

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19208031

研究課題名(和文) 植物の環境ストレスによる酸化シグナリングの分子機構

研究課題名(英文) Molecular characterization of oxidative signaling pathway in plant response to environmental stress

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

研究成果の概要(和文)：

葉緑体由来の活性酸素種(ROS)に応答する遺伝子群を約800個同定し、それらの機能解析を行った。その結果、PSIIおよびPSS8と名付けた新規遺伝子が葉緑体由来のROSを介したストレス応答に重要であることを明らかにした。

また、植物の環境ストレス応答に重要である熱ショック転写因子(HsfA2)の誘導機構について解析し、HsfA2の発現はHsfA1dおよびHsfA1eに制御されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We identified approx. 800 genes responsive to reactive oxygen species (ROS) derived from chloroplasts. We found that two novel genes, named *PSII* and *PSS8*, are important for plant response to oxidative stress via ROS. Furthermore, the analysis of the expression of *heat shock transcription factor A2 (HsfA2)*, a key regulator for stress response, under environmental stress indicated that HsfA1d and HsfA1e regulate *HsfA2* expression in response to environmental stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
総計	29,600,000	8,880,000	38,480,000

研究分野：植物生理学

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, 環境ストレス, 抗酸化系, 葉緑体, 転写因子, シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

行動の自由を持たない植物は、日々の環境変化に応答(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。高等植物は酸素発生型の光合成を行うため、他生物に比べ細胞内酸素濃度が非常に高く(葉緑体の酸素濃度は水の酸素飽和濃度にほぼ等しい250 μM)、活性酸素種

(ROS)を容易に生成しやすい状況にある。また、種々の環境ストレス条件下では多量のROSを生成することも知られている。そのため植物は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)などの種々の消去系酵素を巧みに発現調節することによりROSによる酸化障害より身を守っている。ROSは植物細胞内で常に生成するが、様々な環境ストレス条件下においてROS生成が消去系を凌駕すると、酸化

的ストレスとなって細胞機能障害や細胞死を引き起こす。一方、植物細胞内で生成した ROS はシグナルとして作用（酸化シグナリング）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、細胞内の ROS レベルと酸化レベルとのバランス、すなわちレドックス状態を適切に維持することが、環境ストレス応答・耐性に重要であるとともに定常環境条件下における生理作用の発現にも不可欠であることを意味している。

## 2. 研究の目的

ROS を介したレドックス制御機構は現在最も注目されている研究分野の一つであり、多く研究グループが全容の解明に凌ぎを削っているのが現状である。しかし依然として、環境ストレス下での ROS の生成やそれによるレドックス変化を認知する分子機構については不明のままである。本研究では酸化シグナリングによるレドックス制御の初期イベントを明らかにすることを目標とし、(1) 葉緑体由来の酸化シグナリング機構の解析、(2) レドックス制御因子の一つである HsfA2 の発現誘導に関わる上流因子の同定を行う。

## 3. 研究の方法

### 1) 葉緑体由来の酸化シグナリング機構の解析

強力な ROS 発生源である葉緑体の主要な ROS 消去酵素である葉緑体型 APX (ストロマ型 APX およびチラコイド型 APX) の一過的抑制系を作成し、葉緑体型 APX の一過的な発現抑制による ROS レベルの上昇に伴う細胞応答をプロテオーム解析により同定を試みたが、顕著な違いを見つける事が困難であったため、マイクロアレイにより転写レベルで顕著に発現レベルが変化している遺伝子を探索した。次いで、それらの遺伝子破壊株を入手し、それらのストレス耐性を解析した。

2) HsfA2 の発現誘導に関わる上流因子の同定  
プロモーター解析により、HsfA2 の誘導に関与する *cis* エlement を同定し、その条件を元に HsfA2 の発現誘導に関与する転写因子を検索し、その遺伝子の遺伝子破壊株を用いて、HsfA2 の発現誘導に関わる上流因子の同定を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 葉緑体由来の酸化シグナリング機構の解析

tAPX の一過的抑制植物 (tAPX XR) の tAPX 抑制

に必要な十分なエストロゲン量および処理時間などについて検討した。その結果、300  $\mu$ M エストロゲン処理により、24 時間後には tAPX の転写レベルでの発現をほぼ完全に抑制できる事が明らかになった。このとき膜画分の APX 活性の顕著な低下を確認した。そこで、100  $\mu$ M エストロゲンを処理し、48 時間後の tAPX XR を用い、マイクロアレイ解析を行った。その結果、コントロール植物 (GUS XR) と比較し、tAPX XR では 365 個の遺伝子の発現が 2 倍以上に上昇し、409 個の発現が 1/2 以下に抑制されており、これらの遺伝子群を *Responsive to tAPX suppression (RTS)* 遺伝子群とした。RTS 遺伝子群には低温ストレス応答や耐病性に関与する遺伝子が数多く含まれており、葉緑体由来の ROS は生物学的および非生物学的ストレス応答に関与することが示された。さらに、多くのシグナリングに関与する遺伝子 (転写因子、タンパク質キナーゼ、タンパク質分解系) が RTS 遺伝子群に含まれていた。この中から、64 遺伝子の発現をリアルタイム PCR により詳細な解析を行ったところ、ほとんどの遺伝子の発現はマイクロアレイ解析の結果と一致していた。そこで、これらが葉緑体由来の酸化シグナリングの制御に関与する分子であると考え、これらの遺伝子破壊株を単離し、それらのパラコートによる光酸化的ストレスに対して感受性あるいは非感受性を示す変異株 (それぞれ *pss* および *psi*) の選抜を試みた。その結果、独立した 7 つの *psi* (*psi1*~7) 株および 8 つの *pss* (*pss8*) 株が得られた。興味深いことに、*psi1* および *pss8* はエリシター処理にも高感受性を示したことから、PSI1 および PSS8 は葉緑体由来の ROS を介したストレス応答のキーレギュレーターであることが示唆された。

2) HsfA2 の発現誘導に関わる上流因子の同定  
HsfA2 プロモーター 5' 側から徐々に欠失させた一連の 5' 欠失系列とルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子とを融合させたコンストラクトを作製し、一過的にシロイヌナズナへ導入し強光に対する Luc 活性の変動を解析した。その結果、334~79 bp 上流のプロモーター領域に HsfA2 発現の誘導に関与するシスエレメントが存在することが明らかとなった (図 1)。

この領域には Hsf の認識配列である HSE が存在したことから、HsfA2 の発現制御にはその他の Hsf が関与している事が示唆された。そこで、機能重複する転写因子に優先的に標的遺伝子の発現を抑制するキメラリプレッサー過剰発現株 (CRES-T 法) により HsfA2 の発現制御に関与する Hsf の検索を行ったところ、

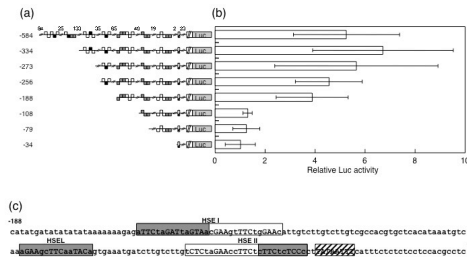


図 1 HsfA2 誘導に関与するシスエレメントの同定

HsfA1d および HsfA1e の CRES-T ラインで、HsfA2 の強光応答が顕著に抑制されていた。そこで HsfA1d および HsfA1e の二重遺伝子破壊株 (KO-HsfA1d/A1e) を作成し、HsfA2 の強光応答を解析したところ、HsfA2 の発現レベルは野生株と比較して顕著に低下していたことから、HsfA2 の強光応答に HsfA1d および HsfA1e が関与している事が明らかとなった。また HsfA2 の強光応答に関与する初期イベントを明らかにするため、HSP90 阻害剤 (ゲルダナマイシン:GDA) およびプロテアソーム阻害剤 (MG-132) に対する応答を解析した。その結果、両阻害剤処理により HsfA2 の発現は顕著に誘導され、その誘導に伴いポリユビキチン化タンパク質が蓄積することを見出した。また強光ストレスおよび酸化ストレスを引き起こすパラコート処理によってもポリユビキチン化タンパク質の蓄積が認められた。以上の結果より、通常条件下では HsfA1d および HsfA1e は HSP90 と結合し、不活性な状態となっているが、ストレス下では蓄積した変性タンパク質をプロテアソーム系で分解するため、HSP90 が HsfA1d および HsfA1e と解離し、その結果、フリーとなった HsfA1d および HsfA1e が核内に移行し、HsfA2 の誘導に機能している事が示唆された (図 2)。

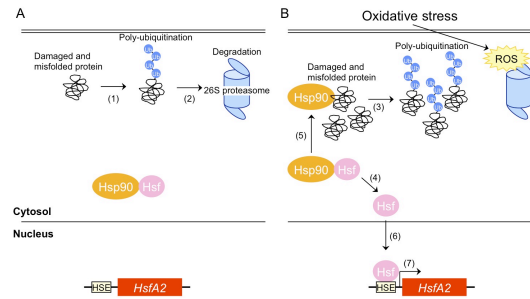


図 2 HsfA2 誘導に関わる分子機構

## 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] (18件)

- ① 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 Physiol.* 査読有、152, 2010 2000-2012
- ② Nishizawa-Yokoi, A., Tainaka, H., Yoshida, E., Tamoi, M., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. The 26S proteasome function and Hsp90 activity involved in the regulation of HsfA2 expression in response to oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 査読有、51, 2010 486-496
- ③ 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 Physiol.* 査読有、51, 2010 190-200
- ④ Morishita, T., Kojima, Y., Maruta, T., Nishizawa-Yokoi, A., Yabuta, Y. and

- Shigeoka, S. Arabidopsis NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoids biosynthesis under high-light. *Plant Cell Physiol.* 査読有、50, 2009 2210-2222
- ⑤ Yabuta, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Ono, K. and Shigeoka, S. Arabidopsis Sgt1a as an important factor for the acquirement of thermotolerance. *Plant Science* 査読有、177, 2009 676-681
- ⑥ Nishizawa-Yokoi, A., Yoshida, E., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. Analysis of the regulation of target genes by an Arabidopsis heat shock transcription factor, HsfA2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有、73, 2009 890-895
- ⑦ Maruta, T., Yonemitsu, M., Yabuta, Y., Tamoi, M., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Arabidopsis phosphomannose isomerase 1, but not phosphomannose isomerase 2, is essential for ascorbic acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 査読有、283, 2008 28842-28851
- ⑧ Yabuta, Y., Maruta, T., Nakamura, A., Mieda, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Conversion of L-galactono-1, 4-lactone to L-ascorbate is regulated by the photosynthetic electron transport chain in Arabidopsis. 査読有、*Biosci. Biotechnol. Biochem* 72, 2008 2598-2607
- ⑨ Nishizawa, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 査読有、147, 2008 1251-1263
- ⑩ Tanabe, N., Yoshimura, K., Kimura, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. Differential expression of alternatively spliced mRNAs of Arabidopsis SR protein homologues, atSR30 and atSR45a, in response to environmental stress. 査読有、*Plant Cell Physiol* 48, 2007 1036-1049
- [学会発表] (計 48 件)
- ① 野志昌弘、葉緑体由来の酸化的シグナリングによる環境ストレス応答の制御機構、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京大学 (東京)
- ② 泰中仁志、熱ショック転写因子 HsfA2 の Hsfs による発現制御機構の解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京大学 (東京)
- ③ 西澤(横井)彩子、熱ショック転写因子 HsfA2 の酸化的ストレス応答を制御するシス配列と制御因子の同定、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 20 日、熊本大学 (熊本)
- ④ 丸田隆典、アスコルビン酸ペルオキシダーゼは葉緑体レドックス状態と環境ストレス応答のクロストークに関与する、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 20 日、熊本大学 (熊本)
- ⑤ 重岡成、葉緑体レドックス制御による環境ストレス応答の分子機構、2009 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同沖縄大会、2009 年 10 月 31 日、琉球大学 (沖縄)
- ⑥ 藪田行哲、シロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA2 を介したストレス応答機構、第 50 回日本生化学会中国・四国支部例会、2009 年 5 月 15 日、とりぎん文化会館 (鳥取)
- ⑦ 西澤彩子、熱ショック転写因子 HsfA2 のストレス応答性発現を制御するシグナル伝達機構の解析、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会 (合同大会)、2008 年 12 月 12 日、神戸ポートアイランド (兵庫)
- ⑧ 西澤彩子、シロイヌナズナ HsfA2 のストレス応答を制御するシグナル伝達経路の解明、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 27 日、名城大学 (愛知)
- ⑨ 丸田隆典、葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの細胞内レドックス調節への関与、第 49 回日本植物生理学会年会、2008 年 3 月 20 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑩ Maruta, T. Photosynthetic electron

transport chain participates in the  
light regulation of ascorbic acid  
biosynthesis. ROS in PLANT 2007、2007  
年9月13日、Ghent, Belgium  
他 38 件

[その他]  
ホームページ等  
<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：8 0 1 4 0 3 4 1

### (2) 研究分担者

田茂井 政宏 ( TAMOI MASAHIRO )  
近畿大学・農学部・准教授  
研究者番号：7 0 3 4 0 7 6 8