

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380028

研究課題名（和文） 環境ストレス耐性の付与にはたすスperlミジンの機構解明

研究課題名（英文） Functional analysis of spermidine for conferring abiotic stress tolerance

研究代表者

森口 卓哉（MORIGUCHI TAKAYA）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・栽培・流通利用研究領域・上席研究員

研究者番号：80343945

研究成果の概要（和文）：スperlミジン（Spd）合成酵素（SPDS）遺伝子をアンチセンスで導入したセイヨウナシ培養シュートの塩、またはカドミウム下での生育は、野生型よりも抑制され、Spd の添加により改善された。野生型への Spd の処理や SPDS 過剰発現体への SPDS 阻害剤処理により、前者ではストレス耐性の付与が、後者では低下がみられた。また、Spd が抗酸化酵素活性の制御を介してストレス耐性に関わっていることを示した。さらに、ディファレンシャルディスプレイ法、cDNA マイクロアレイ解析等により、SPDS 過剰発現体と野生型の間で発現差のある遺伝子として、デハイドリン、パーオキシダーゼ等の遺伝子を特定した。

研究成果の概要（英文）：Transgenic European pear lines with reduced spermidine (spd) synthase (SPDS) expression showed severe effect on phenotypes compared with the wild-type (WT) under salt or cadmium stress. However, repressed phenotype was much alleviated by application of Spd. Application of Spd to WT can confer stress tolerance, while application of SPDS inhibitor to SPDS-overexpressing pear showed reduction of stress tolerance. We also showed the evidence for the importance of Spd in stress tolerance by influencing antioxidant system. Moreover, several genes including dehydrin and peroxidase whose expression levels were significantly different in SPDS-overexpressing line and WT, were successfully isolated by differential display and cDNA microarray.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	7,600,000	2,280,000	9,880,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：ポリアミン、環境ストレス、スperlミジン、組換え体、セイヨウナシ

## 1. 研究開始当初の背景

2007年2月のIPCC(気候変動に関する政府間パネル)の第4次報告書では、温暖化現象の原因は、工業化の拡大や生活レベルの向上等により排出された人為起源の温室ガスの増加であるとほぼ断定している。そして、今世紀末には最大6.4℃の温度上昇を予測している。こうした工業化の拡大による土壌中への有害物質の集積や、工業化に伴う気温上昇、干ばつ等は、農業生産に大きな影響を与え始めている。そのため、環境条件に左右されにくい農産物の持続的な安定生産技術の開発が求められている。一方、永年作物である果樹では栽植地の移動が容易でないことに加えて、土壌条件、異常気象、そして災害等の影響が当該年だけでなく翌年以降の生産性にまで影響を受けるため、一時的な対処ではなく抜本的な技術開発が必要となる。

近年、ポリアミンと環境ストレスとの関係について研究が進み、ポリアミン生合成系酵素遺伝子の一つであるSPDS遺伝子を導入したシロイヌナズナでは、塩分、低温、浸透圧、凍結等の複数のストレスに対して強くなることが示されている(Kasukabe et al. 2004)。ポリアミン生合成系酵素遺伝子であるアルギニン脱炭素酵素遺伝子やS-アデノシルメチオニン脱炭素酵素遺伝子の導入によっても環境ストレス耐性付与の報告がある(Capell et al. 2004; Wi et al. 2006)。このように、ポリアミンが環境ストレス耐性と深く関係していることが明らかとなりつつある。そこで、われわれは、これまで以下の研究を実施してきた。

(1) リンゴから単離したSPDS合成酵素遺伝子をセイヨウナシに導入して過剰発現(SPDSセンス導入系統)させると、このセイヨウナシは、塩、浸透圧、重金属(銅)に対して非組換え体(野生型)に比して、耐性を示すようになった(Wen et al. 2008)。

(2) その際、SPDSセンス導入系統では、抗酸化酵素活性(SODやGR)、さらには非酵素的な抗酸化活性(還元型アスコルビン酸やプロリンの含量)の増加がみられ、SPDS遺伝子の導入により増加したスペルミジン含量がこれら抗酸化活性を高めることで環境ストレス耐性付与に関わっている可能性が推察された(He et al. 2008)。

(3) さらに、このSPDSセンス導入系統では、銅以外にもカドミウム、鉛等の重金属に対しても強くなっていた(Wen et al. 2009, 2010)。

このような背景のもとで、環境ストレス軽減にはたすSpdの重要性について、アンチセンス組換え体を活用して再立証するとともに、SPDS遺伝子の導入が他の代謝系に及ぼす影響、すなわちSPDSのシグナル伝達経路に

ついて知見を得ようとした。

## 2. 研究の目的

これまでにSPDSセンス導入系統では、様々な環境ストレスに対して野生型よりも強くなっていることが示され、今後の温暖化に起因して想定される環境変動に対して、実用的な利用が期待されている。具体的には、われわれの研究グループでは、ポリアミンを植物調節剤として利用できる栽培管理技術の開発に繋げるとともに、ストレス耐性が付与された組換え果樹を台木等として活用するための布石を作りたいと考えている。

そこで、本研究では環境ストレス耐性に及ぼすSpdの重要性を色々な側面から再度精査することを目的とした。そのために、以下の3つの実験を行った。

### (1) 野生型へのSpdの処理と、SPDSを過剰発現させたセイヨウナシへのシクロヘキシルアミン(CHA)処理が抗酸化活性に及ぼす影響

本実験では、野生型のセイヨウナシに外生的にSpdを与えると、環境ストレス耐性が改善され、一方、環境ストレスに強いことが示されているSPDS過剰発現系統(#32)をSPDSの阻害剤であるCHAで処理すると、環境ストレス耐性が低下することが期待される。

### (2) SPDS遺伝子をアンチセンス方向で導入したセイヨウナシ組換え体系統(SPDSアンチセンス導入系統)における環境ストレス耐性

本実験では、SPDSアンチセンス系統は野生型よりも環境ストレスに弱くなり、外生的にSpdを処理することで野生型と同程度までストレスによる障害が回復することが期待される。

### (3) SPDS遺伝子(スペルミジン)のシグナル伝達経路の解明

本実験では、サブトラクション(SSH)法、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法、そしてcDNAマイクロアレイ解析により、SPDS過剰発現体と野生型の間で発現差のある遺伝子を特定し、SPDS遺伝子の導入が影響を及ぼす代謝ネットワークを明らかにすることで、Spdが環境ストレス耐性を付与する機構の一端の解明が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 野生型へのSpdの処理と、SPDSを過剰発現させたセイヨウナシへのシクロヘキシルアミン(CHA)処理が抗酸化活性に及ぼす影響

野生型のセイヨウナシ(*Pyrus communis* L. 'Ballad')およびSPDSをセンス方向で導入した#32の培養シュートを用いた。野生型にSpdを処理する場合は、2mMのSpd溶液を作り、0.01%のTween20を含む溶液として、

フィルター滅菌を行った。一方、#32 への CHA についても、同様に 2 mM の CHA 溶液を作り、0.01% の Tween20 を含む溶液として、フィルター滅菌を行った。これら溶液をそれぞれの培養シュートに霧吹きにて十分量を散布した。乾燥後に再び培地に定植して実験処理を開始した。なお、対照区として、蒸留水を同様に散布した。処理後、過酸化水素、膜の障害程度（脂質の酸化）の指標であるマロンディアルデヒド（MDA）そして、プロリンの量を求めた。

#### **（2）SPDS 遺伝子をアンチセンス方向で導入したセイヨウナシ組換え体系統（SPDS アンチセンス導入系統）における環境ストレス耐性**

リンゴ由来 SPDS 遺伝子（MdSPDS1）を CaMV35S を持つバイナリベクター pBI121 にアンチセンス方向で挿入しアグロバクテリウム（LBA4404）を介してセイヨウナシに感染させ、アンチセンス導入系統を獲得した。アンチセンスライン（A21、A22、A33）、そして野生型のセイヨウナシの培養シュートを用いて、塩（150 mM）、カドミウム（150  $\mu$ M）、またはこれらを含まない培地に植えた。外生的な Spd の効果を検証するために、150 mM 塩 + 1.0 mM Spd、150  $\mu$ M カドミウム + 0.5 mM Spd についても検討した。比較的長期的なストレスの影響をみるために、塩については 10 日後に、カドミウムについては処理後 21 日後に培養シュートの長さや重さについて調査した。培養シュートの長さや重さについては、ストレス期間中の成長量として計算するとともに、遊離型のポリアミン、グルタチオン（GSH）、MDA、プロリンの量を測定した。また、SOD と GR 活性についても測定した。

#### **（3）SPDS 遺伝子（スペルミジン）のシグナル伝達経路の解明**

SSH 法および DD 法のために、野生型のセイヨウナシおよび SPDS をセンス方向で導入した #32 の培養シュートを用いた。シュートの長さが 5-6cm の時に、それぞれの培養シュートから RNA 抽出を行ない、それぞれ SSH 法は Ban et al. (2007) および Clonetech 社のプロトコルに、DD 法は GeneFishing 社のプロトコルに従って、#32 と野生型の間で発現強度に差のある遺伝子の特定と同定を行った。さらに、ニホンナシ「豊水」由来の cDNA マイクロアレイを利用して、野生型と SPDS センス導入系統（#32）あるいは野生型と SPDS アンチセンス導入系統（A22）間で、発現に差異のある遺伝子群を網羅的に解析した。ニホンナシとセイヨウナシは遺伝子配列の相性が極めて高いことから、セイヨウナシにおいてもニホンナシの EST から設計したマイクロアレイが利用可能である。材料には、野生型のセイヨウナシ、#32 および A22 の培養シュートを用いた。継代培養 10 日後に、それぞれの培養シュートから total RNA を抽出

し、Agilent 社の一色法プロトコルに従い、シアニン 3-CTP 色素でラベル化した cRNA を合成した。マイクロアレイ解析には、独自に設計した前述のニホンナシカスタムアレイ（Agilent 社）を用いた。ラベル化されたターゲット RNA のハイブリダイゼーション後に、DNA マイクロアレイスキャナによるスポット抽出と分析を行った。得られたデータを Subio ソフトウェアで解析し、野生型と比較して SPDS センス導入系統、あるいはアンチセンス導入系統で発現が高まっている遺伝子群、逆に低下している遺伝子群を特定した。

#### **4. 研究成果**

##### **（1）野生型への Spd の処理と、SPDS を過剰発現させたセイヨウナシへのシクロヘキシルアミン（CHA）処理が抗酸化活性に及ぼす影響**

野生型に対し、外生的に Spd を与えると、塩、浸透圧のいずれのストレスにおいても、全てにおいて有意ではないものの過酸化水素の量は減少し、MDA 値も小さくなる傾向であった。一方、プロリンの含量は塩ストレスでは、Spd 処理により高まる傾向であったが、浸透圧ストレスではほとんど変化しなかった。このように有意差は認められないものの、総じて Spd により、酸化状態が改善されていることが推察された。

SPDS 過剰発現組換え体（#32）において、SPDS の阻害剤である CHA を処理すると、過酸化水素含量は増加し、それにともない MDA 値も上昇する傾向が認められた。プロリンの含量は塩ストレスでは減少の、浸透圧ストレスでは増加の傾向であったが、有意ではなかった。

##### **（2）SPDS 遺伝子をアンチセンス方向で導入したセイヨウナシ組換え体系統（SPDS アンチセンス導入系統）における環境ストレス耐性**

アンチセンス組換え体候補として、無作為に選んだ 7 個体では色々な発現抑制レベルの個体が得られた。7 つの候補個体から SPDS の抑制程度が異なる 3 系統（A21、A22、A33）を選んで、野生型とともに、さらなる解析に用いた。サザンブロッティング解析から、A21 は一遺伝子の、A22 と A33 では複数の SPDS が導入されていた。アンチセンス系統における Spd 含量を解析したところ、予想通り Spd の含量が野生型に比べて減少していた。A21、A22、A33 の Spd の含量は、ストレスフリーの培地に移植して 10 日後で野生型のそれぞれ 66.4-69.3%、42.6-44.2%、54.8-54.7%であった。このように Spd 含量の低下した組換え体の作出に成功した。

ストレス下での生育の状態をシュートの伸長量と重さの増加量の変化で評価した。ストレスフリー下に比べてストレス処理はアンチセンス系統と野生型において明らかな

伸長量の抑制を引き起こした。アンチセンス系統の塩ストレス下での伸長量はストレスフリー時の 30%に過ぎず、カドミウムストレスでは、50%であった。アンチセンス系統におけるシュートの伸長量は明らかに Spd の投与により増加し、Spd を高めることでストレスが軽減できることが示唆された。シュートの重さの増加についても同様の結果であった (図 1)。

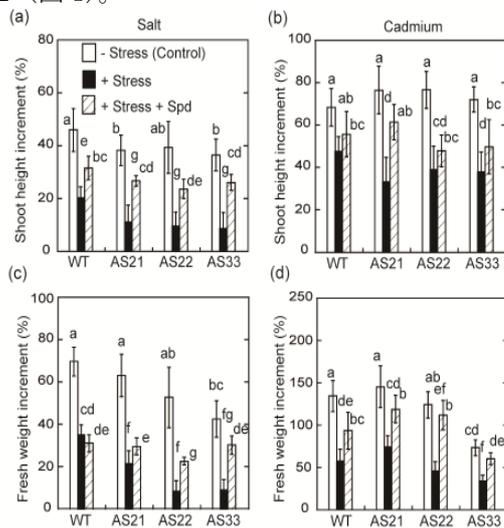


図 1 アンチセンス個体の塩 (a, b) またはカドミウム (c, d) ストレス下におけるシュートの純増加率 (a, c)、新鮮重の純増加率 (b, d) 異なる符号は  $P < 0.05$  で有意

ストレス下での組換え体の Spd 含量は大きく変化した。塩ストレスは野生型の顕著に Spd の量を減少させたが、野生型よりも量的には低いもののアンチセンス系統では有意な変化はなかった。塩ストレスはアンチセンスにおけるプトレシン (Put) の集積を有意に抑制したが野生型では有意な変化は認められなかった。スペルミン (Spm) に関しては塩ストレス下ではアンチセンス系統で増加傾向にあり、全ポリアミンの量は野生型に比べて有意に低かった。塩ストレス下のアンチセンス系統に Spd を投与すると、ポリアミン量は増加した。Spd の投与により Put、Spd、全ポリアミン含量は顕著に高くなった。一方、カドミウムストレスもポリアミン含量に大きな変化をもたらした。アンチセンス系統の Spd と全ポリアミン含量は野生型よりも低く、そこに Spd を投与すると Spd 含量は大きく上昇した。Spd 投与後には、A21 を除いて、野生型とアンチセンス系統の間には Spd と全ポリアミン含量に大きな差異はみられなかった。アンチセンス系統の抗酸化反応を明らかにするため、GSH の量と GR、SOD 活性について解析した。ストレスフリー下に比べて塩ストレスはアンチセンス系統と野生型ともに有意な GSH の増加をもたらした。しかしなが

らアンチセンス系統の GSH の増加は野生型に比べて小さかった。Spd の投与により大きく改善され、例えば A21 では、GSH の 80%の上昇が認められた。一方、カドミウムストレスでは全てにおいて GSH の減少が観察された。GSH の状態は Spd の投与により、すべての系統ではないが、改善されたことから Spd が GSH のカドミウムの隔離能力を高めている可能性が示唆された。アンチセンス系統と野生型の GR 活性には差異は認められなかった。塩ストレスはアンチセンス系統において GR の明確な変化を引き起こさなかったが、野生型では増加した。逆にカドミウムストレスはそれぞれのストレスフリー時に比べて GR 活性の大幅な抑制を引き起こした。特に A21 と A22 の GR 活性は野生型よりも有意に低かった。ストレスの種類に関わらず Spd の処理はアンチセンス系統と野生型の GR 活性を高めた。さらに、Spd 投与後の GR 活性にはアンチセンス系統と野生型で有意な差異は認められなかった。アンチセンス系統の SOD 活性はストレスフリー下でも野生型よりも低かった。同じ傾向がストレス処理でも観察された。塩ストレス下では、SOD 活性は一般的に増加したが、カドミウムストレスでは減少した。Spd を投与すると、多くの場合、野生型よりは低いものの、アンチセンス系統の SOD 活性は有意に上昇した。膜のリン脂質の酸化状態の指標である MDA は、ストレスフリー下ではアンチセンス系統と野生型の間には有意な差異はなかった。しかし、MDA 値の増加は両ストレス処理により特にアンチセンス系統において顕著となった。外生的な Spd 処理により、アンチセンス系統の MDA 値は両ストレス下で著しく減少した。野生型でも MDA 値の減少がみられた。プロリン含量は、ストレスフリー下では、全ての系統において有意な差異はなかった。しかし、塩またはカドミウムストレスにより、アンチセンス系統、野生型ともにプロリン含量は上昇した。ただし、アンチセンス系統の増加は野生型よりも小さかった。Spd の投与により、アンチセンス系統と野生型のプロリン含量は顕著に増加し、全ての系統で同じレベルとなった。塩やカドミウムストレス下でのポリアミンのストレス軽減作用を確かめるためにポリアミン量と抗酸化酵素活性、GSH 量、プロリン量、MDA 値との関係について相関係数を求めた。塩ストレス下では Spd 含量と GR 活性、SOD 活性、GSH 量、プロリン量の間には有意な正の相関が認められ、有意な負の相関が Spd と MDA 値間にみられた。同じ傾向が Put 含量と全ポリアミン含量についても得られた。逆に Spm 含量とこれらの値には低い相関係数しか得られなかった。カドミウムストレスにおいてもこれらの値は Spd 含量と全ポリアミン含量の間で認められた。Put も相関関係を示したが、Spd の

場合に比べて低い値であった。しかし、Spmとこれらの値には低い相関係数しか得られなかった。

### (3) SPDS 遺伝子 (スperlミジン) のシグナル伝達経路の解明

定法に従い SSH 法を行った結果、メタルチオネイン様遺伝子、リンゴの発現遺伝子 (CN894649)、Dnaj、グリシンリッチプロテイン等が SPDS を導入して過剰発現している #32 の組換え体で発現が高まっていることが明らかとなった。しかし、#32 で誘導されている遺伝子として選び出したなかで、約 60% 程度が SPDS であった。この結果は当然であったが、非常に効率が悪いので、SSH 法はここで中止することとした。DD 法により、野生型と #32 で、増幅濃度の異なる 42 種類の遺伝子が得られた (図 2)。

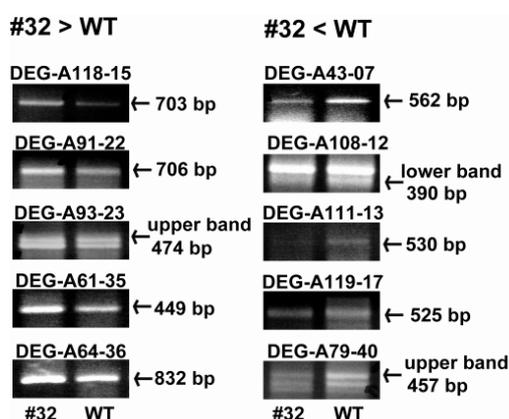


図 2 DD 法により組換え体 (#32) で発現が高い、あるいは低い遺伝子の事例

このようにして単離した遺伝子のサイズとホモロジー検索を行い、10 種類の遺伝子 (5 個は #32 で誘導、残る 5 個は抑制されているもの) を選抜した。これらにはメタルチオネイン (DEG-A118-15)、プロリンリッチタンパク質 (DEG-A91-22)、RAV 転写因子 (DEG-A93-23)、キシログルカン糖転移酵素 (DEG-A64-36)、デハイドリン (DEG-A108-12)、タウマチン様タンパク質 (DEG-A79-40) 等のストレス応答に関係すると推定される遺伝子が含まれていた。DD 法により単離したこれら遺伝子が本当に想定通りの発現パターンを野生型と #32 で示すかを確認するために、定量 PCR を行ったところ、想定通りの発現差が得られたことから DD 法は再現性と信頼性の高い手法であることが明らかとなった。続いて選抜した 10 種類の遺伝子について、塩またはカドミウムストレス下での発現について、野生型と #32 のそれぞれで解析したところ、DEG-A118-15 と DEG-A61-35 は塩、カドミウム処理した #32 と野生型の両方で発現が誘導されたが、野生型よりも #32 において、

その誘導程度は大きかった。DEG-A19-22 は #32、野生型の塩ストレスで誘導されたが、この発現はカドミウムストレスでは抑制される傾向がみられた。DEG-A93-23 と DEG-A64-36 は DEG-A91-22 とは逆の発現パターンを示した。それらはカドミウムストレス下の #32 で大いに誘導されたが、塩ストレスでは抑制された。DEG-A43-07、DEG-A108-12、DEG-A111-13、DEG-A119-17、そして DEG-A79-40 は両ストレス下の #32 で誘導されたが、野生型では変化するもののその変動幅は小さかった。興味深いことに全て 10 種類の遺伝子はストレスの種類に関わらず、野生型よりも #32 で発現が高かった。

11, 259 種類の遺伝子を搭載したニホンナシ「豊水」由来の cDNA マイクロアレイ解析により、野生型と #32 あるいは野生型と A22 間で、発現に差異のある遺伝子群を網羅的に解析した。継代培養 10 日後に、野生型と比較し #32 で発現量が 8 倍以上変化していた遺伝子は 65 種類であった。発現に 8 倍以上の変動が確認された遺伝子の中で、発現が誘導された遺伝子は 60 種類、抑制された遺伝子は 5 種類であり、変動した遺伝子のほとんどで発現が誘導されていた。発現が最も誘導された遺伝子では、野生型に比べ発現量は約 260 倍となったのに対し、発現が最も抑制された遺伝子であっても、野生型の発現量の約 1/20 程度と、変動の幅にも違いがみられた。これらの 65 種類の遺伝子について、BLAST 解析によりシロイヌナズナの遺伝子リスト (TAIR9) と相同性を検索したところ、43 種類については相同性の高い遺伝子が見つかった。その遺伝子の中には、生体防御として知られるエンドキチナーゼなどが含まれていたが、既知のストレス応答遺伝子と相同性の高い遺伝子はみだせなかった。今回解析したマイクロアレイには、パーオキシダーゼと相同性の高い遺伝子も含まれていたが、変動幅が小さく最大でも 3 倍程度であった。また、メタルチオネイン様タンパク質や Universal stress protein も同様に、それほど大きな変動をしていなかった。同様に、野生型と比較し A22 で発現量が 8 倍以上変化していた遺伝子を調べたところ、わずか 24 種類であった。24 種類の遺伝子の中で、A22 で発現が誘導された遺伝子が 13 種類、発現が抑制された遺伝子が 11 種類であった。A22 で発現が変動した遺伝子では、わずか 8 種類の遺伝子でのみしかシロイヌナズナの遺伝子と相同性が認められなかったが、その中にはパーオキシダーゼと相同性の高い遺伝子が含まれていた。

今回解析に用いたニホンナシのマイクロアレイは、定量 PCR と同様な発現パターンを検出できることを確認している。野生型と比較して、遺伝子組換え系統で発現変動幅の大

きな遺伝子群には、既知のストレス応答遺伝子と相同性の高い遺伝子は含まれていなかった。しかしながら、相同性検索から機能を推定できなかった遺伝子も多く含まれていることから、これまでに見つかっていない新規のストレス耐性遺伝子が含まれている可能性も示唆された。

## 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 Xiao-Peng Wen, Yusuke Ban, Xiao-Ming Pang and Takaya Moriguchi. (2011) Identification of differentially expressed genes potentially related to stress tolerance in a transgenic line of European pear over-expressing an apple spermidine synthase gene (*MdSPDS1*). J. Hort. Sci. Biotechnol. 査読有 86: 146-152.

② Xiao Peng Wen, Yusuke Ban, Horomichi Inoue, Narumi Matsuda, Masayuki Kita and Takaya Moriguchi. (2011) Antisense inhibition of a *spermidine synthase* gene highlights a role of polyamines for stress alleviation in pear shoots subjected to salinity and cadmium. Environ. Exp. Bot. 査読有 72: 157-166.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森口 卓哉 (MORIGUCHI TAKAYA)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・上席研究員  
研究者番号：80343945

### (2)研究分担者

寺上 伸吾 (TERAGAMI SHINGO)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・研究員  
研究者番号：20507595  
中島 育子 (NAKAJIMA IKUKO)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・主任研究員  
研究者番号：80355362

### (3)連携研究者

井上 博道 (INOUE HIROMICHI)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・主任研究員  
研究者番号：40370556