメラトニン内生量を減少させることを試みた。動物のAANAT及びIDO遺伝子の塩基配列を参考にして、AANAT及びIDO相同遺伝子を植物のゲノムデータベースで探索したところ、AANAT相同遺伝子は藻類のクラミドモナス(以下、*CrAANAT*)で、IDO相同遺伝子はイネ(以下、*OsIDO*)でcDNAクローンが存在したので、これらを用いた。*CrAANAT*、*OsIDO*をCauliflower virus 35Sプロモーター下で恒常的発現するように、*Agrobacterium*を用いてマイクロトムに遺伝子導入を行った。

得られた*CrAANAT*過剰発現組換え体では、メラトニン内生量が非組換え体に対して最大で8倍程度に増加した(図4)。一方、*OsIDO*過剰発現組換え体では、メラトニン内生量が非組換え体に対して最大で4分1程度まで減少していた(図5)。これらの結果から、植物においてもAANATはメラトニン生合成に、IDOはメラトニン代謝に関与している

ことが示唆された。また、これらの遺伝子を利用することで植物がもつメラトニンの内生量の制御が可能であることが示された。なお、*OsIDO*過剰発現組換え体でメラトニン内生量が完全に消失することではなく、メラトニンの効果をより明確に示すにはメラトニンをまったく含まない組換え体を得る必要がある。しかしながら、メラトニンが生育に必須である場合、組換え体を得ることは不可能なため、部位特異的に発現するプロモーターの利用や誘導条件下でのみメラトニン内生量を減少させるなど一層の工夫が求められる。

5. おわりに

以上に示したように、次世代モデル植物であるトマト品種マイクロトムにおいて、遺伝子組換え技術を利用してメラトニンの内生量を制御する技術が開発されつつある。これらのツールと組換え体を活用することで、植物発達におけるメラトニンの生理機能の解明が進むものと期待される。今回紹介した一連の研究で得られた組換えトマトの解析は継続中であるが、メラトニン内生量を減少した組換え体では葉の形態変化、葉色の変化など表現型の変化が見られており、今後の解析結果が期待される。これらの基礎研究への利用に加えて、メラトニンを新たな植物生長調節物質として農業生産に利用することや、農作物の高付加価値化のためにメラトニン内生量を制御することも可能となるだろう。

謝 辞

本ミニレビューは、第34回日本比較内分泌学会大会(2009年10月22日～24日、千里ライフサイエンスセンター)で開催された比較内分泌学会企画委員会企画シンポジウム「生物リズムをあやつる情報伝達分子研究の新展開」で発表した内容に加筆した。このシンポジウム及び本誌で発表の機会を与えていただきました服部淳彦先生(東京医科歯科大)、及び安東宏徳先生(九州大)に感謝いたします。また、本研究で用いたメラトニン抗

図4 *CrAANAT*を導入した組換えトマト (品種マイクロトム) の葉におけるゲノムPCR法による導入遺伝子の確認 (A)、qRT-PCR法による導入遺伝子の発現確認 (B) およびELISA法によるメラトニン内生量の定量 (C)

* $P < 0.05$, Student's t-test.

図5 *OsIDO*を導入した組換えトマト (品種マイクロトム) の葉におけるゲノムPCR法による導入遺伝子の確認 (A)、qRT-PCR法による導入遺伝子の発現確認 (B) およびELISA法によるメラトニン内生量の定量 (C)

* $P < 0.05$, Student's t-test.

体 (HAC-AA92-03RBP86) をご供与下さいました崎尚先生 (群馬大) に感謝いたします。

文 献

- 1) Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W, 1995. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res* **18**, 28-31
- 2) Hattori A, Migita H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ, 1995. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int* **35**, 627-634.
- 3) Lei XY, Zhu RY, Zhang GY and Dai YR, 2004. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines. *J Pineal Res* **36**, 126-131
- 4) Chen Q, Qi WB, Reiter RJ, Wei W and Wang BM, 2009. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *J Plant Physiol* **166**, 324-328
- 5) Okazaki M, Ezura H, 2009. Profiling of melatonin in model tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *J Pineal Res* **43**, 338-343
- 6) Okazaki M, Higuchi K, Hanawa Y, Shiraiwa Y, Ezura H, 2009. Cloning and characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* cDNA arylalkylamine N-acetyltransferase and its use in the genetic engineering of melatonin content in the Micro-Tom tomato. *J Pineal Res* **43**, 373-382
- 7) Okazaki M, Higuchi K, Aouni A, Ezura H, 2010. Lowering intercellular melatonin by

- transgenic analysis of indoleamine 2,3-dioxygenase from rice in tomato plants. *Journal of Pineal Research*. (In press).
- 8) Matsukura C, Aoki K, Fukuda N, Mizoguchi T, Asamizu E, Saito T, Shibata D, Ezura H, 2008. Comprehensive resources for tomato functional genomics based on the miniature model tomato Micro-Tom. *Current Genomics* **9**, 436-443
- 9) Aoki K, Yano K, Suzuki A, Kawamura S, Sakurai N, Suda K, Kurabayashi A, Suzuki T, Tsugane T, Watanabe M, Ooga K, Torii M, Takahashi H, Watanabe Y, Kodama M, Ichinose Y, Kikuchi M, Fukushima S, Okabe A, Arie T, Sato Y, Yazawa K, Satoh S, Omura T, Ezura H, Shibata D, 2010. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC Genomics* **30**; 11(1): 210.
- 10) Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H, 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar of tomato functional genomics. *Plant Cell Physiology* **47**, 426-431

概日時計の時刻リセットの分子機構

金 尚 宏、深 田 吉 孝(東京大・院理・生物化学)
E-mail: konntgf@gmail.com・sfukada@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

1. 時刻調節機能を持つ概日時計

地球の自転は周期的な環境変化をもたらし、地球の生物は昼と夜のダイナミックな環境変化に永い年月にわたってさらされてきた。その結果、睡眠・覚醒、代謝活動、免疫機能といった生物の多様な生理現象に約一日のリズムが観察される¹⁾。環境変化の無い、例えば暗黒条件においてもこれらのリズムが観察されることから、生物は約一日周期で時を刻む体内時計を獲得したことがわかる。この生物時計は概日時計 (circadian clock) と呼ばれ、地球上のほぼ全ての生物が持つ。さらに哺乳類の体内を見てみると、概日時計はほぼ全ての組織に存在することがわかってきた。また、概日時計の周期は正確に24時間ではなく、ヒトの場合は約25時間の活動リズムを示す。この環境サイクルと体内リズムの時間のズレを解消する(両者を同調させる)ために、環境因子を利用して概日時計の時刻が調節される。最も普遍的な同調刺激は光であるが、時刻によって光シグナルは概日時計に対して異なる効果を持つ。つまり、夜明け前の光は概日時計の時刻(位相)を前進させるの

に対し、日没後の光は位相を後退させる。一方、昼間の光照射は位相変化を起こさない。光シグナルの他にも、食事、温度、社会的な相互作用、音、あるいは活動などが概日時計の時刻調節シグナルとして働く。

2. 中枢時計と末梢時計

哺乳類の個体において各組織の概日時計は階層的な構造を持つ^{2, 3)}。視床下部の視交叉上核に存在する時計機構は中枢時計と呼ばれ、行動や血中ホルモン濃度などのリズムを制御している。一方、肝臓や腎臓など末梢組織に存在する時計は末梢時計と呼ばれ、代謝やイオン濃度の調節など各組織に特有の機能を制御する。中枢時計の時刻は光や自らの活動量などによって調節され、この中枢時計は神経や液性因子の調節を介して末梢時計の時刻を調節している。興味深いことに、生命の維持が脅かされるような深刻な状況では末梢時計は中枢時計からの支配を逃れて独自の時刻調節を行うことが知られている。例えば、夜行性のげっ歯類に昼間の限られた時間帯のみに餌を与えると、餌が与えられる少し前から餌