

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450503

研究課題名(和文)12-オキソフィトジエン酸が関わるレトログレードシグナルの解明

研究課題名(英文)Analysis of retrograde signal via 12-oxo-phytodienoic acid

研究代表者

藪田 行哲 (Yabuta, Yukinori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00379562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではシロイヌナズナApx2とHsfA2の強光応答における12-オキソフィトジエン酸(OPDA)の関与について調べるため、OPDAを合成できないfad3/fad7/fad8変異株を用いて解析した。その結果、強光照射1時間後のApx2およびHsfA2の転写レベルは野生株と比較して差は認められなかったことから、1時間以内の誘導にはOPDAは関与していない事が示唆された。また、RNA-seq解析により野生株と比較してfad3/fad7/fad8で発現が1/2以下に減少していた遺伝子は239あり、これらの遺伝子の強光による発現誘導はOPDAを含むオキシリピン類により制御されている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the involvement of 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) in the regulation of Apx2 and HsfA2 expression under high light in Arabidopsis, I analyzed using fad3/fad7/fad8 mutants which can not synthesis OPDA. However, there was no significant difference in the transcript level of Apx2 and HsfA2 between the wild-type plants and fad3/fad7/fad8 mutants at 1 h after high light irradiation, suggesting that OPDA was not involved in these induction within 1 hour. RNA-seq analysis showed that the transcript levels of 239 genes were decreased (<2-fold) in the fad3/fad7/fad8 mutants compared with the wild-type plants. This finding suggests that the high light inducible expression of these genes was regulated by oxilipin containing OPDA.

研究分野：植物生理学

キーワード：12-オキソフィトジエン酸 オキシリピン レトログレードシグナル レドックス 熱ショック転写因子

1. 研究開始当初の背景

光は植物の生存のため必要不可欠であるが、植物の光合成能では消費しきれない光エネルギーは活性酸素種 (ROS) の生成を増大させ、それによる酸化傷害を引き起こす (光酸化ストレスと呼ぶ)。そのため植物は光環境の変化を敏感に検知し、種々の遺伝子の発現を変化させ環境に应答・適応している。この遺伝子発現の制御には光合成電子伝達系のレドックス状態やプラスチド遺伝子の発現状況、ROS レベルやクロロフィル前駆体などが関与し、これらの変化がシグナルとなり、核へと伝えられる。このような“オルガネラから核”へのシグナルはレトログレードシグナル (逆行性シグナル) と呼ばれる。そのメカニズムはストレスなどにより生成した ROS やクロロフィル前駆体などが GUN1 などの種々のタンパク質によって認知され、シグナルとして伝達されることが提唱されている (図 1)。

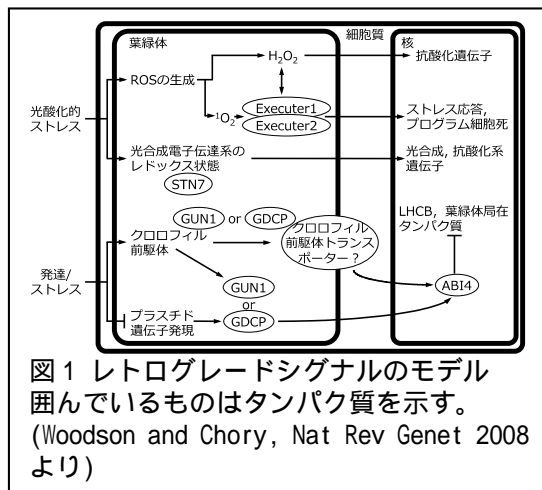


図 1 レトログレードシグナルのモデル 困んでいるものはタンパク質を示す。(Woodson and Chory, Nat Rev Genet 2008 より)

しかしながら、どのような低分子化合物がシグナルとして機能しているのか？また、そのシグナルがどのような分子機構により認知・伝達されているのか？など不明な点が多く残されている。

申請者はこれまでに植物の ROS 消去系の鍵酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (Apx) の光酸化ストレス応答は、ストレス初期には光合成電子伝達系のレドックス状態が、引き続くストレスにより上昇した細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> レベルがシグナルとなっている事を明らかにした (*Plant Cell Physiol.*, 2004)。また、シロイヌナズナを用いた解析により Apx2 は熱ショック転写因子 A2 (HsfA2) により制御されており (*Plant J.*, 2006; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2009)、HsfA2 の発現は Hsp90 活性と変性タンパク質の蓄積レベルにより制御されていることを報告した (*Plant Cell Physiol.*, 2010)。さらに、HsfA2 の発現は HsfA1d により制御されていることを明らかにし、Apx2 を含めた多くの光酸化ストレス応答遺伝子の発現は ROS によるプロテアソーム活性の阻害により変性タン

パク質が蓄積し、それらの修復のため HsfA1d と結合していた Hsp90 が解離し、フリーとなった HsfA1d が HsfA2 の誘導を介していることを報告した (図 2; *Plant Cell Physiol.*, 2011)。

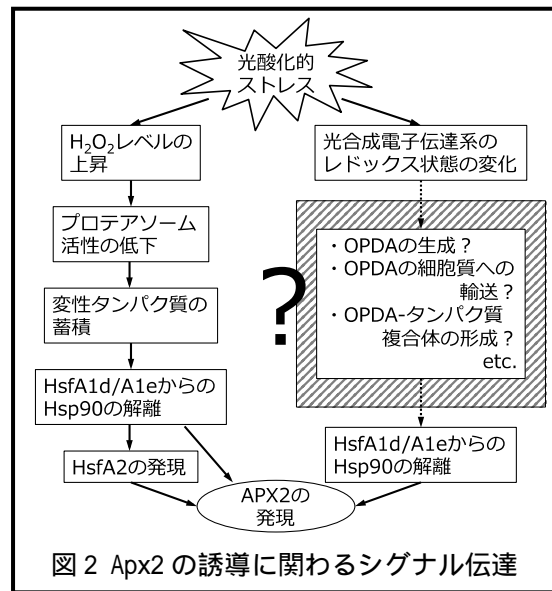


図 2 Apx2 の誘導に関わるシグナル伝達

一方、光合成電子伝達系のレドックス変化を介した Apx2 の発現は HsfA1d が直接制御している事が報告された (Ramel et al., 2012, PNAS)。しかしながら、どのような化合物が光合成電子伝達系のレドックス変化により生成するのか、その化合物がどのように HsfA1d と Hsp90 の解離に関与しているか不明である。ところで、葉緑体で合成される 12-オキソフィトジエン酸 (OPDA) がシクロフィリン 20-3 (CYP20-3) と呼ばれるタンパク質への結合を介して病原体感染応答のレトログレードシグナル伝達に関与することが最近報告された (Park et al., 2013, PNAS)。一方で非常に興味深い事に、申請者は公的データベースより HsfA1d の標的である HsfA2 および Apx2 の発現は OPDA 処理により誘導を受ける事を見出した。しかし、CYP20-3 は葉緑体に局在するため、CYP20-3 と HsfA1d あるいは Hsp90 と相互作用している事は考えにくい。以上の事実は OPDA が関わる未知のメカニズム (図 2 右) が HsfA2 および Apx2 の誘導に関わっていることが推測された。

2. 研究の目的

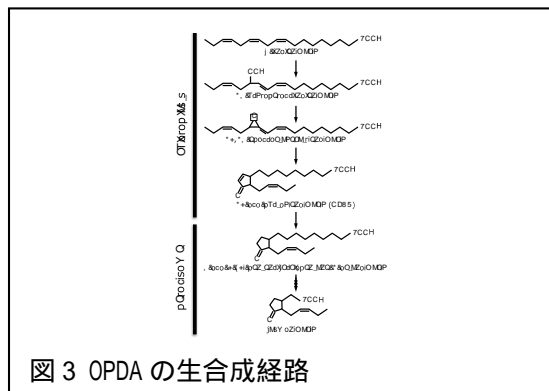
本研究では詳細な分子機構が不明である光合成電子伝達系のレドックス変化による HsfA2 および Apx2 の発現調節に関わる分子機構を明らかにすることを目的に、本制御機構への OPDA の関与について検討する。

3. 研究の方法

まず、HsfA2 および Apx2 の OPDA に対する応答に HsfA1d/A1e が関わっているかを

確認するために、HsfA1d/A1e 遺伝子破壊株 (KO-HsfA1d/A1e) を用いて解析した。

つぎに OPDA はトリエン脂肪酸から合成されるため (図 3)、トリエン脂肪酸合成能を欠く *fad3-2fad7-1fad8-1* 変異株 (*fad3/7/8*) を用い、Apx2、HsfA2 の遺伝子の強光応答を解析した。

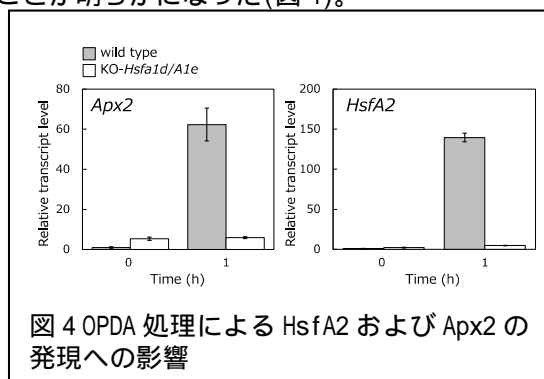


光酸化ストレス下における OPDA を含めた / 不飽和カルボニルの定量はジニトロフェニルヒドラジン誘導体化し、HPLC により分析を試みた。

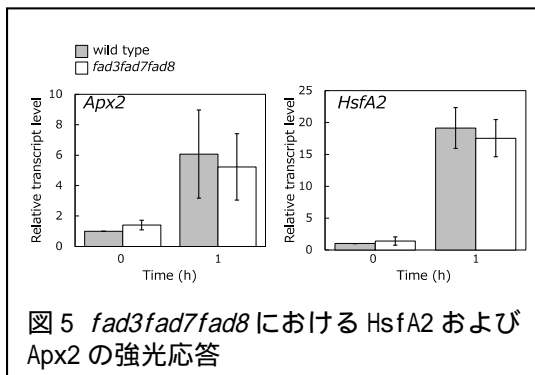
また OPDA を含むオキシリピン類を介した強光応答に関わるシグナル伝達機構について調べるため、強光 ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 1 時間照射したシロイヌナズナ野生株と *fad3/7/8* を用い、RNA-seq 解析を行った。

#### 4. 研究成果

3 週齢の野生株と KO-HsfA1d/A1e に 1 時間  $20 \mu\text{M}$  OPDA 処理を行ったところ、野生株において Apx2 および HsfA2 の発現が誘導されたが、KO-HsfA1d/A1e ではそれらの誘導は顕著に抑制されていた。このことから OPDA による Apx2 および HsfA2 の発現の誘導は HsfA1d および HsfA1e が関わっていることが明らかになった (図 4)。



つぎに *fad3/7/8* における Apx2 および HsfA2 発現の強光応答 ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 時間) を野生株と比較したが、顕著な差は認められなかった (図 5)。このことから Apx2 および HsfA2 の 1 時間以内の強光応答には OPDA は関与していないことが示唆された。



そこで、OPDA を含むオキシリピン類を介した強光応答に関わるシグナル伝達機構について調べるため、強光条件下で野生株と *fad3/7/8* で発現レベルに差がある遺伝子を RNA-seq 解析により検索した。その結果、野生株と比較して *fad3fad7fad8* で発現が 1/2 以下に減少していた遺伝子は 239、2 倍以上上昇していた遺伝子は 153 あった。

*fad3fad7fad8* で減少していた遺伝子は強光条件下で生成されるオキシリピン類により発現が制御されていると考え、これらの遺伝子に着目したところ、オキシリピン類である植物ホルモンのジャスモン酸 (JA) により制御を受けることが知られている JRG21、VSP1、RAP2.6、PDF1.2 などが含まれていた。そこで JRG21、VSP1、RAP2.6、PDF1.2 のオキシリピン応答性およびそのシグナル伝達機構について解析した。

3 週齢の野生株に 1 時間の JA 処理を行ったところ、VSP1 および PDF1.2 の転写レベルの誘導が認められ、オキシリピン類である 2-ヘキサナール (2-Hex) によっても誘導を受けた。JRG21 の転写レベルは JA および 2-Hex 処理により大きく変化しなかった。RAP2.6 の転写レベルは JA および 2-Hex 処理により低下した。

TGA2、TGA5、TGA6 は OPDA を介した遺伝子発現制御に関わるロイシンジッパー型転写因子である。そこで 2-Hex 処理による VSP1 および PDF1.2 もまたこれらの転写因子により発現制御を受けているかを解析するために *tga2/5/6* 変異体を用いて解析した。その結果、両遺伝子の転写レベルの 2-Hex による誘導は抑制された。以上のことから VSP1 および PDF1.2 は 2-Hex による誘導には TGA2/5/6 が関与している事が明らかとなった。一方で、今回用いた処理条件では 2-Hex もしくは JA による Apx2 および HsfA2 の発現の誘導は認められなかった。

また OPDA や 2-Hex などの / 不飽和カルボニルを含むオキシリピン類の定量を行ったが、OPDA については検出することができず、2-Hex は強光ストレスによる顕著な増加は認められなかった。

-カロテンの酸化生成物である -シクロシト랄 ( -CC) は強光下で生成し、レトログレードシグナルの伝達に機能して

いることが報告された (Ramel et al., 2012)。興味深いことに -CC もまた / 不飽和結合を持つけれども、カロテノイドに由来するためオキシリピン類ではないことから、 / 不飽和結合が Apx2 および HsfA2 の誘導に関わっているのか、もしくは分子の構造に関わっているのかを調べることができると考えた。そこで、Apx2 および HsfA2 の -CC 応答を調べたところ、どちらの遺伝子の発現も誘導された。興味深いことに KO-HsfA1d/A1e において Apx2 の -CC による発現の誘導は抑制されていたが、Apx2 は野生株と比較して顕著な差は認められなかった。

#### 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 1 件)

Yabuta, Y. Functions of heat shock transcription factors involved in response to photooxidative stresses in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 80, (2016) 1254-1263

〔学会発表〕(計 7 件)

藪田行哲、佐々木悠、重岡成、渡邊文雄、シロイヌナズナ HsfA1d/A1e を介した -シクロシト랄による遺伝子発現制御機構の解明、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

藪田行哲、稲田陽子、石川孝博、渡邊文雄、重岡成、シロイヌナズナの強光応答遺伝子の発現に及ぼすオキシリピン類の影響、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートピアアイランド(兵庫県神戸市)

藪田行哲、佐々木悠、渡邊文雄、重岡成、シロイヌナズナにおける -シクロシト랄による遺伝子発現制御機構の解明、ユーグレナ研究会第 31 回研究集会、2015 年 11 月 7 日、Kiten ビル コンベンションホール(宮崎県宮崎市)

藪田行哲、植物における光酸化的ストレス応答のシグナル伝達に関する研究、日本農芸化学会中四国支部 支部創立 15 周年記念第 42 回講演会(2015 年度農芸化学奨励賞受賞講演)、2015 年 6 月 13 日、鳥取大学鳥取キャンパス(鳥取県鳥取市)

藪田行哲・野口淳・佐々木悠・石川孝博・重岡成・渡邊文雄、強光応答遺伝子の発現に及ぼす 12-オキソフィトジエン酸の影響、日本農芸化学会 2015

年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

藪田行哲、植物における光酸化的ストレス応答のシグナル伝達に関する研究、日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年度農芸化学奨励賞受賞講演)、2015 年 3 月 26 日、ホテルグランピア岡山(岡山県岡山市)

佐々木悠、藪田行哲、渡邊文雄、重岡成、植物特異的クラス C 熱ショック転写因子の機能解析、第 5 回日本光合成学会年会、2014 年 5 月 30 日、近畿大学農学部奈良キャンパス(奈良県奈良市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藪田 行哲 (YABUTA Yukinori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00379562