

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08196

研究課題名(和文) 葉の老化制御メカニズムの解明と農作物への応用を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Control mechanism of leaf senescence and its application to agricultural products

研究代表者

松岡 大介 (Matsuoka, Daisuke)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・講師(研究機関研究員)

研究者番号：60437506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では老化の開始や進行を制御する分子メカニズムを解明し、農作物の増収や収穫後の品質保持やコスト削減を可能とする新品種の作出のための基盤研究を行うことを目的として行った。MAPKKK17、MAPKKK18過剰発現を用いた表現型解析や網羅的な遺伝子発現解析により、MAPKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14経路が、ストレス応答性の開花促進に関与し、その結果として、葉の老化が促進したと考えられた。また、老化に関わる複数の遺伝子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、葉の老化制御におけるMAPKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14経路の役割を明らかにし、また老化に関わる複数の遺伝子を同定することができた。これらの成果は葉の老化制御メカニズムのさらなる解明につながる重要な発見である。また同経路の機能改変により、老化の制御だけではなく、昆虫の食害に対する抵抗性を付与することにも成功した。これらの成果はモデル植物を用いた基礎的な知見ではあるが、今後、これらの成果をもとにした新品種の作出などが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism that controls the initiation and progression of leaf senescence, and to carry out basic research for the production of new varieties that can increase the yield of crops, maintain quality after harvest, and reduce costs. By phenotypic analysis and comprehensive gene expression analysis using MAPKKK17 and MAPKKK18 overexpression plants, the MAPKKK17 / 18-MKK3-MPK1 / 2/7/14 pathway is involved in stress-responsive flowering promotion, and as a result, It was considered that leaf aging was accelerated. In addition, we identified several genes involved in leaf senescence.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：老化制御 ジャスモン酸 MAPKカスケード

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉の老化は単に細胞が死んで枯れていく現象ではなく、限られた栄養源を再利用して新しい組織や器官を形成するために植物が積極的に取り入れている生存戦略の1つであり、植物の生育にとって重要な役割を果たしている。また農学的側面から考えると葉の老化は収量や収穫後の保存(葉物野菜の黄化や栄養成分の分解など)にも関係する重要な形質である。

老化は生育に伴う内生的な刺激や環境の変化(ストレス)により制御されているが、植物ホルモンはそれらのシグナルを伝達する上で重要な機能を担っている。これまでにサイトカイニン、エチレン、オーキシン、アブシジン酸、サリチル酸やジャスモン酸など数多くの植物ホルモンの関与が示唆されているが、その仕組みは複雑で未解明の部分が多い。

葉の老化は植物の成長制御の重要な現象であるだけでなく、農作物の収量や保存に関わる重要な形質であることから、モデル植物であるシロイヌナズナのみならず、主要な農作物であるイネやトウモロコシなどを用いて精力的に研究されている。これまでに、葉の色の変化など表現型を基にした遺伝学的解析、各種植物ホルモンの定量など生化学的解析、DNA マイクロアレーやプロテオームなどの網羅的解析がなされてきており、上述のように多くの植物ホルモンの関与や老化時に特異的に発現する遺伝子群(SAGs)が同定されている。特にSAGsについてはこれまで800以上の遺伝子が同定されている。しかしこれまでの研究においては個々の遺伝子が老化に関与することは示されているが、それぞれの遺伝子がどのように関連しているかなどその分子メカニズムは不明な点が多い。さらに本研究で主に扱うアブシジン酸による老化についてはその関与は古くから提唱されているもののそのメカニズムに関してこれまでのところ数種の遺伝子が同定されているだけである。

申請者は最近、シロイヌナズナのMAPKKK18(アブシジン酸により発現誘導される)の全長遺伝子にFlagタグを付加するようにpBI121ベクターに導入し35Sプロモーター支配下で過剰発現するように形質転換したシロイヌナズナ(以降35SMAPKKK18植物)およびキナーゼドメインのATP結合領域のリジン残基をアルギニン残基に置換するように変異を導入したMAPKKK18を同様に過剰発現するように形質転換したシロイヌナズナ(以降35SMAPKKK18KN植物)を作製した。35SMAPKKK18植物を通常条件下で生育させた場合、野生型植物より約14日早く葉の黄化が始まり、一方35SMAPKKK18KN植物では野生型植物より約10日葉の黄化が遅れ、活発に成長し大型化した(Matsuoka *et al.* Plant Mol. Biol. 2015)。これらの成果はMAPKKK18が老化の制御において重要な役割を演じていることを示すものであるが、同時にMAPKKK18の活性を調節したものを過剰発現することによって老化の時期を制御することが可能となった。さらにアブシジン酸処理による葉の老化において35SMAPKKK18植物が高感受性を示す一方35SMAPKKK18KN植物では老化の遅延が観察されたことから35SMAPKKK18植物での老化の促進はアブシジン酸のシグナルを強化すること

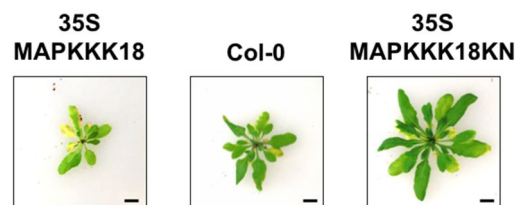


図 MAPKKK18過剰発現による老化時期の変化

35SMAPKKK18植物では早期に老化することで小型化し一方、35SMAPKKK18KN植物では老化が遅延することで生育期間が長期化するとともに大型化する。図には発芽後40日のロゼッタ葉の形状を示している。

(Matsuoka *et al.* 2015より改変)

によりまた 35SMAPKKK18KN 植物での老化の遅延はアブシジン酸のシグナルに対してドミナントネガティブな効果により生じたと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では老化の開始や進行を制御する分子メカニズムを解明し、農作物の増収や収穫後の品質保持やコスト削減を可能とする新品種の作出のための基盤研究を行うことを目的としている。これまでの予備的研究により、MAPKKK18 は MKK3 と相互作用すること、また MKK3 は MPK1/2/7/14 と相互作用することから MAPKKK18-MKK3-MPK1/2/7/14 が MAPK カスケードを形成し老化を制御していると考えている。そこで、本研究では MAPKKK18 遺伝子の過剰発現による老化制御メカニズムを解明し、明らかにした老化制御系を利用した有用作物を作出するための基盤研究として以下の研究を研究期間内に実施する。

(I) MAPKKK18 過剰発現による老化制御メカニズムの解明

1. 老化を制御する MAPKKK18 カスケードの完成
2. MAPKKK18 カスケード下流因子の同定
3. 他の老化制御因子への影響評価

(II) 不活性型 MAPKKK18 過剰発現による老化抑制を利用した高収量作物作出のための基盤研究

1. 誘導発現系の構築による老化制御
2. コマツナへの老化制御系の導入および収量、収穫後の品質評価

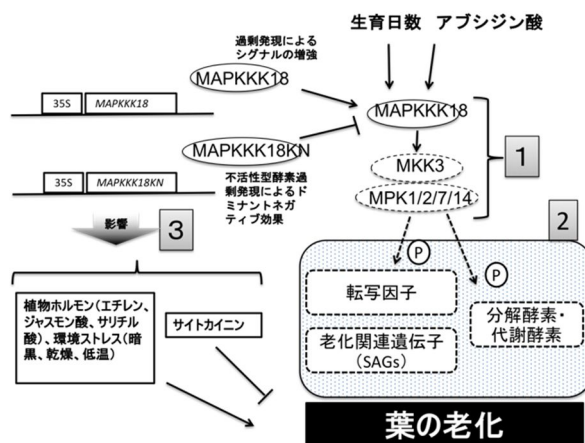
3. 研究の方法

1) MAPKKK18 過剰発現による老化制御メカニズムの解明 (図)

1. 老化を制御する MAPKKK18 カスケードの完成

・これまでのタンパク質間相互作用解析の予備実験により MAPKKK18 は下流 MAPKK として MKK3 を MAPK として MPK1/2/7/14 とカスケードを形成する可能性が高い。また 2 週齢の 35SMAPKKK18 植物から精製したリコンビナント MAPKKK18 がアブシジン酸処理依存的に活性化することを明らかにしている (Matsuoka *et al.* Plant Mol. Biol. 2015)。そこでアブシジン酸処理した 35SMAPKKK18 植物における MKK3、MPK1/2/7/14 活性をそれぞれを特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降、活性測定を行う。

図 研究テーマ (I) MAPKKK18 過剰発現による老化制御メカニズムの解明の概要
図中の 1、2、3 はそれぞれのサブテーマに対応



・35SMAPKKK18 植物による老化の早期化がそれぞれの遺伝子破壊植物との交配によりどのように変化するかを検証する。これまでに交配に用いる遺伝子破壊植物のうち *mkk3 mpk1 mpk2 mpk7* については遺伝子破壊植物を ABRC より取り寄せホモ個体を得ている。また MAPK については冗長

的な機能を考え、複数遺伝子破壊株の作成を行う。

2. MAPKKK18 カスケード下流因子の同定

- ・35SMAPKKK18 および 35SMAPKKK18KN 植物で変動する遺伝子、タンパク質の網羅的調査

野生型シロイヌナズナ 35SMAPKKK18 および 35SMAPKKK18KN のロゼット葉より抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレーによる網羅的な発現変動の調査を行う。さらにそれぞれのロゼット葉より抽出したタンパク質を 2 次元電気泳動によりプロテオーム解析を行う。網羅的解析により得られる変動遺伝子およびタンパク質の機能をこれまでに報告があるものについては文献等により精査し、それらの中で各種ホルモンの合成やシグナル系に関連する候補遺伝子およびタンパク質の絞り込みを行う。また本実験により明らかにする変動するタンパク質の中には MAPKKK18 カスケードを形成するタンパク質も含まれている可能性が高い。下流 MAPK が同定できた場合は同 MAPK 分子によるリン酸化の有無をリコンビナント酵素によるリン酸化により検証する。

- ・網羅的解析により得られた候補遺伝子やタンパク質の過剰発現体や遺伝子欠損体を作製しその表現型（特に葉の老化に対する影響）を調査すると共に、各種ホルモン（アブシジン酸、エチレン、サリチル酸、ジャスモン酸）およびストレス（暗黒、乾燥、低温）に対する応答を評価する。また 35SMAPKKK18 植物との交配を行い、遺伝学的な関係を評価する。

3. 他の老化制御因子への影響評価

- ・野生型シロイヌナズナ、35SMAPKKK18 および 35SMAPKKK18KN に各種ホルモン（エチレン、サリチル酸、ジャスモン酸）およびストレス（暗黒、乾燥、低温）処理を行い、これらの処理による葉の老化に対する影響を検証する。ロゼット葉の老化に対する影響は Detached leaf assay を用いて行う。葉の老化の評価はマーカー遺伝子（SAG12 など）の発現、クロロフィル含量の定量、トリパンブルー染色による死細胞の観察により総合的に行う。

- ・野生型シロイヌナズナ、35SMAPKKK18 および 35SMAPKKK18KN において各種ホルモン合成やシグナル伝達に関わる遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR により検証する。

4. 研究成果

MAPKKK18過剰発現による老化制御メカニズムの解明を目指し、特にMAPKKK18カスケード下流因子の同定について野生型シロイヌナズナ及び35SMAPKKK18のロゼット葉より抽出したRNAを用いてDNAマイクロアレーによる網羅的な発現変動の調査を行った。網羅的解析により得られた変動遺伝子およびタンパク質の機能をこれまでに報告があるものについては文献等により精査し、それらの中で各種ホルモンの合成やシグナル系に関連する候補遺伝子およびタンパク質の絞り込みを行った。その結果、サリチル酸の合成やシグナル伝達に関与する遺伝子がMAPKKK18過剰発現植物において顕著に誘導されていることが確認された。またMAPKKK18と相同な遺伝子であるMAPKKK17について同様に過剰発現植物を作製し、その表現型の調査を行い、MAPKKK18過剰発現植物との比較を行った。本成果については、学術論文において発表している。

(Matsuoka et al Plant Biotechnology 2018) MAPKKK17、MAPKKK18過剰発現では、開花の促進に関係する遺伝子群が早期に発現誘導されること、また、サリチル酸やジャスモン酸に応答する遺伝子群に発現の変化が見られたことから、MAPKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14経路が、ストレス応答性の開花促進に関与し、その結果として、葉の老化が促進したと考えられた。(第60回日本植物生理学会発表、2019年)

MAPKKK17、MAPKKK18過剰発現でストレス応答性の遺伝子の発現変動が見られたことから、葉

の老化にも関係し、農業上重要な、昆虫の食害に対する抵抗性や応答遺伝子の変化について、検証を行った。ハスモンヨトウ食害を受けたシロイヌナズナではマーカー遺伝子の発現上昇など一般的な食害反応が起こること、その際にMAPKKK17、MAPKKK18 の発現量も上昇していることが分かった。そこでMAPKKK17 過剰発現体、MAPKKK18過剰発現体をエサとしてハスモンヨトウの飼育を行った結果、MAPKKK17 過剰発現体、MAPKKK18 過剰発現体で飼育した幼虫は成長が抑制される傾向にあり、MAPKKK17/18の過剰発現が昆虫の食害に対しても有用な形質を示すことがわかった。現在これらの成果について、論文にまとめているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daisuke Matsuoka, Kaori Soga, Takuto Yasufuku, Takashi Nanmori	4. 巻 35
2. 論文標題 Control of plant growth and development by overexpressing MAP3K17, an ABA-inducible MAP3K, in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 171-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0412a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Matsuoka Tomoyuki Furuya Tetsushi Iwasaki Takashi Nanmori	4. 巻 592
2. 論文標題 Identification of tyrosine autophosphorylation sites of Arabidopsis MEKK1 and their involvement in the regulation of kinase activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3327-3334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1002/1873-3468.13242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松岡 大介、狭間 雅幸、南森 隆司、坂本 克彦
2. 発表標題 アブジジン酸により誘導されるシロイヌナズナMAP3K, MAP3K17/18の下流経路の検索
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----