

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14705

研究課題名(和文) ポリアミン分解経路の制御によるストレス耐性植物の作出とその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Production of abiotic stress-tolerant plants through the regulation of polyamine catabolic pathway and exploration of its molecular basis

研究代表者

草野 友延 (Kusano, Tomonobu)

東北大学・生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：40186383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリアミン分解とストレス応答との関連性については解析がなされてこなかった。本研究では、シロイヌナズナに5つ存在するポリアミン酸化酵素遺伝子の機能欠失変異体を用いて塩ストレス応答を調べた。単一遺伝子欠失変異体は、野生型と同程度の感受性を示した。次に、二重欠失変異体を調べたところ細胞質局在型酵素の欠失変異体が塩ストレスに耐性となることを見出した。この変異体では、野生型に比べ塩処理による活性酸素種の産生が抑制されていた、しかし一方、防御遺伝子群の発現は亢進されていた。本研究成果は、ストレス耐性植物を作出する新たな戦略を提示したと言える。

研究成果の概要(英文)：The link between polyamine oxidases and stress responses remains elusive. This issue was addressed using Arabidopsis polyamine oxidase (pao) mutants. The five single pao mutants and wild type showed similar response to salt stress. Then two double pao mutants were generated by crossing, and tested the salt stress response. The pao mutant which showed the reduced cytoplasmic polyamine oxidase activity became high salt- and drought-tolerant compared to wild type plant. Upon salt stress this mutant produced less amount of reactive oxygen species and induced the genes of salt overly sensitive-, ABA-dependent- and ABA-independent pathways. The results suggest that the Arabidopsis plant silencing cytoplasmic polyamine oxidase genes shows salinity tolerance by reducing ROS production and inducing subsets of stress-responsive genes.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物 ポリアミン ポリアミン酸化酵素 分解制御 ストレス耐性 活性酸素種 ストレス防御遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは、アミノ基が2つ以上含まれる脂肪族化合物の総称である。植物の主要ポリアミンは、ジアミンのプトレシン、トリアミンのスペルミジン、そしてテトラミンのスペルミンとその異性体であるサーモスペルミンである。これらの合成経路については、2007年に植物に2つあると考えられてきたスペルミン合成酵素遺伝子の一方がサーモスペルミン合成酵素遺伝子であることが明らかになり、その全容が確立された。ポリアミンの分解経路については、銅を含むアミン酸化酵素(CuAO)とFADを補酵素として要求するポリアミン酸化酵素(PAO)が関与することが知られている。モデル植物の一つであるシロイヌナズナでは、10個のCuAO遺伝子と5個のPAO遺伝子が存在することがゲノム解析から予測され、前者の1つ及び後者の4つについては本研究開始当初までに特徴づけがなされていた。本研究で着目したシロイヌナズナPAOをAtPAO1~AtPAO5と呼称する。AtPAO1は、細胞質局在型の酵素をコードしていた。AtPAO2、AtPAO3そしてAtPAO4は基質特異性は異なるもののいずれもパーオキシゾームに局在していた。残されたAtPAO5については、本研究開始直後にイタリアのグループと代表者のグループが相次いで細胞質局在型の酵素であることを公表した。代表者らの研究成果の新規性は、AtPAO5酵素がサーモスペルミンを基質として最も好むこと、AtPAO5遺伝子の機能が欠損した変異体は野生型に比べ初期生育に大きな差異が見られないものの栄養成長から繁殖成長への移行が大きく遅れること、等を明らかにした点にある(Kim et al., *Plant Physiology* 2015)。代表者らは、イネに存在する7つのPAOについても既に5つについて研究開始当初までに、それぞれ特徴付けを行い公表した(Ono et al., *Amino Acid* 2012; Liu et al., *Plant Cell Physiol* 2014; Liu et al., *Plant Cell Reports* 2014)。

上述のように、ポリアミン分解系に関与するPAO酵素に関する知見は2つのモデル植物でようやく全体像理解がなされようとしていた。

2. 研究の目的

ポリアミンは、植物の伸長あるいは分化といった成長過程へ関与することがよく知られている。また、環境因子が変動したときにもポリアミン合成酵素遺伝子が応答することより環境ストレス時にも機能することが知られている。しかし、ポリアミン分解経路と環境ストレス応答との関連性については全く研究がなされていなかった。従って、本研究では、シロイヌナズナの5つのPAO遺伝子の機能欠失変異体を用いて両者の関係性に迫ろうと考えた。さらに、環境ストレス耐性を示す植物系統における耐性の分子基盤を明らかにすることも本研究の目的とし

た。

3. 研究の方法

- (1) AtPAO機能欠失変異体の取得・同定
オハイオ州立大にある Arabidopsis Biological Research Center より各 AtPAO 遺伝子に T-DNA が挿入されている株を入手した。遺伝子発現がほぼ起こっていない系統あるいは発現が大幅に低下している系統を選抜し、以下 pao1、pao2、pao3、pao4 そして pao5 と呼称する。
- (2) 使用したポリアミン
プトレシン、スペルミジンおよびスペルミンは東京化成、もしくは和光純薬製のものをを用いた。サーモスペルミンは城西大学・薬学部の新津教授が合成されたものをご分与いただいた。
- (3) 遺伝子発現解析
定量的 RT-PCR 解析は、Applied Biosystems 社の real-time RT-PCR 解析マシンを用いて行った。
- (4) 塩ストレスおよび乾燥ストレス処理
塩ストレス処理：野生株と AtPAO 機能欠失変異体の種子を滅菌処理後、0~100mM NaCl を含む MS 培地に播種し2週間成長させた後の根の伸長を測定した。乾燥処理：野生株と AtPAO 機能欠失変異体の種子を土に播種し2週間、週に1度50 mL の水を与えて成長させた。その後、それぞれを2群に分け、一方をこれまでと同様に週に1度給水を行い、他方には水を全く与えずに成長させ2週間後の生育を観察した。
- (5) 二重変異体の作成
pao1 と pao5、pao2 と pao4 の二重機能欠失変異体をそれぞれの交配により作成した。
- (6) 水分消失検定
本検定は Weigel and Glazebrook (2002) に述べられた方法によって行った。
- (7) Na および K 濃度の測定
2週間生育させた幼植物を塩処理し、十分に水洗いした後65℃で2日間乾燥させた。乾燥した試料を硝酸で処理し、ろ過液を ICP 分光光度計で測定を行った。
- (8) ポリアミン酸化酵素活性
上記活性は、Liu and Liu (2004) に述べられた手法に準じて測定した。
- (9) 活性酸素種の測定
過酸化水素量の測定：Messner and Boll (1994) の手法に準じて測定した。スーパーオキシド量の測定：Doke (1983) に述べられたようにニトロブルーテトラゾリウム(NBT)還元能に基づき測定した。In situ 染色法：NBT とジアミノベンチジンをを用いた組織染色法によりスーパーオキシドと過酸化水素量の植物体内の分布を調べた。
- (10) 高速液体クロマトグラム法によるポリアミン分析
植物体からのポリアミン抽出、ベンゾイ

ル誘導体化、そして高速液体クロマトグラム法は、Naka et al. (2010)および Sagor et al. (2015)に述べた方法に準じて行った。

4. 研究成果

既述したようにシロイヌナズナ植物には5つのPAO遺伝子が存在している。5つの単一PAO遺伝子欠失変異体と野生株の間には、明瞭な塩ストレスに対する感受性の差が見られなかった。そこで、次に二重機能欠失変異体の作成を行った。その際、遺伝子がコードする酵素の細胞内局在性を考慮した。AtPAO1とAtPAO5は細胞質に、他の三者はパーオキシゾームに局在していたことより、pao1pao5そしてpao2pao4の2つの二重変異体を得た。因みに、後者についてはpao2pao3pao4の三重変異体の作成も試みたが成功していない。興味深いことに、pao1pao5は野生型に比べ、塩ストレスに対しても乾燥ストレスに対しても耐性となっていた。一方、pao2pao4は野生型とほぼ同程度の塩ストレス、乾燥ストレス感受性を示した。pao1pao5がストレス耐性となった分子基盤を明らかにするために、種々の解析を行ったところ、この二重変異体では野生株に比べNa含量が野生株の75%であったこと、PAO活性は野生株の約62%に低下していること、塩ストレス後の過酸化水素量及びスーパーオキシド量が野生株の81%そして72%レベルに低下していることを明らかにした。さらには、塩ストレス時に機能することが知られているSOS(salt overly sensitive)経路、ABA依存のおよびABA非依存の防御経路の多くの遺伝子群の発現が昂進している事実を明らかにした。上記の結果は、細胞質局在型のポリアミン分解経路の活性抑制が塩ストレス時の活性酸素種の産生を抑え、同時に一群のストレス時の防御遺伝子群の発現を高めることで、宿主植物をストレスから保護することを可能にすることを示した。

本研究成果は、ポリアミン酸化酵素遺伝子発現の制御による新たなストレス耐性植物作出の戦術の可能性を提示したことになる。

この間、Selaginella植物におけるシロイヌナズナにおけるPAO5と同じ分子系統樹に属するPAO遺伝子の単離と酵素の特徴づけを行い公表した(Sagor et al. 2015)。また、イネのOsPAO6 cDNAの公知情報に大きな誤りがあることを明らかにした。さらにイネ植物における7種のPAO遺伝子の種々の条件下での発現変動についても解析を行った(論文投稿準備中)。

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2件)

1. Sagor GHM, Inoue M, Kim DW, Kojima S,

Niitsu M, Berberich T, Kusano T (2015) The polyamine oxidase from lycophyte *Selaginella lepidophylla* (SelPAO5), unlike that of angiosperms, back-converts thermospermine to norspermidine. *FEBS Letters* 589: 3071-3078. 査読あり

2. Sagor GHM, Zhang S, Kojima S, Simm S, Berberich T, Kusano T (2016) Reducing cytoplasmic polyamine oxidase activity in *Arabidopsis* increases salt and drought tolerance by reducing reactive oxygen species production and increasing defense gene expression. *Frontiers in Plant Science* 7: 214. 査読あり

[学会発表](計5件)

1. Sagor GHM, 井上雅貴, Kim DW, 兎島征司, 新津勝, Berberich T, 草野友延: Selaginella 由来クレード III のポリアミン酸化酵素の特徴づけ 日本ポリアミン学会第7回年会 京都工芸繊維大学 京都府京都市 2015年11月13日 14日
2. Sagor GHM, Zhang S, 兎島征司, Berberich T, 草野友延: シロイヌナズナにおける非生物ストレスに対するポリアミン酸化酵素の役割 日本ポリアミン学会第7回年会 京都工芸繊維大学 京都府京都市 2015年11月13日 14日
3. Sagor GHM, Zhang S, Kojima S, Berberich T, Kusano T: Reducing cytoplasmic polyamine oxidase activity in *Arabidopsis* increases salt and drought tolerance by reducing reactive oxygen species production and increasing defense gene expression. Tohoku University-Russian Academy Joint Seminar. November 25, 2015, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University. 宮城県仙台市
4. Berberich T, Sagor GHM, Kojima S, Kusano T: Polyamine oxidases in the *Arabidopsis* to abiotic stresses in *Arabidopsis*. 日本植物学会 第80回大会 P-0462 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) 2016年9月16日 19日
5. 草野友延, Sagor GHM, 井上雅貴, 兎島征司, Berberich T: イネ OsPAO6 cDNA の同定と発現解析 日本ポリアミン学会第8回年会 千葉工業大学 (千葉県津田沼市) 2017年1月20日 21日

[図書](計2件)

1. Kusano T, Sagor GHM, Berberich T (2017) Chapter 2: Molecules for sensing polyamines and transducing their actions in plants. In Polyamines, a protocol series of Method in Molecular

- Biology (Edited by A. Ruben and A. Tiburcio) Springer in press
2. Berberich T, Sagor GHM, Kusano T (2017) Chapter 32: Abiotic stress phenotyping of polyamine mutants. In Polyamines, a protocol series of Method in Molecular Biology (Edited by A. Ruben and A. Tiburcio) Springer in press

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 草野 友延
東北大学・大学院生命科学研究科・名誉教授
研究者番号：40186383

(2)研究分担者 児島 征司
東北大学・学際フロンティア研究所・助教
研究者番号：20745111

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()