

## 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4月6日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380063

研究課題名（和文）植物の生体防御にはたすポリアミンの分子基盤の解明

研究課題名（英文）Exploration of molecular bases of polyamine's defensive roles against environmental stresses in plants

研究代表者

草野 友延 (KUSANO TOMONOBU)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：40186383

研究成果の概要（和文）：植物においてもポリアミンは、細胞分裂が盛んな細胞や生殖細胞に多く含まれることから、細胞分裂、成長そして分化等のプロセスで機能するとされてきた。ポリアミン合成系遺伝子の発現は、塩や乾燥といった非生物学的ストレスや非病原性微生物の感染時に誘導されることから、ポリアミンはこうした環境ストレスに対する生体防御においても機能することが示唆されていた。研究実施者は、テトラアミンであるスペルミンとサーモスペルミンを合成できない変異体が塩や乾燥ストレスに高感受性となること、また細胞間隙に蓄積したスペルミンが病原菌感染時特異的遺伝子群の発現を誘導するシグナル分子として機能することを示してきた。本研究で、テトラアミンの2成分を迅速に定量的に分離する手法を確立し、スペルミンが上記ストレス時の防御に機能することを明らかにした。また、シロイヌナズナ植物体内でこれら2つのテトラアミンの合成部位が分けられているかについても、各合成酵素遺伝子のプロモーター解析から示した。上述のスペルミンシグナル伝達経路には、ポリアミンの分解に関わるポリアミン酸化酵素が関与することが薬理的手法により示唆されていた。そこで、シロイヌナズナに5種類あるポリアミン酸化酵素遺伝子の発現パターン、このうちの4種類の組換え酵素のポリアミン基質の特異性等についても明らかにした。従来、植物のポリアミン酸化酵素は末端代謝系と呼ばれる反応を触媒すると考えられていたが、シロイヌナズナのポリアミン酸化酵素は、いずれも動物細胞と同じ逆変換代謝系の反応を触媒することを示した。単子葉植物のイネには、7種類のポリアミン酸化酵素遺伝子が存在するが、このうち少なくとも3種類の遺伝子産物は、シロイヌナズナと同じく逆変換代謝系の反応を触媒することを明らかにした。イネは、末端代謝系を触媒する酵素の存在が示唆されており、この点についても検討を進めている。スペルミン合成酵素遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナとスペルミン合成酵素遺伝子を欠損しているシロイヌナズナを用いて、熱ショック応答反応においても重要な役割を担っていることを示した（論文投稿中）。スペルミンは、小胞体ストレス応答反応における鍵遺伝子のひとつ *bZIP60* の発現を誘起することを報告してきたが、本研究により *IRE1* がもつ RNase 活性を高め、*bZIP60* 転写物をスプライシングし、活性型の *bZIP60* タンパク質の産生をもたらす事も示した（投稿準備中）。外部から加えたサーモスペルミンは、スペルミン応答遺伝子群のほぼ全てを誘導する活性を持ち、シロイヌナズナでのキュウリモザイクウイルスの増殖を著しく抑制する活性を持つことも明らかにした。この発見は、ポリアミン骨格をもつ化合物が新たな植物成長化学調節物質となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：In plants, polyamines function in cell division, growth and differentiation because the polyamine contents were found to be higher in actively dividing cells and in reproductive organs. Expression of the genes encoding polyamine biosynthesis enzymes is often enhanced in abiotic and biotic stress condition. Thus polyamines are expected to function for defending host plants against various environmental stresses. Before starting this project, the applicant did two important findings in plant polyamine research; i.e., (1) spermine-deficient mutant Arabidopsis plant became hypersensitive to

high salinity and dehydration stresses, suggesting that spermine has a defensive role against these two stresses. (2) spermine has a signaling role to evoke the expression of a subset of genes involved in pathogen defense. In December, 2007, a research group reported that *ACL5* gene which was previously thought to encode a spermine synthase, encodes a thermospermine (an isomer of spermine) synthase. With this background, first we established a method to separate those two tetraamines, spermine and thermospermine. Second we analyzed the spatio-temporal expression of spermine synthase gene and thermospermine synthase gene in *Arabidopsis* by monitoring  $\beta$ -glucuronidase reporter gene expression under the promoters of these genes in *Arabidopsis*. In spermine-signaling pathway, the involvement of polyamine oxidase(s) is strongly suggested. Third, therefore, characterization of polyamine oxidase (PAO) genes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* was performed. In *Arabidopsis*, four of the PAO genes were cloned into *Escherichia coli* expression vector. All of the recombinant PAOs catalyzed the back-conversion reaction but not the polyamine terminal catabolism reaction. Rice genome contains 7 PAO genes. Of them, at least 3 PAO genes catalyzed the polyamine back-conversion reaction, strongly suggesting that rice plant has two catabolic pathways for polyamines. Fourth, spermine has a defensive role in heat shock response (submitted, revision prepared). We also demonstrated that *bZIP60*, one of the master genes in the unfolded stress response (UPR), is upregulated by spermine. The product of *bZIP60* resides in endoplasmic reticulum (ER) in physiological condition, while, once UPR is triggered, it is shown that *bZIP60* transcript is spliced by RNase activity of IRE1. Fifth, *bZIP60* transcript is spliced by spermine and the resulting transcript produces the active bZIP60 protein which targets into the nucleus (manuscript in preparation). In this activation process, IRE1 is also involved. Lastly we showed that thermospermine has a similar signaling activity to induce the defense genes and inhibits phyto viral particle multiplication as spermine does.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
平成22年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成23年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物、ストレス、ポリアミン、生体防御、スペルミン

#### 1. 研究開始当初の背景

植物ポリアミン量が種々の環境ストレス時に変動すること、各合成系の遺伝子の発現が変化することも明らかになっていた。本研究開始時、ポリアミン研究における研究実施者の独自性は、(1)非病原ウイルス感染時におけるスペルミンが起点となるシグナル伝達

経路の発見、そして(2)スペルミン合成欠損株が、塩ストレスおよび乾燥ストレスに高感受性になること、の2点にあった。2007年12月号の *FEBS Letters* に、シロイヌナズナの *ACL5* 遺伝子はスペルミン合成酵素遺伝子ではなく、異性体であるサーモスペルミンを合成する遺伝子であることが報じられた。こう

した研究開始当初の状況から、まず2つのテトラアミンを分離・定量するハイスループット解析法の確立が急がれた。

## 2. 研究の目的

ポリアミンは、アミノ基を2つ以上もつ脂肪族炭化水素の総称であるが、植物における主要な成分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アミンのスペルミンとサーモスペルミンである。これらのポリアミンは、植物の成長や分化ばかりでなく、様々なストレス(病原菌などの攻撃、高塩、乾燥、極温など)に应答して、ポリアミン代謝を亢進することが知られている。さらに、ポリアミン合成系の酵素遺伝子を過剰発現した植物は、こうした環境ストレスに対して耐性となることが明らかとされているが、それ以上に踏み込んだ解析がなされていないのが現状である。研究実施者らは、病原菌感染時のポリアミンの働きについての研究を行い、ポリアミン合成系の最終産物であるスペルミンが、多数の遺伝子群の発現を制御するシグナル分子として、過敏細胞死を含む病原菌抵抗性反応に大きく寄与することを明らかにした。また、塩や乾燥といった非生物学的ストレスにもスペルミンが重要な役割を持つ直接的な証明を行い、スペルミンは植物にマルチストレス耐性を付与する数少ない分子の一つであることを提唱している。本研究は、植物の生体防御反応におけるスペルミンの重要性を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナを主な植物材料として、ポリアミン合成酵素およびポリアミン分解に関与する遺伝子の過剰発現体あるいは、当該遺伝子の欠損変異体を用いて研究を進めた。

(2) こうして得られた変異体におけるポリアミン含量、そして各遺伝子の発現量についても、高速液体クロマトグラフィーによる解析や定量的 RT-PCR 法にて調べた。

(3) 大腸菌におけるタンパク質産生系を持ちいてポリアミン酸化酵素を産生・精製し、各種ポリアミンの基質特異性についても解析した。

(4) シロイヌナズナのポリアミン酵素遺伝子の欠損変異体の多重変異体については、交雑を繰り返して作成した。

(5) ポリアミン分解の反応様式についても高速液体クロマトグラフィー解析により行なった。

## 4. 研究成果

本研究の成果を箇条書きで記す。

(1) テトラアミンであるスペルミンとサー

モスペルミンの分離・定量法を開発した。

(2) テトラアミンであるスペルミンとサーモスペルミン合成酵素遺伝子のプロモーター解析を行い、両テトラアミンの合成される部位の違いを明らかにした。

(3) スペルミンにはシグナル分子としての機能があることを明らかにしたが、このシグナル伝達経路にはポリアミン酸化酵素の関与が強く示唆されたため、シロイヌナズナに存在する5種類のポリアミン酸化酵素遺伝子および遺伝子産物の特徴づけを行なった。

(4) 単子葉であるイネの7種類のポリアミン酸化酵素遺伝子、およびこのうちの3種類のポリアミン酸化組換え酵素の特徴づけを行い、単子葉植物で初めてポリアミン逆変換反応を触媒する酵素の存在を示した。

(5) 外部から加えたサーモスペルミンにはスペルミンと同様な遺伝子発現を誘導する活性を持つことを示した。サーモスペルミンは、キュウリモザイクウイルスの増殖を抑制する活性をもつことも示した。

上記5項目については、論文発表を行なった。

(6) スペルミンが熱ショック应答時にも生体を防御する役割を担うことを明らかにした。(改定稿を準備中)

(7) スペルミンが小胞体ストレス应答時の鍵転写因子をコードする *bZIP60* 遺伝子の発現を誘導することを報告してきたが、今回、IRE1 のもつ RNase 活性によりスプライシングされ、活性型の *bZIP60* タンパク質が作られる過程もスペルミンが活性化することを明らかにした。(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9件)

(1) Sagor GHM, Takahashi H, Niitsu M, Takahashi Y, Berberich T, Kusano T (2012)

Exogenous thermospermine has an activity to induce a subset of the defense genes and restrict cucumber mosaic virus multiplication in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 査読有 DOI 10.1007/s00299-012-1243-y

(2) Ono Y, Kim DW, Watanabe K, Sasaki A, Niitsu M, Berberich T, Kusano T, Takahashi Y

(2012) Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back

conversion. *Amino Acids* 査読有 42: 867-876

(3) Tateda C, Kusano T, Takahashi Y (2012) The *Arabidopsis* voltage-dependent anion channel 2 is required for plant growth. 査読有 *Plant Signaling & Behavior* 7: 31-33

(4) Tateda C, Watanabe K, Kusano T, Takahashi Y (2011) Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 査読有 62: 4773-4785

(5) Sagor GHM, Yamaguchi K, Watanabe K, Berberich T, Kusano T, Takahashi Y (2011) Spatio-temporal expression analysis of *Arabidopsis thaliana* spermine synthase gene promoter. *Plant Biotechnol* 査読有 28: 407-411

(6) Takahashi Y, Cong R, Sagor GHM, Niitsu M, Berberich T, Kusano T (2010) Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 査読有 29: 955-965

(7) Naka Y, Watanabe K, Sagor G.H.M, Niitsu M, Pillai A, Kusano T, Takahashi Y (2010) Quantitative analysis of plant polyamines including thermospermine during growth and salinity stress. *Plant Physiol Biochem* (Polyamine special issue) 査読有 48:527-533

(8) Sagor G.H.M, Cong Run-Zi, Berberich T, Takahashi H, Takahashi Y, Kusano T (2009) Spermine signaling in defense reaction against avirulent viral pathogen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 査読有 4:316-318

(9) Mitsuya Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Matsumura H, Takahashi H, Terauchi R, Kusano T (2009) Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *J Plant Physiol* 査読有 166:626-643

[学会発表] (計 19 件)

国内発表 (計 15 件)

(1) 土橋隼人, Sagor GHM, 新津勝, 高橋芳弘, Thomas Berberich, 草野友延: T-DNA 挿入 pao 変異体植物の外部投与ポリアミンへの反応性に基づくシロイヌナズナのポリアミン酸化酵素の基質特異性への考察 日本ポリアミン学会 第 3 回年会 さいたま市民会館 おおみや小ホール 2012, 1, 26-27

(2) Sagor GHM, 金東煜, 新津 勝, 佐々木彩乃, Berberich Thomas, Howell H. Stephen, 草野友延: シロイヌナズナ小胞体ストレス応答の鍵転写因子 bZIP60 のポリアミンによる活性化機構. 日本ポリアミン学会 第 3 回年会 さいたま市民会館 おおみや小ホール 2012, 1, 26-27

(3) 星陽子, 金東煜, 新津勝, Berberich Thomas, 草野友延: ポリアミンによるシロイヌナズナの葉の老化抑制におけるオートファジーの役割. 日本ポリアミン学会 第 3 回年会 さいたま市民会館 おおみや小ホール 2012, 1, 26-27

(4) 金東煜, 小野裕介, 渡辺佳奈子, 佐々木彩乃, 新津勝, Berberich Thomas, 草野友延, 高橋芳弘: イネにおけるポリアミン酸化酵素の特徴づけ. 日本農芸化学会東北支部会 第 146 回 山形大学農学部 2011, 10, 8

(5) 金東煜, 小野裕介, 渡辺佳奈子, 佐々木彩乃, 新津勝, Berberich Thomas, 草野友延, 高橋芳弘: 植物におけるポリアミン酸化酵素の特徴づけ. 第 10 回 ポリアミンと核酸の共進化(東京) 慈恵医大 2011, 9, 8

(6) Sagor GHM, 渡邊加奈子, 新津勝, Berberich T, 草野友延, 高橋芳弘: シロイヌナズナの 5 種のポリアミン酸化酵素の

- 特徴づけ. 日本農芸化学会 2011 年度大会(京都) 京都女子大学 2011, 3, 25-28
- (7) 佐々木彩乃, 小野裕介, 渡邊加奈子, Sagor GHM, Berberich T, 新津勝, 草野友延, 高橋芳弘: シロイヌナズナおよびイネのポリアミン酸化酵素遺伝子の分子生物学的解析. 第 52 回 日本植物生理学会年会(宮城) 東北大学 川内北キャンパス 2011, 3, 20-22
- (8) Sagor GHM, 新津勝, 草野友延, 高橋芳弘: シロイヌナズナにおける熱ショックストレスに対するスペルミンの防御的役割. 日本ポリアミン学会 第 2 回年会 帝京大学 宇都宮キャンパス 2011, 1, 27-28
- (9) 小野裕介, 佐々木彩乃, 新津勝, 草野友延, 高橋芳弘: イネのポリアミン酸化酵素遺伝子の特徴づけ. 日本ポリアミン学会 第 2 回年会 帝京大学 宇都宮キャンパス 2011, 1, 27-28
- (10) Sagor GHM, Cong R, 新津勝, Berberich T, 草野友延, 高橋芳弘: シロイヌナズナにおける 5 種のポリアミン酸化酵素の解析. 日本農芸化学会東北支部・北海道支部合同支部会 東北大学農学部 2010, 9, 27-28
- (11) Sagor GHM, Cong R, 新津勝, Berberich T, 草野友延, 高橋芳弘: 植物におけるポリアミンの分解: シロイヌナズナにおけるポリアミン酸化酵素の特徴づけ. 「ポリアミンと核酸の共進化」研究会 東京慈恵会医科大学 2010, 9, 11
- (12) 渡邊佳奈子, 仲友紀恵, Sagor GHM, 新津勝, Pillai MA, 草野友延, 高橋芳弘: サーモスペルミンの植物からの定量的検出法. 「ポリアミンと核酸の共進化」研究会 東京慈恵会医科大学 2010, 9, 11
- (13) 草野友延 (記念講演)「植物ポリアミン研究の進歩」日本ポリアミン学会 設立総会・記念シンポジウム 東京慈恵会医科大学 2010,01,23
- (14) 渡邊佳奈子, 仲友紀恵, Sagor GHM, 新津勝, Pillai MA, 草野友延, 高橋芳弘: スペルミン異性体であるサーモスペルミンの植物からの検出と定量分析. 第 144 回日本農芸化学会東北支部会〔岩手〕いこいの村&岩手大学 2009,10,30-31
- (15) 仲友紀恵, 渡邊佳奈子, Sagor G.H.M. , 新津勝, Pillai M.A., 草野友延, 高橋芳弘: 二つのテトラアミン異性体であるスペルミンとサーモスペルミンの HPLC による定量分析手法の確立. 植物化学調節学会 44 回大会〔仙台〕東北大学片平キャンパス 2009,10,29-30
- 国際学会(計 4 件)
- (1) Kusano T, Ono Y, Kim DW, Watanabe K, Sasaki A, Niitsu M, Takahashi Y, Berberich T: Polyamine back conversion catalyzed by three polyamine oxidases in *Oryza sativa*. COST FA0605 Limassol ,Cyprus, November 17-19, 2011 (Poster)
- (2) Kusano T, Kim DW, Ono Y, Watanabe K, Sasaki A, Niitsu M, Takahashi Y: Three polyamine oxidases catalyze polyamine back conversion in *Oryza sativa*. Gordon Research Conference (Polyamine). Waterville Valley, New Hampshire, USA, June 19-24, 2011 (Poster)
- (3) Takahashi Y, Conz RZ, Sagor GHM, Niitsu M, Berberich T, Kusano T: Molecular biological and biochemical characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. 2010 International Polyamine Conference June 14-18, 2010

Shizuoka, Japan (Poster)

- (4) Takahashi Y, Naka Y, Watanabe K, Sagor GHM, Niitsu M, Pillai A, Kusano T: High-throughput analysis of plant polyamines including thermospermine during growth and salinity stress. 2010 International Polyamine Conference June 14-18, 2010 Shizuoka, Japan (Oral, invited)

[図書] (計2件)

1. 舘田知佳、草野友延、高橋芳弘：植物ミトコンドリア VDAC の病原菌防御における役割、化学と生物 2010：296-297
2. Kusano T, Tateda C, Berberich T, Takahashi Y (2009) Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. Plant Cell Reports 28 (9) 1301-1308 審査有、総説

[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

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/outou/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

草野 友延 (KUSANO TOMONOBU)  
東北大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号：40186383

### (2) 研究分担者

高橋 芳弘 (TAKAHASHI YOSHIHIRO)  
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：20390891

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：