

薄層クロマトグラフィーと画像解析を用いた トウガラシ属植物におけるポリアミン蓄積量の調査

今中 雄大*・田中 諒*・田中 英法*・今井 章裕*

(平成30年8月21日受付)

Polyamine analyses in capsicum plants by a combined method of thin-layer chromatography and image analysis

Yudai IMANAKA, Makoto TANAKA, Hidenori TANAKA and Akihiro IMAI

(Received Aug. 21, 2018)

Abstract

Polyamines are widely distributed in living organisms and essential for their cell proliferation and cell differentiation. Although it has shown in recent decades that polyamines have specific functions in plants, such as environmental stress response and organ development, the molecular basis still remains unclear. A previous study has reported that polyamines are highly abundant in green peppers. In this study, to examine whether polyamines are abundant in the every cultivars of capsicum plants, we analyzed the amount of polyamines, which are putrescine, spermidine, and spermine, by a combined method of thin-layer chromatography and image analysis. Taking an organ-specific of polyamine accumulation into consideration, our results may suggest that high accumulation of putrescine in green peppers is caused by a competitive inhibition due to ethylene biosynthesis.

Key Words: polyamine, green peppers, capsicum plants, thin layer chromatography, image analysis

1. はじめに

ポリアミンは、あらゆる生物の細胞内にみられ、細胞増殖、細胞分化、および環境適応など、多岐にわたる生命現象に関与する生理活性物質である^[1]。定義として“ポリアミン”は、アミノ基を2つ以上含む低分子脂肪族化合物を指す総称である。代表的なポリアミンとしては、2個のアミノ基を有するプトレスシン、3個のアミノ基を有するスペルミジン、4個のアミノ基を有するスペルミンの三種が挙げられる。ヒトを含むほとんど全ての真核生物では、プトレスシンはオルニチンから合成されるが、例外としてアブラナ科植物の多くの種ではプトレスシンはアルギニンからアグマチンを経由して合成されるなど、その生合成経路には生物種間で多様性がみられることが分かっている^[2]

(図1)。スペルミジンは、プトレスシンと補因子である脱炭酸型S-アデノシルメチオニン(dcSAM)を基質に、スペルミンは、スペルミジンとdcSAMを基質に、それぞれスペルミジン合成酵素とスペルミン合成酵素の触媒活性によるアミノプロピル基の転移で合成される。ポリアミンは細胞中では、核酸やATP、その他の酸性分子と結合して局在することで、上述のような細胞プロセスに寄与すると考えられている^[3]。生物におけるポリアミン生合成の必要性については、逆遺伝学的手法によって調べられており、出芽酵母のスペルミジン合成酵素遺伝子 *SPE3* の欠損変異体はスペルミジンまたはスペルミン要求性の増殖を示し^[4]、シロイヌナズナのスペルミジン合成酵素遺伝子 *AtSPDS1* および *AtSPDS2* の二重欠損変異は胚性致死を引き起こす^[5]。加えて、ポリアミン生合成酵素の阻害剤を用いることで悪

* 広島工業大学生命学部食品生命科学科

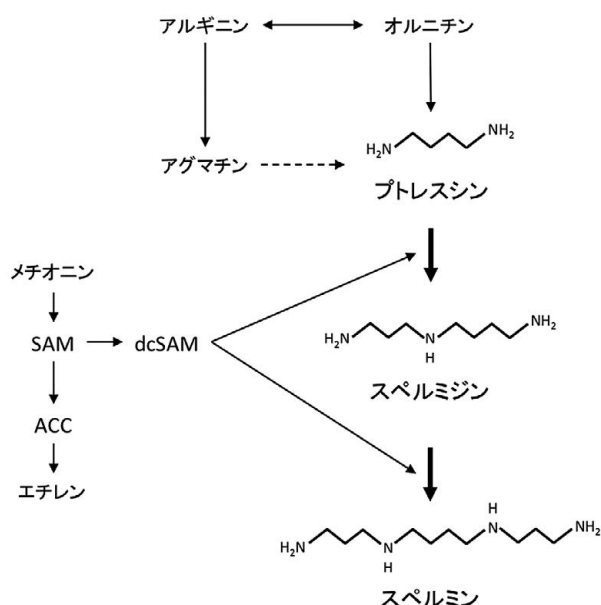


図1. ポリアミンの生合成経路と化学構造式。

プトレスシン、スペルミジン、およびスペルミンはアミノプロピル基の転移によって合成される。SAM, S-アデノシルメチオニン；dcSAM, 脱炭酸型 S-アデノシルメチオニン；ACC, アミノシクロプロパンカルボン酸。

性黒色腫（メラノーマ）の細胞増殖が停止することなども明らかになっており^[6]、複数の生物種においてポリアミンの生合成が細胞の生存に必須であることを示唆する結果が蓄積している。

ポリアミンは消化管でそのまま吸収されることから、食品として摂取することで体内への供給が可能である。高ポリアミンの飼料を与えたマウスでは、毛並みが良く、中年期の生存率が上昇する^[7]。また、ショウジョウバエでは、ポリアミンを多量に含む食品を摂取することで、加齢とともに起きる記憶力の低下が緩和される^[8]。他にも、ポリアミンは動脈硬化の誘発因子である LFA-1 の発現を抑制することから、動脈硬化などの生活習慣病を予防できる可能性について唱えられている^[9]。こうした様々な疾病への関与を示す結果から、ポリアミンは、いわゆる“アンチエイジング効果”をもつ食品成分であるとして近年注目されている。

ポリアミンが、納豆、ぬか漬、チーズといった発酵食品に高濃度で含まれることはよく知られる。しかし、ピーマン (*Capsicum annuum* 'grossum') の果実にもポリアミンが多く含まれることは、あまり知られていない^[10]。ポリアミンは細胞分裂期の細胞において特に豊富に蓄積する。そのため、発酵食品に多く含まれるポリアミンは、活発に細胞増殖する微生物によって多量に産生されたものであると考えられる。しかし、ピーマンにおいて種子や果皮などの複合器官である果実にポリアミンが多く蓄積しているこ

とは興味深く、ポリアミンの植物細胞に特異的な未知の生理機能を示唆しているのかもしれない。本研究では、ピーマンを実験材料とし、植物体の異なる器官でも同様にポリアミンが多く蓄積しているのかについて調査した。また、生物学的に同種であるシシトウガラシ（以下シシトウと表記）やトウガラシの果実において、ピーマンと同様にポリアミンを多く含む食品であるのかについて明らかにすることを目的とした。一般に、ポリアミンを定量分析する実験手法としては、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が用いられるが、定量性が高い反面、装置やカラムが高価であり、研究の初発段階の試験的な実験を行う際には不適当である。本研究では、比較的安価な機器で簡便に測定できる薄層クロマトグラフィーを採用し、画像解析と融合させた方法で定量化を試みた。加えて、植物種間におけるポリアミンの生合成機構の違いや、新たな機能を類推する手がかりを得ることを目的とした。

2. 実験方法

2.1. ポリアミンの抽出

植物試料からのポリアミンの抽出とダンシル化は、Flores & Galston (1982)^[11]の方法を一部改変し、次の通りに行った。0.1-1.0 g の植物試料に対し、10倍量の 5% (v/v) 過塩素酸を加え、乳鉢と乳棒を用いて破碎した。抽出液をチューブに回収し、13,500 rpm で10分間遠心分離した。100 μ L の上清に 200 μ L のダンシルクロライド (5 mg/mL アセトン) と 100 μ L の飽和炭酸ナトリウムを加え、暗所で 2 時間静置した。その後、50 μ L の L(-)-プロリン (100 mg/mL) を加え、30分間静置した。さらに、250 μ L のベンゼンを加え、ボルテックスにより攪拌した後、2層に分離したベンゼン層 50 μ L を薄層クロマトグラフィーのサンプルとした。

2.2. 薄層クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィーによる展開方法は、高橋ら (2017)^[12]の方法に従った。薄層プレートは TLC ガラスプレートシリカゲル60 (メルクミリポア) を使用し、展開槽は円筒型 TLC 展開槽 (矢沢科学) を使用した。展開液には、クロロホルム：トリエチルアミン = 2 : 1 で混合した溶媒を用い、展開前に溶媒蒸気を展開槽内に十分に飽和させた。展開液がプレートの上から約 5 cm に到るまで展開を行った。

2.3. 画像解析

展開後の薄層プレートは、ChemiDocTM XRS システム (BIO-RAD) を用いて 302 nm の励起波長を照射し、露光時間 500 ミリ秒で蛍光画像を撮影した。取得した画像は、

ImageJ ソフトウェア ver 1.51s (NIH) を用いて解析され、該当するスポットのシグナル強度は Gel Analyzer モードで計算された。

3. 結果

3.1. 薄層クロマトグラフィーと画像解析によるポリアミン量の測定方法の定量性の検討

本研究では代表的なポリアミンであるプトレスシン、スペルミジン、スペルミンのみについて注目し、分析を行うことにした。まず、この三種類のポリアミン塩酸塩の混合水溶液を調製し、段階的に希釈した。その希釈液をダンシル化し、薄層クロマトグラフィーによって展開した後、高感度 CCD カメラを用いて、紫外線照射下で薄層プレートの蛍光像を TIFF 画像として取得した (図2A)。画像解析ソフト ImageJ の Gel Analyzer モードにより、取得した画像の各レーンのシグナルの水平方向の輝度値の和を、垂直軸に対してのスペクトルとして表示し (図2B)、各ピークについて積分した値を算出した。薄層クロマトグラフィーによる展開像におけるポリアミン三種のスポットの判別は高

橋らの論文^[12]を参照した。それぞれのポリアミンの物質質量とスペクトラムの積分した値 (面積) をプロットしたグラフを図2Cに示す。本研究で分析したプトレスシン、スペルミジン、スペルミンに関してはいずれも、60-2000 pmol の範囲内において、ポリアミン物質質量と面積の間に高い直線性が見られた (プトレスシン; $y = 2.559x + 3798$, $R^2 = 0.9848$, スペルミジン; $y = 4.153x + 295$, $R^2 = 0.9927$, スペルミン; $y = 4.5983x + 380$, $R^2 = 0.9886$)。プトレスシンに関しては、スペルミジンまたはスペルミンに比べ、基礎値が著しく高かったことから、同一スポットに未同定のダンシル化合物が含まれていることが示唆された。20 pmol 以下の物質質量では直線性が低くなることから、本研究では 60 pmol 相当以下のシグナルに関しては不検出 (n.d.) とした。

3.2. トウガラシ属の同種栽培品種間におけるポリアミン蓄積量の比較

ピーマンの栽培品種であるパブリカ、シシトウ、トウガラシ (図3A-D) の果皮の湿重量あたりのポリアミン含量に

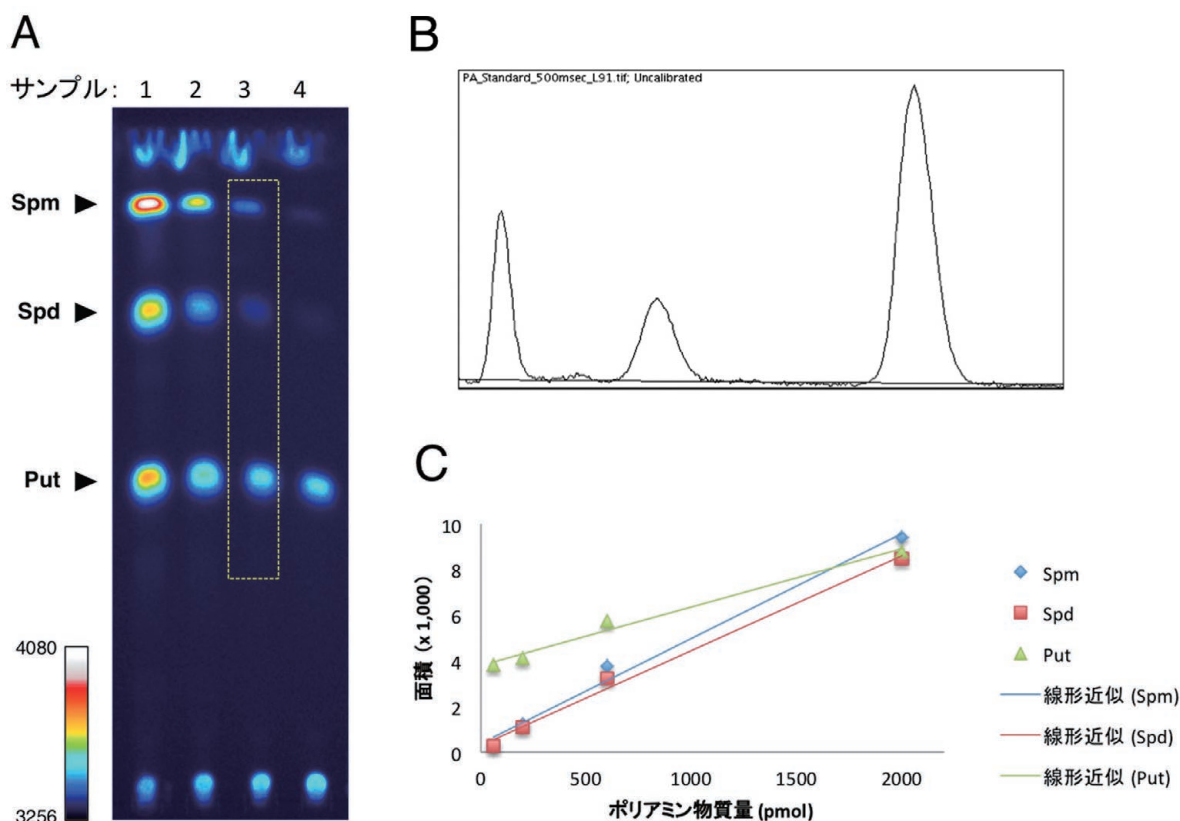


図2. 薄層クロマトグラフィーと画像解析によるポリアミン定量法の検討。

A, ポリアミン塩酸塩の混合溶液の薄層クロマトグラフィー展開像。蛍光シグナルの輝度は擬似カラーで表示した。サンプル1-4はそれぞれ、各種ポリアミンを各2,000 pmol, 600 pmol, 200 pmol, 60 pmolで混合したものである。B, 画像解析ソフト ImageJ を用いて、図2.A中の黄色点線枠の輝度値の和をスペクトラムで表示した図。C, 展開したポリアミン物質質量と画像解析により算出したスペクトラムのピークの囲まれた面積のグラフ。Spm, スペルミン; Spd, スペルミジン; Put, プトレスシン。

ついて、薄層クロマトグラフィーと画像解析を融合した方法を用いて比較解析を行った。本実験では、パプリカは黄色の果実から (図3B)、トウガラシは赤色の乾燥させていない果実 (図3D) から、それぞれ果皮を採取した。

上述の方法 (3.1. に記述) と同様に薄層クロマトグラフィー展開を行った蛍光画像を図4. に示した。シシトウ

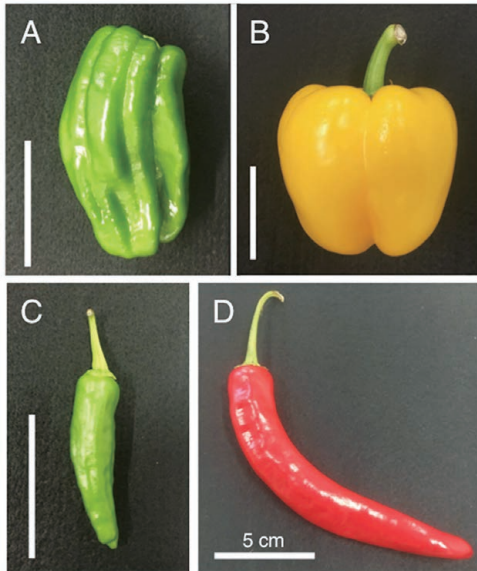


図3. 本実験で使用したトウガラシ属植物の果実。

A, ピーマン; B, パプリカ (黄色); C, シシトウ; D, トウガラシ (赤色)。図中のバーは全て5 cmを示す。

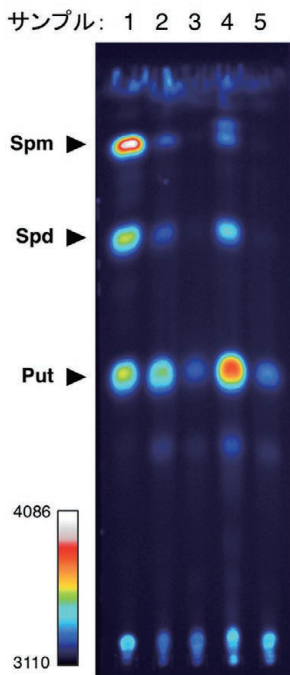


図4. トウガラシ属各種植物の果皮から抽出したポリアミンの薄層クロマトグラフィー展開蛍光画像。

蛍光シグナルの輝度は擬似カラーで表示した。サンプル1, 各2,000 pmolで混合した各種ポリアミン; 2, ピーマン; 3, パプリカ; 4, シシトウ; 5, トウガラシ。Spm, スペルミン; Spd, スペルミジン; Put, プトレスシン。

のレーンにおいて、スペルミンのスポットに隣接したシグナルが検出された。この蛍光画像をもとに、プトレスシン、スペルミジン、スペルミンの湿重量あたりの物質量を定量したグラフを図5. に示した。ピーマンとシシトウにおいては、分析した三種類のポリアミンのなかでプトレスシンが最も多く、パプリカとトウガラシではスペルミジンが最も多いことが分かった。湿重量あたりのポリアミン含量が最も多かったシシトウでは、プトレスシンが $1.626 \pm 0.205 \mu\text{mol/g F.W.}$ 、スペルミジンが $0.542 \pm 0.067 \mu\text{mol/g F.W.}$ 、スペルミンが $0.085 \pm 0.024 \mu\text{mol/g F.W.}$ 含まれていた (F.W. は湿重量 Fresh Weight の意)。一方、トウガラシは、プトレスシンが $0.051 \pm 0.096 \mu\text{mol/g F.W.}$ 、スペルミジンが $0.239 \pm 0.003 \mu\text{mol/g F.W.}$ 、スペルミンに関しては検出限界以下 ($0.03 \mu\text{mol/g F.W.}$ 以下) であり、パプリカは、唯一スペルミジンだけが検出されたが、 $0.251 \pm 0.013 \mu\text{mol/g F.W.}$ と、シシトウやピーマンに比べると低い値であった。

3.3. ピーマンにおける器官特異的ポリアミン蓄積量の測定

過去の研究において、ポリアミンが多く蓄積していることが明らかになっていたピーマンに関して、ポリアミンが植物体のどの器官に特に多く蓄積しているか3.2. の実験と同様の方法で解析した。ポリアミンを抽出する器官として、果皮、胎座、種子、葉、茎、根を対象とした。果皮、胎座、種子、茎に関しては、ポリアミンのなかでプトレスシンが最も多量に蓄積しているのに対し、葉および根においてはスペルミジンが最も多かった (図6)。プトレスシンに注目して比較すると、葉および根では検出限界以下であり、検出されたのは果皮、胎座、種子、および茎だけであった。プトレスシンが検出された4器官のうち、果皮は最も多く全体の53.3%を、次いで、茎、胎座、種子がそれぞれ、23.1%、15.0%、8.7%を占めることが分かった。

4. 考察

本研究では、従来のHPLC法に比べ、安価かつ簡便な方法として、薄層クロマトグラフィーと画像解析を融合させた定量方法を用いて植物試料のポリアミン含量を測定した。薄層プレート上のスポットの蛍光輝度値に関しては、少なくとも60-2,000 pmolの範囲においては、高い直線性が確認された (図2C)。Nishimura et al. (2006) の報告^[10]においてHPLC法で定量されたピーマンのポリアミン含量と比べて、今回の定量法において算出した値がほぼ一致することから、本手法による定量方法が概ね妥当であると考えられる。しかし、プトレスシンにおいては、物質量に対する輝度値の変化の直線性は高いと判断されるものの ($R^2 = 0.9848$)、バックグラウンドとなる基礎値がスペルミジンやスペルミンに比べ著しく高かった。これは、過剰のダンシ

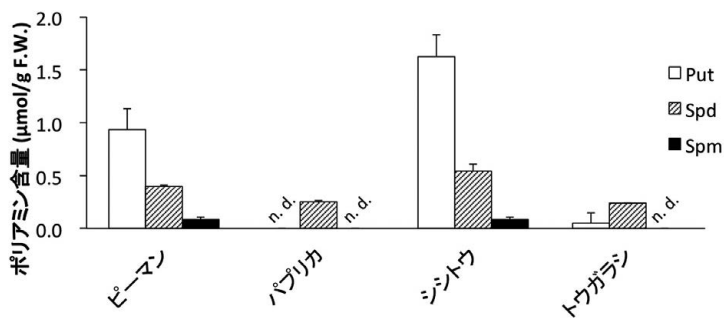


図5. トウガラシ属の同種栽培品種の果皮におけるポリアミン含量。

本実験は、独立に3回反復され、エラーバーはその標準偏差を示す。不検出であったポリアミンは、n.d.として表示した。Put, プトレスシン; Spd, スペルミジン; Spm, スペルミン。

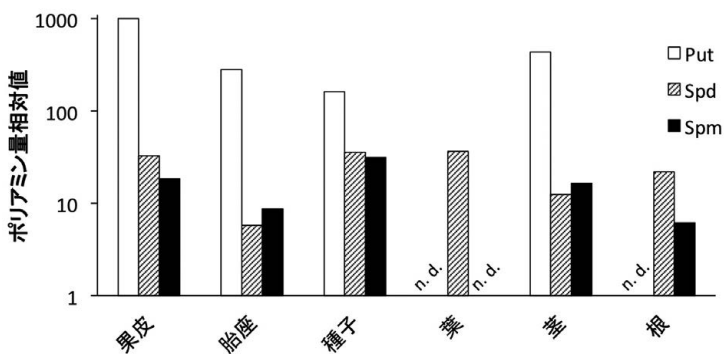


図6. ピーマンの植物体における器官特異的ポリアミン蓄積量。

不検出であったポリアミンは、n.d.として表示した。縦軸は湿重量あたりのポリアミン物質量を算出し、果皮のプトレスシンの値を1,000とした時の相対値で表示した。Put, プトレスシン; Spd, スペルミジン; Spm, スペルミン。

ルククロライドを除くために添加したプロリンがダンシル化され基礎値を増加させていると考えられ、このことから本方法ではプトレスシンの定量性が低くなっている可能性が否めない。一方、スペルミジンおよびスペルミンに関しては、バックグラウンドとなる基礎値は低かったため、これらの分子に関しては、本方法で定量した値には高い信頼性があると言えそうである。

果皮におけるポリアミン含量を比較したところ、シシトウはピーマンよりも湿重量あたりのポリアミン含量が高いことが明らかになった。一方、トウガラシはパプリカとほぼ同程度で、ピーマンやシシトウに比べると3種類のポリアミンの全てにおいて含量が低かった。この差の要因としては、果皮を構成する細胞内の水分が大きく影響しているのかもしれない。各果実の体積を比べると、今回使用したトウガラシやパプリカは、ピーマンやシシトウと比べて体積がかなり大きいことが推察できる(図3)。仮に細胞数が大きく変わらないとすれば、細胞内を占める水分が湿重量を大きく占め、本実験のように湿重量あたりでポリアミン含量を算出すると値は低くなるはずである。今後の研究として、乾重量あたりのポリアミン定量実験、または、果実あたりの細胞数をそれぞれ計測することで、果実あたりのポリアミン含量を定量することができるはずである。それにより、栽培品種ごとの詳細な比較と特性の考察が可能になるだろう。

本研究で行なった薄層クロマトグラフィーで、シシトウにおいて、スペルミンのスポットに隣接したシグナルが認められた(図4)。これはスペルミンの構造異性体であるテ

ルモスペルミンと考えられる。テルモスペルミンの生合成酵素遺伝子 *ACL5* はシロイヌナズナにおいて初めて同定されており、その後植物界において幅広くみられる遺伝子であることが知られている^{[13][14]}。テルモスペルミンは茎伸長に必要なポリアミンであるが^[15]、その作用機構については不明な点が多い。本研究で調査した植物はいずれも同種でありながら、シシトウのみでテルモスペルミンが検出されたことは興味深く、栽培品種が系統的に派生する短期間において遺伝子進化が起きた可能性が強く考えられる。

ピーマンの器官別ポリアミンの相対蓄積量を調べた結果、果実に含まれる器官(果皮、胎座、種子)において多くポリアミンが蓄積していることが明らかになった他、莖においても多量に蓄積することが明らかになった。莖には、形成層と呼ばれる維管束の木部と節部をつくり出し肥大生長を行う分裂組織があり、そこでは細胞分裂が活発である。ポリアミンが細胞増殖期に多く蓄積していることを踏まえると^[1]、莖に蓄積するポリアミンは形成層に比較的多く局在しているのかもしれない。あるいは、ポリアミンは細胞壁と結合し、それらの機能性や安定性を高める作用があると考えられている^[16]ことから、ピーマンの莖の細胞中には元来遊離のポリアミンが多く局在しているのかもしれない。また、この器官特異的なポリアミン類の局在に関しては、トウガラシ属の栽培品種間で違いがあるかについては今後明らかにしていくべき課題である。

複数の生物において、スペルミジンやスペルミンの生合成は、基質のひとつである脱炭酸型S-アデノシルメチオニン(dcSAM)の生合成が律速段階となることが多くの生物

で報告されている^[1] (図1)。その反応の基質である S-アデノシルメチオニン (SAM) は、果実の成熟を促進する植物ホルモンであるエチレンの生合成に至る反応の基質でもあり、植物においてポリアミンとエチレンの生合成は拮抗関係にある。今回の研究において、ピーマンは、植物体のどの器官においてもポリアミンを多く蓄積するのではなく、とりわけ果実に多くポリアミンを蓄積することが明らかになった。この結果から筆者らは、果実においてポリアミンが特徴的な生理機能を持ち、その初発となるプトレスシンを積極的に多く合成していることを前提としたうえで、スベルミジンやスベルミンの蓄積量には、果実において成熟を促すエチレンの合成量に大きく依存しているのではないかと考える。すなわち、ピーマンやシシトウのように緑色の未熟な果実では、果実の成熟を促すエチレンの生合成が活発であると考えられる。それによって拮抗関係にあるスベルミジンやスベルミンの生合成は進みにくくなり、プトレスシンが多く蓄積しているのかもしれない。この仮説は、今回実験に使用した黄色のパプリカや赤色のトウガラシにおいて、スベルミジンの蓄積がプトレスシンよりも多かった結果と矛盾しない。プトレスシンの生合成遺伝子や dcSAM の合成を触媒する酵素の該当遺伝子の発現段階別の発現変動を調べることに加え、それらの遺伝子の変異体の表現型解析によって、果実におけるポリアミンの新たな機能が発見されると期待される。

謝 辞

本研究の一部は、広島県水産海洋技術センターの設備機器 ChemiDoc™ XRS システム (BIO-RAD) を利用して行われました。実験遂行に当たりご支援頂いた西井祥則様に感謝致します。

文 献

- [1] 五十嵐一衛, 神秘の生命物質-ポリアミン, 6-33, 共立出版 (1993)
- [2] Fuell C, Elliott KA, Hanfrey CC, Franceschetti M, Michael AJ, Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae, *Plant Physiol Biochem*, 48: 513-20 (2010)
- [3] Igarashi K, Kashiwagi K, Polyamines: mysterious modulators of cellular functions, *Biochem Biophys Res Commun*, 271: 559-64 (2000)
- [4] Hamasaki-Katagiri N, Tabor CW, Tabor H, Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of the *SPE3* gene (spermidine synthase), *Gene*, 187: 35-43 (1997)
- [5] Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D,

Tabata S, Komeda Y, Takahashi T, Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 135: 1565-73 (2004)

- [6] Kramer DL, Chang BD, Chen Y, Diegelman P, Alm K, Black AR, Roninson IB, Porter CW, Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p 21WAF1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p 21-regulated genes, and a senescence-like phenotype, *Cancer Res*, 61: 7754-62 (2001)
- [7] Soda K, Dobashi Y, Kano Y, Tsujinaka S, Konishi F, Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice, *Exp Gerontol*, 44: 727-32, (2009)
- [8] Gupta VK, Scheunemann L, Eisenberg T, Mertel S, Bhukel A, Koemans TS, Kramer JM, Liu KSY, Schroeder S, Stunnenberg HG, Sinner F, Magnes C, Pieber TR, Dipt S, Fiala A, Schenck A, Schwaerzel M, Madeo F, Sigrist SJ, Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner, *Nat Neurosci*, 16: 1453-60 (2013)
- [9] Soda K, Kano Y, Nakamura T, Kasono K, Kawakami M, Konishi F, Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte, *J Immunol*, 175: 237-45 (2005)
- [10] Nishimura K, Shiina R, Kashiwagi K, Igarashi K, Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink, *J Biochem*, 139: 81-90 (2006)
- [11] Flores HE, Galston AW, Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography, *Plant Physiol*, 69: 701-706 (1982)
- [12] 高橋卓, 懸樋潤一, 今井章裕, TLC を用いた簡便なポリアミン検出, *ポリアミン*, 1: 14-16 (2017)
- [13] Hanzawa Y, Takahashi T, Michael AJ, Burtin D, Long D, Pineiro M, Coupland G, Komeda Y, *ACAULIS5*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase, *EMBO J*, 19: 4248-56 (2000)
- [14] Takano A, Kakehi J, Takahashi T, Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom, *Plant Cell Physiol*, 53: 606-16 (2012)
- [15] Kakehi J, Kuwashiro Y, Niitsu M, Takahashi T, Thermospermine is required for stem elongation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol*, 49: 1342-9 (2008)
- [16] 多田雄一, 植物細胞遺伝子工学, 65-80, 三恵社 (2014)