

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03996

研究課題名(和文)植物の浸透圧ストレスに対する感知システムと初期応答の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms of the sensing systems and initial responses to osmotic stress in plants

研究代表者

篠崎 和子 (Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：30221295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：乾燥や高塩濃度などの浸透圧ストレス時の初期にABAを介さずに活性化するサブクラス I SnRK2の相互作用因子として、3つのB4-RAF様キナーゼを同定した。これらのキナーゼは、サブクラス I SnRK2とともにP-ボディにおいて共局在し、浸透圧ストレス時にサブクラス I SnRK2を特異的にリン酸化して活性化することを示した。さらに、多重変異体のトランスクリプトーム解析や生育観察から、これらのキナーゼはサブクラス I SnRK2の上流因子であることを示した。一方、同様の手法を用いて種類の異なるRAFがABAによって活性化されるサブクラス III SnRK2の上流因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾燥などの浸透圧ストレスを感知した植物は、遺伝子発現を制御して耐性を獲得するが、そのシグナル伝達系には植物ホルモンのABAを介した経路に加え、ABAを介さない経路が存在する。本研究ではABAが合成される前の初期のストレス応答で重要な機能を果たしている因子であるRAF様キナーゼが同定され、浸透圧ストレスの受容体に迫る重要因子が明らかにされた。得られた研究成果はNature Commun.などのレベルの高い学術誌に掲載された。また、同定された遺伝子は環境ストレス耐性作物開発のために利用できると考えられ、地球環境劣化に対応した食料問題や環境問題の解決に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：There are ABA-dependent and ABA-independent signaling pathways in the osmotic stress responses such as drought and high salt in plants. We elucidated that three B4-RAF like protein kinases are interacting factors of the subclass I SnRK2 protein kinases that are activated through an ABA-independent signaling pathway in the early stages of the osmotic stress responses. We also elucidated that these kinases co-localize with the subclass I SnRK2 kinases in the P-bodies and specifically phosphorylate and activate the SnRK2s in response to osmotic stress. Furthermore, transcriptome analyses and growth observation of the multiple mutants showed that these kinases are upstream factors of the subclass I SnRK2s. On the other hand, using similar methods, we also indicated that different RAF like kinases are upstream factors of subclass III SnRK2 protein kinases activated through an ABA-dependent signaling pathway.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：シロイヌナズナ 浸透圧ストレス応答 シグナル伝達機構 ストレス感知システム SnRK2キナーゼ RAFキナーゼ オスモセンサー

1. 研究開始当初の背景

動くことができない植物は、乾燥や高塩濃度、凍結などによって起こる浸透圧ストレスを絶えず受け生存を脅かされている。これに対して植物は気孔の開閉などの生理的応答や遺伝子発現制御を駆使してストレスに応答し適応して生存している。これまで、シロイヌナズナやイネを用いて浸透圧ストレスによって誘導される遺伝子群の機能や発現制御機構の解析を行ってきた。その結果、環境ストレスによって植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) の合成が誘導されて、蓄積された ABA によって多くの遺伝子が誘導され、これらの遺伝子産物の働きでストレス耐性が獲得されることを示した。ABA による遺伝子発現制御機構の研究は、ABA のレセプターが同定されたことで飛躍的に進み、ABA の受容からタンパク質キナーゼや転写因子の活性化を経て、ABA 誘導性遺伝子発現に至る一連のシグナル伝達機構が解明された。しかし、ABA 合成に先立って起こる浸透圧ストレス応答の根幹をなすストレス感知システムおよびその直接の下流で機能する初期応答に関する知見は断片的でほとんど明らかにされていない。サブクラス I SnRK2 の活性化は ABA の影響を受けないため、その活性化を起点として上流に遡ることで直接的にストレス感知システムの解析を推進できると考えられる。また、サブクラス III SnRK2 は、ABA を介した経路に加え ABA を介さない経路でも活性化されるため、サブクラス I SnRK2 で得られた知見をもとにサブクラス III SnRK2 の上流因子の同定も可能となり、複雑な浸透圧ストレスに対する植物の初期応答機構が解明されることが考えられる。

2. 研究の目的

これまで世界に先駆けて乾燥などの浸透圧ストレス耐性の獲得機構に関する転写制御ネットワークを解明してきた。その結果、浸透圧ストレス応答には、ABA の蓄積を介した遺伝子発現の制御機構に加えて、素早い遺伝子発現を制御する ABA 非依存的なシグナル伝達系が存在していることを示してきた。植物にとって、より鋭敏に浸透圧ストレスを感知しストレスに対応した応答を行うことは、生死に関わる重大な問題であり植物の生存を支える重要なシステムであると考えられる。そこで、本研究では ABA 非依存的に活性化するサブクラス I SnRK2 に着目して、その活性制御を担う上流因子を同定するとともに、それらの因子の役割の解明を目指す。また、サブクラス III SnRK2 は ABA を介さない経路でも活性化するため、サブクラス I SnRK2 で得られた知見をもとにサブクラス III SnRK2 の上流因子の同定も目指す。得られた結果から、植物の鋭敏な浸透圧ストレスに対応した初期応答システムを解明する。

3. 研究の方法

これまで、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法により、植物の環境ストレス応答で重要な機能を果たすタンパク質の複合体を解析して不安定な相互作用因子を同定する手法を開発した。シロイヌナズナのサブクラス I SnRK2 に特異的な相互作用因子に関して本手法を用いて解析を行い、B4 サブファミリーに属する RAF 様ファミリーキナーゼを同定した。また、サブクラス III SnRK2 に特異的な相互作用因子としても、RAF 様ファミリーキナーゼを単離した。単離された RAF 様キナーゼは、浸透圧ストレス応答の初期に活性化するため、浸透圧ストレス時の SnRK2 の活性化に関与している可能性が高い。そこで、相互作用因子に関して細胞内局在を解析したり、サブクラス I SnRK2 に対するリン酸化活性を解析したり、多重変異体などを作製して解析することで、サブクラス I SnRK2 の活性化を担う RAF 様キナーゼを同定する。さらに、核に局在する RAF 様キナーゼの活性を比較解析することで、サブクラス III SnRK2 の活性化に関与するキナーゼも同定する。本研究ではタンパク質分解の阻害剤及び架橋剤処理を施す手法でタンパク質複合体を精製するなどして、これまででは困難であった結合が不安定な相互作用因子を単離して解析に用いる。

4. 研究成果

(1) サブクラス I SnRK2 の相互作用因子の発現と機能解析

浸透圧ストレスの初期にABAを介さずに活性化するサブクラスI SnRK2の相互作用因子として見出されているB4-RAF様キナーゼとそれらと近縁なRAF様キナーゼに着目した。GFP蛍光を用いた発現解析から、これらのRAF様キナーゼのうち3つのB4-RAFキナーゼであるRAF18、RAF20及びRAF24は、浸透圧ストレス時にP-ボディに局在することが示された。サブクラスI SnRK2はP-ボディに局在することから、BiFC法及び共免疫沈降法を用いて解析を行うと、これら3つのRAF様キナーゼはサブクラスI SnRK2と共局在することが明らかになった。これらのRAF様キナーゼは互いに高い相同性を示し、葉や根などに恒常的に発現していることが示された。また、ゲル内リン酸化実験法を用いて、これらのRAF様キナーゼがサブクラスI SnRK2をリン酸化することを明らかにした。

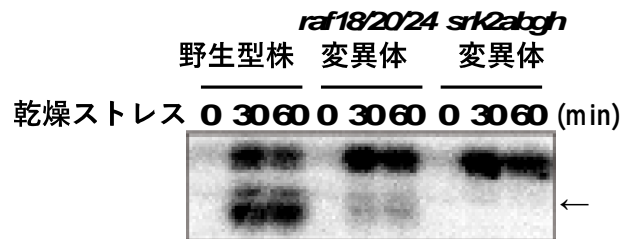


図1 サブクラスI SnRK2の活性化の評価

浸透圧ストレス（乾燥ストレス）に応答したサブクラスI SnRK2の活性化をゲル内リン酸化法により可視化した。矢印はサブクラスI SnRK2の活性化の位置を示す。野生型株で見られたサブクラスI SnRK2の活性化が *raf18/20/24* 変異体において、顕著に減少していたことからRAF18/20/24がサブクラスI SnRK2の活性化因子である事が示された。

(2) サブクラスI SnRK2の活性化を担うRAF様キナーゼの同定

サブクラスI SnRK2をリン酸化して活性化する候補として同定された3つのB4-RAF様キナーゼとその近縁なRAF様キナーゼ遺伝子の変異体を収集し、多重変異体を作製した。また、これら3つのRAF様キナーゼ遺伝子の過剰発現体の作製も行った。得られた変異体を用いて、サブクラスI SnRK2のリン酸化活性を測定し、これらの3つのB4-RAF様キナーゼが浸透圧ストレス時にサブクラスI SnRK2を特異的に活性化することを示した（図1）。また、これらのB4-RAF様キナーゼは、ABA応答において中心的な役割を果たすサブクラスIII SnRK2は標的とせず、その活性化を起ささないことも明らかにした。さらに、ト

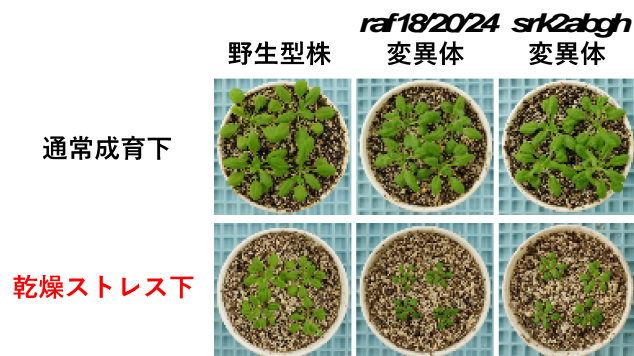


図2 浸透圧ストレス（乾燥ストレス）条件下における *raf18/20/24* 変異体と *srk2abgh* 変異体の成育表現型

浸透圧ストレス下では、*raf18/20/24* 変異体と *srk2abgh* 変異体は、野生型株よりも成育が遅延した。

ランスクリプトーム解析法により、これらのB4-RAF様キナーゼの多重変異体とサブクラスI SnRK2の多重変異体において発現が変化した遺伝子を網羅的に解析して比較した。その結果、発現が増加した遺伝子及び発現が減少した遺伝子が、2種の変異体で一致していた。さらにこれら2種の変異体の生育を観察すると、どちらの変異体も浸透圧ストレス（乾燥ストレス）時特異的に生育が遅れたことから（図2）、これらは同じシグナル伝達系で機能していることが示された（図3）。得られた結果をまとめて、論文を作成して投稿した結果、Nature

(3) サブクラス III SnRK2の活性化の調節機構の解明

初期の浸透圧ストレス条件下でのサブクラス III SnRK2活性の調節メカニズムを詳細に理解するために、シロイヌナズナのサブクラス III SnRK2相互作用タンパク質の同定を試みた。サブクラス III SnRK2の1つであるSRK2Dに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を結合し (SRK2D-GFP) これを導入したシロイヌナズナの植物体をマンニトールで処理した。SRK2D-GFP発現植物からの免疫沈降物を、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) で分析した。その結果、B4-RAF様キナーゼとは異なる複数のRAF様キナーゼが相互作用タンパク質として同定された。これらのRAF様キナーゼ遺伝子の発現解析の結果、通常および浸透圧ストレス条件下で発現が見られ

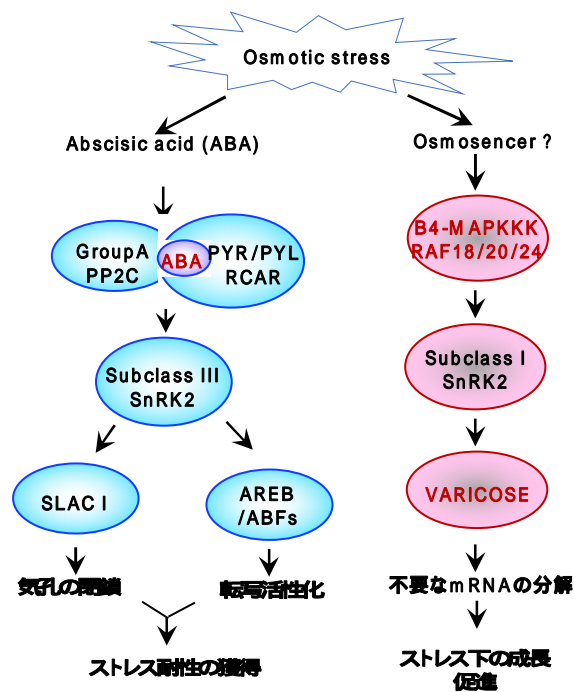


図3 浸透圧ストレス条件下におけるABA依存性及び非依存性のシグナル伝達機構

ABA非依存性シグナル伝達系では、RAF18、RAF20及びRAF24がサブクラス I SnRK2の上流の活性化因子として機能している。

た。サブクラス III SnRK2とこれらRAF様キナーゼ間の物理的相互作用をさらに調査するために、これらのRAFを発現する植物を用いてco-IPアッセイを行った。サブクラス III SnRK2タンパク質は、これらのRAF-GFPタンパク質と共免疫沈降した。続いて、ベンサミアナタバコの葉の系を用いてBiFCアッセイを行った。これらのRAF様の一つは細胞質内でサブクラス III SnRK2と相互作用したが、ABA非応答性サブクラス I SnRK2との間に検出可能な相互作用は見られなかった。また、BiFCアッセイを使用して、他のRAF様キナーゼもサブクラス III SnRK2と相互作用するが、サブクラス I SnRK2とは相互作用しないことを確認した。次にこれらのRAFの変異体を作製して浸透圧ストレスに対する耐性を調べると、野生型植物と比較して生存率が大幅に低下し、これらのRAF様キナーゼが浸透圧ストレス耐性の獲得において重要な役割を示していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Soma Fumiyuki, Takahashi Fuminori, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 2462
2. 論文標題 Affinity Purification Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Identify Proteins Interacting with ABA Signaling Components	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 181 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2156-1_14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soma Fumiyuki, Takahashi Fuminori, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Cellular Phosphorylation Signaling and Gene Expression in Drought Stress Responses: ABA-Dependent and ABA-Independent Regulatory Systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 756 ~ 756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10040756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kidokoro Satoshi, Hayashi Kentaro, Haraguchi Hiroki, Ishikawa Tomona, Soma Fumiyuki, Konoura Izumi, Toda Satomi, Mizoi Junya, Suzuki Takamasa, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 118
2. 論文標題 Posttranslational regulation of multiple clock-related transcription factors triggers cold-inducible gene expression in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2021048118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2021048118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soma Fumiyuki, Takahashi Fuminori, Suzuki Takamasa, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 11
2. 論文標題 Plant Raf-like kinases regulate the mRNA population upstream of ABA-unresponsive SnRK2 kinases under drought stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15239-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hikaru, Takasaki Hironori, Takahashi Fuminori, Suzuki Takamasa, Iuchi Satoshi, Mitsuda Nobutaka, Ohme-Takagi Masaru, Ikeda Miho, Seo Mitsunori, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo	4. 巻 115
2. 論文標題 Arabidopsis thaliana NGATHA1 transcription factor induces ABA biosynthesis by activating NCED3 gene during dehydration stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E11178 ~ E11187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1811491115	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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 相馬史幸、高橋史憲、鈴木孝征、篠崎一雄、篠崎和子
2. 発表標題 RAF-SnRK2キナーゼカスケードを介した乾燥ストレス応答機構の解明
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀岡悠香、相馬史幸、福井あずさ、篠崎和子
2. 発表標題 シロイヌナズナの環境ストレス応答におけるRAF様タンパク質キナーゼの機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumiyuki Soma, Fuminori Takahashi, Takamasa Suzuki, Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki
2. 発表標題 Identification of protein factors that regulate ABA-unresponsive subclass I SnRK2s in Arabidopsis
3. 学会等名 the 30th International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuko Yamaguchi-Shinozaki
2. 発表標題 Signalling pathways and adaptation to drought and temperature stress in plants
3. 学会等名 Climate Change and plant stresss responses (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬史幸, 高橋史憲, 鈴木孝征, 篠崎一雄, 篠崎和子
2. 発表標題 乾燥ストレス条件下においてサブクラス I SnRK2 の活性化を担うタンパク質キナーゼの同定
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soma Fumiyuki, Mogami Junro, Sato Yuta, Takahashi Fuminori, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko
2. 発表標題 Identification of regulator kinases of mRNA decay under osmotic stress conditions in Arabidopsis,
3. 学会等名 29th International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikaru Sato, Hironori Takasaki, Fuminori Takahashi, Satoshi Iuchi, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohme-Takagi, Miho Ikeda, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki
2. 発表標題 Analysis of novel transcription activators of the NCED3 gene that regulates drought stress responses in Arabidopsis Thaliana
3. 学会等名 29th International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬史幸, 高橋史憲, 鈴木孝征, 篠崎一雄, 篠崎和子
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるサブクラス I SnRK2 の活性を制御するプロテインキナーゼの同定
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井あずさ, 相馬史幸, 最上惇郎, 佐藤花繪, 佐藤裕太, 高橋史憲, 篠崎一雄, 篠崎和子
2. 発表標題 浸透圧ストレス時にシロイヌナズナのタンパク質リン酸化酵素SnRK2 の活性を制御する上流因子の同定
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
研究分担者	溝井 順哉 (Mizoi Junya) (20469753)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	城所 聡 (Kidokoro Satoshi) (70588368)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教 (12601)	

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
---------	---------