

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14日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580403

研究課題名（和文） 大気中NO_xの植物バイタリゼーション制御遺伝子の決定と分子機構の理解

研究課題名（英文） Study on the genes and molecular mechanism of the plant vitalization effect of atmospheric nitrogen dioxide

研究代表者

高橋 美佐 (TAKAHASHI MISA)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：10294513

研究成果の概要（和文）：

二酸化窒素がシグナル的に植物バイオマス、器官サイズを増加させるバイタリゼーション効果について研究した。器官サイズの増加は、細胞分裂ではなく、細胞拡大に起因することが分かった。トランスクリプトーム解析により抽出された遺伝子の逆遺伝学的解析から、原因遺伝子 *Vital* 遺伝子を特定した。遺伝子発現量の経時変化において二酸化窒素存在否で有意な差を示す6個の細胞拡大遺伝子の共発現遺伝子を公開データベース ATTED II を用いて研究した。

研究成果の概要（英文）：

This work studied plant vitalization effect of nitrogen dioxide (PVEON) in *Arabidopsis thaliana*. PVEON more than doubled leaf size, which appeared to be attributable to cell expansion, but not to cell division. Reverse genetic study of genes identified by the transcriptome analysis revealed that a novel gene *Vital* is involved in the PVEON. Six genes controlling cell expansion differed significantly in temporal gene expression changes between presence and absence of nitrogen dioxide, and their coexpressed genes were analyzed using a gene database ATTED II.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：植物分子生理学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：シロイヌナズナ、二酸化窒素、トランスクリプトーム解析、植物バイタリゼーション、生長促進、細胞拡大、共発現解析、核内倍加

1. 研究開始当初の背景

二酸化窒素は、大気の微量成分の一つである。原始地球の大気は二酸化窒素を含まず、大気中二酸化窒素の出現は生命誕生の後、陸上植物が現れる数十億年前とされる。大気中

二酸化窒素は植物の進化に重要な役割を果たしてきたはずであるが、この視点からの研究は皆無に等しかった。

申請者は植物を環境基準レベル (50 ppb) の二酸化窒素に数週間～数ヶ月間曝露すると、光合成、窒素代謝、栄養素の取込みなどが全

般的に活性化され、器官サイズ、バイオマス収量が増加する (1.4~2.8 倍) することを世界に先駆けて発見し、この効果をバイタリゼーションと命名した (Takahashi et al., New Phytol. 2005)。一般的には、二酸化窒素は窒素源として利用されるが、いまの場合濃度が低く二酸化窒素の窒素源としての寄与は小さく (全窒素の 5%以下)、この効果は、二酸化窒素のシグナル作用によると考えられる (Takahashi et al. 2005)。申請者は、バイタリゼーションを顕著に現す遺伝子を特定して二酸化窒素がどのような代謝系の遺伝子を変化させるかバイタリゼーション分子機構の理解を進めると、省資源で環境負荷もなく、しかも農業生産性を高めうる夢のような技術を開発する新しい研究領域が生み出されると考え本研究を行った。

この効果は、シロイヌナズナの外、ケナフ、レタスなど各種植物において確認された (Adam et al., Botany, 2008; Takahashi et al., Int J Phytoremediation, 2008)。シロイヌナズナでは、アクセッション間で効果は異なった：シュートバイオマス増加は、1.6 倍 (Columbia) または 2.5 倍 (C24) であった。他方、二酸化窒素曝露で栽培したシロイヌナズナと非曝露のシロイヌナズナの葉細胞について、細胞数と細胞面積を比較解析すると、細胞数には有意差がないのに対し、細胞サイズには明瞭な差が認められた。故に、バイタリゼーションは細胞拡大機構と密接に関係した現象である事が推定された。また、何らかの細胞拡大遺伝子の関与が推定された。

バイタリゼーション原因遺伝子決定の方法論として、量的形質遺伝子座解析 (QTL 解析) を用いる方法も考えられたが、ゲノム資源・情報等へのアクセスのし易さなどを考慮して、逆遺伝学的方法を主とする方法を選んだ。トランスクリプトーム解析 (マイクロアレイ解析) により、二酸化窒素処理により発現量が 2 倍以上増加するシロイヌナズナ遺伝子 138 個を抽出した。これらのうち、転写因子等を含む 18 個に着目し、それらの遺伝子破壊株を入手して、バイタリゼーション原因遺伝子の特定の準備を完了していた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がバイタリゼーションに関してこれまでの研究で得た解析結果を基に、バイタリゼーション原因遺伝子と分子機構の理解を目指して次の点について研究する。

(1) バイタリゼーションによる細胞拡大機構、遺伝子の解析

- (2) バイタリゼーションに関連する遺伝子破壊株の解析と原因遺伝子の逆遺伝学的決定。
- (3) 細胞拡大遺伝子の発現の経時変化の解析と共発現遺伝子の解析。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* C24) のマイクロアレイ解析から抽出された 18 個の遺伝子の機能破壊株 (Columbia をバックグラウンドとする) および *Arabidopsis thaliana* Columbia、*Arabidopsis thaliana* C24 の野生株を実験材料として用いた。機能破壊株は ABRC ストックセンターより入手した。植物の栽培は NO_x 濃度制御曝露チャンバー内で 22 ± 0.3°C、相対湿度 70 ± 4%、人工照明下 70 μmol photons/m²/s の条件下で行った。播種後 1 週間、NO₂ を含まない (<5 ppb NO₂) 空気中で栽培し、その後 4 週間、NO₂ を含む (50 ppb NO₂) 空気中 [+NO₂ 植物]、または NO₂ を含まない空気中 [-NO₂ 植物] で栽培した 35 週齢の植物を材料とした (図 1)。

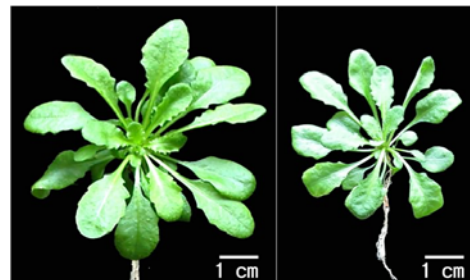


図 1. 本研究に用いた植物材料。(左)+NO₂、(右)-NO₂ 植物。

(2) 細胞拡大機構、遺伝子の解析

細胞数、細胞面積の解析は、±NO₂ 植物の完全展開葉 (第 8 葉) を用い、常法により、固定後、樹脂包埋し、並皮面および横断面について、微分干渉顕微鏡画像解析した。横断切片はマイクロトーム (Leica Microsystems) により調製した。

細胞核の倍数性レベルの解析 (東京大学塚谷裕一教授との共同研究) は、塚谷ら (Plant Cell Physiol. 48:278-286, 2007) の方法に従って、フローサイトメーター (Beckman Coulter) を用いて行った。

(3) 遺伝子機能破壊株と原因遺伝子の解析

各遺伝子機能破壊株および野生株の +NO₂ 植物と -NO₂ 植物について、栽培後のバイオマス量 (乾燥重量) を定量し、+NO₂ 植物と -NO₂

植物のバイオマスを比較解析した。

(4) リアルタイム PCR 解析

細胞拡大に関与する遺伝子 13 個について、+NO₂ 植物と -NO₂ 植物における遺伝子発現をリアルタイム PCR により経時的(NO₂ 曝露 0-3 週間)に比較解析した。また、共発現遺伝子の解析は、シロイヌナズナ公開データベース ATTED II(Arabidopsis thaliana trans-factor and cis-element prediction database)を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞拡大の機構、遺伝子の解析

個体当たりの葉の数は、+NO₂ 植物と -NO₂ 植物において、それぞれ 28.7±1.37 と 24.1±1.75 (平均±SD, n=15)であり、1.2 倍増加した(図 2)。葉のサイズ: 1.3-8.4 倍増加(平均 3.6 倍)した(図 2)。全葉面積は+NO₂ 植物において -NO₂ 植物比で 2.6 倍増加した。表皮下組織の並皮面において、細胞数には両植物で差がなかったが、+NO₂ 植物の細胞面積は -NO₂ 植物の 1.8 倍で有意に (p<0.05) 異なった(図 3)。これは、葉面積の増加に匹敵する。横断面の細胞数には有意差がなかったが、+NO₂ 植物の細胞面積は、-NO₂ 植物の 1.4 倍で有意に (p<0.05) 異なった(図 3)。これらの結果から、バイタリゼーションによる器官サイズ (バイオマス) の増加は、細胞分裂ではなく細胞容積の増加 (=細胞拡大) に起因すると結論された。故に、バイタリゼーションにおいて何らかの細胞拡大遺伝子の関与が推定される (投稿準備中)。

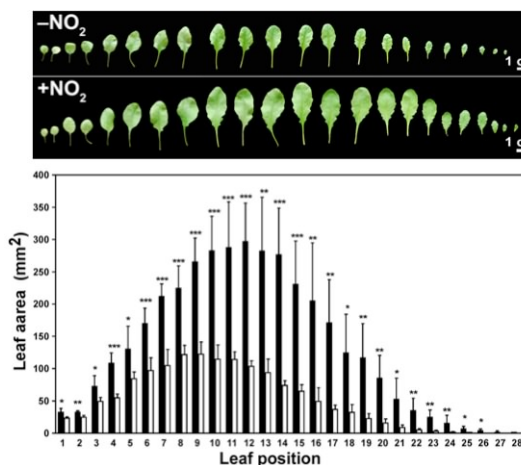


図 2 二酸化窒素の存否 (±NO₂) で育てた 35 日齢シロイヌナズナ C24 の本葉と葉面積。平均値±SD (n=5)。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

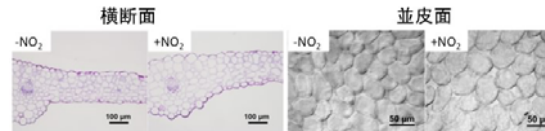


図 3 二酸化窒素の存否 (±NO₂) で育てた 35 日齢シロイヌナズナ C24 の本葉第 8 葉の横断面と並皮面 (表皮下組織)。

この細胞拡大と核内倍加 (endoreduplication と呼ばれ、細胞分裂を伴わない核の DNA 複製のことで、核の DNA 量は基本の 2C から倍増し、細胞サイズ拡大の一因となる。Sugimoto-Shirasu and Roberts, Curr. Opin. Plant Biol. 6:544, 2003 など)との関連を解析した。その結果、+NO₂ 植物と -NO₂ 植物において、2C、4C、8C、16C、32C の DNA 量の細胞が観察され、その割合に有意差は認められなかった (図 4)。すなわち+NO₂ 植物と -NO₂ 植物の間に倍数性レベルに差は観られなかった。故に、バイタリゼーションによる細胞拡大は、核内倍加に因るものではないと結論された。

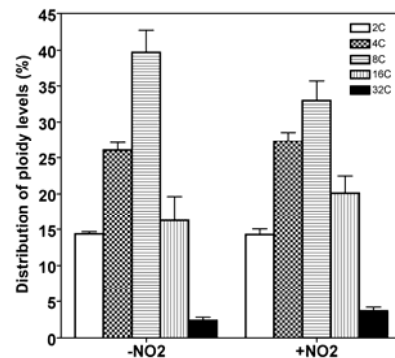


図 4. +NO₂ 植物と -NO₂ 植物の DNA 含量

(2) 遺伝子機能破壊株と原因遺伝子の解析

シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana C24)のマイクロアレイ解析で NO₂ により発現が顕著に増加する 18 遺伝子の各遺伝子の T-DNA 挿入変異体 (Columbia) のホモ接合体について NO₂ の効果を解析した結果、一つの株 (vital 株) がバイタリゼーションを示さなかった(図 5)。VITA1 と相同性をもつ既知の遺伝子はなく、VITA1 は機能アノテーションがない。

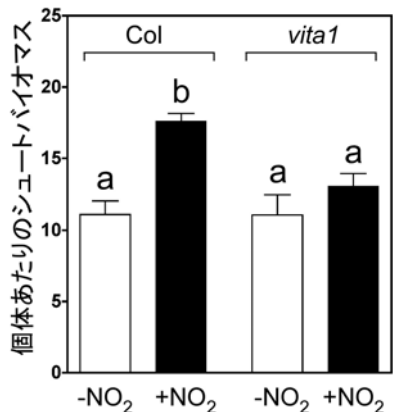


図5. 機能破壊株 *vita1* は、バイタリゼーション (バイオマス増加) を示さなかった。P<0.05

VITA1 の機能を明らかにするため、過剰発現体 (C24) を作成し、NO₂ の存在 (50 ppb) または非存在 (<5 ppb) 下で栽培して、バイオマス量を解析した。NO₂ 非存在下での栽培において、バイオマスは野生株比で有意に (1.3 倍) 増加した (図 6 左、特許申請済)。故に *VITA1* は、それ自身何らかの新規細胞拡大/細胞分裂促進遺伝子であり、バイタリゼーション原因遺伝子の一つであると考えられる。また、NO₂ 存在下での栽培において、過剰発現体のバイオマスは顕著に増加した (NO₂ 非存在下で栽培した野生株の 2.6 倍、図 6 右)。この結果は、*VITA1* 以外に別の原因遺伝子が存在することを示唆している。*vita1* 株での結果と併せて、それら遺伝子は、*VITA1* と協調して発現する可能性が高い。今後、*VITA1* が細胞拡大または細胞分裂機能のどちらかまたは両者をもつのかに関する形態学的解析、さらに *VITA1* 形質転換体と共発現遺伝子群の解析、

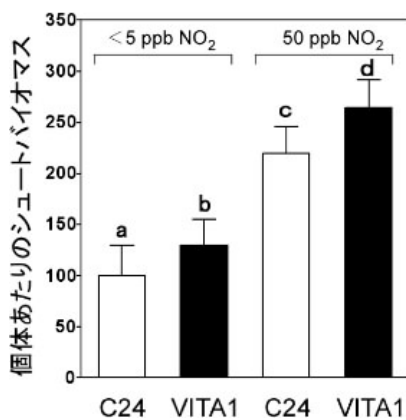


図6. 過剰発現体 *VITA1* は、バイタリゼーション (バイオマス増加) を示した。P<0.05

関連代謝経路解析により、分子機構理解が飛躍的に深化するものと展望される。

(3) リアルタイム PCR 解析

一般に、植物バイオマスは、器官当たりの細胞数と細胞容積によって決まる。バイタリゼーションにおけるバイオマスの増加は上述の通り細胞拡大が原因であることが分かった。そこで、シロイヌナズナで報告されている細胞拡大(促進または阻害)遺伝子(Breuninger and Lenhard, Curr. Top. Dev. Biol. 91:185, 2010 など)から絞り込んだ 12 個の遺伝子について、+NO₂ 植物と-NO₂ 植物における遺伝子発現をリアルタイム PCR により経時的(NO₂ 曝露 0-3 週間)に比較解析した(図 7)。その結果、2 個の促進遺伝子(*TOR* および *NAC1*)と 2 個の阻害遺伝子(*ATHB16* および *RON2*)の発現量が-NO₂ 植物に比べ+NO₂ 植物において有意に増加した。他方、1 個の促進遺伝子(*ARL*)と 1 個の阻害遺伝子(*OBP2*) の発現量が-NO₂ 植物に比べ+NO₂ 植物において有意に減少した(図 7)。残りの 6 個の遺伝子は調べた限り+NO₂ 植物と-NO₂ 植物において有意な差は認められなかった。さらに、6 個の遺伝子の発現量が-NO₂ 植物と+NO₂ 植物とにおいて顕著な差が明瞭になるタイミング、期間は遺伝子毎に異なった。*NAC1* は、曝露開始 1-3 週目で有意であった。*ATHB16*、*TOR*、*RON2* は、曝露開始 2-3 週目で有意であった。*OBP2* およ

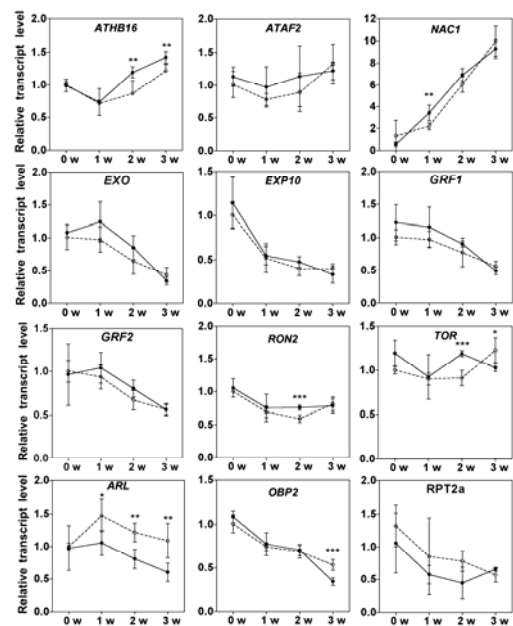


図7. +NO₂ 植物(実線)および-NO₂ 植物(点線)における細胞拡大遺伝子の発現の経時変化。

び *ARL* は、曝露開始 1~3 週目で有意であった。以上、バイタリゼーションにおける細胞拡大には、細胞拡大促進遺伝子の活性化、細胞拡大阻害遺伝子の抑制が複雑に関与していることが推定される。

6 個の細胞拡大関連遺伝子の発現制御の統一的理解を試みるため、シロイヌナズナ・トランスクリプトーム共発現データベース ATTED-II を用いて、これらの 6 遺伝子と共発現する遺伝子群について解析した。その結果、高い相関が観られる遺伝子は存在しなかった。しかし、*IAGLU* (*INDOLE-3-ACETATE BETA-D-GLUCOSYLTRANSFERASE*)と *YSL3* (*YELLOW STRIPE LIKE 3*)が、*OBP2* および *ARL* と比較的高い相関を示した。この点も含め、本研究で絞られた 6 個の遺伝子の発現制御は、バイタリゼーション分子機構理解の鍵となると考えられる。

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 7 件)

1. S. Nakano, M. Takahashi, A. Sakamoto, H. Morikawa, K. Katayanagi. The reductive reaction mechanism of tobacco nitrite reductase derived from a combination of crystal structures and UV-Vis microspectroscopy. *Proteins*. (2012, in press). 査読有 DOI: 10.1002/prot.24094
2. S. Nakano, M. Takahashi, A. Sakamoto, H. Morikawa, K. Katayanagi. Structure-function relationship of assimilatory nitrite reductases from the leaf and root of tobacco based on high-resolution structures. *Protein Sci*. 21(3):383-395 (2012). 査読有 DOI: 10.1002/pro.2025
3. M. Takahashi, S. Kohama, J. Shigeto, Y. Hase, A. Tanaka, H. Morikawa. Mutants of *Ficus pumila* produced by ion beam irradiation with an improved ability to uptake and assimilate atmospheric nitrogen dioxide. *International Journal of Phytoremediation* 14 (3): 275-281 (2012). 査読有 DOI: 10.1080/15226510701827085
4. M. Takahashi, A. Sakamoto, H. Ezura and H. Morikawa. Prolonged exposure to atmospheric nitrogen dioxide increases fruit yield of tomato plants. *Plant Biotechnology* 28 (5): 485-487 (2011). 査読有 DOI: 10.5511/plantbiotechnology.11.0819a
5. S. Ishikawa, Y. Ito, Y. Sato, Y. Fukaya, M.

Takahashi, H. Morikawa, N. Ohtake, T. Ohshima, K. Sueyoshi. Two-component high-affinity nitrate transport system in barley: Membrane localization, protein expression in roots and a direct protein-protein interaction. *Plant Biotechnology* 26: 197-205 (2009). 査読有 DOI: 10.5511/plantbiotechnology.26.197

6. 高橋美佐「大気環境浄化における植物の可能性」におい・かおり環境学会誌 42 (1) 2-7 (2011) (査読無し)
7. 高橋美佐「植物利用による環境浄化法—ファイトレメディエーション」*ケミカルエンジニアリング* 54, (4) 18-21 (2009) (査読無し)

[学会発表] (計 9 件)

1. 高橋美佐, 坂本 敦, 塚谷 裕一, 森川弘道: Endoreduplication Is Not Involved in Cell Expansion by Atmospheric Nitrogen Dioxide in *Arabidopsis thaliana* (大気中二酸化窒素の植物バイタリゼーションによる細胞拡大は核内倍加が原因ではない) 第53回日本植物生理学会年会 (2012年3月16~18日、京都産業大学、京都)
2. 高橋美佐, 坂本 敦, 塚谷 裕一, 森川弘道: 大気中二酸化窒素の植物バイタリゼーション作用による細胞拡大機構の解析 第52回日本植物生理学会年会 (2011年3月20~22日、仙台)
3. 高橋美佐, 柏原俊一, 古橋孝将, 坂本敦, 江面浩, 森川弘道: 大気中二酸化窒素の植物バイタリゼーション効果の原因遺伝子 第28回日本植物細胞分子生物学会 (仙台) 大会 (2010年9月2日~3日、東北大学、宮城県)
4. 高橋美佐, 柏原俊一, 古橋孝将, 坂本 敦, 森川弘道: 大気中二酸化窒素の植物バイタリゼーション原因遺伝子の解析 第51回日本植物生理学会年会 (2010年3月18~21日、熊本)
5. 高橋美佐: 高い環境浄化能を持つ新植物品種の創製 第13回放射線プロセスシンポジウム (2009年11月12日~13日、日本科学未来館、東京) 招待講演
6. 高橋美佐, 坂本 敦, 江面 浩, 森川弘道: 大気中 NO_x の植物バイオマス増産効果 日本育種学会 第116回公演会 (2009年9月25日~26日、北海道大学、北海道)
7. 高橋美佐: 大気中 NO_x の植物成長促進作用 第50回大気環境学会大気環境学会植物分科会集会 (2009年9月16日、慶応大学、横浜) 招待講演
8. 高橋美佐, 柏原俊一, 古橋孝将, 塚谷裕一, 坂本敦, 森川弘道: 大気中窒素酸化物の植物バイタリゼーション効果 (1) シロイヌナズナ 第27回日本植物細胞分子生物学会 (藤沢)

大会(2009年7月30日～31日、日本大学、神奈川県)

9. 高橋美佐、坂本敦、江面浩、森川弘道:大気中窒素酸化物の植物バイタリゼーション効果
(2)トマトなど 第27回日本植物細胞分子生物学会(藤沢)大会(2009年7月30日～31日、日本大学、神奈川県)

[図書] (計1件)

1. 高橋美佐、森川弘道 植物による大気汚染の浄化「植物機能のポテンシャルを活かした環境保全・浄化技術ー地球を救う超環境適合・自然調和型システムー」株式会社シーエムシー出版 140-150 (2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

名称:植物の生育促進方法及びこれをもちいて栽培された植物

発明者: 高橋美佐、森川弘道

権利者:国立大学法人広島大学

種類:特許

番号:特願 2011-107584

出願年月日:平成23年5月12日

国内外の別:国内

名称:オオイタビ KNOX 品種変異株識別用プライマー

発明者: 高橋美佐、森川弘道

権利者:国立大学法人広島大学

種類:特許

番号:特願 2011-058586

出願年月日:平成23年3月17日

国内外の別:国内

名称:NO_xに应答して植物の生育を促進させる遺伝子の利用方法

発明者: 高橋美佐、森川弘道、江面浩

権利者:国立大学法人広島大学

種類:特許

番号:PCT/JP2010/7241

出願年月日:平成22年12月13日

国内外の別:国際出願(PCT)

名称:NO_xに应答して植物の生育を促進させる遺伝子の利用方法

発明者: 高橋美佐、森川弘道、江面浩

権利者:国立大学法人広島大学

種類:特許

番号:特願 2009-288518

出願年月日:平成21年12月18日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 美佐 (MISA TAKAHASHI)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 10294513

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: