

植物におけるポリアミンの代謝・制御 およびストレス反応へのかかわり

森 口 卓 哉

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
果樹研究所生理機能部
305-8605 茨城県つくば市

Polyamine Metabolism, Its Regulation and Involvement in Stress Responses in Plants

Takaya MORIGUCHI

Department of Plant, Cell and Environment, National Institute of Fruit Tree Science
National Agriculture and Bio-oriented Research Organization
Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan

Summary

Polyamines are involved in a wide range of plant processes, including cell division, morphogenesis and stress responses. However, their exact role(s) is not completely understood. Recent advances in molecular techniques such as gene expressions and transgenic strategies have enabled us to initiate the study of the regulatory mechanisms controlling cellular polyamine levels and the mode of polyamine functions in plants. In this review, biosynthetic pathways of polyamines are presented. In addition, physiological functions of polyamines in plants especially in the abiotic and biotic stress responses are described, along with a few topics.

Key words: arginine decarboxylase, environmental stress, ornithine decarboxylase, polyamines, putrescine, S-adenosylmethionine decarboxylase, spermidine, spermidine synthase, spermine, spermine synthase, stress response

1. はじめに

ポリアミンは低分子の正電荷した脂肪族炭化水素の総称で、全ての生物に普遍的に存在している (Galston, 1983)。最も一般的なポリアミンは、ジアミンであるブトレンジン、カダベリン (マメ科植物に多量に存在)、トリアミンであるスペルミジン、テトラアミンのスペルミンである。これらのポリアミンは、細胞分裂やDNAの複製のような細胞内の過程やストレス反応などにおいて

重要な役割をはたしている。しかし、植物ホルモンに比べて、ポリアミンは植物細胞内ではマイクロからミリモル以上という高濃度で存在しているため、植物ホルモン作用の伝達に関わる“植物ホルモンのセカンドメッセンジャー”と考えられている (Slocum and Flores, 1991)。哺乳動物では、がん細胞など分泌活性や増殖の盛んな組織、細胞においてポリアミンが多く含まれている。オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) はポリアミン生合成の律速酵

素であり (Tabor and Tabor, 1984), ODCの阻害剤によりがん細胞の成長が抑えられることが動物のモデル実験では明らかになっている (Pegg, 1986). このようにポリアミンは細胞の生存に必須であるが, 高濃度で存在すると害作用がある. そのため, 細胞内にはODC活性を調節することで内生のポリアミン濃度を精緻に制御する機構が存在する. すなわち, ODCは特異的な阻害タンパク質 (ODCアンチザイム) によりユビキチン化されずにプロテアソームによって分解される (Murakami et al., 1992). このアンチザイムはポリアミンの輸送系も負に調節し, ポリアミンの取り込み阻害や排出促進にも関わっている (Suzuki et al., 1994). このアンチザイムによる阻害はさらに別のタンパク質 (ODCアンチザイムインヒビター) により回復する. 植物ではオオムギの発芽種子でODCアンチザイムの存在が報告されている (Koromilas and Kyriakidis, 1998).

ポリアミンは遊離型, 接合型, 結合型として存在するが, 細胞内での詳しい局在性についてはよく解っていない (Pandey et al., 2000). 接合型は主にヒドロキシ桂皮酸などとアミド結合している. 接合型は花芽発育の過程 (Martin-Tanguy, 1997; Bais and Ravishankar, 2002) などに関与していると報告されているが, 生理的な役割は十分に解明されていない.

2. ポリアミンの代謝

プトレシンは, 尿素回路から直接的にODCにより, または間接的にアルギニンがアルギニン脱炭酸酵素 (ADC) によりアグマチンとなり, *N*-カルバモイルプトレシンを経て合成される. このアグマチンから *N*-カルバモイルプトレシンの生合成に関与するアグマチンディイミダーゼと *N*-カルバモイルプトレシンからプトレシンへの生合成を触媒する *N*-カルバモイルプトレシアマミドヒドラーゼの存在が, 最近シロイヌナズナにおいて報告されている (Illingworth et al., 2003; Janowitz et al., 2003; Piotrowski et al., 2003). また, アルギニンはアルギナーゼによりオルニチンとなり, ODCによりプトレシンが生合成される経路もある. さらに, 尿素回路のシトルリンからもプトレシンは生合成される. 動物, 糸状菌, 酵母では植物や細菌と異なり, ADCを介したプトレシンの合成経路を欠いている (Hanfrey et al., 2001). 植物の糸状菌病などの防除にODC遺伝子への変異導入やODCタンパク質の阻害を利用する考えがある (Bailey et al., 2000). ODC遺伝子への変異導入は, 糸状菌が植物に対して病原性を発揮するにはODCが必須であるため, 糸状菌のODC遺伝子に変異を導入してその機能を破壊

して病原性を消失させる考え方である. 一方のODCタンパク質の阻害は, ODCを唯一のプトレシン合成経路とする糸状菌, 害虫そして線虫ではODCの阻害により死滅するが, 植物にはADC経路があるため, 例え植物がODC阻害剤を吸収しても生存できるという考え方に起因している. しかし, 必ずしもすべての植物にはODCとADC経路が備わっているとは限らないようである. それはシロイヌナズナにはODCに相当する塩基配列がゲノム中に存在しないという報告があるためである (Hanfrey et al., 2001).

スペルミジンやスペルミンはプトレシンから合成され, その合成に必要なアミノプロピル基はメチオニンに由来する. メチオニンから *S*-アデノシルメチオニン (SAM) が合成され, それが *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC) によって脱炭酸型SAMに変換される. この脱炭酸型SAMがアミノプロピル基のドナーとなってスペルミジン合成酵素 (SPDS) によりスペルミジンが, スペルミン合成酵素 (SPMS) によりスペルミンが合成される. 脱炭酸型SAMが合成されればこれがメチル化に用いられることはなく, もっぱらポリアミンの生合成に利用される. 植物においてSAMはエチレン生合成系の1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) 合成酵素の基質でもある. 一般的にポリアミンは老化抑制に作用することが多く, 逆にエチレンは老化促進作用を示す. しかも両者の生合成経路がSAMを介して結びついているため, この生理的作用の拮抗性を基質の競合に原因を求めている研究 (Even-Chen et al., 1982; Roberts et al., 1984) もあるが, SAMはメチル化のドナーでもあることからエチレンやポリアミンの合成に用いられるSAMは全体のわずか10%程度であり (Ravanel et al., 1998), SAMの微妙な量的バランスからだけでは論じることができないようである (Quan et al., 2002). しかし, ポリアミンが傷害誘導型のACC合成酵素を転写レベルで制御することでエチレンの生合成に関与していることがトマトを用いた実験で示されている (Li et al., 1992). 他にもポリアミンがオーキシンやACC処理によるエチレン生成を抑制することも報告されている (Suttle, 1981). 逆にエチレンがポリアミンの生合成を制御している事例もある. Roustanら (1992) はニンジンの体細胞胚形成過程のニンジンの培養細胞にエテホン処理するとスペルミジンやスペルミンへの¹⁴Cメチオニンの取り込みが抑制されるとともに, ADCおよびSAMDC活性が減少し, 結果的に形成される体細胞胚の数が減少すること, そして塩化コバルトでエチレン生成を阻害するとポリアミンへの¹⁴Cメチオニンの取り込みや酵素活性が上

昇し、体細胞胚形成も活発になることを報告している (Roustan et al., 1992). いずれにしてもポリアミンとエチレンとの関係についてはさらなる研究が必要である.

これまでポリアミンの生理機能解明のため、ポリアミン生合成系酵素の阻害剤が用いられてきた. β -ジフルオロオロメチルオルニチン (DFMO, オルニチンのアナログ) は ODC の, β -ジフルオロオロメチルアルギニン (DFMA, アルギニンのアナログ) は ADC の阻害剤で、不可逆的にそれぞれ ADC と ODC の活性中心部位に結合することによって酵素反応を阻害する (Slocum and Flores, 1991). しかし細胞中にアルギナーゼ活性があると DFMA は DFMO に変換され、ODC を阻害することとなる. メチルグリオキサール-ビス-グアニルヒドラゾン (MGBG) は SAMDC の競合的阻害剤である (Slocum and Flores, 1991) が ADC と PAO をも阻害する (Kakkar and Sawhney, 2002). シクロヘキシルアミン (CHA) は SPDS と SPMS の競合的、かつ可逆的な阻害剤である (Kakkar and Sawhney, 2002). 各酵素の阻害剤は安定性や特異性の点から疑問視されているのみならず実際に取り込まれて輸送されているかどうかは証明されておらず、完全に信頼性があるわけではない (DeScenzo and Minocha, 1993). しかし、これら阻害剤により多くの重要な知見が得られているのも事実である.

植物においてポリアミンはジアミン酸化酵素 (DAO) とポリアミン酸化酵素 (PAO) によって分解される. PAO については詳しい総説がある (Šbela et al., 2001). PAO の阻害剤としては β -ヒドロキシエチルヒドラジン (HEH) が用いられる. プトレシンやカダベリンは DAO により過酸化水素とアンモニアを放出してピロリンを生じる. DAO の基質特異性は低く、トリアミンやテトラアミンであるスペルミジンやスペルミンに対しても作用する (Bais and Ravishankar, 2002). スペルミジンとスペルミンは PAO により酸化され、スペルミジンが酸化されるとピロリンとジアミノプロパンが、スペルミンが酸化されるとジアミノプロパンとアミノプロピルピロリンが生じる. そして、ピロリンは γ -アミノ酪酸 (GABA) を経てコハク酸となり TCA 回路に入る (Flores and Filner, 1984). ジアミノプロパンはアラニンへと代謝される (Terano and Suzuki, 1978). スペルミジン/スペルミン- N^1 -アセチルトランスフェラーゼ (SAT) と PAO によりスペルミジンとスペルミンがプトレシンに変換される経路もある (Pegg, 1986).

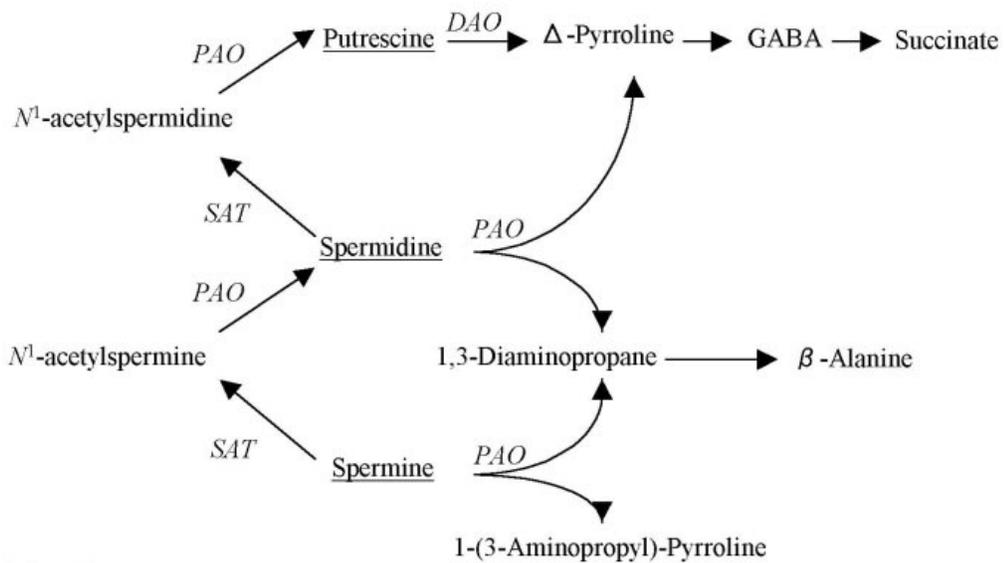
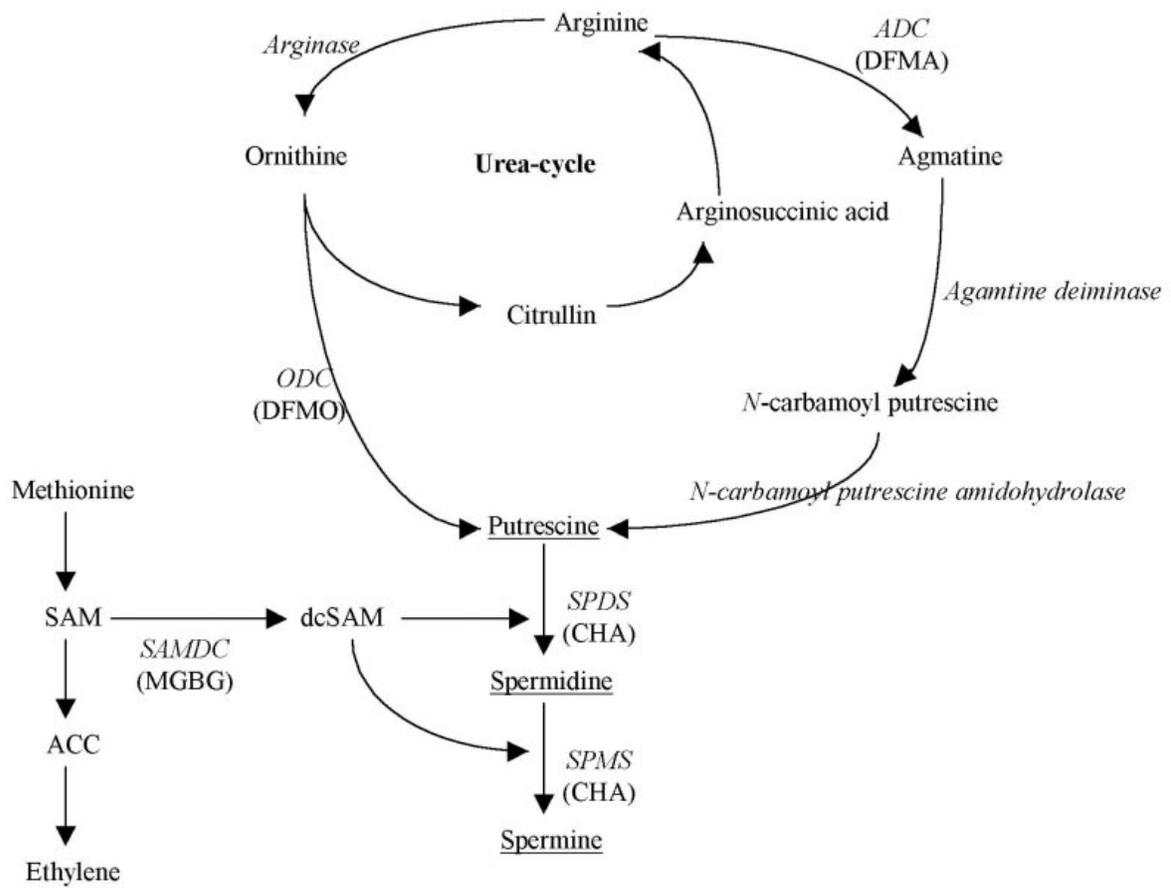
以上、これまで記載してきたポリアミンの代謝経路を第 1 図に示す.

次にこれら酵素の局在性について現在までの知見をま

とめると、ADC はクロロプラストのチラコイド膜に存在しているという報告 (Kakkar and Sawhney, 2002 の総説参照) と細胞質に存在しているという報告 (Smith, 1979; Young and Galston, 1984) がある. 最近、ADC の局在性について光合成器官では主にクロロプラストに、非光合成器官では本質的に核に存在していることが報告されている (Bortolotti et al., 2004). 一方、ODC は細胞質と核に存在する (Panagiotidis et al., 1982; Young and Galston, 1984; Kakkar and Sawhney, 2002 の総説参照). SAMDC, SPDS も細胞質に局在している (Kakkar and Sawhney, 2002 の総説参照). SPMS の細胞内の局在性については今のところ報告はない. DAO および PAO は細胞壁に局在しているため (Kaur-Sawhney et al., 1981; Galston, 1983), 外生的に与えたスペルミジンやスペルミンがそのままの形状を保った状態で細胞内へ到達しているかどうかが議論されるゆえんとなっている.

3. ポリアミン生合成系酵素および遺伝子の特徴

ODC は補因子としてピリドキサール-5-リン酸 (PLP) を必要とし、その酵素タンパク量は転写・翻訳・翻訳後の段階で制御されている (Heby and Persson, 1990). 哺乳動物において、ODC は発がん遺伝子であり、その恒常的な活性化は細胞のがん化と関係している (Auvinen et al., 1992). 哺乳動物の ODC 遺伝子の 5' 上流では GC 含量が高く、そこには small upstream open reading frame (uORF) が存在している. また、C-末端 (3' 領域) にタンパク質の急速な分解に関わる PEST 領域がある (Rogers et al., 1986). 事実、マウスの ODC 遺伝子の 3' 領域を削除すると ODC の分解は著しく抑制されることが知られている (Ghoda et al., 1989). 植物の ODC 遺伝子は最初にニンジンから単離され (Michael et al., 1996), その後、様々な植物から単離されている. 植物の ODC 遺伝子は動物のそれとアミノ酸配列が非常に似ているがタンパク質の急速な分解に関与する 3' 領域がないため、動物の ODC 遺伝子よりも半減期が長いと考えられている. Kwak and Lee (2001) はトマトから ODC 遺伝子を単離して詳しく解析している. トマトの ODC 遺伝子はスクロースにより発現が誘導されること、サイトカニン、オーキシン、スクロースそしてグルコースによる発現誘導パターンが ADC 遺伝子の場合とは異なることを示し、植物の発育において ODC 遺伝子と ADC 遺伝子は異なる生理過程に関与している可能性を示唆している. このことは、これまでも ODC 経路は生殖成長、細胞増殖や細胞成長に関与し (Cohen et al., 1983; Martin-Tanguy, 1997), 一方の ADC 経路は栄養成長や各種ストレス反応



GABA: γ -Aminobutyric acid

SAT: spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase

第1図 ポリアミンの代謝経路 酵素は斜体，酵素の阻害剤は括弧で示す

下でのプトレシン生成に関与していると考えられてきたことと一致する (Pérez-Amador et al., 1995; Soyka and Heyer, 1999). さらに, Kwak and Lee (2001) はトマトの ODC 遺伝子の uORF の機能について解析している. uORF は下流の ORF (ODC をコードしている部分) の翻訳を抑制するが, uORF 中の開始コドン (AUG → UUG) して uORF そのものをなくすと翻訳量が増加することを示している. しかし uORF 中でアミノ酸置換やフレームシフトさせてもまだ翻訳抑制効果があるため, uORF の存在そのものが下流の ODC の翻訳を抑制するのではないかと推察している. シロイヌナズナには ODC 遺伝子に相当する塩基配列がゲノム中に存在しない (Hanfrey et al., 2001) が, ODC 活性を色素体の膜画分において検出している事例もあることから (Tassoni et al., 2000, 2003), 葉緑体ゲノムに ODC が局在している可能性も考えられている.

ADC も補因子として PLP を必要とする (Sandmeier et al., 1994) が, エンバクの ADC は PLP を必要としないと考えられている (Malmberg and Cellino, 1994). ADC 遺伝子はこれまでエンバク (Bell and Malmberg, 1990), トマト (Rastogi et al., 1993), エンドウ (Pérez-Amador et al., 1995), シロイヌナズナ (Watson and Malmberg, 1996), ダイズ (Nam et al., 1997), ブドウ (Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 1999), カーネーション (Chang et al., 2000) などの植物から単離されている. エンバク (Malmberg and Cellino, 1994), カーネーション (Chang et al., 2000) そしてブドウ (Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 2001) から単離された ADC 遺伝子は酵素前駆体のポリペプチドをコードしているが, 翻訳後の修飾により二つのポリペプチドに切断される. シロイヌナズナの ADC タンパク質においても同様に翻訳後の修飾が報告されている (Watson and Malmberg, 1996). しかし, 後述する SAMDC 遺伝子の場合とは異なり, この酵素前駆体の切断は自律触媒的な反応ではなく酵素を必要とする反応によって切断される. 一般に ADC 遺伝子も ODC 遺伝子と同様に長い 5' 側に非翻訳領域を有しており, その領域に uORF が存在している. この uORF の機能についてはカーネーションの ADC 遺伝子において詳しい解析がなされ, ODC 遺伝子と同様に ADC の uORF も下流の ADC 遺伝子の翻訳を抑制することが報告されている (Chang et al., 2000).

SAMDC 遺伝子はポテト (Mad Arif et al., 1994), ホウレンソウ (Bolle et al., 1995), ニチニチソウ (Schröder and Schröder, 1995), ムギ類 (Dresselhaus et al., 1996), シロイヌナズナ (Franceschetti et al., 2001), イネ

(Franceschetti et al., 2001), トウモロコシ (Franceschetti et al., 2001), カーネーション (Lee et al., 1997a) などから単離されている. 植物の SAMDC 遺伝子は, ORF 中にイントロンを含んでおらず, また ODC 遺伝子や ADC 遺伝子と同様に長い 5' 側の非翻訳領域を有している. さらに, ODC 遺伝子や ADC 遺伝子にも存在している uORF ともう一つの ORF (tiny uORF) とがオーバーラップする形で存在している (Franceschetti et al., 2001). この SAMDC 遺伝子の uORF がコードしているペプチドは約 49 から 54 残基と, ODC 遺伝子 (約 5 ~ 10 残基) や ADC 遺伝子 (約 7 ~ 8 残基) と比べて長いのが特徴である (Chang et al., 2000). Hanfrey ら (2002) は, この長い 5' の非翻訳領域の uORF の機能解析のため, 1) uORF の開始コドンのアミノ酸 (メチオニン) をフェニルアラニンに置き換えて uORF をなくして tiny ORF を伸ばした場合, 2) uORF の終止コドンを uORF の中に人為的に作成して通常の uORF よりも短い uORF を作成した場合について, 変異を導入していない対照と比較しながら下流に連結した GUS 遺伝子の活性を調べている (Hanfrey et al., 2002). その結果, 1) と 2) ではいずれも対照と比較して GUS 活性の増加が認められたことから, ODC 遺伝子や ADC 遺伝子と同様にこの uORF は下流の ORF の翻訳を負に制御していることが明らかにされている. しかし, ODC 遺伝子 (Kwak and Lee, 2001) や ADC 遺伝子 (Chang et al., 2000) では uORF 部分を短くした場合 (SAMDC の 2) の修飾に相当) の下流の ORF の翻訳への影響についての報告がないので, これら脱炭酸酵素遺伝子に存在する uORF が同じ機構によって下流の ORF の翻訳を負に制御しているかどうかについてはさらに検討する必要がある. また, SAMDC 遺伝子の uORF 部分を 1) や 2) のように改変した遺伝子をタバコに導入すると組換えタバコの生育が異常になることから, uORF は下流の SAMDC 遺伝子の翻訳を制御することで正常な生育に適切なポリアミン濃度を維持 (ホメオスタシス) するという重要な役割をはたしていると考えられている (Hanfrey et al., 2002). SAMDC 遺伝子も酵素前駆体のポリペプチドをコードしており, 翻訳後の修飾により YVLSESS モチーフの部分で二つのポリペプチドに切断されるが, ADC 遺伝子の場合とは異なりこの酵素前駆体の切断は自律触媒的な反応である (Xiong et al., 1997). また, 植物の SAMDC は動物と異なり (Pegg, 1986; Kameji and Pegg, 1987), プトレシンによって酵素前駆体の切断が促進されないのも特徴の一つである (Xiong et al., 1997). 赤色光や青色光は SAMDC 遺伝子の発現を誘導するが (すなわちフィトクロームや blue/UV-A 光受容体が遺伝子発現

に關与), この誘導にはカルシウムのホメオスタシスが關与していること (Yoshida et al., 2002) やSAMDC遺伝子の発現には既日リズムが關与していること (Dresselhaus et al., 1996) も報告されている。また, SAMDC欠損変異体酵母 (*spe2*) においては, 酸素条件下ではスペルミジンまたはスペルミンが増殖に必須で, 代わりにプトレシンを加えても変異体は増殖できない。一方で無酸素下ではスペルミジンやスペルミンは変異体の増殖には必須ではなくなることが知られている (Balasundaram et al., 1991)。

SPDS遺伝子は, シロイヌナズナ (Hashimoto et al., 1998), タバコ (Hashimoto et al., 1998), ヒヨス (Hashimoto et al., 1998), トマト (Alabadi and Carbonell, 1999b), コーヒー (Hatanaka et al., 1999), エンドウ (Alabadi and Carbonell, 1999a), リンゴ (Zhang et al., 2003) などから単離されている。植物のSPDS遺伝子はプトレシン*N*-メチル転移酵素 (PMT) 遺伝子と推定アミノ酸配列が類似しており, 両者ともにSAMまたは脱炭酸型SAMと結合すると推定されるドメインを有し (Hashimoto et al., 1998), これらの酵素遺伝子は61~72%の相同性を有している (Zhang et al., 2003)。しかし, SPDS遺伝子に共通するがPMT遺伝子にはない特異的なアミノ酸配列の存在が明らかとなっていることから, 両者を区別することが可能である (Hashimoto et al., 1998; Zhang et al., 2003)。シロイヌナズナには3種類のSPDS遺伝子 (*SPDS1*, *SPDS2*, *SPDS3*) が存在し, *SPDS3* (注: 現在, *SPDS3*はSPMS遺伝子であることが判明している) 以外については酵素活性を有することからSPDSをコードすることが証明されている (Hanzawa et al., 2002)。酵母のtwo-hybridシステムを用いた実験から, *in vitro*ではシロイヌナズナのSPDS1とSPDS2は相互作用し, SPMSはSPDS1またはSPDS2と相互作用すること, *in vivo*ではSPDS1とSPDS2の組合せのヘテロダイマーまたはSPDS2とSPMSの組合せのヘテロダイマーを形成することが報告されている (Panicot et al., 2002)。このヘテロダイマーの詳細な生理的意義については今後調べていく必要があるが, ポリアミン生合成系の最終段階に関わる酵素がこのような複合体を形成していることは, 酵素反応の効率化やスペルミンの効率的な生合成などの側面からも興味深い。リンゴは3種類のSPDS遺伝子 (*MdSPDS1*, *MdSPDS2a*, *MdSPDS2b*) をもっている。ゲノム上のSPDS遺伝子座としては二カ所存在する (*SPDS1*と*SPDS2*) と想定され, *MdSPDS1*は*SPDS1*の遺伝子座から, *MdSPDS2a*と*MdSPDS2b*の2種類の遺伝子はもう一方の同じ*SPDS2*の遺伝子座からスプライシングにより

作られると考えられている (Zhang et al., 2003)。

スペルミンを生合成する遺伝子は, 最初にわい化したシロイヌナズナの突然変異体 (*acaulis5*) の解析 (Hanzawa et al., 1997) から単離・同定され, ACL5遺伝子と呼ばれている (Hanzawa et al., 2000)。植物からSPMS遺伝子が単離された事例は少なく, シロイヌナズナ以外ではESTとしてトマト (Accession No. BI423064) とダイズ (BU926803, CA800176, BG405642, BI426629) で登録されている程度である。興味深いことにSPDS欠損変異体の酵母 (*spe3*) ではその増殖にスペルミジンを絶対的に要求するが, 対照的に酵母のSPMS欠損変異体 (*spe4*) ではその増殖にスペルミンを必要としない (Hamasaki-Katagiri et al., 1998)。シロイヌナズナには2種類のスペルミン合成酵素遺伝子 (SPMSとACL5) が存在するが (SPMSは以前はSPDS3と呼ばれていた), SPMS遺伝子を壊してスペルミンがほとんど合成されなくなっても生育や形態的な特徴は野生型と同じで変化せず, ACL5遺伝子を壊すことで初めて前述したようにわい化することが報告されている (Imai et al., 2004)。シロイヌナズナではこのように役割の異なったSPMS遺伝子とACL5遺伝子が存在しているが他の植物については今のところ知見がない。また, シロイヌナズナのACL5遺伝子の上流には, オーキシシン反応に關係する転写因子の認識するシス配列が存在している (Hanzawa et al., 2000)。実際にシロイヌナズナのACL5遺伝子の転写はオーキシシンの処理により誘導され, 他の植物ホルモンであるベンジルアデニン, アブシジン酸, ブラシノリド, ジベレリンでは誘導されない。しかし, SPMS遺伝子はACL5と異なりアブシジン酸で誘導される (Hanzawa et al., 2000; Hanzawa et al., 2002)。これらSPMS遺伝子とACL5遺伝子では, 遺伝子が破壊された時の表現型に差異 (わい化となるか否かという点) が見られたり, 植物ホルモンに対する反応性において異なっているという結果は, 植物の成長や分化過程でのスペルミンの生理機能を研究する上でも興味深い。

4. 環境ストレス耐性における生理機能

4.1. 高温ストレス

トマトは高温の影響を受けやすく, 特に開花や受精時期の高温は収量低下を招く大きな問題となる。そこで, 高温ストレス下でのトマトの花粉発芽に及ぼすポリアミンの効果について調べられている (Song et al., 1999)。トマトの花粉発芽率は33~35℃の温度下では対照区 (25℃) と比べて著しく低下するが, 予め発芽培地や開花前の花にポリアミン, 特にスペルミジンを処理してお

くと発芽率が向上する。また、ポリアミンと生合成系の酵素活性の変化をトマトの花粉発芽過程において調べた結果、ADCとSAMDCの酵素活性の上昇とともにプトレシンに対するスペルミジンとスペルミンの割合{(SPD + SPM) / Put}の増加(代謝系路がスペルミジンやスペルミンの合成に流れている)が起こること、そしてSAMDCの阻害剤であるMGBG処理により、この割合の低下とともに発芽率も低下することが報告されている(Song et al., 2001)。さらに、高温下のトマト花粉ではSAMDC活性が抑制されているためスペルミジンやスペルミンの含有量は増加せず、スペルミジンまたはスペルミンを添加すると発芽率が改善される(Song et al., 2002)。これらのことから、SAMDCの活性が上昇し、その結果スペルミジンやスペルミンの含有量が増加することが正常な花粉の発芽や花粉管の伸長に必要であると考えられる。このトマト花粉の発芽時や花粉管の伸長期において、常温下では接合型のポリアミンが増加するが、高温下では増加が抑制されることが知られており、接合型のポリアミンがこの過程で重要な役割をはたしているようである(橋 2000の総説参照)。ウメの花粉発芽に及ぼすポリアミンと温度の影響についても調べられている(Wolukau et al., 2004)が、処理するポリアミンの種類や温度条件により花粉の発芽率や花粉管の伸長が改善されたり、あるいは逆に抑制されたりと、一定の傾向はないようである。高温ストレス耐性のワタ(綿花)の花粉や培養細胞ではカルジン(caldine)やサーミン(thermine)という特殊なポリアミンが高温下で蓄積することが知られている(Kuehn et al., 1990)。高温ストレス下においてイネのカルスを用いた実験でも、抵抗性のイネではカルジンやサーミンの蓄積が認められるが、感受性のイネでは検出されない(Roy and Ghosh, 1996)。これら特殊なポリアミンは耐熱性細菌に存在するもので、植物においてもこれらが高温ストレス耐性に深く関わっていることを示唆するものである。

4.2. 低温ストレス

果実(レモン、グレープフルーツ、ピーマン)を低温障害を引き起こす温度で貯蔵するとプトレシン含有量が増加し、障害がひどくなるとプトレシン含有量も高くなり両者の間には正の相関が認められている(McDonald and Kushad, 1986)。一方、コムギにおいては霜害抵抗性が強いほどプトレシンを多く蓄積する傾向がある(Racz et al., 1996)。低温耐性があるイネほどプトレシン含有量およびABA含有量が高く、電解質の溶出が少ないことも報告されている(Lee et al., 1995)。また、低温耐性のイネでは茎葉と根において低温遭遇後にプトレシン含有

量とADC活性が上昇するが、DFMAでADC活性を阻害するとプトレシン含有量の増加が抑制され、結果的に低温耐性や生存率の低下と電解質の溶出の増加を招く(Lee et al., 1997b)。さらに低温耐性のイネでは低温処理するとABA含有量が増加するが、ABA阻害剤を処理するとABA含有量、プトレシン含有量、そしてADC活性の増加が抑制されること、また低温処理前にABAを与えることで低温感受性のイネでも耐性を付与させることができることから、ABAはADC活性の上昇とプトレシンの増加を引き起こすことで低温耐性の獲得に至ると考えられている(Lee et al., 1997b)。このようにポリアミンはABAの生理機能に深く関与していることが推察できる。チェリモア果実では低温障害の出る6で貯蔵すると、接合型のスペルミンと結合型のスペルミジンの量が顕著に減少する(Escribano et al., 1996)。ズッキーニでは低温順化過程でSAMDC活性の上昇とともに、スペルミジンとスペルミン含有量が増加することから、スペルミジンとスペルミンが膜脂質の過酸化を軽減している可能性が示唆されている(Kramer and Wang, 1989; 1990)。低温抵抗性と感受性のキュウリ品種を用いてマイクロソーム画分の酵素活性とポリアミンの関係が詳しく調べられている(Shen et al., 2000)。抵抗性の品種の葉では、遊離型のスペルミジン含有量は低温(3℃, 24時間暗黒)処理中と常温に戻した時に増加し、常温に戻した時にはプトレシン含有量が増加する。しかし、感受性の品種ではいかなる時期にもこれらポリアミンの増加が認められない。また、感受性品種にスペルミジンを予め処理することで、過酸化水素の量の増加、NADPH依存オキシダーゼの活性化、および活性酸素種(ROS)の生成が抑えられる。すなわちスペルミジンはROSの生成に関わるオキシダーゼの低温誘導活性を抑制することでキュウリの低温耐性獲得に重要な役割をはたしていると考えられる。また、ハウレンソウを用いて低温障害とポリアミンの関係を調べた研究によると(He et al., 2002)、ハウレンソウを6日間低温に遭遇させると、SAMDC活性の増加とプトレシン含有量とスペルミジン含有量の増加が認められることが明らかとなっている。MGBGは、SAMDC活性を阻害することによって、低温下においてハウレンソウの成長抑制と光合成の光障害を引き起こすが、スペルミジンを根に与えるとこれら症状が回復する。さらに、MGBG処理では、チラコイド膜の脂質過酸化反応の増加、チラコイド膜の透過性および炭水化物代謝酵素の活性の低下が引き起こされており、これら一連の結果から低温順化にはSAMDC活性の上昇とそれにともなう葉緑体のスペルミジンの増加が重要であることが示されている。

4.3. 塩ストレス

ヒマワリ種子の発芽過程で塩処理を行うと、塩濃度の増加に対応してプトレシン含有量、スベルミジン含有量、スベルミン含有量そしてADC活性が減少するが、特にプトレシンの減少程度が大きいことが知られている (Benavides et al., 1997). 耐塩性程度の異なるイネで塩処理によるADC活性とその発現の差異について調べた結果、耐塩性のイネでは塩濃度の上昇や処理の長時間化にともないADC活性は高まるが、感受性のイネでのADC活性は一度高まった後に急激に減少する (Chattopadhyay et al., 1997). ADC遺伝子の転写産物も耐塩性のイネでは無処理に比較して20倍の強度で検出されるが、感受性のイネでは7倍にとどまる。これらの結果は、イネにおける耐塩性にはADC遺伝子の発現とADC酵素の活性化が関与し、感受性のイネにはこの機構が存在していないことを示唆している。Santa-Cruzら (1997) の耐塩性の野生トマト (*Lycopersicon pennellii*) と感受性の栽培トマト (*L. esculentum*) を用いて比較した実験では、ともに塩処理によりプトレシン含有量とスベルミジン含有量の低下が起り、スベルミン含有量は耐塩性のトマトでは減少しないが感受性のトマトでは顕著に減少するため、結果的に耐塩性のトマトではプトレシン含有量に対するスベルミジン含有量とスベルミン含有量の割合 $\{(SPD + SPM)/Put\}$ が増加するが、感受性のトマトではこのような傾向が認められないことが示されている。Shalataら (2001) により、野生トマト (*L. pennellii*) は栽培種に比べて塩ストレス下の根における抗酸化酵素活性や抗酸化物質含量の増大が大きいことが見いだされている。この結果はポリアミンには抗酸化酵素活性を誘導する機能があると考えられていることと関連している。また、塩処理を行ったイネからディファレンシャルディスプレイ法によりSAMDC遺伝子を単離し (塩ストレスでSAMDC遺伝子が誘導されていることを示している)、塩類抵抗性と感受性のイネにおけるSAMDC遺伝子の発現を調べると、抵抗性のイネではSAMDC遺伝子の発現レベルが高く、抵抗性の程度と発現レベルの間には正の相関が認められている (Li and Chen, 2000). SAMDC遺伝子の塩類耐性への関わりについては組換え体植物の解析から直接的に示唆されている。例えば、イネにSAMDC遺伝子を導入して過剰発現させた形質転換体は、塩処理下では非組換え体に比べて生育が良くなり、3~4倍量のスベルミジンとスベルミンが蓄積するようになる (Roy and Wu, 2002). ヒト由来のSAMDC遺伝子をタバコに導入すると、形質転換タバコではスベルミジン含有量とプトレシン含有量 (特に接合型) が増加する

とともに、耐塩性や耐乾性という非生物的なストレスに対する耐性のみならずフザリウムなどの糸状菌病による生物的なストレスに対する耐性も認められるようになる (Waie and Rajam, 2003). さらに、タバコにマウス由来のODC遺伝子を導入した研究では (Kumria and Rajam, 2002b), 草丈、枝数、節間長、葉形そして頂芽の形態などが変化するとともに耐塩性も高まることが示されている。シロイヌナズナでは、塩ストレスによりADC遺伝子 (*AtADC2*) が誘導されるとともに遊離型のプトレシン含量が増加するが、この*AtADC2*にトランスポゾンを導入して遺伝子を破壊したところ、遊離型のプトレシンの蓄積が25%程度まで減少して結果的に塩ストレスに対しても弱くなることが報告されている (Urano et al., 2003). ここで記述したように、塩処理によるポリアミン含有量の変化は報告により異なった結果となっている。これは植物の種類、生理的な状態および塩処理方法の差異が原因であると考えられる。しかし、組換え体植物の研究を通して、ポリアミン生合成系の酵素遺伝子は、植物体内のポリアミン生合成の制御を介して塩ストレス耐性に関与していることが伺える。

4.4. 浸透圧ストレス

カラシナの葉では、通常の生育状況下では一般にADC遺伝子の発現は検出限界以下であるが、マンニトールで浸透圧ストレスを与えるとその発現が誘導される (Mo and Pua, 2002). このカラシナにおけるマンニトールによるADC遺伝子の発現誘導とポリアミン蓄積の傾向は、低温ストレスや塩ストレスでも同様に認められる。エンバクの葉を浸透圧ストレス (ソルビトール, マンニトール, プロリン, ベタインまたはスクロース) 処理すると、ADC活性が上昇するとともにプトレシン含有量が増加する (Flores and Galston, 1984). このADC活性の上昇やプトレシンの蓄積は、DFMAをストレス前に処理することで阻害されるが、DFMOでは阻害効果はない。また、シクロヘキシミドでは完全に阻害され、転写阻害剤 (コルディセピン, アクチノマイシンD) では部分的に阻害される。つまりストレスにより引き起こされる現象には *de novo* のタンパク合成が必要であると考えられる。同様にエンバクの葉でも浸透圧処理を行った報告がある (Borrell et al., 1996). 浸透圧処理とともにスベルミン処理を行うと、ADCの転写産物は増加するもののその酵素活性は減少する。このADCの転写産物量と酵素活性レベルの不一致は、スベルミンがADCの酵素前駆体の切断を抑制して活性型ADCの生成を阻害しているためと考察されている。スベルミンは、暗黒下で浸透圧処理した葉のクロロフィルの分解を遅らせるとともに、

ストレスで急増するプトレシン含有量を低下させる。タバコにADCを導入した場合にはADC経路によるプトレシンの合成が促進される。この時の形態の異常程度はプトレシンの量と比例するため、多量に蓄積したプトレシンは栄養成長に害作用を有することが明らかとなっている (Masgrau et al., 1997)。これらの結果から、Bouchereauら (1999) はその総説でストレスに遭遇した細胞ではプトレシンから他のポリアミンへ代謝されることが生存 (ストレス障害の回避) のために必要なポイントであると推察している。DFMAやDFMOを用いた実験からアブラナではADC経路が主たるプトレシン合成の経路であることが知られているが、浸透圧ストレスを与えるとDFMAとDFMOは、ともにポリアミンを減少させることが報告されている (Aziz et al., 1997)。このことはストレス下での葉はADCとODC経路の両方でプトレシン合成を担っていることを示しており、これまではストレス下ではADC経路が主たるプトレシン合成の経路であるとする多くの事例と相反するものの、ODC経路のストレス下でのプトレシン合成への関与を示すもので興味深い。

4.5. カリウム欠乏ストレス

植物で最初にカリウム欠乏によりプトレシンが蓄積することが報告されたのはオオムギである (Richards and Coleman, 1952)。その後、多くの植物細胞内でのカチオンのバランス維持にプトレシンが重要な役割を担っていることが知られるようになり、欠乏症状がひどくなるとプトレシン含有量も増加することが認められている (Bouchereau et al., 1999の総説参照)。また、プトレシン含有量の増加には主にはADC活性の上昇が関与しているが、ODC活性も2倍程度上昇するため、ODC経路も何らかの生理的役割をはたしていると考えられている (Young and Galston, 1984)。一方、カリウム欠乏下で育てたシロイヌナズナでは、ADC活性の増大とプトレシンの増加が認められるが、このADCの活性化にはmRNAやタンパク質の上昇をともなっていないことが示されている (Watson and Malmberg, 1996)。プトレシンの増加がストレスの原因なのか、またはその結果なのか、その生理的な意義については不明である。一方、ブドウではカリウム欠乏により誘導されるポリアミンの種類と量の変化は、組織および発育時期により異なり、特に接合型と結合型のポリアミンがブドウのカリウムの状態を示す良い指標となっている (Geny et al., 1997)。最近、ポリアミン (スペルミジン) がチャンネルタンパクによるカリウムイオンの取り込みを阻害することが明らかとなり、スペルミジンが孔辺細胞のチャンネルタンパクに作用

してカリウムの取り込みを制御している可能性も考えられている (Liu et al., 2000)。植物では、環境ストレスとなる多くの因子が孔辺細胞のイオンチャンネル活性の調整を介して気孔の開閉に影響を与えているため (MacRobbie, 1997)、この結果はその調節過程へのポリアミンの関与を示唆するもので興味深い。

4.6. 低酸素ストレス

イネとコムギの茎葉を低酸素に遭遇させると、両者ともに茎の伸長が阻害されるにともなってプトレシンが蓄積するが、スペルミジン含有量とスペルミン含有量はほとんど変化しないことが認められている (Remo and Bertani, 1989)。しかし、より厳しい低酸素濃度下では、イネとコムギではプトレシンの合成能力に差があり、イネではコムギよりも多くのプトレシンを蓄積することができ、このことがコムギに比べてイネでは低酸素となる冠水条件により適応している原因であると推察されている。イネの発芽後3日の実生を無酸素下で育てると、子鞘葉では遊離型と結合型のプトレシンのみが顕著に蓄積し、これに対応してADC活性も高まる。一方、無酸素下にある根でもADC活性の上昇とともに遊離型のプトレシン含有量、スペルミジン含有量そしてスペルミン含有量が増加するが、いずれの結合型ポリアミンの蓄積は逆に抑制される。このような無酸素下でのイネの子鞘葉と根でのポリアミン蓄積の差異は、両者の生化学的エネルギーバランス (エネルギーチャージ) の違いが原因ではないかと推察されている (Reggiani et al., 1989a)。また、無酸素下でのイネ子鞘葉の伸長はプトレシン含有量に依存しており、外生的にプトレシンを与えると伸長は促進されるが、DFMAを与えるとプトレシンの増加が抑制され、子鞘葉の伸長も抑制される。一方、DFMO処理ではこの抑制効果は認められないことが報告されている (Reggiani et al., 1989b)。さらに、Reggianiら (1990) は無酸素下での耐性程度の異なる作物 (強い順に、イネ>イヌビエ>トウモロコシ>ライムギ、オオムギ、コムギ) で調べ、耐性作物ほど茎葉と根のプトレシン含有量が高くADC活性が高いこと、耐性の低いコムギの根にプトレシンを与えると部分的に無酸素下での生存率が高まることを示している。イネを無酸素下で育てるとプトレシン含有量やADC活性が増加するとともにエチレン生成量も高まり、エチレン作用の阻害剤によりプトレシン含有量が減少する (Lee and Chu, 1992)。これらのことから、イネの無酸素下での子鞘葉の伸長には少なくともエチレンとポリアミンが関与していると考えられている。カヤツリグサ科の水生植物でもイネ同様に冠水下では茎葉の伸長と遊離型プトレシンの増加が認められている (Lee

et al., 1996). しかしイネと異なりADC活性のみならずODC活性も上昇し、それぞれの阻害剤であるDFMAやDFMOを添加するとこれら効果がなくなる。イネではこれまでの研究から無酸素下でのプトレシンの蓄積は主にADC経路により合成された結果と考えられているが、このカヤツリグサ科の水生植物ではDFMAやDFMOによりプトレシンの蓄積が減少するため、ADCとODC経路の両方がプトレシンの生合成に関わっていることを示すものである。

4.7. その他ストレス

インゲンマメを酸性液 (pH 1.8) で処理すると脂質の過酸化を誘導して過酸化水素の含量が増加するが、スペルミジンまたはスペルミン (1 mM) を同時に処理すると過酸化水素の増加が抑制されることが報告されている (Velikova et al., 2000)。この抑制作用はスペルミジンよりもスペルミンで高い結果が得られている。これら結果から Velikova ら (2000) は、植物における酸からの保護効果はポリアミンの有するリン脂質膜安定化効作用、酸自体の中和作用そして抗酸化作用に起因していると考えられている。酸ストレス下でダイズのADCのmRNAおよび酵素活性が誘導されることも報告されている (Nam et al., 1997)。

ポリアミンの重金属による酸化ストレスからの防御作用についても報告がある。例えば、ヒマワリの葉片をカドミウムまたは銅 (0.5 mM) で処理をするとリン脂質膜の酸化を引き起こし、スペルミン含量はほとんど変化しないがプトレシンとスペルミジンの含量が有意に減少する。この時に 1 mM のスペルミンを与えておくとカドミウムや銅によるリン脂質膜の酸化が有意に抑えられる (Groppa et al., 2001)。ポリアミンにはカドミウムや銅処理により酸化状態となった植物を超酸化物から防御するスーパーオキシドジスムターゼやグルタチオン還元酵素活性を維持・回復させる効果があるようである (Groppa et al., 2001)。

植物の二酸化イオウに対する感受性は、窒素源の供給形態で比べると硝酸態よりもアンモニア態の形で与えた方が弱くなることが知られている (Smith, 1973)。そこで、エンドウを硝酸態窒素または硝酸態とアンモニア態窒素を半量ずつとした条件で育てて二酸化イオウにさらすと、後者の条件下で顕著にプトレシン含有量とスペルミジン含有量が増加する (Priebe et al., 1978)。この二酸化イオウにさらした時とアンモニア態窒素を与えた時に見られるポリアミンの増加は同じ作用機作によるものと考えられている。

トマトにポリアミンを与えるとオゾンによる障害を有

意に抑えることができ、特にスペルミジンとスペルミンでその効果が高くなる。このオゾン障害の軽減の原因として、ポリアミンが気孔を閉じるように作用した結果、オゾンの取り込み率が低下したためであると考えられている (Ormrod and Beckerson, 1986)。前述したようにポリアミン (スペルミジン) がチャンネルタンパクによるカリウムイオンの取り込みを阻害する報告もあり (Liu et al., 2000)、興味深い。オオムギをオゾンで処理するとADC活性が高まりスペルミジン含有量が増加するが、DFMA処理するとADC活性の増加が妨げられオゾン障害も一層顕著となる (Rowland-Bamford et al., 1989)。ヨーロッパパトウヒにおいてもオゾンとともに酸性のミストを与えるとプトレシン含有量、スペルミジン含有量そしてスペルミン含有量の増加が認められるようになる (Dohmen et al., 1990)。オゾン耐性のタバコ (Bel B) では、オゾン処理により、一過的なADC活性の上昇に先立ち遊離型と接合型のプトレシン含有量が増加するが、感受性のタバコ (Bel W3) ではこのような反応が耐性のタバコに比べて弱く、しかも障害が出てからプトレシンの増加が起こることが知られている (Langebartels et al., 1991)。また、抵抗性のタバコではオゾン処理により細胞外にROSの除去作用をもつモノカフェオイル-プトレシンが検出されるようになる。一方、感受性のタバコではオゾン処理により急速なエチレン生成とACC含有量の上昇が認められる。このように抵抗性のタバコではポリアミンの蓄積が認められ、感受性のタバコではエチレン生成が顕著となることから、オゾン処理がポリアミン合成経路を主に誘導するのか、あるいはエチレン合成経路を誘導するのか、明らかでないがポリアミンがオゾン耐性の程度に関係していると考えられている (Langebartels et al., 1991)。また、ポリアミンは、*in vitro* でのラジカル生成を抑制するが、これにはポリアミンの脂質の過酸化抑制作用や老化抑制作用が関係していることも報告されている (Drolet et al., 1986)。

ポリアミンと除草剤のパラコートによる酸化ストレス耐性との関係については、キク科の *Conyza bonariensis* で調べられている (Ye et al., 1997)。抵抗性のバイオタイプではプトレシン含有量が恒常的に増加すると抵抗性の程度が高まり、この時のADC活性とODC活性も10~15倍に上昇する。プトレシンを外生的に与えておくと抵抗性のバイオタイプではパラコートによる酸化ストレス耐性が一層高まる。これらの結果から、パラコートによる酸化ストレスに対する耐性の獲得においてプトレシンが重要な役割をはたしているものと考えられる。また、パラコート抵抗性のヒメムカシヨモギ (*Conyza canadensis*)

は内生のポリアミン含有量が高く維持され、感受性のヒメムカシヨモギに外生的にプトレシンを与えるとパラコート耐性が付与されることなどから、高濃度のポリアミン含有量がパラコート耐性に必要であると考えられている (Szigeti et al., 1996)。さらに、トウモロコシの実験から、パラコートはプトレシンと同じ運搬体を介して細胞内に取り込まれ、プトレシンは競合的にパラコートの取り込みを阻害することが明らかとなっている (Hart et al., 1992)。他の除草剤との関連では、エンドウにスペルミジンまたはスペルミンとともに選択的除草剤であるアトラジン処理すると、アトラジンのみの処理に比べて生育の改善とクロロフィルの増加が見られ、光合成の photosystem の機能も改善される。これらの除草剤による障害の軽減機能は、ポリアミンによってチラコイド膜が保護されるためであると考えられている (Zheleva et al., 1994)。

5. その他の生理機能

ポリアミンは、細胞分裂、DNA・RNA 合成、タンパク合成、細胞壁形成、形態形成、花芽分化、花器形成、老化抑制、雄性不稔などの多くの生理機能に関与していることが示されている (e.g. Evans and Malmberg, 1989; Martin-Tanguy, 1997; Walden et al., 1997; Pandey et al., 2000; Bais and Ravishankar, 2002)。ポリアミンが根粒菌の根面への吸着過程に関与していること (Smith, 1977; Lahiri et al., 1992; Ozawa and Tsuji, 1993; Fujihara et al., 1994; Vassileva and Ignatov, 1999a, b) も、ポリアミンの生理機能の多面性を示すものである。ここではそのような多面的な機能の中でも果樹において有用であると考えられる現象、例えば結実や病害抵抗性とポリアミンとの関係について、いくつかの事例を紹介する。果実 (果菜) の成熟・老化とポリアミンとの関係については総説 (Evans and Malmberg, 1989; Pandey et al., 2000) を紹介するにとどめる。

Azizら (2001) は早期生理落果の程度の異なる 2 種類のブドウ品種 (早期生理落果が少ないピノノアールと著しいメルロー) を用いて、生理落果とポリアミンの関係について報告している。両品種ともに生理落果に先立ち遊離型ポリアミンの含有量の減少が見られるが、可溶性接合型ポリアミンの含有量は増加する。開花期前にスペルミジンやジアミノプロパンを 0.5 ~ 1 mM の濃度で与えておくと、両品種においてともに遊離型ポリアミン含有量が増加して顕著に生理落果が抑制されるが、プトレシンを与えてもこの効果は認められない。ADC の阻害剤である DFMA で処理すると、ポリアミン含有量が減少

して生理落果が誘発される。また、SPDS, PAO のそれぞれの阻害剤である CHA, HEH を与えると、スペルミジン含有量やスペルミン含有量が減少し、一方でプトレシン含有量が増加し、生理落果が増加する。これらのことから、スペルミジン含有量が低いと生理落果が顕著となるものと考えられる。さらに、早期の生理落果時は糖含有量 (特にスクロース) の減少と全遊離アミノ酸含有量の増加が認められるが、スペルミジン処理により生理落果が軽減するとともに可溶性糖含有量の増加とアミノ酸含有量の減少という逆の現象が見られることから、スペルミジン処理によるブドウの生理落果抑制効果は、糖レベルとアミノ酸レベルのバランス調整を介したものであると推論されている (Aziz et al., 2003)。

単為結果性を示すトマトの変異系統 (*pat-2*) を用いてポリアミンと単為結果性の関係が調べられている (Fos et al., 2003)。この変異系統は、GA20 酸化酵素活性が高く、活性型ジベレリンの前駆物質である GA20 が普通のトマトよりも 160 倍以上も高いため、受粉やホルモン処理をしなくても単為結果性を示し、GA の合成阻害剤であるパクロトトラゾールにより単為結果性は消失することが知られている (Fos et al., 2000)。野生型の未受粉子房に、スペルミジン、スペルミンを与えると部分的な単為結果を誘導させることができる。*pat-2* におけるパクロトトラゾールによる単為結果の阻害効果はスペルミジンにより回復する。DFMO や DFMA は *pat-2* の未受粉子房の発育を阻害する。しかし、DFMA による発育阻害はプトレシンと GA の投与で回復するが、DFMO を与えて発育を阻害した場合には GA の投与では回復できるもののプトレシンやスペルミジンの投与では生育が回復しない。*pat-2* の未受粉子房では遊離型スペルミン含有量が野生型に比べて有意に高く、ODC 遺伝子や SPDS 遺伝子の転写産物量および ODC 活性も高い。これらの結果から、*pat-2* は未受粉子房でも GA 含有量が高いため、GA が ODC 経路を活性化し、その結果ポリアミン含有量が高くなり単為結果に至ると推論している。つまり単為結果となるためにはポリアミンが必要であるがそれだけでは不十分であり、前提条件として GA 含有量が高いことが必須のようである。一方、雄性不稔へのポリアミンの関わりについても最近報告されている (Guo et al., 2003) が文献を紹介するにとどめる。

うどんこ病のムギ抵抗性品種を用いて病原菌の感染時におけるポリアミンの役割について調べた興味深い報告がある (Cowley and Walters, 2002)。病原菌接種後 1 ~ 4 日で ODC, ADC, SAMDC, DAO および PAO の活性がそれぞれ上昇し、これらに対応して遊離型のプトレシン、

スペルミンそして接合型のプトレシン, スペルミジン, スペルミンの含有量がそれぞれ増加する. また, ヒドロキシ桂皮酸との接合型ポリアミンの生成に関与するプトレシンヒドロキシ桂皮酸転移酵素 (PHT) とトリアミンフェルロイル-CoA 転移酵素 (TFT) も同様に活性が上昇している. 抵抗性の機構としては以下のような二つの仮説が提唱されている. 一つ目は, DAOやPAOの反応では過酸化水素などのROSの生成が促進する (Allan and Fluhr, 1997). これら過酸化水素などのROSは, プログラム細胞死 (PCD) のシグナル伝達 (Mittler et al., 1997) の過程やリグニン化 (Pellegrini et al., 1994) の過程に関与するとともに, 直接的には過酸化水素などのROSの抗菌作用 (Peng and Kuc, 1992) により抵抗性を誘導したのではという考えである. 二つ目は, スペルミンは, アポトーシスに関与しているカスパーゼを活性化することが知られているため (Stefanelli et al., 1998), うどんこ病に抵抗性を示すムギで認められた遊離型スペルミン含有量の増加が, カスパーゼ活性化を介して抵抗性を誘導したためであるというものである (Cowley and Walters 2002). 接合型ポリアミンはタバコモザイクウイルス (TMV) に感染したタバコの過敏感反応を起こした部位においても蓄積することが知られている (Torrighiani et al., 1997). したがって接合型ポリアミンの生成に関与するPHTやTFTを導入すれば糸状菌やウイルスに対する過敏感反応を誘導することで抵抗性植物の獲得が可能になると考えられる. また, TMVに感染したタバコの葉の細胞間隙にはスペルミンが多量に蓄積し, このスペルミンがサリチル酸のシグナル伝達を経ずに pathogenesis-related protein (PRタンパク) の発現を誘導してTMV抵抗性の獲得に関与していることも報告されている (Yamakawa et al., 1998). Takahashiら (2003) はこの過程でスペルミンが mitogen-activated protein kinases (MAPKs) を活性化させることを見出し, スペルミンによる抵抗性の獲得機構について次のような経路を提示している. すなわち, TMVの感染によりスペルミンが蓄積してROSが作られる (恐らくはスペルミンの分解過程でROSが作られる) とともに, ミトコンドリアへのカルシウムイオンの流入が促される. そのため, 二次的なROSやalternative酸化酵素 (AOX) が誘導されてミトコンドリアの機能障害が起こる. ミトコンドリア機能の損失は, MAPKsであるSIPK (salicylic acid-induced protein kinase) とWIPK (wound-induced protein kinase) を活性化させ, 引き続いて過敏感反応に至る一連の遺伝子群の発現を誘導して抵抗性獲得に至るといった興味深いものである.

6. おわりに

近年は組換え体の解析から, より直接的にポリアミン代謝関連酵素遺伝子の役割を解析することができるようになり, これまでにODC遺伝子, ADC遺伝子そしてSAMDC遺伝子を植物体に導入して解析した事例がいくつか報告されている (Kakkar and Sawhney, 2002の総説参照). 最近, クロダネカボチャ由来のSPDS遺伝子をシロイヌナズナに導入し, 組換え体の環境ストレス耐性について調べた結果が報告されている (春日部・橋, 2002). それによると, 組換えシロイヌナズナは, 野生型に比べて冷温耐性 (5, 2~4日), 凍結耐性 (-5, 5日間), 塩ストレス耐性 (75mM NaCl, 45日間), 浸透圧ストレス耐性 (200mMソルビトール, 70日間), パラコート毒性耐性そして乾燥ストレス耐性を獲得している. 一般に多くの乾燥ストレス誘導遺伝子はABAによって誘導され, これらの遺伝子はまた塩ストレスによっても誘導される. しかし, 乾燥ストレスで誘導される遺伝子のわずか10%しか低温では誘導されないことが知られている (Shinozaki et al., 2003). 事実, ABAは浸透圧ストレスで誘導される遺伝子の発現に関与しているが, ABAの低温ストレス反応への関与は浸透圧ストレスの時に比べると小さいようである (Shinozaki et al., 2003). 一方で, 先のSPDS遺伝子のシロイヌナズナへの導入事例から, SPDS遺伝子のみを導入することで, 塩ストレス耐性に加えて冷温や凍結に対するストレス耐性も同時に付与できることが示されているが, この成果は, ポリアミン生成系遺伝子を利用した環境ストレス耐性植物を作出する上で非常に重要な知見である.

ストレス耐性以外では, エンバク由来のODC遺伝子をタバコに導入して過剰発現させると形態が著しく変化することが示されている (Masgrau et al., 1997). マウス由来のODC遺伝子をポプラに導入するとエチレン生成が増加し (Quan et al., 2002), またイネに導入すると組換え体カルスからの再分化率が向上する (Kumria and Rajam, 2002a). 一方, エンバクのADC遺伝子をタバコに導入して過剰発現させると, アグマチン含有量は増加するがポリアミン含有量には影響がなく, また組換え体の形態にも大きな変化を与えないことが報告されている (Burtin and Michael, 1997). SAMDC遺伝子については, ヒト由来のSAMDC遺伝子をタバコにセンス方向で導入するとプトレシン含有量の減少とスペルミジン含有量の増加が起こり, 組換え体の葉片からはカルス誘導培地にもかかわらずシュートが形成されやすくなる (Noh and Minocha, 1994). 同様な内生のポリアミン含有量の変化はニンジンのSAMDC遺伝子をイネに導入した際にも見

られる (Thu-Hang et al., 2002). ポテトのSAMDC遺伝子をアンチセンス方向で導入すると、枝分かれが多くなるとともに節間が短くなる。また葉が小さくなり塊根も小さくなった形質転換ポテトが得られている (Kumar et al., 1996; Pedros et al., 1999). 興味深いことに酵母のSAMDC遺伝子をトマト果実の成熟期に特異的に発現するE8プロモーター下でトマトに導入して過剰発現させると、リコペン含有量が増加し、トマトの樹の寿命が長くなり、さらにジュース品質も向上することが示されている (Mehta et al., 2002). このようにポリアミン生合成系の酵素遺伝子を植物に導入すると内生のポリアミン含有量 (バランス) が変化することで形態形成や内成分の組成などに影響を与えていることが明らかになっている。

このように組換え体の解析や、シロイヌナズナや酵母のポリアミン生合成系酵素遺伝子の変異系統の解析から、ポリアミンの生理機能について理解が深まってきてはいるが、他の因子と複雑に相互作用しているため十分に機能解明されているとは言い難い。例えば、ジャスモン酸やメチルジャスモン酸がIAA, BAなどとも相互作用してポリアミン生合成系酵素遺伝子の転写や翻訳を調節していることが知られている (Biondi et al., 2003; およびこの論文の引用文献)。また、前述したようにシロイヌナズナのACL5遺伝子の5'上流には、オーキシンに反応する転写因子が結合すると考えられるシス配列があり、ACL5遺伝子とオーキシンとの関係が推察されている (Hanzawa et al., 2000)。他にもシロイヌナズナのADC遺伝子の5'上流にはABA-responsive element (ABRE) に関係したモチーフの存在やSAMDC遺伝子の5'上流にはDRE/CRT (dehydration-responsive element/C-repeat) に関係したモチーフの存在が報告されている (Urano et al., 2003)。そのため将来的にはマイクロアレイなどによるポリアミンと植物ホルモンとの関係や、ポリアミン輸送体機構、シグナル伝達経路などの解明に期待が寄せられている。シロイヌナズナにSPDS遺伝子を導入して過剰発現させた組換え体植物由来の全RNAをプローブとするマイクロアレイ解析では、DREB (dehydration-responsive element-binding protein) などの乾燥ストレスのシグナル伝達に関与する転写因子やストレス耐性遺伝子のrd29Aの発現誘導が確認されている (橘, 私信)。さらに、シロイヌナズナにABA, 塩, 乾燥, 低温などの処理を行った際のポリアミン生合成系酵素遺伝子の発現解析も網羅的に行われ始めている (Urano et al., 2003)。これら解析によりポリアミンの生理機能がより一層明らかになれば、果樹栽培の現場においても生産安定や環境ストレス

の回避・軽減が可能となるポリアミンを利用した技術開発につながるものと考えられる。

摘 要

ポリアミンは細胞分裂、形態形成そしてストレス反応などの多くの重要な過程に関与していると考えられているが、その生理機能は未だ十分に理解されていない。近年の分子生物学の進展によりポリアミン代謝制御機構の遺伝子レベルでの研究や組換え体技術による内生ポリアミン量の制御が可能となってきている。ここではポリアミンの代謝経路やその制御機構について説明する。また、特に環境ストレス耐性とポリアミンの関連性について記載する。さらに、果樹において有用であると考えられるポリアミンの生理機能についても概説する。

謝辞 本原稿は、三重大大学生物資源学部橘昌司教授ならびに生理機能部形質発現研究室本多親子主任研究官に校閲していただきました。ここに厚く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Alabadí, D. and J. Carbonell. 1999a. Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissues of pea. *Plant Mol. Biol.* 39: 933-943.
- 2) Alabadí, D. and J. Carbonell. 1999b. Molecular cloning and characterization of a tomato spermidine synthase cDNA (Accession No. AJ006414). *Plant Physiol.* 120: 935.
- 3) Allan, A.C. and R. Fluhr. 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9: 1559-1572.
- 4) Auvinen, M., L.C. Anderson and E. Hölttä. 1992. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360: 355-358.
- 5) Aziz, A. 2003. Spermidine and related-metabolic inhibitors modulate sugar and amino acid levels in *Vitis vinifera* L: possible relationships with initial fruitlet abscission. *J. Exp. Bot.* 54: 355-363.
- 6) Aziz, A., O. Brun and J-C. Audran. 2001. Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine (*Vitis vinifera*). *Physiol. Plant.* 113: 50-58.
- 7) Aziz, A., J. Martin-Tanguy and F. Larher. 1997. Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. *Plant Growth*

- Regul. 21: 153-163.
- 8) Bailey, A., E. Mueller and P. Bowyer. 2000. Ornithine decarboxylase of *Stagonospora (Septoria) nodorum* is required for virulence toward wheat. J. Bio. Chem. 275: 14242-14247.
- 9) Bais, H.P. and G.A. Ravishankar. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. Pant Cell Tissue Org. Cult. 69: 1-34.
- 10) Balasundaram, D., C.W. Tabor and H. Tabor. 1991. Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5872-5876.
- 11) Bell, E. and R.L. Malmberg. 1990. Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat, reveals similarity to *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. Mol. Gen. Genet. 224: 431-436.
- 12) Benavides, M.P., G. Aizencang and M.L. Tomaro. 1997. Polyamines in *Helianthus annuus* L. during germination under salt stress. J. Plant Growth Regul. 16: 205-211.
- 13) Biondi, S., V. Scoccianti, S. Scaramagli, V. Ziosi and P. Torrigiani. 2003. Auxin and cytokinin modify methyl jasmonate effects on polyamine metabolism and ethylene biosynthesis in tobacco leaf discs. Plant Sci. 165: 95-101.
- 14) Bolle, C., R.G. Herrmann and R. Oelmüller. 1995. A spinach cDNA with homology to S-adenosylmethionine decarboxylase. Plant Physiol. 107: 1461-1462.
- 15) Borrell, A., T. Bestford, T. Altabella, C. Masgrau and A.F. Tiburcio. 1996. Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. Physiol. Plant. 98: 105-110.
- 16) Bortolotti, C., A. Cordeiro, R. Alcázar, A. Borrell, F.A. Culiañez-Macià, A.F. Tiburcio and T. Altabella. 2004. Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. Physiol. Plant. 120: 84-92.
- 17) Bouchereau, A., A. Aziz, F. Larher and J. Martin-Tanguy. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Sci. 140: 103-125.
- 18) Burtin, D. and A.J.I. Michae. 1997. Overexpression of arginine decarboxylase in transgenic plants. Biochem. J. 325: 331-337.
- 19) Chang, K.S., S.H. Lee, S.B. Hwang and K.Y. Park. 2000. Characterization and translational regulation of the arginine decarboxylase gene in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant J. 24: 45-56.
- 20) Chattopadhyay, M.K., S. Gupta, D.N. Sengupta and B. Ghosh. 1997. Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. Plant Mol. Biol. 34: 477-483.
- 21) Cohen, E., Y.M. Heimer, S. Malis-Arad and Y. Mizrahi. 1983. Involvement of polyamines in cell division of various plant tissues. p. 443-454. In: U. Barchrach, A. Kaye and R. Chayen (eds.) Advances in Polyamine Research. vol 4. Raven Press, New Yourk.
- 22) Cowley, T. and D.R. Walters. 2002. Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Plant Cell Environ. 25: 461-468.
- 23) DeScenzo, R.A. and S.C. Minocha. 1993. Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. Plant Mol. Biol. 22: 113-127.
- 24) Dohmen, G.P., A. Koppers and C. Langebartels. 1990. Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) towards 14-month exposure to ozone and acid mist: effect on amino acid, glutathione and polyamine titers. Environ. Pollut. 64: 375-383.
- 25) Dresselhaus, T., P. Barcelo, C. Hagel, H. Lörz and K. Humbeck. 1996. Isolation and characterization of a Tritordeum cDNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase that is circadian-clock-regulated. Plant Mol Biol. 30: 1021-1033.
- 26) Drolet, G., E.B. Dumbroff, R.L. Legge and J.E. Thompson. 1986. Radical scavenging properties of polyamines. Phytochemistry 25: 367-371.
- 27) Escribano, M.I., P. Aguado, R.M. Reguera and C. Merodio. 1996. Conjugated PA levels and Put synthesis in Cherimoya fruit during storage at different temperatures. J. Plant Physiol. 147: 736-742.
- 28) Evans, P.T. and R.L. Malmberg. 1989. Do polyamines have roles in plant development? Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 235-269.
- 29) Even-Chen, Z., A.K. Mattoo and R. Goren. 1982. Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunts label from 3,4-[¹⁴C] methionine into spermidine in aged orange peel discs. Plant Physiol. 69: 385-388.
- 30) Flores, H.E. and P. Filner. 1984. Putrescine catabolism in plant cells: -aminobutyraldehyde dehydrogenase activity in mono and dicotyledonous species. Plant Physiol. 75 (Suppl.) : 118 (Abstr.) .
- 31) Flores, H.E. and A.W. Galston. 1984. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. Plant Physiol. 75: 102-109.
- 32) Fos, M., F. Nuez and J.L. Garcia-Martínez. 2000 The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin

- content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol.* 122: 471-479.
- 33) Fos, M., K. Proaño, D. Alabadi, F. Nuez, J. Carbonell and J.L. García-Martínez. 2003. Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic *pat-2* tomato ovaries. *Plant Physiol.* 131: 359-366.
- 34) Franceschetti, M., C. Hanfrey, S. Scaramagli, P. Torrigiani, N. Bagni, D. Burtin and A.J. Michael. 2000. Characterization of monocot and dicot plant *S*-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochem. J.* 353: 403-409.
- 35) Fujihara, S., H. Abe, Y. Minakawa, S. Akao and T. Yoneyama. 1994. Polyamines in nodules from various plant-microbe symbiotic associations. *Plant Cell Physiol.* 35: 1127-1134.
- 36) Galston, A.W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. *BioScience* 33: 382-388.
- 37) Geny, L., M. Broquedis, J. Martin-Tanguy, J.P. Soyer and J. Bouard. 1997. Effects of potassium nutrition on polyamine content of various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 85-91.
- 38) Ghoda, L., L. van Daalen Wetters, M. Macrae, D. Ascherman and P. Coffino. 1989. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science* 243: 1493-1495.
- 39) Groppa, M.D., M.L. Tomaro and M.P. Benavides. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci.* 161: 481-488.
- 40) Guo, D-P., Y-Z. Sun and Z-J. Chen. 2003. Involvement of polyamines in cytoplasmic male sterility of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*). *Plant Growth Regul.* 41: 33-40.
- 41) Hamasaki-Katagiri, N., Y. Katagiri, C.W. Tabor and H. Tabor. 1998. Spermine is not essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the *SPE4* gene (spermine synthase) and characterization of a *spe4* deletion mutant. *Gene* 210: 195-201.
- 42) Hanfrey, C., M. Franceschetti, M.J. Mayer, C. Illingworth and A.J. Michael. 2002. Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant *S*-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J. Biol. Chem.* 277: 44131-44139.
- 43) Hanfrey, C., S. Sommer, M.J. Mayer, D. Burtin and A.J. Michael. 2001. Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of argine decarboxylase activity. *Plant J.* 27: 551-560.
- 44) Hanzawa, Y., A. Imai, A.J. Michael, Y. Komeda and T. Takahashi. 2002. Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 527: 176-180.
- 45) Hanzawa, Y., T. Takahashi and Y. Komeda. 1997. *ACL5*: an Arabidopsis gene required for internodal elongation after flowering. *Plant J.* 12: 863-874.
- 46) Hanzawa, Y., T. Takahashi, A.J. Michael, D. Burtin, D. Long, M. Pineiro, G. Coupland and Y. Komeda. 2000. *ACAULIS5*, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J.* 19: 4248-4256.
- 47) Hart, J.J., J.M. DiTomaso, D.L. Linscott and L.V. Kochian. 1992. Transport interactions between paraquat and polyamines in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiol.* 99: 1400-1405.
- 48) Hashimoto, T., K. Tamaki, K. Suzuki and Y. Yamada. 1998. Molecular cloning of plant spermidine synthase. *Plant Cell Physiol.* 39: 73-79.
- 49) Hatanaka, T., H. Sano and T. Kusano. 1999. Molecular cloning and characterization of coffee cDNA encoding spermidine synthase. *Plant Sci.* 140: 161-168.
- 50) He, L., K. Nada, Y. Kasukabe and S. Tachibana. 2002. Enhanced susceptibility of photosynthesis to low-temperature photoinhibition due to interruption of chill-induced increase of *S*-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Cell Physiol.* 43: 196-206.
- 51) Heby, O. and L. Persson. 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 15: 153-158.
- 52) Illingworth, C., M.J. Mayer, K. Elliott, C. Hanfrey, N.J. Walton and A.J. Michael. 2003. The diverse bacterial origins of the Arabidopsis polyamine biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* 549: 26-30.
- 53) Imai, A., T. Akiyama, T. Kato, S. Sato, S. Tabata, K.T. Yamamoto and T. Takahashi. 2004. Spermine is not essential for survival of Arabidopsis. *FEBS Lett.* 556: 148-152.
- 54) Janowitz, T., H. Kneifel and M. Piotrowski. 2003. Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Lett.* 544: 258-261.
- 55) Kakkar, R.K. and V.K. Sawhney. 2002. Polyamine research in plants - a changing perspective. *Physiol. Plant.* 116: 281-292.
- 56) Kameji, T. and A.E. Pegg. 1987. Effect of putrescine on the synthesis of *S*-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochem. J.* 243: 285-288.

- 57) 春日部芳久・橘昌司. 2002. ポリアミン合成酵素遺伝子による植物の環境ストレス抵抗性の改良. *Bio Industry* 19: 54-62.
- 58) Kaur-Sawhney, R., H.E. Flores and A.W. Galston. 1981. Polyamine oxidase in oat leaves: a cell wall-localized enzyme. *Plant Physiol.* 68: 494-498.
- 59) Koromilas, A.E. and D.A. Kyriakidis. 1998. The existence of ornithine decarboxylase-antizyme complex in germinated barley seeds. *Physiol. Plant.* 72: 718-724.
- 60) Kramer, G.F. and C.Y. Wang. 1989. Coorelation of reduced chilling injury with increased spermidine and spermine levels in zucchini squash. *Physiol. Plant.* 76: 479-484.
- 61) Kramer, G.F. and C.Y. Wang. 1990. Effects of chilling and temperature preconditioning on the activity of polyamine biosynthetic enzymes in zucchini squash. *J. Plant Physiol.* 136: 115-122.
- 62) Kuehn, G.D., B. Rodriguez-Garay, S. Bagga and G.C. Phillips. 1990. Novel occurrence of uncommon polyamines in higher plants. *Plant Physiol.* 94: 855-857.
- 63) Kumar, A., M.A. Taylor, S.A. Mad Arif and H. Davies. 1996. Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J.* 9: 147-158.
- 64) Kumria, R. and M.V. Rajam. 2002a. Alteration in polyamine titres during *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with ornithine decarboxylase gene affects plant regeneration potential. *Plant Sci.* 162: 769-777.
- 65) Kumria, R. and M.V. Rajam. 2002b. Ornithine decarboxylase transgene in tobacco affects polyamines, *in vitro*-morphogenesis and response to salt stress. *J. Plant Physiol.* 159: 983-990.
- 66) Kwak, S-H. and S.H. Lee. 2001. The regulation of ornithine decarboxylase gene expression by sucrose and small upstream open reading frame in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Physiol.* 42: 314-323.
- 67) Lahiri, K., S. Chattopadhyay, S. Chattopadhyay and B. Ghosh. 1992. Polyamine metabolism in nodules of *Vigna mungo* during senescence. *Phytochemistry* 31: 4087-4090.
- 68) Langebartels, C., K. Kerner, S. Leonardi, M. Schraudner, M. Trost, W. Heller and H. Sandermann Jr. 1991. Biochemical plant responses to ozone. I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 95: 882-889.
- 69) Lee, T.M. and C. Chu. 1992. Ethylene-induced polyamine accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Plant Physiol.* 100: 238-245.
- 70) Lee, M.M., S.H. Lee and K.Y. Park. 1997a. Characterization and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol. Biol.* 34: 371-382.
- 71) Lee, T.M., H.S. Lur and C. Chu. 1995. Abscisic acid and putrescine accumulation in chilling-tolerant rice cultivars. *Crop Sci.* 35: 502-508.
- 72) Lee, T.M., H.S. Lur and C. Chu. 1997b. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. II. Modulation of free polyamine levels. *Plant Sci.* 126:1-10.
- 73) Lee, T.M., Y-J. Shieh and C-H. Chou. 1996. Role of putrescine in enhancing shoot elongation in *Scirpus mucronatus* under submergence. *Physiol. Plant.* 96: 419-424.
- 74) Li, Z-Y. and S-Y. Chen. 2000. Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theor. Appl. Genet.* 100: 782-788.
- 75) Li, N., B.L. Parsons, D. Liu and A.K. Mattoo. 1992. Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Mol. Biol.* 18: 477-487.
- 76) Liu, K., H. Fu, Q. Bei and S. Luan. 2000. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol.* 124: 1315-1325.
- 77) McDonald, R.E. and M.M. Kushad. 1986. Accumulation of putrescine during chilling injury of fruits. *Plant Physiol.* 82: 324-326.
- 78) MacRobbie, E.A.C. 1997 Signaling in guard cells and regulation of ion channel activity. *J. Exp. Bot.* 48: 515-528.
- 79) Mad Arif, S.A., M.A. Taylor, L.A. George, A.R. Butler, L.R. Burch, H.V. Davies, M.J.R. Stark and A. Kumar. 1994. Characterisation of the S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene of potato. *Plant Mol. Biol.* 26: 327-338.
- 80) Malmberg, R.L. and M.L. Cellino. 1994. Arginine decarboxylase of oats is activated by enzymatic cleavage into two polypeptides. *J. Biol. Chem.* 269: 2703-2706.
- 81) Martin-Tanguy, J. 1997. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.* 100: 675-688.
- 82) Masgrau, C., T. Altabella, R. Farrás, D. Flores, A.J. Thompson, R.T. Bestford and A.F. Tiburcio. 1997. Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 11: 465-473.
- 83) Mehta, R.A., T. Cassol, N. Li, N. Ali, A.K. Handa and A.K.

- Mattoo. 2002. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nature Biotech.* 20: 613-618.
- 84) Michael, A.J., J.M. Furze, M.J.C. Rhodes and D. Burtin. 1996. Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochem. J.* 314: 241-248.
- 85) Mittler, R., K. Simon and E. Lam. 1997. Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* 110: 1333-1344.
- 86) Mo, H. and E-C. Pua. 2002. Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiol. Plant.* 114: 439-449.
- 87) Murakami, Y., S. Matsufuji, T. Kameji, S. Hayashi, K. Igarashi, T. Tamura, K. Tanaka and A. Ichihara. 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360: 597-599.
- 88) Nam, K.H., S.H. Lee and J. Lee. 1997. Differential expression of ADC mRNA during development and upon acid stress in soybean (*Glycine max*) hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 38: 1156-1166.
- 89) Noh, E.W. and S.C. Minocha. 1994. Expression of a human *S*-adenosylmethionine decarboxylase cDNA in transgenic tobacco and its effects on polyamine biosynthesis. *Transgenic Res.* 3: 26-35.
- 90) Ogawa, T. and T. Tsuji. 1993. A possible role for polyamines in the repression of growth of *Bradyrhizobium japonicum* bacterioids in soybean nodules. *Plant Cell Physiol.* 34: 899-904.
- 91) Ormrod, D.P. and D.W. Beckerson. 1986. Polyamines as antiozonants for tomato. *HortSci.* 21: 1070-1071.
- 92) Panagiotidis, C.A., J.G. Georgatsos and D.A. Kyriakidis. 1982. Superinduction of cytosolic and chromatin-bound ornithine decarboxylase activities of germinating barley seeds by actinomycin D. *FEBS Lett.* 146: 193-196.
- 93) Pandey, S., S.A. Ranade, P.K. Nagar and N. Kumar. 2000. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J. Biosci.* 25: 291-299.
- 94) Panicot, M., E.G. Minguet, A. Ferrando, R. Aláczar, M.A. Blázquez, J. Carbonell, T. Altabella, C. Koncz and A.F. Tiburcio. 2002. A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 2539-2551.
- 95) Pedros, A.R., M.R. MacLeod, H.A. Ross, D. MacRae, A.F. Tiburcio, H.V. Davies and M.A. Taylor. 1999. Manipulation of *S*-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers. An increase in activity leads to an increase in tuber number and a change in tuber size distribution. *Planta* 209: 153-160.
- 96) Pegg, A.E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234: 249-262.
- 97) Pellegrini, L., O. Rohfritsch, B. Fritig and M. Legrand. 1994. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiol.* 106: 877-886.
- 98) Peng, M. and J. Kuc. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathol.* 82: 696-699.
- 99) Pérez-Amador, M.A., J. Carbonell and A. Cranell. 1995. Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Mol. Biol.* 28: 997-1009.
- 100) Piotrowski, M., T. Janowitz and H. Kneifel. 2003. Plant C-N hydrolase and the identification of plant *N*-carbamoylputrescine amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278: 1708-1712.
- 101) Priebe, A., H. Klein and H-J. Jäger. 1978. Role of polyamines in SO₂-polluted pea plants. *J. Exp. Bot.* 29: 1045-1050.
- 102) Primikiris, N.I. and K.A. Roubelakis-Angelakis. 1999. Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* 208: 574-582.
- 103) Primikiris, N.I. and K.A. Roubelakis-Angelakis. 2001. Indications for post-translational regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Mol. Biol.* 45: 669-678.
- 104) Quan, Y., R. Minocha and S.C. Minocha. 2002. Genetic manipulation of polyamine metabolism in poplar II: effects on ethylene biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 929-937.
- 105) Racz, I., M. Kovacs, D. Laszity, O. Veisz, G. Szalai and E. Paldi. 1996. Effects of short-term and long-term low temperature stress on polyamine biosynthesis in wheat genotypes with varying degrees of frost tolerance. *J. Plant Physiol.* 148: 368-373.
- 106) Rastogi, R., J. Dulson and S.J. Rothstein. 1993. Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* 103: 829-834.
- 107) Ravel, S., B. Gakiérel, D. Job and R. Douce. 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7805-7812.
- 108) Reggiani, R., A. Hochkoepler and A. Bertani. 1989a. Polyamines in rice seedlings under oxygen-deficit stress. *Plant*

- Physiol. 91: 1197-1201.
- 109) Reggiani, R., A. Hochkoepler and A. Bertani. 1989b. Polyamines and anaerobic elongation of rice coleoptile. *Plant Cell Physiol.* 30: 893-898.
- 110) Reggiani, R., P. Giussani and A. Bertani. 1990. Relationship between the accumulation of putrescine and the tolerance to oxygen-deficit stress in gramineae seedlings. *Plant Cell Physiol.* 31: 489-494.
- 111) Remo, R. and A. Bertani. 1989. Effect of decreasing oxygen concentration on polyamine metabolism in rice and wheat shoots. *J. Plant Physiol.* 135: 375-377.
- 112) Richards, F.J. and E.G. Coleman. 1952. Occurrence of putrescine in potassium deficient barley. *Nature* 170: 460-461.
- 113) Roberts, D.R., M.A. Walker, J.E. Thompson and E.B. Dumbroff. 1984. The effect of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnations. *Plant Cell Physiol.* 25: 315-322.
- 114) Rogers, S., R. Wells and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.
- 115) Roustan, J-P., A. Latché and J. Fallot. 1992. Influence of ethylene on the incorporation of 3,4-[¹⁴C]methionine into polyamines in *Daucus carota* cells during somatic embryogenesis. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 201-205.
- 116) Rowland-Bamford, A.J., A.M. Borland, P.J. Lea and T.A. Mansfield. 1989. The role of arginine decarboxylase in modulating the sensitivity of barley to ozone. *Environ. Pollut.* 61: 95-106.
- 117) Roy, M. and B. Ghosh. 1996. Polyamines, both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus. *Physiol. Plant.* 98: 196-200.
- 118) Roy, M. and R. Wu. 2002. Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci.* 163: 987-992.
- 119) Sandmeier, H., T.I. Hale and P. Christen. 1994. Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylase. *Eur. J. Biochem.* 221: 997-1002.
- 120) Santa-Cruz, A., M. Acosta, F. Pérez-Alfocea and M.C. Bolarin. 1997. Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiol. Plant.* 101: 341-346.
- 121) Schröder, G. and J. Schröder. 1995. cDNA from *Catharanthus roseus*, heterologous expression, identification of the proenzyme-processing site, evidence for the presence of both subunits in the active enzyme, and a conserved region in the 5'-mRNA leader. *Eur. J. Biochem.* 228: 74-78.
- 122) Šebela, M., A. Radová, R. Angelini, P. Tavladoraki, I. Frébort and P. Peč. 2001. FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci.* 160: 197-207.
- 123) Shalata, A., V. Mittova, M. Volokita, M. Guy and M. Tal. 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol. Plant.* 112: 487-494.
- 124) Shen, W., K. Nada and S. Tachibana. 2000. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiol.* 124: 431-439.
- 125) Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki and M. Seki. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410-417.
- 126) Slocum, R.D. and H.E. Flores. 1991. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 127) Smith, T.A. 1973. Amine levels in mineral-deficient *Hordeum vulgare* leaves. *Phytochemistry* 13: 2093-2100.
- 128) Smith, T.A. 1977. Homospermidine in *Rhizobium* and legume root nodules. *Phytochemistry* 16: 278-279.
- 129) Smith, T.A. 1979. Arginine decarboxylase of oat seedlings. *Phytochemistry* 18: 1447-1452.
- 130) Song, J., K. Nada and S. Tachibana. 1999. Ameliorative effect of polyamines on the high temperature inhibition of in vitro pollen germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Sci. Hort.* 80: 203-212.
- 131) Song, J., K. Nada and S. Tachibana. 2001. The early increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is essential for the normal germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pollen. *Plant Sci.* 161: 507-515.
- 132) Song, J., K. Nada and S. Tachibana. 2002. Suppression of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is a major cause for high-temperature inhibition of pollen germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Physiol.* 43: 619-627.
- 133) Soyka, S. and A.G. Heyer. 1999. *Arabidopsis* knockout mutation of *ADC2* gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Lett.* 458: 219-223.
- 134) Stefanelli, C., F. Bonavita, I. Stanic, M. Mignani, A. Facchini, C. Pignatti, F. Flamigni and C.M. Calderera. 1998. Spermine

- causes caspase activation in leukaemia cells. FEBS Lett. 437: 233-236.
- 135) Suttle, J.C. 1981. Effect of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry* 20: 1477-1480.
- 136) Suzuki, T., Y. He, K. Kashiwagi, Y. Murakami, S. Hayashi and K. Igarashi. 1994. Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8930-8934.
- 137) Szigeti, Z., I. Rác, É. Darkó, D. Lásztity and E. Lehoczki. 1996. Are either SOD and catalase or the polyamines involved in the paraquat resistance of *Conyza canadensis*? *J. Environ. Sci. Health. B31*: 599-604.
- 138) Tabor, C.W. and H. Tabor. 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
- 139) 橋昌司. 2000. ポリアミンの生理機能および植物の環境ストレス抵抗性との関連. *植物の化学調節* 35: 56-66.
- 140) Takahashi, Y., T. Berberich, A. Miyazaki, S. Seo, Y. Ohashi and T. Kusano. 2003. Spermine signalling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *Plant J.* 36: 820-829.
- 141) Tassoni, A., M. Van Buuren, M. Franceschetti, S. Fornalè and N. Bagni. 2000. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 383-393.
- 142) Tassoni, A., S. Fornalè and N. Bagni. 2003. Putative ornithine decarboxylase activity in *Arabidopsis thaliana*: inhibition and intracellular localisation. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 871-875.
- 143) Terano, S. and Y. Suzuki. 1978. Formation of γ -alanine from spermine and spermidine in maize shoots. *Phytochemistry* 17: 148-149.
- 144) Thu-Hang, P., L. Bassie, G. Safwat, P. Trung-Nghia, P. Christou and T. Capell. 2002. Expression of a heterologous *S-adenosylmethionine decarboxylase* cDNA in plants demonstrates that changes in *S-adenosyl-L-methionine decarboxylase* activity determine levels of the higher polyamines spermidine and spermine. *Plant Physiol.* 129: 1744-1754.
- 145) Torrigiani, P., A.L. Rabiti, C. Bortolotti, L. Betti, F. Marani, A. Canova and N. Bagni. 1997. Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytol.* 135: 467-473.
- 146) Urano, K., Y. Yoshida, T. Nanjo, Y. Igarashi, M. Seki, F. Sekiguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 2003. Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* 26: 1917-1926.
- 147) Urano, K., Y. Yoshida, T. Nanjo, T. Ito, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 2004. *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 369-375.
- 148) Vassileva, V. and G. Ignatov. 1999a. Effects of polyamines on dicarboxylate and oxygen uptake by symbiosomes and free bacterioids from *Galega orientalis* nodules. *Symbiosis* 27: 59-71.
- 149) Vassileva, V. and G. Ignatov. 1999b. Polyamine-induced changes in symbiotic parameters of the *Galega orientalis-Rhizobium galegae* nitrogen-fixing system. *Plant Soil* 210: 83-91.
- 150) Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151: 59-66.
- 151) Waie, B. and M.V. Rajam. 2003. Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human *S-adenosylmethionine* gene. *Plant Sci.* 164: 727-734.
- 152) Walden, R., A. Cordeiro and A.F. Tiburcio. 1997. Polyamines: Small molecules triggering pathways in Plant growth and development. *Plant Physiol.* 113: 1009-1013.
- 153) Watson, M.B. and R.L. Malmberg. 1996. Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. *Plant Physiol.* 111: 1077-1083.
- 154) Wolukau, J.N., S-L. Zhang, G-H. Xu and D. Chen. 2004. The effect of temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor on in vitro pollen germination and pollen tube growth of *Prunus mume*. *Sci. Hort.* 99: 289-299.
- 155) Xiong, H., B.A. Stanley, B.L. Tekwani and A.E. Pegg. 1997. Processing of mammalian and plant *S-adenosylmethionine decarboxylase* proenzymes. *J. Biol. Chem.* 272: 28342-28348.
- 156) Yamakawa H., H. Kamada, M. Satoh and Y. Ohashi. 1998. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 118: 1213-1222.
- 157) Ye, B., H.H. Müller, J. Zhang and J. Gressel. 1997. Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and wheat. *Plant Physiol.* 115: 1443-1451.

- 158) Yoshida, I., H. Yamagata and E. Hirasawa. 2002. Signal transduction controlling the blue- and red-light mediated gene expression of *S*-adenosylmethionine decarboxylase in *Pharbitis nil*. *J. Exp. Bot.* 53: 1525-1529.
- 159) Young, N.D. and A.W. Galston. 1984. Physiological control of arginine decarboxylase activity in K-deficient oat shoots. *Plant Physiol.* 76: 331-335.
- 160) Zhang, Z., C. Honda, M. Kita, C. Hu, M. Nakayama and T. Moriguchi. 2003. Structure and expression of spermidine synthase genes in apple: two cDNAs are spatially and developmentally regulated through alternative splicing. *Mol. Gen. Genomics* 268: 799-807.
- 161) Zheleva, D., T. Tsonev, I. Seriev and E. Karanov. 1994. Protective effect of exogenous polyamines against atrazine in pea plants. *J. Plant Growth Regul.* 13: 203-211.