

## ピリジンヌクレオチドを介した植物生理応答の制御機構の解明

丸田隆典

### 目 的

NAD(P)H は生体内で種々の代謝への還元力として必要不可欠であるとともに、細胞内酸化還元状態の制御にも重要である。また、ピリジンヌクレオチドの量または酸化還元比（細胞内 NAD(P)(H)ステータス）の変化がシグナルとして作用し、植物の生理応答、特にストレス応答の制御に重要である可能性が古くから示唆されていた。しかし、その分子機構は未解明のままである。

これまでに、ヌクレオシド 2 リン酸由来の化合物に対して加水分解活性を持つ酵素ファミリー、Nudix hydrolase (NUDX) に着目し、シロイヌナズナにおけるそれらの分子特性の解明を試みてきており (Ogawa et al., 2008; Maruta et al., 2012b), 1) 葉緑体型 NUDX19 が NADPH に特異的な加水分解活性を持つ唯一の NUDX であること, 2) 本酵素の欠損または過剰発現により細胞内 NAD(P)(H)ステータスが変化すること, そして 3) 本酵素の欠損株は強光ストレスに高い耐性能を有することを明らかにしてきた。そこで本研究では、NUDX19 欠損株を用いたマイクロアレイ解析により、NAD(P)(H)ステータスの遺伝子発現に及ぼす影響を解析し、そのシグナルとしての生理作用を明らかにすることを目的とした。

### 方 法

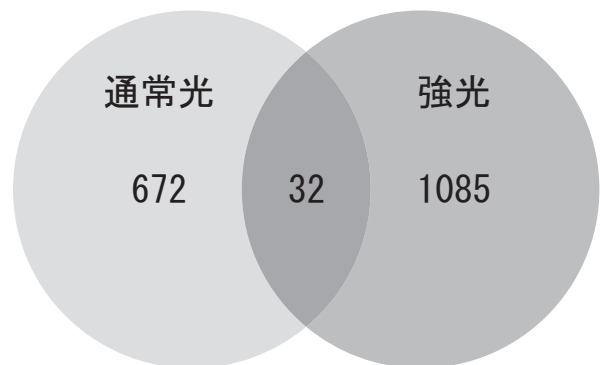
明期 ( $100\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) 16 時間, 暗期 8 時間の光条件 (通常条件とする) で 3 週間土耕栽培した野生株および NUDX19 欠損株に強光 ( $1,200\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) を 6 時間照射した。葉から Total RNA を抽出し、Affymetrix 社のプロトコルに従ってマイクロアレイ解析 (Arabidopsis ATH1 Genome Array, Affymetrix) を行った。また、サリチル酸 (SA) の定量は、Maruta et al. (2012a) に従って行った。また、ホルモン感受性試験は、MS 培地上で 2 日間栽培した野生株および欠損株を、種々の濃度の SA, ジャスモン酸メチル (MeJA) およびアブシジン酸 (ABA) を含む MS 培地に移し、さらに 10 日間栽培したときの根の長さを測定することにより行った。

### 結 果

マイクロアレイ解析により、NUDX19 欠損株において 2 倍以上または 1/2 以下に発現の変化する遺伝子群の同定を試みた。その結果、通常および強光条件下の欠損株においてそれぞれ 704 および 1117 個の遺伝子群の発現が変

化することが明らかになった。興味深いことに、それらのグループ間での遺伝子の重複性はほとんど見られなかった (第 1 図)。また、強光ストレス防御に関連する遺伝子 (例えば抗酸化や光合成に関連する酵素など) の誘導も認められなかった。一方、発現遺伝子の詳細なクラスタリング解析の結果、NAD(P)(H)ステータス変化は SA 生合成/応答遺伝子発現と密接に関連することが示唆された。

次に、野生株および NUDX19 欠損株における SA レベルを測定したところ、通常および強光条件下においてサリチル酸が欠損株で増加することが分かった。さらに、NUDX19 欠損株は SA に対して高感受性を示した。SA は他の植物ホルモンである MeJA や ABA と拮抗的に作用することが知られている。そこで、MeJA および ABA に対する感受性を調べたところ、NUDX19 欠損株はそれらのホルモンに対しては非感受性を示した。



第 1 図 NUDX19 欠損の遺伝子発現に及ぼす影響  
通常および強光条件下の NUDX19 欠損株において発現変化していた遺伝子数を示す。

### 考 察

本研究により、NAD(P)(H)ステータスにより発現制御を受ける候補遺伝子群が 1700 個以上同定され、本ステータスのシグナルとしての可能性が大きく示された。興味深いことに、NUDX19 欠損株における遺伝子発現の変化は、光強度の違いによって大きく異なっていたことから、NAD(P)(H)ステータスのシグナルとしての作用は光環境によって異なることが示唆された。一方、これまでに NUDX19 欠損株の強光耐性の表現型は抗および光合成酵素の活性増加に起因することが明らかになっているが、抗酸化および光合成に関連する遺伝子の発現が欠損株で増加していなかった。このことは、NAD(P)(H)ステータスによるそれらの酵素の翻訳後修飾による活性化機構の

存在を示唆した。発現遺伝子の詳細なクラスタリング解析により、NAD(P)(H)ステータスはSA生合成/応答遺伝子発現制御に関与する可能性が示唆された。事実、欠損株は高濃度のSAを含み、SAに対して高感受性を示した。さらに、傷害や乾燥ストレス応答に重要なMeJAおよびABAに対しては非感受性を示した。以上より、NUDX19によるNAD(P)(H)ステータスの制御は植物ホルモンを介したストレス応答のバランス制御に寄与することが示唆された。

### 引用文献

Maruta, T., Noshi, M., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2012a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered retrograde signaling from

chloroplasts to nucleus plays specific role in response to stress. *Journal of Biological Chemistry*, **287**: 11717-11729.

Maruta, T., Yoshimoto, T., Ito, D., Ogawa, T., Tamoi, M., Yoshimura, K. and Shigeoka, S. (2012b) An Arabidopsis FAD Pyrophosphohydrolase, AtNUDX23, is Involved in Flavin Homeostasis. *Plant and Cell Physiology*, **53**: 1106-1116.

Ogawa, T., Yoshimura, K., Miyake, H., Ishikawa, K., Ito, D., Tanabe, N. and Shigeoka, S. (2008) Molecular characterization of organelle-type Nudix hydrolases in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, **148**: 1412-1424.