

## 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 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657014

研究課題名（和文） イソプレン放出による植物の高温耐性と葉面温度低下の新奇メカニズム

研究課題名（英文） Thermotolerance through isoprene emission and the novel mechanism of decrease in leaf surface temperature in plants

研究代表者

矢崎 一史 (YAZAKI KAZUFUMI)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：00191099

研究成果の概要（和文）： イソプレン合成酵素(IspS)の発現により、シロイヌナズナが 60 度、2.5 時間の熱処理に対して耐性を獲得する機構の解明を目的とした。種々の植物ホルモンを網羅的に調べたが、野生型と形質転換体で有意な差はなかった。一方、熱処理直後は形質転換体でも野生株同様に強くしおれるが、その後 23 度での培養時に IspS 形質転換体の回復が有意によいことから、急性の熱ショック耐性と、その後の回復は全く別のプロセスであると考えられた。実際、IspS 発現タバコがオゾン傷害抵抗性を示すとの報告もあり、熱ストレスを負荷下、チラコイド内で発生する活性酸素種の消去にイソプレンが貢献していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Mechanism of thermotolerance by expressing isoprene synthase (IspS) in *Arabidopsis thaliana* has been studied, in which transgenic plants were treated at 60 °C for 2.5 hr. We compared various endogenous plant hormone contents between wild type and IspS-expressing *Arabidopsis* systematically, but could find significant difference. During the analysis we found that the tolerance to drastic and short time heat shock seems to be different to recovery rate of treated plants on cultivation at 23°C for a week. Considering with a recent report on the tolerance of IspS-expressing tobacco plant to ozone stress, it is suggested that the thermotolerance we observed may be due to the depletion of reactive oxygen species raised after heat shock treatment in plastids by isoprene, which actually functions as OH radical scavenger in atmosphere.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,700,000 | 0       | 1,700,000 |
| 2011 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,600,000 | 270,000 | 2,870,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、イソプレン、高温耐性、プラスチド、MEP 経路、揮発性有機化合物

## 1. 研究開始当初の背景

| 植物には炭素 5 からなるヘミテルペンであ

るイソプレンを放出する植物が多くある。イソプレン放出植物には、ポプラ、ヤナギ、クズなど生長の早い植物が多く、特に熱帯領域の植物が夏の日差しの強い日中に放出することが多いとされる。一方で、イソプレンを全く放出しない植物も多くあり、その生合成は植物の生育には必須でないことも示されている。

筆者は、ポプラ属植物からイソプレン合成酵素遺伝子をクローニングし、イソプレン放出の植物にとっての生理的意義を調べる研究を行っていたが、最近イソプレン合成酵素遺伝子を持たないシロイヌナズナにこれを導入発現したところ、形質転換シロイヌナズナはイソプレンを放出するに伴い、極めて高い熱耐性を獲得することを突き止めた。その熱耐性は、野生型が死滅してしまう60度2.5時間という過激な熱処理に対して、独立した全ての形質転換体が生存できるという顕著なものであった。詳しい機能は未解明であるが、実際に放出されるイソプレンの量的には300 ng hr<sup>-1</sup> plant<sup>-1</sup>とわずかでありながら、葉表面温度が5度から最大で8度も低下することを見いだしており、これは従来の機構では説明できない斬新な発見と評価されている。

京都議定書に代表されるように、今や地球の温暖化は全世界的に取り組むべき問題に発展しているが、ほとんどの注目はCO<sub>2</sub>排出規制にみるように温暖化を食い止める方策に向いており、間違いなく温暖化を続ける地球環境に対しどのように適応していくかに対しては、十分な配慮がなされていないのが現状である。申請者は、イネなどの重要作物の穀倉地帯が北上を続ける現実と照らし合わせ、作物に卓抜な高温耐性を付与する分子育種の開発が必要と考える。

## 2. 研究の目的

筆者は、自らが見出したイソプレン合成酵素遺伝子の導入による顕著な高温耐性を、農学的に応用することを考えた。イネはもともと熱帯地方の原産ではあるが、わが国で栽培される主だった種はいずれも高温耐性は低く、開花期に気温が高いと十分に結実をしない。そこで本研究では、*Populus alba* からクローニングしたイソプレン合成酵素遺伝子をイネに導入し、高温耐性イネの分子育種の基盤を構築することを目的とする。組換えイネのイソプレン放出能力と高温耐性を評価する。高温耐性は、超高温・短時間の評価と、高温・長期間の組み合わせで急性、および慢性の高温ストレス耐性を評価し、そのイソプレン放出量との相関を検定する。その際、シロイヌナズナと同様に、葉表面の温度低下の程度を測定する。またシロイヌナズナのイソプレン放出組換え体でみられたプラント

マスの増大も組換えイネで評価し、イネの場合には種子の収量も対照群と比較する。さらにより効率の良いプロモータの検索と、高温耐性を支えるメカニズムの解明をイソプレノイド代謝変動の解析より行い、高温耐性イネの分子育種に必要な基盤情報を得る。

## 3. 研究の方法

イソプレン合成酵素は、イソプレン放出植物ではその葉のプラスチドに局在しているため、光合成活性に依存して供給される、非メバロン酸 (MEP) 経路のジメチルアリルグリニン酸 (DMAPP) を基質にして一段階の反応でイソプレンを生成する。できたイソプレンは蓄積することなく大気中に放出されることが知られている。本研究では、シロイヌナズナに使った35Sプロモータ以外にもトウモロコシのユビキチンプロモータを使って、筆者の研究室でクローニングした *Populus alba* の cDNA をイネに発現させる。組換えイネは、IspS を35Sプロモータでドライブしたコンストラクトを作成中し、イネに導入する。その生育を待って、まずはイソプレン放出能の評価、次いで急性熱耐性、慢性熱耐性の評価を行い、葉表面の温度のモニタリングを行って、イソプレン放出植物と対照群との比較を行う。さらに、プラントマスの評価、種子収量の評価を行い、導入遺伝子の効果を調べる。さらに、内在性の代謝産物の変動を調べることで、葉表面温度低下に関するメカニズムに関しても考察を行う

## 4. 研究成果

イソプレンはプラスチド内にて、MEP 経路により DMAPP を前駆体として生合成される。IspS 形質転換体は PaIspS 遺伝子の導入によって、MEP 経路に由来するイソプレノイド系化合物の含量に変化をもたらした可能性が考えられた。そこで、MEP 経路において生合成される主要イソプレノイドであるカロテノイド、ビタミンE及びクロロフィル含量を測定した。その結果、カロテノイド含量とクロロフィル含量は野性株と形質転換体の間に明確な差は見られなかったが、形質転換体はビタミンE含量が野性株よりも若干増加していることが示唆された。そこで、ビタミンE含量の増加が高温耐性に何らかの寄与をしている可能性を考え、ビタミンE含量が野性株に比べて4倍以上であるビタミンE高蓄積変異体 35S::HPT1 を用いて、高温耐性実験を行った。しかし結果として、野性株に比べて35S::HPT1 に明確な高温耐性は見られなかった (data not shown)。

MEP 経路ではイソプレン、イソプレノイドと同様に DMAPP を前駆体として、ジベレリンやアブシジン酸、サイトカイニン等の様々な植物ホルモンが生合成される。形質転換体の

細胞の大きさが増大した結果から、イソプレレン合成酵素の発現により代謝が改変し、これらの植物ホルモンの含量が変動した可能性が考えられる。そこで、植物体の植物ホルモン含量の測定を行った。

植物体は常温下 (23°C) 及び高温下 (40°C) でそれぞれ 4 日間生育させたものを使用し、植物ホルモンはオーキシシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸について測定した。その結果、どちらの温度で処理した場合にも、野生株と形質転換体間では顕著な差は見られなかった。しかし、ABA に関しては、野生株・形質転換体共に、予想に反して高温時の方が常温に比べて含量が高くなっており、高温にすることで ABA レベルとしては気孔を閉じる方向にシフトしている事が分かった (図 1)。

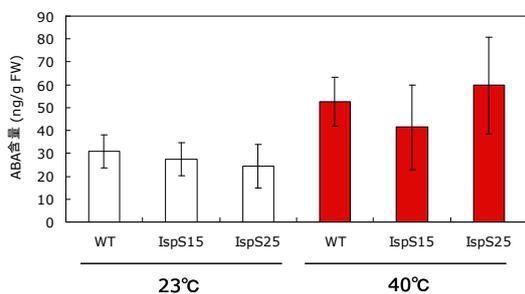


図 1. 常温及び高温条件下での ABA 含量

形質転換体では細胞の大きさが増大したのに関わらず、野生株と形質転換体間には植物ホルモンの含量に有意の差は見られなかった。植物ホルモンと同様に DAMPP を前駆体とするイソプレノイドの  $\beta$  カロテンやクロロフィル含量も形質転換体は野生株と差は見られていない。しかし、ビタミン E 含量は減少していることから、DMAPP を前駆体として生合成される物質へのイソプレレン合成による影響はあると考えられる。そこから、同様に DMAPP を前駆体とする他の物質の含量が変化し、それらが細胞の生長に影響を与えた可能性が考えられる。また、それと共に、イソプレレン自身が何らかのシグナルとなり、細胞生長を促進するなどの働きを持つ可能性も否定できない。

佐々木らは IspS 形質転換体が高温耐性を獲得した原因を解明するために、高温処理中の植物体の葉面温度を測定した結果、形質転換体の葉面温度は野生株に比べて 5-8°C 低いと報告している (Plant Cell Physiol. 2007)。一般的に葉面温度の調節は植物ホルモンである ABA によって調節されることが知られている。即ち、細胞内の ABA 量が減少すると気孔が開き、葉からの蒸散量が増加することで葉面温度が低下する。しかし、植物ホルモンを測定した結果から、IspS 形質転換体と野生株の間には ABA 含量の差は見られなかった。

だが、ABA を介さないメカニズムによって蒸散量の変化が現れた可能性も考えられたため、蒸散量測定を行った。実験は簡易法であるが、4 週齢の植物体の根を切断し、地上部の水分量の損失を重量として追跡することで行った。

測定は常温条件下 (25°C) 及び高温条件下 (60°C) の両方で行った。その結果、常温条件下においては野生株と IspS 形質転換体間に差は見られなかったが、高温条件下においては、IspS 形質転換体の方が野生株よりも高い値を示す事が再現性良く観察された。しかしその差は小さく、統計的に有意差があるというレベルではなかった (図 2)。

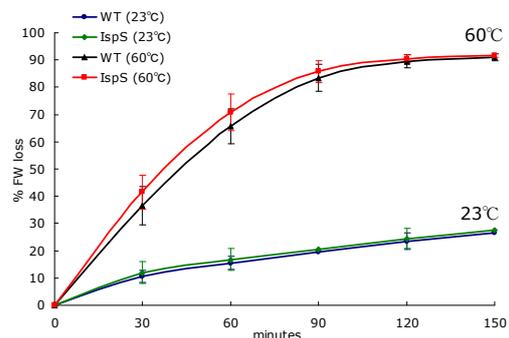


図 2. 常温及び高温条件下における蒸散量

IspS 形質転換体が高温耐性を得た理由の一つとして、蒸散量の上昇が関与すると予想されるが、蒸散は葉の気孔を介して行われるために、IspS 形質転換体は野生株に比べて気孔コンダクタンスが高いのではないかと考えられた。気孔の開閉を調節する植物ホルモンである ABA 含量には差は見られなかったが、イソプレレンが何らかの機構を介して、気孔コンダクタンスに変化を起こしている可能性もあるため、実際に気孔を観察した。50°C に静置し植物体のロゼット葉を観察したが、IspS 形質転換体と野生株間に明確な差は見られなかった。

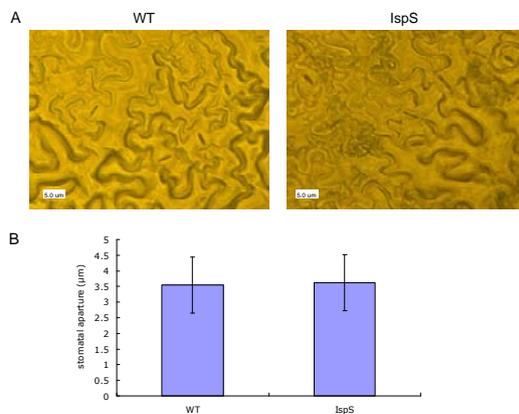


図 3. 高温条件下 (50°C) における気孔

- (A) 気孔の顕微鏡写真  
(B) 気孔コンダクタンス測定

以上の結果から、IspS 形質転換体に見られる高温耐性はアブシジン酸とは関係のないメカニズムによって起こっていると判断された。葉面温度の低下の原因として、イソプレンの生成及び放出によるものの可能性も考えるが、イソプレンの気化熱は  $6.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  (純正化学株式会社製品安全データシート)、また DMAPP からのイソプレンの生成反応は吸熱反応 ( $10.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) (学術出版 現代科学の基礎より算出) であり、微量なイソプレンの生合成及び葉からの放出自体 ( $3.5 - 4.8 \text{ nmol hr}^{-1} \text{ plant}^{-1}$ ) が葉の表面温度を直接下げているとは考えにくい。そこから、葉面温度が低下した原因としては、イソペン放出に伴う水の蒸散量の増加が考えられる。今回の実験で有意差が見られなかった理由として、行った実験手法が簡易法であり、生育状態の蒸散を正しくモニターできていない可能性が高いと考えている。今後、よりインタクトで正確な測定法を模索する必要がある。

IspS を発現した植物が高温耐性を獲得したメカニズムは複雑な様相を呈しているが、葉面温度の低下とは別に、イソプレンの持つ何らかの他の機構が働くこと」が示唆されている。注目すべきなのは、イソペンにはオゾンや OH ラジカルなどの活性酸素種と反応することである。イソペンは大気中に放出され、図4のように OH ラジカルやオゾンと反応し分解される。

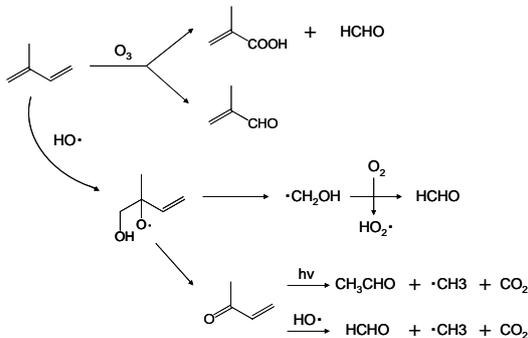


図4. 大気中でのイソプレンの分解経路

例えばオゾンは植物細胞内に入ると  $\text{H}_2\text{O}_2$  などの活性酸素種を生成し、細胞に酸化ダメージを与えることが知られており、イソペン合成酵素を発現させたタバコはオゾン酸化に耐性を持つという報告がある (Claudia et al., 2009)。一方、植物は高温ストレスにさらされると細胞内で活性酸素種の生成が起こり、酸化ダメージを受ける事が知られている (Larkindale and Knight, 2002)。エチレンや ABA、SA などにより抗酸化作用を増

加させることで、高温耐性を得たという報告があることから (Larkindale and Knight, 2002; Jane et al., 2004)、抗酸化作用と高温耐性は関連した事象であると考えられる。ここから、IspS 形質転換体は、高温ストレスにより受ける酸化ダメージをイソプレンの持つ抗酸化作用によって和らげることで高温耐性を得たということが考えられる。以上のことから、イソプレンの持つ「冷却作用」と「抗酸化作用」が複合的に働くことで、IspS 形質転換体は高温耐性を得ている、という結論に至っている (図5)。

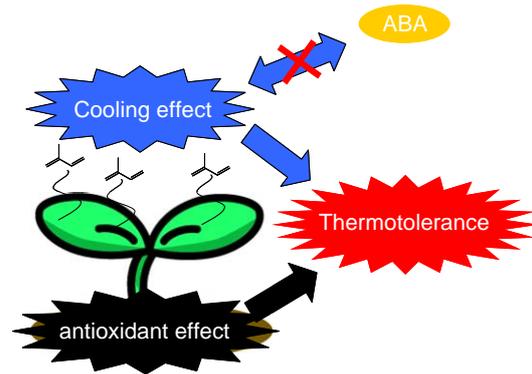


図5. イソペンによる高温耐性機構のモデル図

#### 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2件)

- ① Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Yamamoto, H., Yazaki, K., Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*, **J. Biol. Chem.**, (査読有), 286, 2011, 24125-24134, DOI: 10.1074/jbc.M111.244426
- ② Shitan, N., (5人省略), Yazaki, K., A Tolerance gene for prenylated flavonoid encodes 26S proteasome regulatory subunit in *Sophora flavescens*, **Biosci. Biotech. Biochem.**, (査読有), 75, 2011, 982-984, 982-984, DOI: org/10.1271/bbb.100665

[学会発表] (計2件)

- ① 矢崎一史、植物のイソプレノイド単位 DMAPP を巡る分泌型低分子の代謝生理、科学技術交流財団研究会 (招待公演)、2011年12月22日 (名古屋)
- ② 馬場奈央登、佐々木佳菜子、矢崎一史、イソペン放出による高温耐性機構の解析、第28回日本植物細胞分子生物学会、2010年9月3日 (仙台)

〔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://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LPGE/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢崎 一史 (YAZAKI KAZUFUMI)  
京都大学・生存圏研究所・教授  
研究者番号：00191099