

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07698

研究課題名(和文) サリチル酸気孔閉鎖作用における硫化水素のシグナル伝達物質としての機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of hydrogen sulfide as a signaling substance in stomatal closure induced by salicylic acid

研究代表者

山田 直隆 (YAMADA, Naotaka)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：20304769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物葉の表面に存在し二酸化炭素の取り込みや、酸素と水分の放出に関与する気孔は、植物内にストレス環境下で合成されるサリチル酸によって閉鎖誘導を受けることが知られていました。

これまで、サリチル酸の気孔閉鎖誘導には、活性酸素と一酸化窒素の関与が明らかでありましたが、本研究中、新たに孔辺細胞内で気体分子の硫化水素が発生することを見出しました。そして、サリチル酸による活性酸素の増加が硫化水素発生を引き金になること、さらに発生した硫化水素が一酸化窒素の誘導に関与していることを明らかとし、硫化水素がサリチル酸の気孔閉鎖誘導の新たなシグナル伝達物質として重要な役割を果たすことがわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題研究では、サリチル酸の気孔閉鎖誘導において、硫化水素が孔辺細胞内で発生しシグナル伝達物質として作用することを明らかにしました。硫化水素の重要な役割は、既に報告されている二次メッセンジャーの活性酸素と一酸化窒素を結びつけることでした。アブシジン酸による気孔閉鎖でも、同様な硫化水素と一酸化窒素の機能が報告されており、これら分子は気孔閉鎖誘導シグナルに必須な普遍的であると考えられます。今後これら因子の機能や関連性をさらに解明し、気孔開閉を調節することができれば、植物の光合成能力と水分損失を制御できるようになり、食料生産性の向上、乾燥に強い作物の開発につながるものと期待されます。

研究成果の概要(英文)：Stomata on the surface of plant leaves, which are involved in the uptake of carbon dioxide and the release of oxygen and water, are induced to be closed by salicylic acid synthesized in the plant under stress environment. It has been elucidated that active oxygen and nitric oxide participate in the induction of stomatal closure by salicylic acid. In this study, it was found that gas molecule hydrogen sulfide is generated in guard cells. Furthermore, it was clarified that the increase of active oxygen by salicylic acid triggers the generation of hydrogen sulfide, and that the generated hydrogen sulfide induces nitric oxide.

We uncover that hydrogen sulfide plays an important role as a new signal transducer of salicylic acid-induced stomatal closure.

研究分野：生物有機化学

キーワード：気孔 サリチル酸 硫化水素 一酸化窒素 活性酸素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の生存を左右する気孔の開閉は非常に巧妙に制御されており、さまざまなシグナル分子が気孔閉鎖をもたらすことが知られている。近年、硫化水素(H₂S)や一酸化窒素(NO)などの気体状分子が発芽や病原菌感染抵抗性をはじめとした植物の様々な生理現象の mediator として重要な機能を果たすことが報告されてきた。気孔閉鎖に関しても、アブシジン酸(ABA)の気孔閉鎖誘導では H₂S と NO が重要なシグナル分子となり、活性酸素種(ROS)がこれらのシグナル因子と深く関係しているが明らかとなりつつあった。

一方で、生物・非生物ストレスに対する防御応答を誘導制御するサリチル酸(SA)が、気孔閉鎖作用を示すことが以前から知られていたが、SAの気孔閉鎖誘導では活性酸素種(ROS)とNOのシグナル因子としての重要性が示唆されていたが、H₂Sの関与およびこれら因子の関連性については未解明のままであった。

2015年に Li et al. および Quao et al. によって、SAのトウモロコシ実生に対するカドミウムおよび熱ストレス耐性付与活性発現には、SAがH₂S生成酵素L-Cysteine desulfhydrase(DES1)の遺伝子発現の亢進と、それに付随して生成されるH₂Sがストレス耐性機構の誘導に重要な役割を果たすことが報告された。ABAの気孔閉鎖誘導でも、DES1遺伝子発現の亢進とH₂Sの生成促進が Scuffi et al. によって確認されていたことから、SAの気孔閉鎖誘導でH₂Sがシグナル因子として重要な役割を果たす事が予想された。

2. 研究の目的

これまでH₂SがSAによる気孔閉鎖誘導においてシグナル伝達の重要なシグナル因子である証拠はないことから、本研究では、SA処理時の孔辺細胞内のH₂S量の変化について調べ、SAによるH₂Sの生成誘導を明らかとすることを第一の目的とした。H₂Sの誘導が明らかとなれば次に、第二の目的として、SAの気孔閉鎖誘導でH₂Sがシグナル因子として機能しているかどうかを検討することにした。この場合、既知のABAの気孔閉鎖のメカニズムから考えて、既にシグナル因子として報告されているROSやNOとの関連性が考えられるので、H₂Sや活性酸素などの消去剤をはじめとする様々な生理活性物質を用いて、H₂S、NOおよび活性酸素の関係を解明すること目標とした。

また、我々は既にABAによる気孔閉鎖で孔辺細胞内にH₂S依存的に8-mercapto-cGMP(8-SHcGMP)、NO依存的に8-nitro-cGMP(8-NO₂-cGMP)が生成されることを明らかにしている。8-SHcGMPと8-NO₂-cGMP自身が気孔の開鎖活性を示すことから、これらはH₂SとNOの下流で働く二次メッセンジャーシグナルであるので、SA気孔閉鎖誘導時の両化合物の生成誘導についても検討し、SAの気孔閉鎖誘導でのH₂SとNOが関与するシグナル伝達機構の全容の解明を試みた。

以上、本課題では、SAの気孔閉鎖誘導現象において、H₂Sがシグナル因子であるか明らかとし、既知のNOやROSのシグナル伝達機構におけるH₂Sの機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

1) 気孔開閉実験

気孔開閉試験は、播種から1ヶ月程度生育させたソラマメ(*Vicia faba cv. ryou sai*)の二枚葉を用いて行った。葉の裏側から剥がした表皮から切り出し切片を、pH 6.15のMES buffer(50 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂)に23℃、光照射下で3時間浮遊させ後、検体化合物を含むMES buffer中にて同条件で培養し、気孔の開口度を、顕微鏡を用いて測定した。それぞれの処理で最低100個の気孔について開口度測定を行いその平均値を求めた。

2) 孔辺細胞中の硫化水素、一酸化窒素、過酸化水素量の測定

各々に特異的な蛍光モニタリング用反応試薬を用いた蛍光イメージング法によって測定した。

1)の実験で調整した切片を、蛍光試薬を含むMES buffer(それぞれ5 mmol/L)に浸漬し、暗下・23℃で30分培養後、MES bufferに30分浸漬させ洗浄後(2回)、蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度を測定した(使用フィルター; Ex/Em = 498 nm/526 nm)。それぞれの処理で最低40個の気孔について蛍光測定を行いその平均値を求めた。

蛍光試薬・・・H₂S: Hsip-1 DA、NO: DAF-2 DA、過酸化水素: H₂DCF DA

3) ソラマメ孔辺細胞中の8-SH-cGMPおよび8-NO₂-cGMPの分析

播種から1ヶ月程度生育させたソラマメ葉を、ハイフレックスホモジナイザーを使用して2 mM DTTを含む氷冷した10 mM MES buffer内で微細均質化(30秒3回)し、表皮組織を40 mm ナイロンメッシュ上で収集した。単離した表皮組織を10 mM MES bufferに分散し、明所、3時間培養した後、サリチル酸を含む10 mM MES bufferに再懸濁させ、明所で90分培養した。処理した表皮組織(100~200 mg)を集め、乳棒で粉碎し、抽出溶液(2%酢酸/80%エタノール)に懸濁後、混合物を4℃で30分間インキュベートし、15,000 μgで20分間遠心分離した。ペレットは再度抽出溶液で2回再均質化し、得られた全ての上清を、OASIS WAX-SPE カラム(5 mlのメタノールと5 mlの水で均一処理済み)にかけた後、カラムを5 mlの2% (v/v) 酢酸/H₂Oと5 mlのメタノールで洗浄し、10 mlの5%

(v/v) NH₄OH/メタノールで溶出した。溶出液を乾燥させ、0.1 mL の 0.1%ギ酸水溶液に溶解し、以下の条件の MRM モードの LC-MS/MS (LCMS™-8050, himadzu 製) にて分析した。

<LC 条件>

- ・カラム：CAPCELL PAK C18 (150 X3.0-mm id; Shiseido Fine Chemicals)
- ・移動相：(A) 0.1 % (v/v) ギ酸/水、(B) およびメタノール
グラジエント溶離 0-10 分；0-100%溶媒 B、10-15 分；100%溶剤 B
- ・流速：20 mL/min、カラム温度 40°C

<MS (ESI) 条件>

- ・spray voltage；24.5 kV、
- ・インターフェース温度：300 °C
- ・ヒートブロック温度：350 °C
- ・MRM mode：8-nitro-cGMP；m/z 389 to 195 for
8-mercapto-cGMP m/z 376-182 for
- ・ネブライザガス (窒素) 流量 1.5 L/min
- ・DL 温度：250 °C

4. 研究成果

【結果】

1) サリチル酸処理によるソラマメ気孔閉鎖と孔辺細胞内の硫化水素との関連性の検討

まず、サリチル酸 (SA) のソラマメ表皮切片的気孔に対する閉鎖活性を調べ、ソラマメでは SA の 1~100 μM 処理で、明期条件下の気孔を処理 1 時間から有意に閉鎖されることを確認した (Fig.1)

次に、硫化水素 (H₂S) の消去剤であるヒポタウリン (HT) および H₂S 合成酵素 L-Cysteine desulphhydrase の阻害剤のアミノオキシ酢酸 (AOA) の SA の気閉鎖誘導に対する影響を検討し、SA 処理 (10 μM) で生じる気孔閉鎖は 100 μM のヒポタウリンおよびアミノオキシ酢酸を同時処理により、完全に打ち消されることが分かった (Fig.2、Fig.3)。

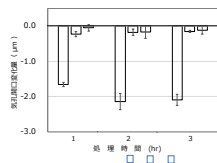


Fig. 2 硫化水素消去剤 (hypotaurine; HT) がサリチル酸によるソラマメ気孔閉鎖に及ぼす影響

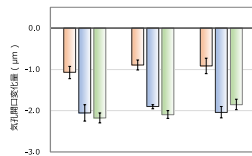


Fig. 1 明期下におけるサリチル酸のソラマメ気孔閉鎖に及ぼす影響

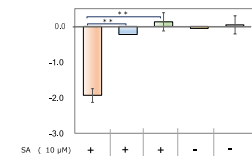


Fig. 3 硫化水素消去剤 (hypotaurine; HT) および硫化水素合成阻害剤 (アミノオキシ酢酸; AOA) がサリチル酸 (SA) によるソラマメ気孔閉鎖に及ぼす影響

SA 処理によって H₂S が孔辺細胞内に生成誘導されるのかを確かめるため、次に H₂S 検出用蛍光プローブ (SulfoBiotics-HSip-1 DA) を用いた蛍光イメージング法により孔辺細胞内の H₂S 量を測定した (Fig.4、Fig. 5)。無処理の孔辺細胞でも H₂S は検出され、気孔では常に硫化水素が存在する事が初めて明らかとなった。H₂S の含量は、SA 処理 60 分後には処理前の 1.7 倍以上まで増加し、この後、無処理時以下まで減少していた。この SA 処理後の孔辺細胞内で観察される H₂S 量の上昇のタイミングは、気孔開閉の始まりと対応しており、この H₂S 増加が、SA の気孔閉鎖誘導のシグナルの伝達に関与している事が考えられた。

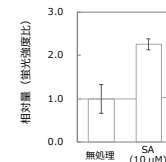


Fig. 4 10 μM サリチル酸処理 60 min 後のソラマメ孔辺細胞内の硫化水素量

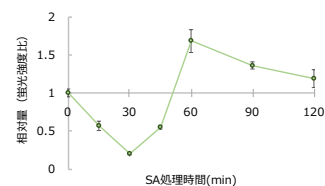


Fig. 5 サリチル酸処理 (10 μM) したソラマメ孔辺細胞内の硫化水素量の経時変化 (対処理前比)

2) サリチル酸処理によるソラマメ気孔閉鎖と孔辺細胞内の活性酸素との関連性の検討

SA は様々な植物の孔辺細胞内の活性酸素 (ROS) の発生を亢進し、シグナル伝達に深く関与していることが報告されているので、カタラーゼやスーパーオキシドアニオンのスカベンジャー (1,2-dihydroxy-3,5-benzenedisulfonic acid; Tiron) の影響を検討した。カタラーゼ (Fig.6) や Tiron (data 非表示) を SA と同時施用した場合、SA による気孔閉鎖は全く観察されなくなり、過酸化水素をはじめとする活性酸素種は、SA の気孔閉鎖の主要なシグナル因子であることが確認できた。

さらに、孔辺細胞内の過酸化水素量を測定したところ、活性酸素量は SA 処理後 5 分後に無処理の 2 倍以上に達しその後、急激に処理前のレベル以下まで減少していた (Fig.7)。の SA による活性酸素の一過性な増加は、H₂S の増減なる挙動を示すことが分かった。

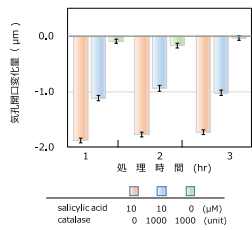


Fig.6 カタラーゼがサリチル酸によるソラマメ気孔閉鎖に及ぼす影響

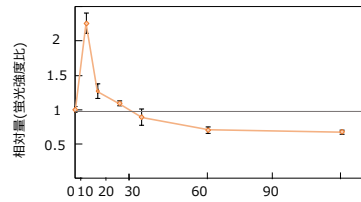


Fig.7 サリチル酸処理 (10μM) したソラマメ孔辺細胞内の過酸化水素量の経時変化 (対処理前比)

3) サリチル酸処理によるソラマメ気孔閉鎖と孔辺細胞内の一酸化窒素との関連性検討

一方、アブシジン酸による気孔閉鎖誘導でのシグナル伝達では NO が重要な役割を果たしていることが明白であるので、SA 気孔閉鎖に対する合成酵素(NOS)阻害剤である N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride(L-NAME)や、NO 消去剤 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl (PTIO) の影響について調査した。SA のソラマメ気孔閉鎖誘導は、これら両化合物によりほとんど完全に打ち消され、NO が SA の気孔閉鎖作用の発現に関与することを明らかとした (Fig.8)。さらに NO 検出用蛍光プローブ (S H₂DCF DA) を用いた蛍光イメージング法により (Fig.9)、孔辺細胞内の NO 量は、SA 処理 60 分後に無処理の 2 倍以上まで増加することを見出し、孔辺細胞での NO の増減は H₂S の場合と類似していることが分かった。

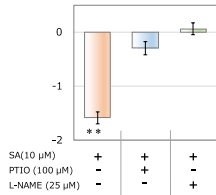


Fig.8 一酸化窒素消去剤 (PTIO) および一酸化窒素生成阻害剤 (L-NAME) がサリチル酸によるソラマメ気孔閉鎖に及ぼす影響

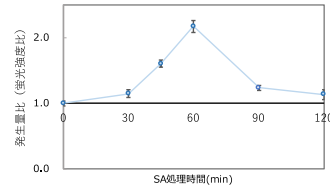


Fig.9 サリチル酸処理 (10μM) したソラマメ孔辺細胞内のソラマメ孔辺細胞内の一酸化窒素量の経時変化 (対処理前比)

4) サリチル酸のソラマメ気孔閉鎖における硫化水素、一酸化窒素、活性酸素の関係性の検討

サリチル酸のソラマメ気孔閉鎖において、H₂S、NO および活性酸素がシグナル伝達因子であることが明らかになったので、これら因子がどのような関係で繋がっているかを調べることにした。まず、SA による孔辺細胞内の発生ピークが処理後 60 分とほとんど変わらない H₂S と NO の関連性を調べるため、SA 処理 (10 μM) 60 分後の H₂S 含量への、NO 消去剤 PTIO や NOS の阻害剤 L-NAME の影響を調べた。PTIO や NOS の施与により SA により増加した H₂S 量は影響を受けなかった (Fig.11)。しかし、SA により増加した NO の含量は H₂S 消去剤ヒポタウリンや H₂S 生合成阻害剤アミノオキシ酢酸処理により、無処理と同程度まで減少した (Fig.11)。以上の結果および硫化水素発生剤によって孔辺細胞内に NO が生成誘導される事例から考え、SA の気孔閉鎖誘導では、H₂S が NO の上流のシグナル因子として作用していると推察した。

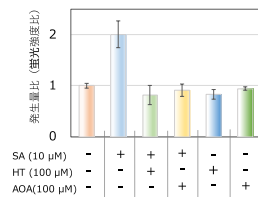


Fig.11 硫化水素消去剤 (Hypotaurnine; HT) および硫化水素生合成阻害剤 (アミノオキシ酢酸; AOA) がサリチル酸 (10μM) の一酸化窒素生成誘導 (処理後 60 分) に及ぼす影響

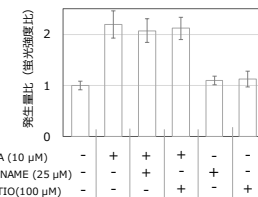


Fig.10 一酸化窒素生成阻害剤 (L-NAME) および一酸化窒素消去剤 (PTIO) がサリチル酸 (10μM) の硫化水素生成誘導 (処理後 60 分) に及ぼす影響

また、SA による H₂S 生成誘導は、カタラーゼにより抑制された (Fig.12)。過酸化水素は SA 処理後最も早く増加する因子であることから、過酸化水素は H₂S の上流のシグナル因子であると結論づけた。

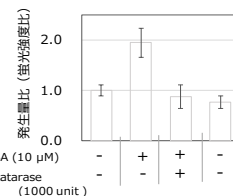


Fig.12 カタラーゼがサリチル酸 (10μM) の硫化水素生成誘導 (処理後 60 分) に及ぼす影響

さらに、SA の気孔閉鎖におけるシグナル伝達因子である活性酸素、硫化水素、一酸化窒素が発生する器官の比較から、各因子の関連性の検討を試みた。高解像度共焦点レーザースキャン蛍光顕微鏡を用いてそれらの局在器官を調べると、SA 処理により過酸化水素と H₂S の局在器官は比較的類似性があり、孔辺細胞の細葉緑体を中心とし、その周辺部位に検出されるのに対し、NO は葉緑体のみで局在していることが分かった。

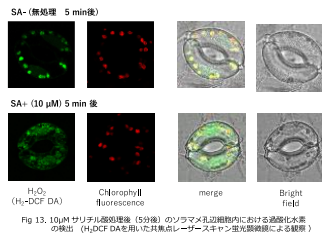


Fig. 13. 10 μ M サリチル酸処理後 (5分後) のソラマメ孔辺細胞内における過酸化水素の検出 (H₂DCF DAを用いた共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察)

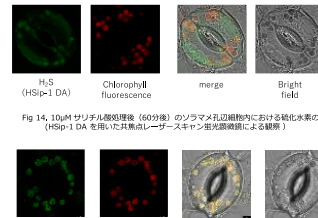


Fig. 14. 10 μ M サリチル酸処理後 (60分後) のソラマメ孔辺細胞内における硫化水素の検出 (HS(-)-1 DAを用いた共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察)



Fig. 15. 10 μ M サリチル酸処理後 (60分後) のソラマメ孔辺細胞内における一酸化窒素の検出 (DAF-2 DAを用いた共焦点レーザー走査型顕微鏡によるモニタリング)

3つの因子の中で最も上流の過酸化水素が葉緑体で強く検出されたことから、光化学系IIの反応阻害剤 DCMU および、シトクロム b6f 複合体阻害剤 DBMIB の影響を検討した。両者は SA による H₂S の発生を抑制し、SA の気孔閉鎖誘導を抑制することを見出した (data 非表示)。

以上より、SA による孔辺細胞内の H₂S の発生は、過酸化水素などの活性酸素種の葉緑体での増加が引き金になる、すなわち SA による気孔閉鎖シグナル伝達において、活性酸素が H₂S と NO の上流で機能していることを明らかとした。

5) SA のソラマメ気孔閉鎖誘導における二次メッセンジャーとしての 8-SH-cGMP および 8-NO₂-cGMP の可能性の検討

SA のソラマメ気孔閉鎖誘導において活性酸素、H₂S および NO の発生が明らかとなったので、これら因子の下流に働くすなわち二次メッセンジャー物質と知られており、気孔閉鎖活性が報告されている 8-SH-cGMP および 8-NO₂-cGMP の分析を行った。8-NO₂-cGMP は、SA 処理した孔辺細胞で無処理より明らかに増加していること確認できた (Table 1)。8-SH-cGMP は今回の検討では検出できなかったが、8-SHcGMP は H₂S 発生下の孔辺細胞内で 8-NO₂cGMP より変換されることが明らかであるので、SA による気孔閉鎖においても、8-SHcGMP と 8-NO₂cGMP が二次メッセンジャーとして機能していることが推測できた。また、8-NO₂cGMP の生成に関与する guanylate cyclase の阻害剤 (ODQ) が SA の気孔閉鎖を打ち消すことが確認されおり (Fig.16)、こも結果からも 8-SHcGMP と 8-NO₂cGMP は二次メッセンジャーであることが示唆できる。

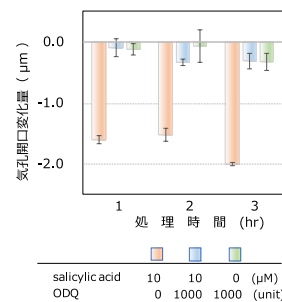


Fig.16 guanylate cyclase阻害剤(ODQ) がサリチル酸によるソラマメの気孔閉鎖に及ぼす影響

Table 1 サリチル酸 (10 μ M) 処理によるソラマメ孔辺細胞内の cGMP 誘導体含量変化

	8-SH-cGMP	8-NO ₂ -cGMP
処理前	Not detected	0.080 ± 0.025
処理60分後	Not detected	0.11 ± 0.082

【結論】

本研究では、近年、活性酸素種 (ROS)、一酸化窒素 (NO) に次ぐ第三のガス状シグナル分子として注目されている硫化水素 (H₂S) が、サリチル酸による気孔閉鎖誘導シグナル伝達経路に重要な役割を示す、すなわちシグナル伝達物質であることを証明した。

また、それらに因子の関連性の解明について検討し、サリチル酸による気孔閉鎖誘導シグナル伝達経路では、これら 3 つのシグナル因子の中で、特に葉緑体にて発生する過酸化水素が第一のシグナルとなり硫化水素の生成を引き起こし、発生した硫化水素は、さらに一酸化窒素を発生させる、すなわち、過酸化水素→硫化水素→一酸化窒素の順でシグナルが伝達され、これら 3 つの因子はいずれもシグナル伝達で重要な役割であることを明らかとした。また、発生誘導された一酸化窒素によって二次メッセンジャーである 8-NO₂cGMP が生成誘導されることも新たに発見し、サリチル酸の気孔閉鎖誘導シグナル伝達経路は、既に報告されているアブジジン酸のシグナル伝達と類似性があることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高杉航平, 新北大樹, 山田直隆, 岩井純夫
2. 発表標題 サリチル酸のソラマメ孔辺閉鎖と硫化水素および活性酸素発生との関係
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田直隆, 新北大樹, 安藤勇輝, 岩井純夫
2. 発表標題 サリチル酸の気孔閉鎖誘導に關する硫化水素、一酸化窒素および活性酸素種の關連性について
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度西日本・中四国支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田直隆, 新北大樹, 岩井純夫
2. 発表標題 サリチル酸の気孔閉鎖誘導におけるシグナル伝達物質としての硫化水素
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新北大樹, 山田直隆, 安藤勇輝, 岩井純夫
2. 発表標題 サリチル酸の気孔閉鎖誘導における硫化水素の機能解明
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田直隆, 新北大樹, 安藤勇輝, 岩井純夫
2. 発表標題 サリチル酸の気孔閉鎖誘導に關与する硫化水素、一酸化窒素および活性酸素種の關連性について
3. 学会等名 農芸化学会2018年度西日本支部大会
4. 発表年 2018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