

1. 研究課題名：高等植物は外からの刺激を如何に認識し、情報を伝達し、応答するか。
2. 研究機関：農林水産省農業生物資源研究所分子遺伝部遺伝子発現研究室
(skikuchi@abr.affrc.go.jp)
3. 研究者：菊池尚志、柴田百合子
4. 研究協力者：永田俊文（科学技術振興事業団長崎研究室派遣研究員）
5. 研究期間：平成7年度～平成11年度

6. 要約

高等植物の環境ストレス応答機構を分子レベルで、解明するためにシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を材料とし、外的ストレスとして 線、UV照射の実験系を構築し、照射に伴う種々の応答反応を生理学的に解析した。この結果、アントシアニンの蓄積(1)、活性酸素消去能の蓄積(1)、成葉での毛状突起(trichome)の増加(2)、エチレンの発生(1)、根の表皮、皮層細胞の膨潤(1)、根毛の伸長(1)、根の伸長性の異常(屈曲)(3)(1: 線、UV共に誘導される反応、2: 線のみで誘導される反応、3: UVのみで誘導される反応)を見いだした。アンチオキシダントを用いた実験、あるいは活性酸素発生剤を用いた実験から、これらの反応が 線・UV照射時に細胞内で発生する活性酸素を介した反応であることを確認した。さらに細胞内シグナル伝達系に関して解析を行った結果、照射に伴ってプロテインキナーゼとしての反応性を持つ NDPK(Nucleoside Diphosphate Kinase) 活性が細胞質画分から膜画分に移行することを見いだした。酵母ツーハイブリッドシステムを用いて NDPK と相互作用する遺伝子群もいくつか見いだしている。以上のことから、高等植物は活性酸素をシグナル伝達因子として利用するストレス応答系を保持し、生体内で活性酸素レベルが異常に上昇した際に、そのダメージから自己防衛するための応答系を誘導する際に用いていることが明らかとなった。

7. 研究目的

生物は環境からの種々の刺激を受け、ある時は情報として発生分化プログラムに役立て、ある時はストレスとしてそれに対抗する自己防衛反応を誘導する。前者の典型的な例が、日長の変化に伴う、栄養成長から生殖成長への変化であり、後者は病害細菌の感染、土壌中の栄養素の変化、有害化学物質との接触に伴う生体防御応答である。我々は後者のストレス認識、応答、自己防衛反応誘導のメカニズムを生理学、分子生物学的に明らかにし、その結果を植物バイオテクノロジーとして応用するために、モデル植物として有名なシロイヌナズナを材料とし、線、UV照射を外的ストレスとして、自然界にはあり得ないか、非常にユニークな応答反応を誘導する 線照射、そしてオゾン層の破壊等で環境問題となっているUV照射の実験系を構築した。植物が 線、UV照射をどのように認識し、どういったシステムで細胞核に情報を伝達し、核でどういった遺伝子発現が誘導され、自己防衛反応が誘導されるかを、解析した。

8. 材料と方法

(1) 野生株および突然変異体とその栽培方法

実験材料としてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用い、野生型として Columbia (Col), Landsberg *erecta* (Ler)の両方を用いた。用いた突然変異体を表1に示した。野生株、突然変異体に関しては Arabidopsis Research Center (Ohio State University, Columbus) より、入手した。

次亜塩素酸滅菌した種子を 1%アガーゲルを含む 1X Murashige Skoog 培地 (2% Sucrose, 100mg/l Inositol, 1mg/l Thiamine, 0.5mg/l nicotinic acid, 0.5mg/l pyridoxine を含む) に播種し、24 時間連続照明(400–500 μ W/m²s⁻¹), 21℃ で栽培した。

Allele Symbol	Gene name	BG	Map pos	Phenotype
tt1-1	transparent testa	Ler	1-64.5	reduced anthocyanin
tt2-1	transparent testa	Ler	5-51.3	reduced anthocyanin
tt3-1	transparent testa	Ler	5-62.1	lacks anthocyanin
tt4-1	transparent testa	Ler	5-20.1	lacks anthocyanin
tt5-1	transparent testa	Ler	3-83.6	lacks anthocyanin
tt6-1	transparent testa	Ler	3-96.4	reduced anthocyanin
tt7-1	transparent testa	Ler	5-13.1	reduced anthocyanin
tt8-1	transparent testa	Ler		reduced anthocyanin
tt10-1	transparent testa	Ler		reduced anthocyanin
ttg1-1	transparent testa, glabra	Ler	5-35.5	lacks anthocyanin lacks trichomes
gl1-1	glabra	Ler	3-46.2	lacks trichomes
gl1-2	glabra	Col	3	lacks trichomes
gl2-1	glabra	Ler	1-116.3	reduced trichomes
gl3-1	glabra	Ler	5-61.1	unbranched trichomes
rhd2-1	root hair defective	Col	5	lacks trichomes
hy4-1	long hypocotyl	Ler	4-15.2	Cryptochrome1 defective
fha-1	late flowering	Ler	1-20.7	Cryptochrome2 defective

表1 本研究で使用したシロイヌナズナの突然変異体

(2) 線、UVの照射条件

線照射

発芽後 18 日から 21 日目の植物体を培地ごと、線照射装置(3kGy/h, 1300TBq, Nordion, Ontario, Canada)に挿入し、コバルト 60 由来の線照射を行った。照射後、植物体は再び培養室に戻し、一定時間後、所定の観察、並びに生化学実験に供した。

UV照射

中波長紫外線(UV-B)並びに長波長紫外線(UV-A)照射を試みた。光源としては FL20SE (275-410nm, ピーク波長 315nm; Toshiba)を中波長用、FL20BLB(300-420nm, ピーク波長 350nm; Toshiba)を長波長用として用い、FL-20BLB は 5mm 厚ガラス板を用いて UV-B をカットした。紫外線強度計(Sectroine DRC-100X, DRC-100H)により紫外線強度を測定した。FL-20SE では光源から 20cm の距離で $30 \mu\text{Wcm}^{-2}$ であり、FL-20BLB では光源から 20cm の距離で $18 \mu\text{Wcm}^{-2}$ であった。

(3) アントシアニン蓄積量の定量

アントシアニンは植物体全体を破壊後、抽出液(n-propano-l:HCl:H₂O=18:1:81)に懸濁し、3分間煮沸後、25℃で一晩抽出した。抽出液の OD_{535nm} と 650nm を測定し、535nm の値から 650nm の値を引き、あらかじめ測定しておいた生重あたりの値を測定値とした。

(4) 活性酸素消去能の測定

ケミルミネッセンス法による消去能の測定

基本的には前田らの方法に従った。100 μM t-butyl hydroperoxyde, 1 μM ルミノール, 1 μM ジエチレントリアミノペンタ酢酸、20%エタノール、50mM リン酸緩衝液(pH7.0)を含む反応液に植物体凍結乾燥物を加え、30, 50 秒間保温後、最終濃度 1 μM ヘミン液を加え、反応を開始し、30 秒後に化学発光を測定した。植物体凍結乾燥物を加えない場合を 1 としたときの相対値で消去能の測定値とした。

E S R を用いたスーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルに対する消去能の測定

スーパーオキシドラジカルに関してはキサンチンオキシダーゼ(XOD)により、ヒポキサンチンからキサンチンが生じる際に発生するスーパーオキシドをジメチル-1-ピロリン-1-オキシド(DMPO)でトラップし E S R で測定する方法を用いた。消去能の検量には SOD (スーパーオキシドデスムターゼ)を用いた。ヒドロキシルラジカルに関しては、過酸化水素が第一鉄イオンで開裂するフェントン反応で発生するヒドロキシルラジカルを DMPO でトラップし測定する方法を用いた。

(これらの測定には九州農業試験場作物開発部流通利用研究室の装置を使わせて頂いた)。

(5) 走査型電子顕微鏡による葉の表面、根の表面の観察

葉の表面の観察 (trichome のカウント)

葉を植物体から切除した後、3%パラフォルムアルデヒド, 0.25%グルタルアルデヒド-リン酸緩衝液(pH7.2)に4時間一晩浸けた。水分を 99.5%エタノールで置換後、99%2-メチル-2-プロパノールに浸け、凍結後、臨界点乾燥装置により、8時間凍結乾燥を行った。イオンスプッターで90秒間コートした後、走査型電子顕微鏡観察を行い、trichome の数を数えた。

根の表面の観察

根は植物体から切除後、3%パラフォルムアルデヒド, 0.25%グルタルアルデヒド-リン酸緩衝液(pH7.2)に4時間浸し、蒸留水で2回洗浄後、エタノールで水分を置換し、3-メチルブチル酢酸に浸した。臨界点乾燥装置で乾燥後、イオンスプッターでコートした。

(6) エチレンの測定

事前に空けておいた小孔から栽培容器内の空気を注射器で吸い出し、ガスクロマトグラフ(GC-7AG, C-R5A)でエチレンに相当するピークを測定した。

(7) in-gel-assay 法によるプロテインキナーゼ活性の測定

基質としてミエリン塩基性タンパク質を含むアクリルアミドゲルを作製し、植物体抽出画分を電気泳動で分離し、泳動終了後、 ^{32}P -ATP を含む溶液にゲルを浸し、リン酸化反応を進行させ、余剰の ^{32}P -ATP を洗浄した後、オートラジオグラフにより、活性のある領域を同定した。

(8) 酵母ツーハイブリッドシステムによる相互作用候補遺伝子のスクリーニング

ベイトとする遺伝子の cDNA をベイトベクター(pAS2-1)の酵母 GAL4 遺伝子 DNA 結合ドメインの下流にクローニングし、Trp 要求性酵母株を形質転換する。一方、ライブラリーベクター(pGAD424)の酵母 GAL4 遺伝子活性化ドメインの下流にシロイヌナズナ cDNA ライブラリーが挿入された DNA mixture を形質転換し、Leu 要求性が回復した株を選抜する。酵母細胞内でベイトと相互作用する cDNA が共存した際に、GAL4 遺伝子が活性を持ち、LacZ 活性が発現する。さらに His 合成遺伝子のプロモーターに GAL4 が作用することにより、His 要求性がなくなる。これら 3 種の栄養要求性がなくなった酵母株を選抜し、ライブラリーベクターを回収し、cDNA の塩基配列を解析した。

(9) マイクロアレイ法による相互作用候補遺伝子の発現解析

ツーハイブリッド法で得られたクローンをガラス板に固定し、Cy5-dCTP で標識したシロイヌナズナ (線非照射、照射) 由来の mRNA をターゲットとしてハイブリダイゼーションを行い、それぞれのクローンの照射による転写量の変化をモニターした。

9. 結果

線、UV照射に伴うアントシアニン、活性酸素消去能の蓄積とその生物学的意味

大線量の線照射(1-3kGy)により、線量依存的に、また経時的にアントシアニンの蓄積が誘導されることが明らかとなった。アントシアニンは植物の花色や紅葉の際の葉の色で有名なフラボノイド系色素である。線量依存性は図 1a に示したように 2.5kGy まではほぼ直線的に上昇すること、アントシアニンの蓄積は照射約 1 日半後に開始され 4 日後にピークに達することが明らかになった(図 1b)。シロイヌナズナにおけるアントシアニン合成経路は図 2 に示したようにアミノ酸の一種であるフェニルアラニンから開始され、

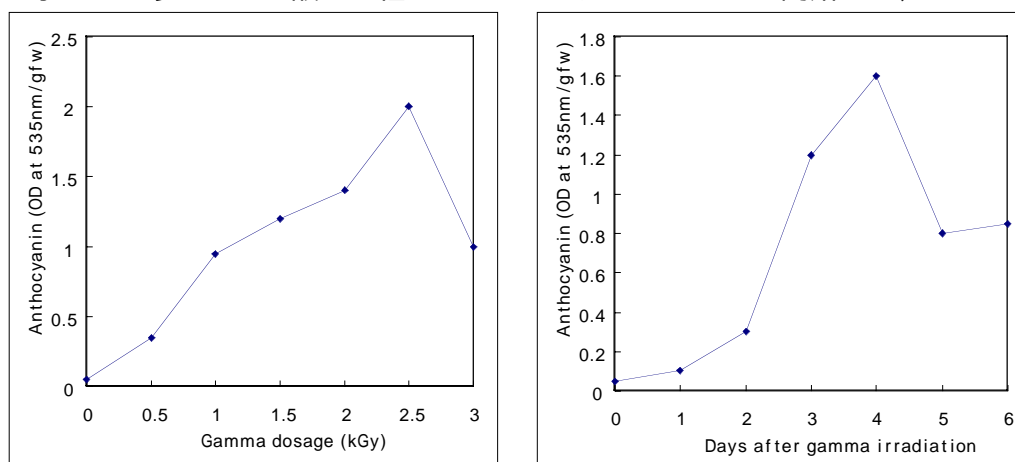


図 1 a : 線照射線量に依存したアントシアニン蓄積量の増加 (照射 4 日後の蓄積量)

図 1 b : 線照射後のアントシアニン蓄積の経時変化(2kGy)

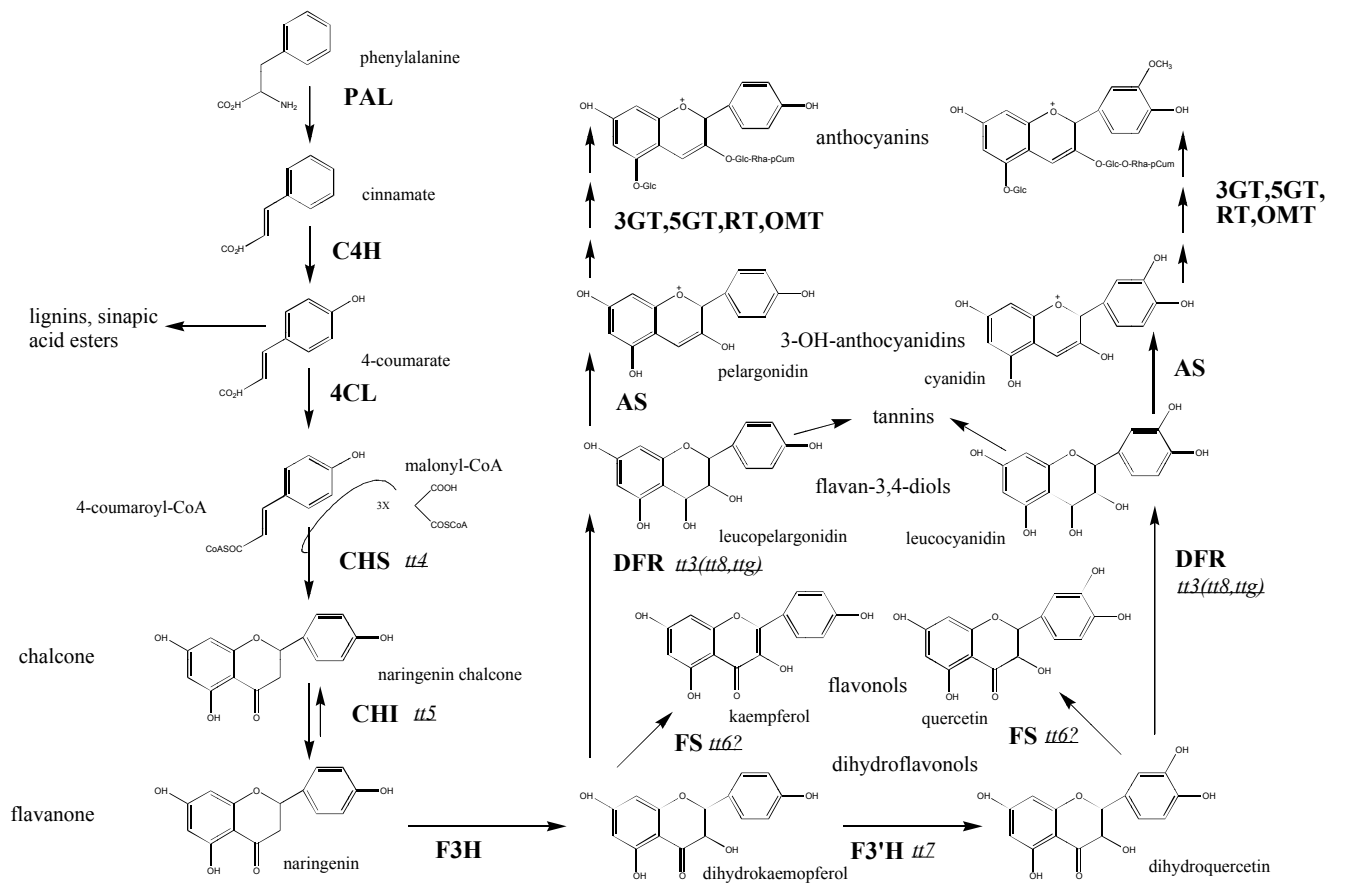


図2 アントシアニンの合成経路

PAL(Phenylalanine ammonialyase),CHS(Chalcon synthase), CHI(Chalcon isomerase)により触媒される反応がキーステップになっているとされている(1)。そこでキー酵素であるPAL や CHS 遺伝子が 線照射にともなって転写レベルで誘導されるか否かを調べるため、ノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。その結果、非照射条件下では転写が認められないのに対して照射後12時間位から転写が認められることが明らかとなった。これらの結果は 線によるアントシアニンの蓄積はシロイヌナズナの通常のアントシアニン合成系を経て合成されていることを示している。アントシアニンの蓄積は植物が種々の環境ストレスにさらされた際、例えば強光、紫外線照射等の光ストレスのみならず低温、乾燥、栄養飢餓、病原微生物の感染、大気汚染ガス曝露、サイトカニン(植物ホルモン)の過剰投与等により誘導されることが知られている(2)。その生物学的意義は強光や紫外線の場合は細胞内を保護するために細胞表面に紫外線を吸収するフィルターとしての色素を蓄積すると考えられてきた。線照射の際のアントシアニンの蓄積は波長がまったく異なるのでこの解釈は適用できない。しかしながらアントシアニンのようなフラボノイド系の色素はラジカル消去能を有することが知られているため、線を照射した植物における活性酸素消去能を測定した(3)。測定方法は材料と方法の項で記述したように、ラジカルを人為的に発生させておき、それに線照射した植物の凍結乾燥物からの粗抽出液を混ぜ、処理後残ったラジカルによるルミノール発光反応を測定し、サンプルのラジカル消去能力を調べるものである。図3に示すように照射後、アントシアニンの蓄積パターンと極めて一致してラジカル消去能力が上昇するこ

とが明らかとなった。この消去能力がアントシアニンによるものなのか、あるいは別の物質によるものかを見極めるため、シロイヌナズナの突然変異体でアントシアニン合成系に異常がある tt(transparent testa)突然変異体系列の内、tt3,tt5 を用いて実験を行った。tt3 は図2に示した酵素のうち DFR を欠損し、tt5 は CHI を欠損している。図3bに示したように、これらの突然変異体では 線照射に伴って野生株の様な活性酸素消去能の上昇は見られなかった。他のアントシアニン合成欠損系列(tt1~tt11, ttg)においても、アントシアニンを一部合成するものでは消去能が存在するが、合成しないものでは完全に消去能が見られなかった。このことから 線照射後に蓄積する活性酸素消去能はアントシアニンそのものの蓄積を反映していると考えられる。

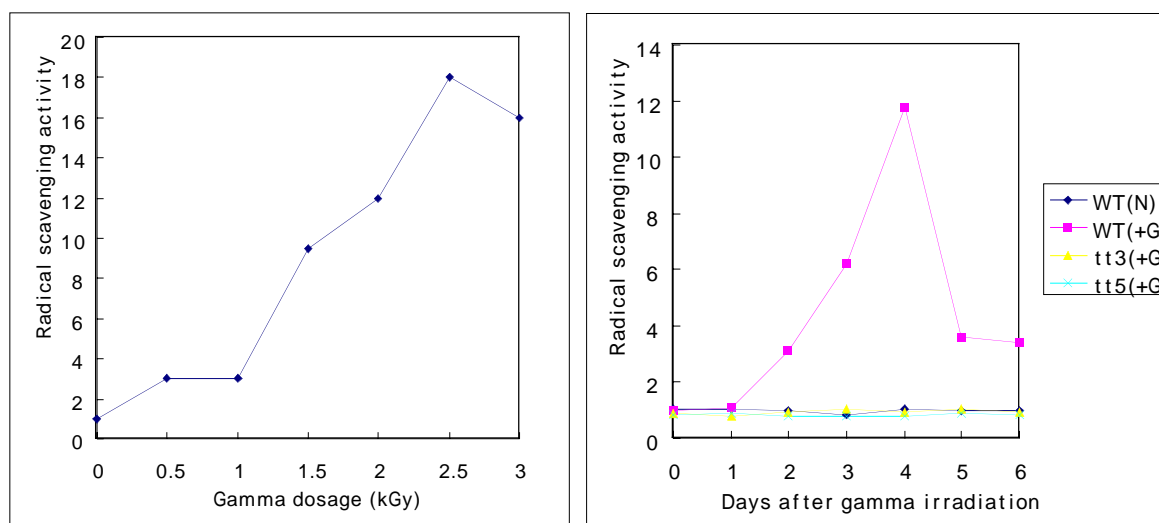


図3a 線照射線量に依存したラジカル消去能の蓄積
 図3b 線照射後のラジカル消去能の蓄積の時間経過

ルミノール法を用いた消去能の測定はラジカルを特定した測定方法ではないので、ESRを用いたラジカル特異的な方法で、線照射植物におけるラジカル別消去能力の測定も試みた。フェントン反応によるヒドロキシルラジカルの消去能、キサンチンオキシダーゼによるスーパーオキシドラジカルの消去能とともに、線照射植物ではアントシアニンの蓄積と平行に上昇していた。

植物体が 線照射を受けた際に、アントシアニンを蓄積させることの生物学的意義が活性酸素消去能の蓄積であるとするならば、図1で示したようにアントシアニンの蓄積誘導は最初の照射に対しては遅すぎる応答である。この応答は再度 線照射された際の予備的対抗手段もしくは最初の照射で発生した長寿命ラジカルに対する消去能力ではないかと考えられる。そこで2度 線を照射する実験を行った。1回目は2kGyを照射し、4日後に再度2kGyを照射した。この実験においてアントシアニンを生成する野生株と生成できない ttg 変異株を用いた。もしも最初の照射で誘導されるアントシアニンがラジカル消去物質として生体内で機能するのであれば2度目の照射後の植物の生物活性に大きな違いが生じるはずである。結果は予想したとおり、野生株と ttg 変異株ではその生理活性に大きな違いがみられ ttg 変異株では枯死寸前であった(図4)。

線照射によるアントシアニンの蓄積が活性酸素によって誘導されるものであるか否かの確認は活性酸素消去剤を用いた実験により確認した。活性酸素消去剤としては PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate), n-PG (n-propyl galate), NDGA (nordihydroguaiaretic acid)の3種を用いた。線照射によるアントシアニン蓄積を活性酸素消去剤による前処理が如何に抑制するかを調べた結果、図5に示した様に、PDTCは抑制効果が低いが、n-PG、NDGAは強い抑制効果を示した。

以上の結果から大線量の線照射により、生体内で生じた活性酸素によりアントシアニン生成系が誘導され蓄積されることが明らかにされた。このアントシアニンは再度の線照射に備えた対抗手段かあるいは最初の照射の際に生体内に蓄積した長寿命のラジカルを消去する能力を有していると考えられる。このことから植物は大線量の線照射という発生分化上未経験の環境ストレスに対しても非常に巧妙な適応手段を有していることが考えられる。



野生株、ttg1-1変異体、野生株にアンチオキシダント前処理を施したもの

図4 線2度照射後の植物体の状態

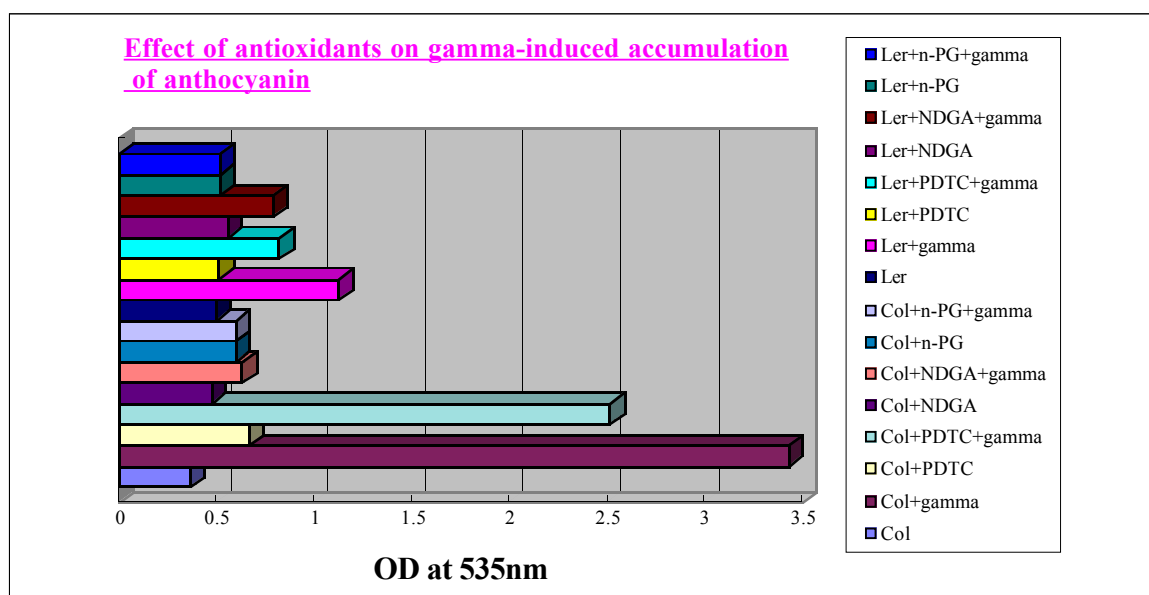


図5 アンチオキシダント前処理による、線照射でのアントシアニン蓄積の抑制

線照射に伴う毛状突起(trichome)の数の増加

シロイヌナズナの成葉の表面にはtrichomeと呼ばれる毛状突起が存在する。これは一つの葉の表皮細胞が分化したもので、野外環境で生育する際に、昆虫等の攻撃から分裂組織等を保護するために存在すると考えられている器官である。従って、実験室環境での植物体の生育には必須ではない器官である。そのために、多くの形態形成異常突然変異体が得られており、単一細胞の終端分化のモデル系として、分子遺伝学的解析が活発に行われている(4, 5)。我々は、偶然 線照射した植物体でtrichomeの分化が活性化し、照射植物体では非照射に比べ、数が2倍になることを見いだした。そこで、本プロジェクトにおいて集中的にtrichomeの増加の生理的機構を解析した。

まず、第7番目の成葉におけるtrichomeの数はColにおいて 122.5 ± 22.7 、Lerでは 57.5 ± 14.5 である。ところが第5番目の成葉の展開時に2kGyの 線を照射すると第7葉のtrichomeの数は 207.9 ± 43.7 、 95.0 ± 27.1 に増加する。平均的に約二倍の増加が見られる(図6)。走査電子顕微鏡観察の結果、新規に見られるtrichomeの生え方は既存のtrichomeに対してランダムに増えるのではなく、それぞれの位置関係を保ちながら合間を縫うように増えている。一方、Lerでの新規trichomeの中には二本のtrichomeが合体したようなものや、4本に分岐したのも見られる。これらのtrichomeの増加が 線照射に伴う活性酸素によるものであることを示すため、

線照射前での活性酸素消去剤(記述の3種)を用いた処理を行ったところ、 線照射での増加はいずれの場合も抑制された。一方、2 μ Mのパラコート(Paracort)を第5葉展開時に添加して、数日後第7葉のtrichomeを数えると、 線照射時ほど大きくはないが小さな、しかし分岐したmini-trichomeが葉の表面に見られた(図7)。その数は水処理による対照区が0に対して、 56.5 ± 20.4 の増加であった。さらに、trichome形成に関与することが明らかにされている突然変異体gl1, gl2, ttg, rhd2を用いた解析においても、 線照射によるtrichomeの増加は抑制された。これらの結果は 線照射によるtrichomeの誘導が通常のtrichome形成経路を経ていることを示している。

現在、これらの知見を利用して、 線照射に伴うGL1遺伝子の活性化、酵母ツーハイブリッドシステムによるGL1遺伝子と相互作用する遺伝子産物の探索を行っている。活性酸素を介した分化誘導は極めて興味深い系であるので、今後も是非継続したい研究テーマである。

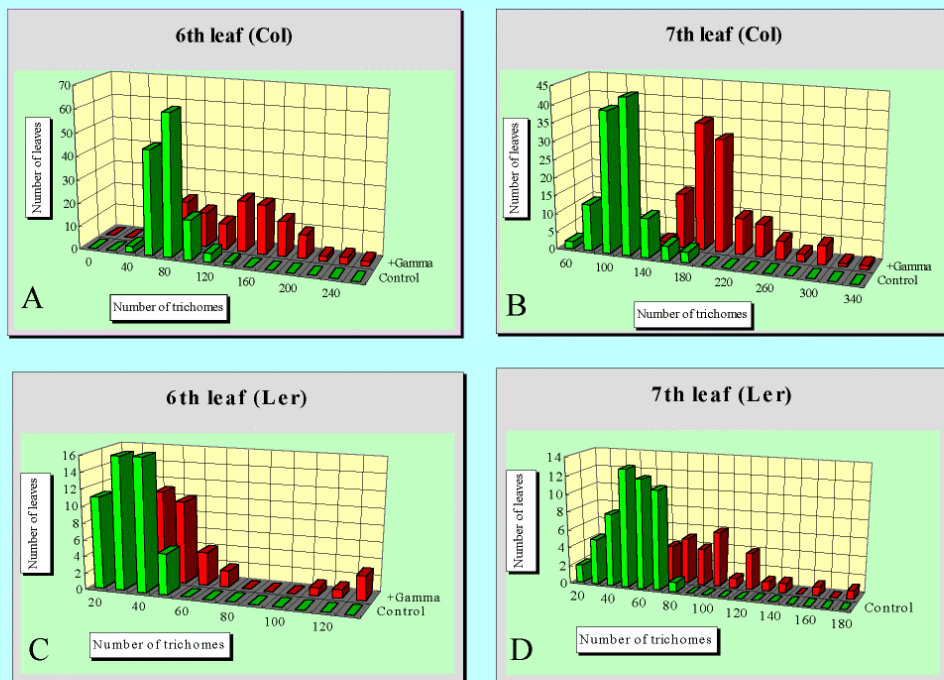


図6 第5葉展開時に γ 線照射した場合の第6, 7葉でのtrichome数の変化

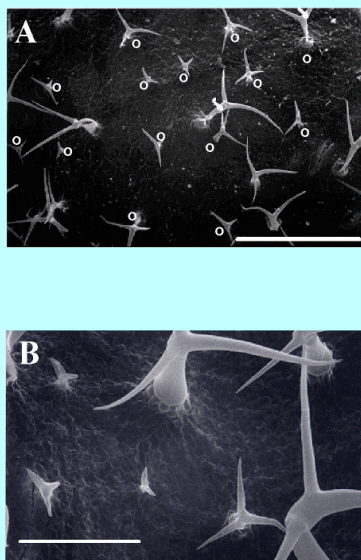


図7 A パラコート処理後の第7葉の表面
 B 拡大したもの
 既存のtrichome以外にmini trichomeが増えているのが観察される。

線照射に伴う根の形態変化

根は地中からの水分、養分の吸収器官として極めて重要な働きを担っており、環境条件の変化、種々のストレスに対して敏感に反応することが知られている。我々も大線量の線照射によって根が極めて特徴的な形態変化を起こすことを見出した。すなわち、照射後2～3日で根の先端部が放射方向に膨潤し、根毛が著しく伸長することが明らかとなった。顕微鏡切片観察を行った結果、根の細胞層のうち表皮細胞と皮層細胞層が膨潤を起こしており、内皮細胞より内側の細胞層には変化が起きていないことが明らかとなった。根の細胞の膨潤には植物ホルモンの一種であるエチレンの生成が関与していることが知られており、何種類かの植物において放射線照射によりエチレン生成が報告されていることから、我々もシロイヌナズナにおいて線照射後エチレンの生成を調べた(6)。その結果、図8に示したように、照射後約2時間以内にエチレン生成が誘導されることが明らかになった。さらにこれらの根の形態変化が線照射によって発生する活性酸素とエチレンによるものであることを確認するために、活性酸素消去剤およびエチレン合成阻害剤を用いた実験を行った。エチレン合成阻害剤に関してはエチレン前駆体のACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)合成を阻害するAVG (aminoethoxyvinylglycine)を用いた。活性酸素消去剤による前処理、エチレン合成阻害剤による前処理ではともに線を照射しても根の膨潤、根毛の伸長は抑制されること、逆に明条件下でスーパーオキシドアニオンを発生するパラコート、メナジオン等の薬剤で処理した場合には線照射と同様な根の形態変化が誘導されることが明らかとなった。これらの結果は、根において誘導される形態変化は活性酸素とエチレン合成を介したシグナル伝達系により活性化されていることを示していると考えられる。

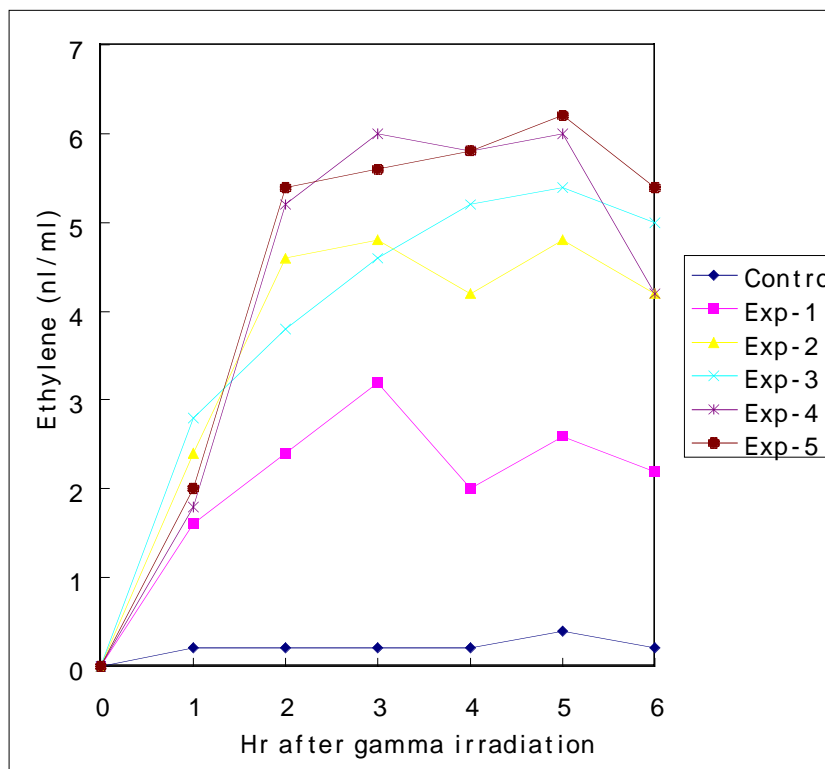


図8 線照射後のエチレンの発生

根のこうした形態変化が果たして植物が自己防衛反応として織り込んでいたものなのか、あるいはエチレン生成のためやむなく形態が崩れてしまったのか、現時点で判断するのは難しい。しかしストレスにตอบสนองして根が膨潤する現象はよく見出されている現象であり、またサツマイモの根がなぜ芋になるのかを考えるうえで、活性酸素やエチレンの関与は重要であると考えられ今後もより詳細な研究を行うべきであると考えている。

UV照射に伴う根の伸長方向の変化

既にシロイヌナズナにおいても、紫外線照射でフラボノイド色素であるアントシアニンが葉に蓄積することが見出されているが、我々はUV-B照射により、根の先端部が肥大し、屈曲する現象を見出した(図9)。この現象はUV-B照射後12時間目から観察され、4日目以降は通常の伸長を続けた。形態変化が線量の強度に依存するかどうかを調べるため形態変化の頻度を根の先端数に対する形態変化を示した根の数で示した。UV照射強度を変化させるため光源からの距離を変化させ実験を行ったところ、膨潤屈曲現象はUV強度に対して正の相関を示すことが明らかとなった。また、紫外線照射時間を変化させたところ感受性はecotype間で異なり、Landsberg *erecta*型の方がColumbia方よりも、高いことが明らかとなった。

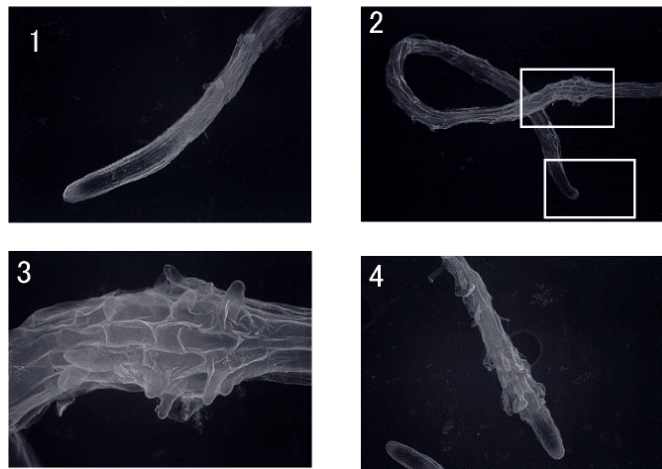


図9 UV-B照射で誘導された根先端部の細胞肥大と屈曲
(1)非照射(x150) (2)照射12時間後(x80)
(3)照射12時間後の根の屈曲開始部位の拡大写真(x400)
(4)照射12時間後の根の先端部の拡大写真(x125)
いずれも走査型電子顕微鏡にて観察した。

根の形態変化はエチレン合成を介しているか。

これまでの実験から我々は 線照射時に誘導される根の形態変化はエチレン産生を介していることをエチレン産生の測定、阻害剤を用いた実験、エチレン応答性の変化した突然変異体を用いた解析から明らかにした。UV照射で誘導される変化に対しても同様の解析を行った。30 μ W/cm²、6時間のUV-B照射を行った後、エチレン生成量の変化を経時的にガスクロマトグラフィーを用いて測定した結果、エチレン生成のピークは、照射開始から8時間後で

あった。一方、照射を行わなかった場合、生成量は0.064-0.114nl/ml/hrの間で一定の値を示し、UV-B照射により、ピーク時には約5倍のエチレンが生成されていることが明らかとなった。エチレン合成阻害剤(AVG)で前処理した系においてはUV-Bで誘導される根の膨潤屈曲現象が抑制された。エチレン生成量は0.1575nl/ml/hrであり、AVG処理を行わなかった場合に較べて、低い値を示した。

オーキシン阻害剤の効果

根の成長に対してオーキシンが関与していることに関しては多くの報告があり、UV照射で誘導される根の膨潤屈曲現象にもオーキシンの関与が考えられたので、オーキシン阻害剤実験を行った。オーキシン輸送阻害剤としてTIBA(2,3,5-triiodobenzoic acid)、オーキシン競合阻害剤としてPCIB(2-8p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid)を用いた。PCIBの濃度依存的に屈曲阻害の割合も増加した。一方、TIBAの投与は阻害効果を観察できずむしろ屈曲が促進された。

ジベレリン合成阻害剤の効果

ジベレリンの外生投与が根の成長に与える影響は植物種や実験条件によって多様であり、ジベレリンの働きも多岐に渡ると考えられている。そこで、ジベレリン合成阻害剤の一つであるAncymidolで前処理した植物にUV-B照射を行ったが、根の屈曲現象の阻害は見られなかった。

線照射応答に係わる細胞内シグナル伝達機構の解析

線照射、UV照射に伴い誘導される一連の応答反応が、こういった細胞内シグナル伝達系を介しているのか、細胞内タンパク質のリン酸化実験を行い解析した。細胞内シグナル伝達系として、MAPキナーゼを介したシグナル伝達系が植物細胞においても明らかにされているので、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)を基質にして、解析を行った。その結果、17.5kDa, pI=5.2のタンパク質が強い基質リン酸化能を持ち、しかも照射に伴って、細胞質画分から膜画分に活性が移行することを見出した(図10)。このタンパク質の微量アミノ酸配列の決定を試みたが、混入する夾雑物のため、塩基配列の決定には至らなかった。横浜市立大学の蓮沼教授のグループが、植物においてもNucleoside diphosphate kinase(NDPK)が細胞内シグナル伝達系に重要な役割を演じているのではないかとの知見を発表した。さらに韓国のSongらのグループもNDPKがファイトクローム下流のシグナル伝達系において、上位に位置し、ファイトクロームと結合することにより、活性が上昇することを報告した(7)。

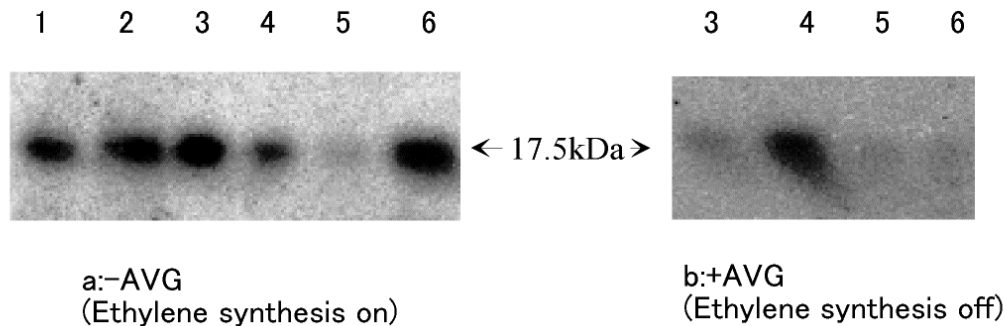


図10 ミエリン結合性タンパク質を基質としたプロテインキナーゼの in gel assay. 1:非照射の細胞全画分、2:照射の細胞全画分 3:非照射の細胞質画分 4:照射の細胞質画分 5:非照射の膜画分 6:照射の膜画分

このタンパク質は分子量 18kDa, pI= 6.0 で NDPK としての活性を持ち、赤色光、近赤色光受容体のファイトクロムが受けた光シグナルを伝達する役割が考えられている。また、同タンパク質は MBP を強くリン酸化する性質を持つことが報告されている。一方、哺乳類等の実験系において NDPK は単に ATP をリン酸供与体としてリボおよびデオキシリボ体 NDP から NTP を生成する酵素としてだけでなく、nm23 に代表されるようにがん転移抑制因子としての機能も見出されている多機能性タンパク質として近年、注目を集めているタンパク質である。

我々が見出していた 17.5kDa タンパク質が NDPK であるという確証は得られていないが、これらの状況証拠的相似点と、蓮沼教授と共同研究を行っている農業生物資源研究所の小松節子主任研究官からイネ由来 NDPK 抗体を分与戴き、シロイヌナズナのタンパク抽出液と Western blot ハイブリダイゼーションを試みた結果、17.5kDa タンパク質と同一の挙動を示した。さらに光シグナル伝達系の突然変異体として青色光受容体（クリプトクローム 1, 2）の欠損変異体として hy4(CRY1-), fha(CRY2-)における NDPK 様遺伝子産物の活性の変化が野生株とどのように違うかを解析した。図 11 に示すように、これら二つの変異体では野生株で見られた照射に伴う膜画分への移行は見られなかった。

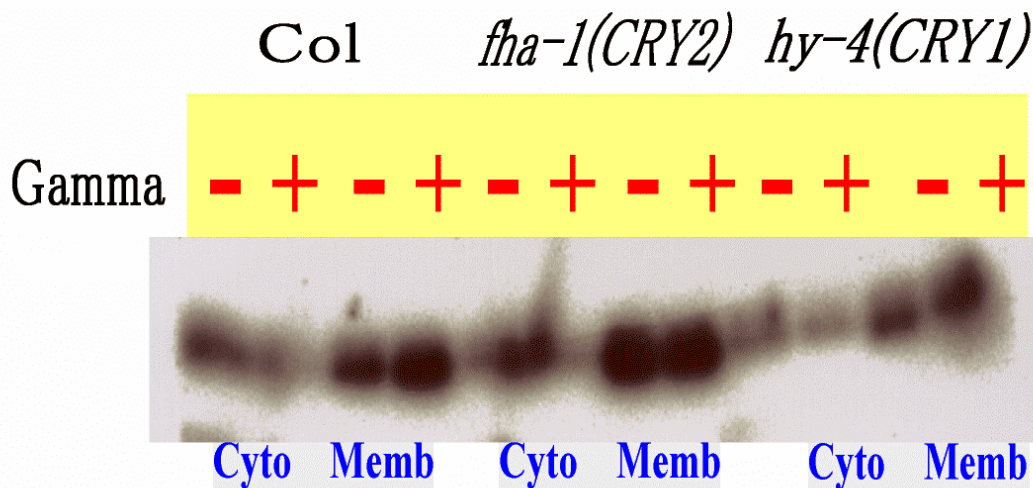
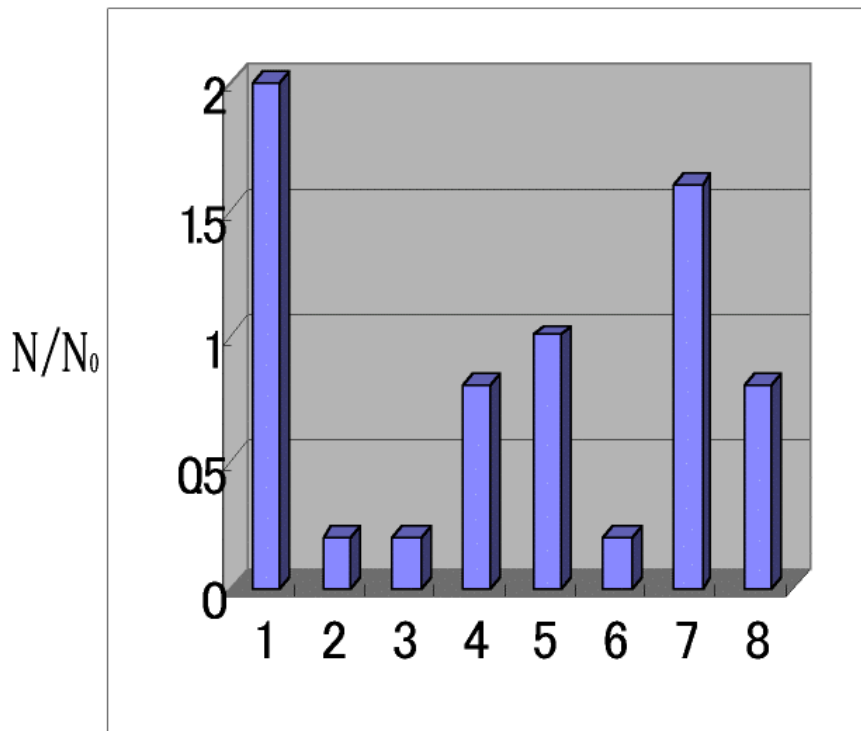


図 11 青色光受容体変異による NDPK 活性の野生株との違い

これらの結果から、NDPK に対象を絞った遺伝子レベルでの研究を開始した。まずシロイヌナズナにおける NDPK 遺伝子の状況についてデータベースサーチを行った結果、ゲノミッククローンとして ndpk1:ATNDK13(X69376)、対応する cDNA クローンとして 150aa からなる(AF017641)、さらに別の cDNA クローンとして 153aa からなる ndpk1a(AF058391)、さらに 232aa からなる ndpk2(AF017640)、239aa からなる ndpk3(AF044265)が登録されていることが分かった。これらは非常に高い相同関係にあることが明らかである。また、多くのクローンにおいて、ATP 結合に必要な領域、自己リン酸化されるセリン残基、NDP キナーゼ活性に必要な領域、リン酸化されるヒスチジン残基が保存されていることが明らかである。また ndpk2,ndpk3 におけるアミノ酸配列の長い部分は細胞内小器官に輸送されるために必要な配列と考えられる。

細胞内でシグナル伝達系に関与するのであれば、NDPK に情報を渡すタンパク質、および NDPK から情報を受け取るタンパク質が存在する筈である。これらがタンパク質のリン酸化反応を介しているにせよ何にせよ、タンパク質間相互作用が存在するはずである。そこで、相互作用タンパク質をスクリーニングするために酵母ツーハイブリッドシステムを用いた。植物体から抽出精製した mRNA に対して ndpk 特異的 primer を用いて RT-PCR 反応を行い ndpk1, ndpk1a のコード領域を GAL4 遺伝子の transactivation domain と共発現させるようにして酵母に遺伝子導入し、一方 GAL4 遺伝子の DNA binding domain と共発現するように組み込まれたシロイヌナズナ cDNA ライブラリーを酵母に導入し、栄養要求性で目的のクローンを選抜する手法をとった。このスクリーニングの結果、現在までに図 12 に示したクローンが NDPK2 と相互作用するクローンとして単離されている。これらのクローンの NDPK2 タンパク質への相互作用の強さを図 12 に示した。



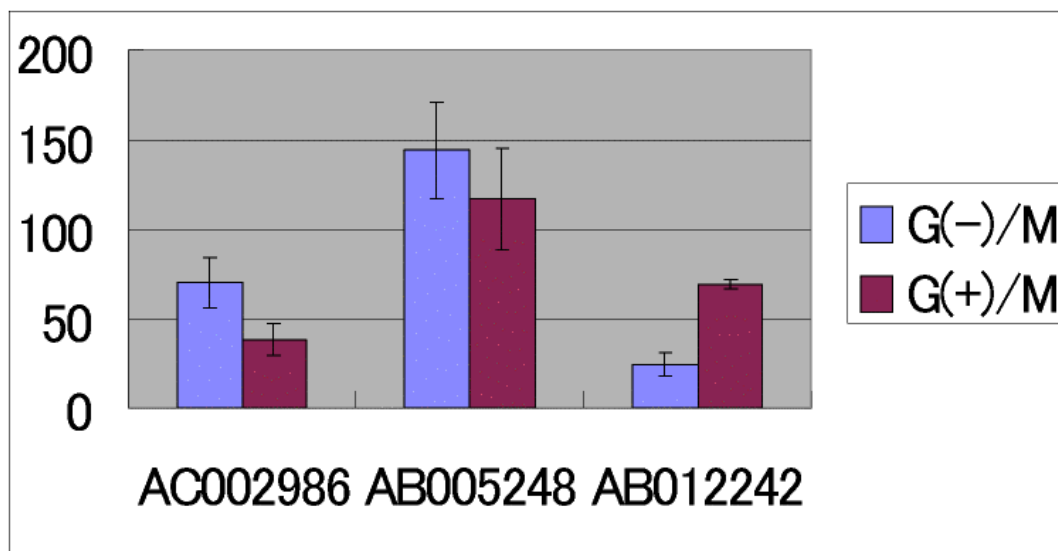
N_0 :interaction of p53 and T antigen of SV40

1. unknown(AF002109)
- 2.PsaL protein(AA597633)
- 3.Chlorophyll binding protein(X03909)
- 4.unknown(AB005248)
- 5.TAC protein(AB012242)
- 6.ATPase protein(D88374)
- 7.ethylene responsive element binding factor(AB008107)
- 8.plasma membrane intrinsic protein(X75883)

図 20 NDPK1a と相互作用するとおもわれる
遺伝子の相互作用の仕方の強さ

これらの遺伝子の発現が 線照射とどのように関係しているかを調べるため、単離された cDNA を PCR 増幅し、マイクロアレイスポッターでスライドガラスに固定し(プローブ化)、線照射、非照射の植物体から抽出した mRNA を蛍光標識し、ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせた結果を、定量処理した結果を図 13 に示した。この結果から分かるよう

に、線照射により、転写量が上昇するクローンと減少するクローンに分かれ、 γ -subunit of Mt F1-ATPase, Ethylene responsive element binding factor (AtERF-5)は上昇し、PsaL Chlorophyll a/b-binding protein, Plasma membrane intrinsic protein 2a, Cytochrome P450-like protein は減少した。

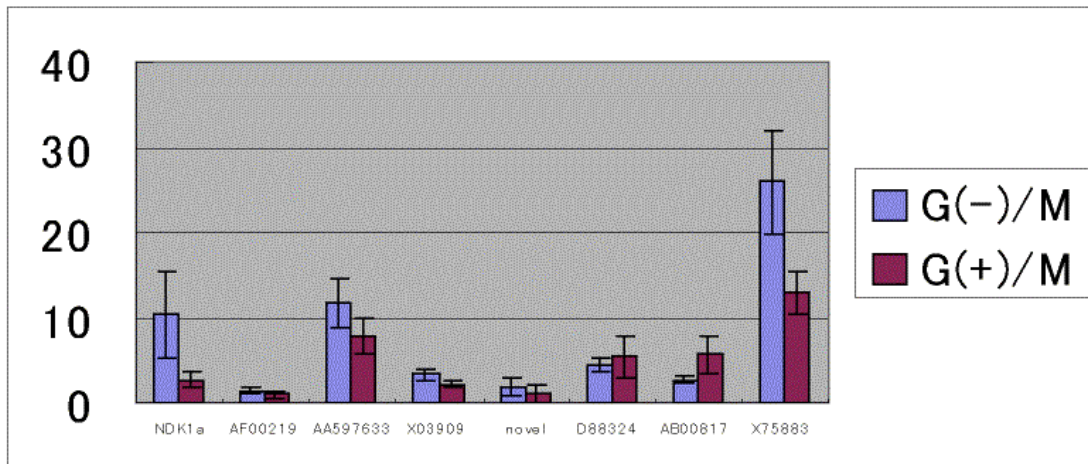


G(+): 2kGy照射後24時間

AC002986:Ch#1 = Cytochrome P450 tyr.gb

AB005248:Ch#5

AB012242:Ch#5



NDK1a:NDK1a

AF00219:Ch#2

AA59763:PsaL

X03909:Chlorophyll a/b-binding protein

novel:novel

D88324:Gamma subunit of Mt F1-ATPase

AB00817:AtERF-5 ethylene responsive element binding factor

X75883:Plasma membrane intrinsic protein 2a

G(+): 2kGy照射後24時間

図 13 NDPK1a と相互作用すると思われる遺伝子の 線照射に伴う、転写量の変化

10. 考察

本研究においては、シロイヌナズナを材料とし、線照射、UV照射を外的刺激として、植物体が外的刺激をどのように、認識し、細胞内で情報を伝達し、応答反応を誘導するか、その分子機構を明らかにし、植物のストレス応答のメカニズムを理解し、バイオテクノロジーとして利用するための、研究を行った。その結果、線、UV照射は、以前から知られていたDNA損傷誘導以外に、活性酸素の発生を介して、植物体に種々の応答反応を誘導することが明らかとなった。

地上部におけるアントシアニンの蓄積は、活性酸素消去能を増大させ、長寿命ラジカルの消去や再度に渡る外的刺激に対する防御機構として機能すること、葉の表皮細胞の毛状突起(trichome)の分化誘導は、ストレスによる細胞分化の誘導と、分裂組織の保護、根の表皮細胞の膨潤は、アンチオキシダントとも考えられる植物ホルモンのエチレンの発生に伴う、副反応と考えられる。これらの生理・生化学的知見は、植物の外界刺激に対する反応の精巧さを教示するのみならず、特殊な環境下での植物体の栽培等の実用的な応用に対しても重要な示唆に富んでいる。

活性酸素は老化、癌化等における悪玉として注目され、その消去能のみが取りあげられる昨今であるが、本研究においては活性酸素が積極的に関与するシグナル伝達系が存在し、その下流に我々が見いだした種々の応答反応が存在することに焦点を当て、解析を行った。本研究で解析したのはタンパク質のリン酸化反応を介したシグナル伝達系であるが、一連のタ

ンパク質を対象とした実験から、NDPK(Nucleoside Diphosphate Kinase)が、NTP を供給するハウスキーピング的機能以外に、本研究で対象とするシグナル伝達系に積極的に関与している知見を得た。NDPK は最近 nm23 の例もあるように、癌の転移抑制機能、あるいは細胞の分化等に関与しているとの報告が相次いで出され、非常に注目を集めている遺伝子であるが、植物においても光形態形成におけるシグナル伝達因子として注目されている遺伝子である。また、十分なデータが揃ってはいないが、線照射応答におけるシグナル伝達系でもこの遺伝子を中心とするシグナル伝達系が存在することから、常套手段として酵母ツーハイブリッドシステムを用いた相互作用因子の探索を試みた。その結果、種々の遺伝子がこの候補として上がり、線照射に対する応答を調べた結果、照射により転写量が上昇するクローンと、減少するクローンに分けられた。今後、これらのクローンを個々に、機能解析すべきであるが、本プロジェクトのこれまでの成果として、キーとなる酵素とその周辺を取り巻く役者が見いだされたことは、今後のさらなる研究の進展にとって重要な礎となるものである。

11. 今後の展開

活性酸素を介した細胞内シグナル伝達系は、これまでの活性酸素に対する悪玉的発想から180度発想を転換した新しい概念であるが、我々は信念を持ってこの解析を行ってきた。幸い、研究の過程において、非常に偶然ではあるが、NDPK がその中心に存在することを示唆するデータが多く蓄積してきた。今後は、NDPK を中心としたシグナル伝達系の解明を重点的に行うことをひとつの研究課題として挙げたい。具体的には、酵母ツーハイブリッドシステムに依る相互作用因子の個々のキャラクタライズ、逆遺伝学的方法による遺伝子の機能を解明を進めたい。

一方、我々が線応答反応として見いだした、葉の表面の trichome の新規形成誘導はこれまでいかなるストレスにおいても、見いだされなかった発見である。Trichome 形成は結果の項でも記述したように、多くの関与する遺伝子の存在が遺伝学的手法により明らかにされ、さらに最近の分子遺伝学的方法により遺伝子が単離されている系である。この利点を生かし、ストレスによる細胞の分化誘導にはいかなるシステムが関与しているかの観点から研究を進めて行くべきと考える。具体的には、trichome 形成のキーとなる転写因子の GL1 とベイトとした酵母ツーハイブリッドシステムにより、GL1 を活性化する因子を見いだす研究を開始している。

本プロジェクトにおいては動物・植物というふだん共同研究がなかなか行われないうフィールドで共同研究が行われたが、細胞内の議論をする際は植物・動物の区別は殆どなく共通の議論が行えたことは非常に有益であった。今後とも、今回のプロジェクトで培われた議論の場が、継続することを願ってやまない。

12. 参考文献

1. Shirley, B.W., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausbel, F., and Goodman, H.,M.
Analysis of Arabidopsis mutants deficient in flavonoid biosynthesis.
Plant J. 8: 659-671.(1995)
2. Dixon, R., and Paiva, N.,L.
Stress-induced phenylpropanoid metabolism.
Plant Cell 7: 1085-1097. (1996)
3. Morel, I., Lescoat, G., Cillard, P., and Cillard, J.
Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action.
Methods in Enzymology 234, 437-443. (1994)
4. Huelskamp, M., Misera, S., and Juergens, G.
Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis.
Cell 76: 555-566. (1994)
5. Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Esch, J., Sivakumaran, S., and Marks, M.D.
A myb-related gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules.
Cell 67: 483-493 (1991)
6. Triantaphylides, C., Banzet, N., Ferullo, J.,M., Larrigaudiere, C., and Nespoulous, L.
Stress responses of tomato fruit tissue submitted to massive doses of ionizing radiation.
Proc. Royal Society of Edinburgh 102B: 97-105. (1994)
7. Choi, G., Yi H., Lee J., Kwon, Y-K., Soh, M. S., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T-R., Song, P-S.
Phytochrome signalling is mediated through nucleisode diphosphate kinase2
Nature 401, 610-613 (1999)

13. 研究業績

13 - 1 . 原著論文

1. T. Nagata, S. Todoriki, T. Hayashi, Y. Shibata, M. Mori, H. Kanegae and S. Kikuchi: γ -Radiation induces leaf trichome formation in Arabidopsis, Plant Physiology, 120, 113-119(1999)

13 - 2 . 総説など

- 1) 菊池尚志、永田俊文:大線量のガンマ線照射はシロイヌナズナに種々の応答反応を誘導する

13 - 3 . 国際学会発表

- 1) T. Nagata, S. Todoriki, T. Hayashi, M. Mori, H. Kanegae and S. Kikuchi: Biochemical and morphological changes induced by gamma irradiation in *A.thaliana*, 7th International conference on Arabidopsis research, June 23-27, 1996, Norwich, UK.
- 2) T. Nagata, S. Todoriki, T. Hayashi, M. Mori, H. Kanegae and S. Kikuchi: Induction mechanism of self-protective responses in plant: gamma irradiation, 8th International conference on Arabidopsis research, June 25-july 1, 1997, Madison, USA.
- 3) T. Nagata, S. Todoriki, T. Hayashi, M. Mori, H. Kanegae and S. Kikuchi: Analyses of the responses induced by massive dosage of gamma irradiation in *Arabidopsis*: 5th International congress of Plant Molecular Biology, September 21-27, 1997, Singapore.
- 4) T. Nagata, S. Komatsu, S. Todoriki, T. Hayashi, Y. Shibata, M. Mori, H. Kanegae and S. Kikuchi: Analyses of the additional trichome induction by massive dosage of gamma irradiation in *Arabidopsis*: 9th International conference on Arabidopsis research, June 24-29, 1998, Madison, USA.
- 5) Y. Shibata, T. Nagata, H. Kanegae, H. Kamada, S. Kikuchi: The morphological changes of Arabidopsis roots induced by UV-B irradiation: 9th International conference on Arabidopsis research, June 24-29, 1998, Madison, USA.
- 6) T. Nagata, S. Komatsu, S. Todoriki, T. Hayashi, Y. Shibata, M. Mori, H. Kanegae and S. Kikuchi: Protein analysis contributed to the signal transduction pathway involved in gamma irradiation in *Arabidopsis*, Plant Protein Club 1998 Symposium "Plant Proteins in Abiotic Stress Responses" September 27-October 1, 1998, York, UK.
- 7) Y. Shibata, T. Nagata, H. Kanegae, H. Kamada, S. Kikuchi: The morphological changes of Arabidopsis roots induced by UV-B irradiation: 9th International conference on Arabidopsis research, June 24-29, 1998, Madison, USA.
- 8) T. Nagata, S. Komatsu, S. Todoriki, T. Hayashi, Y. Shibata, Du. Zeji, M. Mori and S. Kikuchi: NDK genes are contributed to the gamma-induced signal transduction cascade: 10th International conference on Arabidopsis research, July 4-8, 1999, merborne, AT.

13 - 4 . 国内学会発表

- 1) 永田俊文、等々力節子、林徹、森昌樹、鐘ヶ江弘美、三好一丸、菊池尚志：
 ^{60}CO の線照射によるシロイヌナズナのアントシアニン色素合成、第37回日本育種学会、平成7年11月4日 - 5日、京都
- 2) 永田俊文、等々力節子、林徹、森昌樹、鐘ヶ江弘美、三好一丸、菊池尚志：
 ^{60}CO の線照射によって発現誘導されるシロイヌナズナの遺伝子の解析、第18回日本分子生物学会、平成7年12月6日 - 9日、名古屋
- 3) 永田俊文、等々力節子、林徹、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志：線の大量照射によってシロイヌナズナに誘導される形態的および生理的変異の解析、日本シロイヌナズナワークショップ (1996) 平成8年8月23日 - 24日、札幌

- 4) 永田俊文、等々力節子、林徹、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志： 線の大量照射によりアラビドプシスに誘導される形態的および生理的変異の解析、第19回日本分子生物学会、平成8月24日 - 28日、札幌
- 5) 永田俊文、等々力節子、林徹、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志： 線照射により誘導されるシロイヌナズナの形態変化II - 根、葉組織の異常形態形成、第37回日本植物生理学会、平成9年3月26日 - 29日、京都
- 6) 永田俊文、等々力節子、林徹、柴田百合子、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志： 線によりシロイヌナズナに誘導される応答のシグナル伝達機構の解析、日本シロイヌナズナワークショップ(1997)平成9年11月14日 - 15日、和光
- 7) 菊池尚志、永田俊文：シロイヌナズナにおける適応応答の制御機構、日本放射線影響学会第40回大会、平成9年11月、京都
- 8) 永田俊文、小松節子、柴田百合子、等々力節子、林徹、中島信美、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志：エチレン発生を介したシロイヌナズナの線応答機構の解析、第20回日本分子生物学会、平成9年12月16日 - 20日、京都
- 9) 柴田百合子、永田俊文、鐘ヶ江弘美、森昌樹、鎌田博、菊池尚志：紫外線照射で誘導されるシロイヌナズナの根の形態的及び生理学的変化の解析、第20回日本分子生物学会、平成9年12月16日 - 20日、京都
- 10) 永田俊文、小松節子、等々力節子、林徹、柴田百合子、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志： 線照射によるシロイヌナズナの形態形成及び生理的応答の誘導機構の解析、第38回日本植物生理学会、平成10年5月3日 - 5日、北海道
- 11) 柴田百合子、永田俊文、鐘ヶ江弘美、森昌樹、鎌田博、菊池尚志：シロイヌナズナの根における紫外線で誘導される形態変化、第38回日本植物生理学会、平成10年5月3日 - 5日、北海道
- 12) 永田俊文、小松節子、等々力節子、林徹、柴田百合子、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志： 線照射応答における細胞内シグナル伝達系の解析、日本シロイヌナズナワークショップ(1998)、平成10年11月19日 - 20日、木更津
- 13) 菊池尚志、永田俊文、等々力節子、林徹、柴田百合子：シロイヌナズナの線応答反応の解析10.II トライコームの分化誘導に関する生化学的・分子遺伝学的解析、日本放射線影響学会第41回大会、平成10年12月2日 - 4日、長崎
- 14) 永田俊文、小松節子、等々力節子、林徹、柴田百合子、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志：シロイヌナズナに対する線照射によって誘導されるプロテインキナーゼの解析、第21回日本分子生物学会、平成10年12月16日 - 19日、横浜
- 15) 柴田百合子、永田俊文、鐘ヶ江弘美、森昌樹、鎌田博、菊池尚志：UV-B照射でシロイヌナズナに誘導されるプロテインキナーゼの解析、第21回日本分子生物学会、平成10年12月16日 - 19日、横浜
- 16) 永田俊文、小松節子、等々力節子、林徹、柴田百合子、森昌樹、鐘ヶ江弘美、菊池尚志：シロイヌナズナにおける線照射に対応するシグナル伝達系の解析、第39回日本植物生理学会、平成11年3月28日 - 30日、仙台

- 17) 永田俊文、小松節子、等々力節子、林徹、菊池尚志：線で誘導されるシグナル伝達系にNDKは関与しているか？、日本シロイヌナズナワークショップ(1999)、平成11年11月4日-5日、奈良
- 18) 永田俊文、小松節子、等々力節子、林徹、森昌樹、菊池尚志：シロイヌナズナの線照射応答にNucleoside Diphosphate Kinaseはシグナル伝達因子として関与しているか？、第22回日本分子生物学会、平成11年12月7日-10日、福岡

14.

- (1) Responses of the massive dosage of gamma irradiation and UV-B irradiation in Arabidopsis.
- (2) National Institute of Agrobiological Resources
(skikuchi@abr.affrc.go.jp)
- (3) Shoshi Kikuchi, Yuriko Shibata
- (4) Toshihumi Nagata (JST Nagasaki)
- (5) 1995.4-2000.2
- (6) Abstract

We have found that gamma irradiation and UV-B irradiation induce some responses in Arabidopsis. That is, accumulation of anthocyanin, induction of differentiation of leaf epidermal cells to trichomes and morphological changes of root tip structure mediated by ethylene production. Physiological characterization revealed that these responses were mediated by the active oxygen species (AOS). Inner cellular signal transduction mechanism was also challenged to analyse by the in-gel assay method of MAP-kinase activity. Then we have found that 17.5kDa protein has MAP kinase activity and their main activity has moved from cytoplasmic fraction to membrane fraction after gamma irradiation. We have hint that this protein may be the nucleoside diphosphate kinase protein (NDPK). Yeast two hybrid screening fished out some genes that may interact with NDPK1a protein. Analyses of these gene products are still underway. But in this project we have found that AOS plays important role for the signal transducer of the gamma and UV induced stress responses.