

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770038

研究課題名(和文)植物の高次機能を制御する葉緑体型緊縮応答の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of plastid stringent response that regulates physiology of higher plants

研究代表者

増田 真二(Masuda, Shinji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：30373369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：緊縮応答はもともと細菌で発見、研究されてきた栄養環境応答システムであるが、近年緊縮応答に関連した遺伝子が高等植物のゲノムに保存されていることがわかってきた。本研究では、この植物型の緊縮応答が植物の示す様々な高次機能をどのように制御するかのかに関して研究を行った。

モデル植物シロイヌナズナを用いて緊縮応答関連遺伝子の一つを過剰にもしくは任意に発現を誘導するシロイヌナズナを複数ライン単離することに成功した。今後これら組換え植物体の詳細な解析を行うことで、葉緑体で機能する緊縮応答の生理的役割を明らかにできると期待される。

研究成果の概要(英文)：Stringent response is a global regulatory system in bacteria that responds to nutrient conditions. Recently, stringent response-related genes have been identified in plants, although physiological function of the genes are not clarified. In this study, we characterized genetically modified *Arabidopsis* in which stringent response-related genes are over-expressed. The results indicated that plant stringent response is function in chloroplasts that controls a wide variety of metabolic and gene expression processes.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード：緊縮応答 シロイヌナズナ ppGpp stringent response 葉緑体

1. 研究開始当初の背景

緊縮応答はもともと細菌で発見/研究されてきた環境応答機構であるが、近年真核生物からも見いだされ、生物普遍的な生体システムであることがわかってきた。約半世紀前に発見され、その後の研究により、細菌に普遍的に保存された生育にほぼ必須の環境適応機構であることがわかってきている。この環境応答を担う分子が、特殊な核酸分子グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) で、細菌が飢餓条件にさらされたような一時的に生育をストップさせなければいけない時に、その細胞内量が上昇する。大腸菌において ppGpp は RelA および SpoT と呼ばれる 2 つの酵素により、その細胞内存在量がコントロールされることがわかっている。RelA は ppGpp 合成のみを触媒し、SpoT は合成と分解の両方を触媒する。ppGpp は、RNA 合成酵素、翻訳因子、様々な代謝酵素に作用することでその活性を変化させることがわかっている。

近年植物から *relA/spoT* と相同性のある遺伝子が見つかり、それらは RSH と呼ばれている。このことより、植物において、細菌に見られる緊縮応答と類似のイベントが保存されていると考えられるが、その具体的な生理機能はほとんど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物シロイヌナズナを用いて、植物型緊縮応答の役割を明らかにすることを目標に研究を進めた。具体的には、様々な組換え植物体を遺伝学的に作出し、それらの表現型を調べ、植物型の緊縮応答が植物の示す様々な高次機能をどのように制御するかのかに関して研究を行った。

3. 研究の方法

シロイヌナズナには、4 つの RSH 遺伝子 (*RSH1*, *RSH2*, *RSH3*, *CRSH*) が見つかっている。これまでの研究で、4 つの RSH タンパク

質は、少なくとも葉緑体に局在することがわかっている。またこれら 4 つの RSH 遺伝子のうち、*RSH1* は大腸菌の *relA* もしくは *spoT* の変異を相補できないことから、ppGpp 合成活性を持たないと考えられている。実際、シロイヌナズナの RSH1 には、ppGpp 合成活性に必須と考えられている特定のアミノ酸 (RelA において) がいくつか欠損している。

RSH2 と RSH3 は相同性が高く、これらはシロイヌナズナにおけるパラログと考えられる。系統解析からもそのことが支持されている (Masuda 2011)。RSH2 と RSH3 の一次構造を見てみると、ppGpp 合成ドメインと ppGpp 分解ドメインの両方が保存されており、このことから、RSH2 と RSH3 は、ppGpp の合成 / 分解の両方を触媒すると考えられる。一方、CRSH は ppGpp 分解ドメインを持たず、ppGpp 合成ドメインのみを持つ。また CRSH は、C 末端にカルシウムを結合する EF Hand モチーフを持っており、その ppGpp 合成活性はカルシウムで正に制御されることが *in vitro* の実験により示されている (Tozawa 2005)。このことから、CRSH はカルシウム依存的に緊縮応答を誘導すると考えられる。葉緑体内のカルシウム濃度は外界の環境に依存してダイナミックにその存在量が変わることがわかっている。そのため、葉緑体で行われる緊縮応答は、CRSH を介してカルシウム濃度依存的に行われる可能性が考えられた。このカルシウム依存の葉緑体型緊縮応答は植物細胞に特異的なものと考えられた。

そこで本研究では、シロイヌナズナの 4 つの RSH の中でも特に、CRSH に焦点を絞り、植物に保存された緊縮応答の生理的役割を明らかにすべく研究を進めた。

4. 研究成果

まず、CRSH の発現を任意に誘導できる系の確立を進めた。具体的には、任意の時期に CRSH の発現を行うことのできるデキサメタ

ゾン誘導プロモータ下流 *CRSH* の cDNA をつなぎ、その組換え遺伝子を、アグロバクテリウムをもちいた系により野生型シロイヌナズナに導入した。何度かの継代を経て、導入遺伝子をホモに持つラインの確立に成功した。

次に、*CRSH* の発現を任意に抑制できる系の確立を進めた。具体的には、任意の時期に *CRSH* のノックダウンを行うことのできるデキサメタゾン誘導プロモータ下流 *CRSH* 遺伝子欠損 *amiRNA* をつなぎ、その組換え遺伝子を、アグロバクテリウムをもちいた系により野生型シロイヌナズナに導入した。何度かの継代を経て、導入遺伝子をホモに持つラインの確立に成功した。

今後得られた組換え植物体の詳細な解析を行うことで、*CRSH* を介した葉緑体型緊縮応答の機能を明らかにできると期待される。

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 3 件)

1. Masuda, S., Harada, J., Yokono, M., Yuzawa, Y., Shimojima, M., Murofushi, K., Tanaka, H., Masuda, H., Murakawa, M., Haraguchi, T., Kondo, M., Nishimura, M., Yuasa, H., Noguchi, M., Oh-oka, H., Tanaka, A., Tamiaki, H. and Ohta, H. (2011) A monogalactosyldiacylglycerol synthase found in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* reveals important roles for galactolipids in photosynthesis. *Plant Cell* 23: 2644-2658.

2. 増田真二 (2011) 光合成生物の緊縮応答 光合成研究 21, 106-111.

3. Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S.,

Kamiya, Y., Ohta, H. and Shirasu, K. (2013) Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATEDMYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 163: 291-304.

[学会発表](計 6 件)

1. 井原雄太、太田啓之、増田真二 [Quantification of a bacterial alarmone ppGpp, accumulated in Arabidopsis thaliana, by using LC-ESI-MS/MS] 第 54 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 19 日、富山大学

2. 朴木里奈, 前川未来翔, 及川彰, 斉藤和季, 太田啓之, 増田真二 [シロイヌナズナにおける RelA/SpoT ホモログ RSH を介した代謝制御] 第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 22 日、京都産業大学

3. 佐藤諒一, 高市真一, 太田啓之, 増田真二 [非光化学消光 (NPQ) に関与する遺伝子 *LAP1* の機能解析] 第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 22 日、京都産業大学

4. 佐藤諒一, 高市真一, 太田啓之, 増田真二 「非光化学消光 (NPQ) に関与する遺伝子 *LAP1* の機能解析」第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学

5. 松井彩, 井原雄太, 前川未来翔, 戸澤譲, 太田啓之, 増田真二、「緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いた緊縮応答因子 RSH タンパク質の機能解析」第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学

6. 朴木里奈, 前川未来翔, 水澤一樹, 太田

啓之, 増田真二, 「ReIA/ SpoT ホモログ RSH
のシロイヌナズナにおける葉緑体機能制御
機構の解析」第 53 回日本植物生理学会年会、
2012 年 3 月 16 日、京都産業大学

〔図書〕(計 1 件)

Masuda, S., 「Advances in Photosynthesis」
(2011) INTECH, ISBN 978- 953- 307- 928- 8
(total 13 pages).

〔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

増田 真二 (MASUDA SHINJI)

研究者番号 : 30373369

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合セ

ンター・准教授

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :