

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03089

研究課題名(和文) ジャスモン酸経路を介する熱帯樹木の新奇イソプレン合成制御機構の解明

研究課題名(英文) Exploration of regulatory mechanism of jasmonic acid dependent isoprene biosynthesis in tropical trees

研究代表者

屋 宏典 (Oku, Hirosuke)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：10177165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究により植物ホルモンのジャスモン酸がイソプレンの合成・放出制御にも関わっていることが示唆されてきている。本研究は、主要な熱帯樹種であるクワ科のオオバユズビワを対象として、ジャスモン酸経路を介する熱帯樹木の新奇イソプレン合成・放出制御機構を解明することを目的とした。

ジャスモン酸散布後のオオバユズビワ葉部の植物ホルモン濃度、関連シグナリング転写因子並びにイソプレン合成酵素の遺伝子発現の経日変化とこれらの因子間の相関を解析し、IAAとJA-Ile濃度及びこれらのシグナリング下流の転写因子MYC2とSAURのバランスによりイソプレン合成酵素遺伝子の発現が制御されるとの仮説を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気中のイソプレン濃度の増加は間接的に温暖化を促進し、気候変動等の地球環境に大きな影響を及ぼすのみならず人の健康及び農業生産性に対しても大きな影響を及ぼすことが懸念されていることから、その動態の正確な評価が求められている。よって、植物のイソプレン合成の制御機構の解明は正確な大気中のイソプレン動態の把握に貢献すると考えられる。

他方、イソプレンは高温や乾燥等の環境ストレスに対する植物の耐性を向上させることから、その制御機構に関する新知見は新たな耐暑性や耐乾性作物の創出に貢献できる社会的意義もある。

研究成果の概要(英文)：Plant hormone signaling and circadian clock have been implicated in the transcriptional control of isoprene biosynthesis. The present study analyzed plant hormone concentration of JA-treated leaves in which isoprene biosynthesis was mainly controlled by transcriptional modulation of isoprene synthase (IspS) gene. Results suggested that hormonal balance between JA-Ile and indole-3-acetic acid (IAA) plays a central role in the transcriptional regulation of IspS gene through the transcription factors MYC2 and SAUR21, the early auxin responsive genes. Putative cis-acting element for SAUR on IspS promoter (TGTCNN and CATATG) in addition to G-box for MYC2 supports the above proposal.

研究分野：脂質生化学

キーワード：イソプレン 生合成 シグナル伝達 ホルモン ジャスモン酸

1. 研究開始当初の背景

高温ストレスへの植物の応答のひとつにイソプレンというガスの放出があり、メタンと同量の年間5-7億トンものイソプレンが主に熱帯樹木から大気中へと放出されている (Guenther A., *Chemosphere* 2002)。イソプレンは植物にとっては高温や強光等の環境ストレスに対する保護作用を有する一方において、光化学反応性が高く、大気中のヒドロキシラジカル、すなわち活性酸素の一種と窒素酸化物の存在下で反応して一酸化炭素やオゾンを生産する。大気中のヒドロキシラジカルは対流圏の酸化反応を全般的に支配しており、温室効果ガスの一種であるメタン分解の役割を担っているため、イソプレンによってヒドロキシラジカルが消費されることは大気中のメタン分解を抑制することになる。従って、大気中でのイソプレン濃度の増加は間接的に温暖化を促進し、気候変動等の地球環境に大きな影響を及ぼすことが懸念されている。さらに、イソプレンによって生成される対流圏のオゾンが人の健康や農作物や森林の生育に悪い影響を及ぼしているのではないかと研究成果も報告されている (Reich & Amudson, *Science* 1985; Ren *et al.*, *Environ Pollut* 2017)。このように、イソプレンガスは気候変動や人の健康及び農業生産性に対して大きな影響を及ぼすことから、その供給源となっている植物のイソプレン合成の制御・放出には大きな関心が寄せられてきた。

イソプレンに関しては従来、ポプラやオーク等の温帯植物やシロイヌナズナ等のモデル植物を対象とした研究がなされ、合成経路や合成に関与する酵素・遺伝子などについては明らかになっている。しかしながら、地球規模での放出の主役である熱帯樹木については研究が進んでおらず、とりわけ、ストレス時に合成される植物ホルモン等の情報伝達物質を介してどのようにしてイソプレン合成系が制御されるかについては殆ど明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者はイソプレン放出の正確な評価には熱帯樹木に関する研究がより重要であると考え、沖縄産熱帯樹木の環境応答特性やイソプレン合成酵素の特性、温度変化に対する調節機構に関する分子レベルでの研究をこれまで行ってきた。そして、熱帯樹木のイソプレン合成の制御機構を明らかにすることを目的として、オオパイヌビワのイソプレン放出が温度依存的にオン-オフ調節される際の遺伝子発現、基質供給系の中間代謝産物及びイソプレン合成酵素遺伝子 (*Isps*) のプロモーター領域の解析を行った。その結果、オオパイヌビワの *Isps* 発現はジャスモン酸、アブシジン酸、オーキシン等の植物ホルモンと時計遺伝子により協調的に制御されていることが示唆された (Mutanda *et al.*, *Plant Cell Environ* 2016; Shahanaz *et al.*, *Tree Physiol* 2018)。オオパイヌビワの葉をホルモン処理すると、ジャスモン酸が最も強くイソプレン放出を抑制する一方、オーキシンは促進する傾向が認められた (Shahanaz *et al.*, *Plant Cell Environ* 2019)。ジャスモン酸処理に伴うイソプレン放出変化との相関解析により、ジャスモン酸は *ISPS* の転写因子 MYC2 或は LHY を介してイソプレン合成を下方制御しており、MYC2 に関してはオーキシンにより拮抗的に調節されていること、併せてオオパイヌビワのイソプレン合成制御に関するホルモンシグナルの相互作用はジャスモン酸経路に集約されることも強く示唆された。

本研究はこれまでの申請者等の研究を進展させ、植物ホルモン処理及び気温変化や乾燥等の非生物的ストレスに対するオオパイヌビワの細胞内の情報伝達様式を詳細に解析し、ジャスモン酸経路を中心とする情報伝達ネットワークによる熱帯樹木のイソプレン合成・放出の新奇制

御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究によりジャスモン酸はイソプレンを抑制し、オーキシンは促進することが明らかになっている。(1)本研究においてはジャスモン酸或はオーキシンをオオバイヌビワ葉面に散布し、経日的にイソペン放出、光合成速度、MEP経路の代謝産物、ホルモン濃度、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム分析を行う。ホルモンについてはLC-ESI/MSによる植物ホルモンの一斉分析法を用い、ジャスモン酸、オーキシン、ジベレリン、アブシジン酸、サリチル酸等の網羅的な分析を行う。次いで、イソペン放出及び植物ホルモン濃度と高い相関を示す遺伝子或いは光合成関連パラメーターを選別し相関を解析し、植物ホルモン依存性のシグナル伝達に關与する遺伝子群を明らかにする。(2)また、温度変化や乾燥などの非生物的ストレスをオオバイヌビワに負荷して、同様にホルモン濃度と関連シグナル伝達系、特に下流の転写因子とIspS遺伝子発現との相関を解析し、環境ストレスからイソペン合成・放出制御に至る情報伝達経路を解明する。(3)加えて、これまでのトランスクリプトーム研究において部分塩基配列が明らかになっているオオバイヌビワIspSの転写因子MYC2及びLHY等の完全長cDNAの塩基配列を決定し、得られた転写因子タンパク質とプロモーター配列との相互作用を酵母ワンハイブリッドシステムにより解析する。

4. 研究成果

(1) ジャスモン酸散布後のIspS遺伝子の制御

オオバイヌビワ幼木(樹齢2年)の葉に50µMジャスモン酸溶液を噴霧し、イソペン放出、IspS量、IspS遺伝子発現、植物ホルモン及びシグナル伝達関連遺伝子発現を経日的に測定した。

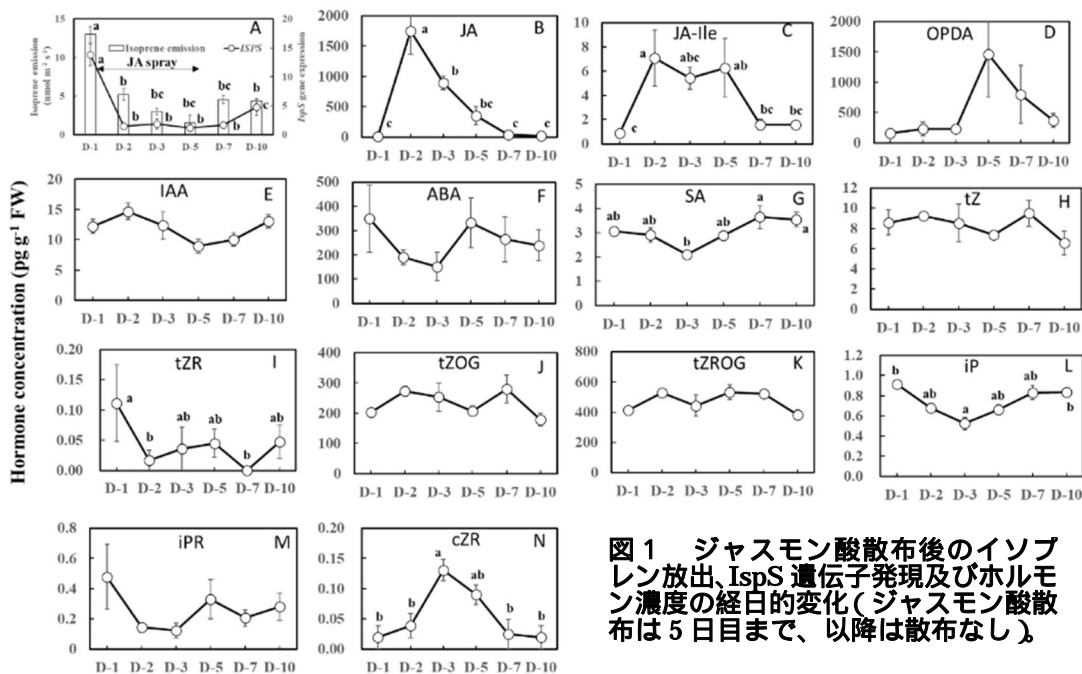


図1 ジャスモン酸散布後のイソペン放出、IspS遺伝子発現及びホルモン濃度の経日的変化(ジャスモン酸散布は5日目まで、以降は散布なし)

ジャスモン酸散布により、イソペン合成遺伝子の発現は5日目まで低下し、散布停止以降発現は上昇したが、散布前のレベルまでには回復しなかった(図1A)。ジャスモン酸散布により葉内のJA、JA-Ile、SA、tZR、iP、cZR濃度が有意に変化した(図1B,C,G,I,L,N)。このうち、SA、iP、tZR濃度はイソペン合成遺伝子発現と正に相関する一方、JA、JA-Ile、cZR濃度は負の相関を示した。これらのホルモン濃度並びにシグナル伝達下流の転写因子遺伝子発現の相関を解析した(表1)。

ホルモンとそのシグナリング下流の転写因子のうち、IAA と JA-Ile についてのみ、IspS 遺伝子の発現と有意に相関していた。このことは両者の比率が IspS 遺伝子発現に関わっていることを示していると考えられた。実際、両者の濃度の比率と IspS 遺伝子発現には図 2 に示すような高い相関が認められた。

表 1 IspS 遺伝子発現とホルモン濃度並びに関連転写因子間の相関

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	
A JA	1.000																							
B JA-Ile	0.771	1.000																						
C OPDA	-0.151	0.394	1.000																					
D IAA	-0.357	-0.060	-0.497	1.000																				
E ABA	-0.318	-0.060	0.581	-0.265	1.000																			
F SA	-0.540	-0.507	0.181	0.027	0.249	1.000																		
G cZR	0.323	0.541	0.094	-0.069	-0.161	-0.520	1.000																	
H Z	0.209	0.016	-0.217	-0.168	0.069	-0.009	0.119	1.000																
I ZR	-0.221	-0.180	-0.066	-0.091	0.624	0.023	0.051	0.359	1.000															
J ZOG	0.318	0.186	-0.063	-0.285	-0.102	-0.119	0.131	0.769	-0.076	1.000														
K ZROG	0.266	0.186	0.053	-0.440	-0.027	-0.069	0.054	0.600	-0.011	0.604	1.000													
L IP	-0.617	-0.665	0.074	0.008	0.483	0.709	-0.818	-0.045	0.284	-0.267	-0.234	1.000												
M IPK	-0.400	-0.178	0.284	-0.388	0.666	-0.003	-0.367	-0.125	0.530	-0.084	-0.114	0.459	1.000											
N Isoprene emission	-0.241	-0.510	-0.391	0.268	0.241	0.188	-0.486	0.214	0.457	-0.135	-0.287	0.640	0.318	1.000										
O IspS protein	-0.096	-0.277	-0.292	0.333	0.313	-0.051	-0.360	0.027	0.451	-0.194	-0.399	0.471	0.474	0.888	1.000									
P IspS	-0.400	-0.521	-0.321	0.188	0.379	0.172	-0.324	0.033	0.634	-0.351	-0.414	0.582	0.439	0.897	0.864	1.000								
Q MYC2 (JA)	-0.125	0.278	0.575	-0.058	-0.016	0.074	0.357	-0.535	-0.358	-0.235	-0.205	-0.277	-0.109	-0.682	-0.485	-0.521	1.000							
R SAUR21 (IAA)	-0.238	-0.476	-0.324	0.145	0.076	0.080	-0.437	-0.102	0.106	-0.076	-0.250	0.490	0.200	0.839	0.680	0.675	-0.668	1.000						
S ABF (ABA)	-0.394	-0.203	0.290	-0.048	-0.075	0.465	-0.118	-0.440	-0.331	-0.182	-0.294	0.114	-0.050	-0.433	-0.508	-0.333	0.588	-0.319	1.000					
T PRI (SA)	-0.173	-0.101	0.110	-0.098	0.026	0.378	0.173	0.291	-0.019	0.283	0.220	-0.031	-0.224	-0.253	-0.419	-0.191	0.192	-0.155	0.521	1.000				
U ARR-B (Cytokinin)	-0.219	-0.130	0.055	-0.282	-0.243	0.108	-0.269	-0.343	-0.262	-0.137	-0.059	0.131	0.048	-0.209	-0.271	-0.228	0.174	-0.079	0.308	-0.045	1.000			
V PRR7 (Circadian)	-0.627	-0.575	-0.081	-0.057	0.359	0.394	-0.409	-0.092	0.477	-0.318	-0.470	0.652	0.429	0.443	0.331	0.602	-0.174	0.298	0.288	0.227	0.292	1.000		
W LHY (Circadian)	0.057	0.318	0.299	0.045	0.224	0.095	0.381	-0.257	0.167	-0.306	-0.213	-0.146	-0.065	-0.211	-0.078	-0.031	0.320	-0.370	-0.149	-0.355	-0.116	-0.197	1.000	

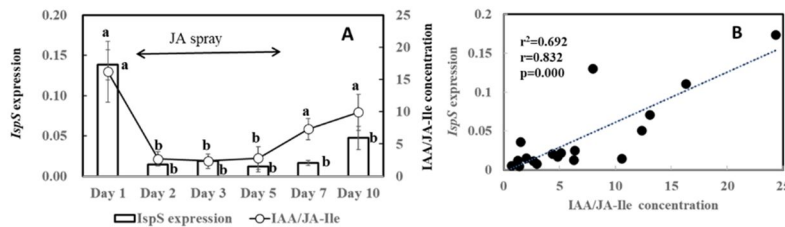


図 2 IspS 遺伝子発現と IAA/JA-Ile 濃度比率の相関

これらのうち JA-Ile シグナリング下流の転写因子である MYC2 は IspS 遺伝子発現の制御因子であることが示唆されている。しかしながら、イソプレン合成遺伝子

発現と MYC2 の相関を検証してみると、MYC2 は IspS 遺伝子発現と負の相関を示し、発現変動の 27% しか説明しないことが明らかとなった (図 3 A)。一方 IAA シグナリング下流の SAUR21 は IspS 遺伝子発現と正に相関し、その発現変動の 45% をできると見積もられた (図 3 B)。このことは IspS 遺伝子の発現変動は MYC2 のみでは説明できず、SAUR21 も関わっていることを示唆していた。

これまででは、IAA による IspS 遺伝子発現の制御は MYC2 を介して行われると考えられてきたが、今回の解析結果は SAUR21 も直接 IspS の発現制御に関与していることを示唆している。両者の発現比率は実際 IspS の発現及びイソプレン放出と非常に高い相関を示した (図 3 C, D)。IspS プロモーターには MYC2 だけでなく SAUR に対するシスエレメントも存在することもこれを支持するものと判断した。

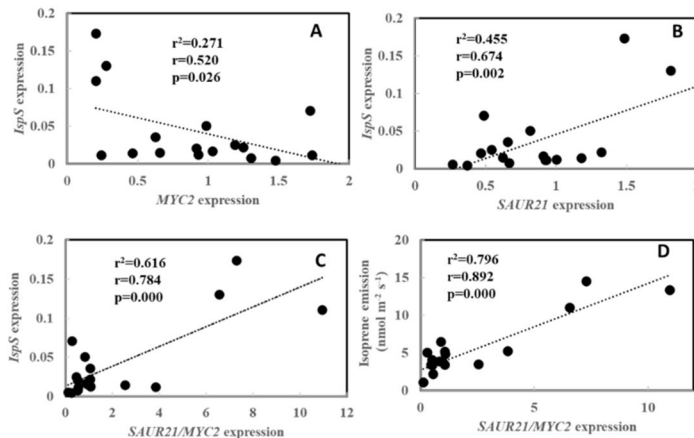


図 3 IspS 遺伝子発現と SAUR21/MYC2 発現比率の相関

者の発現比率は実際 IspS の発現及びイソプレン放出と非常に高い相関を示した (図 3 C, D)。IspS プロモーターには MYC2 だけでなく SAUR に対するシスエレメントも存在することもこれを支持するものと判断した。

(2) 乾燥ストレスによる IspS 遺伝子制御

オオバユビワに乾燥ストレスを 5 日間負荷し、(1) と同様にイソプレン放出、IspS 量、IspS 遺伝子発現、植物ホルモン及びシグナル伝達関連遺伝子発現を経日的に測定した。

乾燥ストレス負荷 5 日目に IspS 量が増加し、一過的にイソプレン放出が増大するが、5 日以

降の再給水により、放出量はベースラインレベルまで低下した。IspS 遺伝子の発現、ホルモン濃度には期間を通じて有意な変動は認められなかった。また、シグナリング遺伝子にも顕著な変動は観察されなかった。これらの結果は本研究で採用した短期の乾燥ストレスによるイソプレレン放出の増加においては IspS 遺伝子発現の制御のすなわち転写レベルの調節ではなく、翻訳レベルによる IspS 量の調節が重要な役割を果たしていることが示唆された。換言すると、翻訳レベルの調節にはホルモンシグナリングは必ずしも関与しないことが示唆された。

(3) MYC2 及び SAUR21 と IspS 遺伝子プロモーターとの相互作用解析

酵母ワンハイブリッドシステムはプロモーター-DNA 結合タンパク質(preym)を GAL4-AD に融合して発現させ、prey タンパク質が酵母宿主ゲノムに組み込まれた既知の bait 配列(標的 DNA)に結合すると、GAL4-AD により AbA 耐性レポーター遺伝子が発現され、宿主酵母が AbA 選択培地で生育が可能になることを利用して、タンパク質-DNA の相互作用の有無を検出するシステム

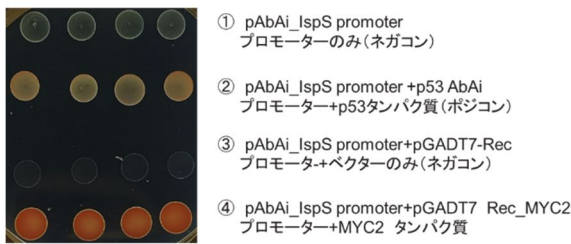


図4 酵母ワンハイブリッドシステムによる MYC2 タンパク質とプロモーターDNA の相互作用

である。

宿主酵母は IspS 遺伝子プロモーターのみ、あるいは融合タンパク質発現用ベクター(pGADT7-Rec) のみの場合は選択培地上で生育できないが、MYC2 タンパク質を融合タンパク質として共発現させると、ポジティブコントロール同様に選択培地で生育した。これにより MYC2 は IspS プロモーターに結合することが示された(図4)。同様の実験を SAUR21 タンパク質についても行った。MYC2 同様に IspS 遺伝子プロモーターに結合することが確認できた。

以上(1)ジャスモン酸散布後の IspS 遺伝子の制御、(2)乾燥ストレスによる IspS 遺伝子制御、(3) MYC2 及び SAUR21 と IspS 遺伝子プロモーターとの相互作用解析の実験結果を踏まえ、IspS 遺伝子の制御について図5に示すような IspS の制御仮説を提唱することができた。

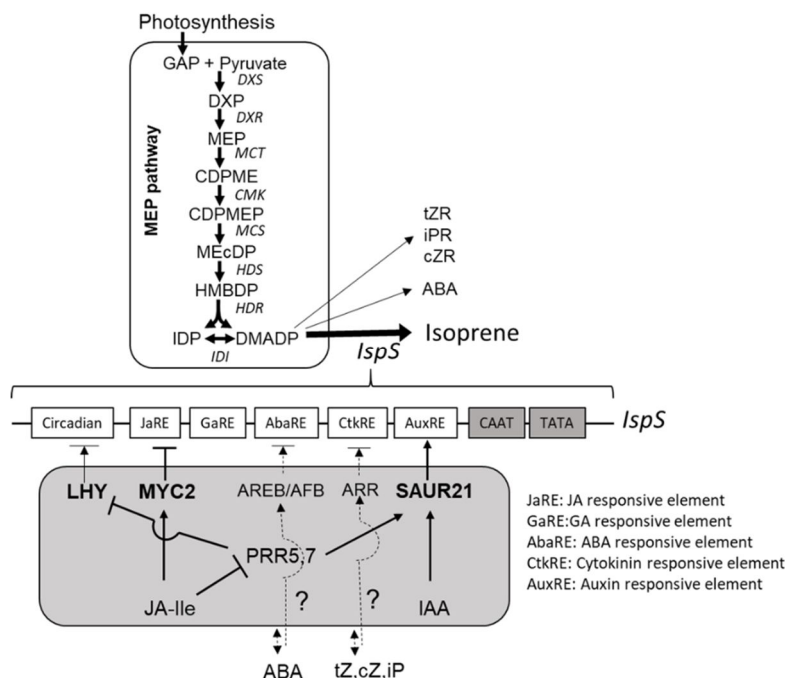


図5 IspS 遺伝子の制御仮説

IspS プロモーターにはホルモンシグナリングの転写因子にตอบสนองする複数のシスエレメントが存在する。これらの IspS プロモーター上の複数のシスエレメントの応答が統合され、IspS 遺伝子発現は調節されるが、JA-Ile と IAA あるいは LHY がこれらのシグナルを集約するうえで主要な役割を演じているものと考えられた。また、このような調節系は急激なホルモン濃度変化を伴うような短期の調節においてとりわけ重要であることも示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Parveen Shahanaz, Iqbal Md. Asif, Mutanda Ishmael, Rashid Md. Harun Ur 、 Inafuku Masashi, Oku Hirotsuke	4. 巻 42
2. 論文標題 Plant hormone effects on isoprene emission from tropical tree in <i>Ficus septica</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 1715 ~ 1728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pce.13513	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oku Hirotsuke, Iwai Shohei, Uehara Misaki, Iqbal Asif, Mutanda Ishmael, Inafuku Masashi	4. 巻 134
2. 論文標題 Growth condition controls on G-93 parameters of isoprene emission from tropical trees	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 1225 ~ 1242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-021-01344-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iqbal Md. A., Miyamoto K., Yumoto E., Parveen S., Mutanda I., Inafuku M., Oku H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Plant hormone profile and control over isoprene biosynthesis in a tropical tree <i>Ficus septica</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biology	6. 最初と最後の頁 492 ~ 501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/plb.13386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Oku Hirotsuke, Mutanda Ishmael, Fukuta Masakazu, Inafuku Masashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Non-enzymatic formation of isoprene and 2-methyl-3-buten-2-ol (2-MBO) by manganese	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06520-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasanuzzaman Mirza、Inafuku Masashi、Nahar Kamrun、Fujita Masayuki、Oku Hirotsuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Nitric Oxide Regulates Plant Growth, Physiology, Antioxidant Defense, and Ion Homeostasis to Confer Salt Tolerance in the Mangrove Species, <i>Kandelia obovata</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 611～611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10040611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高良卓矢, 屋宏典, 稲福征志
2. 発表標題 熱帯植物由来イソプレレン合成酵素 (IspS) の酵素学的性質
3. 学会等名 2019年度西日本・中四国支部合同大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	稲福 征志 (Inafuku Masashi) (90457458)	琉球大学・農学部・准教授 (18001)	
研究分担者	宮本 皓司 (Miyamoto Koji) (90721514)	帝京大学・理工学部・講師 (32643)	
研究分担者	齋藤 星耕 (Saitoh Seiko) (10623754)	沖縄国際大学・経済学部・准教授 (38001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------