

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02458

研究課題名(和文)新規アブシシン酸シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Studies on novel abscisic acid signaling mechanism

研究代表者

轟 泰司 (Todoroki, Yasushi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：30324338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：アブシシン酸(ABA)は種子休眠や耐乾燥性・耐塩性などの環境ストレス応答において必須の植物ホルモンであり、その機能と制御機構を明らかにすることは植物の環境ストレス応答の解明に役立つとともに、ストレス耐性の高い品種の開発やストレス耐性制御剤の開発につながる。本研究では、既知のABA受容体PYLとは異なる未知ABA受容体を同定し、ABAの新しいシグナル伝達経路(非PYL経路)を明らかにすることを目的とし、特異な活性を有するPYLのアンタゴニストを用いた生化学的手法と化学遺伝学的手法を組み合わせた手法により、非PYL経路に関わる新規ABA受容体の候補遺伝子を選抜することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブシシン酸(ABA)のシグナル伝達経路には、既知のPYL経路に加えて、未知のABA受容体を介した経路(非PYL経路)が存在することを初めて明らかにすることで、ABAを介した植物のストレス応答機構に新たな知見を加えることができる。この知見を応用することによって、環境ストレスに高い耐性をもつ品種の開発や、環境ストレス耐性を人工的に自在に制御可能な新規植物調節剤の創出が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Abscisic acid (ABA) is an essential plant hormone in environmental stress responses such as seed dormancy, drought tolerance and salt tolerance. In this study, we aimed to identify unknown ABA receptors that are different from the known ABA receptor PYL and to elucidate a new signaling pathway of ABA (non-PYL pathway). We succeeded in selecting candidate genes for novel ABA receptors involved in the non-PYL pathway by a combination of biochemical and chemical genetic methods using antagonists of PYL with specific bioactivity.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アブシシン酸

1. 研究開始当初の背景

アブシシン酸(ABA)は種子休眠や耐乾性・耐塩性などの環境ストレス応答において必須の植物ホルモンである。その生理作用を誘導するコアシグナル経路は、細胞質受容体PYR/PYL/RCAR(PYL)を起点としたPYL経路(PYL-ABA複合体によるタンパク質脱リン酸化酵素PP2Cの阻害)PP2Cによって阻害されていたリン酸化酵素SnRK2の活性化(活性化型SnRK2による転写因子およびイオンチャネルの活性化)ABA生理作用)であることが、モデル植物シロイヌナズナで明らかにされている。一方、ABA応答にはホスホリパーゼ(PLDやPLC)やホスファチジン酸(PA)といった膜局在因子も関与するが、これらとPYL経路との関わりは明らかになっていない。シロイヌナズナが植物ホルモン研究の中心となる以前の1980~1990年代に行われたABA受容部位に関する研究の多くは、それが膜に局在することを示唆していた。しかし2009年にシロイヌナズナで細胞質受容体PYLが同定されて以降、ABAシグナル伝達に関する研究はPYL一色になり、我々もPYLにフォーカスして、その機能を阻害する化合物(PYLアンタゴニスト)の創出研究を行ってきた。こうした中、研究代表者らが開発したPYLアンタゴニストPANsが予期しない生物活性を示すことがわかった。PANsは、*in vitro*でシロイヌナズナとイネのPYLを強く阻害し、*in vivo*でも発芽生育適温下のシロイヌナズナやレタスなど双子葉植物に対して期待通りにABA拮抗活性を示した。しかしその一方で、イネやアワ、コムギなど単子葉植物と、高温条件下の双子葉植物に対しては、ABA拮抗活性ではなくABA活性を示すことがわかった。その要因を追求していく中で、植物にはPYL経路とは異なるABAシグナル伝達経路が存在するのではないか、という「問い」が改めて浮上してきた。さらに検討を続けた結果、ABAシグナル伝達経路には、既知のPYL経路に加えて、PYLアンタゴニストであるPANsがアンタゴニストとして機能する未知のABA受容体を介した経路(非PYL経路)が存在し、この経路はシロイヌナズナでは熱による膜の流動化等により活性化し、またイネなど単子葉植物では常に機能している、という仮説を得るに至り、これを追求するために本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、PYLアンタゴニストを用いた生化学的手法と化学遺伝学的手法を組み合わせ、PYLとは異なる未知ABA受容体ならびにその下流因子を同定し、ABAの新しいシグナル伝達経路(非PYL経路)を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の最終的な目標は、非PYL経路に関わる未知受容体とその下流因子を同定して非PYL経路を確定することであり、(1)候補遺伝子を選定し、(2)選定した候補遺伝子の機能を解析する、という流れでこれを達成する。

- (1) 非PYL経路に関わる未知受容体ならびにその下流因子の候補遺伝子の探索と選定
生化学的手法と化学遺伝学的手法を組み合わせ探索する。

生化学的手法

非PYL経路受容体はPANsの4'位フェニルプロピニルエーテル側鎖を受容し、さらにこの側鎖末端の官能基の違いに比較的鈍感であるため、ここに光反応性蛍光タグを付けるためのエチニル基を導入したPANC-CHを新規PANsとして合成する。イネもしくはシロイヌナズナ実生の抽出液や膜画分にPANC-CHを入れ、次にクリック反応によってタグを付ける。これに光照射を行うことで、標的タンパク質と共有結合させ、蛍光を手がかりに標的タンパク質を分取し、質量分析・配列解析を行って標的候補タンパク質とその遺伝子を同定する。

化学遺伝学的手法

PANsをイネ・コアコレクション109品種の実生に処理し、その際の遺伝子発現の変動をゲノムワイド関連解析(GWAS)によって調べる。ABA処理時のそれと比較することで非PYL経路に関わる未知ABA受容体の候補遺伝子を選抜する。

- (2) 選定した候補遺伝子の機能解析

遺伝学的な手法と生化学的な手法を用いて、候補遺伝子の機能を検証する。

遺伝学的手法

シロイヌナズナで選定した候補遺伝子の機能欠損変異体および過剰発現体を作成し、ABA、PANsならびに他のPYLアンタゴニストに対する感受性、乾燥耐性や塩耐性などの表現型、高温発芽阻害との関わりを調べる。さらに、既知のABA応答性遺伝子の発現解析やRNAseq解析を行い、遺伝子発現の変動を調べる。イネについては、その破壊系統がレトロトランスポゾンTos17ミュータントパネルに存在するかを検索し、ある場合はそれを購入してシロイヌナズナの場合

と同様の解析を行う。

生化学的手法

受容体候補タンパク質を異種発現して精製し、ABA、PANs ならびに他の PYL アンタゴニストに対する結合親和性を等温滴定カロリーメトリによって定量的に評価する。

4. 研究成果

(1) 生化学的手法による未知 ABA 受容体タンパク質の探索

クリック反応によりビオチンタグを導入するため、PANMe のメチル基の代わりにエチニル基を導入した化合物 PANC≡CH を新規 PANs として合成した。イネ実生伸長試験において、この化合物は PANMe よりも強い ABA 様活性（第二葉鞘伸長阻害）を示したため、これをアルキンプローブとして標的タンパク質のラベル化が可能であるか否か検討した。PYL を用いた *in vitro* モデル試験系においてラベル化条件を最適化し、PANC≡CH 依存的にビオチン標識された PYL のバンドを検出することに成功した。また、PANC≡CH と ABA を共処理した際には、競合的に PYL の標識化が抑制されることも確認した。

(2) 化学遺伝学的手法による未知 ABA 受容体遺伝子の探索

標的遺伝子を迅速に同定するため、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) が適応出来るか否か検討した。GWAS とは、設定された集団に存在する個体間の形質の違いと DNA 配列との関連をゲノム全体にわたり調べることにより、対象とする形質と関連する DNA 多型を統計的に検出する方法である。イネ・コアコレクション 109 品種に対する PANSF5 (ABA 受容体 PYL のアンタゴニストである PANs の中で最も強い ABA 活性を示す化合物) のイネ第二葉鞘伸長阻害率を「形質の値」として GWAS を行い、第 3 染色体に PANs 感受性と関連がありそうな DNA 多型を複数見出した。その中で、アミノ酸配列に変異をもたらす DNA 多型が存在する遺伝子 Os03g0661800 を未知 ABA 受容体の候補遺伝子として選抜した。

(3) PANSF5 標的候補遺伝子 Os03g0661800 の異種発現系の構築

シロイヌナズナにおいて相同性検索を行ったところ、AtPARK13 に最も高い相同性 (45%) を示した。AtPARK13 はミトコンドリアに局在するプロテアーゼであり、熱ストレス応答に関与することが報告されている PDZ ドメインタンパクである。AtPARK13 の発現条件を参考に、大腸菌発現系を採用してベクターおよび菌株を数種検討したが、タンパク質の発現には至らなかった。また、農研機構との共同研究を開始し、Os03g0661800 の遺伝子破壊株を作成するための準備を進めた。

(4) 大腸菌による標的候補遺伝子 Os03g0661800 の発現

In vitro 試験により PANSF5 との結合を検証するため、標的候補遺伝子 Os03g0661800 の大腸菌発現を再度試みた。ベクター 3 種類 (pET28b, pColdII および pColdTF) と大腸菌株 2 種類 (BL21(DE3)と C41(DE3))を用いて発現条件を検討したところ、pCold TF-BL21(DE3)の組み合わせで導入遺伝子の発現が示唆された。しかし、Os03g0661800 がコードする PDZ ドメインタンパク質と比較すると分子量が小さいことから、配列の途中に終始コドンに挿入されている、または発現タンパク質自身のプロテアーゼ作用によって切断されている等の理由が考えられる。原因の究明と今後の研究 (研究方法の (2)) については、研究分担者である竹内が研究代表者として 2022 年度に採択された基盤 B 課題「単子葉植物に特有なアブシシン酸シグナル伝達機構の解明」にて実施する予定である。

(5) PANSF5 の ABA 様活性と内生 ABA 量の関係

PANSF5 の ABA 様活性が内生 ABA 量の変化によるものではないことを検証するために、Os03g0661800 の 3 つのハプロタイプ各 10 品種を用いて、PANSF5 を処理した際の ABA 内生量を測定した。予想に反して、全ての品種で PANSF5 処理により ABA 内生量が増加した。これは PYL アンタゴニストである PANSF5 を処理したことで PYL 経路由来の ABA シグナル伝達が阻害されたため、フィードバック制御により ABA 生合成が活性化したことが原因だと考えている。一方、PANSF5 処理による ABA 内生量の増加は全てのハプロタイプで見られた現象であり、PANSF5 による第二葉鞘伸長阻害率との間に相関関係は認められなかった。従って、PANSF5 による第二葉鞘伸長阻害は内生 ABA 量の増加によるものではない可能性が高いことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 竹内 純 |
| 2. 発表標題 タンパク質の立体構造に基づいた植物ホルモン受容体の阻害剤創製 |
| 3. 学会等名 有機化学研究会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 岡本 昌憲 (Okamoto Masanori) (50455333) | 宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授 (12201) | |
| 研究分担者 | 竹内 純 (Takeuchi Jun) (00776320) | 静岡大学・農学部・准教授 (13801) | |
| 研究分担者 | 大西 利幸 (Ohnishi Toshiyuki) (60542165) | 静岡大学・農学部・准教授 (13801) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|