

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19880033  
 研究課題名（和文） 3次元イメージング法を用いたアブシジン酸合成・応答経路の立体的観察  
 研究課題名（英文） Three dimensional observation of abscisic acid synthetic pathway and signaling  
 研究代表者  
 金森 紀仁（NORIHITO KANAMORI）  
 独立行政法人国際農林水産業研究センター・生物資源領域・研究員  
 研究者番号：30455258

研究成果の概要：ABA 応答には転写因子である AREB がリン酸化することでシグナル伝達することが知られている。さまざまな浸透圧ストレスのうち、乾燥およびマンニトール処理においてリン酸化レベルが最も高く、次いで NaCl および ABA 処理において高いことが明らかになった。10 分の乾燥ストレス処理時点ですでにリン酸化が見られ、6 時間にかけてリン酸化レベルが上昇することが明らかになった。さらに乾燥ストレス処理 30 分の植物体を用いて組織別のリン酸化レベルを測定したところ根において最もストレスを受けていた。ABA 合成の最終段階の反応を触媒している合成酵素アルデヒドオキシダーゼが根端において発現していることから、浸透圧ストレス応答は根でシグナルを受容し、植物全体にシグナルが輸送されることが示唆された。リン酸化に係る遺伝子について 3 次元イメージング法を用いた解析は現在進行中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	360,000	2,660,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：ABA、浸透圧ストレス、3次元イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

移動することができない植物は、乾燥や高塩濃度といった過酷な環境の変化にさらされている。これらの環境の変化は共通して浸透圧ストレスとして植物細胞は感知し、様々な遺伝子を発現することで対応して成長している。これらのストレスに対し植物は、植

物ホルモンの 1 種であるアブシジン酸 (ABA) を合成し、シグナル伝達を介してストレス耐性を獲得している。ABA は環境ストレス以外にも種子形成、発芽、気孔の閉鎖といった水ストレスに応答して合成されることから、植物において重要なシグナル分子として機能している。

ABA の生合成経路の全貌がほぼ明らかになり、関与する合成酵素の特定が急速に進んだ。ABA 合成の最終段階の反応を触媒している合成酵素アルデヒドオキシダーゼが根端および維管束で発現していることが確認された。このことからストレス応答部位、ABA の合成部位、機能部位が異なるため、シグナル輸送に関する研究が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、①ABA 応答に関わる転写因子 AREB 遺伝子の機能解析を行い、生育段階やストレス応答時のリン酸化の有無を観察することで、シグナル輸送の実態を明らかにする。さらに、②3次元イメージング法を用いて、個体レベルで機能遺伝子の立体可視化を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究材料および処理法

モデル植物のシロイヌナズナの播種後2週間の植物体を用いて1時間の浸透圧ストレス(乾燥ストレス処理、NaCl、マンニトール、グルコース)および低温、高温処理を行った。

乾燥ストレス処理は植物体を培地から引き抜き、ろ紙の上に静置し、10分、30分、1時間、2時間、6時間後にサンプリングを行った。

組織別では根、茎、子葉、葉、老化葉、つぼみ、花、シリーク(緑色)、シリーク(黄色)、および種子をサンプリングした。根、茎、子葉、葉はストレス無処理に加え、30分の乾燥ストレス後に各部位に分けサンプリングを行った。

### (2) in gel kinase 法

これらの試料からタンパク質を抽出した後、AREB タンパク質を基質として含むポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。さらに、ゲル内のタンパク質を里奈中レーションし、 $^{32}\text{P}$  を用いてリン酸化能の有無を調べることで、遺伝子の機能解析を行った。

### (3) 3次元イメージング法

植物サンプルを連続的に観察する。連続する画像すべてを3次元再構築ソフト Boxel Viewer (東芝機械)によりコンピューター(PC)上で立体的再構築し、植物体内の遺伝子発現部位等の情報を抽出した。

## 4. 研究成果

### (1) ストレス処理別タンパク質のリン酸化

ABA 応答に重要な役割を果たす転写因子 AREB は浸透圧ストレスを受けリン酸化する

ことでシグナル伝達することが知られている。さまざまな浸透圧ストレスを与え、植物の蛋白のリン酸化レベルを in gel kinase 法を用いて測定を行い、浸透圧ストレスレベルを調べた。

各種ストレスのうち、乾燥およびマンニトール処理において最もストレスを受けていることが明らかになった。次いで NaCl および ABA 処理においてリン酸化レベルが高いことが明らかになった。

さらに、乾燥、ABA および NaCl 処理によるリン酸化経時的に観察したところ、いずれの処理においてもリン酸化レベルが上昇していることが明らかになった(図1)

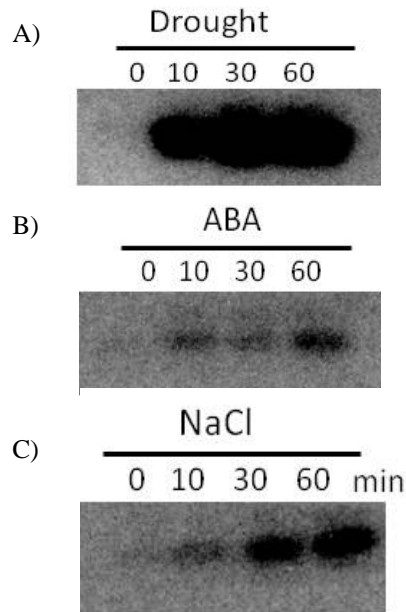


図1. 乾燥、NaCl および ABA 処理によるリン酸化レベルの推移

A, 乾燥ストレス処理; B, 100 $\mu\text{M}$  ABA 水溶液処理; C, 250mM NaCl 水溶液処理

### (2) ストレス処理時間によるストレスレベルの推移

(1)においてストレスレベルが最も高いことが示された乾燥ストレスを用いて、10分、30分、1時間、2時間、6時間の処理を行った後のリン酸化レベルを測定した。

10分間の乾燥ストレス処理においてすでにリン酸化が見られた。さらに、6時間にかけてリン酸化レベルが上昇することが明らかになった。

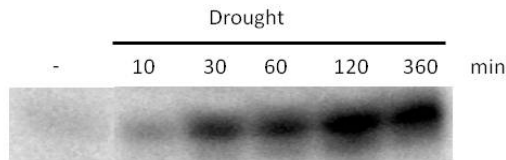


図2. 乾燥ストレス処理によるリン酸化レベルの推移  
リン酸化レベルは10分から6時間にかけて経時的に増加している。

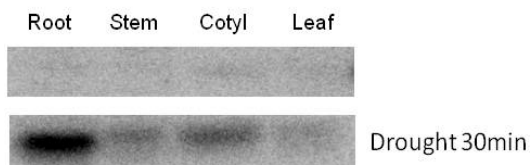
### (3) 組織別のストレスレベル

ストレスを与えていない根、茎、葉、花および種子をもちいてリン酸化レベルを測定したところ、種子においてのみリン酸化が確認された。

さらに乾燥ストレス処理30分の植物体を用いて組織別のリン酸化レベルを測定したところ根において最もストレスを受けていることが明らかになった。

ABA合成の最終段階の反応を触媒している合成酵素アルデヒドオキシダーゼが根端および維管束で発現していることから、浸透圧ストレス応答は根でシグナルを受容し、植物全体にシグナルが輸送されることが示唆された。

#### A)



#### B)



### 図3. 組織別のストレスレベル

A, 根、茎、子葉、本葉におけるリン酸化レベルおよび、乾燥ストレス処理後30分におけるリン酸化レベル。根においてもっとも強いリン酸化が確認できた。

B, 老化葉、花芽、花、シリーク（緑色）、シリーク（黄色）、乾燥種子におけるリン酸化レベル。乾燥種子において最も強いリン酸化が確認できた。老化葉においてもリン酸化が確認でき、ABAが作用していると考えられる部位での活性が見られた。

### Drought, High Salt

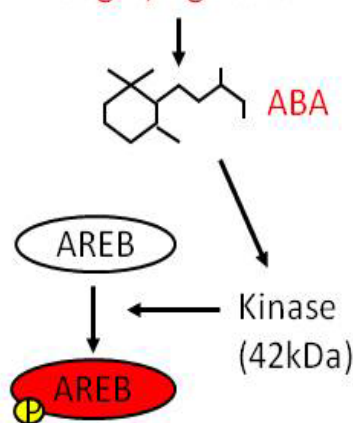


図4. 浸透圧ストレスに対する応答およびリン酸化機構のモデル図

(4) 3次元イメージング法を用いた立体観察  
現在、リン酸化に係る遺伝子について3次元イメージング法を用いて解析を行っているが、現在までに結果は得られていない。取得でき次第、公表する予定である。

### 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 0件)

[学会発表] (計 3件)

1. Norihito Kanamori, Yasunari Fujita, Takuya Yoshida, Hiroko Sayama, Miki Fujita, Kyonoshin Maruyama, K. Hiratsu, Mamoru Ohme-Takagi, Motoaki Seki, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. (2007) Molecular characterization of AREB family transcription factors involved in ABA responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. 7th APSRC International Symposium: Abiotic Stress and Plant Growth and Development, Nov 8, Gwangju, Korea.
2. 金森紀仁・藤田泰成・梅沢泰史・篠崎一雄・篠崎和子 (2008) アブシジン酸応答に関与する AREB の活性調節機構. 第49回日本植物生理学会年会, 3月20~22日, 札幌.
3. Norihito Kanamori, Yasunari Fujita, Kazuo Nakashima, Taizhi Umezawa, Kazuo Shinozaki and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. (2008) Regulation of AREB phosphorylation in *Arabidopsis thaliana*. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB 2008), Aug 17-22, Tampere, Finland.

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金森 紀仁

独立行政法人国際農林水産業研究センター  
ー・生物資源領域・研究員

研究者番号：30455258

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし