

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440147

研究課題名(和文) 生物ストレスに応答したプリン分解の活性化：生理シグナル生成系としての役割検証

研究課題名(英文) Biotic stress-responsive activation of purine catabolism: a possible role in generating physiological signals

研究代表者

坂本 敦 (Sakamoto, Atsushi)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：60270477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：病害や傷害などの生物ストレスに対する初期応答として観察されるプリン分解の活性化について、その植物生理学的意義をこの代謝系と密接に関わる2種類の本質的に異なる生理活性分子、活性酸素及びジャスモン酸(JA)の作用を足掛かりに調査した。シロイヌナズナの逆遺伝学的解析から、活性酸素を生成するプリン分解の初発酵素・キサンチン脱水素酵素が、幅広い病原性微生物に対する抵抗性に関わる可能性が示された。また、プリン分解の主要な代謝中間体であるアラントインが、アブシシン酸を介してJA生成を亢進し、その信号伝達系を活性化することで、この植物ホルモンが制御する病害及び傷害応答に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The possible significance of biotic stress-responsive activation of purine catabolism was examined by focusing on two different groups of physiologically active molecules, reactive oxygen species (ROS) that are generated during the catabolic processes, and the phytohormones jasmonates whose levels were recently shown to be enhanced by the accumulation of allantoin, a major stress-induced purine intermediary metabolite. Reverse-genetic studies using the model plant *Arabidopsis thaliana* suggested that xanthine dehydrogenase, the first enzyme participating in the purine degradation pathway also known as ROS-generating enzyme, is involved in defense against a board range of microbial pathogens. Such studies also revealed that allantoin can activate jasmonate-mediated defense responses in an abscisic acid-dependent manner through the action of MYC2, a master transcriptional regulator in jasmonate signaling.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：活性酸素 植物ホルモン アブシシン酸 ジャスモン酸 アラントイン キサンチン脱水素酵素 病害
応答 傷害応答

1. 研究開始当初の背景

植物における核酸塩基の代謝、特に窒素含量が格段に高いプリン環の酸化的分解は、外部環境で枯渇しがちな窒素栄養の体内リサイクルを保障するハウスキーピング代謝と理解されている。それは、この分解系が初発基質キサンチンから尿酸、アラントインなどのウレイド化合物を経て、最終的に窒素同化基質であるアンモニアを 4 モル当量生じるからである。しかし、プリン分解はさまざまなストレスで活性化され、生理シグナルとしても重要な活性酸素 (ROS) を派生する。このため、環境応答やストレス適応におけるプリン分解の関与が示唆されてきた。その一例が、生物ストレスに対する潜在的役割である。

主として 1990 年代に行われた植物病理学的研究から、病原菌の初期感染過程でイネ科やマメ科の作物では、プリン環分解の初発反応を担うキサンチン脱水素酵素 (XDH) の活性が上昇すること、また、XDH の反応阻害によってこれらの作物の感染応答が抑制されることが報告された。XDH はキサンチンや NADH を酸化し O_2^- の生成も触媒する (このためキサンチン酸化還元酵素とも呼ばれる)。このため、これらの観察事象は宿主植物の初期防御応答である酸化バーストとの関連で特に興味を惹いたが、今世紀に入りこのような過敏感反応の誘導を担う膜結合型の O_2^- 生成 NAD(P)H 酸化酵素が同定されたこともあり、 O_2^- 生成酵素としての XDH への関心は失われたようである。しかし、その後も XDH がこれまでに考えられてきた以上に強力な O_2^- 産生能を持つことや、タバコ葉におけるウイルス増殖が XDH 阻害によって顕著に亢進することなどが報告されている。このように、XDH による ROS 生成を基軸として、プリン分解と生物ストレス応答の密接な関連を窺わせる報告は依然なされているが、両者の因果関係は未解明のままであった。

一方、研究代表者は「代謝の多面的な生理機能」が植物の成長生存戦略に果たす役割に注目し、そのモデルとしてプリン分解系を研究してきた。これまでに、窒素代謝と認識されてきたプリン分解が、乾燥や浸透圧ストレスへの適応にも関わることを明らかにし、ストレス誘導的に蓄積するプリン分解の中間体であるアラントインが、アブシシン酸 (ABA) 生成系を活性化することを見出した。そこで、アラントインの生理作用に焦点を絞り、ストレス適応におけるプリン分解の関与についてさらに解析を進めたところ、この代謝中間体が、病害や傷害に対する防御応答を担うジャスモン酸 (JA) の内生レベルを亢進し、JA に対する遺伝子応答を活性化することを見出した。ABA と JA はともにストレスホルモンとして知られ、それらのシグナル伝達系は複雑にクロストークしながら乾燥や凍結、病傷害などに対する植物応答を制御すると考えられている。アラントインが、多様な環境ストレスと密接に関わる両ホルモンの内生レベルや遺伝子応答を亢進するという研究結果は、それが植物のストレス応答を活

性化する新奇なシグナル様低分子化合物である可能性を提起するものといえる。

以上の既報研究や研究代表者の研究成果を踏まえて、プリン分解系が ROS やアラントインの生成を介して、生物ストレスに対する適応応答の活性化に関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、古くから示唆されてきたにも関わらず、これまで実証的な研究が為されてこなかった「プリン分解過程で生じる ROS の潜在的な生理作用」と、研究代表者が最近見出した「プリン代謝中間体アラントインによる JA 応答の活性化作用」という、全く異なる 2 つの視点から、長らく看過されてきた生物ストレスによるプリン分解活性化の植物生理学的意義を問い、ストレス応答を誘導あるいは活性化する生理活性分子の生成系としてのプリン分解系の役割を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ROS 生成系としての生理機能の検証

XDH の遺伝子破壊や RNA 干渉 (RNAi) によるプリン分解由来の ROS 生成の抑制が、病原性微生物に対するシロイヌナズナの抵抗性発現にどのような影響を与えるのかについて、活物寄生菌 [*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000] および殺生菌 [*Botrytis cinerea*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) EC1] の接種に対する感受性を指標に調査した。

(2) JA シグナル活性化系としての生理機能の解明

アラントインが JA を介してどのような生物ストレス応答に関与するのかを明らかにするために、分解酵素アラントイナーゼの遺伝子破壊によりアラントインを蓄積する変異株 (*aln-1* 株) について、JA に関連する表現型や傷害応答、また上記の病原性微生物に対する病害応答を調査した。また、JA とともにストレス応答や適応に密接に関わる ABA が、アラントインによる JA 応答の活性化機構においてどのように関わっているのかを、JA や ABA の生成やシグナル伝達に欠陥を持つ変異株を用いて分子遺伝学的に解析した。

4. 研究成果

(1) ROS 生成系としての生理機能の検証

プリン分解の ROS 生成系としての潜在的な生理機能に着眼し、逆遺伝学的手法を用いて生物ストレス耐性の観点から ROS 生成酵素 XDH の役割検証を行った。シロイヌナズナのゲノムには 2 つの XDH パラログ (*AtXDH1*, *AtXDH2*) が存在する。そこで研究開始当初は、両遺伝子を標的とする RNAi 株を用いて、5~6 週齢葉に対して病害性微生物の接種実験を行った。その結果、XDH の発現抑制は、*Pst* DC3000 や *B. cinerea* の感染に対して病斑を有

意に拡大させ、シロイヌナズナの病原抵抗性を低下させることが示唆された。しかし、野生株と比較して RNAi 株は加齢に伴い成長が脆弱となり老化も早く進行することから、観察された病斑拡大が実際に病原抵抗性の低下によるものか、或いは成長生理の変異がもたらした二次的影響によるものかを明確に判別する必要があると考えられた。

シロイヌナズナの2つの XDH パラログのうち、*AtXDH1* の発現はストレス誘導的で mRNA レベルも高いが、*AtXDH2* は極めて低レベルで構成的に発現している。そこで、ストレス応答型である *AtXDH1* の遺伝子破壊株 (*Atxdh1* 株) について、成長生理にかかる変異表現型が観察されない2週齢個体を用いて、その病原抵抗性を flood inoculation 法により評価した。葉内増殖菌数や病斑サイズを野生株と比較した結果、*Atxdh1* 株では *Pst* DC3000 や *Pcc* EC1 に対する病害抵抗性が有意に低下していることが明らかとなった。また、定量逆転写 PCR 解析から、野生株では *Pst* DC3000 の接種にตอบสนองして、*AtXDH1* の転写産物レベルが顕著に上昇することが示された。

以上の結果から、XDH がシロイヌナズナの病原抵抗性に実質的に関与し、それには XDH が生成する ROS が重要な役割を担うことが示唆された。最近、メリーランド大学の Xiano の研究グループにより、*AtXDH1* がウドンコ病に対する抵抗性発現に貢献していることが示された (Ma *et al.*, 2016)。この報告と本研究の成果を併せて考えると、シロイヌナズナにおいて XDH、特に *AtXDH1* は、活物寄生菌と殺生菌の両者を含む幅広い病原性微生物に対する抵抗性の発現に関与する新奇な病害抵抗性因子であることが推定された。

(2) JA シグナル活性化系としての生理機能の解明

先行研究として、アラントインを蓄積する *aln-1* 株のマイクロアレイ解析から、このプリン分解中間体が ABA 応答のみならず、JA 応答も活性化する可能性を見出していた。さらに、*aln-1* 株では通常生育条件下でも JA や活性型 JA (JA-Ile) の内生レベルが上昇していることを明らかにしていた。そこで、JA 応答に焦点を絞って *aln-1* 株の発現プロファイルを精査したところ、そのトランスクリプトームが JA 応答を制御するマスター転写因子である MYC2 の影響を強く受けていることが示唆された。これについて確証を得るため、MYC2 および MYC2 の標的遺伝子群について定量逆転写 PCR を実施し、実際にこれらの遺伝子の発現レベルが *aln-1* 株では亢進していることを確認した。次いで、*aln-1* 株に観察される JA 応答遺伝子の活性化が生理レベルにまで反映されているかどうかを調査した。その結果、MYC2 が正に制御することが知られている生理現象 (アントシアニン蓄積、傷害応答) が亢進していたのに対し、負に制御する現象 (主根伸長、*Pst* DC3000 および *Pcc* EC1 に対する病害抵抗性) が抑制されていることが示された。以上の

結果から、アラントインによる JA 応答の活性化には、JA シグナルの主要制御因子である MYC2 が介在することが明らかとなった。

アラントインが MYC2 依存的に JA 応答を活性化する分子機構を明らかにするために、野生株、JA-Ile 欠損変異株 (*jar1-1* 株) および MYC2 欠損変異株 (*myc2-3* 株) に外因性のアラントインを与え、JA 応答遺伝子の発現が増大するかどうかを調べた。その結果、野生株ではアラントイン処理により MYC2 を含む複数の代表的な JA 応答遺伝子が活性化されたが、*myc2-3* 株や *jar1-1* 株ではそれらの発現に変化は見られなかった。この結果を遺伝学的に確かめるために、*jar1-1* 株に *aln-1* 変異を導入した二重変異株を作出し、内因的に蓄積させたアラントインに対する JA 応答遺伝子の発現応答を調べた。その結果、*aln-1* 株で観察された JA 応答遺伝子の発現上昇は、この二重変異株においては消失した。以上の結果から、アラントインは MYC2 に制御された既知の JA シグナル伝達系を通じて JA 応答を活性化させることが生理学的および遺伝学的に示された。アラントインに代えて、その直下の代謝産物で構造が類似したアラントイン酸を野生株に与えても、JA 応答遺伝子の発現は上昇しなかったことから、おそらくプリン分解産物のなかでもアラントインが特異的に JA 応答を活性化する作用を持つことが示された。

MYC2 はもともと乾燥にตอบสนองした ABA シグナルの伝達因子として同定された経緯を鑑み、アラントインによる JA 応答の活性化に ABA が関与するか否かを検証した。まず、ABA 欠損変異株 (*aba2-1* 株および *bglu18* 株) にアラントインを投与し、JA 応答遺伝子が活性化されるかどうか調べたところ、その発現量に変化は見られなかった。この結果の遺伝学的確証を得るために、*bglu18* 株に *aln-1* 変異を導入した二重変異株を作出し、内因的に蓄積させたアラントインに対する JA 応答遺伝子の発現応答を調べたが、この二重変異株においてもその活性化は観察されなかった。以上の結果から、アラントインによる JA 応答の活性化には ABA が必要であり、ABA と JA のクロストークを介して MYC2 が重要な役割を担うことが示された。近年の研究で、ABA は非生物ストレスのみならず生物ストレスへの応答の制御にも関わる報告が相次いでなされているが、本研究で得られた結果はそれらの報告・知見と矛盾せず、プリン分解系が ABA-JA 間のクロストークを介して生物ストレス応答に関わることを示唆している。

(3) 研究成果の総括

プリン分解に関わる酸化還元酵素 XDH の ROS 生成能や、植物ホルモン応答を活性化する分解中間体アラントインの作用に着目し、この窒素代謝系が病害や傷害に対する防御機構に代表される生物ストレス応答に関わる可能性を、シロイヌナズナにおいて具体的に示すことができた。今後の課題として、病害応答において XDH 由来の ROS が介在すると考

えられる正の調節と、アラントインが活性化する ABA-JA-MYC2 経路による負の調節という相反する現象が、どのように統合的に制御された結果、プリン分解系が生物ストレス応答に貢献しているのかを明らかにする必要がある。また、今後の研究の進展により、ハウスキーピング代謝によるストレス応答の制御メカニズムや、新奇な生理活性メタボライトにかかる有用な知見が集積されることが期待される。

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) **Takagi H, Ishiga Y, Watanabe S, Konishi T, Egusa M, Akiyoshi N, Matsuura T, Mori IC, Hirayama T, Kaminaka H, Shimada H, Sakamoto A.** (2016) Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* **67**: 2519–2532. DOI: 10.1093/jxb/erw071 (査読有, SCI 論文被引用回数 4)
- (2) **Watanabe S, Matsumoto M, Hakomori Y, Takagi H, Shimada H, Sakamoto A.** (2014) The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell & Environment* **37**: 1022–1036. DOI: 10.1111/pce.12218 (査読有, SCI 論文被引用回数 20)
- (3) **Watanabe S, Kounosu Y, Shimada H, Sakamoto A.** (2014) Arabidopsis *xanthine dehydrogenase* mutants defective in purine degradation show a compromised protective response to drought and oxidative stress. *Plant Biotechnology* **31**: 173–178. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.14.0117a (査読有, SCI 論文被引用回数 4)

[学会発表] (計 14 件)

- (1) **Takagi H, Ishiga Y, Egusa M, Shimada H, Kaminaka H, Sakamoto A.** Arabidopsis xanthine dehydrogenase I is involved in resistance to a broad range of microbial pathogen. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日～18 日, 鹿児島大学・群元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)
- (2) **Han Y, Kinoshita D, Watanabe S, Takagi H, Shimada H, Sakamoto A.** Possible involvement of ER dynamics in stress-induced ABA production in Arabidopsis leaves. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日～18 日, 鹿児島大学・群元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)
- (3) **Tanaka S, Han Y, Watanabe S, Takagi H, Shimada H, Sakamoto A.** Allantoin stimulates heat-responsive gene expression

and improves heat shock tolerance in Arabidopsis. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日～18 日, 鹿児島大学・群元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

- (4) **Han Y, Watanabe S, Kinoshita D, Takagi H, Shimada H, Sakamoto A.** Possible involvement of endoplasmic reticulum dynamics in activation of ABA-glucoside hydrolysis in Arabidopsis in response to abiotic stress. 第 51 回植物化学調節学会, 2016 年 10 月 29 日～30 日, 高知大学・物部キャンパス (高知県・南国市)
- (5) **Takagi H, Watanabe S, Tanaka S, Shimada H, Sakamoto A.** Purine catabolism impacts on plant growth and efficient nitrogen utilization in Arabidopsis. *Plant Biology* 2016, July 9–13, 2016, Austin (USA)
- (6) **Takagi H, Watanabe S, Tanaka S, Shimada H, Sakamoto A.** The possible contribution of purine catabolism to nitrogen recycling and remobilization in Arabidopsis. 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日～20 日, 岩手大学・上田キャンパス (岩手県・盛岡市)
- (7) **Han Y, Watanabe S, Kinoshita D, Takagi H, Shimada H, Sakamoto A.** Cellular biological analysis of stress-induced abscisic acid production in the endoplasmic reticulum. 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日～20 日, 岩手大学・上田キャンパス(岩手県・盛岡市)
- (8) **Tanaka S, Watanabe S, Takagi H, Han Y, Shimada H, Sakamoto A.** Impact of allantoin accumulation on heat shock tolerance in Arabidopsis. 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日～20 日, 岩手大学・上田キャンパス(岩手県・盛岡市)
- (9) **Takagi H, Ishiga Y, Egusa M, Watanabe S, Konishi T, Akiyoshi N, Matsuura T, Mori IC, Hirayama T, Kaminaka H, Shimada H, Sakamoto A.** The purine metabolite allantoin can activate the MYC2-modulated JA- signaling pathway in an ABA-dependent manner. *Plant Biology* 2015, July 26–30, 2015, Minneapolis (USA)
- (10) **Watanabe S, Kinoshita D, Han Y, Shimada H, Sakamoto A.** Possible role of purine metabolites in stress signaling pathways in Arabidopsis. 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16 日～18 日, 東京農業大学・世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)
- (11) **Takagi H, Watanabe S, Tanaka S, Shimada H, Sakamoto A.** Reverse-genetic approach to elucidate the role of purine catabolism in nitrogen recycling and remobilization in Arabidopsis. 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16 日～18

日, 東京農業大学・世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)

- (12) **渡邊俊介, 韓 邑平, 木下大地, 坂本敦**. シロイヌナズナのストレス適応におけるプリン分解代謝シグナルの検証. 科研費補助金・新学術領域研究「大地環境変動に対する植物の生存・成長突破力の分子的統合解析」第5回若手の会, 2014年11月5日~7日, レイクフォレストリゾート(京都府・南山城村)
- (13) **高木 紘, 渡邊俊介, 田中翔馬, 島田裕士, 坂本 敦**. ウレイド分解・輸送系の機能破壊がシロイヌナズナの成長に与える影響の解析. 科研費補助金・新学術領域研究「大地環境変動に対する植物の生存・成長突破力の分子的統合解析」第5回若手の会, 2014年11月5日~7日, レイクフォレストリゾート(京都府・南山城村)
- (14) **渡邊俊介, 木下大地, 島田裕士, 坂本敦**. 代謝シグナルとしてのアラントインの検証とその利用によるストレス耐性の改変. 第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会・シンポジウム. 2014年8月21日, アイーナ/いわて県民情報交流センター(岩手県・盛岡市)

[その他]

- (1) ホームページ等
<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/mpb/index.php>
- (2) 受賞
乾燥地科学共同研究発表賞(鳥取大学乾燥地研究センター, 2014年12月7日)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
坂本 敦 (SAKAMOTO ATSUSHI)
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 60270477
- (2) 連携研究者
上中 弘典 (KAMINAKA HIRONORI)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号: 40397849