

平成 2 6 年 4 月 1 7 日現在

機関番号： 3 4 4 1 9

研究種目： 基盤研究(A)

研究期間： 2010 ~ 2013

課題番号： 2 2 2 4 8 0 4 2

研究課題名（和文）植物のレドックス制御による環境ストレス応答の分子機構

研究課題名（英文）The molecular mechanisms of environmental stress responses by redox regulation in plants

研究代表者

重岡 成 (shigeoka, shigeru)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号： 8 0 1 4 0 3 4 1

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,600,000 円、（間接経費） 10,680,000 円

研究成果の概要（和文）：植物のレドックス制御による環境ストレス応答の分子機構」を統合的に理解することを目指して、(1)葉緑体ROSを介した酸化シグナリングの制御機構、(2)Nudix hydrolaseの生理的役割について解析した。その結果、(1)葉緑体由来のH₂O₂に特異的に応答する遺伝子群による酸化シグナリング経路、および(2)Nudix hydrolaseによる多様なヌクレオシド2-リン酸類縁体の分解系を介したストレス応答制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To comprehensively understand "the molecular mechanisms of environmental stress responses by redox regulation in plants", the molecular mechanisms of (1) oxidative signaling via ROS produced from chloroplasts and (2) physiological roles of Nudix hydrolases were analyzed. We found that (1) oxidative signaling pathways modulated by the genes whose expressions are specifically regulated by chloroplastic H₂O₂ and (2) Nudix hydrolases regulate stress responsive mechanisms via metabolisms of various nucleoside-2 phosphate derivatives.

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード： レドックス 酸化シグナル 環境ストレス応答 活性酸素種 Nudix hydrolase ヌクレオシド-2リン酸

1. 研究開始当初の背景

行動の自由を持たない植物は、日々の環境変化に应答(馴化)し、さらに強光、乾燥、塩、低(高)温など複合的な激しい環境変化(ストレスと呼ぶ)に対応することで生き残っている。環境ストレスが植物にもたらす障害の多くは活性酸素種(ROS)に起因することが知られている。ROSは植物細胞内で常に生成するが、その過剰な蓄積は細胞内の酸化還元状態(細胞内レドックス状態)を変化させるとともに、細胞内成分の酸化損傷に起因する細胞機能障害や細胞死を引き起こす。一方、細胞内レドックス変化はシグナルとして作用し、環境ストレス応答時の防御系の発現をはじめ、細胞分化や伸張、細胞周期、プログラム細胞死、光合成反応などの生理現象の制御に関与することが明らかになってきた。これらの事実は、細胞内レドックス状態、すなわち酸化物質と還元物質レベルのバランスを適切に調節し、必要に応じて酸化的シグナルを発信することが植物の生理作用の発現に不可欠であることを意味している。

2. 研究の目的

そのような状況下で我々は、環境ストレス応答におけるROSを介した酸化的シグナリングの初期イベントの解明を試み、(1)植物細胞内における主要なROSの発生源である葉緑体内で、任意のタイミングでROSを生成させる実験系を開発した。(2)さらに得られた系を利用して、葉緑体由来のROS生成に应答する遺伝子群を単離した。注目すべきは、それらには既報の環境ストレス応答遺伝子だけでなく、過去に酸化ストレス応答・防御との関連性が明らかにされていない全く新規のものが多数で含まれていたことである。この事実は、植物の種々の環境ストレス応答の制御には、葉緑体でのレドックスバランスの変化と(ROSの生成)と植物ホルモンシグナリング経路とのクロストークが必要であることを示している。

さらに我々は、多くの生体分子(酸化ヌクレオチド、ADP-ribose、NAD(P)H、FAD、CoA、mRNA 5'-キャップ構造など)が含まれるヌクレオシド 2-リン酸類縁体に対する加水分解酵素ファミリー、Nudix(Nucleoside Diphosphate linked some moiety X) hydrolase の機能解析の結果、(1)高等植物シロイヌナズナには細胞内局在性の異なるNudix hydrolaseが27種類(細胞質型AtNUDX1-11,25,ミトコンドリア型AtNUDX13-18,葉緑体型AtNUDX19-24,26,27)存在しており、それらの中でAtNUDX2および7は、細胞内レドックス状態の変化に应答し、NADHおよびADP-riboseの代謝制御によるエネルギー恒常性や種々の細胞応答制御に機能するポリADP-リボシル化反応制御を介して酸化ストレス防御に機能していることを動植物で始めて示した。(2)葉緑体局在型AtNUDX19は、光合成に由来した還元力の電子

キャリアーであるNADPHに対して特異的分解活性を有しており、葉緑体内のレドックス制御に深く関わっている可能性を見いだした。

これらの事実は、当該AtNUDXの酸化ストレス応答・防御への貢献と共に、それらがNADHやNADPHなどの代謝による細胞内レドックス制御を介して環境ストレス応答・防御の「キーレギュレーター」としての役割を果たしている可能性を強く示すものであり、本研究課題の根幹を担う分子機構であると考えた。

そこで、「植物のレドックス制御による環境ストレス応答の分子機構」を統合的に理解することを目指して、(1)葉緑体ROSを介した酸化的シグナリングの分子機構、(2)ヌクレオシド 2-リン酸代謝による細胞内レドックス制御機構について解析する。

3. 研究の方法

RTS遺伝子群の欠損株はSALKから入手した。優勢抑制(CRES-T)ラインは産業技術総合研究所の高木優博士から分譲していただいた。遺伝子の発現解析はリアルタイムRT-PCRにより行った。マイクロアレイ解析はアフィメトリクスのGeneChipを用いて行った。AtNUDXの酵素活性測定はHPLCを用いて行った。

4. 研究成果

葉緑体由来の H_2O_2 を介したシグナル伝達経路を明らかにするために、植物の葉緑体内における H_2O_2 消去のための鍵酵素であるチラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(tAPX)の誘導抑制系を、エストロゲン誘導型RNAi法により構築した(IS-tAPX)(図1)。すなわち、任意のタイミングにおいて葉緑体で H_2O_2 を生成させることができる。

通常生育条件下においてtAPXの発現抑制を誘導したところ、葉緑体における酸化損傷の増大とともに、約800もの遺伝子群の発現に変化が見られ、Responsive to tAPX Silencing(RTS)遺伝子群と名付けた(図1)。

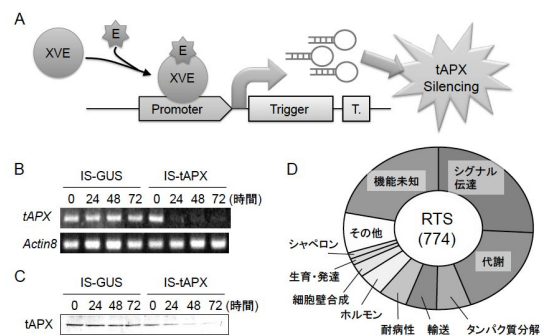


図1. tAPX発現の誘導抑制系を用いた葉緑体由来の H_2O_2 に应答する遺伝子群の同定。A. エストロゲン誘導RNAiの原理、B. IS-tAPXにおけるエストロゲン処理後のtAPX mRNAの発現抑制、C. 同条件下でのtAPXタンパク質の発現抑制、D. RTS遺伝子群の機能分類

これらの遺伝子群に既知の ROS 応答性遺伝子群は含まれておらず、葉緑体由来の H_2O_2 の特異的なシグナル作用を裏付ける結果となった。さらに、RTS 遺伝子群には強光やアブシジン酸応答性遺伝子が多数含まれること、そして tAPX の抑制により低温ストレス応答および耐病性に関与する遺伝子群の発現がそれぞれ抑制および促進されることが分かった。事実、tAPX 誘導抑制株は低温ストレスに対して高感受性を示し、本変異株では耐病性ホルモンであるサリチル酸生合成および応答が促進されていた。興味深いことに、これらの現象の多くは、tAPX 欠損株では認められなかった。

以上の結果から、葉緑体由来の H_2O_2 は特異的なシグナル機能を持ち、アブシジン酸やサリチル酸などの植物ホルモンのクロストークを介して生物学的および非生物学的ストレス応答の制御に関与すること、そしてその調節因子として葉緑体型 APX が機能することが明らかになった(図2)。

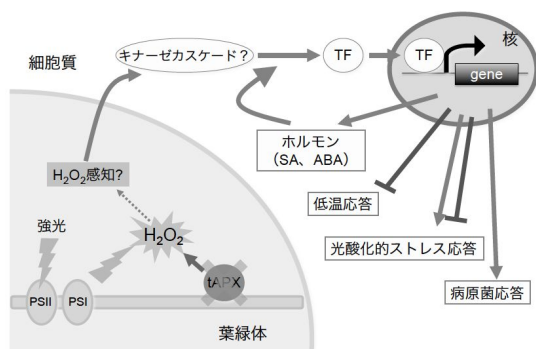


図 2. 葉緑体由来の H_2O_2 シグナリングを介したストレス応答機構

そこで次に、RTS 遺伝子群の欠損株もしくは転写因子の場合は優勢抑制 (CRES-T) ラインから、光酸化的ストレス (活性酸素発生剤/パラコート処理) 高感受性および非感受性株 (それぞれ *pss* および *psi*) を単離し、その原因遺伝子の機能解析を試みた(図3)。その結果、*PSI2* は -アミノ酪酸 (GABA) 合成に関与するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD1) をコードしており、その欠損株はパラコートに対して非感受性を示した(図4)。また、GAD1 もしくはそのアイソフォームである GAD2 の欠損により、酸化ストレス下での GABA レベルが抑制されていた。GABA はシグナルとして植物のストレス応答に関与すると考えられており、葉緑体 H_2O_2 の下流でセカンドメッセンジャーとして機能し、防御遺伝子の発現制御に寄与していると考えられた。

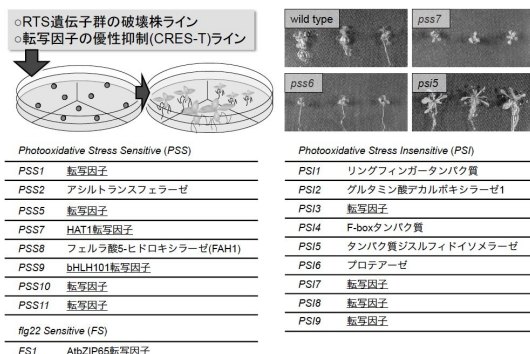


図 3. 光酸化的ストレス高感受性および非感受性株の単離

RTS 遺伝子群の欠損株もしくは優勢抑制 (CRES-T) ラインから、パラコート高感受性および非感受性株 (それぞれ *pss* および *psi*) を単離した。

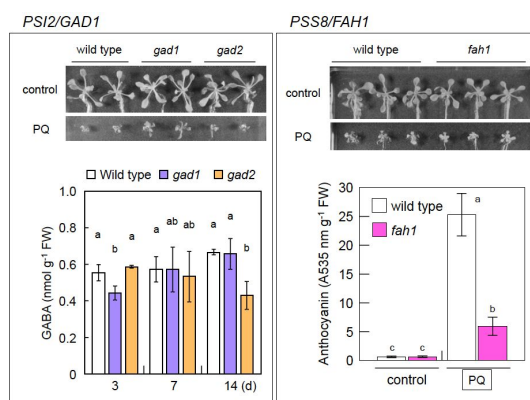


図 4. *PSI2* および *PSS8* の機能解析
両株のパラコート(PQ)処理下での表現型と、GABA もしくはアントシアニンの蓄積レベル

pss7 の原因遺伝子はフェニルプロパノイド生合成に関与するフェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ (FAH1) をコードしていた(図3)。解析の結果、その欠損はアントシアニン生合成系酵素の発現を抑制することが分かり(図4)。葉緑体 H_2O_2 によるフェニルプロパノイド経路の調節を介したアントシアニン生合成の制御機構の存在が示唆された。

その他の *PSS/PSI* 遺伝子群の多くは転写因子をコードしており、レドックスシグナリングとの関連が示唆された(図5)。これらの機能解析から、葉緑体由来の H_2O_2 シグナリングの分子機構が明らかになった。

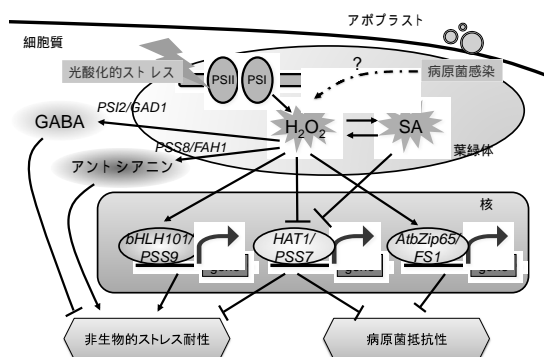


図 5. PSI および PSS 遺伝子群による葉緑体由来 H_2O_2 シグナリングの分子機構

AtNUDX6 は、AtNUDX2 および 7 と同様に、*in vitro* で NADH と ADP-リボースの両方にピロホスホハイドロラーゼ活性を示す。しかし、*AtNUDX6* の発現は種々の非生物学的ストレスではなく、病原菌感染に対する植物独自の獲得免疫機構（全身獲得抵抗性）に重要な植物ホルモンのサリチル酸処理により顕著に誘導された（図 6）。

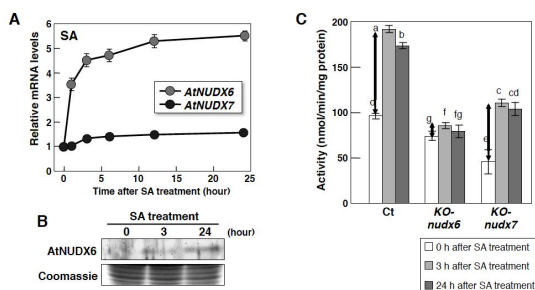


図 6. AtNUDX6 のサリチル酸 (SA) 応答性
A. AtNUDX6 のサリチル酸処理による転写 (A)、タンパク質 (B)、および活性 (C) レベルの変化

そこで、AtNUDX6 過剰発現株および遺伝子破壊株を用いて、病原菌感染応答に関連する遺伝子群の解析を行った結果、本酵素は NADH のみを生理的基質とし、NADH の代謝調節による TRX-h5 の発現制御を介した Nonexpresser of Pathogenesis-Related genes 1 (NPR1) 依存的サリチル酸シグナリング経路の制御により、病原菌感染に対する獲得免疫機構に関与することが示された（図 7）。

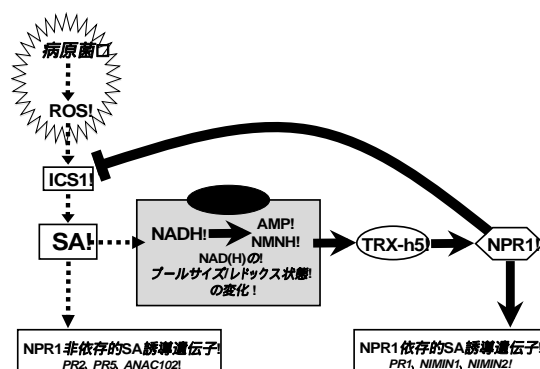


図 7. AtNUDX6 による NADH 代謝を介した生

物的ストレス応答の制御

葉緑体に局在する AtNUDX19 は NADPH 加水分解活性を有し、その欠損は細胞内 NADPH レベルの増加、光合成および抗酸化系の活性化、光酸化ストレス耐性の向上をもたらすことが明らかになった（図 8）。

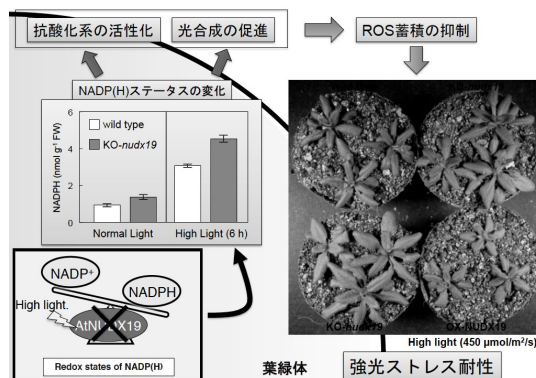


図 8. AtNUDX19 欠損株の強光ストレス耐性機構

マイクロアレイ解析により、通常光（100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ）もしくは強光照射下（1200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ）の野生株および KO-*nudx19* 間でのトランスクリプトームの変化を比較した。その結果、KO-*nudx19* 株ではストレス応答/耐性関連遺伝子に加え、多くのホルモン応答/生合成関連遺伝子の発現が変化していた。実際に、AtNUDX19 の欠損により植物ホルモンに対する応答性が変化していた。

以上より、AtNUDX19 は ROS シグナルの発生源として注目される葉緑体内の主要な還元力である NADPH の代謝制御を介して、葉緑体から核へのレトログレードシグナルにより光合成とストレス応答・防御系のバランス制御、さらには植物ホルモンシグナリング経路の制御に機能していることが明らかになった。

葉緑体局在型 AtNUDX23 は FAD ピロホスホハイドロラーゼ活性を有していた。AtNUDX23 の過剰発現株（OX-*NUDX23*）および RNAi 法による発現抑制株（KD-*nudx23*）を用いて解析した結果、AtNUDX23 の発現量は葉の総 FAD ピロホスホハイドロラーゼ活性と正の相関関係にあることが示されたが、興味深いことに、OX-*NUDX23* だけでなく KD-*nudx23* におけるフラビン化合物（FAD、FMN および RF）量は低下していた。また、両株および、各々のフラビン化合物を含む溶液への葉の浸潤により、フラビン生合成の鍵酵素である LS の転写レベルがコントロール株よりも低下していた。

これらの結果より、AtNUDX23 は FAD の加水分解によるフラビン代謝系のフィードバック調節を介して、細胞内フラビンレベルの制御に機能することが明らかになった（図 9）。

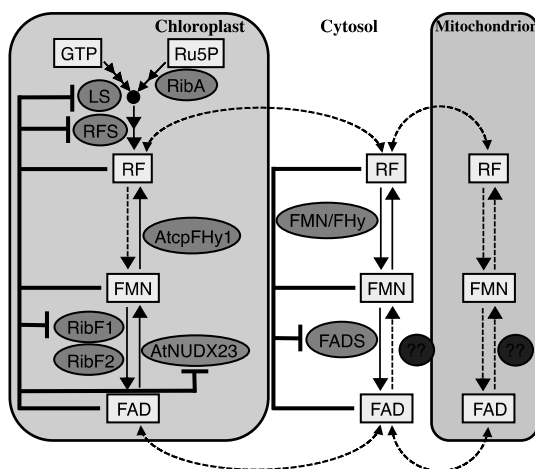


図 9. AtNUDX23 による FAD 代謝を介したフラビン合成系の制御

AtNUDX11 および 15 は、それぞれ細胞質およびミトコンドリアに局在していた。さらに、AtNUDX15 遺伝子は、3' 末端側のイントロンリテンション型の選択的スプライシングにより MTP と C 末端に PST1 型ペルオキシソーム移行シグナルをコードする AtNUDX15a mRNA を生成していたが、ミトコンドリアに局在することが確認された。

AtNUDX11 の大腸菌リコンビナントタンパク質は CoA だけでなく、マロニル-CoA、ラウリル Lauroyl-CoA およびミリスチル-CoA に対し高い親和性を示した。一方、AtNUDX15 および 15a はどちらも CoA よりも、スクシニル-CoA、ラウリル-CoA およびミリスチル-CoA に高い親和性を示した。以上より、AtNUDX11, 15 および 15a の TCA サイクルや脂肪酸代謝などへの関与が示唆された。

バクテリアの緊縮応答に關与する Guanosine-3,5-tetraphosphate (ppGpp) に対する加水分解活性を解析した結果、細胞質局在型 AtNUDX11, 25, ミトコンドリア局在型 AtNUDX15 および葉緑体局在型 AtNUDX26 が、ppGpp の 3' および 5' 位における 2 リン酸結合を加水分解し、最終産物として Guanosine 3', 5' -bisphosphate (pGp) を生成した。特に、AtNUDX26 の ppGpp に対する V_{max} 値および k_{cat}/K_m は他の AtNUDX と比較して最も高い値を示した。そこで、ppGpp 代謝と AtNUDX26 の関係を明らかにするため、AtNUDX26 および ppGpp 代謝関連酵素遺伝子群 (AtRSHs) のストレス応答性を検討した。その結果、乾燥条件下において、AtNUDX26 および AtRSHs の発現レベルの増加が認められた。これらの結果から、AtNUDX26 はストレス下における葉緑体内 ppGpp レベルの制御に AtRSHs と協調的に機能していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 30 件)

Yoshimura, K., Nakane, T., Kume, S., Shiomi, Y., Maruta, T., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Transient expression analysis reveals importance of the VTC2 expression level in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in Arabidopsis. Biosci.Biotechnol. Biochem. 査読有、in press

Maruta, T., Noshi, M., Nakamura, M., Matsuda S., Tamoi, M., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Ferulic acid 5-hydroxylase 1 is essential for expression of anthocyanin biosynthesis-associated genes and anthocyanin accumulation under photooxidative stress in Arabidopsis. Plant Sci. 査読有、219-220、2014、61-68 DOI:10.1016/j.plantsci.2014.01.003

吉村和也、伊藤大輔、丸田隆典、重岡 成 Nudix hydrolase ファミリーによるビタミン補酵素型の代謝制御 ビタミン、査読無、87、2013、1-12 URL:<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cr9vitam/2013/008701/001&name=0001-0012j&UserID=163>. 51.106.144

Ito, D., Kato, T., Maruta, T., Tamoi, M., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. Enzymatic and molecular characterization of Arabidopsis ppGpp pyrophosphohydrolase, AtNUDX26. Biosci.Biotechnol. Biochem. 査読有、76、2012、2236-2241 DOI:10.1271/bbb.120523

Maruta, T., Inoue, T., Noshi, M., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 protects organelles against oxidative stress by wounding- and jasmonate-induced H2O2 in Arabidopsis plants. Biochimica Biophysica Acta. 査読有、1820、2012、1901-1907 DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.08.003

Maruta, T., Yoshimoto, T., Ito, D., Ogawa, T., Tamoi, M., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. An Arabidopsis FAD pyrophosphohydrolase, AtNUDX23, is involved in the flavin homeostasis. Plant Cell Physiology 査読有、53、2012、1106-1116 DOI: 10.1093/pcp/pcs054

Maruta, T., Noshi, M., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. H2O2-triggered retrograde signaling from chloroplasts to nucleus plays a specific role in the response to stress. J. Biol. Chem. 査読有、287、2012、11717-11729 DOI: 10.1074/jbc.M111.292847

Ito, D., Yoshimura, K., Ishikawa, K., Ogawa, T., Maruta, T., and Shigeoka S. A Comparative analysis of molecular

characteristics of Arabidopsis CoA pyrophosphohydrolases, AtNUDX11, 15, and 15a. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有、76、2012、139-147

DOI: 10.1271/bbb.110636

Maruta, T., Inoue, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Arabidopsis NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. Plant Science 査読有、180、2011、655-660
DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.01.014

Foyer, CH. and Shigeoka, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions in order to enhance photosynthesis. Plant Physiology 査読有、155、2011、93-100

DOI: 10.1104/pp.110.166181

Ishikawa, K., Yoshimura, K., Ogawa, T. and Shigeoka, S. Distinct regulation of Arabidopsis ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolases, AtNUDX6 and 7, in biotic and abiotic stress responses. Plant Signal. Behav. 査読有、72、2010、839-841

DOI: 10.1104/pp.109.140442

Ishikawa, K., Yoshimura, K., Harada, K., Fukusaki, E., Ogawa, T., Tamoi, M. and Shigeoka, S. AtNUDX6, an ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase in Arabidopsis, positively regulates NPR1 dependent salicylic acid signaling. Plant Physiology 査読有、152、2010、2000-2012
DOI: 10.1104/pp.110.153569

Maruta, T., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual Role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. Plant Cell Physiology 査読有、51、2010、190-200

DOI: 10.1093/pcp/pcp177

吉村和也、石川和也、重岡 成 高等植物における Nudix hydrolase ファミリーの多様な生理機能 -ヌクレオシド2-リン酸類縁体の代謝を介した細胞応答制御 化学と生物 査読無 48、2010、305-308

URL: http://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/48/5/48_5_305/_article/-char/ja/

〔学会発表〕(計 106 件)

丸田隆典、葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) はストレス / ホルモン応答のバランス制御に関与する、第 55 回日本植物生理学会年回、2014.3.18、富山

村本亘平、Nudix hydrolase (AtNUDX6 および 7) による細胞内 NADH 代謝を介した遺伝子

発現制御、日本分子生物学会、2013.12.3、兵庫

吉村和也、FAD 加水分解酵素による植物フラビン代謝の制御機構、第 54 回日本植物生理学会年会シンポジウム、2013.3.21、岡山

辻村昌希、葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) による NADPH ステータス変化を介したストレス/ホルモン応答の制御、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013.3.25、宮城
重岡 成、レドックス制御を介した環境ストレス応答と分子育種、第 30 回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム (招待講演) 2012.8.3、奈良

吉村和也、シロイヌナズナ葉緑体型 Nudix hydrolase (AtNUDX19) による NADPH 代謝を介した強光ストレス応答機構、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012.3.23、京都

丸田隆典、H₂O₂ signaling from chloroplasts to nucleus plays a specific role in the response to stress.、10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants、2011.7.8、ハンガリー

吉村和也、NADPH加水分解酵素 (AtNUDX19) が光環境順応制御に果たす役割、日本ビタミン学会第63回大会、2011.6.4、広島

吉村和也、葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) の植物ホルモンを介したストレス応答への関与、第 52 回日本植物生理学会年回、2011.3.21、宮城

吉村和也、シロイヌナズナ Nudix hydrolase, AtNUDX6, による全身獲得抵抗性の制御、日本植物学会第 74 回大会、2010.9.10、愛知

〔図書〕(計 1 件)

吉村和也、朝倉書店、ビタミン総合事典 5-2-3 植物におけるパントテン酸の生合成、2010、272-275

〔その他〕

ホームページ等

近畿大学農学部バイオサイエンス学科植物分子生理学研究室ホームページ

<http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/06bio/syokubun/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重岡 成 (SHIGEOKA SHIGERU)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：80140341

(2) 研究分担者

吉村 和也 (YOSHIMURA KAZUYA)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：90379561