

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03700

研究課題名(和文)レドックスシグナル伝達において活性カルボニル種はどのように特異的作用をもたらすか

研究課題名(英文)How do plants utilize reactive carbonyl species as specific redox signals?

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化脂質の分解産物である活性カルボニル種(RCS)は植物において活性酸素(ROS)シグナルを媒介する。RCSシグナル調節・機能解明のためにRCSの代謝と作用を解析し、次の成果を得た。(1) グルタチオントランスフェラーゼ(GST) Tauクラスの約半数はRCS消去活性を示した。RCSはGSTの主要な内在基質と考えられる。(2) RCSは根のオーキシン応答を増強し、側根形成を促す。RCSは植物ホルモンシグナルにも関与する。(3) ROSによるプログラム細胞死(PCD)誘導の最初期に、RCSを消去する還元酵素がH2O2により失活することから、RCS還元酵素がROSセンサーであるとの知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1) 本研究で植物固有のGSTtauアイソザイムの多くがRCS消去活性をもつことが示され、従来酸化還元酵素が主要と考えられていた植物のRCS消去システムの理解が大きく進展した。(2) オーキシンシグナルへのRCSの関与が初めて示された。これは、ROSによる植物ホルモン作用制御の機構解明に大きく寄与する。また、この発見により、植物でのRCSのシグナル分子としての重要性が確立された。(3) ROS刺激からRCS増大にいたる過程には、ROSによるRCS消去酵素の失活が関与することを初めて示した。これは、RCS生成は膜脂質酸化の増大によるだけでなく酵素的な制御も受けていることを示す画期的成果である。

研究成果の概要(英文)：Reactive carbonyl species (RCS), decomposition products of lipid peroxides, mediate oxidative damage and oxidative signal in plants as downstream products of reactive oxygen species (ROS). To elucidate the regulation and function of RCS signal, we examined their metabolism and actions. Following results were obtained. (1) The enzymatic activity of 20 tau isozymes of glutathione transferase (GST) for RCS were examined. A half the tested isozymes scavenged RCS, suggesting that RCS are major endogenous substrates of GST. (2) Addition of ROS or RCS to *Arabidopsis thaliana* roots induced auxin-responsive genes and induced lateral root (LR). Thus ROS and its downstream products RCS constitute a feed-forward loop of the auxin signal for LR formation. (3) In ROS-triggered programmed cell death (PCD) of tobacco cells, an RCS reductase was found inactivated by ROS at a very early stage. This suggests that the reductase is a ROS sensor to facilitate RCS signal for PCD.

研究分野：植物生理学

キーワード：活性酸素 ホルモン 過酸化脂質 アブシシン酸 オーキシン グルタチオントランスフェラーゼ レドックスシグナル 植物

1. 研究開始当初の背景

細胞の酸化還元代謝に伴い生成する活性酸素種 (ROS) は、植物のストレス傷害因子となる一方、プログラム細胞死 (PCD) や防御遺伝子発現を誘導するレドックスシグナルとしてもはたらく。ホルモン応答や分化においても、ROS が局所的・一時的に生成し、細胞のリプログラミングを誘導するなど、植物細胞が内的刺激、外的刺激に応答するとき、ROS が関与することは稀ではない [1]。植物が ROS のような一見特異性の低いシグナルから、どのように特異的情報を引き出すのかは未解明の重要課題である [2]。

研究代表者は、植物細胞において、ROS が膜脂質を酸化して生じるアクロレインや 4-ヒドロキシノネナル (HNE) といった活性カルボニル種 (RCS) が、細胞の酸化的損傷の原因物質であることを明らかにしてきた [3,4,5]。RCS は動物細胞においてシグナル作用を示すことが知られており、また、植物に外部から与えられると防御遺伝子発現を誘導する [6]。研究代表者は、植物では酸化ストレスやホルモン刺激に応答して十種以上の RCS が生成すること、それらの生化学的活性は大きく異なることをこれまでに明らかにした [7,8,9]。これらの背景から、ROS の下流で生じる RCS の分子種の違いが植物のレドックスシグナルの特異性に関与する可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、「生成部位や生理的条件によって ROS の下流で増大する RCS 分子種が異なる、または RCS 感知タンパク質の特異性が細胞ごとに異なることでレドックス信号の特異性が生じるのではないかと仮設し、その妥当性を検証することを目的とした。

具体的には、ROS がシグナルとして関与する 3 つの現象すなわち (1) プログラム細胞死 (PCD) の開始、(2) アブシシン酸 (ABA) による気孔閉口、(3) オーキシンによる側根形成、において、ROS の下流で生成増大する RCS の分子種を明らかにし、RCS によって活性化されるシグナル因子の特定を目指した。

また、細胞で生じる RCS は分子種によって生理作用が異なっていることから、植物細胞は RCS 分子種ごとに生成や消去を制御していると考えられた。RCS の中でもアクロレインはとくに反応性が高く生理活性が強い。研究代表者は、従来の RCS 消去酵素 (2-alkenal reductase, aldo-keto reductase) よりもアクロレインに対する特異性が高い ($K_m < 0.1$ mM), GST アイソザイムをホウレンソウとシロイヌナズナで見出した。本研究では、シロイヌナズナの他の GST アイソザイムが RCS 消去活性をもつ可能性を検証した。

3. 研究の方法

(1) PCD に関与する RCS の制御

タバコ BY-2 細胞に、PCD を誘導する最小濃度 (限界致死濃度) の H_2O_2 と PCD を誘導しない最大濃度 (亜致死濃度) の H_2O_2 を与えたときの RCS 代謝の違い、および RCS を消去する酵素 (レダクターゼ) の活性変化を解析した。

(2) ABA シグナル伝達における RCS の作用

シロイヌナズナの ABA シグナル伝達欠損変異株に対する RCS の効果を解析し、RCS の作用点をさぐった。

(3) オーキシシンシグナル伝達における RCS の作用

シロイヌナズナ実生の側根形成密度および根でのオーキシン応答遺伝子発現を指標として、根に RCS を与えたときのオーキシシンシグナルへの影響を解析した。

(4) アクロレインを消去する GST アイソザイム

シロイヌナズナゲノムにコードされる 28 種の GST tau クラスアイソザイム (GSTU) の cDNA をクローニングし、大腸菌で発現させ、精製した。

4. 研究成果

(1) タバコ BY-2 培養細胞への ROS 刺激 (H₂O₂ 添加) によって増大した RCS がカスパーゼ 3 様プロテアーゼを活性化することが、PCD 開始の初期現象であることを明らかにした。また、H₂O₂ 添加直後に増大する RCS は HNE であり、HNE を消去する NADPH 依存レダクターゼが H₂O₂ によって失活することを発見した。すなわち ROS による PCD 開始において、ROS の作用点は HNE レダクターゼであり、この失活が PCD 開始の最初の現象であることを明らかにした。

(2) ABA による気孔閉鎖シグナル伝達には RCS が介在する。シロイヌナズナの表皮に RCS を与えると Ca²⁺透過性カチオンチャンネルを活性化した。また気孔閉鎖に関わる Ca 依存性キナーゼを欠損した変異株 *cpk6* は、野生株と異なり、RCS を与えても気孔閉鎖が誘導されなかった。これらの結果から RCS の作用部位は Ca²⁺透過性カチオンチャンネル上流であることがわかった。

(3) シロイヌナズナでオーキシンの側根形成シグナルに関して、オーキシンによる側根形成が RCS 消去剤により阻害されること、RCS がオーキシンシグナルを強め、オーキシン応答遺伝子群を活性化することを見出した。RCS はシグナルレプレッサーである AUX/IAA タンパク質の分解を促進した (図 1)。

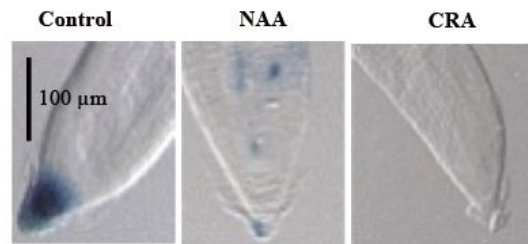


図 1. クロトンアルデヒド (CRA) は、オーキシン (NAA) と同様に、AUX/IAA タンパク質である AXR3 の分解を促進した。

オーキシンレセプター二重欠損株 *tir1 afb2* では RCS の側根形成促進効果は低減した。以上から、RCS が側根形成のオーキシンシグナルを増強する信号系路を形づくることを初めて明らかにした。

(4) GST の標準基質である 1-chloro-2,4-dinitrobenzene に活性を示した 20 種の GSTU アイソザイムの RCS に対する活性を解析した。またシロイヌナズナで RCS を消去する GST アイソザイムを十種以上見出した。アイソザイムによって RCS 分子種に対する基質特異性は異なっていた (図 2)。これらは、GST が内在基質として RCS を認識し、その細胞内濃度を制御する機能をもつことを示唆する。植物ではレダクターゼによる RCS 消去の知見は蓄積されていたが、本研究から、GST も RCS 消去システムに寄与する重要な酵素であることが明らかになった。

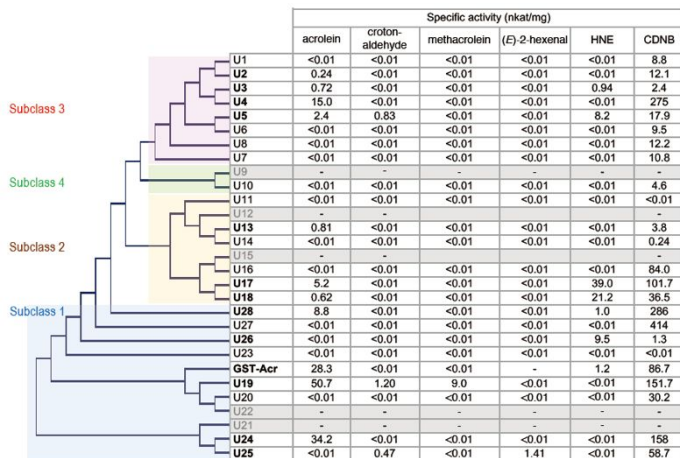


図 2. GSTU アイソザイムの RCS に対する比活性

(5) 以上によって、植物の広範な ROS シグナル応答に RCS が関与することを実証し、RCS の作用と制御機構について新たな知見を得た。これは植物の ROS 応答機構研究に新たな展望を提供するものであり、関連の最新研究動向と総合して総説 2 報にまとめ、発表した [10, 11]。

<引用文献> [1] Mittler (2017) *Trends Plant Sci* **22**: 11, [2] Møller and Sweetlove (2010) *Trends Plant Sci* **15**: 22, [3] Mano et al. (2010) *Plant Biotechnol*, **27**: 193, [4] Yin et al. (2010) *Plant Physiol* **152**: 1406, [5] Mano (2012) *Plant Physiol Biochem* **59**: 90, [6] Yamauchi et al. (2015) *Sci Rep* **5**: 8030, [7] Mano et al. (2009) *Planta*, **230**: 639, [8] Biswas and Mano (2015) *Plant Physiol* **168**: 885, [9] Islam et al. (2016) *Plant Cell Physiol* **57**: 2552, [10] Yalcinkaya et al. (2019) *Environ Exp Bot* **165**: 139, [11] Mano et al. (2019) *Plants* **8**: 391.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Islam Md. Moshui, Ye Wenxiu, Matsushima Daiki, Rhaman Mohammad Saidur, Munemasa Shintaro, Okuma Eiji, Nakamura Yoshimasa, Biswas Md. Sanauallah, Mano Jun'ichi, Murata Yoshiyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Reactive Carbonyl Species Function as Signal Mediators Downstream of H2O2 Production and Regulate [Ca2+]cyt Elevation in ABA Signal Pathway in Arabidopsis Guard Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1146 ~ 1159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mano Jun'ichi, Kanameda Sayaka, Kuramitsu Rika, Matsuura Nagisa, Yamauchi Yasuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Detoxification of Reactive Carbonyl Species by Glutathione Transferase Tau Isozymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 3389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mano Jun'ichi, Biswas Md. Sanauallah	4. 巻 1743
2. 論文標題 Analysis of reactive carbonyl species generated under oxidative stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 117 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7668-3_11	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kitajima Sakihito, Aoki Wataru, Shibata Daisuke, Nakajima Daisuke, Sakurai Nozomu, Yazaki Kazufumi, Munakata Ryosuke, Taira Toki, Kobayashi Masaru, Aburaya Shunsuke, Savadogo Eric Hymeya, Hibino Susumu, Yano Haruna	4. 巻 247
2. 論文標題 Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (Ficus carica)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 1423 ~ 1438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-018-2880-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Saki, Suzuki Yurina, Saitoh Keisuke, Kitajima Sakihito, Ohya Norimasa, Gotoh Takeshi	4. 巻 60
2. 論文標題 Cloning and Aggregation Characterization of Rubber Elongation Factor and Small Rubber Particle Protein from <i>Ficus carica</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Biotechnology	6. 最初と最後の頁 83 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12033-017-0051-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Masaru, Miyamoto Maako, Match Toru, Kitajima Sakihito, Hanano Shigeru, Sumerta I Nyoman, Narise Takafumi, Suzuki Hideyuki, Sakurai Nozomu, Shibata Daisuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Mechanism underlying rapid responses to boron deprivation in <i>Arabidopsis</i> roots	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 106 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2017.1416670	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mano Jun'ichi, Biswas Md. Sanauallah	4. 巻 1743
2. 論文標題 Analysis of Reactive Carbonyl Species Generated Under Oxidative Stress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 117 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7668-3_11	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yin Lina, Mano Jun'ichi, Tanaka Kiyoshi, Wang Shiwen, Zhang Meijuan, Deng Xiping, Zhang Suiqi	4. 巻 161
2. 論文標題 High level of reduced glutathione contributes to detoxification of lipid peroxide-derived reactive carbonyl species in transgenic <i>Arabidopsis</i> overexpressing glutathione reductase under aluminum stress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 211 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pp1.12583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 松井健二、望月智史	4. 巻 56
2. 論文標題 植物が香り化合物を出す仕組み、吸う仕組み 単純拡散では説明がつかない	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 95-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yalcinkaya Tolga, Uzilday Baris, Ozgur Rengin, Turkan Ismail, Mano Jun'ichi	4. 巻 165
2. 論文標題 Lipid peroxidation-derived reactive carbonyl species (RCS): Their interaction with ROS and cellular redox during environmental stresses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental and Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 139 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envexpbot.2019.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Biswas Md. Sanaulah, Fukaki Hidehiro, Mori Izumi C., Nakahara Kazuha, Mano Jun'ichi	4. 巻 100
2. 論文標題 Reactive oxygen species and reactive carbonyl species constitute a feed forward loop in auxin signaling for lateral root formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 536 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mano Jun'ichi, Biswas Md. Sanaulah, Sugimoto Koichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Reactive Carbonyl Species: A Missing Link in ROS Signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 391 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants8100391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Biswas Md. Sanaulah, Terada Ryota, Mano Jun'ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Inactivation of Carbonyl-Detoxifying Enzymes by H2O2 Is a Trigger to Increase Carbonyl Load for Initiating Programmed Cell Death in Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 141 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9020141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Toshiyuki, Ikeda Ayana, Shiojiri Kaori, Ozawa Rika, Shiki Kazumi, Nagai-Kunihiro Naoko, Fujita Kenya, Sugimoto Koichi, Yamato Katsuyuki T., Dohra Hideo, Ohnishi Toshiyuki, Koeduka Takao, Matsui Kenji	4. 巻 178
2. 論文標題 Identification of a Hexenal Reductase That Modulates the Composition of Green Leaf Volatiles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 552 ~ 564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.00632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 真野純一, 要田紗也加, 松浦凧沙, 山内靖雄
2. 発表標題 アクロレインは植物グルタチオントランスフェラーゼの共通基質である
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第51回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun'ichi Mano
2. 発表標題 Reactive carbonyl species modulate hormone signals in plants
3. 学会等名 The 23rd International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉光里佳, 要田紗也加, 松浦凧沙, 山内靖雄, 真野純一
2. 発表標題 アクリレインは植物グルタチオントランスフェラーゼの共通基質である
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺田凌太, Md. Sanaulah Biswas, 真野純一
2. 発表標題 H2O2はカルボニルレダクターゼを失活させ, タバコ細胞のプログラム死に関わるカルボニル種を増大させる
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中原一葉, Md. Sanaulah Biswas, 深城英弘, 森泉, 真野純一
2. 発表標題 活性酸素種と活性カルボニル種はオーキシンの側根形成シグナルをフィードフォワード調節する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun'ichi Mano, Md. Sanaulah Biswas
2. 発表標題 Lipid peroxide-derived reactive carbonyl species are critical mediators of oxidative signal in plants.
3. 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (国際学会)
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 Md. Sanullah Biswas, Hidehiro Fukaki, Jun'ichi Mano
2 . 発表標題 Oxylipin carbonyls are involved in the auxin signalling to initiate lateral root formation in Arabidopsis thaliana.
3 . 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Suzuka Monden, Ryoma Oishi, Chihiro Nozaki, Jun'ichi Mano
2 . 発表標題 Search for plant components that can scavenge reactive carbonyl species.
3 . 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Sayaka Kanameda, Hiroki Sakai, Yasuo Yamauchi, Nagisa Matuura, Jun'ichi Mano
2 . 発表標題 Molecular evolution of acrolein-detoxifying isozyme of glutathione transferase in plants.
3 . 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Tanaka, T., Ikeda, A., Shiki, K., Kunihiro, N. N., Yamato, K. T., Dohra, H., Ohnishi, T., Koeduka, T., Matsui, K.
2 . 発表標題 Identification of six carbon-aldehyde reductase responsible for the adjustment of green leaf volatile composition in Arabidopsis thaliana.
3 . 学会等名 Plant Volatiles Gordon Research Conference (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun'ichi Mano
2. 発表標題 Lipid peroxide-derived reactive carbonyl species directly activate caspase-like proteases to initiate programmed cell death in plants
3. 学会等名 CLS, Tokyo Tech. International Forum 2018 "Redox regulation of protein functions, transcription, translation and folding" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真野純一, 池本真梨, 田中克典, Ambra Pradipta
2. 発表標題 根の分裂組織における活性カルボニル種の生成
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本貢一, 酒井杏子, 藤屋紀香, 真野純一
2. 発表標題 茶に含まれる抗酸化フラボノイドが過酸化脂質由来のカルボニル化合物消去能を持つ
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上奈々香, 真野純一, 武宮淳史
2. 発表標題 活性カルボニル種はROSシグナル伝達を仲介し青色光による気孔開口を阻害する
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村田 芳行 (Murata Yoshiyuki) (70263621)	岡山大学・環境生命科学研究科・教授 (15301)	
研究分担者	山内 靖雄 (Yamauchi Yasuo) (90283978)	神戸大学・農学研究科・准教授 (14501)	
研究分担者	松井 健二 (Matsui Kenji) (90199729)	山口大学・大学院創成科学研究科 教授 (15501)	
研究分担者	北島 佐紀人 (Kitajima Sakihito) (70283653)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授 (14303)	