

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580477

研究課題名(和文) 大気中の二酸化窒素による植物バイタリゼーション原因遺伝子の共発現解析とその解明

研究課題名(英文) Study on genes that co-express with VITA1, a causal gene for the plant vitalization effect of atmospheric nitrogen dioxide

研究代表者

高橋 美佐 (TAKAHASHI, MISA)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10294513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：大気中に含まれる二酸化窒素(NO<sub>2</sub>)による植物成長分化の促進＝バイタリゼーションについて、原因遺伝子の一つであるVITA1および同遺伝子と協調的に発現する遺伝子についてシロイヌナズナを用いて研究した。第8葉の細胞動力学解析から、NO<sub>2</sub>処理は出葉期をNO<sub>2</sub>非処理区比で2日以上早めることが分かった。NO<sub>2</sub>は花成も促進するが、vita1変異体の解析からVITA1は花成阻害因子であることが分かった。タンパク質レベルの解析はVITA1の翻訳産物は2個存在することを示した。酵母ツーハイブリッド法は相互作用蛋白の存在を示唆した。マイクロアレイ解析は15個のVITA1共発現遺伝子の存在を示した。

研究成果の概要(英文)：We studied co-expressing genes involved in the plant vitalization by atmospheric nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) or a NO<sub>2</sub>-induced growth regulation in *Arabidopsis thaliana*. Reverse genetic analysis identified VITA1 as a causal gene for this regulation. Kinematic analysis of the 8th leaf indicated that exposure to NO<sub>2</sub> accelerated the timing of leaf appearance by more than 2 days. Furthermore, NO<sub>2</sub> exposure significantly accelerated the time to flower. The *vita1* mutants exhibited early flowering, suggesting that VITA1 is an inhibitor of flowering. Immunoblot analysis showed two translational products of VITA1, which was confirmed by N-terminal sequencing analysis. The yeast two-hybrid screening for VITA1 protein yielded 3 positive clones. Micro-array analysis identified 15 genes that co-expressed with VITA1 in response to NO<sub>2</sub> exposure. These results will provide important clues for understanding of the molecular mechanism underlying NO<sub>2</sub>-induced plant growth.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：シロイヌナズナ 二酸化窒素 植物バイタリゼーション 生長促進 花成促進 共発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

二酸化窒素は、大気微量成分の一つである。二酸化窒素は人為的要因にまたは天然要因で大気中の窒素と酸素との反応により生成する。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後大気中酸素が上昇 (oxidative burst) した後、陸上植物が現れる数十億年前とされる。大気中の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い。

申請者は植物を環境基準レベル (10~50 ppb) の二酸化窒素に長期間 (数週間~数ヶ月) 曝露すると、植物の成長分化が促進され、器官サイズ、バイオマス、細胞内元素含量が増加 (1.4~2.8 倍) すること (バイタリゼーション) を世界に先駆けて発見した (Takahashi et al., *New Phytol* 2005; 168:149-154)。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)、二酸化窒素はシグナル的に効いている (Takahashi et al., *New Phytol* 2005; 168:149-154)。この効果は、シロイヌナズナ、レタス、トマトなど各種植物において確認された (Adam et al. *Botany* 2008; 86:213-217; Takahashi et al., *Int J Phytoremediat* 2008; 10:73-76; *Plant Biotechnol* 2011; 8:485-487)。さらに、形態学的発生学的解析から、葉サイズの増加は、細胞サイズと細胞数の増加が原因であることが分かった。これらの結果から、バイタリゼーションにより、何らかの細胞分裂/細胞拡大遺伝子が活性化され、バイオマス増加するものと考えられた。

申請者は、シロイヌナズナ・マイクロアレイ解析から、二酸化窒素により発現量が 2 倍以上増加する遺伝子 138 個 (上記十数個の遺伝子に該当するものは無かった) を特定した。これら遺伝子の T-DNA 挿入変異体 (Columbia) のホモ接合体について二酸化窒素の効果解析した結果、一つの株 (*vita1* 株) がバイタリゼーションを示さなかった (図 1)。この欠失は、*VITA1* 配列の導入により相補された。故に *VITA1* は、バイタリゼーションにおける二酸化窒素情報 (バイオマス増加) の流れにおいて重要な役割を果たすはずである。*VITA1* と相同性をもつ既知の遺伝子はなく、*VITA1* は機能ア

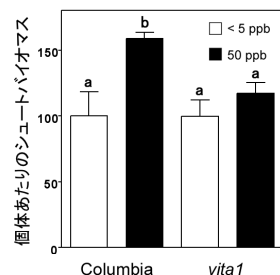


図 1 T-DNA 挿入変異体 *vita1* はバイタリゼーションを消失していた。  $P < 0.05$

ノテーションがない。

*VITA1* の機能を明らかにするため、過剰発現体 (C24) を作成し、二酸化窒素の存在 (50 ppb) または非存在 (<math>< 5 \text{ ppb}</math>) 下で栽培して、バイオマス量を解析した。二酸化窒素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 (特許申請済)。故に *VITA1* は、それ自身何らかの新規細胞分裂/拡大促進遺伝子であり、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た。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、大気中に含まれる二酸化窒素の植物成長促進作用 (バイタリゼーション) について、原因遺伝子 *VITA1* とその共発現遺伝子群の解析に焦点を絞って、その分子機構の全体像の解明である。この作用を顕著に現す遺伝子が特定されると、省資源で環境負荷はなく、かつ農業生産性を高める画期的技術が開発できる。

本研究は、まず *VITA1* 形質転換体のマイクロアレイ解析により共発現遺伝子群を取得し、解析する。ついで、原因遺伝子候補を絞り込み、形質転換し、バイオマス量の解析により原因遺伝子を特定して、その全体像の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. アクセッション Col-0, Ler, C24) および *VITA1* の T-DNA 挿入変異体 (*vita1*) をパーライトとパーミキュライト (1:1, v/v) に播種、1 週間二酸化窒素を含まない空気中で栽培した後、50 ppb 二酸化窒素を含む空気中 (+ NO<sub>2</sub> 植物) または二酸化窒素を含まない空気中 (-NO<sub>2</sub> 植物) で栽培した。栽培は NO<sub>x</sub> 濃度制御曝露チャンパー内で  $22 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $70 \pm 4\%$ 、人工照明下  $70 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  の条件下で行った。

### 細胞動力学的解析

17~35 日齢の植物体について、第 8 葉を 2 日ごとに採取、FAA で固定、4 に保存した。これらの葉について葉面積、細胞サイズ、細胞数について Takahashi et al. (2014) [論文 5] に従って解析した。

### 花成時期の解析

花茎の長さが 1 cm になったときの栽培日数を花成時期とした。同時期のロゼット葉数についても計測した。

## タンパク質の電気泳動

35S::VITA1-GFP コンストラクトをシロイヌナズナアクセスン Col-0 に導入して作出した形質転換植物からタンパク質を抽出、SDS-PAGE で分離した。ゲルを CBB 染色した。並行して PVDF 膜にブロッティングして抗 GFP 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。

## タンパク質の N 末端配列の解析

SDS-PAGE、CBB 染色後、GFP 抗体と反応したバンドをゲルから切り出し、エドマン分解、HPLC 分析により N 末端のアミノ酸配列を決定した。

## 定量的リアルタイム PCR 解析

シュートから抽出した RNA 1  $\mu\text{g}$  を鋳型に逆転写反応を行った。リアルタイム PCR 解析は、ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて行った。

## マイクロアレイ解析

12 日齢のシロイヌナズナ Col-0 野生株および *vital* 変異体の +NO<sub>2</sub> 植物および -NO<sub>2</sub> 植物のシュートを採取して、全 RNA を抽出した。Affymetrix ATH1 マイクロアレイを用いてマイクロアレイ解析を行った。

## 4. 研究成果

### 生理学的解析

まず、全体像解明の基礎となる細胞レベルでの解析を実施した。+NO<sub>2</sub> 植物および -NO<sub>2</sub> 植物の第 8 葉の葉面積、細胞サイズ、細胞数について経時的 (播種後 17~35 日齢)

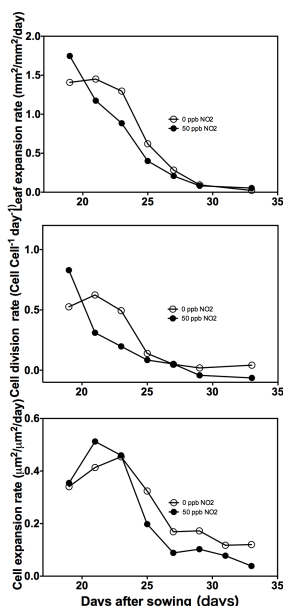


図 2 シロイヌナズナ C24 の +NO<sub>2</sub> 植物と -NO<sub>2</sub> 植物の第 8 葉の細胞動力学解析

に解析した。その結果、相対葉面積増加速度 (RLER)、相対細胞増殖速度 (RCDR) および相対細胞拡大速度 (RCER) はいずれの値も +NO<sub>2</sub> 植物が大きかった (図 2)。さらに、-NO<sub>2</sub> 植物では播種後 19-21、21-23 および 23-33 日目にそれぞれ葉成長の第 1、2 および 3 phase にあることが分かった。また、+NO<sub>2</sub> 植物ではどの phase も 2 日以上早くなることが初めて分かった。また、二酸化窒素処理により出葉時期も 2 日以上早くなることが分かった (論文 1)。

さらに、二酸化窒素は花成促進作用をもつことが新たに分かった (図 3)。この促進作用はシロイヌナズナアクセスン C24、Col-0、Ler で観察された (図 3)。すなわち、二酸化窒素によるバイタリゼーションは、バイオマスの増加と花成の早期化を惹起する。一般に、環境シグナル刺激 (一酸化窒素、ジベレリン、糖の添加、低温処理、光周期波長処理など) では、早咲きはバイオマス蓄積が低く (またはその逆)、「早咲きバイオマス高」効果は二酸化窒素に固有である (論文 2,3,5)。この結果はバイタリゼーションの全体像解明の重要な生理学的基礎である。

また、*VITA1* を破壊すると、花成が促進されることが新たにわかり (図 4)、*VITA1* は花成阻害因子であると推定される。故に、*VITA1* は二酸化窒素によるバイオマス生産と花成の両面に作用することが分かり、バイタリゼーション解明の重要な手がかりが得られた。また、これらの結果から、申請者は、二酸化窒素は正の植物成長調節因子であるとの作業仮説を発表した (論文 4)。

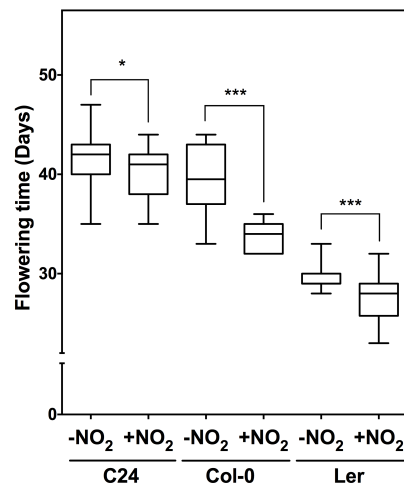


図 3. 二酸化窒素処理によって、シロイヌナズナアクセスン C24、Col-0、Ler の花成が促進された

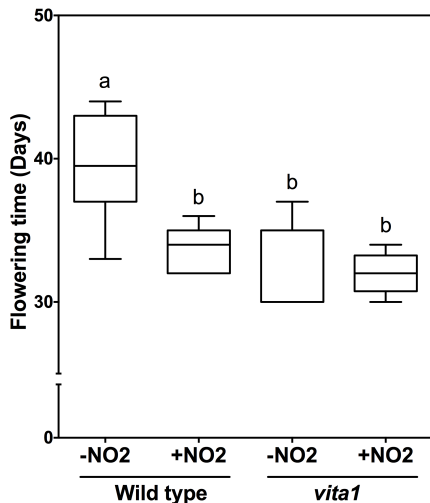


図4 シロイヌナズナ Col-0 野生株と *vita1* の花成時期

### VITA1 タンパク質解析

次に、細胞内における *VITA1* の翻訳産物について解析した。*VITA1* を破壊すると、バイタリゼーションは消失するので、*VITA1* は二酸化窒素のバイオマス生産促進作用の示現に必要な因子である。一方で、花成は阻害する因子であることが分かっている。この結果から、*VITA1* タンパク質と相互作用する何らかの細胞内タンパク質の存在が予想された。すなわち、二酸化窒素処理により *VITA1* タンパク質が増えバイオマス蓄積が促進されるが、同時に *VITA1* と相互作用する (花成阻害作用を抑える) 細胞内タンパク質が増え、その結果花成が促進されると考えられる。*VITA1* は、82 アミノ酸残基からなるペプチドをコードする。*VITA1*-GFP 融合タンパク質をシロイヌナズナで発現させ、タンパク質を抽出して抗 GFP 抗体を用いて免疫学的解析を行った。その結果、抗 GFP 抗体と反応するバンドが 2 本観察された。さらに N 末端アミノ酸配列解析から N 末端のプロセッシングが確認された。これらの結果から、*VITA1* は翻訳後修飾を受け、翻訳産物は 2 個存在することが示された。翻訳産物について *VITA1* と相互作用するタンパク質について酵母ツーハイブリッド法によりスクリーニングした。その結果、これまでに 3 つのポジティブなクローンが得られた。これらのクローンはバイタリゼーション作用分子機構の解明の有力な手がかりになると考えられる。

### IYG 遺伝子発現解析

定量的リアルタイム PCR により、+NO<sub>2</sub> 植物および -NO<sub>2</sub> 植物の第 8 葉における *VITA1* の発現ならびに *VITA1* の発現と密に関係する細胞分裂/細胞拡大に関する遺伝子群

(Intrinsic Yield Genes, IYGs と称される) 約 25 個の遺伝子の発現量 (mRNA 蓄積量) について調査した。その結果、調査した全ての IYG 遺伝子の発現量は年齢特異的で、両植物間の発現量の差は年齢に依存して変動することがわかった (図 5) [論文 5]。他方、*VITA1* は、増殖期 (17—21 日齢) では -NO<sub>2</sub> 植物、+NO<sub>2</sub> 植物共に比較的強く発現しており、両者に有意差が観られなかった (図 6)。しかし、細胞拡大期 (23 日齢以降) を通して、発現量は比較的安定で常に有意に +NO<sub>2</sub> 植物 > -NO<sub>2</sub> 植物であった。+NO<sub>2</sub> 植物では 23 日齢以降も高い発現量 (23 日齢以前の発現量に匹敵する) が維持されることが分かった。以上の結果から、*VITA1* は二酸化窒素で誘導される細胞拡大遺伝子またはその制御遺伝子であることが示唆された。

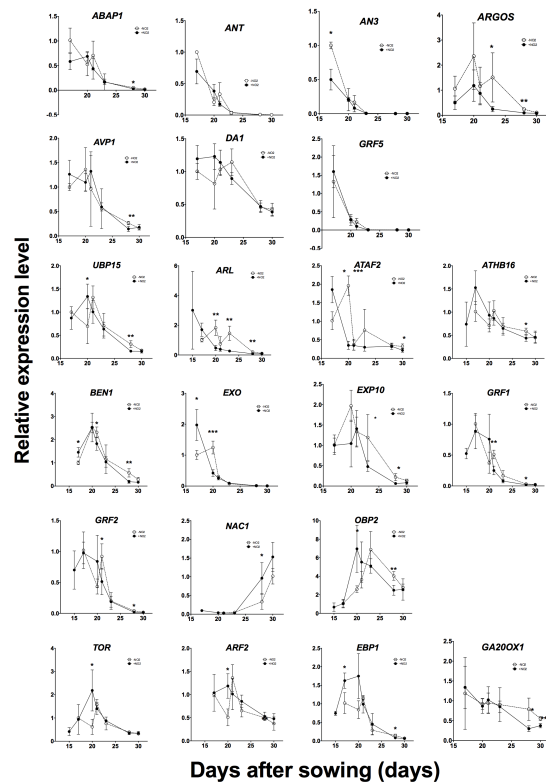


図5 細胞増殖/細胞拡大に関する遺伝子群 (Intrinsic Yield Genes, IYGs と称される) の発現解析

### *VITA1* と共発現する遺伝子の解析

これまでの研究から明らかとなった原因遺伝子 *VITA1* と共発現する遺伝子群について公開データベースを用いて調査した。その結果抽出された 5 個の遺伝子 (*ERF061*, *SRF4*, *LRL3*, *NAC025* および *At5g1440*) について、mRNA 発現量に対する二酸化窒素処理または非処理の効果を実時間 PCR により時系列解析した (図 6)。これらの遺伝子の T-DNA 挿入変異体について

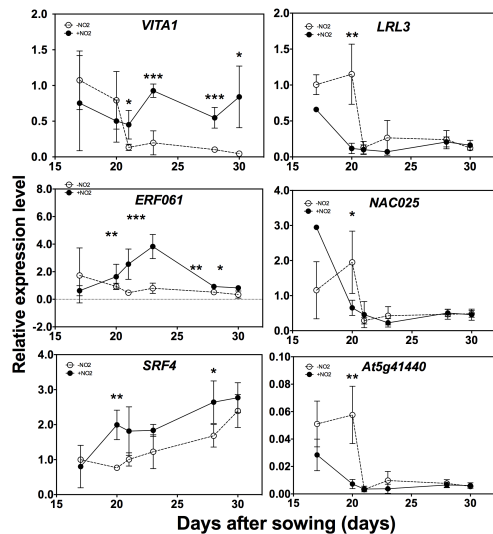


図 6 *VITA1* 遺伝子とその共発現遺伝子の発現解析

二酸化窒素による植物バイタリゼーション効果について調査したが、遺伝子を特定するには至らなかった。そこで、シロイヌナズナ Col-0 野生株と *VITA1* の遺伝子破壊株 (*vital*) の 12 日齢の +NO<sub>2</sub> 植物と -NO<sub>2</sub> 植物について、マイクロアレイ解析を行った。発現量を比較解析し、相関解析した結果、*ATMG10* など 15 遺伝子が *VITA1* の発現パターンと高い相関を持つことが分かった。これらの遺伝子は、*VITA1* の機能解析および植物バイタリゼーション解明に重要な手がかりを与えるものである。

#### 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. M. Takahashi, H. Morikawa. Kinematic evidence that atmospheric nitrogen dioxide increases the rates of cell proliferation and enlargement to stimulate leaf expansion in Arabidopsis. *Plant signaling & Behavior* 査読有(2015 in press).
2. M. Takahashi, H. Morikawa. Nitrogen dioxide accelerates flowering without changing the number of leaves at flowering in Arabidopsis thaliana. *Plant signaling & Behavior* 9 (10): e970433 査読有(2014). doi: 10.4161/15592316.2014.970433.
3. M. Takahashi, H. Morikawa. Differential responses of Arabidopsis thaliana accessions to atmospheric nitrogen dioxide at ambient concentrations. *Plant signaling & Behavior* 9

(2): e28563 査読有(2014) doi: 10.4161/psb.28563

4. M. Takahashi, H. Morikawa. Nitrogen dioxide is a positive regulator of plant growth. *Plant signaling & Behavior* 9 (2): e28033 査読有(2014)
5. M. Takahashi, T. Furuhashi, N. Ishikawa, G. Horiguchi, A. Sakamoto, H. Tsukaya, H. Morikawa. Nitrogen dioxide regulates organ growth by controlling cell proliferation and enlargement in Arabidopsis. *New Phytologist* 201: 1304-1315 査読有(2014) DOI: 10.1111/nph.12609
6. M. Takahashi, M. Nakagawa, H. Morikawa. Progress and Problems in Producing Nitrogen Dioxide-Philic Plants. *Iranian Journal of Biotechnology*. 11(3): 145-6. 査読有(2013) DOI: 10.5812/ijb.11373
7. S. Nakano, M. Takahashi, A. Sakamoto, H. Morikawa, K. Katayanagi. X-Ray Crystal Structure of a Mutant Assimilatory Nitrite Reductase That Shows Sulfite Reductase-Like Activity. *Chemistry & Biodiversity* 9: 1989-1999 査読有(2012). DOI: 10.1002/cbdv.201100442

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：シロイヌナズナにおけるバイオマス蓄積と花芽形成に対する二酸化窒素の効果 第 56 回日本植物生理学会年会 (2015 年 3 月 16~18 日、東京農業大学 (東京))
2. 高橋美佐、坂本 敦、塚谷 裕一、森川弘道：大気中二酸化窒素は正の植物成長調節因子である 第 55 回日本植物生理学会年会 (2014 年 3 月 18~20 日、富山大学 (富山))
3. 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成長調節作用に關与する遺伝子群 第 31 回日本植物細胞分子生物学会 (札幌) 大会 (2013 年 9 月 10 日~12 日、北海道大学 (札幌))
4. 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ホルモン様作用による細胞増殖 and/or 拡大に關与する遺伝子発現の解析 第 54 回日本植物生理学会年会 (2013 年 3 月 21~23 日、岡山大学 (岡山))
5. 高橋美佐、坂本敦、塚谷裕一、森川弘道：二酸化窒素の植物バイタリゼーションの研究 (4) 細胞拡大と核内倍加との間に相関関係はなかった 第 30 回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会 (2012 年 8 月 3 日~5 日、奈良先端科学技術大学院大学 (奈良))

## 6 . 研究組織

### (1)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