

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14679

研究課題名(和文) 種子発芽誘導に關与するNOシグナル伝達物質の検索

研究課題名(英文) Search for signal transducer on mitigation of thermoinhibition of germination in lettuce seed by nitric oxide

研究代表者

山田 直隆 (YAMADA, Naotaka)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：20304769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)に、環境ストレス下における植物の機能抑制を軽減する作用が知られていましたが、その作用メカニズムについては不明でした。本研究では、NOの高温発芽阻害の軽減作用のメカニズムを調査しました。33℃高温時のレタス種子発芽阻害が、様々なNO発生誘導剤処理により打ち消されることを確認し、この時NOが種子内に8-ニトロcGMPの生成を誘導し、この物質がアブシジン酸の代謝を促進し発芽を誘発させていることを見出しました。8-ニトロcGMPがNOのシグナルを細胞内で伝達する役割を担っていることを推測でき、本成果がストレス条件下での植物の機能向上技術の開発につながるものと期待されます。

研究成果の概要(英文)：It was known that nitric oxide (NO) improve plant functional decline under environmental stress, but the mechanism of action remain unclear. In this subject, we investigated the preventive mechanism of thermoinhibition at 33 °C on lettuce seed germination by the application of NO. The results presented in this study show that the NO induced the synthesis of 8-nitro-cGMP in seeds in the presence of reactive oxygen species, and 8-Nitro-cGMP triggered the germination of lettuce seed at high temperature. This study therefore showed that 8-nitro-cGMP acts as a signaling molecule on germination and that a NO/8-nitro-cGMP signaling cascade operates in seed at high temperature.

研究分野：生物有機化学

キーワード：植物 発芽 高温ストレス 8-ニトロcGMP アブシジン酸

1. 研究開始当初の背景

環境の変化を細胞内に伝えるため、様々な化合物が関係しているが、その中で現在注目を集めているのが活性酸素と一酸化窒素 (NO) である。特に、ガス状分子の NO が、植物の様々な環境ストレス下の機能抑制に対し軽減作用を示すことが、近年、報告されつつあるが、その作用メカニズムについては不明であった。植物の種子発芽過程において一酸化窒素 (NO) が重要な機能を果たすことが報告されており、種子の吸水によって生成する NO が、アブシジン酸 (ABA) 代謝酵素の遺伝子 (CYP707A2) の発現を誘導し種子内の ABA 量を低下し、ABA による発芽阻害が抑制され発芽誘導が生じる機構が考えられていた (Frontiers in Plant Science, 2013, 4, 346)。しかしながら、NO の直接的なターゲット分子種は未解明のままであった。

近年、Yao Ten ら (J. plant physiol., 2010, 167, 885-899) によって、環状グアノシンリン酸 (cGMP) 処理したシロイヌナズナ種子で、アブシジン酸 (ABA) の分解が促進し発芽が促進されることが報告されていた。一方、我々の研究グループは、植物の表皮細胞において活性酸素種 (ROS) と NO により cGMP の環状 8-ニトログアノシンリン酸 (8-NO₂-cGMP) への変換が生じ、生じた 8-NO₂-cGMP が気孔閉鎖を誘導することを見出していた (The Plant Cell, 2013, 25(2) 558-571)。哺乳類では、活性酸素種 (ROS) と NO により生成する活性窒素種 (RNS) が 8-NO₂-cGMP の生成に関与し、生じた 8-NO₂-cGMP が感染・炎症はじめとする広範な生理現象のシグナル物質として作用することが明らかであったが (Nature Rev. Mol. Cell Biol., 2007, 8, 813-824)、植物で初めて NO により誘導合成される 8-NO₂-cGMP を単離・同定 (数 pmoles/g fr wt) に成功し、これが気孔閉鎖に係る NO シグナルの二次メッセンジャーであることを証明した。

以上のことから、NO の関与が考えられる種子発芽においても、表皮 (孔辺) 細胞と同じく cGMP のニトロ化により 8-NO₂-cGMP が生成し、これが NO の直接的な伝達物質として発芽誘導に関与していることが十分に予想された。

2. 研究の目的

本研究では、植物の環境ストレス下の機能抑制現象としてレタス種子の高温時発芽阻害に着目し、NO の高温時発芽阻害の軽減作用における 8-NO₂-cGMP の機能を調査することで、NO の情報伝達因子の探索と NO の作用機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

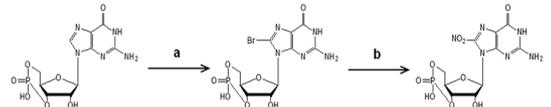
NO の作用に影響を及ぼすことが知られている様々な生理活性物質を用いた生理学的手法により、NO のレタス高温発芽阻害の軽減作用の特性を調べるとともに、NO 発生時の種子内の 8-NO₂-cGMP の検出および、8-NO₂-cGMP 自体の高温発芽阻害の軽減作用を検討し、NO の情報伝達因子としての可能性を調べ、レタスの高温発芽阻害軽減における NO 作用機構の解明を行った。また、高温発芽阻害と関係がある ABA と NO 処理との関係についても調べた。実際の実験方法は、以下の (1) ~ (4) に示す。

(1) 発芽試験試験

シャーレ (径 6 cm) を使い、レタス (Lactuca sativa L cv. green wave; タキイ種苗株) 種子をろ紙上に 50 粒ずつ播種し、3 ml の NO 発生剤などの薬剤を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) 中で、33 (± 0.5) °C・日長 12hr の光照射下にて培養し、経過時間毎の発芽数を観測した。実験は 8 連で行い、その平均から発芽率を算出した。

(2) 8-NO₂-cGMP の調製

Scheme 1 に示す方法で、cGMP より 2 段階の反応にて 8-NO₂-cGMP を合成した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製し、生物検定に用いた。



Reagents and condition: (a) NBS: N-bromosuccinimide, H₂O-CH₃CN (2:1), 0°C, 1hr
(b) 0.5M NaNO₂, 0.05M HCl aq. / DMSO, 50°C, 3days

Scheme 1 8-NO₂-cGMP の合成方法

(3) 種子中の 8-NO₂-cGMP の検出と同定

8-NO₂-cGMP の抽出と分析は、Honda らの方法 (The Plant Cell, 2013, 25(2) 558-571) に従った。NO 発生剤であるニトロプルシドナトリウム (SNP) と 1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-ethyl-2-aminoethyl)-3-ethyl-1-triazene (NOC12) を、それぞれ 200 μM 処理し 33 °C で 2 時間培養したレタス種子 5 g を、液体窒素で冷却下乳鉢にて破砕し、2% acetic acid : ethanol = 1:3 溶液にて浸漬し 8-NO₂-cGMP を抽出 (3 回) した。抽出液を減圧濃縮し、得られた残渣を OASIS WAX SPE columns (Waters 製) を用いて、以下の方法で精製した。

抽出・精製で得られた分析サンプルを、以下の方法に従い逆相 HPLC にてさらに分画し、それぞれの分画濃縮液を以下の条件にて LCMS-IT-TOF (島津社製) を用い分析した。

SPE columns による精製方法

残渣をチャージしたカラムを、2 mL の 2%(v/v) acetic acid/water と 2 mL の

methanol で洗い流した後, 2 mL の 5% (v/v) NH₄OH/methanol で溶出し, 減圧濃縮後, 1%ギ酸水溶液に溶解し HPLC 分析溶液とした。

HPLC 分取条件

- ・カラム: Mightysil RP-18 column (250 x 4.6 i.d.; Kanto chemical)
- ・カラム温度: 40 °C
- ・移動相: グラジエント溶離
A: 0.1% (v/v) ギ酸 水溶液
B: 0.1% (v/v) ギ酸 メタノール溶液 (0-3min B:5%; 3-9min B:5-100%; 9-20 min B: 100 %.)
- ・流速: 1.0 ml/min.
- ・検出: UV absorption (395nm)

LC - MS/MS 分析条件

- ・カラム: CAPCELL PAK C18 column (150 x3.0 mm i.d.; Shiseido Fine Chemicals)
- ・カラム温度: 40 °C
- ・移動相: グラジエント溶離
A: 0.1% (v/v) ギ酸 水溶液
B: 0.1% (v/v) ギ酸 メタノール溶液 (0-1 min B:5%, 1-6 min B:5-100%, 6-20 min B: 100 %)
- ・流速: 0.2ml/min.
- ・イオン化: ESI negative mode,
- ・ネプライザーガス流量: 1.5mL/min
- ・コリジョン(CID)エネルギー: 100%
- ・CID 温度: 300 °C

(4) ABA の定量

ABA の定量は, Rong Zhou らの方法 (Journal of Chromatography A, 2003, 75-85) に従って行った。培養したレタス種子 3000 粒を凍結乾燥した後, 10mM MES-KOH バッファー (pH6.8) に懸濁し, ピーズ破砕法にて 15 秒間 (x 4 回) 破砕した。破砕液を遠心分離後, 上澄みを減圧濃縮し, 得られた残渣を, 以下の の方法で OASIS HLB SPE columns (Waters 社製) を用いて精製した。

濃縮残渣を, の条件にて LCMS-8050 (Shimadzu 社.) を用いて分析し, ABA を定量した。なお, 定量には内部標準物質として, 市販の ABA と重水 (D₂O), 重水酸化ナトリウム (NaOD) から合成した D6-ABA を用い, 内部標準法にて ABA 量を算出した。

SPE columns による精製方法

残渣をチャージしたカラムを, 1 mL の MeOH : H₂O : acetic acid = MeOH : H₂O : acetic acid = 10:89:1 溶液で洗い流した後, 1 mL の MeOH : H₂O : acetic acid = 80:19:1 溶液で溶出し, 減圧濃縮後, メタノールに溶解し LC-MS 分析溶液とした。

LC - MS/MS 分析条件

- ・カラム: CAPCELL PAK C18 column (150 x3.0 mm i.d.; Shiseido Fine Chemicals)
- ・カラム温度: 40 °C
- ・移動相: グラジエント溶離
A: 12 mM 酢酸水溶液
B: Acetonitrile-water(95:5) (0-1 min B:15%, 1-10 min B:15-33%, 10-16.7 min B:33-100%, 16.7-22 min B: 100 %)
- ・流速: 0.2ml/min.
- ・MS イオン化: ESI positive mode,
- ・ネプライザーガス流量: 1.5mL/min
- ・CID 電圧: 15V
- ・CID 温度: 250 °C

4. 研究成果

(1) NO の高温発芽阻害軽減作用の検討

様々な NO 発生剤のレタス種子高温発芽阻害への影響について検討し, SNP や NOC12 などの代表的な NO 発生剤だけでなく S-Nitrosoglutathione などでも高温時の発芽の軽減作用が確認できた (Fig.1 a, b, c)。S-Nitrosoglutathione 処理時の NO 発生には, 触媒となる二価の銅イオンや鉄イオンが必要であることから, 発生した NO が種子内に浸透した場合だけでなく, 種子内で NO が発生する場合でも, 発芽が誘導されることが明らかとなった。また, SNP の活性が, NO の酸化消去剤である Sodium 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO) で打ち消されたことから, NO 発生剤が変化した副産物でなく, 発生する NO が発芽誘導物質の本体であることが確認できた (Fig.1 d)。

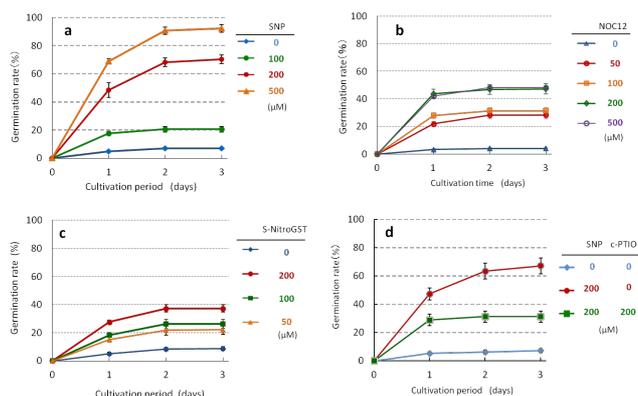


Fig.1 一酸化窒素発生剤のレタス高温(33°C)種子発芽誘導とNO吸収剤(c-PTIO)の影響
a) Sodium nitroprusside-dihydrate (SNP), b) 1-Hydroxy-2-nitro-3-(4-ethyl-2-aminomethyl-9-ethyl-1-triazene) (NOC12)
c) S-Nitrosoglutathione (S-NitroGST),
d) SNP + Sodium 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO)

(2) 高温時の NO による発芽誘導における cGMP と, 活性酸素種の機能解明

NO は様々な細胞で NO 感受性グアニリルシクラーゼ (NO-GC) を活性化し, cGMP 産生を誘発するが, NO-GC の特異的な阻害剤の 1H-[1,2,4]-Oxadiazole [4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) の添加に

よって NO による高温時の発芽誘導の阻害が観察され、cGMP の添加によってこの阻害が回復し発芽が誘導された。実際に高温レタス種子において、NO が NO-GC を誘導するかどうかは不明であるが cGMP が NO の高温時発芽誘導において重要な因子であることが明らかとなった。

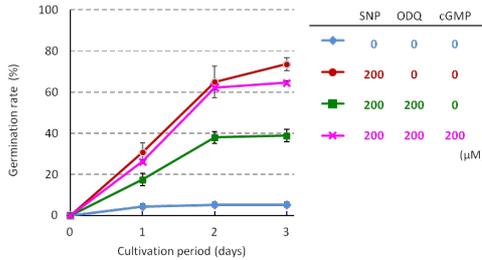


Fig. 2 一酸化窒素のレタス高温 (33°C) 種子発芽誘導に及ぼす guanylate cyclase inhibitor (ODQ) の影響

一方 NO による高温時の発芽誘導は、抗酸化作用物質のアスコルビン酸や、スーパーオキシド消去剤である 1,2-dihydroxy-3,5-benzenedisulfonic acid (tiron), 過酸化水素の分解を触媒するカタラーゼにより抑制された (Fig.3) 以上より、ROS が NO の効果発現に重要な役割を果たすことが判明した。

NO は ROS と反応し、より反応性の高い活性窒素種 (NOS) が生じる。そこで、peroxynitrite (ONOO⁻) 発生剤 3-(4-morpholinyl)sydnone imine hydrochloride (SIN-1) の作用を検討したところ、NO 発生剤処理時と同じく高温時の発芽誘導作用を示し、NO と活性酸素種と反応し生成する ONOO⁻ が、高温時の発芽誘導の情報伝達物質であることが明らかとなった。

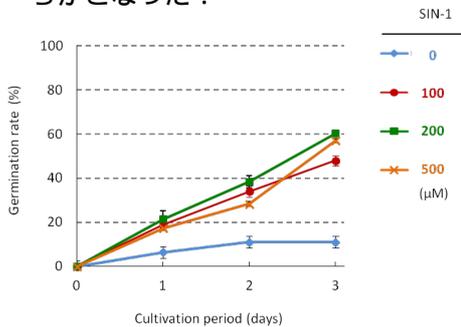


Fig. 4 peroxynitrite (ONOO⁻) 発生剤 (SIN-1) のレタス高温 (33°C) 種子発芽阻害に及ぼす影響

(3) NO 処理されたレタス種子中の 8-NO₂-cGMP の検出と、8-NO₂-cGMP の高温時発芽誘導活性

NO の高温時種子発芽誘導には、cGMP と ONOO⁻ が関与していることが明らかとなり、8-NO₂-cGMP がレタス種子内で生じている可能性があったので、LC-MS/MS を用いた MRM 法にて 8-NO₂-cGMP の検出を行った。

その結果、SNP および NOC18 をそれぞれ 200 μM の濃度で 2 時間培養したレタス種子の抽出液中に、authentic な 8-NO₂-cGMP と同じ保持時間に、m/z 389.03 の [M-H]⁻ のプレカーサイオンと、それぞれ m/z 291.06, m/z 195.03 のプロダクトイオンが観察された (Fig.5)。無処理の場合では 8-NO₂-cGMP のピークは検出されなかったことから、NO は、高温時下でレタス種子内に 8-NO₂-cGMP を生成誘導させていることが明らかとなった。これまで、植物では表皮細胞だけにしか 8-NO₂-cGMP は検出されていなかったが、本課題で初めて種子内で 8-NO₂-cGMP が生成を確認することに成功した。

さらに、合成した 8-NO₂-cGMP をレタス種子へ処理した場合でも、NO 発生剤処理と同様に高温時の発芽阻害は回避され発芽が誘導された。

これらの結果より、NO のレタス高温発芽阻害の軽減すなわち発芽誘導現象において、8-NO₂-cGMP が NO の二次メッセンジャーとしての役割を担っていることが明らかとなった。

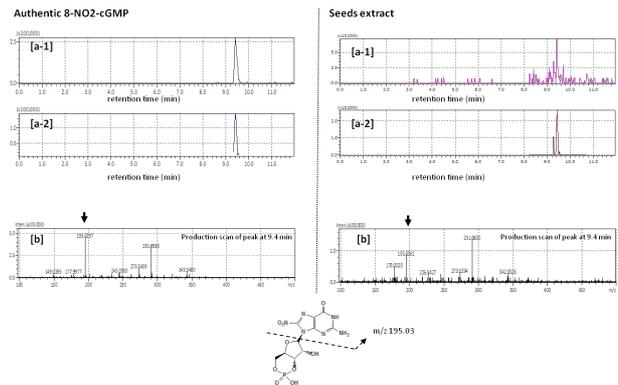


Fig. 5 LC-MS/MSによるNO処理されたレタス種子抽出物における8-Nitro-cGMPの同定

(A) Chromatogram showing detection of the precursor ion (m/z 389.03 [M-H]⁻); [a-1] and production ion (m/z 195.03 [M-H]⁻); [a-2]. (B) Negative ion tandem mass spectrometry (MS/MS) production ion (m/z 389.03 [M-H]⁻) spectra of 8-NO₂-cGMP.

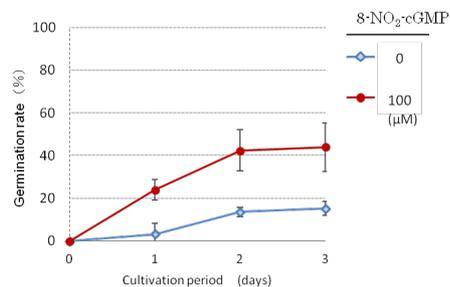


Fig. 6 レタス高温 (33°C) 種子発芽阻害に及ぼす 8-NO₂-cGMP の影響

(4) NOによる高温種子発芽誘導とABA代謝との関連性の解明

高温時のレタス種子内では、発芽阻害活性を示す ABA が代謝されず高濃度で存在することが報告されている。そこで NO 発生剤処理した高温下レタス種子内の ABA 含量を LC-MS/MS によって分析した。

その結果、200 μ M の SNP 処理した培養 12 時間後の種子の ABA 量は、無処理区より 50%以下に減少し、23 の通常温度で培養した場合と同程度であった (Fig.7)。

一方、SNP 処理による高温発芽誘導は、ABA 代謝阻害剤 paclobutrazole (PBZ) によって打ちけられたことが確認された。また、外性 ABA により通常条件 23 下で阻害されるレタス種子発芽が、SNP 処理により阻害低減されることを新たに見出した。

以上から考えると、NO による高温種子発芽阻害の軽減は、NO が ABA の代謝を促進し、高温時種子内の高濃度の ABA を減少させていることが示唆された。

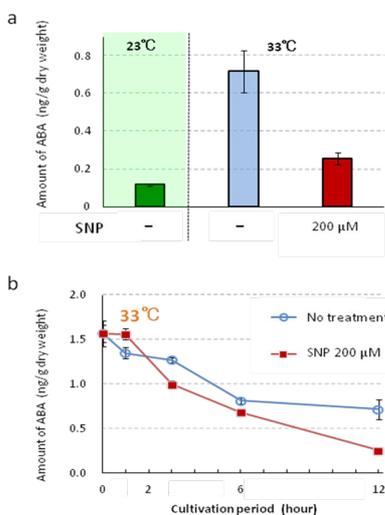


Fig. 7 一酸化窒素がレタス種子のABA含量に及ぼす影響

a) seeds cultivated on the medium containing SNP for 12 hr
b) seeds cultivated at 33°C

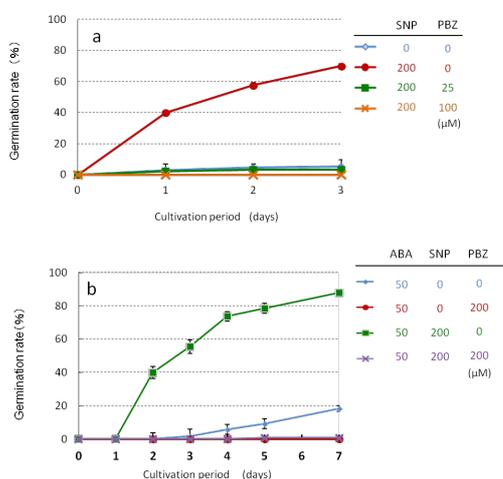
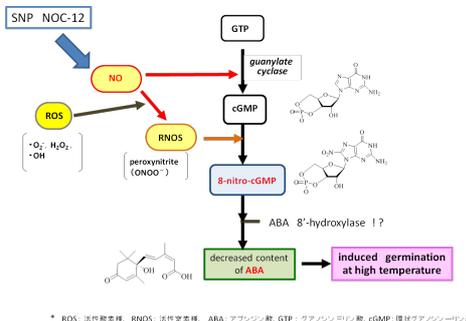


Fig. 8 一酸化窒素のレタス種子発芽誘導に及ぼすABA代謝阻害剤paclobutrazole(PBZ)の影響
a) 33°C, b) 23°C + ABA 50 μ M

(5) 結論

本研究にて、レタス種子の高温時発芽阻害が様々な NO 発生剤処理により軽減されることを確認し、この NO の発芽誘導において、NO と活性酸素種が種子内の cGMP をニトロ化することで 8-ニトロ cGMP が生成され、これが NO の発芽阻害抑制作用の二次メッセンジャーとして働くことを解明した。また、高温時、NO 発生剤処理によりレタス種子の ABA 含量が減少することを発見し、NO の発芽誘導がこの ABA 含量の低下に起因している事を明らかとした (Fig. 9)。本研究では、NO 発生剤で処理したレタス種子中に 8-ニトロ cGMP が存在することを初めて確認することができたので、今後、8-ニトロ cGMP 処理時の ABA 量の変化や ABA 代謝酵素の発現等を検討することで、NO の高温発芽誘における NO の情報伝達因子としての 8-NO₂-cGMP の詳細な機能が明らかとなり、種子発芽における NO の様々な作用機構の解明が期待できる。



* ROS: 活性酸素種, RNOS: 活性窒素種, ABA: アブシジン酸, GTP: グアニリル三リン酸, cGMP: 環状グアニリル三リン酸

Fig. 9 本研究の結果から予想されるNOによるレタス高温種子発芽阻害の軽減作用におけるシグナルカスケード

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

「一酸化窒素によるレタス種子高温発芽阻害の低減作用」山田直隆, 大村亮太, 岩井純夫, 日本農薬学会第42回大会, 2017.03.07, 愛媛大学(松山市)

「一酸化窒素が高温時の種子発芽阻害に及ぼす影響」, 山田直隆, 大村亮太, 岩井純夫, 2016年度日本農芸化学会西日本支部大会, 2016.9.16, 長崎大学(長崎市)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・山田直隆(YAMADA Naotaka)
九州大学・農学研究院・助教
研究者番号: 20304769

(4) 研究協力者

・岩井純夫(IWAI Sumio)
鹿児島大学・農学部
・大村亮太(OMURA Ryouta)
九州大学・生物資源環境科学府