

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07484

研究課題名(和文) イソプレン合成を指標とした熱帯樹木の温度センシング及びシグナリング系の解明

研究課題名(英文) Exploration of temperature sensing and signaling mechanism targeting isoprene emission

研究代表者

屋 宏典 (OKU, Hirosuke)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：10177165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯樹木はイソプレンというガスを放出して熱や光などの強い環境ストレスに適応していると考えられている。イソプレンは植物にとっては有益であるが、大気中ではメタン分解能力を減少させて地球温暖化を加速するなどの問題も引き起こす可能性が指摘されており、その合成・放出の調節機構を解明することが求められている。本研究は熱帯樹木のオオバイヌビワをモデルとして、温度変化に伴うイソプレン放出と関連遺伝子発現を網羅的に解析し、熱帯樹木のイソプレンの合成・放出制御には数種の植物ホルモンが日内変動関連遺伝子の制御を介して複合的に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Isoprene emitted from terrestrial vegetation plays an important role in tropospheric chemistry. In order to clarify the temperature dependent molecular regulation of isoprene emission, we carried out a comprehensive analysis of the RNA-seq data set by using correlation analysis, network constructions and co-expression analysis. Results revealed a very close association of isoprene emission and *IspS* gene to genes in the plant hormone signal transduction pathway and circadian clock elements. Transcript levels of 29 genes in these pathways were validated by qRT-PCR. The upstream promoter region of *IspS* was also cloned and several putative cis-regulatory elements identified were consistent with transcriptional regulation in response to light, heat, temperature, plant hormones and circadian rhythmicity

研究分野：脂質生化学

キーワード：イソプレン 熱帯樹木 温度変化 シグナリング

1. 研究開始当初の背景

熱帯植物は、高い外気温と強烈な太陽光線によりもたらされる高温ストレスを克服するため、イソプレンという炭化水素を葉から放出することにより葉温を下げ、或は葉緑体のチラコイド膜を安定化させ、高温ストレスによって引き越される光合成の阻害や他の生理障害から身を守っていると考えられている。一方、低温時には葉からのイソプレン放出を抑制し、炭酸固定産物であるイソプレンの無駄な消費を回避するというような、温度に依存した合理的な代謝調節を行っている。しかしながら、熱帯樹木がどのように温度を感知して、上述のように合目的にイソプレン放出を制御しているのかは全く不明であった。

2. 研究の目的

一般的に植物からのイソプレン放出は気温と光強度に依存しており、申請者等は沖縄産の熱帯樹木を供試材料として熱帯産樹木のイソプレン放出の環境特性が温帯産の植物とは異なる可能性を指摘してきている。申請者はさらに、熱帯樹木のハマイヌビワ及びオオバイヌビワにおいてイソプレン放出が光合成とは独立して特異的に温度と直結して調節されていることを初めて見いだした。この成果は以下の点を明らかにした。1) 両樹木は一日の時間平均温度の積算が300を境にイソプレン放出をオン-オフ制御していた。すなわち、一日の時間平均温度の積算が300以下に低下した翌日はイソプレン放出が完全に停止し、積算温度が300以上になった翌々日からイソプレン放出が再開された。2) 外気温の低下に応じてイソプレン放出は速やかに低下したが、調べた温度範囲内で光合成速度は殆ど影響を受けなかった。3) イソプレン放出のオン-オフ調節では炭酸固定反応に関与している遺伝子発現に比べてイソプレン合成酵素遺伝子の発現変動が特に顕著であり、イソプレン放出の変動は主にイソプレン合成酵素遺伝子の発現変動により説明された。これらの成果は、熱帯植物であるハマイヌビワやオオバイヌビワでは、温度変化感知後のイソプレン合成のオン-オフ調節が温度センシングと直結していることを示唆しており、イソプレン放出が熱帯植物の温度感知機構を解明する上で良い指標となる可能性を指摘している。特に、温度低下時のイソプレン放出抑制は速やか且つ選択的であり、温度センサーとその下流のシグナリングを解明するよいモデル系となると考えられた。

植物の温度変化への応答機構に関しては全般的に不明な点が多いが、植物が温度をどのように感知しているかについては以下のようなメカニズムが提唱されている。生体膜の主要成分であるリン脂質の流動性が温度依存的に変化し、膜の相転移がシグナルとして機能している。転写を抑制するヒスト

ンタンパク質 H2AZ を含むヌクレオソームの占有率が温度変化に応じて変化し、下流の温度応答性の遺伝子発現を制御している。しかしながら、についてはラン藻を植物細胞モデルとした説であり、植物で実際に機能しているかは不明である。一方、はモデル植物であるシロイヌナズナを用いて得られた成果であるが、この機構が熱帯植物に適用できるのかについての検証はなされていない。従って、熱帯植物の温度センシングとシグナリング系については殆ど解明されていない。

我々はこれまで沖縄産熱帯樹木のイソプレン放出の環境特性が温帯産の植物とは異なる可能性を指摘してきている。このような環境ストレスに対する応答性の差異が何に起因するかを解明する研究の一環として、ハマイヌビワ及びオオバイヌビワを含めた数種の熱帯樹木のイソプレン生合成酵素の遺伝子クローニングも行った。さらに既述のイソプレン放出のオン-オフ調節では炭酸固定反応に関与している遺伝子発現に比べてイソプレン合成酵素遺伝子の発現変動が特に顕著であり、イソプレン放出の変動は主にイソプレン生合成酵素遺伝子の発現変動により説明されることを明らかにしている。本研究においてはこれらの知見、特にイソプレン放出の温度依存的なオン-オフ時のイソプレン生合成酵素遺伝子の制御を基本標的にして、熱帯植物であるオオバイヌビワにおける温度センシングとシグナリング系について以下の点を明らかにすることを目的とした。イソプレン放出のオン-オフに伴う関連代謝パラメーターの変動及びギガシーケンサーを用いた遺伝子発現の網羅的解析により、温度変化に伴うイソプレン合成制御の俯瞰的プロファイルを明らかにする。イソプレン生合成酵素遺伝子の温度応答性のプロモーター構造及び関連転写因子群を明らかにする。1)-2)の知見をパスウェイ可視化ツールにより統合して熱帯樹木の温度センサー及び下流のシグナリング系を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者等はイソプレン放出と光合成関連のパラメーターを同時にリアルタイムで計測できる分析システムを用いることにより、人口気象室内での条件としては12以下の温度でオオバイヌビワのイソプレン放出が完全に停止し、これ以上の温度になると24時間以降にイソプレン放出が再開されることを見いだしている。本研究においてはオオバイヌビワをモデルとして、上述のリアルタイムの分析システムを用いて、人口気象室内の温度を段階的に上下させた場合のオオバイヌビワの葉におけるイソプレン放出と光合成関連パラメーター及び各種代謝関連酵素及び遺伝子発現変動のプロファイリングを行うため以下の実験を実施した。

(1)温度変化にともなう代謝産物変動の解析。
まず気象室内の温度を 30 から 12 まで 1 日毎に 6 刻みで段階的に低下させ、その後 30 へと上げ、各ステップ毎にイソプレン放出速度と光合成能を計測した後、葉のサンプリングを行う。サンプリングした葉についてはイソプレン合成の基質である また、イソプレン合成と直接的に関係すると思われる MEP 経路の中間代謝産物及びイソプレン合成酵素をウェスタンブロッティング法により測定した。

(2)温度変化に伴う遺伝子発現変動の解析
本研究においては 次世代シーケンサーにより RNA-seq を行った。アセンブルされたコンティグ配列については、再評価を行った後、Hi-per-BLAST システム、KEGG アノテーションサーバー及び PANTHER HMM スコアリングツールを用いて機能推定 (アノテーション) を行うと同時に、それらの代謝経路への関連付けを行った。

次いで、温度低下に伴うオオバイヌビワの葉のトランスクリプトーム解析を行った。まず、イソプレン放出と高い相関を示す遺伝子或いは光合成関連パラメーターを選別し、可視可ツール Cytoscape の BiNGO プログラムを用いて出現頻度の高い遺伝子オントロジー (GO) 解析を行った。得られた GO はイソプレン放出と相関する細胞内イベントと考えられる。この GO 内の遺伝子について、イソプレン放出との相関を Cytoscape により可視化し、イソプレン放出制御の情報伝達に關与する遺伝子の絞り込みを行った。なお、網羅的解析を補足するために、得られた遺伝子群については qRT-PCR により再現性を確認し、植物ホルモン依存性の情報伝達に關わっている因子の確実な絞り込みを行った。

(3)イソプレン合成酵素プロモーター領域の解析。イソプレン合成酵素遺伝子の塩基配列を基にゲノムウォーキング法によりイソプレン合成酵素のプロモーター領域の塩基配列の決定を行った。

4. 研究成果

(1)温度変化にともなう代謝産物濃度変動の解析。

図 1 はイソプレン合成の代謝反応系を示している。本研究では主に図に示す代謝産物、酵素タンパク及び遺伝子発現について解析した。図中にしめすように、イソプレンは光合成産物であるグルセルアルデヒド 3 リン酸 (G3P) を原料にして、DXS、DXR、MCT、CMK、MCS、HDS、HDR の反応を介して基質である DMADP が合成され、イソプレン合成酵素 IspS によりイソプレンへと転換される。

オオバイヌビワのイソプレン放出は温度依存的に低下し、12 になると殆ど停止する。一方、温帯植物のポプラのイソプレン放出も同様に温度低下に伴い低下するが、完全に停

止することはなかった (図 2)。これらの結

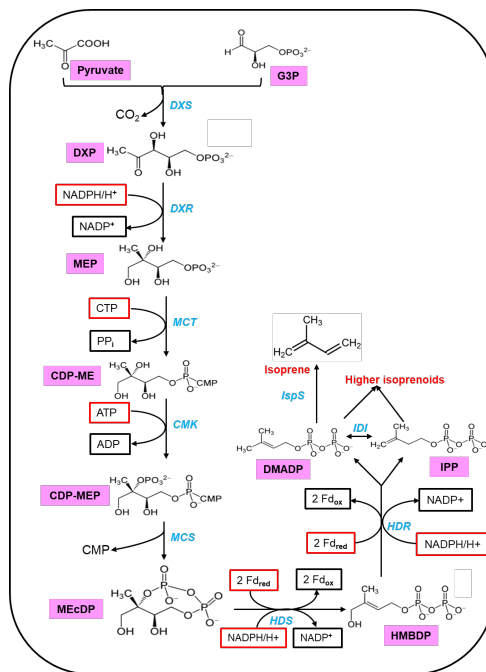


図 1 イソプレン合成経路

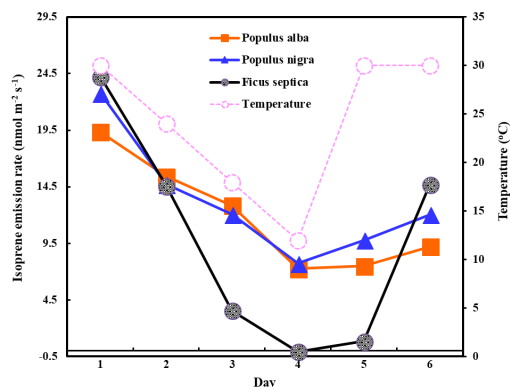


図 2 温度低下に伴うオオバイヌビワのイソプレン放出変化

果から、オオバイヌビワのイソプレン放出は低温に対してポプラより鋭敏に反応していることが明らかとなった。従って、温度適応における代謝応答を解析するいいモデルであると考えられ、本研究の研究材料として用いた。

引き続き、温度低下に対するイソプレン放出変化と光合成速度の相関を調べた (図 3)。

温度低下に伴い、イソプレン放出は完全に停止するまで低下することが再現された。これに対して、イソプレン合成の基質供給を行う光合成は、ある程度低下はするものの、完全に停止することはなく、温度低下の影響はイソプレン合成に比べて軽度であった (図 3)。このことは、低温適応時のイソプレン放出変化は基質濃度変化ではなく、以外の因子の変動による可能性を示唆している。

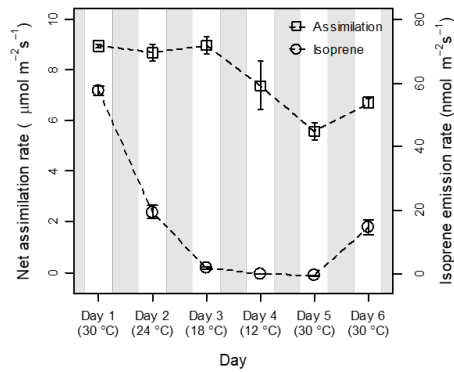


図3 温度低下に伴うイソプレレン放出及び光合成速度の変化

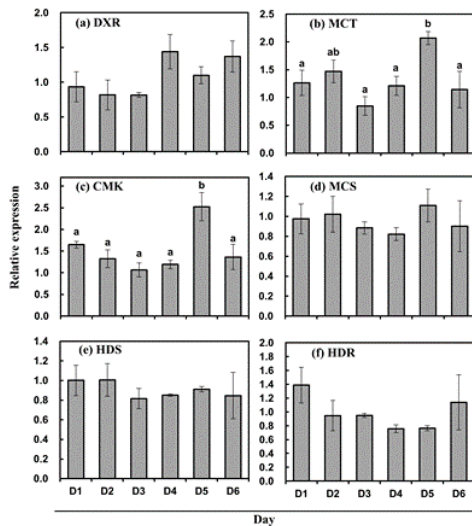


図4 温度低下に伴う MEP 経路の遺伝子発現変化 (図中棒グラフのアルファベットが異なる場合は有意差があることを示す)

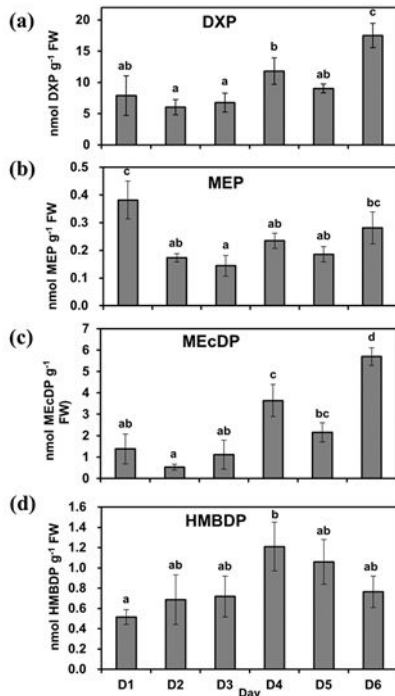


図5 温度低下に伴う MEP 経路の中間代謝産物濃度変化 (図中棒グラフのアルファベット

が異なる場合は有意差があることを示す) 温度変化に伴い、MEP 経路の遺伝子のうち CMK が有意に変動するが、イソプレレン放出とは相関していなかった (図4)。また、基質となる DMADP を供給する MEP 経路の中間代謝産物では MEcDP 及び HMBDP 等の DMADP に至る直前の代謝産物がイソプレレン放出低下に伴い低下する傾向にあった (図5) 一方、基質となる DMADP 濃度もイソプレレン放出低下に伴い増加する傾向が認められた (図6)。

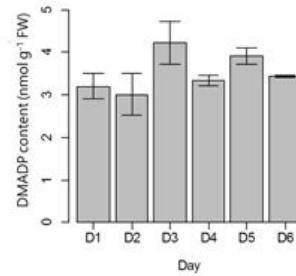


図6 温度低下に伴う DMADP 濃度変化

中間代謝産物濃度のこれらの変化はイソプレレン放出と正の相関は示さないことから、これらの濃度変化がイソプレレン放出の制御因子ではないことが示唆された。DMADP に至る直前の中間代謝産物濃度はイソプレレン放出低下に伴い増加する傾向があることから、イソプレレン放出が逆にこれらの中間代謝産物濃度の調節因子となっている可能性が考えられた。イソプレレン放出が抑制された分、葉内に中間代謝産物が蓄積したことを反映しているのかも知れない。

(2) 温度変化に伴う遺伝子発現変動の解析

温度変化に伴うオオバユズビワの葉のトランスクリプトーム解析を行った (図7)。

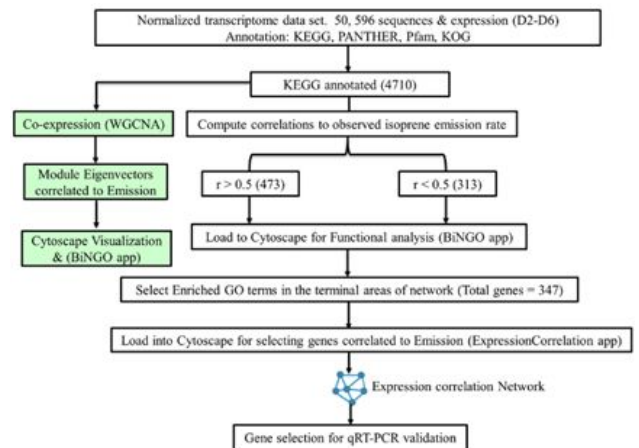


図7 温度低下に伴うオオバユズビワの葉のトランスクリプトーム解析概要

解析対象となった遺伝子 50,596 のうち、4,710 についてアノテーションが行われ、そのうちの 347 の遺伝子が GO 解析により、イ

ソブレン放出と関連していることが明らかとなった。本研究においては、イソブレン放出と正に相関する遺伝子と負に相関する遺伝子を区別して GO 解析を行った (図 8 及び 9)

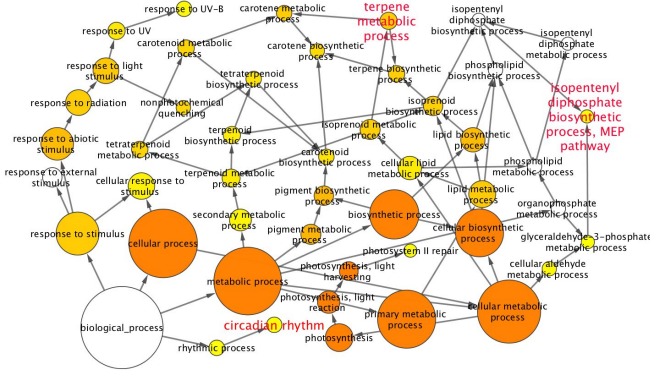


図 8 イソブレン放出と正に相関する遺伝子の GO 解析結果

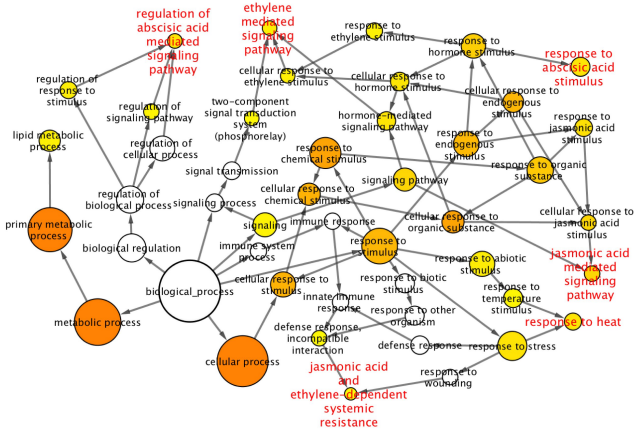


図 9 イソブレン放出と負に相関する遺伝子の GO 解析結果

正に相関する GO term にはテルペン合成系、IPP 合成及び MEP 経路の遺伝子が集密していた (図 8)。一方、負に相関する GO term には植物ホルモンシグナリング系の遺伝子が集密していた (図 9)。これらの遺伝子群についてイソブレン放出との共相関解析を行い、イソブレン放出制御に関与している可能性の高い遺伝子を日内変動については 9 個、ホルモンシグナリング系については 20 個に絞り込み、qRT-PCR により定量分析を行った (図 10)。

最後に、これまで得られている MEP 経路の代謝産物濃度、イソブレン合成酵素タンパク質量及びトランスクリプトーム解析により絞り込まれた遺伝子発現変動についてネットワーク解析を行い、図 11 に示すようなイソブレン合成制御機構に関する作業仮説を提唱することができた。

以上、本研究の成果は以下のように総括される。

温度変化に適応したイソブレン放出のオン-オフ調節では、基質供給に関与している MEP 回路の遺伝子発現及び中間代謝産物濃度に大きな変化はなく、イソブレン

放出の変動は主に *ISPS* の発現変動により説明された。

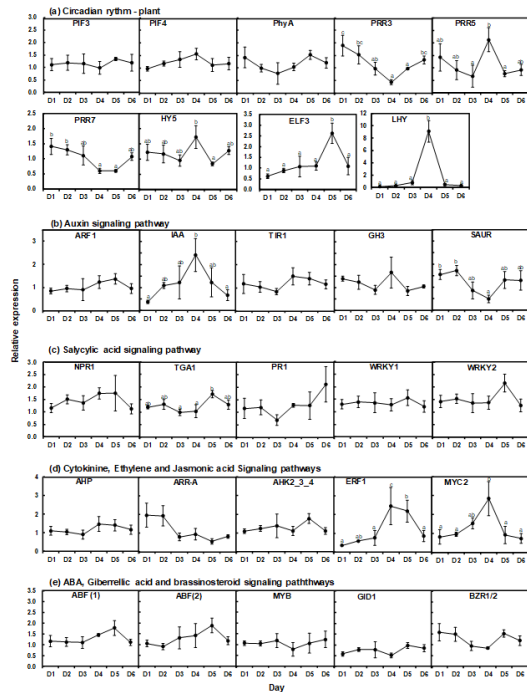


図 10 温度低下に伴う時計遺伝子及びホルモンシグナリング系遺伝子の変動

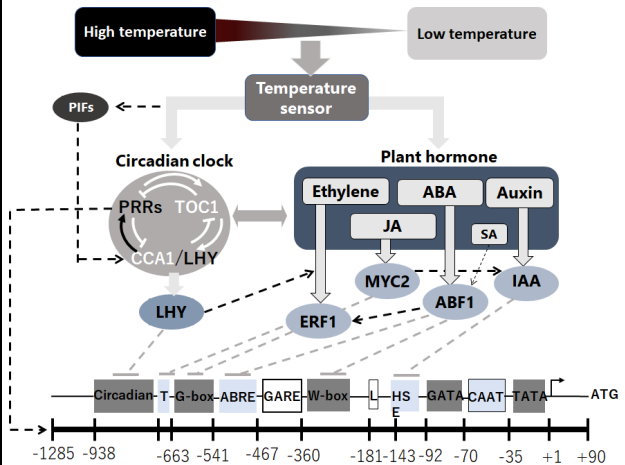


図 11 オオバユヌビワのイソブレン放出制御機構

トランスクリプトームの遺伝子オントロジー、共相関の可視可とネットワーク解析により、*ISPS* の発現は植物ホルモン合成遺伝子と概日時計遺伝子により協調的に制御されていると推定された (図 11)。

イソブレン合成に影響する主要な植物ホルモンはエチレン、アブシジン酸 (ABA)、オーキシン、ジャスモン酸 (JA) であり、いずれも概日時計遺伝子と連動して *ISPS* を下方制御していると推定された。

ISPS のプロモーターには上記植物ホルモンに応答するシスエレメントがあった (図 11)。

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5件)

Ishmael Mutanda, Seikoh Saitoh, Masashi Inafuku, Hiroaki Aoyama, Tomonori Takamine, Kazuhito Satou, Masako Akutsu, Kuniko Teruya, Hinako Tamotsu, Makiko Shimoji, Haruki Sunagawa, Hirosuke Oku Gene expression analysis of disabled and re-induced isoprene emission by the tropical tree *Ficus septica* before and after cold ambient temperature exposure *Tree Physiol* 36, 873-882 (2016) 査読あり

Ishmael Mutanda, Masashi Inafuku, Hironori Iwasaki, Seikoh Saitoh, Masakazu Fukuta, Keiichi Watanabe, Hirosuke Oku Parameterization of G-93 isoprene emission formula for tropical trees *Casuarina equisetifolia* and *Ficus septica* *Atmospheric Environ* 141, 287-296 (2016). 査読あり

Ishmael Mutanda, Masashi Inafuku, Seikoh Saitoh, Hironori Iwasaki, Masakazu Fukuta, Keiichi Watanabe, Hirosuke Oku Temperature controls on the basal emission rate of isoprene in a tropical tree *Ficus septica*: exploring molecular regulatory mechanisms *Plant, Cell & Environ* 39, 2260-2275 (2016) 査読あり

Hirosuke Oku, Masashi Inafuku, Takeshi Ishikawa, Tomonori Takamine, Mutanda Ishmael, Masakazu Fukuta Molecular cloning and biochemical characterization of isoprene synthases from the tropical trees *Ficus virgata*, *Ficus septica*, and *Casuarina equisetifolia* *J Plant Res* 128, 849-861 (2015) 査読あり

屋 宏典、稲福征志、斉藤星耕、福田雅一 (2015) 熱帯樹木のイソブレン放出調節機構の解明とその応用. オレオサイエンス 16: 7-19 査読なし

〔学会発表〕(計2件)

比嘉拓也、稲福征志、屋宏典 熱帯樹木のイソブレン放出制御におけるイソブレン合成酵素の生理学的意義 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度

合同大阪大会 2017年9月

Mutanda I, Kameshima Y, Inafuku M, Saitoh S, Oku H. (2015). Regulation of isoprene emission in *Ficus septica*, a tropical tree, during changes in environmental temperature. Poster presented at TERPNET 2015 - 12th International Meeting on Biosynthesis, Functions, and Synthetic Biology of Isoprenoids, Vancouver, BC, CA. (June 1-5)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

屋 宏典 (OKU, Hirosuke)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授
研究者番号: 1 0 1 7 7 1 6 5

(2)研究分担者

稲福 征志 (INAFUKU, Masashi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・研究員
研究者番号: 9 0 4 5 7 4 5 8

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし