

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21276

研究課題名(和文)独自の順遺伝学アプローチによる植物の活性酸素誘導性プログラム細胞死の分子機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of oxidative stress-induced programmed cell death in plants using an original forward genetics approach

研究代表者

丸田 隆典(Maruta, Takanori)

島根大学・学術研究院農生命科学系・教授

研究者番号：50607439

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):過酸化水素(H₂O₂)は優れたシグナル分子であり、変動環境における植物の生死決定に重要な役割を担う。本研究では、H₂O₂誘導性細胞死の分子機構に焦点をあて、独自のバイオアッセイ系を活用した遺伝学的スクリーニングにより、H₂O₂誘導性細胞死に必要な遺伝子を複数同定した。同定した遺伝子の機能解析を通して、H₂O₂生成系としての光呼吸の役割と、細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼを介したグルタチオン酸化機構の存在を明らかにした。そして、これらのレドックス変化の下流でシステインリッチ機能未知タンパク質が細胞死の発動に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、酸化ストレス誘導性細胞死に関与する遺伝子を網羅的に同定した。特に、従来は防御酵素として機能するアスコルビン酸ペルオキシダーゼが、過度な酸化ストレス条件ではグルタチオン酸化を介して細胞死を導くことは新しい発見であった。また、同定したシステインリッチ機能未知タンパク質はH₂O₂感知に関与することが示唆され、今後の解析により未同定の細胞内H₂O₂センサーの同定が期待される。このように、本研究は酸化ストレス誘導性細胞死の分子機構の解明に大きく貢献した。また、H₂O₂は変動環境における植物の生死決定に重要な役割を担うため、本研究の成果はストレスに強い農作物の育種に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文):Hydrogen peroxide (H₂O₂) is an excellent signaling molecule that plays a critical role in determining plant life and death in fluctuating environments. In this study, we focused on the molecular mechanism of H₂O₂-induced cell death and identified several genes required for this process through genetic screening using an original bioassay system. Functional analysis of the identified genes revealed the role of photorespiration as a H₂O₂-generating system and elucidated the mechanism of glutathione oxidation mediated by cytosolic ascorbate peroxidase. Additionally, we discovered that a cysteine-rich, functionally unknown protein downstream of these redox changes is involved in the initiation of cell death.

研究分野：植物代謝生理学

キーワード：酸化ストレス プログラム細胞死 アスコルビン酸 グルタチオン シグナル伝達 過酸化水素 シロイヌナズナ 環境順応

1. 研究開始当初の背景

近年の異常気象の多発により、世界中で深刻な農業被害が生じている。特に、自然災害が多発し、食糧自給率の低い我が国では、バイオテクノロジー技術による環境耐性作物の分子育種が喫緊の課題である。植物の生産性に影響する環境要因には光、温度、水分および土壌成分などが含まれるが、いずれの要因の変動によっても、植物細胞では共通して活性酸素種 (ROS) の蓄積が起こる。特に、ROS の一種である過酸化水素 (H_2O_2) は優れたシグナル分子であり、変動環境における植物の生死決定に重要な役割を担うため、その作用機序の解明はストレスに強い農作物の育種に大きく貢献しうる。

真核生物に共通の現象として、ROS に起因する酸化ストレスは遺伝的にプログラムされた細胞死経路を活性化しうる。動物ではアポトーシスをはじめ、鉄/ROS 依存的な細胞死・フェロトーシスや、リポキシトーシス (Dixon et al., Cell, 2012; Ueta et al., J. Biol. Chem., 2012; 他) などが特徴付けられている。植物でも類似の細胞死が起こる可能性が示唆されているが、植物はこれらの動物経路に必要な遺伝子をほとんど持っておらず、その分子機構は不明である。また、植物細胞では H_2O_2 の発生源が多様であり、変動環境下では異なる H_2O_2 シグナル伝達経路の活性化が同時多発的に起こる。この複雑さのために、 H_2O_2 シグナリングの全体像を把握することは困難であり、 H_2O_2 の感知機構も未同定である。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナの酸化ストレス誘導性プログラム細胞死の分子機構を解明することを目的とした。この目的を達成するために、先行研究で酸化ストレス誘導性細胞死に関与する遺伝子を探索し、候補遺伝子としてシステインリッチ機能未知タンパク質 (CRUP)、葉緑体型グルタミン酸合成酵素 (GS2) および細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX1) を同定した。そこで、これらの遺伝子の機能解析を通して、酸化ストレス誘導性細胞死の分子機構の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

先行研究では、カタラーゼ欠損株 (*cat2*) を酸化ストレスモデルとして遺伝学的スクリーニングに応用し、*cat2* で生じる細胞死に関わる遺伝子候補を同定した。まず、これらの遺伝子が酸化ストレス誘導性細胞死に必要などうかを調べるために、候補遺伝子の欠損株と *cat2* を交配させ、二重欠損株を作出し、細胞死への影響を調べた。CRUP の機能は未知であったため、cDNA をクローニングし、分子生物学的な手法によって機能解析を進めることとした。GS2 や APX1 は代謝酵素であることから、細胞内レドックス制御や光呼吸を中心とした代謝制御への関与を調べた。

4. 研究成果

1) システインリッチ機能未知タンパク質 (CRUP) の機能

CRUP の実質的な機能は未解明であるが、これまでにオーキシン応答やミトコンドリア由来の逆行性シグナル伝達に関与することが報告されている。また、大規模なプロテオミクスデータから、CRUP のシステイン残基は H_2O_2 による酸化修飾を受けることが報告されており、このタンパク質の H_2O_2 センサーとしての機能が示唆された。CRUP と CAT2 の二重欠損株を作出したところ、人工的な酸化ストレス条件、温和かつ長期的な、または強烈かつ短期的な光ストレス条件のいずれにおいても、*cat2* で生じる細胞死が CRUP の欠損により抑制されることが明らかになった。また、*cat2* で生じるグルタチオン酸化などのレドックス異常は CRUP の影響を受けなかったことから、CRUP は H_2O_2 レベルやレドックス状態の調節には関与せず、 H_2O_2 シグナルの下流で機能することがわかった。CRUP の実質的な機能の解明を目的として、cDNA のクローニングを試みたが、cDNA サイズが大きすぎるために全長をクローニングすることはできなかった。そこで、CRUP のペプチド抗体を 2 種類作成したが、ウエスタンブロット解析により CRUP タンパク質に特異的なシグナルを検出することはできなかった。現在、ゲノムの精密編集が可能なイネを用いて、分子生物学的解析に利用可能なゲノム編集株の作出を検討している。

2) 葉緑体型グルタミン酸合成酵素 (GS2) の機能

葉緑体型 GS2 は、フェレドキシン依存グルタミン合成酵素 (Fd-GOGAT) とともに、GS-GOGAT サイクルを構成し、光呼吸に関与する。*cat2* で蓄積する H_2O_2 の発生源は光呼吸であることから、GS2 による光呼吸の維持が酸化ストレス誘導性細胞死に重要な役割を果たすと考えられた。GS2 の欠損は強光ストレス条件における *cat2* の細胞死を著しく抑制した。また、同様の結果は Fd-GOGAT の欠損によっても観察された。GS2 の欠損により、*cat2* におけるグルタチオン酸化や酸化ストレス誘導性遺伝子の発現が抑制されたことから、GS2 は酸化ストレスの発生そのものに必要であることが示唆された。さらに、GS2 の欠損により光呼吸フラックスが

抑制されることが確認された。以上の結果から、葉緑体における GS2 と Fd-GOGAT の共役は、光呼吸の維持、すなわち H₂O₂ 生成の維持を通して *cat2* の酸化ストレス誘導性細胞死を促進することが明らかになった。

3) 細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX1) の機能

APX1 は細胞質でアスコルビン酸依存的に H₂O₂ を消去する酵素である。この反応により酸化されたアスコルビン酸は、デヒドロアスコルビン酸還元酵素 (DHAR1/2) のはたらきによって還元型へと再生されるが、その結果としてグルタチオンが酸化される。グルタチオンの酸化は、酸化ストレス誘導性細胞死の発動に必要であることがわかっている。APX1 は DHAR1/2 と共役することで酸化ストレス応答のグルタチオン酸化プロセスに関与すると仮説を立てた。*cat2* 背景で APX1 を欠損させることで、グルタチオン酸化とともに細胞死が抑制された。トランスクリプトーム解析の結果、APX1 と CAT2 の同時欠損により、酸化ストレス応答性遺伝子の発現が緩和されるとともに、DNA 損傷応答のマーカー遺伝子の発現が増加することがわかった。

次に、グルタチオン酸化における APX1 と DHAR1/2 の共役について調べるために、*apx1* および *dhar1/2* をカタラーゼの阻害剤で処理した。野生株への阻害剤処理により、カタラーゼ活性の低下とともにグルタチオン酸化が認められた。一方、このグルタチオン酸化は *apx1* および *dhar1/2* では有意に抑制された。さらに、これらの欠損株ではともに DNA 損傷応答が活性化されていた。これらの結果から、*cat2* において APX1 と DHAR1/2 の共役はグルタチオン酸化システムとして機能し、プログラム細胞死の発動に必要であることがわかった。

以上の結果より、*cat2* で生じる酸化ストレス誘導性細胞死には、葉緑体 GS-GOGAT サイクルによる H₂O₂ 生成の維持と、APX1 と DHAR1/2 の共役によるグルタチオン酸化プロセスが必要であることが明らかになった (図 1)。そして、これらのレドックス変化の下流において CRUP が細胞死の発動に重要な役割を担う可能性が示された。

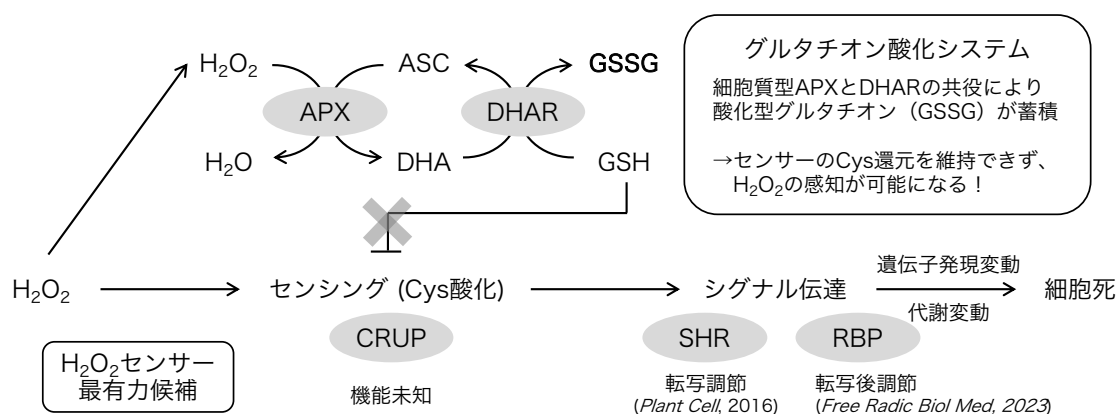


図 1 酸化ストレス誘導性細胞死におけるグルタチオン酸化システムと CRUP の位置付け

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hamada Akane, Ishikawa Takahiro, Maruta Takanori	4. 巻 87
2. 論文標題 The demand for ascorbate recycling capacity rises as the ascorbate pool size increases in Arabidopsis plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1332 ~ 1335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbad107	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 Maruta Takanori, Tanaka Yasuhiro, Yamamoto Kojiro, Ishida Tetsuya, Hamada Akane, Ishikawa Takahiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Evolutionary insights into strategy shifts for the safe and effective accumulation of ascorbate in plants	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 2664 ~ 2681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erae062	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 Maruta Takanori	4. 巻 86
2. 論文標題 How does light facilitate vitamin C biosynthesis in leaves?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac096	査読の有無 無
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 Hamada Akane, Tanaka Yasuhiro, Ishikawa Takahiro, Maruta Takanori	4. 巻 114
2. 論文標題 Chloroplast dehydroascorbate reductase and glutathione cooperatively determine the capacity for ascorbate accumulation under photooxidative stress conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 68 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.16117	査読の有無 無
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 Willems Patrick, Van Ruyskensvelde Valerie, Maruta Takanori, Pottie Robin, Fernandez-Fernandez Ivario D., Pauwels Jarne, Hannah Matthew A., Gevaert Kris, Van Breusegem Frank, Van der Kelen Katrien	4. 巻 200
2. 論文標題 Mutation of Arabidopsis SME1 and Sm core assembly improves oxidative stress resilience	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 117 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2023.02.025	査読の有無 無
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 Iwagami Takumi, Ogawa Takahisa, Ishikawa Takahiro, Maruta Takanori	4. 巻 86
2. 論文標題 Activation of ascorbate metabolism by nitrogen starvation and its physiological impacts in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 476 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac010	査読の有無 無
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 Tanaka Mio, Takahashi Ryuki, Hamada Akane, Terai Yusuke, Ogawa Takahisa, Sawa Yoshihiro, Ishikawa Takahiro, Maruta Takanori	4. 巻 10
2. 論文標題 Distribution and Functions of Monodehydroascorbate Reductases in Plants: Comprehensive Reverse Genetic Analysis of <i>Arabidopsis thaliana</i> Enzymes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1726 ~ 1726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10111726	査読の有無 無
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 Kameoka Takashi, Okayasu Takaya, Kikuraku Kana, Ogawa Takahisa, Sawa Yoshihiro, Yamamoto Hiroshi, Ishikawa Takahiro, Maruta Takanori	4. 巻 107
2. 論文標題 Cooperation of chloroplast ascorbate peroxidases and proton gradient regulation 5 is critical for protecting <i>Arabidopsis</i> plants from photo oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 876 ~ 892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15352	査読の有無 無
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 丸田隆典	4. 巻 95
2. 論文標題 ビタミンC代謝と植物の環境ストレス順応	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 405 ~ 412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Hamada Tamami, Maruta Takanori	4. 巻 2798
2. 論文標題 Measurements of Ascorbate and Dehydroascorbate in Plants Using High-Performance Liquid Chromatography	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 131 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3826-2_8	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Satsuki Sato, Kana Kikuraku, Takahiro Ishikawa, and Takanori Maruta
2. 発表標題 Cytosolic ascorbate peroxidase 1 triggers glutathione oxidation and cell death in Arabidopsis catalase-deficient mutants
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023 (TJPB 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tadashi Sasaki, Takumi Iwagami, Takahiro Ishikawa, Takanori Maruta
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying stress priming to suppress high-light sensitivity of ascorbate-deficient mutants: Contribution of flavonoids?
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023 (TJPB 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤沙月、菊樂香奈、三富 弦、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼを介した酸化ストレス誘導性細胞死の分子機構
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第67回 講演会（例会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤本七海、石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhamdi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 酸化ストレス誘導性細胞死に必要な遺伝子の探索と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第67回 講演会（例会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤沙月、菊樂香奈、三富 弦、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ1はカタラーゼ欠損株におけるグルタチオン酸化と細胞死に必要である
3. 学会等名 第65回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤本七海、石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhamdi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 シロイヌナズナのカタラーゼ欠損株における過酸化水素誘導性細胞死に必要な新規タンパク質の同定
3. 学会等名 第65回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhamdi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 光呼吸由来のH2O2誘導性細胞死における葉緑体型グルタミン合成酵素の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 支部創立20周年記念 第62回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱田あかね、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 強光条件の葉緑体におけるアスコルビン酸再生の生理学的重要性
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 支部創立20周年記念 第62回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱田あかね、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 細胞質および葉緑体におけるグルタチオン依存アスコルビン酸再生系の生理学的重要性
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱田あかね、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 強光条件におけるアスコルビン酸再生の分子機構と生理学的重要性
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhamdi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 葉緑体GS/GOGATサイクルはカタラーゼ欠損により生じる細胞死に必要なである
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhamdi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 葉緑体GS/GOGATサイクルはカタラーゼ欠損変異株において酸化ストレス応答を駆動する
3. 学会等名 第64回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhamdi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 光呼吸に起因する酸化ストレス誘導性細胞死への葉緑体型グルタミン合成酵素の関与
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会およびシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊樂香奈、三富 弦、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 酸化ストレス誘導性細胞死の制御機構解明を目的としたトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田あかね、寺井佑介、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 酸化ストレス条件におけるグルタチオン依存アスコルビン酸再生システムの役割
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhamdi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 光呼吸由来の酸化ストレス誘導性細胞死の分子制御機構
3. 学会等名 日本農芸化学会 中四国支部 第61回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhamdi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 光呼吸由来のH2O2誘導性細胞死における葉緑体GS-GOGATサイクルの役割
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱田あかね、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 酸化ストレス下のアスコルビン酸再生におけるグルタチオン依存経路の生理学的重要性
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊樂香奈、三富 弦、松浦恭和、森 泉、小川貴央、石川孝博、丸田 隆典
2. 発表標題 強光ストレス下における酸化ストレス誘導性細胞死の制御機構菊樂
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸田隆典
2. 発表標題 なぜ、そしてどのように植物はアスコルビン酸を高濃度に蓄積するのか？
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊樂香奈、三富 弦、松浦恭和、森 泉、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 強光ストレス下におけるH2O2誘導性細胞死の調節機構
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋可菜、丸田隆典、Amna Mhandi、Frank Van Breusegem
2. 発表標題 葉緑体型グルタミン合成酵素（GS2）は光呼吸由来H2O2によって生じる細胞死に必要である
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸田隆典
2. 発表標題 植物環境順応におけるアスコルビン酸と活性酸素種の相互作用に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊樂香奈、三富 弦、松浦恭和、森 泉、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 カタラーゼ欠損株における酸化ストレス誘導性細胞死のレドックス調節
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://shimane-univ-biochemistry.jp

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	小川 貴央 (Ogawa Takahisa) (80603802)	島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授 (15201)	

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
---------	---------