

1. 研究課題名：植物における活性酸素を介した信号伝達系の解明

2. 研究機関：(株)三井業際植物バイオ研究所

3. 分担者：柴田大輔、白野由美子、古矢香織

4. 共同研究者：農林水産省生物資源研究所 菊池尚志

5. 研究期間：平成7年度～平成8年度

## 6. 要約

イネから単離されたりポキシゲナーゼ遺伝子プロモーターを含む DNA 断片をレポーター遺伝子としてグルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を接続させた。このコンストラクトを土壤細菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 を介して、vacuum infiltration 法によりシロイヌナズナへ遺伝子導入した。得られた形質転換植物を生育させ、次世代の植物に放射線を照射して、生成する GUS の発現をグルクロニダーゼを基質として調べた。その結果、本プロモーターは放射線に感受していることが判明した。本システムで放射線を照射に伴う活性酸素シグナルをモニターすることができると考えた。次に、シロイヌナズナへの放射線を照射に伴うシグナル伝達を解明するために、線照射後のタンパク質のリン酸化を検討した。3 分間照射を行い(150 Gy)、直ちに 4 で植物体を破碎し、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P 標識された ATP とともに試験管内でタンパク質のリン酸化反応を行った。2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離し、CBB 染色でスポットの分離を確認した後、イメージアナライザーでリン酸化タンパク質のスポットを解析した。非照射の対照区と照射の実験区でスポットの違いを調べたところ、CBB 染色でも判別できるスポットにひとつ違いがあることが判明した。このタンパク質のアミノ酸配列解析を継続している。

## 7. 研究目的

放射線を植物に照射することにより生成する活性酸素種が各種の遺伝子発現を誘導することが明らかになってきた。植物を対象とした放射線の照射は遺伝育種目的で放射線による突然変異の作出、および、貯蔵流通等の目的での塊茎の発芽防止等に用いられてきたが、放射線が植物に照射された際の応答機構に関しては、生化学的、分子生物学的研究はあまり行われてこなかった。放射線により、各種の活性酸素が生成することはよく知られているが、最近の研究により、活性酸素は各種の生体内反応の引き金になっていることが明らかになってきた。活性酸素により引き起こされる遺伝子発現の解析は、有用な 2 次代謝産物の生産性を向上させることなどに役立つと考えられる。

植物においては、活性酸素の役割は不明な点が多いが、最近の研究によると、植物の病害抵抗性機構に関わっていることが明らかとなってきた(文献 1)。病害菌と植物の相互作用により生成した低分子物質(エリシターと呼ばれる)が植物の病害抵抗性機構を発現させるのであるが、初期の植物側の反応により活性酸素種が多量に細胞から放出されることが知られている。この活性酸素種は、それ以降に起こる過敏感反応の引き金になっていると考えられている。しかし、その信号伝達の実体は不明である。また、病害抵抗性反応時には各種の 2 次代謝産物が生産されることが知られていることから、活性酸素を介した信号により 2 次代謝に関わる遺伝子が活性化されることも予想される。

最近、菊池らは、放射線照射で生成した活性酸素により、植物の2次代謝産物の生産性が向上するとともに、形態の変化が生じることを示した。彼らは、モデル植物としてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用い、これに放射線(コバルト60の線)を照射したところ、2次代謝産物の一つであるフラボノイド系色素アントシアニンが急速に蓄積されることを見いだした。また、同時に、葉の表面にある葉毛(trichome)の密度が増加することを見いだした。このような放射線の効果は、活性酸素を消去する抗酸化剤等を用いた実験から、生体に放射線が当たった時に水分子が分解して発生する活性酸素ラジカルを介した誘導であることが確認されている。菊池らが示した2次代謝産物(アントシアニン)生産は病害抵抗性反応時に見られる2次代謝生産と類似性しており、同様な活性酸素シグナルによる遺伝子の活性化である可能性が高い。

菊池らの見いだした放射線照射により生成した活性酸素種を介した信号伝達系は、遺伝子発現制御因子である Myc-Myb ヘテロダイマーを活性化する系である可能性が高い。アントシアニンの合成を制御している遺伝子としてトウモロコシの C1 および R1 が知られており、前者は動物の Myb 様の DNA 結合タンパク質(文献2)、後者は動物の Myc 様 helix-loop-helix タンパク質(文献3)であることが明らかにされている。シロイヌナズナにおいても TTG という遺伝子が関与していることが知られており、この突然変異体は R1 によって相補されることも知られている(文献4)。動物の系では、活性酸素を発生させると、遺伝子発現制御因子 c-jun のリン酸化が誘導され転写因子 AP-1 が活性化されることが報告されており、この信号伝達系に c-Src, Ha-Ras, Raf-1 等の遺伝子制御因子の関与が明らかにされている(文献5)。一方、葉毛の形態形成の開始に関与する遺伝子として GL1 および先程の TTG が知られており、GL1 は遺伝子クローニングの結果、Myb タンパク質とよく似た構造をしていることが明らかとなっている(文献6)。

当社では、シロイヌナズナを用いた遺伝子解析に関わる各種の技術開発の実績がある。特に、DNA マーカー、遺伝子導入、P1ゲノムライブラリー作製などでの研究を公表してきた。また、病害抵抗性機構に関わる遺伝子の研究を5年以上行ってきた実績があり、活性酸素種の発生に関わる酵素であるリポキシゲナーゼ遺伝子を病害抵抗性反応時の葉からクローニングすることにも成功している(文献7、8、9)。

シロイヌナズナは遺伝学的な解析が他の植物に比べて格段に進んでおり、また、遺伝子単離のための各種の方法が開発されているので、菊池らの用いた実験系は活性酸素を介した信号伝達、2次代謝生産、組織の分化を引き起こす遺伝子の特定に好都合である。また、放射線を活性酸素発生源としている点で研究の独創性があり、本研究では、この実験系を用いて、菊池らとの共同研究により、活性酸素を介した信号伝達系を解明することを目的としている。

## 8. 材料と方法

### 8-1. 形質転換植物の作製と解析

イネから単離されたリポキシゲナーゼ遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子として GUS 遺伝子を接続させた。リポキシゲナーゼ遺伝子のプロモーター部分をゲノムクローンから制限酵素 *KpnI* と *SnaBI* で切り出して末端を平滑化した。また、植物用ベクターである

pSLG0 を制限酵素 *Xba*I で切断して、末端を平滑化し、切り出したプロモーター部分を挿入した。ベクターへのプロモーター部分の挿入は PCR で調べた後、接続部分の塩基配列を調べて、確認した。このコンストラクトのプラスミド DNA を調製し、土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 にエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。遺伝子導入されたことはサザン法により確認した。

*A. tumefaciens* からシロイヌナズナへの遺伝子導入は vacuum infiltration 法により行った。シロイヌナズナを約 3 週間生育させ、最初の花茎の先端を切断し、1 週間後に *A. tumefaciens* の感染を行った。*A. tumefaciens* は抗生物質カナマイシンを含む LB 培地で培養した後、遠心分離で菌体を回収し、植物用の培地 (1/2 B5、1/1,000 Hyponex、1% sucrose、0.044 mM ベンジルアミノプリン、0.02% Silwet L-77、pH 5.7) に再懸濁した。花茎を切断した植物をこの *A. tumefaciens* の懸濁液に漬け込み、減圧下で 20 分間置き、圧力を戻してから、植物体を形質転換用チャンバー (20 ) 内で生育させた。植物体から得られた種子を 2% の次亜塩素酸で滅菌後、50 mg/ml の濃度のカナマイシンを含む寒天培地にて選抜した。得られたカナマイシン耐性植物を生育させ、種子を採った。

Plox-GUS が導入された形質転換植物に放射線を照射して、生成する GUS の発現をグルクロニダーゼを基質として調べた。染色液の組成は、1.9 mM X-gluc、0.5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ 、0.5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ 、0.3% Triton X-100、20% methanol であった。

## 8-2 . リン酸化蛋白質の解析

M S 寒天培地に播種後 3 週間経過し、成葉の第 8 葉が展開した頃のシロイヌナズナにコバルト 60 由来の  $\gamma$  線を照射した。照射条件は、通常の形態変化を調べる際には 50 Gy/min、30 分から 40 分の照射条件で行うが、これらの条件を適用するとタンパク質リン酸化解析の場合は照射中に大方の反応が終結してしまうことが予備実験の段階で判明したので、3 分間照射を行い(150 Gy)、直ちに 4 で植物体を破碎し、緩衝液に懸濁することにした。緩衝液の組成は 50mM Tris-HCl pH7.4、1% Triton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、150mM NaCl、1mM PMSF、1mM EDTA、5mM バナジル酸ナトリウム、10mg/ml Aprotinine、10mg/ml Benzamidine、10mg/ml Leupeptine であった。懸濁液の一部をとり、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P 標識された ATP とともに試験管内でタンパク質のリン酸化反応を行った。この際の反応液(40ml)の組成は 20mM Tris-HCl pH 7.5、10mM  $MgCl_2$ 、10mM  $MnSO_4$ 、39mM [  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ] ATP(0.44 TBq/mmol)であった。この実験の対照区としては  $MnSO_4$  の代わりに、4mM EGTA を用いた緩衝液を用いた。反応液は 30 で 10 分間反応させ電気泳動用緩衝液(8M Urea、2% Triton X-100、2% Ampholine、10% PVP-40)を加えることにより反応を終結させた。2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE) によりタンパク質を分離し、CBB 染色でスポットの分離を確認した後、イメージアナライザーでリン酸化タンパク質のスポットを解析した。

今回の実験で観察されたスポットのうちで非照射の対照区と照射の実験区でスポットの違いを調べたところ、CBB 染色でも判別できるスポットにひとつ違いがあることが判明したので、このスポットに狙いを定め、20 枚の 2D-PAGE からパンチアウトし、スポットからタ

ンパク質を抽出し、ガスフェイズのアミノ酸分析器においてアミノ酸配列の解析を行った。

## 9. 結果

### 9-1. 形質転換植物の作製

イネが耐病性を示す時期に発現しているリポキシゲナーゼ遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子である GUS 遺伝子を接続させたコンストラクトを作製した(図1)。リポキシゲナーゼ遺伝子のプロモーター部分をゲノムクローンから切り出し、植物用ベクター pSLG0 に導入した。コンストラクトは接続部分の塩基配列を調べて確認した。

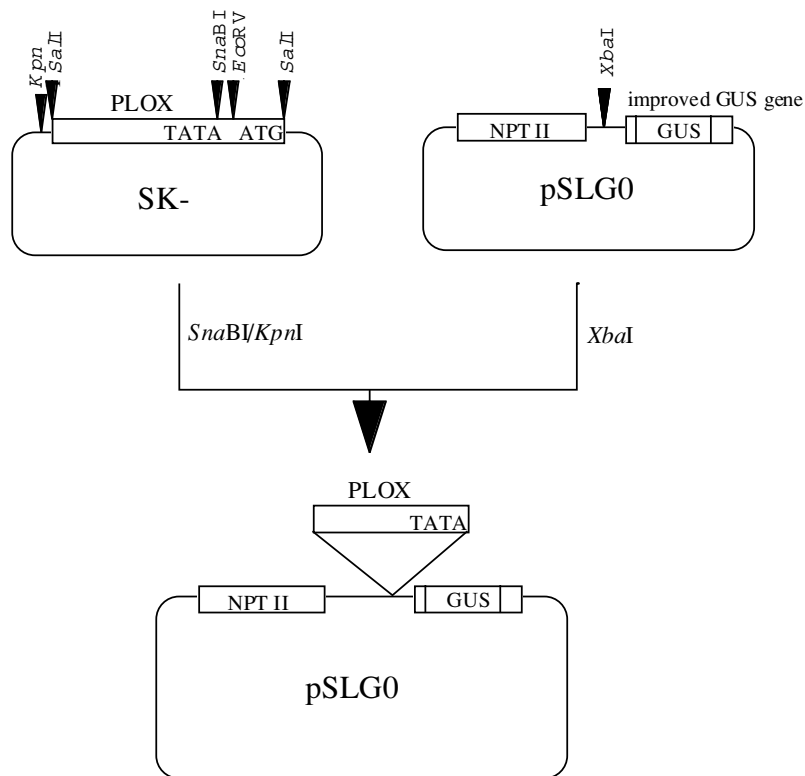


図1 活性酸素シグナルを検出するためのプロモーター/レポーター遺伝子コンストラクトの作製

このコンストラクトを土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 に遺伝子導入し、サザン法により導入を確認した後に、シロイヌナズナの形質転換に用いた。形質転換は約3週間生育させた植物(エコタイプ; Ws)を用いて vacuum infiltration 法で行った(図2、3)。形質転換植物は選抜マーカーとしてコンストラクトに含まれているカナマイシン耐性

遺伝子を指標にして選抜した（図4）。この形質転換植物を生育させ（図5）、種子を採り、次の世代の植物を解析に用いた。組換え体実験指針に基づいて、形質転換植物の育成は全て、形質転換植物用に設計されたチャンバー内で行った。形質転換植物に目的のプロモーター／レポーター遺伝子領域が導入されていることはPCR法により確認した。

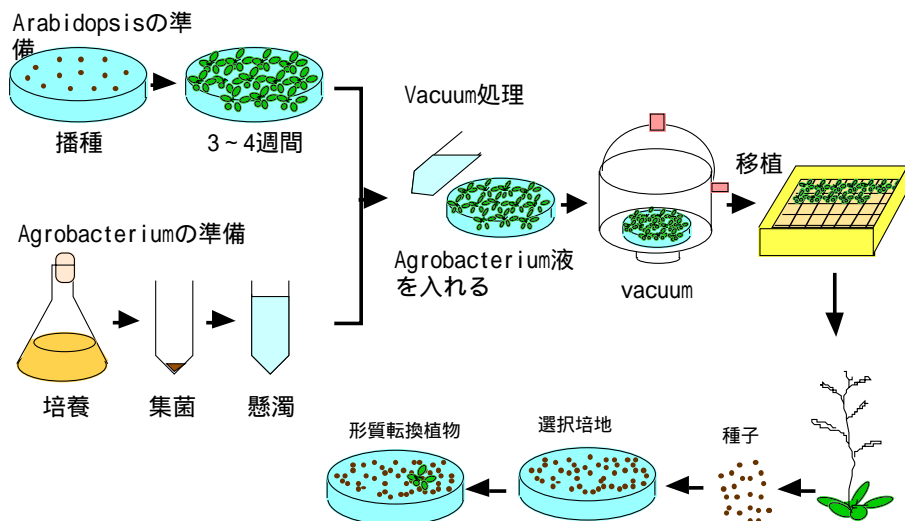


図2 Vacuum infiltration法によるArabidopsisへの遺伝子導入法

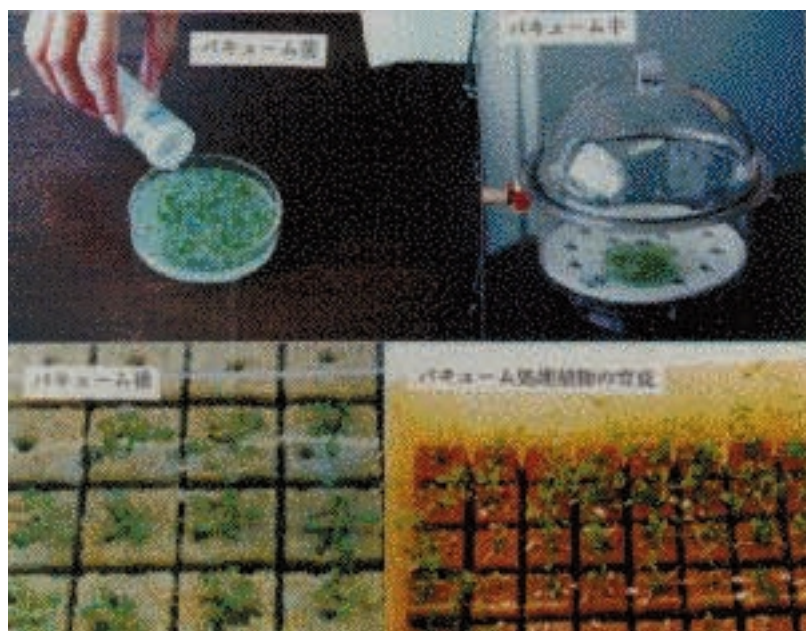


図3 バキューム法による遺伝子導入

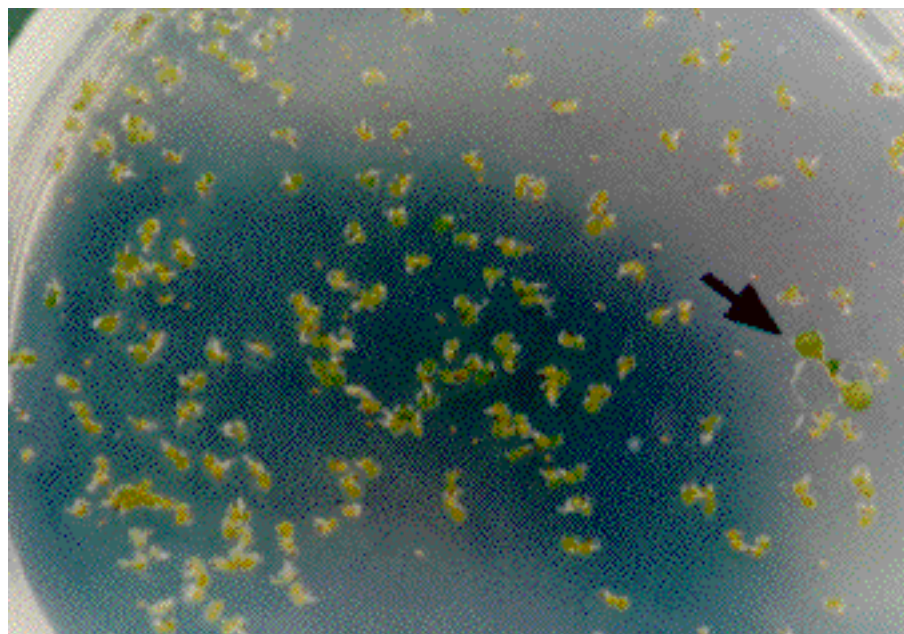


図4 カナマイシン耐性形質転換植物 (矢印)

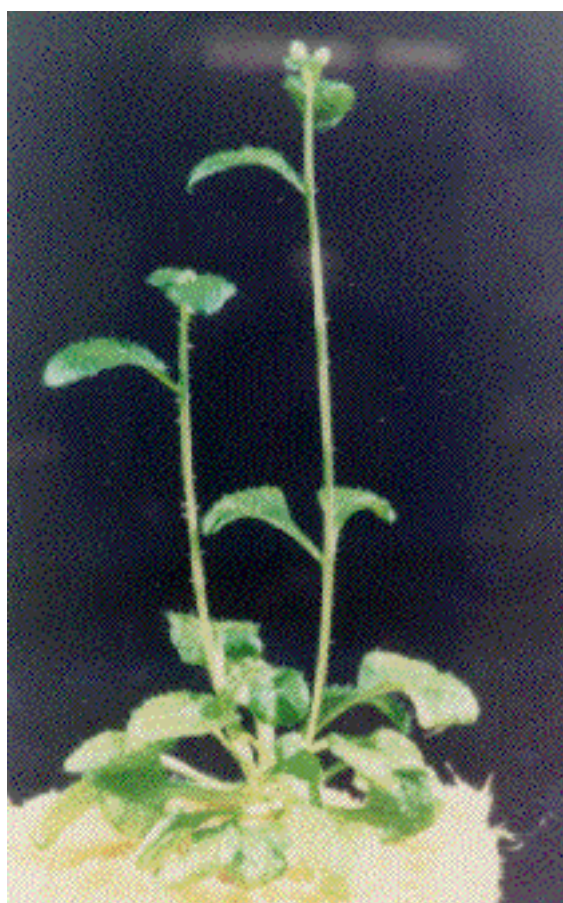


図5 形質転換植物の育成

#### 9-2. 形質転換植物への放射線照射実験

形質転換植物を寒天培地上で約2週間育成して、プレートごと放射線暴露装置に入れて放

射線 (50 Gy/min) を 10 分間照射した。照射した植物を 20℃ で 24 時間おいた後、GUS 遺伝子の産物であるグルクロニダーゼの基質 X-Gluc に浸けて GUS 反応を起こさせた。37℃ で一晩反応させた後、100%のエタノールに浸けて植物の緑色を抜いて、GUS 遺伝子の発現を観察した。その結果、放射線照射した区分には、発現が認められ、本プロモーターが放射線に感受していることが確かめられた (図 6, 7)。

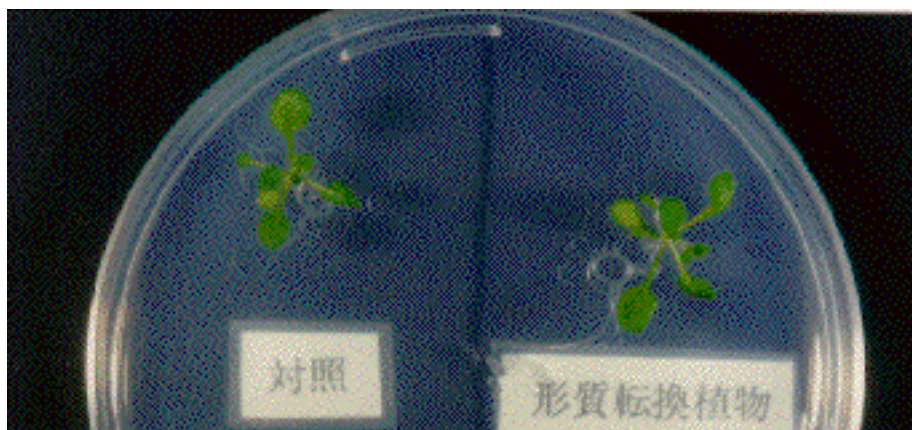


図 6 放射線照射に用いた形質転換植物

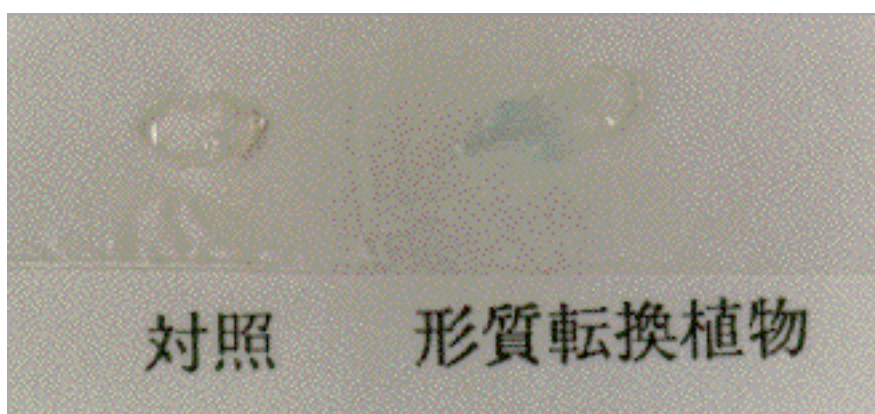


図 7 放射線照射後の GUS 遺伝子の発現  
形質転換植物は GUS 染色によって青色を呈しているが、対照植物は染色されない。

### 9-3 . リン酸化蛋白質の解析

動物における UV 応答の解析から活性酸素を介した信号伝達系には Src ファミリーの Try キナーゼの活性化、Ha-Ras GTP の増大、Raf-1 キナーゼから始まる MAP キナーゼカスケードを経た転写因子 AP-1(c-fos,c-jun)の活性化のモデルが提唱されている (文献 5)。植物においても同様のカスケードが存在するの否かを調べる目的で、放射線照射において細胞内でリン酸化パターンの変化するタンパク質の解析を行った。シロイヌナズナで形態の変化が誘導される照射条件はコバルト 60 線を 2-3K Gy 照射した場合であるが、照射器の関係から 40 分から 60 分の照射時間を要してしまい、シグナル伝達の初期反応の解析には不適當であることが考えられた。そこで、照射量を少なくした場合に生化学的变化が誘導される最低限の照射量はどの程度かを予備実験で調べた結果、3 分間の照射でリン酸化タンパク質

のパターンに差が見いだされることが明らかとなった。そこで研究方法に記載した条件で植物体に照射を行い、タンパク質のスポットの解析を行った。なお、この照射条件でも根の形態変化の誘導は確認された。

リン酸化タンパク質のスポットは照射をすると出現するもの、照射をすると消えるもの、照射をするとサイズが大きくなるもの、照射をしても変化しないものにクラス分けされた。これらのうちでタンパク質の一次構造の解析はある程度の量が必要なため、CBB 染色で検知出来るスポットで照射により変化するものを探した。その結果、図 8 に示した酸性側の分子量 30 K 程度のタンパク質は照射後消失するタイプのタンパク質であるが解析に適していることが明らかとなった。リン酸化がなくなることから、照射により活性化されるフォスファターゼの存在が考えられるが、現在、このタンパク質のスポットに焦点を当て、解析を継続中である。

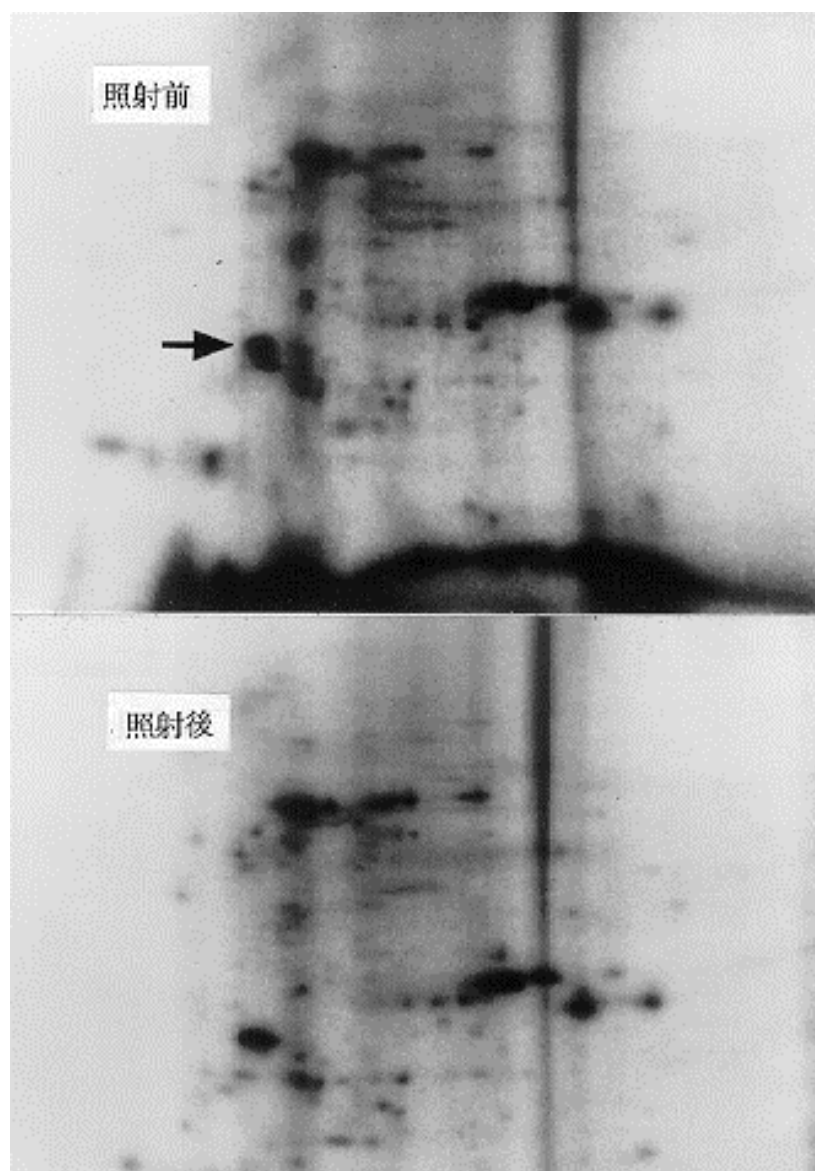


図 8 放射線照射後のリン酸化蛋白質の解析  
照射後と照射前と比較すると、照射によって消失するスポットが見出された。



## 10. 考察

本研究では、病害抵抗性機構に関するイネのリポキシゲナーゼ遺伝子のプロモーターが放射線照射に感受することを、形質転換植物を用いて示した。本研究に用いたリポキシゲナーゼ遺伝子はイネがいもち病菌に感染した場合に、菌の生育を阻止する反応が起きる際に特異的に発現していることが知られており、病害抵抗性機構に関っていると考えられている（文献7）。植物の病害抵抗性反応の初期においては、病害菌と相互作用によって生成した低分子物質（エリシターと称される）が宿主である植物の細胞を刺激して、多量の活性酸素種（主に、スーパーオキシドアニオンと過酸化水素）を放出することが知られている。活性酸素種は放射線の照射によっても発生することが知られているので、病害抵抗性時に発現している遺伝子は放射線の照射によっても発現することが期待される。本研究の結果は、この考え方を指示するものであり、それと同時に、本遺伝子のプロモーターが活性酸素シグナルのレポーターとして利用できる可能性を示唆している。今回の実験においては、レポーター遺伝子として GUS 遺伝子を用いたが、対象区と明かな差は認められるものの、発現は少なく、今後は感度の高いレポーター遺伝子の使用が必要であろう。また、今回の実験では、形質転換植物は1個体しか得られておらず、普遍的な結果を導き出すためには、さらに形質転換植物の数を増やす必要があるだろう。

放射線照射に伴うシグナル伝達機構を調べる目的で、タンパク質のリン酸化を調べたところ、対象区に比べてリン酸化されないタンパク質があることが判明した。通常、シグナル応答に伴いタンパク質のリン酸化が起こるのであるが、今回の結果では、本来はリン酸化されるタンパク質が放射線照射によってリン酸化されなくなっているものが見出された。この結果の解釈は、このタンパク質がリン酸化によって機能がオンになるのかオフになるのかによって異なってくる。通常はリン酸化によって機能がオンになる例が多いが、その場合には、レプレッサーなどの負の機能を担っている可能性がある。つまり、通常はあるシグナル伝達系を抑制しているのであるが、活性酸素シグナルが伝達することによって、その制御がはずれて、活性酸素特有な生理現象発現に関している可能性がある。いずれにしろ、このタンパク質の遺伝子クローニングが当面の目標になるであろう。今回のアミノ酸配列決定の結果は出ておらず、今後の展開が期待される。

## 11. 今後の展開

活性酸素によるシグナル伝達の解明は、植物の遺伝子操作による機能改変をはかる上で重要なステップであると位置づけられる。今回の研究によって、植物での活性酸素シグナルに関する手掛かりが得られたと考えられるが、放射線照射によってリン酸化を受けなくなったタンパク質の同定が、これからの研究の重要な点であろう。本研究は共同研究者の菊池によって引き続き行なわれる予定である。

## 12. 参考文献

- 1) M. C. Mehdy: "Active oxygen species in plant defense against pathogens." *Plant Physiol.* 105, 467-472 (1994)

- 2) J. Paz-Ares, D. Ghosal, U. Wienand, P. A. Peterson and H. Saedler: "The regulatory *cl* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators." *EMBO J.* 6, 3553-3558 (1987)
- 3) S. R. Ludwig, L. F. Habera, S. L. Dellaporta and S. R. Wessler: "Lc, a member of the R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7092-7096 (1989)
- 4) A. M. Lloyd, V. Walbot and R. W. Davis: "Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production activated by maize regulators R and C1." *Science* 258, 1773-1775 (1992)
- 5) Y. Devary, R. A. Gottlieb, T. Smeal and M. Karin: "The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases." *Cell* 71, 1081-1091 (1992)
- 6) D. G. Oppenheimer, P. L. Herman, J. Esch, S. Sivakumaran and M. D. Marks: "A myb-related gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules." *Cell* 67, 483-493 (1991)
- 8) D. Shibata: "Plant Lipoxygenase Genes" in "Lipoxygenases and Lipoxygenase Pathway Enzymes" ed. by G. Piazza AOC PRESS (1996)
- 9) D. Shibata and B. Axelrod: "Plant Lipoxygenases" *J. Lipid Mediators Cell Signaling* 12, 213-228 (1995)
- 7) Y-L. Peng, Y. Shirano, H. Ohta, T. Hibino, K. Tanaka and D. Shibata: "A novel lipoxygenase from rice: Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus." *J. Biol. Chem.* 269, 3755-3761 (1994)

### 13 . 研究業績

13 - 1 . 原著論文   なし

13 - 2 . 総説など   なし

13 - 3 . 国際学会発表   なし

13 - 4 . 国内学会発表   なし

13 - 5 . 新聞など   なし

13 - 6 . 特許   なし

14 .

(1) Signal transduction via active oxygen species in plants

(2) Mitusi Plant Biotechnology Research Institute

(3) Daisuke Shibata, Yumiko Shirano, Kaori Furuya

(4) Shoshi Kikuchi, Department of Molecular Biology, National Institute of Agrobiological Resources

(5) 1996 – 1997

(6) Abstract

A promoter/reporter construct was prepared by fusing a promoter sequence of the pathogen-inducible rice lipoxygenase gene *Lox2:Os1* with the glucuronidase (GUS) gene. The fusion gene construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV2260. *Agrobacterium*-mediated transformation of the higher plant *Arabidopsis thaliana* was carried out by the vacuum infiltration method. A transgenic plant expressing the promoter/GUS gene that was obtained from about 5,000 T2 seeds was irradiated with gamma ray (600 Gy) and then kept at 20 C for 24 hours. GUS activity was detected in the transgenic plant but not in the control plant. These results indicate that the lipoxygenase gene promoter responds to gamma irradiation, suggesting that a signal from active oxygen species activates the gene promoter.

We analyzed protein phosphorylation after gamma ray irradiation in *A. thaliana*. The plants were irradiated for 3 min with gamma ray (150 Gy), and immediately homogenized with buffer. The homogenate was mixed with <sup>32</sup>P ATP for protein phosphorylation. Proteins in the reaction mixture were separated by 2-d polyacrylamide gel electrophoresis. We identified several spots that were labeled with <sup>32</sup>P in the control plants but not in the irradiated plants. Amino acid sequencing of these proteins, especially a protein that was detectable also by CBB staining, has been under investigation.