

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21580124
 研究課題名（和文） 植物におけるミロシナーゼ-グルコシノレート・システムの新たな機能解析
 研究課題名（英文） A novel role for the myrosinase-glucosinolate system in phototropic response
 研究代表者
 山田 小須弥（YAMADA KOSUMI）
 筑波大学・生命環境系・准教授
 研究者番号：70292521

研究成果の概要（和文）：高等植物の光屈性メカニズムを光誘導性の成長抑制物質（光屈性制御物質）の観点から解明することを目的として様々な生理化学的解析を行った。植物が光屈性刺激を感受すると、単子葉・双子葉植物にそれぞれ固有の光屈性制御物質が照射側組織で作られ、続いて H_2O_2 およびリグニンの蓄積が誘導されて最終的に光側組織の細胞の一時的な硬直化が生じることが明らかにされた。光屈性制御物質の種特異性は各植物が具備する生体防御反応（ファイトアレキシン産生）の違いにより説明可能であり、光屈性の誘導メカニズムと生体防御反応とのクロストークの可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Blue light induces many adaptive responses in plants, including the phototropism. To clarify the mechanism of growth inhibition in response to phototropic response, the isolation and identification of various growth inhibitors (PRS: phototropism regulating substances) has been attempted. To understand the mechanism of growth inhibition induced by PRS, physiological and genetic analyses have been performed. We found that phototropic stimulation induces H_2O_2 accumulation via the up-regulation of PRS (e. g. 4-MTBI and raphanusanins in radish, DIMBOA and MBOA in maize). We also found that PRSs contribute to their growth inhibitory activity by promoting H_2O_2 synthesis and subsequent lignification, which could increase the stiffness at the primary cell-wall level. These results suggest a close association between an oxidative burst and phototropic curvature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：光屈性、植物成長調節物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 光屈性は植物が一方向からの光に対して莖を光の方向に屈曲させる現象であり、植物全般が具備する環境応答反応として知られているが、その反応メカニズムについては不明な点が多い。光屈性を誘導する「初期要因」が、従来の植物ホルモン・オーキシンの横移動にともなう影側組織の成長促進ではなく、光屈性刺激によって新たに生成するオーキシン活性抑制物質（光屈性制御物質）による光側組織の成長抑制であるという仮説が90年代前半に提唱されて以来、数多くの光屈性制御物質の探索が行われてきた。双子葉植物としてアブラナ科のダイコンおよびシロイヌナズナ芽生え、単子葉植物としてイネ科のトウモロコシ芽生えなどを実験材料として光屈性刺激（青色光照射）により内生量が顕著に増加する物質を単離・同定したところ、興味深いことにその多くは各植物固有のファイトアレキシン（生体防御物質）であった。

(2) ダイコン芽生えではミロシナーゼ-グルコシノレート・システムと呼ばれる防御応答反応によって生成するイソチオシアネートの一種、4-MTBI およびその代謝物であるラファナスニンが刺激後すみやかに光側組織中で増加することが明らかになり、さらにミロシナーゼの酵素活性および遺伝子の転写レベルの上昇も確認された。また、トウモロコシ芽生えにおいてもファイトアレキシン合成に関連した酵素に着目した光屈性の研究が行われ、光照射側組織におけるファイトアレキシン量（ベンゾキサジノイドの一種、DIMBOA およびその代謝物である MBOA）の増加ならびに生成に関わる酵素（DIMBOA-glucosidase）活性や転写レベルの上昇が観察された。これらの結果から、光屈性反応の初期応答と生体防御反応には何らかの関連性があることが強く示唆されていた。

2. 研究の目的

「ミロシナーゼ-グルコシノレート・システム」は含硫配糖体のグルコシノレートが加水分解酵素・ミロシナーゼによってファイトアレキシン（主な物質としてイソチオシアネートが挙げられる）を生成するアブラナ科植物で主に知られた生物機能である。一方、イネ科植物ではベンゾキサジノイド（例えば DIMBOA および MBOA など）を生成する反応系が良く知られており、この反応には基質とな

る DIMBOA 配糖体およびその特異的加水分解酵素である DIMBOA-グルコシダーゼが関与していることが知られている。本研究はミロシナーゼ-グルコシノレート・システムおよびベンゾキサジノイド生成機構が光屈性反応における光照射側組織の細胞伸長にどのように関与しているのか、さらに両反応系を介して生成した光屈性制御物質による成長抑制メカニズムの類似性について、生理化学的アプローチによって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 植物の培養

①トウモロコシ芽生え

トウモロコシ種子は流水中で12時間吸水（暗所）後、湿らせたバーミキュライト上に播種した（室温25℃）。その後24時間赤色光（ $0.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）下で培養し、更に暗所で2日間培養した。実験の約24時間前に緑色安全光の下で湿らせたバーミキュライトの入った小型シートリングケースに植え替えを行い、最終的に4日齢の芽生え（幼葉鞘の長さが3.5~4.0 cm）を実験に供した。なお、*bx1* 変異株は Maize Genetics Cooperation Stock Centerより入手した。

②ダイコン芽生え

ダイコン（桜島大根）種子は室温（暗所）で1時間程度吸水させた後、湿らせたバーミキュライト上に播種した（25℃）。その後暗所で4日間培養した。実験の約24時間前に緑色安全光の下で湿らせたバーミキュライトの入った小型シートリングケースに植え替えを行い、最終的に4日齢の芽生え（下胚軸の長さが約4.0 cm）を実験に供した。

(2) 光屈性刺激

光屈性実験用の光源として、青色LED光あるいは白色蛍光灯をスリット状の青色アクリル製フィルター（パラグラス、クラレ）で分光して得られた青色光（ $0.05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）を用いた。光屈性刺激はスリットが芽生えの先端部とほぼ同じ高さになるように調節して与えた。屈曲角度はカメラで一定時間毎のインターバル撮影により記録し、撮影画像を基に測定した。

(3) 化合物の投与

一定量のラノリンを小型シャーレに量りとり、各濃度に有機溶媒で調製した化合物を加え温めながら混合させた。コントロールと

して等量の溶媒だけを混合したラノリンペーストを用意した。緑色安全光下で爪楊枝を用い、ダイコン芽生えの場合はフック直下から 2 cm の幅で、トウモロコシ芽生えの場合は幼葉鞘と中胚軸とのジャンクションのより上の 2 cm に片側投与した。

(4) H₂O₂の局在部位の可視化

H₂O₂の局在部位の可視化については、過去に報告されているTissue print法を用いた(Schopfer et al., Plant Physiol., 1994)。ニトロセルロース膜(Hybond-C Extra、アマシヤム社)は 10%デンプン水溶液(w/v)に終濃度が 0.5 Mになるようヨウ化カリウムを加えて調製したKI-starch反応液に浸し、ドライヤーで乾燥させた。ヨウ化カリウムの酸化による影響を最小限に抑えるため、ニトロセルロース膜は 2 時間以内に使用した。これらの操作は緑色安全光下で行った。青色光照射または化合物を投与した芽生えの屈曲部位をそれぞれカミソリで切り出し、切断面を均等な圧力でニトロセルロース膜に約 60 秒間押しつけた。60 分程度ニトロセルロース膜を暗所・室温に放置した後、実体顕微鏡で観察し、画像を記録した。

(5) リグニンの局在部位の可視化

リグニンの局在部位の可視化については、フロログルシノール - 塩酸による染色法を用いた(Pomar et al., Protoplasma, 2002)。染色液はフロログルシノールを 99.5%エタノールおよび 10.1 M塩酸(25/75, v/v)を用いて終濃度 1%フロログルシノール - 塩酸液(w/v)になるよう調製した。青色光照射または化合物を投与した芽生えからカミソリを用いて屈曲部位の薄切片を作成し、直ちにフロログルシノール - 塩酸染色液に浸し、10 分間染色を行った。これらの操作は全て緑色安全光下にて行った。染色後、H₂Oを数滴たらしたスライドガラスに切片を乗せ、光学顕微鏡で観察を行い、画像を記録した。

(6) ラファヌサニン誘導性遺伝子のライブラリーの作成およびクローニング

常法に従って単離したラファヌサニンをラノリンにまぶし、4 日齢のダイコン黄化芽生えの胚軸(フック下 2 cm)に片側投与した。一定時間後に胚軸を切り出し、液体窒素中で凍結させた。サブトラクション法による遺伝子ライブラリーの作成は使用したキット(PCR-select cDNA subtraction kit、クローンテック社)の説明書に従って行った。ラファヌサニン処理および青色光照射によ

る遺伝子発現プロファイリングはリアルタイム PCR 法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 光屈性刺激にともなう過酸化水素(H₂O₂)およびリグニンの蓄積

シロイヌナズナよりも植物サイズが大きく、同じアブラナ科のダイコン芽生えを材料にして、光屈性刺激によって誘導される光照射側の成長抑制の原因の一つとして考えられている細胞の一時的な硬直化(cell wall stiffness)について詳細な検討を行った。ダイコン芽生えの光屈性を誘導する最適な光エネルギー量(青色光)を検討し、その光エネルギー条件下で経時的にダイコン芽生えの下胚軸をサンプリングし、過酸化水素(H₂O₂)およびリグニン量のカイネティクスを調べた。

ダイコン芽生えの屈曲角度の経時変化と光照射側組織におけるH₂O₂およびリグニンの蓄積量を比較・検討したところ、両パラメーター共に屈曲開始時期に先立ち、増加していることが確認された。続いて、光屈性刺激にともないH₂O₂およびリグニンが光照射側組織で蓄積する様子を可視化するため、先ずH₂O₂の蓄積についてTissue-printing法および生体染色法(DAB染色)を用いて検討した。Tissue-printing法では光屈性刺激を与えてから 30 分後には光側組織でH₂O₂由来のシグナルが観察された。H₂O₂の蓄積はその後、60 分、90 分後まで観察されたが、120 分後には明瞭なシグナルが確認できなかった。生体染色法については検出感度の問題もあり、光照射側ならびに影側組織における明瞭な差異は観察できなかった。一方、リグニンの蓄積については胚軸の薄切片を調製し、フロログルシノール-塩酸により染色したプレパラートを顕微鏡下で観察した。リグニンの蓄積にともなうシグナルは光照射側組織の隣り合う細胞同士の接合部位で観察された。特に強いシグナルが皮層部位で確認された。これらの結果はトウモロコシ芽生えにおけるH₂O₂およびリグニン量の定量実験で得られた知見と一致しており、光屈性刺激によってcell wall stiffnessが誘導され、その結果光照射側組織の成長抑制が引き起こされるというメカニズムは植物普遍的なものである可能性が示唆された。

(2) 光屈性制御物質投与による応答(ダイコン芽生え)

光屈性刺激にともない、光照射側組織においてH₂O₂およびリグニンの蓄積が確認された

ことから、次にミロシナーゼ-グルコシノレート・システムによって生成するイソチシアネートの一種、4-MTBIおよびその代謝物であるラファヌサニンをダイコン芽生えの片側にラノリンにまぶして投与し、 H_2O_2 およびリグニン蓄積のカイネティクスを調べた。なお、投与量は内生の4-MTBIおよびラファヌサニン量を基に決定した。その結果、片側投与開始から30分後には投与側組織で H_2O_2 由来のシグナルが観察された。 H_2O_2 の蓄積はその後、60分、90分後まで観察された。シグナルは光屈性刺激と比較してより強く観察された。一方、リグニンの蓄積についても光屈性刺激の場合と同様の方法で調べたところ、投与側組織でシグナルが観察された。これらの結果は光屈性刺激に応答して照射側組織で生成した4-MTBIおよびその代謝物であるラファヌサニンが H_2O_2 およびリグニンの蓄積を誘導している可能性を強く示唆している。

(3) 光屈性制御物質投与による応答 (トウモロコシ芽生え)

先行研究より、光屈性刺激に応答してトウモロコシ芽生えの照射側組織における H_2O_2 およびリグニンの内生量が増加することが機器分析により明らかとなっていた。前述のダイコン芽生えの実験で用いた手法により、トウモロコシ芽生えにおける光屈性刺激、ならびにベンゾキサゾリノンの一種・DIMBOAを片側投与した際の幼葉鞘における H_2O_2 およびリグニン蓄積の可視化実験を行った。その結果、ダイコン下胚軸で観察された場合と同様に、光屈性刺激にともない照射側組織で一過的な H_2O_2 由来のシグナルが観察された (図1参照)。

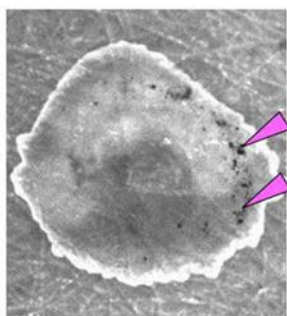


図1 光屈性刺激にともなう H_2O_2 の蓄積 (トウモロコシ芽生え、右側から刺激を与えた)

また、リグニンの蓄積についても光屈性刺激によって照射側組織でシグナルが観察された。さらに、リグニン由来のシグナルはDIMBOA処理を行った場合においても投与側

組織で観察された。また、後述する*bx1* 変異株においても光屈性刺激後に H_2O_2 およびリグニン蓄積の可視化実験を行った。その結果、両パラメーター共に照射側組織で非常に弱いシグナルしか観察されなかった。以上の結果より、光屈性刺激に応答してトウモロコシ芽生えの照射側組織で生成したベンゾキサジノイドが H_2O_2 およびリグニンの蓄積にともなうcell wall stiffnessを誘導することが示唆された (図2参照)。

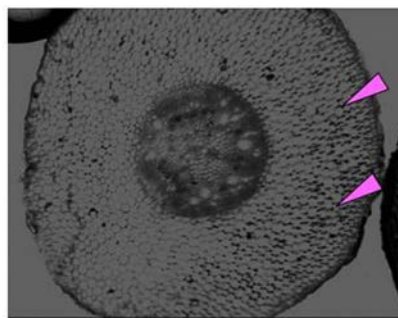


図2 光屈性刺激にともなうリグニンの蓄積 (トウモロコシ芽生え、右側から刺激を与えた)

(5) ベンゾキサジノイド欠損トウモロコシ芽生えにおける光屈性反応

先行研究からトウモロコシ芽生えにおいて、光屈性制御物質生成に関わる重要な加水分解酵素であるDIMBOA-glucosidaseの阻害剤をあらかじめ植物体に取り込ませておくと、その後の光屈性反応が顕著に抑制されることが報告されている (Jabeen et al., J. Plant Physiol. 2006)。しかし、阻害剤実験はターゲット酵素以外への影響も否定できない。そこで、トウモロコシ*bx1* 変異株 (インドール化合物由来のDIMBOA生成能欠損体, Frey et al., Science, 1997) を用いて光屈性反応を調べ、同時に行った野生株の反応と比較・検討を行った。

光屈性刺激開始から約4時間後に屈曲の様子を観察してみると、予想に反して*bx1* 変異株も正常な光屈性反応を示していた。しかし、光屈性反応のカイネティクスを詳細に分析したところ、野生型の芽生えでは照射開始60分以内に明瞭な屈曲を示したが、その時点で*bx1* 変異株はほとんど屈曲していなかった。しかし*bx1* 変異株ではその後90分から120分後にかけて屈曲が観察され、およそ180分後には野生型とほぼ同程度の屈曲を示した。以上の結果から光屈性制御物質の役割として、光屈性は二相性の反応によって制御されており、光屈性制御物質はそのうちの初期応答反応で重要な役割を担っており、その後は従来から報告されているような植物ホルモ

ン・オーキシンの偏差分布により制御されている可能性が示唆された。

(6) ラファヌサニン誘導性遺伝子の探索

ラファヌサニンはダイコン芽生えの光屈性制御物質の一つとして単離され、その植物成長抑制活性は同じ光屈性制御物質の4-MTBIを凌ぐものである。このラファヌサニンの生理作用メカニズムを分子レベルで明らかにする目的で、サブトラクション法を用いたラファヌサニン誘導性遺伝子のライブラリーの作成、およびスクリーニングを行った。作成したライブラリーからクローニングされた遺伝子の多く(55%)は植物の防御応答に関連するものであった(図3参照)。主なものとしてトランスポーター、加水分解酵素、プロテイン・キナーゼおよびシグナル伝達因子が確認された。また、クローニングされた88種類のラファヌサニン誘導性遺伝子のうち、様々な機能を有する50個の遺伝子を選抜して、その発現プロファイルを調べたところ、44個の遺伝子はラファヌサニン処理によって発現が誘導され、4個は抑制されていた。更にラファヌサニン処理によって発現が強く誘導された33個の遺伝子のうち、25個の遺伝子については様々な光エネルギー量の青色光照射(光屈性刺激)によっても同様に発現の誘導が見られた。今回の光屈性制御物質であるラファヌサニンによって制御される遺伝子群の網羅的解析によって、光屈性の初期応答と生体防御応答は一部クロストークしている可能性が遺伝子レベルからも明らかにされた。

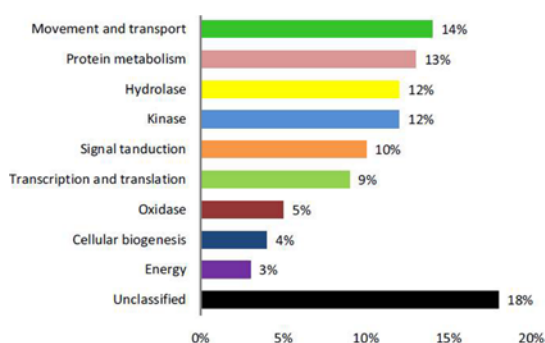


図3 ラファヌサニン処理によって発現が誘導された遺伝子タイプ (Moehninsi et al., BMC Plant Biology, 2010より引用)

(7) まとめおよび今後の展望

本研究で得られた知見は、ミロシナーゼ-グルコシノレート・システムに代表されるファイトアレキシン産生をとまなう生体防御反応が光屈性反応、特にその初期応答において重要な役割を担っていることを示唆するものであり、光屈性メカニズムを理解する上で非常に興味深い。双子葉植物のシロイヌナ

ズナを用いたミロシナーゼ欠損変異株、あるいは過剰発現株などによる分子レベルでの詳細な検討が今後必要となってくるが、これらの研究成果は将来、農作物の増産、農作物への高付加価値の付与、環境低付加型農業の開発などに貢献す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4件)

- ① Ando, S., Sato, Y., Shigemori, H., Shimizu, T., Okada, K., Yamane, H., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Yamada, K., Akimoto-Tomiya, C., Tanabe, S., Nishizawa, Y. and Minami, E. Identification and characterization of 2'-deoxyuridine from the supernatant of conidial suspensions of rice blast fungus as an infection-promoting factor in rice plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**, 519-532, 2011. (有)
- ② Nakajyo, H., Hisamatsu, Y., Goto, N., Yamada, K., Hasegawa, K. and Shigemori, H. Structure-activity relationships on senescence-promoting effect of arabidopsides from *Arabidopsis thaliana*. *Heterocycles*, **83**, 57-62, 2010. (有)
- ③ Moehninsi, Miura, K., Nakajyo, H., Yamada, K., Hasegawa, K. and Shigemori, H. Comparative transcriptional profiling-based identification of raphanusanin-inducible genes. *BMC Plant Biology*, **10**, 111-127, 2010. (有)
- ④ Ando, S., Tanabe, S., Shigemori, H., Yamada, K., Shimizu, T., Okada, K., Yamane, H., Akimoto-Tomiya, C., Nishizawa, Y. and Minami, E. *Magnaporthe oryzae*: a tool for the molecular analysis of compatibility. *Journal of Pesticide Science*, **34**, 335-338, 2009. (有)

[学会発表] (計8件)

- ① 山田小須弥、Riffat JABEEN、長谷川剛、長谷川宏司、繁森英幸 青色光照射によって誘導されるcell-wall stiffnessと光屈性との関連性 植物化学調節学会第46回大会(2011年11月1-2日、宇都宮大学)
- ② Kosumi Yamada, Taeko Narisawa, Moehninsi, Haruyuki Nakajyo, Tsuyoshi Hasegawa, Koji Hasegawa, Hideyuki Shigemori The role of isothiocyanate and its derivatives in the blue light-induced growth inhibition of

radish hypocotyls. 8th International Workshop Sulfur Metabolism in Higher Plants (November 22-27, 2010, Australia)

- ③ 成澤多恵子、山田小須弥、モーニンスイー、中城治之、長谷川剛、長谷川宏司、繁森英幸 ダイコン下胚軸の光屈性におけるイソチオシアネートの役割 植物化学調節学会第45回大会 (2010年11月1-2日、神戸大学)
- ④ Moehninsi, Kosumi Yamada, Kenji Miura, Hideyuki Shigemori Identification and characterization of raphanusanin-induced genes in etiolated radish hypocotyls. 第51回日本植物生理学会年会 (2010年3月18-21日、熊本大学)

〔図書〕 (計1件)

山田小須弥：“植物の感覚と運動”、“芽と葉の不思議”、“人間を助ける植物”、「博士教えてください—植物の不思議—」(長谷川宏司・広瀬克利編著)、大学教育出版、pp. 75-77, 128-131, 210-213, 221-223, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 小須弥 (YAMADA KOSUMI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：70292521