

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03278

研究課題名(和文)酸化シグナルを運ぶ活性カルボニル種が植物細胞に特異的応答を引き起こすメカニズム

研究課題名(英文)Biochemical mechanism of reactive carbonyl signaling in plants

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1)活性カルボニル種(RCS)は孔辺細胞のH⁺ATPaseまたはその活性調節機構に作用し青色光応答を阻害し、これによりABAシグナルとBLシグナルのクロストークを媒介することを示した。(2)RCSは葉の老化開始シグナルであり、葉のアルデヒドオキシダーゼはRCSを消去し老化開始を抑制することを見出した。(3)塩ストレスでの成長阻害はRCSの増大が要因でありRCS消去剤は障害を軽減することを明らかにした。(4)RCSを特異的に消去する複数のGSTアイソザイムをミヤコグサなどで新たに見出した。(5)アルケナルレダクターゼが葉緑体で生じるアポカロテノイドの一部を消去することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)孔辺細胞のABAシグナル経路とBLシグナル経路のクロストークをRCSが介することを初めて示した。(2)農業生産の世界的な阻害要因である塩ストレス障害に関し、アクロレインやHNEなどのRCSの増大が生育阻害の原因であり、RCS消去剤によって塩ストレス障害が軽減されることを初めて示した。(3)GSTは一般に解毒酵素として重要性であると広く理解されていたが、GSTが植物体内でGSが何を解毒しているかは明確でなかった。本成果によって、複数の被子植物種で、複数のGSTUがRCSを基質として認識することが明らかとなり、GSTの生理機能としてRCS消去が大きな意味をもつことが示された。

研究成果の概要(英文)：We found the following facts. (1) RCS suppresses the plasma membrane H⁺-ATPase activity/activation in the guard cell and thereby inhibit the blue light-responsive stomata opening. (2) RCS act as a signal to start leaf senescence. The aldehyde oxidase in the leaf suppresses the initiation of senescence by scavenging RCS such as acrolein. (3) Salt stress-induced growth inhibition of plants was suppressed by the scavenging of RCS with the exogenously added carbonyl scavenger dipeptides, indicating that the RCS accumulation is a critical cause of salt stress-related tissue injury. (4) Several glutathione transferase Tau class isozymes in *Theilungiella halophila* and *Lotus japonicus* show substrate specificity for RCS such as acrolein and HNE, as do those in *Arabidopsis thaliana*. (5) Alkenal reductase (AER), which resides in the cytosol, can scavenge some of apocarotenoids, which are generated in the chloroplast and act as a retrograde signal, suggesting a signal-regulating role of AER.

研究分野：植物生理学

キーワード：環境ストレス 植物ホルモン シグナル伝達 レドックスシグナル グルタチオントランスフェラーゼ 活性酸素 親電子物質 アクロレイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の環境ストレス応答においては、ストレス防御遺伝子活性化や、植物ホルモンシグナル伝達の促進には活性酸素種(ROS)が関与する。ROSは細胞内のレドックス状態に影響を与え、タンパク質のチオール基を酸化して細胞の応答を引き起こしたり細胞に障害をもたらしたりする。しかし、植物細胞内でのROSの作用メカニズム、とくにROSシグナル受容体の正体はほとんど未解明であった。研究代表者はこれまでに、過酸化脂質分解産物である、 α -不飽和アルデヒド、ケトン(活性カルボニル種(RCS)と総称)が植物においてROSの作用を細胞に伝える媒介因子として働くことを明らかにしてきた。

不飽和脂肪酸から生成するRCSには構造(炭素鎖長、酸素化度、不飽和結合数)が異なる20種以上の分子種があり、植物組織ではこれらのなかでアクロレイン(Acr)、4-ヒドロキシノネナール(HNE)、4-ヒドロキシヘキサナール(HHE)、クロトンアルデヒド、2-ペンテナール、2-ヘキサナールが頻繁に検出される。最も化学的反応性が高いのはAcrであり、ついでHNEである。細胞内ではこれら潜在毒性の異なるRCSが異なる定常濃度で存在しており、ストレスの種類、強度、持続時間に応じて、それぞれの濃度が別々に増大することで、ストレスシグナル作用や細胞障害をもたらすと考えられる。既知のRCS代謝酵素であるアルデヒドレダクターゼやアルデヒドデヒドロゲナーゼはアルデヒド分子種ごとの特異性は低く、細胞が多種類のRCSの個別の濃度を調節している生化学機構はほとんど未解明である。

RCSは親電子物質であり、Michael付加反応でタンパク質の求核残基を修飾し、タンパク質の構造変化による機能変化(失活または活性化)を引き起こす。植物でのRCSのシグナル作用として、アブシシン酸(ABA)による気孔閉鎖シグナル伝達の媒介、オーキシンによる側根形成シグナル伝達の媒介、培養細胞の酸化ストレス下でのプログラム細胞死(PCD)開始シグナル作用が明らかになっている。PCD開始シグナルとしてのRCSの直接の標的はカスパーゼ3様プロテアーゼであることが明らかになっており、一方オーキシンシグナル経路でのRCSの作用点は、シグナル伝達変異株を用いた解析から、オーキシン受容体TIR1またはAUX/IAAレプレッサーであると推定されている。RCSの標的タンパクを特定し、そのタンパク質との反応を解明することは、植物のROSシグナル伝達メカニズム解明に不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、植物におけるRCSシグナルの作用メカニズムを解明すること、およびRCS制御機構を解明することを目的として、以下の目標を設定した。

(1) 気孔の青色光(BL)応答におけるRCSの機能と作用点の解明。

孔辺細胞においてRCSは機構を閉鎖するホルモンであるABAやジャスモン酸メチル(MeJA)のシグナルの下流で生成する。気孔開度はABA、MeJAおよびCO₂により閉鎖制御、BLにより開口制御を受けており、RCSがこれらのシグナルネットワークにおよぼす影響を解析し、孔辺細胞におけるRCSの作用点を推定する。

(2) PCD開始に関与するRCSの解明。

培養細胞でのPCD開始にRCSが関与することから、植物体のPCDの一種である葉の老化へのRCSの関与を検証し、老化を促進するRCSを特定する。また、環境ストレスによるPCDとして塩ストレス条件下での根の表皮細胞のPCDがある。そこでRCSの塩ストレス障害への関与を検証する。

(3) RCSを消去する植物酵素の性質解明。

グルタチオントランスフェラーゼ(GST) Tauクラスアイソザイム(GSTU)は植物に固有であり、とくに維管束植物ではもっとも種類の多いアイソザイムである。シロイヌナズナがもつ28種のGSTUのうち、活性測定した20アイソザイムの半数はAcrやHNEを基質とすることを研究代表者は明らかにした。ここでは、シロイヌナズナ以外の植物のGSTUもRCSを基質とするかをシロイヌナズナに近縁の*Thellungiella halophila*(アブラナ科)および*Lotus japonicus*(ミヤコグサ、マメ科)の複数のGSTUで検証する。

一方、酵素2-アルケナールレダクターゼ(AER)は過酸化脂質に由来するRCSの α -不飽和結合を特異的に還元するが、 α -不飽和カルボニル化合物はカロテノイド酸化生成物(アポカロテノイド)にも複数含まれている。アポカロテノイドは葉緑体の酸化ストレスによって生じ、レトログレードシグナル(RGS)として防御応答に寄与するとされており、細胞質局在性のAERがアポカロテノイドを基質とするかを調べ、RGSシグナル調節機構に関する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 気孔の青色光応答におけるRCSの機能と作用点

典型的RCSとしてAcrをシロイヌナズナの葉に噴霧し、その後BLを照射し、気孔開口応答をサーモグラフィー差分画像解析により評価した。またBLシグナル伝達に関与するフォトリポリン、BLUS1、リン酸化レベルへのAcrの影響、孔辺細胞プロトプラストのH⁺-ATPase活性へのAcrの影響を評価した。

(2) 葉の老化に関与するRCSの解析

アルデヒドオキシダーゼ (AO) はさまざまなアルデヒドを基質としてカルボン酸に参加する酵素であり、シロイヌナズナでは長角果に特異的に発現するアイソザイム AO4 が欠損すると長角果の RCS レベルが増大し老化が促進される。シロイヌナズナの葉で主要な AO アイソザイム AO3 は ABA 生合成に関わることが知られているが、葉の老化制御にも関与する可能性がある。AO3 遺伝子を欠損した *ao3* 株を用い、葉の老化が野生株より早いかを検証するとともに、老化開始に伴い増大する RCS を HPLC 分析によって特定した。

(3) 塩ストレス障害に関与する RCS の解析

植物の塩ストレス障害には ROS の関与が知られており、RCS が塩ストレスでの PCD に関与する可能性を検証した。シロイヌナズナ種子の発芽、および実生の成長に対する NaCl の阻害効果と、カルボニル消去ペプチドが塩ストレスを軽減するかを検証した。また塩による生育阻害と相関する RCS を特定するために、塩ストレス時に植物体内で増大するカルボニル種を HPLC で分別定量した。さらにタンパク質カルボニル化レベルを評価した。

(4) RCS を基質とする新たな GST アイソザイムの探索

シロイヌナズナ GSTU タンパクと相同性の高いタンパク質をコードする複数の GST 遺伝子を *T. halophila* および *L. japonicus* ゲノムデータベースで検索し、リソースから *T. halophila* の 9 種の cDNA、*L. japonicus* の 6 種の cDNA を入手した。これらを実験室で発現させ精製したのち、Acr、HNE、クロトンアルデヒドに対する触媒活性を測定した。

(5) AER のアポカロテノイドに対する基質特異性の解析

大腸菌で発現させ精製した AER を用いて、9 種類のアポカロテノイドに対する触媒活性を測定した。活性が検出された基質に関しては、さらに生成物の構造を LC-MS/MS 分析により推定した。

4. 研究成果

(1) BL による気孔開口シグナルを RCS が負に制御するメカニズム

葉に RCS である Acr を添加すると、BL 照射に応答した気孔開口が抑制されることを見出した。これは気孔閉鎖ホルモンである ABA のシグナル伝達の下流で生成する RCS が気孔開口抑制にも働くことを示唆する。BL の受容から気孔開口に至るシグナル伝達経路タンパクの活性化に対する Acr の効果を解析し、Acr によってもっとも大きな阻害を受けるのは孔辺細胞細胞膜 H⁺-ATPase であること、また Acr の作用点は H⁺-ATPase を活性化するキナーゼまたは不活性化するホスファターゼであると推定できた。これにより、RCS が孔辺細胞の ABA シグナル経路と BL シグナル経路のクロストークを媒介する物質であることが初めて示された。

(2) 葉の老化を開始させる RCS の発見

シロイヌナズナ AO3 欠損株 *ao3* は野生株に比べて葉の老化が早い。AO3 は ABA 生合成に関わる酵素で *ao3* 株は ABA 含量が低い、*ao3* 株の早期老化は ABA 欠損によるものではなく、Acr やクロトンアルデヒドなど脂質由来の RCS の蓄積によるものであることを明らかにした。すなわち、RCS は葉の老化開始シグナルであり、正常な葉では AO3 が RCS を消去している RCS が蓄積しないために老化が開始しないことが明らかになった。

(3) 塩ストレス障害に関与する RCS の同定

塩ストレス (100 mM NaCl) を与えた植物は、根の伸長阻害および葉の光化学系 II (PSII) 活性低下が認められたが、カルボニル消去ペプチドであるカルノシン (CAR) を NaCl と同時に与えると、塩ストレス障害が軽減された。塩ストレス処理により植物体内ではイオンバランス (Na⁺/K⁺比) の変化、H₂O₂ レベルの増大およびアクロレインや HNE などの RCS レベルの増大、タンパク質カルボニル化レベルの増大が生じた。CAR は RCS レベル増大およびタンパク質カルボニル化レベルの増大を抑制したが、イオンバランス変化、H₂O₂ 増大には影響しなかった。これらの結果から、アクロレインや HNE などの RCS の増大が塩ストレス障害の要因であり、植物の RCS 消去能を高めることで塩ストレス障害が軽減できることが初めて示された。

(4) RCS を基質とする新たな GST アイソザイムの発見

T. halophila の GSTU 3 種、*L. japonicus* の GSTU 3 種のタンパク質を実験室で発現させることができた。*T. halophila* の pdh18739 タンパク、pdh02749 タンパクはアクロレイン、HNE、クロトンアルデヒドを消去する活性を示した。このうち pdh02749 はとくに HNE に対する比活性が高く、従来知られている植物の GST アイソザイムの中では最高の値を示した。*T. halophila* の pdh13104 タンパクは GST に共通した人工基質である 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) に対する酵素活性があったが、RCS に対する活性は示さなかった。*L. japonicus* の F13 タンパク、M07 タンパク、M20 タンパクはいずれもアクロレイン、HNE、クロトンアルデヒドを基質として認識した。とくに M06 は GSTU アイソザイムの系統樹では *T. halophila* pdh02749 タンパクと同じクレードに属し、HNE に対して比較的高い比活性を示した。これらの結果から、シロイヌナズナおよびその近縁種である *T. halophila* のみならず、マメ科植物においても RCS を消去する GST アイソザイムが存在することが初めて明らかになった。

従来、GST は生理学的重要性をもつ解毒酵素であると広く理解されていたが、植物体内で GST が何を解毒しているかは必ずしも明確でなかった。本成果によって、複数の被子植物種で、複数の GSTU が RCS を基質として認識することが明らかとなり、GST が解毒する内在性基質として RCS が大きな意義をもつことが示された。

(5) AER のアポカロテノイドに対する基質特異性の解析 (真野)

カロテノイド酸化分解生成物のなかで， α -不飽和カルボニル構造を持つ 9 つの分子種のうち，AER の基質として還元されたのは α -イオンなど 3 種であった。AER の基質とならなかった β -シクロシトラールなど他の 6 つの分子種はいずれも 炭素にアルキル基をもっていたことから，AER の基質認識には RCS の 炭素からアルキル基の分岐がないことが必要であると示唆された。

アポカロテノイドは葉緑体から発せられるレトログレードシグナル (RGS) の作用を持つ。AER は細胞質に局在する酵素であり，RGS を調節する機能をもつ可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nurbekova Zhadyrassyn, Srivastava Sudhakar, Standing Dominic, Kurmanbayeva Assylay, Bekturova Aizat, Soltabayeva Aigerim, Oshanova Dinara, Tureckova Veronica, Strand Miroslav, Biswas Md. Sanauallah, Mano Jun'ichi, Sagi Moshe	4. 巻 108
2. 論文標題 Arabidopsis aldehyde oxidase 3, known to oxidize abscisic aldehyde to abscisic acid, protects leaves from aldehyde toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1439 ~ 1455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15521	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. Sanauallah, Mano Jun'ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Lipid Peroxide-Derived Reactive Carbonyl Species as Mediators of Oxidative Stress and Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.720867	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 真野純一	4. 巻 60
2. 論文標題 植物細胞の酸化シグナルを伝える活性カルボニル種・過酸化脂質由来、 α -不飽和カルボニル化合物の作用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 131 ~ 136
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 Islam Md. Moshui, Ye Wenxiu, Akter Fahmida, Rhaman Mohammad Saidur, Matsushima Daiki, Munemasa Shintaro, Okuma Eiji, Nakamura Yoshimasa, Biswas Md. Sanauallah, Mano Jun'ichi, Murata Yoshiyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Reactive Carbonyl Species Mediate Methyl Jasmonate-Induced Stomatal Closure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1788 ~ 1797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa107	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 Koschmieder Julian, Wust Florian, Schaub Patrick, Alvarez Daniel, Trautmann Danika, Krischke Markus, Rustenholz Camille, Mano Jun'ichi, Mueller Martin J, Bartels Dorothea, Hugueney Philippe, Beyer Peter, Welsch Ralf	4. 巻 185
2. 論文標題 Plant apocarotenoid metabolism utilizes defense mechanisms against reactive carbonyl species and xenobiotics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 331 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiaa033	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 Sugimoto Koichi, Matsuoka Yasumasa, Sakai Kyoko, Fujiya Norika, Fujii Hiroyuki, Mano Jun'ichi	4. 巻 355
2. 論文標題 Catechins in green tea powder (matcha) are heat-stable scavengers of acrolein, a lipid peroxide-derived reactive carbonyl species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 129403 ~ 129403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2021.129403	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 Murakami Nanaka, Fuji Saashia, Yamauchi Shota, Hosotani Sakurako, Mano Jun'ichi, Takemiya Atsushi	4. 巻 63
2. 論文標題 Reactive Carbonyl Species Inhibit Blue-Light-Dependent Activation of the Plasma Membrane H ⁺ -ATPase and Stomatal Opening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1168 ~ 1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac094	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 Sultana Most. Sharmin, Yamamoto Shun-ichi, Biswas Md. Sanaulah, Sakurai Chisato, Isoai Hayato, Mano Jun'ichi	4. 巻 70
2. 論文標題 Histidine-Containing Dipeptides Mitigate Salt Stress in Plants by Scavenging Reactive Carbonyl Species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 11169 ~ 11178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.2c03800	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

〔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 真野純一, 池本真梨, 田中克典, Ambara Pradipta
2. 発表標題 側根形成過程における活性カルボニル種の生成とその意義
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021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

1. 発表者名 羽田紋子, 松井健二, 松岡恭正, 真野純一
2. 発表標題 ネギ属に含まれる含硫アミノ酸は優れたアクロレイン消去物質である
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度中四国支部大会（第63回講演会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Most. Sharmin Sultana, Shun-ichi Yamamoto, Md. Sanullah Biswas, Chisato Sakurai, Hayato Isoai, Jun'ichi Mano
2. 発表標題 Histidine-containing dipeptides mitigate salt stress in plants by scavenging reactive carbonyl species
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度中四国支部大会（第63回講演会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山内 靖雄、須藤 修、和田 哲夫、日本バイオスティミュラント協議会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 500
3. 書名 バイオスティミュラントハンドブック	

〔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	杉本 貢一 (Sugimoto Koichi) (00511263)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	
研究分担者	村田 芳行 (Murata Yoshiyuki) (70263621)	岡山大学・環境生命科学学域・教授 (15301)	
研究分担者	深城 英弘 (Fukaki Hidehiro) (80324979)	神戸大学・理学研究科・教授 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	武宮 淳史 (Takemiya Atsushi) (80448406)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・准教授 (15501)	
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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イスラエル	Ben-Gurion University of the Negev			
ドイツ	University of Freiburg			
バングラデシュ	BSMR Agricultural University			
中国	Shanghai Center for Plant Stress Biology			
ハンガリー	Biological Research Centre			
トルコ	Ege University			