

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780332

研究課題名(和文) 活性酸素を介した新奇ストレス応答機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of novel mechanism of reactive oxygen species-mediated stress response

研究代表者

丸田 隆典 (Maruta, Takanori)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：50607439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、葉緑体由来の活性酸素種(ROS)の下流において、転写因子であるHDおよびbZipが酸化ストレス応答に重要な働きを持つことを明らかにした。また、両転写因子は植物の病原菌に対する応答にも関与することをつきとめた。さらに、新規シグナリング因子として複数の転写因子を同定するとともに、葉緑体ROSがアントシアニンの蓄積および光酸化ストレス防御に必要であることを明らかにした。このように、本研究は葉緑体由来のROSシグナリングの転写因子ネットワークと生理学的意義を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, I found that transcription factors, HD and bZip, are important for oxidative stress response via chloroplast-produced reactive oxygen species (ROS). The transcription factors were also found to be involved in the response to pathogen. In addition, several new transcription factors were identified as novel regulators of ROS signaling. I also found that chloroplastic ROS is required for anthocyanin accumulation and photo-protection. Thus, this study revealed the transcription factors network in chloroplastic ROS signaling and its physiological significance.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 生理学 ストレス 遺伝子 植物 活性酸素種 転写因子

1. 研究開始当初の背景

行動の自由を持たない植物は、日々の環境変化に応答(馴化)し、さらに強光、乾燥、塩、低(高)温など複合的な激しい環境変化(非生物的ストレスと呼ぶ)や、病原菌感染などによる生物的ストレスに対応することで、生き残っている。活性酸素種(ROS)は植物細胞内で常に生成するが、様々な環境ストレス条件下においてROS生成が消去系を凌駕すると、酸化ストレスとなって細胞機能障害や細胞死を引き起こす。一方、植物細胞内で生成したROSはシグナルとして作用(酸化シグナリング)し、生物学的および非生物的ストレス応答時の防御系の発現やプログラム細胞死などの生理現象の制御に関与することが明らかになってきた。したがって、植物のストレス応答機構を理解し、有用作物の分子育種等に応用するためには、ROSを介した酸化シグナリングの分子機構の解明が急務である。

そのような状況下で申請者は、主にモデル植物であるシロイヌナズナを用いて環境ストレス応答における酸化シグナリングの初期イベントの解明を試みてきた(Plant Cell Physiol, 2004, 2009, 2010, 2011; J Biol Chem, 2008; Plant J, 2006; 他)。これらの研究の過程において、植物細胞内における主要なROSの発生源である葉緑体内で、任意のタイミングでROSの一種であるH₂O₂を生成させる実験系を初めて開発し、1)葉緑体由来のROS生成に応答する遺伝子群(約800個)を単離するとともに、2)葉緑体由来のROSは生物学的および非生物的ストレス応答の両方に関与することを見いだした(J. Biol Chem, 2012; Plant Signal Behav, 2012)。この事実は、植物の生物学的および非生物的ストレス応答は独立した分子機構を介して行われるのではなく、互いにクロストークしており、その制御には葉緑体由来のROSが重要であることを示していた。さらに注目すべきは、同定した遺伝子群には既報の環境ストレス応答(熱ショック、傷害、耐病性など)遺伝子だけでなく、新奇の転写因子やタンパク質キナーゼなど、過去に酸化ストレス応答・防御との関連性が明らかにされていない全く新奇のものが多数含まれていたことであった。よって、葉緑体ROS応答性遺伝子の機能解析は新奇の酸化シグナリングの分子機構の解明およびROSを介したストレス応答機構の本質的な理解に繋がると容易に予想される。

2. 研究の目的

申請者は、同定した800遺伝子の機能解析を試みるべく、各々の破壊株ラインを作成し、種々のストレス条件下での表現型を網羅的に解析した。その結果、パラコート処理による光酸化ストレスおよび病原菌応答を引き起こすエリシター(病原菌由来のペプチドなど)処理の両方に対して高感受性を示す2

つの変異株を単離し、これらの原因遺伝子がホメオボックス転写因子(HD)、ロイシンジッパー型転写因子(bZip)およびタンパク質キナーゼ(MAPKKK)をコードすることを突き止めた。すなわち、これらは葉緑体由来のROSの下流において生物学的および非生物的ストレス応答のクロストークに重要な役割を担っており、これらの機能解析は酸化シグナリングを介したストレス応答の本質的な役割およびその分子機構の解明に繋がると強く示唆された。そこで本申請では、HD、bZipおよびMAPKKKの生理機能やシグナリングにおける役割を明らかにするとともに、新規シグナリング因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

HD、bZipおよびMAPKKKは酸化シグナリングを介したストレス応答において重要な役割を担っていると思われる。そこで各遺伝子の1)過剰発現株の作出、2)ストレス応答性、3)細胞内局在性、4)過剰発現株のストレス感受性、5)下流遺伝子などの多面的な解析を通して、各遺伝子のストレス応答における重要性および位置づけを明確にするとともに、レドックス制御とストレス応答との関連性を考察する。

また、新規シグナリング因子を同定するために、申請者の同定したROS応答性遺伝子の破壊株ラインから、さらなる酸化ストレスに高感受性の変異体をスクリーニングすることを目指した。

4. 研究成果

(1) HDの生理機能

HDは、パラコート処理による酸化ストレス高感受性変異株の原因遺伝子として同定された。詳細な解析の結果、HD欠損株は酸化ストレスに高感受性を示し、過剰発現株は非感受性を示すことが分かった。HDは転写抑制因子として機能することが分かっており、その発現は葉緑体由来のROSによって抑制された。GFP融合タンパク質を用いてHDの細胞内局在性を調べたところ、HDは核のみに局在したが、H₂O₂処理下では細胞質にも局在した。興味深いことに、HDのC末端に保存されたCys残基のSerへの置換は、HDの細胞質局在性を阻害した(図1)。よって、HDの発現および局在の両方がROSによって制御されるこ

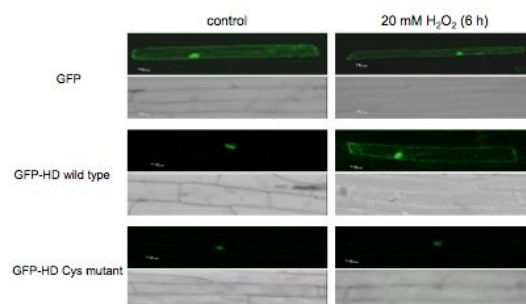


図1 HDの細胞内局在性のレドックス制御

とが分かった。

HD 欠損株の酸化的ストレス高感受性は、酸化損傷の増大に起因するものではないことが分かった。HD 欠損株を用いたマイクロアレイ解析の結果、HD の下流遺伝子にはストレス防御遺伝子に加え、成長に関与する遺伝子も含まれていた。それらの一部の遺伝子プロモーターには、HD 認識シス配列が含まれており、HD の直接的な制御が示唆された。以上より、HD は植物のストレス応答や成長を制御する因子であり、葉緑体由来の ROS は HD の発現および局在性を調節することでストレス下での成長を制御していることが示された (図 2)。本成果に関して、現在、論文を執筆中である。

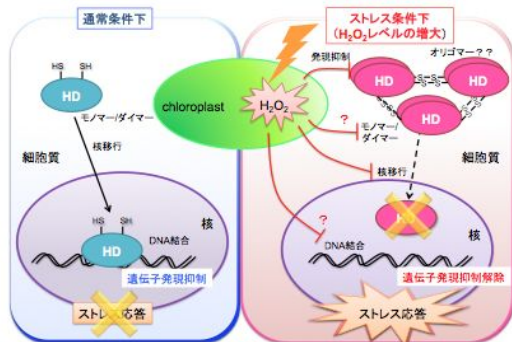


図2 HDを介したストレス応答機構

(2) bZip の生理機能

bZip も、HD と同様に、酸化的ストレス高感受性変異株の原因遺伝子として同定された。詳細な解析により、bZip 欠損株は酸化的ストレスよりも、エリシターに対して顕著に現れることから、病原菌応答への関与が強いことが分かった。bZip の発現は葉緑体由来の ROS やエリシターによって強く誘導されることが分かった。興味深いことに、bZip との機能重複性が示唆されている bZip21 は応答性を示さず、その欠損株も野生株と同程度のストレス感受性を示した。葉緑体由来 ROS と、エリシターの両方に応答する遺伝子を見いだし、それらの bZip 欠損株における遺伝子発現を調べることで、本転写因子の標的遺伝子特定することができた。よって、bZip は、bZip21 とは異なり、葉緑体由来の ROS の下流で病原菌応答に関与することが分かった。

(3) MAPKKK の生理機能

同様に、MAPKKK もまた、酸化的ストレス高感受性変異株の原因遺伝子として単離されたが、詳細な解析の結果、MAPKKK の葉緑体 ROS 応答性は非常に弱く、また、MAPKKK 欠損株の酸化的ストレス感受性は、本遺伝子の欠損以外の要因により生じている可能性が示唆された。よって、本研究における MAPKKK の機能解析を中止し、後述する新規因子の同定および機能解析にフォーカスした。

(4) 新規シグナリング因子の同定

新規シグナリング因子を同定するために、葉緑体 ROS 応答性遺伝子群の破壊株および優性抑制株のストレス感受性を網羅的に調べた。その結果、酸化的ストレス高感受性または非感受性変異株の原因遺伝子として、新たに 9 つの転写因子を同定することができた。これらのなかの一つは、鉄欠乏応答に関与しており、酸化的ストレス下でシグナルとしての ROS 供給に寄与している可能性が示唆されている。また、後述するように、いくつかの代謝系遺伝子も同定された。このように、葉緑体 ROS の下流における転写因子ネットワークが同定されてきている。

(5) 葉緑体由来の ROS によるアントシアニン合成系の制御機構

変異株スクリーニングの過程において、光酸化的ストレス下でのアントシアニン蓄積が生じない変異株を同定した (図 3)。アントシアニンは植物の保護色素として極めて重要である。本変異株は、フェルラ酸 5 ヒドロキシラーゼ (FAH1) の欠損株であった。FAH1 はアントシアニン合成とも関連するフェニルプロパノイド経路の代謝酵素であるが、興味深いことに、FAH1 欠損株ではアントシアニン合成関連遺伝子の発現が抑制されていた。このことは、フェニルプロパノイド代謝中間体がアントシアニン合成遺伝子発現を制御するシグナルになることを示唆した。

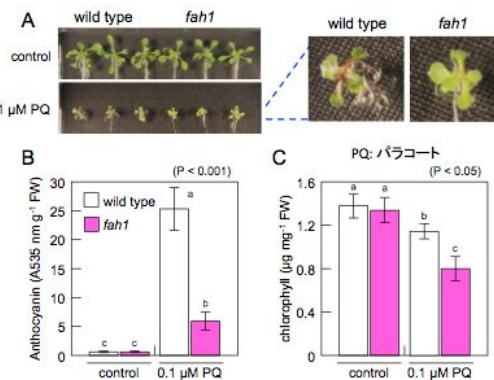


図3 アントシアニン欠乏株、*fah1*の単離

葉緑体由来の ROS は FAH1 発現とともに、アントシアニン蓄積を促進することが分かった。これらの事実から、葉緑体由来の ROS は FAH1 の誘導によりフェニルプロパノイド経路を調節し、アントシアニン合成を制御するシグナル量を変化させることで、合成系を活性化すると考えられた。一連の成果を Plant Science 誌に報告した (Maruta et al., 2014)。現在、葉緑体 ROS の下流において、FAH1 発現を制御する転写因子の同定を試みている。

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1件)

Maruta T, Noshi M, Nakamura M, Matsuda S, Tamoi M, Ishikawa T, Shigeoka S. Ferulic acid 5-hydroxylase 1 is essential for expression of anthocyanin biosynthesis-associated genes and anthocyanin accumulation under photooxidative stress in Arabidopsis. Plant Science. 219-220, 2014, 61-68. 査読あり
doi: 10.1016/j.plantsci.2014.01.003

〔学会発表〕(計16件)

丸田隆典、野志昌弘、問田英里、岡本泰、大和開、田茂井政宏、高木優、澤嘉弘、石川孝博、重岡成：葉緑体由来の酸化的シグナリングに關与する転写因子ネットワークの解明(日本農芸化学会 2014 年度大会・明治大学・H26、3/27-20)

岡本泰、野志昌弘、田茂井政宏、高木優、丸田隆典、石川孝博、重岡成：葉緑体 H₂O₂ 応答性 bHLH 転写因子は光酸化的ストレス応答に關与する(第 55 回植物生理学会年会・富山大学・H26、3/18-20)

森本哉太、丸田隆典、野志昌弘、高木優、澤嘉弘、重岡成、石川孝博：葉緑体 H₂O₂ 応答性 NAC 転写因子ファミリーの包括的な機能解析(第 55 回植物生理学会年会・富山大学・H26、3/18-20)

大和開、問田英里、野志昌弘、田茂井政宏、吉村和也、高木優、丸田隆典、澤嘉弘、石川孝博、重岡成：ホメオドメインロイシンジッパー転写因子は酸化的ストレス応答に關与する(第 55 回植物生理学会年会・富山大学・H26、3/18-20)

野志昌弘、岡本泰、問田英里、田茂井政宏、高木優、丸田隆典、石川孝博、重岡成：葉緑体由来の H₂O₂ シグナリングを介したストレス応答の分子機構(第 55 回植物生理学会年会・富山大学・H26、3/18-20)

大和開、問田英里、野志昌弘、野坂亮太、田茂井政宏、吉村和也、高木優、丸田隆典、澤嘉弘、石川孝博、重岡成：ホメオドメインロイシンジッパー転写因子のレドックスシグナリングへの關与(第 36 回日本分子生物学会年会・神戸ポートアイランド・H25、12/3-6)

大和開、問田英里、野志昌弘、野坂亮太、田茂井政宏、吉村和也、高木優、丸田隆典、澤嘉弘、石川孝博、重岡成：ホメオドメインロイシンジッパー(HAT1)転写因子を介したストレス応答機構(日本農芸化学会支部・日本ビタミン学会 2013 年度合同広島大会・県

立広島大学・H25、9/5-6)

Takanori Maruta, Masahiro Noshi, Eri Toida, Masahiro Tamoi, Kai Yamato, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa, Shigeru Shigeoka: Molecular mechanism of chloroplastic H₂O₂-mediated stress response in Arabidopsis (11th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, Warsaw University, 17-19 July, 2013)

丸田隆典、野志昌弘、問田英里、田茂井政宏、高木優、澤嘉弘、石川孝博、重岡成：アスコルビン酸ペルオキシダーゼ変異体を用いた葉緑体由来の酸化的シグナリング経路の同定(日本ビタミン学会第 65 回大会・一橋大学・H25、5/17-18)

問田英里、野志昌弘、松田峻、野坂亮太、田茂井政宏、吉村和也、高木優、大和開、丸田隆典、澤嘉弘、石川孝博、重岡成：葉緑体由来の酸化的シグナリングに關与する転写因子群の機能解析(日本ビタミン学会第 65 回大会・一橋大学・H25、5/17-18)

丸田隆典、野志昌弘、問田英里、松田峻、中村茉樹、田茂井政宏、高木優、石川孝博、重岡成：葉緑体由来の H₂O₂ 応答性遺伝子群の包括的な逆遺伝学的解析(日本農芸化学会 2013 年度大会・東北大学・H25、3/25-27)

問田英里、野志昌弘、松田峻、野坂亮太、田茂井政宏、吉村和也、高木優、丸田隆典、大和開、澤嘉弘、石川孝博、重岡成：ホメオドメインロイシンジッパー転写因子(HAT1)を介した酸化的ストレス応答(日本農芸化学会 2013 年度大会・東北大学・H25、3/25-27)

丸田隆典、重岡成【招待講演】：高等植物における活性酸素種代謝とレドックスシグナリング(第 54 回植物生理学会年会・岡山大学・H25、3/21-23)

野志昌弘、問田英里、岩井佑真、岡本泰、倉田竜也、中村茉樹、松田峻、野坂亮太、田茂井政宏、丸田隆典、吉村和也、高木優、重岡成：酸化的シグナリングに關与する新奇転写因子群の同定と機能解析(第 54 回植物生理学会年会・岡山大学・H25、3/21-23)

丸田隆典、問田英里、大和開、松田峻、野坂亮太、野志昌弘、田茂井政宏、澤嘉弘、高木優、吉村和也、石川孝博、重岡成：Isolation and characterization of novel transcription factors involved in oxidative signaling(第 35 回日本分子生物学会年会・福岡国際会議場・マリンメッセ福岡・H24、12/11-14)

丸田隆典、芦田奈々、松田峻、野坂亮太、野志昌弘、田茂井政宏、吉村和也、石川孝博、重岡成：葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ発現の誘導抑制系を用いた酸化的シグナリングの分子機構の解明（日本ビタミン学会第 64 回大会・長良川国際会議場・H24、6/22-23）

〔図書〕(計 0 件)

〔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 0 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸田 隆典 (MARUTA, Takanori)
島根大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：50607439

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし