

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20985

研究課題名(和文)藻類におけるアブシジン酸シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of ABA signal transduction system in algae

研究代表者

小林 勇気 (Kobayashi, Yuki)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：80644616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)の藻類における機能やシグナル伝達機構における知見は少ない。申請者は、単細胞紅藻シゾンにもABAが存在し、機能していることを明らかにしている。しかし、ABAシグナル伝達機構は不明である。藻類には陸上植物のABA受容体は存在しないが、下流の制御因子であるPP2CとSnRK2は存在しており、これらを用いたシグナル伝達系が藻類でも存在していることが予測され検証を行った。その結果、PP2CとSnRK2共にシゾンでもABAシグナル伝達因子として機能していた。さらに下流の転写因子やプロモーターについても明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ABA is a phytohormone, which acts the tolerance of abiotic stresses in land plants. In a recent study, we found that ABA is synthesized in primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* under salt stress condition and prevents the cell-cycle initiation. However, ABA signal transduction system in *C. merolae* is remain unclear. While land plants contain a specific ABA receptor protein, no counterpart has been found in algal species. Other ABA signal transduction components in the land plants, PP2C and SnRK2 proteins, exist on the *C. merolae* genome. In this study, we constructed over expression or antisense strain of CmPP2C and CmSnRK2. The CmPP2C antisense and CmSnRK2 over expression strains showed ABA response under non-ABA treatment condition. Covertly, the CmPP2C over expression and CmSnRK2 antisense strain did not show the ABA response under ABA treatment condition. These observations suggested that *C. merolae* has an ABA signal transduction system similar to that in land plants.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アブシジン酸 植物ホルモン 細胞周期 藻類

1. 研究開始当初の背景

ABA は植物ホルモンの一種として組織の休眠や成長抑制、ストレス応答のシグナルとして働いている。陸上植物では、作用機序も明らかにされており、近年、長年の謎であった ABA 受容体が発見されシグナル伝達機構の理解も急速に進んでいる。永らく ABA は蘚類(コケ植物)以上の陸上植物にしか存在しないと考えられてきたが、近年の報告から一部の原核生物や単細胞性の藻類まで多種の生物間に存在することが明らかにされた。ABA は原核生物であるラン藻でも発見されているが、酸化ストレスによるカロテノイドの非酵素的な分解産物として存在していると考えられており、細胞内での機能を持たない。偶発的に合成された物質が、植物ホルモンとして多様なシグナル伝達を行うようになった進化的な意義・機構について、興味が高まっている。しかし、陸上植物以外での ABA の機能や作用機序を解き明かした例はおどろくほど少ない。そこで申請者は最も初期に分岐した植物であることがゲノム解析によって明らかになっている原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) で解析を行った。ABA 添加によってシゾンではテトラピロールの一種であり、タンパク質に結合していない状態の Free heme が減少することが明らかになった。この Free Heme の減少は ABA によって誘導される TSPO タンパク質によって引き起こされていることを突き止めた。生体内において Free Heme の減少は細胞周期の停止を引き起こす。さらに解析を進め原始紅藻であるシゾンにおいても ABA が存在していること、塩ストレスによって ABA が誘導されること、ABA は細胞周期を停止させることで、細胞の塩耐性を上昇させることを明らかにした。これは ABA がテトラピロールを介して細胞周期制御に関わっていることを示した初の事例である。このように陸上植物以外の生物で ABA の効果と

作用機序が明らかにされた例はなく、シゾンで解析を進めることで藻類における ABA の機能とシグナル伝達を含む分子機構が明らかになることが予想された。近年、陸上植物で ABA レセプターである RCAR/PYR が発見された。通常 ABA シグナルを正に制御するリン酸化酵素 SnRK2 が脱リン酸化酵素である PP2C によって不活性化されている。RCAR/PYR は ABA 存在下で PP2C と結合することで SnRK2 への脱リン酸化を阻害する。これにより SnRK2 が活性化し標的タンパク質がリン酸化され、ABA 応答が引き起こされる(図1)。ABA レセプターである RCAR/PYR、脱リン酸化酵素である PP2C、リン酸化酵素である SnRK2 が ABA シグナル伝達機構のキー因子である。RCAR/PYR は陸上植物以外では保存されておらず、異なるシグナル伝達機構が存在していることが示唆されている。また、RCAR/PYR 以外にもレセプターが存在することが予測されている。シゾンでは RCAR/PYR は保存されていないが、陸上植物のものと高く保存された SnRK2 と PP2C を持っていることがデータベース解析の結果明らかになった。また、陸上植物では ABA 応答は SnRK2 の下流に位置する bZIP 型転写因子によって制御されているがシゾンでも bZIP 型転写因子は保存されている。このように陸上植物と同様の ABA シグナル伝達因子がシゾンにも存在することから、藻類でも陸上植物とレセプター以外は類似した機構でシグナル伝達を行っている可能性が高い。そこで本研究ではシゾンを用いて藻類における ABA レセプターの探索および ABA シグナル伝達機構の解明を目的とする。本研究で明らかになるであろう ABA シグナル伝達機構をテトラピロール量制御の上流因子として組み込むことでテトラピロールを介したグローバルな細胞内制御系のモデルを提示することが出来る。

2. 研究の目的

本研究ではシズンを用いて、藻類における ABA シグナル伝達機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本申請研究ではシズンにも陸上植物と類似性の高い ABA シグナル伝達機構があるという仮説に基づいて、陸上植物のホモログを生化学的に解析し機能を明らかにする。ホモログがないものに関してはスクリーニングを行い探索・取得する。陸上植物同様に藻類でも複数のシグナル伝達経路が存在する可能性もあるが、そのすべてを明らかにするのではなく、基本となる 1 経路だけでも ABA 受容から遺伝子発現までの伝達経路の流れを明らかにすることを優先する。下記の(1)-(5)の方法でシズンにおける ABA シグナル伝達系の特定を目指す。

(1) PP2C・SnRK2 の機能の生化学的性質の検証

陸上植物で明らかになっている ABA シグナル伝達のキー因子である PP2C・SnRK2 が、シズンでも機能しているか生化学的に検証する。PP2C・SnRK2 の過剰発現株、破壊株を作製し ABA 存在下、非存在下での挙動を観察する。また SnRK2 のリン酸化状態の変化を観察する。

(2) ABA レセプターの探索

陸上植物では ABA 存在下で ABA レセプターは PP2C に結合している。シズン PP2C を ABA 存在下と非存在下で免疫沈降することによって *in vivo* で PP2C と複合体を形成しているタンパク質を取得する。これらのタンパク質を質量分析によって特定する。特定されたタンパク質を用いて ABA との結合実験を行い、レセプターを特定する。特定したレセプターを欠出させたシズンを作製し、ABA によるレスポンスを確認する。

(3) 転写因子の特定

ABA シグナルによる転写制御は一般的に bZIP 型転写因子であることが知られている。その他にも MYB 型、Homeodomain 型の転写因子も報告がある。これらの転写因子は活性化型の SnRK2 によってリン酸化され活性化することが知られている。陸上植物で、これらの転写因子は多重遺伝子族を形成しており、合計で数百を超えるホモログが存在する。一方、シズンは遺伝子重複が少ないため、bZIP(1 種)、Homeodomain(6 種)、MYB(17 種)の計 24 種類しか存在しない。このためスクリーニング等を行わず、総当り的な解析が可能である。

(4) プロモーターの同定と機能解析

申請者は既にシズンで ABA 添加によって顕著に発現が上昇する遺伝子をアレイ解析等の結果突き止めている。中でも TSPO は非常にレスポンスよく発現応答する。主に TSPO を用いて前項で得られた転写因子とのプロモーター結合実験を行いプロモーター領域の特定を行なう。

(5) モデルの検証と陸上植物への応用

上記の解析で得られた知見を元に、ABA シグナル伝達のモデルを構築する。このモデルを検証すべく、リン酸化活性や最終的な ABA 応答遺伝子の転写活性 (TSPO 等) を各因子の欠出株から検証していき矛盾なくシグナルが伝達していくか検証する。

4. 研究成果

本研究ではシズンにおける ABA シグナル伝達機構を明らかにすることを目的とし研究を行った。申請者はシズンゲノム解析の結果から、シズンでも高等植物と類似した ABA シグナル伝達機構を持っているのではないかと、仮説を立て証明を行った。本研究では 1) 高等植物で ABA シグナル伝達の中心的役割を果たす PP2C・SnRK2 による ABA 伝達機構の生化学的な証明、2) ABA 受容体の探索、3) 転写

因子の特定、4)プロモーターの同定と機能解析、5)モデルの検証、の5つの小目標を置き研究遂行を目指した。

(1) PP2C・SnRK2の機能の生化学的性質の検証

4種のPP2C、1種のSnRK2がシゾンには存在している。これらは系統解析の結果、陸上植物でABAシグナル伝達に関わっているタイプとは異なるタイプであり、陸上植物とは早い段階で分岐していることがわかった。このことから陸上植物の先祖型である可能性が考えられた。これら4種のPP2C、1種のSnRK2に対する欠出型形質転換体の作出を試みたが得られなかった。これらは必須遺伝子であることが考えられたため、アンチセンスによる抑制株と過剰発現株の作出を行った。作出された株についてABA応答をTSP0遺伝子発現を比較することによって検証した。この結果PP2C2と3の過剰発現株でABA応答が不全となった。一方、これらのアンチセンス株ではABA非添加状態でもABA添加時と同程度のTSP0遺伝子発現が認められた。逆にSnRK2過剰発現株ではABA非添加状態でもABA応答を示し、アンチセンス株ではABA応答が消失した。このことから陸上植物と同様にシゾンPP2C2,3は負にSnRK2は正にABAシグナル伝達に関わっていることが明らかになった。しかし、これらPP2CとSnRK2のin vivoでの結合は確認できなかったことから、シゾンでは直接結合していないことも示唆された。

(2) ABAレセプターの探索

ABA存在下でABAレセプターはPP2Cに結合している可能性が示唆される。シゾンPP2Cにタグを付加した形質転換体を作製した。ABA存在下と非存在下でタグ抗体を使った免疫沈降を行いin vivoでPP2Cと複合体を形成しているタンパク質を取得し、これらのタンパク質を2次元電気泳動で分離し、ABA存在下でのみPP2Cと複合体を形成しているものを質量分析によって特定を試みた。しかし、

発現量の多い特定のタンパクがノイズとなって検出されるため、精度が低く特定に至らなかった。そこで本研究で用いた方法の問題点を明らかにし、それを解消するための基礎データが得た。

(3) 転写因子の特定

申請段階ではデータベース上でbZIP型転写因子とアノテーションされている遺伝子は1種であったが、再解析の結果4種存在することが明らかになった。これらのアンチセンス株を作製し、ABA応答をTSP0遺伝子発現を比較することによって検証した。4種のbZIPのうちbZIP1アンチセンス株でABA応答が著しく阻害されることが明らかになった。bZIP型転写因子はヘテロダイマーもしくはホモダイマーで生体内で機能していることが知られている。そこでbZIP1とペアになって機能するbZIPの探索を行った。TSP0プロモーター領域と各bZIP組換えタンパク質との結合を検証した結果、bZIP1と2の組み合わせでプロモーター領域に結合することが確認された。この際bZIP1単体での結合は確認されなかったことからbZIP1と2がヘテロダイマーを形成してTSP0の転写を行っていることが示唆された。

(4) プロモーターの同定と機能解析

bZIP1と2の組換えタンパク質を用いて断片化したTSP0プロモーター領域との結合をゲルシフトアッセイにより確認した。その結果、興味深いことに転写開始点より下流に結合することが示唆された、この結合は幾つかのABA応答遺伝子でも保存されていた。これらの結果を用いて結合部位の配列をアライメントし共通配列の探索を試みた。しかし、多少の保存性は認められるものの明確なモチーフを確定するには至らなかった。

(5) モデルの検証と陸上植物への応用

本研究の結果から紅藻シゾンでも陸上植物と類似したABAシグナル伝達機構が存在していることが明らかになった。ABA添加によっ

て PP2C と SnRK2 を介して bZIP1 と 2 のホモダイマーが TSP0 転写を活性化することを明らかにした(図1)。追加実験として ABA 添加による SnRK2 と bZIP のリン酸化の確認をおこなった。SnRK2、bZIP1 それぞれに FLAG-tag を付加した形質転換体を作成し、ABA 添加後、それぞれの tag を用いてタンパク質を精製しリン酸化タンパクを特異的に認識する抗体で反応した所、SnRK2、bZIP1 共にリン酸化が確認された。このことから ABA 添加によって PP2C が不活性化し、SnRK2 がリン酸化・活性化され、下流の bZIP を活性化していると考えられた。bZIP1 のリン酸化は ABA 添加時でも SnRK2 アンチセンス株では確認されず、ABA にレスポンスして SnRK2 によって bZIP1 が活性化されることが示された。この様に当初の仮説通り、紅藻シゾンでも陸上植物型のシグナル伝達機構が保存されており、細胞内共生によって原始植物が誕生した初期から ABA を能動的に使用したストレス応答のためのシグナル伝達機構が存在したことが示唆される。しかし、本研究の期間内には藻類における ABA 受容体は同定できず今後の課題となった。

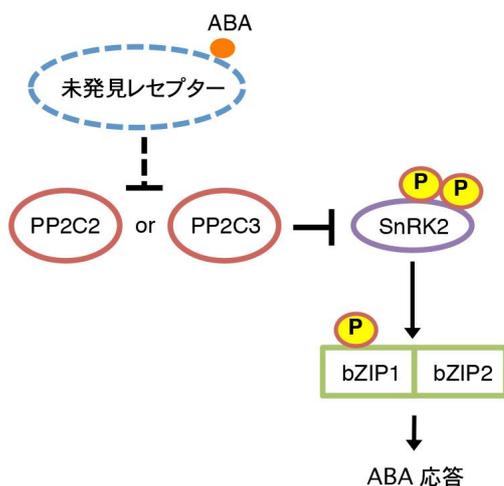


図1 シゾンABAシグナル伝達のモデル

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 6件)

1. Keiko Taki, Toshiyuki Sone, Yuki Kobayashi, Satoru Watanabe, Sousuke Imamura, and Kan Tanaka. Construction of a URA5.3 deletion strain of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: A backgroundless host strain for transformation experiments. J. Gen. Appl. Microbiol. 査読有り、61, 2015, 211-214.
2. Yuki Kobayashi, Hiroyuki Ando, Mitsumasa Hanaoka, and Kan Tanaka. Abscisic acid participates in the control of cell-cycle initiation through heme homeostasis in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. Plant Cell Physiol. 査読有り、57, 2016, 953-960.
3. Noriko Ueki, Takahiro Ide, Shota Mochiji, Yuki Kobayashi, Ryutaro Tokutsu, Norikazu Ohnishi, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Kan Tanaka, Jun Minagawa, Toru Hisabori, Masafumi Hirono, and Ken-ichi Wakabayashi. Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有り、113, 2016, 5299-5304.
4. Yuki Kobayashi and Kan. Tanaka. Transcriptional regulation of tetrapyrrole biosynthetic genes explains abscisic acid-induced heme accumulation in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. Front. Plant Sci. 査読有り、29, 2016, (online published) (DOI: 10.3389/fpls.2016.01300)

5. Yuki Kobayashi and Kan Tanaka. Extraction and Measurement of Abscisic Acid in a Unicellular Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*. Bio Protocol. 査読有り、6, 2016, e2033.
6. 小林勇氣、田中 寛、植物ホルモン「アブシジン酸」獲得のルーツ、化学と生物、査読有り、55, 2016, 256-262.

〔学会発表〕(計 10件)

1. 竹村時空、小林勇氣、瀧景子、今村壮輔、田中寛、*Cyanidioschyzon merolae* における細胞内小胞輸送タンパク質 CmRab5 の機能解析、2015年10月31日 川崎 第14回微生物研究会
2. 小林勇氣、安藤洸幸、華岡光正、田中寛、紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* におけるアブシジン酸の機能、2015年12月2日 神戸 第38回日本分子生物学会年会
3. 瀧景子、曾根俊之、小林勇氣、渡辺智、今村壮輔、田中寛、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) の遺伝子改変ホスト株の分離、2015年12月3日 神戸 第38回日本分子生物学会年会
4. Yuki Kobayashi, Hiroyuki Ando, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka. Functional analysis of ABA in *Cyanidioschyzon merolae*. 2016年3月18日 岩手 第57回日本植物生理学会年会
5. Tokiaki Takemura, Yuki Kobayashi, Keiko Taki, Sousuke Imamura, Kan Tanaka. Functional analysis of nitrogen responsive small G protein CmRAB5 in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. 2016年3月20日 岩手 第57回日本植物生理学会年会
6. Yuki Kobayashi, Kan Tanaka. Abscisic

acid response in *Cyanidioschyzon merolae*. 2016年6月4日 東京 1st *Cyanidioschyzon merolae* symposium. (国際学会、招待講演)

7. 吉川瞳子、小林勇氣、瀧景子、今村壮輔、田中寛：単細胞紅藻シゾンにおける核遺伝子の光転写活性化機構の解析：2017年3月3日 藤沢 第11回日本ゲノム微生物学会年会
8. 小林勇氣、田中寛、紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における ABA シグナル伝達の解析：2017年3月18日 鹿児島 第58回日本植物生理学会年会
9. 竹村時空、小林勇氣、今村壮輔、田中寛：単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における多重遺伝子変異系の開発：2017年3月18日 鹿児島 第58回日本植物生理学会年会
10. 田中寛、小林勇氣、共生による細胞進化；別個のオシレーションは如何に共役したか？ 2017年3月22日 大阪 真核細胞のオルガネラ研究最前線（招待講演）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 勇氣 (Kobayashi, Yuki)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：80644616