

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：81202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14658

研究課題名(和文)植物の休眠を誘起する栄養飢餓シグナリングの解明

研究課題名(英文)Elucidation of nutrient starvation signal transduction during bud dormancy in gentian

研究代表者

高橋 秀行(Takahashi, Hideyuki)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：00455247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、多年生植物であるリンドウの休眠器官形成と休眠導入が、リン酸欠乏による緊縮応答により誘導される可能性について分子生物学的解析を実施した。緊縮応答のシグナル分子である ppGpp を調節する 2 種の RelA/SpoT Homologs (RSH1、CRSH) をリンドウから単離し発現を調査したところ、リン酸欠乏条件では両遺伝子の発現が有意に増加した。次世代シーケンス解析から、RSH1 には 13 種のバリエーションが存在し、リン酸欠乏により機能型バリエーションの発現比率が変動することが明らかになった。これらの結果から、リン酸濃度に依存した RSH の調節が休眠制御に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dormancy caused by nutritional starvation is a specific regulatory system of bacteria and fungi. This dormancy is mediated by stringent response that is regulated by RelA/SpoT Homologs (RSH). However, we previously found that gentian plantlets cultured under P deficient condition produced dormant organ, indicating the possibility that plants also possess a dormancy mechanism regulated by stringent response. In this study, we identified two RSH genes (RSH1 and CRSH) and found that the expression level of these genes increased by P starvation in gentian plantlets. Furthermore, we identified 13 variants of RSH1 using a next generation sequence technique. Interestingly, the expression ratio of functional variant was higher in plantlets cultured under P deficient condition. The ratio was also higher in dormant organ of field grown gentian plants. These results imply that P concentration-dependent regulation of RSH may be involved in dormancy mechanism in gentian.

研究分野：植物代謝

キーワード：花卉 休眠

1. 研究開始当初の背景

休眠は成長や活動を一時的に休止しエネルギー消費を抑えることで、様々な環境変化に適応する生物の生存戦略の1つである。一般的に、植物は気温や日長等の環境変化に対して種子や冬芽等の休眠器官を形成し休眠するが、研究代表者の先行研究から、リンドウでは前述の環境要因以外に、リン酸欠乏に応答して休眠器官である越冬芽を形成し休眠することが明らかとなった。栄養源の枯渇に応答した休眠誘起は菌類・細菌類で特有の現象とされ、この際の代謝抑制を緊縮応答と呼び、以下の機構が知られている。大腸菌やサルモネラでは、栄養飢餓に応答して緊縮応答の鍵遺伝子である *RelA* や *SpoT* の発現が変動する。その結果、蓄積したグアノシン四リン酸 (ppGpp) が、RNA polymerase のシグマ因子の1つである RpoS の蓄積を促進することで細胞内の代謝が抑制される。近年、植物で *RelA* と *SpoT* の相同遺伝子 *RSH* (*RelA/SpoT* Homologs) が発見され、葉緑体の様々な機能を調節することが報告されている。しかしながら、栄養飢餓に応答した休眠誘導自体が植物において知られていなかったため、休眠及び緊縮応答への関与は明らかとなっていない。申請者は、リンドウから *RSH* (*GtRSH1*, *GtRSH4*) の単離に成功し、これら遺伝子の発現がリン酸欠乏による休眠誘起に伴って上昇することを明らかにしている。この結果は、緊縮応答を介した情報伝達により休眠器官形成及び休眠が誘導された可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、*RSH* を中心とした解析から、緊縮応答と休眠との関係を証明する。*GtRSH* 遺伝子の高発現及び抑制または ppGpp 処理が、遺伝子及び代謝全体に与える影響を明らかにすることで、リン酸欠乏による休眠誘起の実態を分子レベル・代謝レベルで明らかにする。さらに、リン酸条件に応答した *RSH* 発現調節機構を明らかにすることで、植物の新たな休眠誘起モデルを構築する。

3. 研究の方法

必須栄養素欠乏の休眠への影響

必須栄養素を除いた MS 培地でリンドウを培養し、*RSH* 発現への影響と休眠誘起の有無を確認する。

緊縮応答による休眠調節機構の解析

RSH は、ppGpp の合成と分解を調節し、生じた ppGpp が直接のシグナルとなり緊縮応答を誘導する。本サブテーマでは、*RSH* の活性評価と、リン酸欠乏時の関連遺伝子・代謝物の挙動から、緊縮応答及び休眠制御機構を明らかにする。

-A *RSH* の機能解析

RSH は、ppGpp の合成または分解のいずれ

かに働く。単離した *RSH1* と *CRSH* について、大腸菌を用いて融合蛋白質を作成し、ppGpp に対する酵素特性を調査する。フォールディング等の要因で大腸菌による蛋白合成がうまく働かなかった場合、コムギ無細胞発現系またはピキア酵母による発現を試みる。

-B リン酸欠乏時の緊縮応答経路の解析

植物における緊縮応答の代謝経路に属する遺伝子及び代謝物について、リン酸欠乏の影響を調査する。遺伝子に関しては、リンドウ EST 情報から相同遺伝子を単離する。*RSH* と新たに単離された遺伝子は、リアルタイム PCR を用いてリン酸欠乏による発現挙動と発現部位を明らかにする。

-C *RSH* 高発現体及び発現抑制体の作出

RSH1 と *CRSH* の塩基配列情報を基に、高発現及び RNAi 用ベクターを作成し、アグロバクテリウム法で遺伝子導入する。リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現レベルを確認した後、発現が顕著に変化した個体を実験に用いる。

RSH 遺伝子のスプライシング制御の解析

リンドウから単離された *RSH* 遺伝子には、スプライシングバリエーションが複数確認されている。次世代シーケンサーを用いて全バリエーションを検出した後、リン酸濃度依存または組織別のバリエーションパターンを明らかにし、リン酸応答型スプライシング機構を解明する。バリエーションの比率に関しては、通常条件、リン酸欠乏条件、圃場サンプルから ORF をクローニングし、大腸菌 96 コロニーからダイレクトシーケンスを行なう。

4. 研究成果

必須栄養素欠乏の休眠への影響

リンドウ品種ポラーノホワイト (Pw) の培養個体を必須栄養素を除いた MS 培地で育成し、表現型への影響を調査した (図 1)。マグネシウムを除いた培地では成長が阻害され、葉の黄化や枯死が観察された。また、通常の MS 培地で育成した個体に比べ分枝数が約 5 倍増加した。窒素を除いた MS 培地では、葉の黄化またはアントシアニンの蓄積が観察された。また、越冬芽の形成が観察された。カリウムを除いた培地では、殆ど影響は見られなかった。リン酸を除いた MS 培地では、葉の黄化とアントシアニンの蓄積が見られ、個体は 100% 越冬芽を形成した。ここで、カリウムとリン酸欠乏の影響を他の品種 (ももこりん、アルビレオ、ジョバンニ) で調査したところ、全ての品種においてリン酸欠乏条件で越冬芽形成が観察された。一方、カリウム欠乏は影響を及ぼさなかった。尚、微量元素については顕著な表現型への影響は観察されなかった。以上の結果から、必須栄養素

中でもリン酸の欠乏が最も越冬芽形成を誘導することが確認された。



図1 必須栄養素欠乏による越冬芽形成誘導

緊縮応答による休眠調節機構の解析

-A RSH の機能解析

リンドウ越冬芽から *RSH* 遺伝子の単離を実施し、2種の *RSH* (*RSH1* と *CRSH*) を得た。*RSH1* はシロイヌナズナの *AtRSH1* と高い相同性を示し、*CRSH* は Ca^{2+} -activated RelA / spot-like protein (*AtCRSH*) と高い相同性を示した。これら遺伝子を pTrcHis ベクター及び pCold-ProS2 ベクターを用いて大腸菌での蛋白質発現を試みたが活性を有した蛋白質作出には至らなかった。また、小麦無細胞系を用いたが活性を検出できなかった。

-B リン酸欠乏時の緊縮応答経路の解析

リン酸欠乏による *RSH1* と *CRSH* の遺伝子発現への影響を培養個体の shoot 及び root で調査した (図2)。これら遺伝子の発現は、リン酸欠乏条件 (-P) において shoot と root 共に上昇が観察された。特に shoot での発現レベルが高かったことから、以降の解析には shoot を用いた。

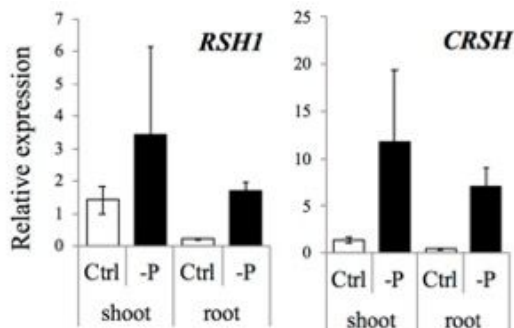


図2 リン酸欠乏条件での shoot 及び root における *RSH1* と *CRSH* の遺伝子発現

リン酸欠乏による *RSH1* と *CRSH* の発現誘導がリンドウに共通の現象であるかを確認するため、他の品種での挙動を確認したところ、アルビレオ (Alb)、矢巾 (Yah) でも同様の傾向が見られたことから、リン酸欠乏に応答した *RSH1* と *CRSH* の発現上昇はリンドウに共通の機構であることが明らかとなった (図3)。

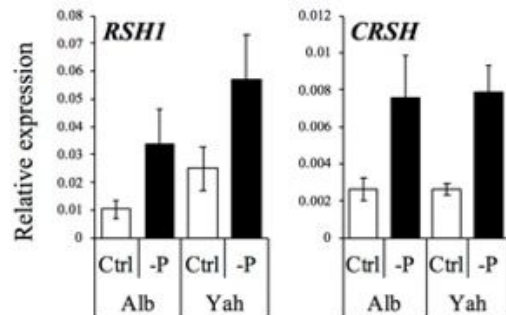


図3 リン酸欠乏条件における *RSH1* 及び *CRSH* の発現 (品種間比較)

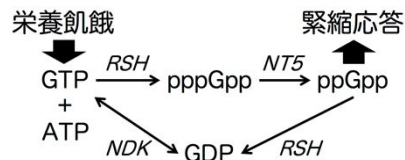


図4 植物の緊縮応答のモデル

図4に植物における緊縮応答の代謝経路を示した。pppGpp から ppGpp を生産する酵素である 5'-nucleotidase (NT5) と、GDP から GTP を生産する酵素である nucleoside diphosphate kinase (NDK) について遺伝子を単離し、リン酸欠乏による発現への影響を調査した。その結果、リン酸欠乏条件において *NT5* の発現は上昇傾向にあり、*NDK* の発現は下降傾向にあった (図5)。従って、リン酸欠乏条件では ppGpp が蓄積し、緊縮応答が誘導されることが推測された。

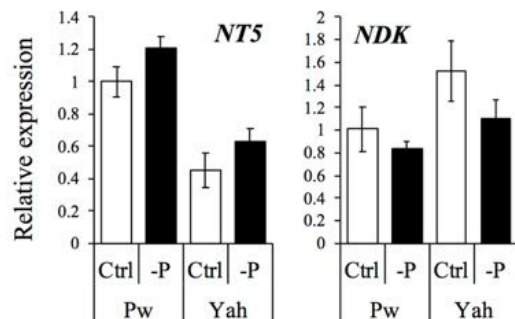


図5 リン酸欠乏条件における *NT5* 及び *NDK* の発現

-C RSH高発現体及び発現抑制体の作出

形質転換体の作成にあたり、リンドウで既に実績のある NOS プロモーターとシロイヌナズナ ADH 由来翻訳エンハンサーを搭載したベクターを用いた。RSH1 及び CRSH の高発現体では明確な表現型は観察されなかった (図 6)。尚、発現抑制体作出には VIGS を用いたが、十分な発現抑制が見られなかったため解析には用いなかった。

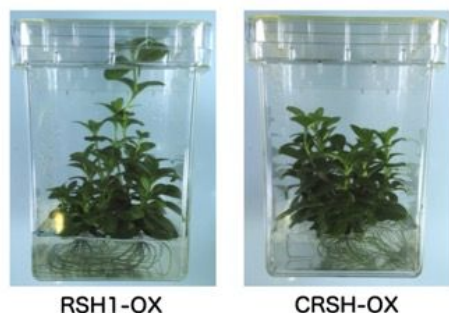


図 6 RSH1 及び CRSH 高発現体

RSH 遺伝子のスプライシング制御の解析 RSH1 及び CRSH のゲノム配列を決定したところ、RSH1 は 24 個のエキソンから構成され、CRSH は 6 個のエキソンから構成されていた。次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析から、発現している全バリエーションの検出を試みた。その結果、RSH1 に関しては 13 種のバリエーション (V1~V13) が存在することが判明した。その殆どはフレームシフトによりストップコドンが生じていたが、V11 のみが配列上機能性バリエーションであることが予想された。リン酸欠乏による RSH1 バリエーションのパターンを明らかにするため、通常条件で培養した個体とリン酸欠乏条件で培養した個体で RSH1 の ORF をクローニングし、大腸菌 96 クローンを用いてダイレクトシーケンスを実施した。その結果、通常条件では約 80% が WT であり、V1 と V7 が発現しているのに対して、リン酸欠乏条件では V1、V2、V7、V11、V12、V13 が発現していた (図 7)。V11 は機能性バリエーションと予想されることから、リン酸欠乏時には本バリエーションが何らかの機能を示す可能性が示された。

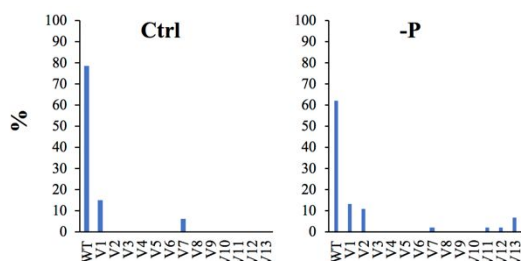


図 7 リン酸欠乏条件における RSH1 バリエーションの発現

図 7 で見られた RSH1 バリエーションについて、組織特異的なスプライシングが行なわれている可能性がある。また、休眠導入との関与を明らかにするため、圃場栽培されたリンドウの越冬芽を用いて RSH1 バリエーションの検出を行なった (図 8)。10 月に採取した越冬芽では、WT、V1~V9 のバリエーションが検出された。それに対して、2 月に採取した越冬芽では、WT、V1、V2、V4、V5、V10、V11 のバリエーションが検出された。V11 は 2 月の越冬芽でのみ検出されたことから、休眠状態の変遷により RSH1 による制御が変化する可能性が示された。また、V12 と V13 はリン酸欠乏条件でのみ発現することが明らかとなった。

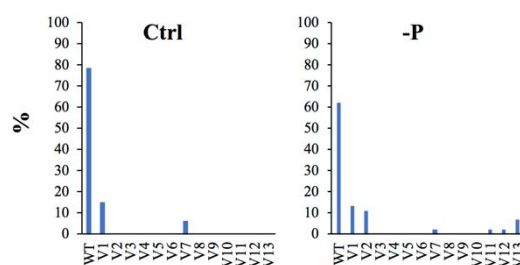


図 8 圃場越冬芽における RSH1 バリエーションの発現

本課題の成果から、緊縮応答の鍵遺伝子である RSH1 及び CRSH はリン酸欠乏条件で発現が上昇することが明らかとなった。先行研究から、リン酸欠乏によりリンドウは休眠導入することが報告されている。従って、RSH を介した緊縮応答が休眠に関与する可能性が示された。形質転換体では明確な表現型は観察されなかったが、RSH は ppGpp の合成と分解の両方に作用することから (図 4)、他の酵素を含めた調節により ppGpp 量の増加には至らなかったのではないかと予想された。また、RSH1 には 13 種のスプライシングバリエーションが存在しており、リン酸条件または組織により発現パターンが変動することを突き止めた。バリエーションの中で V11 は機能性バリエーションと予想され、本バリエーションはリン酸欠乏時または休眠状態の変遷時に発現することから、リンドウの休眠制御に何らかの機能を示す可能性が示された。今後、本機能性バリエーションの詳細な解析を実施することで新たな休眠調節機構が明らかになることが期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

高橋秀行¹、藤田晃平¹、今村智弘²、西原

昌宏¹(1.岩手生工研、2.東京理科大)「ゲンチオオリゴ糖によるリンドウ越冬芽の萌芽誘導機構」第33回日本植物細胞分子生物学会(東京)大会・シンポジウム(2015年8月)

Takahashi H.「Gentio-oligosaccharide regulates bud dormancy in *Gentiana triflora*」KAAB International Symposium 2015(2015年9月)

(招待講演)高橋秀行「リンドウの安定生産に向けたメタボロミクス技術の利用」第7回新潟大学・刈羽村先端農業バイオ研究センターフォーラム「農業バイオとオミクス～先端技術による農業バイオの新展開」(2016)新潟大学農学部

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

受賞

高橋秀行「日本植物細胞分子生物学会奨励賞」(2015年8月11日)

報道

高橋秀行「岩手日報」2015年9月23日

高橋秀行「岩手日報」2015年9月24日

高橋秀行「岩手日日新聞」2015年10月6日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋秀行(HIDEYUKI TAKAHASHI)

公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号:00455247

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

藤田晃平(FUJITA KOUHEI)

公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究助手

吉田千春(YOSHIDA CHIHARU)

公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究助手