

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：13901  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010年度 ～ 2012年度  
 課題番号：22780011  
 研究課題名（和文）イネのペルオキシソームにおけるアセトアルデヒド脱水素酵素の生理機能の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of physiological function of peroxisomal aldehyde dehydrogenase in rice  
 研究代表者  
 三屋 史朗 (MITSUYA SHIRO)  
 名古屋大学・生命農学研究科・助教  
 研究者番号：70432250

### 研究成果の概要（和文）：

植物の環境ストレス耐性における、ペルオキシソーム局在型 BADH タンパク質の生理機能を調べた。その結果、植物の BADH は種により様々な細胞内局在性を示したが、いずれも光合成組織に見られた。またイネだけでなく様々な植物の BADH がアセトアルデヒドの酸化も触媒し、触媒に必要なドメインの単離に成功した。イネにおいて BADH 遺伝子は環境ストレスにより増加したため耐性への関与が示唆されたが、通常の生育には必要ないことが示唆された。

### 研究成果の概要（英文）：

This study was done to determine the physiological function of peroxisomal BADH protein in the environmental stress tolerance of plants. Although plant BADH proteins showed various subcellular localization, most protein was mainly detected in photosynthetic tissues of leaves. Various plants' BADHs as well as rice showed acetaldehyde oxidation activity. The domain for the oxidation of acetaldehyde was identified in BADH proteins. Although, in rice, the expression of BADH genes was increased by environmental stress, indicating the involvement of those genes in the tolerance, BADH genes seemed not necessary for the growth under normal conditions.

### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 2012年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

### 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学雑草学

キーワード：植物、環境、アセトアルデヒド脱水素酵素、グリシンベタイン、ペルオキシソーム、イネ、分子生物学

#### 1. 研究開始当初の背景

ベタインアルデヒド脱水素酵素 (Betaine aldehyde dehydrogenase; BADH) は、はじめは大腸菌においてベタインアルデヒド(BA) を特異的な基質とする適合溶質グリシンベタイン (ベタイン) の合成酵素として単離された (Falkenberg & Strom 1990)。その後、

ベタインはハウレンソウやオオムギなど一部の植物でも生成され、BADH はベタインの生成を通じて植物の環境ストレス耐性に関与するタンパク質として単離され、これまで多くの研究がなされてきた。

イネ科植物の BADH タンパク質およびその遺伝子に注目した研究の結果、イネ科植物のオオムギやヤンソウだけでなく、ベタイン

を生成しないイネからも BADH 遺伝子が単離され、その発現量は高塩、乾燥などの環境ストレスにより増加することから、BADH は植物の環境ストレス耐性機構においてベタイン生成以外の生理機能があると示唆されてきたが (Nakamura et al. 1997)、その生理機能はほとんど明らかになっていない。

本研究代表者の研究により、イネの BADH についての酵素学的解析の結果、イネの BADH タンパク質が、ベタインの前駆体である BA だけでなく、アセトアルデヒドも基質とすることが明らかになった (Mitsuya et al. 2009)。アセトアルデヒドは、植物が冠水状態から脱した際に嫌気呼吸により発生したエタノールから生成され、その毒性が非常に高いことから (冠水後ストレス)、迅速に酸化、解毒される必要がある。これまでは、アセトアルデヒドはミトコンドリア局在型アルデヒドデヒドロゲナーゼにより主に酸化されると酵素学的に示されたが (Nakazono et al. 2000)、本研究代表者の研究より、イネの BADH タンパク質がイネのペルオキシソームにおいて、冠水後ストレス時のアセトアルデヒドの酸化に働いている可能性が示された。

また、イネおよびオオムギの BADH は、基質としてアミノブチルアルデヒド (AB-ald)、アミノプロピオンアルデヒド (AP-ald)、トリメチルアミノブチルアルデヒド (TMAB-ald)、トリメチルアミノプロピオンアルデヒド (TMAP-ald) も効率よく酸化することが明らかになった。さらに BADH の細胞内局在性が葉緑体 (ホウレンソウ BADH)、サイトゾルおよびペルオキシソーム (イネとオオムギ BADH) と多様であることを併せると、植物の環境ストレス耐性において、BADH タンパク質がベタイン合成だけでなくポリアミン代謝など他の生理的機能を有することも推察される。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、植物の環境ストレス耐性機構における BADH タンパク質の生理機能を解明することを目的とし、はじめに、イネやオオムギ以外の様々な植物における BADH タンパク質について基質特異性のカイネティクス分析および組織・細胞内局在性解析を行う。また、BADH タンパク質をコードする遺伝子をノックダウンさせた植物体を作成することによって、環境ストレス耐性における BADH タンパク質の役割を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 様々な植物種における BADH タンパク質のカイネティクス分析。イネ、オオムギ、ヤンソウ、ソルガム、トウモロコシ、ホウレ

ンソウ、シロイヌナズナ、および *Alternaria alternata* (糸状菌) における BADH 遺伝子をデータベースから探索し、PCR 法によりクローニングした。その後、pET32a ベクターにサブクローニングし、大腸菌 BL21 株に導入することによって、それぞれのリコンビナント BADH タンパク質を作製し、アフィニティクロマトグラフィによって精製した。

(2) 様々な植物種の BADH タンパク質の組織および細胞内局在性解析。イネ科植物 (オオムギ、ヤンソウ、オーチャードグラス、ローズグラス)、ヒユ科植物 (ホウレンソウ、オカヒジキ)、キク科植物 (ヒマワリ) を土耕において生育させ、それらの葉を FAA 固定し、抗ホウレンソウ BADH 抗体、抗 HvCMO 抗体を用いた蛍光抗体法を行った。さらに、それらの葉を用いて、ベタイン濃度の測定を NMR を用いて行い、BADH および CMO タンパク質の発現量をウェスタンブロット分析により調べた。

(3) イネおよびシロイヌナズナの BADH 遺伝子ノックダウン植物体の作出。シロイヌナズナ BADH 遺伝子ノックアウト株をデータベースより検索し、Arabidopsis Biological Resource Center より入手した。またイネのノックダウン株の作出のために、*OsBADH1* および *OsBADH2* 遺伝子のタンパク質コード領域をアンチセンス方向に pCambia121 ベクターに組み込んだアンチセンス用コンストラクトを作製し、イネ品種日本晴のカルスにアグロバクテリウム法により導入した。

## 4. 研究成果

(1) 様々な植物種における BADH タンパク質のカイネティクス分析

本研究では、PCR 法によりオオムギ (*BBD1*, *BBD2*)、ヤンソウ (*LcBADH1*, *LcBADH2*)、ソ

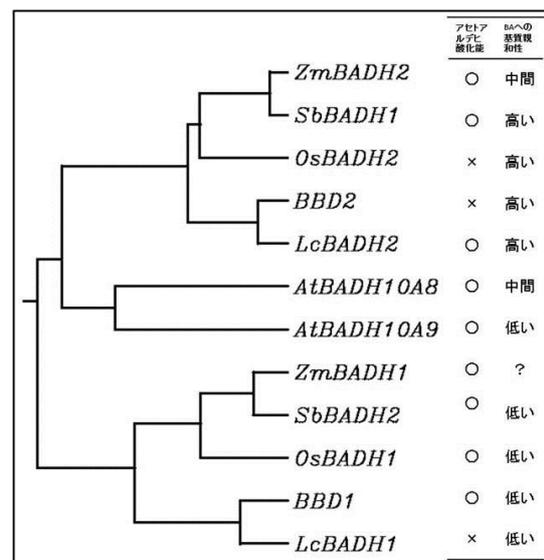


図1. 植物におけるBADHタンパク質のアミノ酸配列に基づく系統樹。リコンビナントタンパク質のアセトアルデヒド酸化能およびUAに対する親和性を示した。

ルガム (*SbBADH1*, *SbBADH2*)、トウモロコシ (*ZmBADH1*, *ZmBADH2*)、シロイヌナズナ (*AtBADH10A8*, *AtBADH10A9*)、ホウレンソウ (*SoBADH*), *Alternaria alternata* (*AaBADH-like*)を単離した。このうち、*SoBADH* および *AaBADH* タンパク質は作製の段階で不溶化しリコンビナントタンパク質を精製することができなかったが、そのほかのリコンビナント *BADH* タンパク質は精製に成功した。BA およびアセトアルデヒドを基質としてカイネティクス分析を行った結果、全てのリコンビナント *BADH* タンパク質が BA を基質としたが、高親和性および低親和性の二つに分かれた。さらにアセトアルデヒドについては、基質とするものとししないものの二つに分かれた (図 1)。

オオムギについて、低親和性かつアセトアルデヒドを基質とする *BBD1*、高親和性かつアセトアルデヒドを基質とししない *BBD2* を持つことが分かったため、次に *BBD1* と *BBD2* を 4 つの領域に分け、モザイク状に融合させたリコンビナントタンパク質を作製した。BA とアセトアルデヒドを基質としたカイネティクス分析の結果、BA に対する親和性に関わるドメインは *BBD2* の後半 1/4 の領域、アセトアルデヒド活性の有無に関わるドメインは *BBD1* の後半 1/2 の領域に存在することが示された (図 2)。

|                           | アセアルデヒド酸化能 | BAへの親和性 |
|---------------------------|------------|---------|
| <b>BBD2</b>               | ×          | 高い      |
| <b>BBD1</b>   <b>BBD2</b> | ×          | 高い      |
| <b>BBD1</b>   <b>BBD2</b> | ×          | 高い      |
| <b>BBD1</b>   <b>BBD2</b> | △          | 高い      |
| <b>BBD1</b>               | ○          | 低い      |

図 2. *BBD1* および *BBD2* タンパク質の融合タンパク質を用いた、アセトアルデヒド酸化能および BA への親和性に重要なドメインの探索

(2) 様々な植物種の *BADH* タンパク質の組織および細胞内局在性解析

オオムギ、ヤンソウ、オーチャードグラス、ローズグラス、ホウレンソウ、オカヒジキおよびヒマワリを土耕栽培し、1ヶ月育てた後に塩化ナトリウム水溶液を処理することによって塩ストレスを与えた。その後、最上位展開葉を用いて以下の実験を行った。ベタイン濃度を測定したところ、その濃度は植物種により様々であったが、塩処理によって有意に増加した。ベタイン合成に関わるふたつのタンパク質 (*BADH* と *CMO*) の発現解析の結果、各植物において、*BADH* または *CMO* のいずれかの発現量が塩処理によって増加した。イネ科

C4 植物 (ローズグラス) では、今回用いた抗 *CMO* 抗体により *CMO* タンパク質が検出されなかった。*BADH* および *CMO* タンパク質の組織および細胞内局在性解析の結果、細胞内局在性は科によって異なること、組織内局在性は主にカルビン回路を持つ組織に特に多くタンパク質が見られることが分かった (表 1)。

| 科   | 植物             | グリシンベタイン合成酵素       |                |
|-----|----------------|--------------------|----------------|
|     |                | 細胞内局在性             | 組織内局在性         |
| イネ科 | オオムギ (C3)      | サイトソル<br>ペルオキシソーム  | 葉肉、維管束鞘        |
|     | オーチャードグラス (C3) | サイトソル<br>ペルオキシソーム様 | 葉肉、維管束鞘        |
|     | ローズグラス (C4)    | サイトソル<br>ペルオキシソーム様 | 維管束鞘<br>葉肉、維管束 |
| ヒユ科 | ホウレンソウ (C3)    | 葉緑体                | 葉肉、維管束鞘<br>維管束 |
|     | オカヒジキ (C4)     | 葉緑体                | 維管束鞘<br>葉肉     |
| キク科 | ヒマワリ (C3)      | ペルオキシソーム様          | 葉肉             |

(3) イネおよびシロイヌナズナの *BADH* 遺伝子ノックダウン株の作出

シロイヌナズナの *BADH* 遺伝子ノックアウト株を、ABRC のデータベースより検索し、入手した。その後、各ラインの種子を複数栽培し、葉を採取して全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。PCR 法により、*AtBADH* 遺伝子の存在を確認したところ、いずれのラインにおいても *AtBADH* 遺伝子が増幅されたため、ノックアウト株を単離することが出来なかった。

次に、イネの *BADH* 遺伝子 (*OsBADH1*, *OsBADH2*) をアンチセンス方向に挿入した *OsBADH1anti-pCAMBIA121*、*OsBADH2anti-pCAMBIA121* をイネ品種日本晴カルスに導入し、T2 世代の種子を得ることに成功した。それぞれのラインを栽培し、葉から全 RNA を抽出して cDNA を作製した。それぞれ *OsBADH1* と *OsBADH2* 遺伝子の存在量をリアルタイム PCR 法により調べたところ、野生型に比べて 1/2-1/4 量に減少したラインを見つけることに成功した。しかし、*OsBADH1* と *OsBADH2* の塩基配列が相同であったため、両方の遺伝子が減少した傾向が見られた。これらの *BADH* 遺伝子ノックダウンイネは、通常条件下において正常な生育を示した。

## 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 7 件)

① Shiro Mitsuya, Katsutoshi Kozaki, Tetsuko Takabe Tissue localization of the glycine betaine biosynthetic enzymes in barley leaves. Plant

Production Science, 査読有, Vol. 16, 2013, pp. 117-122.

② Tomohito Hayashi, Tomofumi Yoshida, Kiyoshi Fujii, Shiro Mitsuya, Takako Tsuji, Yurie Okada, Eriko Hayashi, Akira Yamauchi Maintained root length density contributes to the waterlogging tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Field Crops Research, 査読有, 2013, 印刷中, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rccr.2013.03.020>

③ Saori Ogawa, Shiro Mitsuya S-methylmethionine is involved in the salinity tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants at germination and early growth stages. Physiologia Plantarum, 査読有, Vol. 144, 2012, pp. 13-19.

④ Koji Yamane, Shiro Mitsuya, Mitsutaka Taniguchi, Hiroshi Miyake Salt-induced chloroplast protrusion is the process of exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts into cytoplasm in leaves of rice. Plant Cell & Environment, 査読有, Vol. 35, 2012, pp. 1663-1671.

⑤ Shiro Mitsuya, Junko Kuwahara, Keiko Ozaki, Eiji Saeki, Takashi Fujiwara, Tetsuko Takabe Isolation and characterization of a novel peroxisomal choline monooxygenase in barley. Planta, 査読有, Vol. 234, 2011, pp. 1215-1226.

⑥ Takashi Fujiwara, Shiro Mitsuya, Hiroshi Miyake, Tasuku Hattori, Tetsuko Takabe Characterization of a novel glycinebetaine/proline transporter gene expressed in the mestome sheath and lateral root cap cells in barley. Planta, 査読有, Vol. 232, 2010, pp. 133-143.

⑦ 三屋史朗, 藤原崇志, 服部侑, 高倍鉄子 イネ科植物オオムギの耐塩性機構における巧みな適合溶質グリシンベタイン利用戦略. 化学と生物, 査読無, Vol. 48, 2010, pp. 478-484.

〔学会発表〕(計 16 件)

① 三屋史朗ら オオムギの葉におけるグリシンベタイン生合成酵素の組織内局在性. 第 235 回日本作物学会講演会, 2013 年 3 月. 川崎.

② Thiem Thi Tran et al. The responses of root system development, water uptake and dry matter production to the interactions between water deficit conditions and different levels of nitrogen in rice. 日本作物学会第 235 回講演会, 2013 年 3 月. 川崎.

③ Emi Kameoka et al. Genotypic variation in root hydraulic conductivity of rice in response to mild drought stress. 日本作物学会第 235 回講演会, 2013 年 3 月. 川崎.

④ 菊谷直子ら 摘心処理によるダイズ収量

増加の生理機構解明. 日本作物学会第 235 回講演会, 2013 年 3 月. 川崎.

⑤ 山内章ら Developmental and functional responses of rice root system to environment. 日本作物学会第 235 回講演会, 2013 年 3 月. 川崎.

⑥ 土屋明日美ら 耐塩性イネ科植物 *Leymus chinensis* におけるベタインアルデヒド脱水素酵素の機能および発現解析. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月. 京都.

⑦ 三屋史朗ら オオムギのペルオキシソームに局在するコリンモノオキシゲナーゼの機能解析. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月. 京都.

⑧ 光寄克敏ら 植物におけるグリシンベタイン合成酵素の細胞内および組織内局在性. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月. 京都.

⑨ 三屋史朗ら 耐塩性イネ科植物 *Leymus chinensis* におけるベタインアルデヒド脱水素酵素の機能解析. 第 233 回日本作物学会講演会, 2012 年 3 月. 東京.

⑩ 菅沼あずみら イネ種子根系における水吸収・輸送構造モデルの提案-アポプラスト構造ならびに構成細胞の水透過性-. 第 36 回根研究集会, 2012 年 6 月. 宮城.

⑪ 奥村陽子ら イネの収量形成における登熟期の根系機能の役割. 日本作物学会第 233 回講演会, 2012 年 3 月. 東京.

⑫ 亀岡笑ら 水欠乏条件下での根系内の深度別資源分配に関わる可塑性のイネ乾物生産における機能的意義. 日本作物学会第 233 回講演会, 2012 年 3 月. 東京.

⑬ 菅沼あずみら 異形側根に注目したイネ根系の水通導性. 日本作物学会第 233 回講演会, 2012 年 3 月. 東京.

⑭ 光寄克敏ら 塩生植物オカヒジキにおけるグリシンベタイン合成酵素の組織局在性に関する研究. 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月. 仙台.

⑮ Mitsuya S. et al. OsBADH1 is possibly involved in the oxidation of acetaldehyde in rice peroxisomes. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, 2010 年 7 月. スペインバレンシア

⑯ Kamisugi Y. et al. Characterisation of the PEX11 peroxisome membrane genes in *Physcomitrella patens*. The 13th annual moss international conference, 2010 年 7 月. 札幌.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三屋史朗 (MITSUYA SHIRO)  
名古屋大学・生命農学研究科・助教  
研究者番号：70432250

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：