様式Ｃ－１９

# 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２１日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21580111
研究課題名（和文）　植物細胞内シグナル伝達物質としての cGMP/NO の機能解析

研究課題名（英文）　Functional analysys of cGMP/NO as signal transducers in plant cells

研究代表者
山形　裕士（YAMAGATA HIROSHI）
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：00159203

研究成果の概要（和文）：植物におけるサイクリック GMP（cGMP）や一酸化窒素（NO）の機能は不明な点が多い。本研究では、cGMP/NO による植物遺伝子発現調節機構を解析した。シロイヌナズナの cGMP/NO 応答性の 2 種類の遺伝子のプロモーター中に cGMP および NO 応答性シスエレメントを決定した。その結果、cGMP と NO 応答性配列が異なることを明らかにし、cGMP と NO のシグナル伝達が異なることを示した。ダイズのカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター中の UnitI 配列が cGMP 応答性シスエレメントであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The role of cGMP and NO in plant cells is not well understand. The mechanisms of signal transduction of cGMP/NO at the level of gene expression were studied.  cGMP/NO responsible elements in the promoters of cGMP/NO regulated genes in *Arabidopsis* were determined.  cGMP-responsible element was different from the NO-responsible element in both promoters, suggesting that cGMP and NO signal transduction pathway are different from each other.  Unit I sequence in the promoter of soybean chalcone synthase 8 gene was shown to be cGMP-dependent *cis*-element.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 2009 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総　計 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

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：情報伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 光合成関連遺伝子等、多くの植物遺伝子の発現は光によって調節されている。我々は、光受容体フィトクロームが介する光シグナル伝達機構を解析する中で、アントシアニンの生成やカルコン合成酵素遺伝子の発現がサイクリック GMP (cGMP)により誘導されることを初めて報告した。植物にも動物と同様に cGMP が存在することは既に証明されており、重要な働きが示唆されるが、動物において既に同定されている cGMP 合成酵素（グアニル酸シクラーゼ、GC）や cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素（PKG）が植物には同定されておらず、cGMP の合成機構と標的分子を含め、cGMP シグナル伝達の詳細な機構と cGMP の役割の全体像は未解明である。さ

らに、動物では GC が持つヘムに一酸化窒素（NO）が結合して GC が活性化されることが知られているが、植物においては cGMP シグナル伝達と NO の関連も不明である。

(2)我々は、最近、cGMP と NO が、ダイズにおいてイソフラボンやファイトアレキシンなどのフラボノイドの多くの合成系酵素遺伝子の発現を誘導することを見出し、遺伝子発現調節における cGMP の重要性を明らかにした。しかし、その機構の詳細は不明である。

２．　研究の目的

(1) 植物における cGMP/NO シグナル伝達機構はほとんど解明されていない。NO シグナル伝達のシロイヌナズナ変異株を単離、解析して新たな cGMP/NO シグナル伝達因子を同定する。

(2) cGMP/NO 応答性遺伝子のプロモーター解析により cGMP および NO 応答に関わるシスエレメントを同定し比較する。（cGMP と NO が同じシグナル伝達上の因子であれば、シスエレメントは同一であることが期待される）。

(3) シスエレメントに結合する転写因子を同定し、cGMP/NO シグナルによる植物遺伝子の転写活性化機構を探る。

(4) 新規 GC と PKG の候補を探索し、大腸菌で発現・精製して酵素の特性を詳細に解析し、植物におけるこれらの酵素の発見・同定を目指す。

(5) シロイヌナズナに上記の GC と PKG 候補 cDNA を導入した過剰発現株を作成し、これら酵素の生理機能を解明する。また、ダイズ培養細胞の GC 過剰発現ラインを作成し、フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現やフラボノイド量の変動を解析する。

３．研究の方法

(1) cGMP/NO シグナル伝達変異株の単離と解析

シロイヌナズナの cGMP/NO 応答性遺伝子のプロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子(*FFLUC*)の融合遺伝子をシロイヌナズナに導入し、cGMP/NO シグナル伝達経路変異株を同定する。具体的にはニコチアナミン合成酵素遺伝子(*AtNAS1*)およびフェリチン遺伝子(*AtFER1*)プロモーターと *FFLUC* の融合遺伝子をアグロバクテリウムを介する Flowral dip 法によりシロイヌナズナに導入し、cGMP/NO 処理でルシフェラーゼにより強く発光する形質転換株を微弱発光イメージングシステムを用いて選抜する。次に形質転換体の種子を EMS で処理し、cGMP/NO 処理しても発光しない変異株を単離する。戻し交配後、変異の原因遺伝子の染色体上へのマッピングとポジショナルクローニングを行い変異の原因遺伝子を同定する。また、当該野生型遺伝子の導入（相補試験）による表現型の復帰を確認する。これにより、新規 cGMP/NO シグナル伝達因子を同定する。

(2) cGMP/NO 応答性遺伝子の cGMP/NO 依存的転写調節機構の解明

シロイヌナズナおよびダイズ由来の cGMP/NO 応答性遺伝子プロモーター::*GUS* 融合遺伝子を植物細胞のプロトプラストに導入し、GUS の一過的発現を測定するプロモーター解析システムを用い、cGMP および NO 応答性シスエレメントを同定して比較解析する。さらに、cGMP/NO 応答シスエレメントに結合する転写因子を酵母 one-hybrid 法によりクローニングし、cGMP/NO シグナル伝達系の標的転写因子を解明する。

(3)GC と PKG 候補遺伝子産物の特性解析

新たに植物の GC および PKG の候補を検索してそれらの全長または部分ドメイン cDNA 断片を発現ベクターに導入し大腸菌と形質転換し、いくつかの発現タンパク質を精製し、酵素学的特性を詳細に検討する。

(4) GC を過剰発現するダイズ培養細胞株の作成と解析

ダイズ光独立栄養培養細胞 (SB-P 細胞、当研究室で維持)を形質転換し、GC の過剰発現株を確立する。この細胞の cGMP 含量（イムノアッセイ）、各種フラボノイド含量（HPLC 分析）、フラボノイド合成系酵素遺伝子等の光応答性遺伝子の発現（ノーザン分析と定量的 PCR）等を野生株細胞と比較し、光シグナル伝達における GC の機能を明らかにする。

４．研究成果

cGMP および NO の植物細胞内シグナル伝達における機能の解明を目的とし、特に遺伝子発現調節機構解析を中心に以下の研究を実施した。

(1) cGMP/NO シグナル伝達変異株の単離と解析

NO シグナル伝達のシロイヌナズナ変異株を単離するために、NO 応答性遺伝子プロモーターとホタルルシフェラーゼの融合遺伝子を作成した。強い cGMP/NO 応答性を確認したシロイヌナズナのニコチアナミン合成酵素遺伝子(*AtNAS1*)およびフェリチン遺伝子(*AtFER1*)プロモーター中の転写開始点をプライマー伸張法で決定し、*AtNAS1* は 3 箇所、*AtFER1* は 1 箇所の転写開始点を持つことを

明らかにした。次に、これらのプロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子(*FFLUC*)を連結した融合遺伝子をシロイヌナズナに導入した。現在、形質転換体を選抜中である。

(2)シロイヌナズナ cGMP/NO 応答性遺伝子の cGMP/NO 応答性シスエレメントの解析

プロモーター解析を効率的に行うために、ホタルとウミシイタケのルシフェラーゼを用いる一過的遺伝子発現系（デュアルルシフェラーゼシステム）を確立した。

シロイヌナズナ T-87 細胞のプロトプラストに PEG 法で *AtNAS1::GUS* および *AtFER1::GUS* 融合遺伝子を導入し、GUS の発現が SNP（NO 発生剤）及び 8-Br-cGMP 添加により誘導されることを認めた。さらに種々の長さに 5'末端を欠失した各プロモーターの解析により cGMP および NO 応答に関わるシスエレメントを絞り込んだ。特に *AtNAS1* プロモーター中の NO 応答性シスエレメントを 13 塩基に絞り込みこの配列に結合する転写因子を推定した。両遺伝子とも cGMP 応答性配列と NO 応答性配列が異なっていたことからこれらの遺伝子発現を調節する cGMP と NO のシグナル伝達経路も互いに異なることを推定した。

さらに、*AtFER1* プロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子(LUC)の融合遺伝子を高発現するシロイヌナズナ T87 細胞形質転換株を確立し、NO と cGMP 処理による LUC 活性の上昇を認めた。この形質転換細胞を用いた薬理学的解析により、NO と cGMP のシグナル伝達経路が異なることを示した。この結果は上記の一過的遺伝子発現系で得た結果と一致した。

(3)ダイズカルコン合成酵素遺伝子の cGMP による発現調節

ダイズ SB-P 細胞中のカルコン合成酵素遺伝子（*CHS8*）の発現は cGMP により約 10 倍に増加すること、およびこの反応に新たなタンパク質合成を必要としないことを定量的 RT-PCR で示した。

また、SB-P 細胞プロトプラストに暗所下 PEG 法で cGMP 応答性の *GmCHR8::GUS* 融合遺伝子を導入する一過的発現系を確立し、GUS の cGMP による発現誘導を認めた。*CHS8* プロモーター中には、ダイズイソフラボン合成系酵素遺伝子の発現を促進する MYB 転写因子 GmMYB176 の結合配列が存在する。上記の一過的遺伝子発現系で解析したところ、この配列は cGMP 応答性を示さなかった。一方、*CHS8* プロモーター中の Unit1 配列が cGMP の標的配列であることが示唆された。これらの結果、GmMYB171 は cGMP シグナル伝達の標的転写因子ではないことが示唆された。

(4)グアニル酸シクラーゼおよび cGMP 依存性プロテインキナーゼの植物ホモログ遺伝子を大腸菌で発現・精製し、酵素の特性を詳細に解析したが、いずれも活性は検出されなかった。

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５件）


① 吹田憲治、小原達矢、矢野俊介、豊島美咲、<u>山形裕士</u>
大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子発現を調節する cGMP/NO シグナル伝達機構の解析, 大豆たん白質研究, 査読無, Vol. 13, 55-61 (2010).

② Nakagawa, M., Ueyama, M., Tsuruta, H., Uno, T., <u>Kanamaru, K.</u>, Mikami, B., and <u>Yamagata, H.</u>
Functional analysis of the cucumisin propeptide as a potent inhibitor of its mature enzyme.
J. Biol. Chem., 査読有, 285, 29797-29807 (2010).

③ Fujiwara, M., Dongliang, Li., Kazama, Y., Abe, T., Uno, T., <u>Yamagata, H.</u>, <u>Kanamaru,</u> K., and Itoh, R.
Further Evaluation of the Localization and Functionality of Hemagglutinin Epitope- and Fluorescent Protein-Tagged AtMinD1 in *Arabidopsis thaliana.*
Biosci. Biotechnol. Biochem., 73 (7), 1693-1697 (2009)

④Suita, K., Kiryu, T., Sawada, M., Mitsui, M., Nakagawa, M., <u>Kanamaru, K., and Yamagata, H.</u>, Cyclic GMP acts as a common regulator for the transcriptional activation of flavonoid biosynthetic pathway in soybean.
Planta, 査読有, 229, 2009, 403-413.

⑤ 渡辺和彦、杉本琢真、大塩哲視、吹田憲治、<u>山形裕士</u> (2009)
作物の抵抗性誘導．一酸化窒素の病害抵抗性への関与
作物栄養Ｖ, 査読無, 第２巻, 6, 58-68

〔学会発表〕(計 3 件)

① Atsuko Furukawa, Shunsuke Yasuda, Shinya Okuyama, Emiko Take, Mamoru Furuichi, Rena Azuma, Noriyuki Shibamoto, Tomohide Uno, Kengo Kanamaru, and Hiroshi Yamagata. Transcriptional control of fruit-specific expression of cucumisin and its application for transgenic plants that accumulate useful proteins in the fruit. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference (SOL & ICuGI 2011). Kobe Convention Center, 2011.11.30

② 小島志織, 山本俊佑, 能勢琢也, 朴杓允, 宇野知秀, 山形裕士, 金丸研吾. 色素体局在性脂肪酸合成律速酵素の発現と機能. 日本農芸化学会 2011 年度大会. 2011.3.27.

③ 山形裕士、大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子発現を調節する cGMP/NO シグナル伝達機構の解析.第 13 回不二たん白研究財団報告会,2010.6.1.

〔その他〕
ホームページ等
http:// www2.kobe-u.ac.jp/%7Eunotom/

６．研究組織

(1)研究代表者

山形 裕士 (YAMAGATA HIROSHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：00159203

(2)研究分担者

金丸 研吾 (KANAMARU KENGO)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90260025

(3)連携研究者

なし