

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440149

研究課題名(和文)酸化シグナルによる植物細胞傷害プロセス解明：活性カルボニル種の作用とインパクト

研究課題名(英文)Action of reactive carbonyl species in plant oxidative signaling

研究代表者

真野 純一 (Mano, Jun'ichi)

山口大学・大学研究推進機構・教授

研究者番号：50243100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化脂質由来の活性カルボニル種(RCS)が植物の酸化シグナルとして作用することを検証し、RCSの作用点を以下のように解明した。(1) 活性酸素によるタバコBY-2培養細胞のプログラム細胞死(PCD)開始には、RCSがシグナル分子となることを立証した。(2) PCDを開始させるカスパーゼ3様プロテアーゼ(C3LP)がRCSにより直接活性化されることを見いだした。(3) アブシシン酸(ABA)による気孔閉鎖シグナル伝達において、活性酸素の下流でRCSがシグナルを伝えることを立証した。また、(4) 強毒性RCSであるアクロレインを消去するグルタチオントランスフェラーゼを植物から初めて単離した。

研究成果の概要(英文)：We proved the physiological role of reactive carbonyl species (RCS), lipid peroxide-derived toxic species, to act as signal mediator in oxidative signaling in plants. Following achievements were done. (1) RCS were produced in oxidatively stimulated cells and they initiated programmed cell death in tobacco and Arabidopsis thaliana. (2) The earliest event in RCS-stimulated tobacco cells was the RCS-mediated activation of caspase-3-like protease. (3) In guard cells, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signal after abscisic acid stimulation leading to stomata closure was mediated by RCS. We further investigated the mechanism of RCS modulation in plants, and found that novel isozymes of glutathione transferase in spinach and A. thaliana catalyze the conjugation of acrolein and glutathione efficiently.

研究分野：植物生理学

キーワード：酸化シグナル 活性カルボニル種 活性酸素 プログラム細胞死 アブシシン酸 気孔閉鎖 グルタチオントランスフェラーゼ 植物ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

乾燥や高温低温など野外環境条件の変動は植物のストレスであり、農業生産に大きな損失をもたらしている。こうしたストレスは、その環境における野生植物生育限界の決定因子でもある。ストレス条件では、細胞で生成増大する活性酸素が細胞死を引き起こし、組織が傷害される。また、近年の研究から、活性酸素は感染や傷害など生物的ストレスに対する植物の防御応答シグナル、さらにアブシシン酸 (ABA) の気孔閉口シグナル伝達経路の仲介物質などとしてもはたらくことが明らかになってきた。このように活性酸素は植物のさまざまな生理学的局面で細胞の運命を決定づける「酸化シグナル」として作用する。このシグナルはなんらかのタンパク質によって受容・認識されると考えられるが、活性酸素がどのように特異的なシグナルとして伝達されるのかは未解明である。

活性酸素は細胞内では膜脂質を酸化し、生成した過酸化脂質が分解されると反応性の高い、 $\alpha$ -不飽和カルボニル化合物 (活性カルボニル種 (reactive carbonyl species; RCS)) が生じる。研究代表者らの下記(1)~(3)の研究成果から、植物の酸化障害の直接的な原因物質は RCS であることが明らかになってきた。(1) RCS 消去酵素 2-アルケナルレダクターゼ (AER) を植物で過剰発現させると、RCS 生成が抑制され、環境ストレス耐性が高まった。(2) 植物への酸化ストレス処理により、毒性の高いアクロレインなどの RCS 生成が増大した。(3) これらの RCS は葉緑体のグルタチオン (GSH) を消費し、チオール制御酵素を失活させ、光合成を阻害した。すなわち、膜脂質の酸化で生じるさまざまな RCS が植物の環境ストレスにおいて、活性酸素により発生し、細胞に傷害を与える因子である。一方、植物への生物ストレスによって活性化されたリポキシゲナーゼ (LOX) が過酸化脂質を生成したときにも RCS は生成する。

この RCS がストレス防御遺伝子群の発現を誘導することが知られていた。これらの知見を総合すると、活性酸素の下流で生じる RCS は、植物の酸化シグナルを担う化学的実体であるという可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物の酸化シグナル伝達機構における RCS の意義と作用、および RCS 制御機構を解明することを目的とした。植物の酸化シグナル応答に RCS が関与するならば、細胞に酸化刺激 ( $H_2O_2$  など) を与えたとき、RCS が増大するはずであり、かつ、RCS を消去すれば細胞の応答が抑制されるはずである。最初の実験では、活性酸素によって引き起こされるプログラム細胞死 (PCD) への RCS の関与を検証し、RCS の作用点の解明をめざした。つぎに、活性酸素が関与することが知られている ABA による気孔閉口シグナル伝達過程への関与を検証した。

酸化刺激によって細胞で増大するカルボニル種の分析から、これまでに植物細胞ではアクロレインや 4-ヒドロキシノネナール (HNE) といった RCS のなかでもきわめて反応性の高い分子種が増大することを明らかにしてきた。アクロレインを消去する酵素として、動物では数種類のグルタチオントランスフェラーゼ (GST) が知られていたが、植物では同定されていなかった。予備実験からホウレンソウにアクロレイン消去 GST 活性を見いだしたので、これを精製し、酵素学的性質を解析することをめざした。

## 3. 研究の方法

(1) 活性酸素により誘導される PCD への RCS の関与

タバコ Bright Yellow-2 (BY-2) 培養細胞を Murashige-Skoog 培地で振とう培養し、培養 4 日目の細胞に  $H_2O_2$  を与えた。PCD は TUNEL アッセイ、ゲノム DNA の断片化 (アガロースゲル電気泳動で 180 bp 断片およびその整数

倍長の断片が出現する), および細胞の萎縮(細胞壁からの分離)によって判定した。AER 過剰発現タバコを寒天培地で栽培し, その根に  $H_2O_2$  または NaCl によりストレスを与え, 根の表皮細胞の PCD を TUNEL アッセイにより判定した。

#### (2) RCS による PCD 誘導の初期現象の解析

RCS を与えたタバコ BY-2 細胞から水溶性タンパク質を抽出し, カスパーゼ 1 様プロテアーゼ (C1LP), カスパーゼ 3 様プロテアーゼ (C3LP) 活性を, 蛍光標識した基質の分解量から求めた。また, 同様に処理した細胞のアスコルビン酸含量, グルタチオン含量を測定した。

#### (3) ABA による気孔閉鎖シグナル伝達への RCS の関与

タバコ表皮に ABA を与えたときに生成する RCS を 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンで誘導体化し, HPLC により同定, 定量する。表皮に RCS を与えたときの気孔開度(顕微鏡観察), 孔辺細胞の  $K^+$  流入チャネル活性化を測定する。

#### (4) Acr を消去する GST アイソザイムの単離と cDNA クローニング

ホウレンソウからアクロレイン (Acr) 消去活性をもつ GST アイソザイムをグルタチオン (GSH) アフィニティークロマトグラフィーなどで単離精製した。精製度は, 等電点電気泳動で単一のタンパク質になったことで検定した。このアイソザイムの部分アミノ酸配列から, シロイヌナズナ cDNA 配列ライブラリを検索し, 相同性の高い GST Tau アイソザイムをいくつか大腸菌で発現させ, 精製 GST タンパク質の Acr 消去能を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) RCS が PCD 開始のシグナル分子であることの立証。

タバコ BY-2 細胞への  $H_2O_2$  処理により PCD が進行するとき PCD に先立ち複数種類の RCS

が生じること, カルボニル消去剤であるカルノシンまたはヒドララジンを BY-2 に加えると,  $H_2O_2$  添加後の細胞の活性酸素レベル増大は消去剤無添加時と同レベルだが RCS の増大は抑えられ, PCD が進行しないことを見いだした。また, さまざまな RCS が PCD を誘発する強さを比較し, アクロレインと HNE がもっとも PCD 誘発能が高いことを明らかにした。さらに塩ストレス処理によって根の表皮細胞で進行する PCD にも RCS がシグナルとして関与することをタバコとシロイヌナズナで立証した。本成果は *Plant Physiol.* 誌に掲載され, On the Inside 欄で Editor によって内容が紹介された。

#### (2) RCS による C3LP の活性化が PCD の開始イベントであることを発見。

タバコ BY-2 細胞での酸化ストレスによる PCD 初期過程を解析した。PCD を誘導する濃度の Acr と誘導しない濃度の Acr を BY-2 細胞に加えたときの細胞の生化学的成分の変化を比較し, PCD の誘導には, Acr による C3LP の活性化が伴うことを明らかにした。また, C3LP タンパク質は RCS により活性化されるが,  $H_2O_2$  によっては活性化されないことから, 細胞に  $H_2O_2$  を与えたときの C3LP 活性化は, RCS の作用によることが示された。本成果は *Plant Cell Physiol.* 誌に掲載され, 表紙に採用された。

#### (3) 孔辺細胞の ABA 応答(気孔閉口)に RCS がシグナルとして作用することを立証。

RCS 消去酵素 AER を過剰発現させたタバコでは, ABA による気孔閉口応答が阻害された。RCS を与えると応答が回復した。この結果から, ABA が孔辺細胞の NADPH オキシダーゼを活性化し, 生じた活性酸素により気孔閉口が誘導されるシグナル伝達系では, RCS が活性酸素のシグナルを下流に伝達する分子であることが初めて明らかになった。*Plant Cell Physiol.* 誌に受理された。

#### (4) Acr に特異的な GST アイソザイムをホウ

レンソウから初めて単離。

Acr を消去する既知の植物酵素に比べ、Km 値が 2 桁小さいことから、生理的な Acr 消去酵素と推定された。さらにホウレンソウの GST とアミノ酸配列の相同性が高いシロイヌナズナ GST アイソザイム Tau19 も、同様に Acr に特異性の高い GST であることを見いだした。*Planta* 誌に受理された。

#### 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 9 件)

Mano, J., Ishibashi, A., Muneuchi, H., Morita, C., Sakai, H., Biswas, Md. S., Koeduka, T. and Kitajima, S. (2017) Acrolein-detoxifying isozymes of glutathione transferase in plants. *Planta* 245: 255-264. 査読有り .

Islam, Md. M., Ye, W., Matsushima, D., Munemasa, S., Okuma, E., Nakamura, Y., Biswas, Md. S., Mano, J. and Murata, Y. (2016) Reactive carbonyl species mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Plant Cell Physiol.* 57: 2552-2563. 査読有り .

Mano, J., Endo, T. and Miyake, C. (2016) How do photosynthetic organisms manage light stress? A tribute to the late Professor Kozi Asada. *Plant Cell Physiol.* 57: 1351-1353. 査読なし .

Biswas, Md. S. and Mano, J. (2016) Reactive carbonyl species activate caspase-3-like protease to initiate programmed cell death in plants. *Plant Cell Physiol.* 57: 1432-1442. 査読有り .

Biswas, Md. S. and Mano, J. (2015) Lipid peroxide-derived short-chain carbonyls mediate hydrogen peroxide-induced and salt-induced programmed cell death in plants. *Plant Physiol.* 168: 885-898. 査読有り .

Mano, J., Nagata, M., Okamura, S., Shiraya, T., and Mitsui, T. (2014) Identification of

oxidative-modified proteins in salt-stressed Arabidopsis: a carbonyl-targeted proteomics approach. *Plant Cell Physiol.* 55: 1233-1244. 査読有り .

Wang, S., Uddin, Md. I., Tanaka, K., Yin, L., Qi, Y., Mano, J., Matsui, K., Shimomura, N., Sakaki, T., Deng, X. and Zhang, S. (2014) Maintenance of chloroplast structure and function by overexpression of the OsMGD gene leads to enhanced salt tolerance in tobacco. *Plant Physiol.* 165: 1144-1155. 査読有り .

Mano, J., Khorobrykh, S., Matsui, K., Iijima, Y., Sakurai, N., Suzuki, H. and Shibata, D. (2014) Acrolein is formed from trienoic fatty acids in chloroplasts: A targeted metabolomics approach. *Plant Biotechnol.* 31: 535-544. 査読有り .

真野純一 (2014) 活性酸素は生体分子にどう作用するか? - 酸化シグナルを伝える活性カルボニル種の生成と作用 . 光合成研究 . 24 : pp. 84-89 . 査読有り .

[学会発表](計 12 件)

Mano, J.: Reactive carbonyl species function as oxidative signals. The symposium "Plant Oxylipins and Their Diverse Functions.", 東京工業大学, 神奈川県横浜市 (2016 年 12 月 5 日) .

真野純一, 村田芳行: 過酸化脂質由来の活性カルボニル種のシグナル作用 . 第 29 回植物脂質シンポジウム, 大阪大学, 大阪府豊中市 (2016 年 11 月 25 日) .

Md. Sanaullah Biswas, Jun'ichi Mano, Hidehiro Fukaki: Involvement of oxylipin carbonyls in the auxin-dependent lateral root formation. 第 57 回 日本植物生理学会年会, 岩手大学, 岩手県盛岡市 (2016 年 3 月 19 日) .

Biswas, S., Mano, J.: 酸化シグナル因子である活性カルボニル種が植物プログラム

細胞死を引き起こすしくみ.第57回日本植物生理学会年会,岩手大学,岩手県盛岡市(2016年3月19日).

Md. Sanauallah Biswas, Hidehiro Fukaki, Jun'ichi Mano: Oxylipin carbonyls are involved in the auxin signalling to initiate lateral root formation. 日本植物学会第79回大会,朱鷺メッセ,新潟県新潟市(2015年9月6日).

Mano, J., Biswas, S.: Glutathione in plant cells is constitutively consumed by acrolein, a lipid peroxide-derived highly toxic aldehyde. The 12th International POG Conference Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, Verona 市, イタリア(2015年6月24日-26日).

〔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  
<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~mano/pg789.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

真野 純一 (Mano, Jun'ichi)  
山口大学・大学研究推進機構・教授  
研究者番号: 50243100

### (2)研究分担者

松井 健二 (Matsui, Kenji)  
山口大学・創成科学研究科・教授  
研究者番号: 90199729

肥塚 崇男 (Koeduka, Takao)  
山口大学・創成科学研究科・助教  
研究者番号: 30565106

### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

### (4)研究協力者

( )