

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07325

研究課題名(和文)酸化ストレスシグナルの受容機構の解明

研究課題名(英文) Screening of receptors involved in oxidative stress signaling

研究代表者

山内 靖雄 (Yamauchi, Yasuo)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：90283978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは多くの環境ストレスにおいて併発しているため、その実体解明は様々な環境ストレスの理解につながる。本研究課題ではシグナル分子を植物がどのように受容しているかを明らかにすることを目的に、「酵母Two-hybrid系を用いた HSFA1-HSP70/90相互作用に対するRSLVの影響」、「GPCR様受容体欠損株を用いた逆遺伝学的解析」、の2つの実験を行った。その結果、前者は否定されたが、後者は酸化ストレスシグナル受容にGPCR様受容体が関わっていることを支持する結果を得ることができた。これらの研究の一部をまとめ、論文を2報出版することができた。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is accompanied by various environmental stresses, thus signaling mechanism involved in the oxidative stress is an important subject to understand environmental stress response in plants. In this study, two possibilities of reception of oxidative stress signal were validated. As a result, involvement of interaction of HSFA1 and HSP70/90 in oxidative stress recognition was rejected. On the other hand, recognition of oxidative stress signal by GPCR-like receptor was supported by various positive data, therefore I published these results in two original papers.

研究分野：植物生理学

キーワード：酸化ストレス 植物 高温ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに酸化ストレスシグナルの化学的本来として、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル結合を持つ炭素鎖4~9の直鎖カルボニル化合物(RSLV)を見出した。研究開始当初、RSLVが関与する酸化ストレスシグナル電子伝達系には、1)HSFA1が関与する系と、2)HSFA1の関与しない系、の2つがあると想定した。1)HSFA1が関与する情報伝達系では、最上流のシグナル受容に機能するHSFA1とHSP70(またはHSP 90)複合体形成にRSLVが影響を与えることが関わっていると考えている2)HSFA1とHSP複合体が関与しない未知の情報伝達系に関しては、動物の嗅覚における匂い物質受容と類似した機構が植物にも存在すると考え、Gタンパク質共役受容体(GPCR)の関与するシグナル伝達系の存在を仮定した。

### 2. 研究の目的

本研究計画ではRSLVがHSFA1とHSPの相互作用与える影響を、酵母Two-Hybrid系を用いてin vitroで解析する事、および植物GPCRがRSLVの関与するシグナル伝達系で機能している可能性を見出す事を目的とした。

### 3. 研究の方法

酸化ストレスシグナルとして申請者らが同定した2-ヘキセナールはモデル植物であるシロイヌナズナに処理をすると、30分後に代表的な酸化ストレス応答遺伝子であるZAT10の発現が最大となる。受容体タンパク質の候補として、動物において匂い物質などの揮発性低分子化合物の受容体として機能していることが知られているGタンパク質共役受容体

(GPCR)を候補タンパク質とし、シロイヌナズナが持っている34種類のGPCR様タンパク質を欠損した突然変異体を用いたスクリーニングを行なった。スクリーニングは2-ヘキセナール処理後、野生型シロイヌナズナに比べ、ZAT10の発現が半分以下に減少しているものを選抜することにした。その結果、cand1、cand6、cand7、cand8の4種類の突然変異株がスクリーニングされた。次に実際にそれらの突然変異体欠損しているタンパク質が2-ヘキセナールを結合するかどうかを、昆虫細胞において組換えタンパク質と異種発現させたものを作成し、<sup>3</sup>Hで放射性標識した2-ヘキセナール(<sup>3</sup>H-2-ヘキセナール)を合成して、in vitroでの結合実験に供した。

### 4. 研究成果

「酵母Two-hybrid系を用いたHSFA1-HSP70/90相互作用に対するRSLVの影響」については、実験系の構築は計画通りに研究を進めることができた。しかしながら本実験では、予想された結果を得ることができず、作業仮説として設定した、シグナル分子が直接HSFA1-HSP70/90相互作用を阻害する、ということが否定された。現在は別のシグナル伝達経路を仮定し、その可能性を検討している。「GPCR様受容体欠損株を用いた逆遺伝学的解析」についても実験計画とおり、実験系を構築することができた。その系を用いて実験を進めた結果、いずれのタンパク質も<sup>3</sup>H-2-ヘキセナールを結合することが分かったが、リガンドとしては機能しない<sup>3</sup>H-3-ヘキセナールを用いた実験結果から、cand1、cand6、cand8が2-ヘキセ

ナール特異的な受容体として機能している可能性が示された。またGPCR受容体の下流の情報伝達に関わるタンパク質として、GPA1、CNGCs、TPC1が関わっていることをそれらの欠損変異体を用いたスクリーニングから明らかにされた。現在は、2-ヘキセナールの受容からZAT10の発現に至る経路を以下のように想定している。

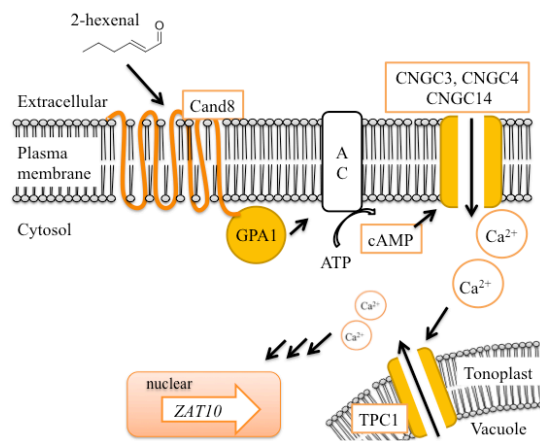


図. 2-ヘキセナールの受容からZAT10の発現に至る情報伝達系の想定モデル。

環境ストレスの多くに関わっている酸化ストレスシグナル受容にGPCR様受容体が関与していることを指示する結果を得ることができた。これらの研究の一部をまとめ、論文を2報出版することができた。

また2-ヘキセナール以外にもGPCR容受容体を介したシグナル伝達系により情報が伝達されている候補化合物として3-ヘキセニルアセテート（以下、3-HAC）を見出だした。3-HACは植物病原菌応答に関わるマーカー遺伝子（*PR1*や*PR2*）を誘導することから、これらの遺伝子の発現が抑えられた突然変異体スクリーニングから、以

下のような情報伝達系モデルを組み立てることができた。

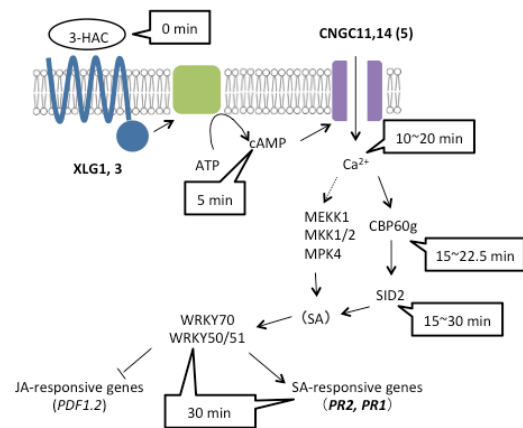


図. 3-ヘキセニルアセテート (3-HAC) の受容からマーカー遺伝子 (*PR1*, *PR2*) の発現に至る情報伝達系の概要モデル。

特筆される成果としては、研究の過程で、植物の主要な酸化ストレスシグナルとして機能する化合物 (RSLV) の代表格である2-ヘキセナールの合成酵素の単離に成功した。2-ヘキセナールは植物の葉の匂いを特徴付ける代表的な香り (みどりの香り) であり、今から100年以上前に同定された化合物である。しかしそれを合成する酵素は、存在が示唆されてから100年以上も不明であった。そのため2-ヘキセナール合成酵素の特定は、新聞報道やネットニュース、アロマ関係の雑誌にも取り上げられるなどの反響が大きな成果であった。

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 2 件)

1、Kunishima, M., Yamauchi, Y., Mizutani, M., Kuse, M., Takikawa, H., Sugimoto, Y. Identification of

(Z)-3:(E)-2-hexenal isomerases essential to the production of the leaf aldehyde in plants *Journal of Biological Chemistry*, 291, 14023-14033 (2016)

2、Marutani, Y., Yamauchi, Y., Higashiyama, M., Miyoshi A., Akimoto S., Inoue, K., Ikeda, K., Mizutani, M., Sugimoto, Y. Essential role of the PSI-LHCII supercomplex in photosystem acclimation to light and/or heat conditions by state transitions. *Photosynthesis Research*, 131, 41-50 (2017)

[学会発表] (計 6件)

1、國嶋幹子、山内靖雄、水谷正治、杉本幸裕

青葉アルデヒドの生成に関わる酵素遺伝子の同定とトマトの香気成分の改変

日本農芸化学会、2015

2、國嶋幹子、山内靖雄、水谷正治、杉本幸裕

Identification of (3Z):(2E)-hexenal isomerase playing a crucial role in the production of leaf aldehyde

日本植物生理学会、2015

3、山内靖雄、みどりの香りはストレスシグナルとして機能するか?

植物二次代謝フロンティア研究会(招待講演)、2016

4、東山真理; 青木仁美; 山内靖雄; 中安大; 水谷正治; 杉本幸裕

シロイヌナズナの酸化ストレス情報伝達系に関わるシグナル受容体の探索

日本農芸化学会関西支部第497回講演会、2016

5、新出ひかる、青木仁美、山内靖雄、水谷正治、杉本幸裕

シロイヌナズナの2-hexenal情報伝達系に関わるCyclic nucleotide-gated Ca channelのスクリーニング

日本農芸化学会関西支部第501回講演会、2017

6、Yasuo Yamauchi

Identification of (Z)-3:(E)-2-hexenal isomerase involved in the production of the leaf aldehyde

第14回日本ナス科コンソーシアム(招待講演)、2017

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: (Z)-3:(E)-2-ヘキセナルイソメラーゼ

発明者: 山内靖雄

権利者: 神戸大学

種類:

番号:

出願年月日: 平成26年11月21日

国内外の別: 国内

○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

山内 靖雄 (YAMAUCHI, Yasuo)  
神戸大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：90283536

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )