

機関番号：32660

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2010

課題番号：21200068

研究課題名（和文）活性酸素種生成酵素の網羅的解析に基づく植物 ROS ダイナミクス・ネットワークの解明

研究課題名（英文）The elucidation of plant ROS dynamics-network based on global analysis of NADPH oxidases, Rboh proteins

研究代表者

賀屋 秀隆 (KAYA HIDETAKA)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：80398825

研究成果の概要（和文）:

活性酸素種 (ROS) は、非常に細胞毒性が強いため、生物にとって不要なものである、と思われがちである。しかし、ROSは、生きる上で必要不可欠な物質でもある。では、植物はどのように、ROSを利用しているのであろうか。シロイヌナズナには、ROSを生成する酵素が 10 種もある。本研究により、これらはCa²⁺あるいはリン酸化により活性化しROSを生成すること、相互作用因子により活性が調節されることを示唆した。これらのことから、植物は、適当な組織・タイミングでROSを生成し、毒性の強いROSを巧みに活用していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）:

Reactive oxygen species (ROS) are molecules that oxidize lipids, protein, and DNA, and create damage to cellular function, in general. However, ROS are essential for living cells as well as plant cells. How do plants utilize toxic ROS? *Arabidopsis* has ten enzymes, AtRbohA-J, which have ROS-producing activities. We showed that the each *AtRboh* gene was expressed in various tissues, all AtRboh proteins were activated by Ca²⁺ or phosphorylation, and some of AtRboh protein was regulated by several interacting proteins. These results suggested that plants generated ROS at a suitable timing and tissue to utilize toxic ROS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：生物学 農学

科研費の分科・細目：基礎生物学 境界農学・植物分子生物生理学 応用分子細胞生物学

キーワード：植物分子機能，発生・分化制御，活性酸素種，Ca²⁺，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

光合成や呼吸の際，副次的に活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) が生成される。ROS は、きわめて反応性が高い物質で、細胞に甚大な影響を及ぼすため、植物にとっていわば毒となる物質である。その為、植物は、ROS を消去する抗酸化物質・抗酸化酵素を多数もつ。ところがその一方で、植物は ROS を生成する酵素として NADPH oxidase を持ち合わせており、ROS を積極的に生成する。この積極的に生成された ROS は、形態形成・感染防御応答・環境ストレス応答などに不可欠で、多様な生命現象の局面において有益に活用されている。これらのことから、「諸刃の剣」に例えられる ROS の生成は、厳密に制御されなければならない。しかし、その制御機構の全貌は未解明であった。

2. 研究の目的

シロイヌナズナには、NADPH oxidase である Rboh (respiratory burst oxidase homolog) が 10 種も存在する。しかし、毒性の強い ROS を生成する酵素が、なぜ 10 種も存在するのであろうか？どの様なメカニズムで活性化するのか？については、不明な点が多かった。本研究では、積極的に生成される ROS の発生機構および生理学的意義の解明を目的とし、解析をおこなった。

3. 研究の方法

(1) ヒト培養細胞HEK293T細胞を用いた異種発現系による植物Rbohの測定

HEK293T細胞にシロイヌナズナあるいはイネのRboh遺伝子を一過的に発現させ、Ca²⁺イオノフォアであるイオノマイシンあるいは、脱リン酸化酵素阻害剤であるカリクリンAにより誘導されるROSをルミノール化学発光により、定量的に測定した。

(2) 酵母Two-hybrid screening によるAtRboh相互作用因子の探索

シロイヌナズナ AtRboh の活性制御領域であると考えられる N 末端領域を bait に、シロイヌナズナの cDNA library から蛋白質間相互作用する因子を探索した。

(3) シロイヌナズナ突然変異体を用いた表現型解析

シロイヌナズナ AtRboh 遺伝子に T-DNA が挿入された突然変異体について、表現型解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) AtRbohA-JのROS生成活性

シロイヌナズナ 10 種全てのAtRbohについて、HEK293Tを用いた異種発現系解析により、ROS生成活性を調べた。すべて、Ca²⁺あるいは蛋白質リン酸化により、活性化することを明らかにした。さらに、活性化能は大きく 3 つのグループに分けることができた。このことは、必要とされるROS量を各酵素間で分担していることを示唆するものである。

(2) AtRbohA-J遺伝子の発現解析

10 個全ての AtRboh 遺伝子について、RT-PCR や promoter::GUS による発現解析をおこなった。その結果、植物全体で発現するもの、花器官特異的に発現するもの、根特異的に発現するものにカテゴライズすることができた。興味深いことに、8 遺伝子が根で発現していることが判明した。このことは、AtRboh により積極的に生成された ROS は、根において多様な役割を担っていることを示唆するものである。根における発現組織を細胞レベルで解析すると共に、活性能を照合することで、ROS の役割がさ

らに明らかになると考えられる。

(3) イネOsRbohBのROS生成活性

イネにおいて感染防御応答に関与すると考えられているOsRbohBについても、異種発現解析をおこなった。AtRbohと同様にCa²⁺および蛋白質リン酸化により活性化されることを明らかにした。さらに、Ca²⁺による活性化には、1st EF-handモチーフとEF-handよりN末端側の領域が必要であるが、リン酸化による活性化には、これらの領域は必要ではないことも明らかにした。

(4) Ca²⁺-ROSシグナルネットワーク解析

イネCa²⁺チャネル候補因子OsMCA1は細胞膜に局在すること。OsMCA1過剰発現株、機能破壊株の解析より、低浸透圧下でのCa²⁺上昇ならびに低浸透圧誘導性のROS生成に関与することを示唆した。

(5) Ca²⁺-ROSシグナルネットワークの始点

AtRbohD, AtRbohFのCa²⁺依存的な活性化は、蛋白質リン酸化酵素阻害剤K252aにより阻害されることを明らかにした。このことは、Ca²⁺-ROSによるポジティブフィードバック制御において、AtRbohのリン酸化により誘導されたROSがこのフィードバックの始点であるという新規な概念を提唱するものである。

(6) AtRbohD, AtRbohF相互作用因子の探索

シロイヌナズナにおいて感染防御応答において機能するAtrbohD, AtrbohFの活性化制御因子を探索した。酵母two-hybrid screeningにより19種の候補因子を単離した。全ての候補因子について、AtRbohDあるいはAtRbohFを、HEK293T細胞に共発現させ、活性化に関与するかどうかを調べたところ、活性を抑制する因子、活性を促進する因子を同定することができた。

(7) CIPK26及びSRC2によるAtRbohFの活性

制御機構

酵母two-hybridスクリーニングにおいて、AtrbohFの相互作用候補因子とした単離したsoybean gene regulated by cold-2 (SRC2) CBL-interacting protein kinases 26 (CIPK26)について、細胞内局在を調べたところ、AtRbohFと同じくSRC2, CIPK26共に細胞膜周辺に局在した。並行して、*Nicotiana benthamiana*を用いた共免疫沈降法により、植物細胞内での相互作用を調べたところ、AtRbohFと蛋白質間相互作用することを明らかにした。これらのことは、AtRbohFの活性を制御する因子であることを強く示唆する。さらに、異種共発現解析により、SRC2はAtRbohFのCa²⁺及びリン酸化誘導による活性を促進すること、CIPK26は抑制することを明らかにした。

根を低温にさらすROS生成が誘導される。このROS生成にAtRbohFが関与すること、さらに、SRC2が関与することを明らかにした。このことは、ROS生成制御において、AtRbohFはCa²⁺・リン酸化だけでなく、多様な相互作用因子により厳密に制御されていることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- 1 Takahashi S, Kimura S, Kaya H, Iizuka A, Wong HL, Shimamoto K, Kuchitsu K. Reactive oxygen species production and activation mechanism of the rice NADPH oxidase OsRbohB, Journal of Biochemistry. 査読有, 2012, doi:10.1093/jb/mvs044
- 2 Kurusu T, Nishikawa D, Yamazaki Y, Gotoh M, Nakano M, Hamada H, Yamanaka T, Iida K, Nakagawa Y, Saji H, Shinozaki K, Iida H, Kuchitsu K. Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca²⁺ influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. BMC Plant Biology 査読有, 12, 11, 2012,

[doi:10.1186/1471-2229-12-11](https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-11)

- 3 Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, Hiraoka G, Senzaki E, Michikawa M, Kuchitsu K, Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. BBA-molecular cell research 査読有, 1823, 398–405, 2012, [doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.011](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.011)
- 4 Hamada H, Kurusu T, Okuma E, Nokajima H, Kiyoduka M, Koyano T, Sugiyama Y, Okada K, Koga J, Saji H, Miyao A, Hirochika H, Yamane H, Murata Y, Kuchitsu K, Regulation of a proteinaceous elicitor-induced Ca²⁺ influx and production of phytoalexins by a putative voltage-gated cation channel, OsTPC1, in cultured rice cells. Journal of Biological Chemistry 査読有, 287, 9931–9939, 2012
- 5 Dadacz-Narloch B, Beyhl D, Larisch C, Lopez-Sanjurjo EJ, Reski R, Kuchitsu K, Muller T, Becker D, Schoenknecht G, Hedrich R, A novel calcium binding site in the slow vacuolar cation channel TPC1 senses luminal calcium level. Plant Cell 査読有, 23, 2696-2707, 2011
- 6 Kurusu T, Yamanaka T, Nakano M, Takiguchi A, Ogasawara Y, Hayashi T, Iida K, Hanamata S, Shinozaki K, Iida H, Kuchitsu K, Journal of Plant Research 査読有, Involvement of the putative Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels, NtMCA1 and NtMCA2, in Ca²⁺ uptake, Ca²⁺-dependent cell proliferation and mechanical stress-induced gene expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells.

2011, [doi:10.1007/s10265-011-0462-6](https://doi.org/10.1007/s10265-011-0462-6)

- 7 Kurusu T, Hamada H, Sugiyama Y, Yagala T, Kadota Y, Furuichi T, Hayashi T, Umemura K, Komatsu S, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K, Journal of Plant Research 査読有, Negative Feedback Regulation of Microbe-Associated Molecular Pattern-Induced Cytosolic Ca²⁺ Transients by Protein Phosphorylation. 124, 415-424, 2011

[学会発表] (計 35 件)

- 1 賀屋秀隆, シロイヌナズナの花粉管先端生長における活性酸素種生成酵素の機能解析, 植物生理学会年会, 2012年3月16日, 京都産業大学
- 2 今井亜耶, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 *AtRbohA*, *AtRbohE*, *AtRbohG*, *AtRbohI* 遺伝子の機能解析, 植物生理学会, 2012年3月18日, 京都産業大学
- 3 新堀仁美, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 *AtRbohD*, *AtRbohF* の新奇活性制御候補因子の単離と機能解析, 植物生理学会, 2012年3月17日, 京都産業大学
- 4 河原崎朋子, シロイヌナズナ NADPH oxidase *AtRbohA-J* の比較解析, 植物生理学会, 2012年3月16日, 京都産業大学
- 5 木村幸恵, シロイヌナズナ NADPH オキシダーゼ *AtRbohD*, *AtRbohF* のリン酸化は Ca²⁺ による活性化に必要である, 植物生理学会年会, 2012年3月16日, 京都産業大学
- 6 河原崎朋子, シロイヌナズナの活性酸素種生成酵素 *AtRbohA-J* の活性制御機構と機能分担, 生化学会, 2011年9月23日, 京都国際会館
- 7 中島諒, 花粉管の先端生長に関与するシロイヌナズナの活性酸素種生成酵素 *AtRbohH*, *AtRbohJ* の機能解析, 生化学会, 2011年9月23日, 京都国際会館
- 8 新堀仁美, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 *AtRbohD*, *AtRbohF* の新奇活性制

- 御因子の単離と機能解析, 第生化学会, 2011年9月23日, 京都国際会館
- 9 飯塚文子, イネのNADPH Oxidase, OsRbohBのROS生成活性と活性化機構, 生化学会, 2011年9月22日京都国際会館
 - 10 木村幸恵, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素AtRbohD, AtRbohFの活性化機構の比較解析, 生化学会, 2011年9月22日, 京都国際会館
 - 11 賀屋秀隆, シロイヌナズナ花粉管の先端生長に必要なNADPH oxidaseの機能解析, 植物学会, 東京大学2011年9月17日
 - 12 朽津和幸, 植物のCa²⁺活性酸素シグナルネットワーク, 植物学会, 東京大学, 2011年9月17日
 - 13 朽津和幸, シロイヌナズナの10種の活性酸素生成酵素種(Nox)の活性制御機構・発現部位・機能分担の網羅的比較解析バイオイメージング学会, 2011年9月1日
 - 14 Kaya H, Functional analysis of *Arabidopsis* NADPH oxidase AtRbohH and AtRbohJ in pollen tube, 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. Budapest, Hungary, 2011年7月5日
 - 15 Kuchitsu K, Regulation of ROS production in early signaling network in innate immunity in cultured plant cells. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. Budapest, Hungary, 2011年7月5日
 - 16 Kawarazaki T, ROS-producing activates and functional diversity of the ten isozymes of *Arabidopsis* NADPH Oxidases AtRbohA–J, 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. Budapest, Hungary, 2011年7月5日
 - 17 Kimura S, Molecular mechanisms for activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and AtRbohF, by Ca²⁺ and phosphorylation, 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants. Budapest, Hungary, 2011年7月5日
 - 18 河原崎朋子, シロイヌナズナ NADPH oxidase AtrbohA–J の網羅的比較解析, 植物生理学会, 2011年3月20日, 東北大学
 - 19 木村幸恵, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 AtrbohD, AtrbohF の活性化機構の比較解析, 植物生理学会, 2011年3月20日, 東北大学
 - 20 河原崎朋子, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 AtrbohA–J の網羅的比較解析, BMB2010, 2010年12月7日, 神戸ポートアイランド
 - 21 来須孝光, イネ培養細胞の感染防御応答におけるCa²⁺動員とCa²⁺を介した情報伝達に関する因子の解析, BMB2010, 2010年12月7日神戸ポートアイランド
 - 22 路川真貴, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 AtrbohD, AtrbohF の新奇活性制御候補因子の単離と機能解析, BMB2010, 2010年12月7日, 神戸ポートアイランド
 - 23 今井亜耶, HEK293T 細胞を用いた異種共発現系によるシロイヌナズナ NADPH oxidase の活性調節機構の解析, 植物学会, 2010年9月9日, 中部大学
 - 24 新堀仁美, 活性酸素種生成酵素 AtrbohD, AtrbohF の活性化制御候補因子の単離と機能解析, 植物学会, 2010年9月9日, 中部大学
 - 25 朽津和幸, 植物の生体防御と活性酸素-Ca²⁺シグナルネットワーク, 日本生体防御学会, 2010年7月24日, 仙台市戦災復興記念館
 - 26 Kawarazaki T, Screening for novel regulators of AtRbohD and AtRbohF, NADPH oxidases involved in producing of reactive oxygen species, International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月6日パシフィコ横浜
 - 27 Kimura S, Regulation of ROS-producing activity of an *Arabidopsis* NADPH oxidase, AtRbohF, by binding of Ca²⁺ and phosphorylation, International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月6日,

パシフィコ横浜

- 28 河原崎朋子, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 *AtrbohD*, *AtrbohF* 活性制御候補因子の単離, 植物生理学会, 2010年3月18日, 熊本大学
- 29 河原崎朋子, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 *AtrbohD*, *AtrbohF* 活性制御候補因子の単離, 植物生理学会, 2010年3月18日, 熊本大学
- 30 朽津和幸, 植物の Ca^{2+} -活性酸素情報伝達ネットワーク, 植物生理学会, 2010年3月18日, 熊本大学
- 31 先崎栄里子, 活性酸素種生成酵素 *AtRboh* の活性制御機構の解析: 異種共発現系の構築と *AtRac/ROP* の関与の検証, 植物生理学会, 2010年3月18日, 熊本大学
- 32 高橋真哉, 異種発現系を用いたイネ *NADPH* オキシダーゼ *OsrbohB* の活性酸素種生成活性制御機構の解析, 植物生理学会, 2010年3月18日, 熊本大学
- 33 高橋真哉, Regulation of production of reactive oxygen species by a rice *NADPH* oxidase, *OsrbohB*, 日本分子生物学会, 2009年12月9日パシフィコ横浜
- 34 路川真貴, シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 *Atrboh* の活性制御候補因子の単離と機能解析, 植物学会, 2009年9月17日, 山形大学
- 35 朽津和幸, カルシウムイオンの結合を介した植物の活性酸素生成酵素 *NADPH* oxidase の活性調節機構の解析, 日本バイオイメージング学会, 就実大学, 2009年9月3日

[図書] (計1件)

著者名: 賀屋秀隆・木村幸恵・朽津和幸
出版社: 羊土社
書名: 実験医学 増刊 活性酸素シグナルと酸化ストレス 第1章-10 植物のストレス応答・形態形成における活性酸素種の積極的生成とその制御
発行年: 2009年 ページ: 2382-2389 (84-91)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

賀屋 秀隆 (Kaya Hidetaka)
東京理科大学・理工学部・助教
研究者番号: 80398825

(2) 研究分担者

高橋 真哉 (Takahashi Shinya)
東京理科大学・理工学部・ポスト
ドクトラル研究員 (平成21年度のみ)
研究者番号: 80370419

山中 拓哉 (Yamanaka Takuya)
東京理科大学・理工学部・ポスト
ドクトラル研究員 (平成21年度のみ)
研究者番号: 00422501

(3) 連携研究者

朽津 和幸 (Kuchitsu Kazuyuki)
東京理科大学・理工学部・教授
研究者番号: 50211884

来須 孝光 (Kurusu Takamitsu)
東京理科大学・理工学部・プロジェクト
研究員
研究者番号: 50422499

(4) 研究協力者

木村 幸恵 (Kimura Sachie)
東京理科大学・理工学研究科・博士課程

河原崎 朋子 (Kawarazaki Tomoko)
東京理科大学・理工学研究科・博士課程

先崎 栄里子 (Senzaki Eriko)
東京理科大学・理工学研究科・修士課程

路川 真貴 (Michikawa Masataka)
東京理科大学・理工学研究科・修士課程

今井 亜耶 (Imai Aya)
東京理科大学・理工学研究科・修士課程

新堀 仁美 (Nibori Hitomi)
東京理科大学・理工学研究科・修士課程

中島 諒 (Nakajima Ryo)
東京理科大学・理工学研究科・修士課程

飯塚 文子 (Iizuka Ayako)
東京理科大学・理工学研究科・修士課程

森 恭一郎 (Mori Kyo-ichiro)
東京理科大学・理工学部・学士課程

村上 祐樹 (Murakami Yuki)
東京理科大学・理工学部・学士課程

山本 裕太 (Yamamoto Yuta)
東京理科大学・理工学部・学士課程