

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06713

研究課題名(和文) B3-MAPKKを介した植物浸透圧ストレス応答機構の解明

研究課題名(英文) Understanding the molecular mechanism of B3-MAPKK-mediated plant osmostress response

研究代表者

坂田 洋一 (Sakata, Yoichi)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：50277240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の浸透圧ストレス応答においてタンパク質リン酸化酵素SnRK2は重要な役割を果たすが、SnRK2が浸透圧により活性化される機構については不明であった。本研究課題では、ヒメツリガネゴケにおいて見出されたSnRK2上流キナーゼとしてのB3-RAFが被子植物シロイヌナズナにおいても保存され、SnRK2を活性化することが明らかとなり、B3-RAFを介したSnRK2の活性化機構が陸上植物に広く存在することを示した。一方、シロイヌナズナB3-RAFの活性制御機構については、ヒメツリガネゴケとシロイヌナズナで異なる機構が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究グループによる乾燥応答の制御因子としてのRAFの発見がシロイヌナズナRAFの機能解明につながったように、ヒメツリガネゴケの解析はコケ植物の知見にとどまらず、被子植物が有しながらもこれまで明らかにされてこなかった環境情報処理システムの解明に繋がることが期待できる。進行する地球規模の環境変化において、水環境に対する作物のレジリエンス向上は重要課題である。植物の水環境情報統御の分子基盤を明らかにしていくことは、食糧・エネルギー問題解決への基盤技術構築に貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：A protein kinase SnRK2 plays an essential role in osmostress responses of plants; however, a mechanism how SnRK2 is activated by osmostress was unknown. Our research group showed using the moss that B3-RAF is an upstream kinase of SnRK2 in ABA and osmostress signaling. In this research project we further showed that B3-RAF is evolutionarily conserved in Arabidopsis, which is a model plant of angiosperms, and also regulates osmostress-responsive SnRK2 activity via direct phosphorylation. Our research demonstrates that B3-RAF mediated osmostress-dependent SnRK2 activation is evolutionarily conserved among land plants. On the other hand, the mechanism by which B3-RAF is activated is suggested to be different between Arabidopsis and the moss.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：ABA 浸透圧 SnRK2 RAFカイネース シロイヌナズナ ヒメツリガネゴケ

### 1. 研究開始当初の背景

陸上植物は乾燥(浸透圧ストレス)に曝されると、植物体を乾燥から守るために気孔の閉鎖や適合溶質の蓄積、根の成長制御といった様々な生理応答を引き起こす。これらの応答は植物固有のタンパク質リン酸化酵素 SnRK2 (Snf1-Related Protein Kinase 2) の活性化による下流因子のリン酸化により引き起こされる。SnRK2 の活性化機構には 1) 浸透圧によるもの、2) 植物が乾燥に曝されることで蓄積される植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)によるものがあると考えられている。今までに、ABA を介した活性化機構については多くの知見が得られている。SnRK2 は通常状態ではタンパク質脱リン酸化酵素 (PP2CA) と結合し、活性が抑制された状態にある。ABA が受容体 PYL に結合すると、PYL と PP2CA の結合を促進し、SnRK2 の抑制状態が解除され、自己リン酸化を介して活性化されるというモデルである。

しかしながら、乾燥(浸透圧ストレス)に応答した維管束における ABA 合成・孔辺細胞への輸送には一定の時間がかかるため、乾燥ストレス後数分単位で観察される気孔閉鎖を ABA による SnRK2 の活性化のみで説明することはできない。すなわち、ABA/PYL/PP2CA を介さない SnRK2 活性化機構が気孔閉鎖に重要な役割を持つにも関わらず、浸透圧による活性化機構については、未知の上流因子の存在が示唆されているのみで、ほとんど明らかにされていないのが現状である。そのような状況で、申請者の研究グループは基部陸上植物であるヒメツリガネゴケを用いて、SnRK2 の ABA・浸透圧ストレスに応答した活性化に必須な因子として B3 MAPKKK をコードする ARK (ABA and abiotic stress-responsive Raf-like kinase) を同定した (Saruhashi et al., PNAS 2015)。さらに、モデル被子植物シロイヌナズナがコードする B3 MAPKKK の一部の遺伝子がヒメツリガネゴケにおいて ARK 機能を相補することを明らかにした。しかしながら、シロイヌナズナを含めた被子植物において B3 MAPKKK の SnRK2 活性化における役割については現在まで全く明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、SnRK2 の上流キナーゼとして B3 MAPKKK をコードする ARK に着目し、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、これらを欠損する変異株を樹立し、ABA/浸透圧ストレス感受性、気孔閉鎖に及ぼす影響を生理学的に解析する。さらに、ARK が SnRK2 活性化に及ぼす影響をゲル内リン酸化アッセイや試験管内リン酸化アッセイといった生化学的手法を用いて調べ、ARK を介した SnRK2 活性化機構の分子基盤を明らかにするとともに、植物において未解明な浸透圧センサー機構解明への糸口を得る。

陸地に固着し移動できない陸上植物は様々な環境センサーを発達させ、環境変化に対応する仕組みを獲得してきた。水分環境は植物にとって最も大事な要因の一つであり、乾燥や塩害などの環境ストレスは植物に浸透圧ストレスとして認識され、植物は様々な防御応答を発動する。バクテリアにおいては、二成分制御系が浸透圧センサーとして機能することが明らかとなっているが、植物においては未だその実態は明らかでない。SnRK2 の活性化機構において研究が進んだ ABA/PYL/PP2CA による制御機構についても、浸透圧ストレスを感知して蓄積が高まる ABA に依存した仕組みであり、浸透圧を感知する仕組みについては未だ答えが出ていない。植物において一部の B3 MAPKKK はバクテリアの二成分制御系でセンサー因子として機能するヒスチジンキナーゼと物理的に相互作用して機能が制御される例が報告されている。本研究により ABA に依存しない浸透圧による SnRK2 の活性化機構に関わる直接的な上流因子の同定に成功すれば、長らく不明であった植物の浸透圧センサーの解明に一步近づくであろう。さらには、本研究により B3 MAPKKK を介した SnRK2 活性化機構を明らかにすることができれば、植物の乾燥ストレス耐性を向上させる新たな手法の開発へと繋がると考えている。

### 3. 研究の方法

シロイヌナズナゲノムには 6 コピーの B3 MAPKKK がコードされている。このうち 3 種の B3 MAPKKK がヒメツリガネゴケの ARK 機能を相補する事が、申請者を含めた研究グループの先行研究により示されている。本研究ではこれら 3 種の B3 MAPKKK (AtARK1, 2, 3 と名付ける) に着目して研究を進める。すでに、シロイヌナズナバイオリソースセンター (ABRC) より取り寄せた T-DNA 挿入ラインの掛け合わせにより、AtARK を様々な組み合わせで欠損するシロイヌナズナの作出を完了している。さらに、3 種の AtARK を欠損するシロイヌナズナ変異株 (TKO 株) では野生型株と比較して、種子発芽時に ABA 感受性が低下し、切除葉の水分損失が増大する事、すなわち、乾燥ストレスに応答した気孔閉鎖機能に異常を持つことを明らかにしている。

#### ABA および乾燥(浸透圧)ストレスに応答した気孔開度解析

シロイヌナズナにおいて、最も乾燥応答および ABA 応答が早期に現れるのは気孔閉鎖である。そこで、単離表皮細胞および葉切片を用いて、ABA 処理時、高浸透圧溶液処理時(乾燥ストレス)における野生型株および TKO 株の気孔開度を調査する。単離表皮と葉切片を用いる理由は、浸透圧ストレスを受けて葉で合成される内因性 ABA の関与を区別するためである。また、同様

の理由で、ABA 合成欠損株である *aba2-1* 変異株も併用する。これらを行う事で、乾燥ストレス時において AtARK が浸透圧経路で働くのか、ABA 経路で働くのかを明らかにする。

#### ABA および乾燥ストレスに応答した SnRK2 活性化解析

SnRK2 の活性化は植物の ABA および乾燥 (浸透圧) ストレス応答に必須である。SnRK2 の活性化はヒストンを人工基質としたゲル内リン酸化アッセイにより検出することができる。この手法を活用し、野生型株と AtARK 欠損 (TKO) 株において ABA および高浸透圧溶液処理時 (乾燥ストレス) における SnRK2 活性化状態を解析する。AtARK が SnRK2 の活性化に必要なものであるならば、TKO 株において SnRK2 の活性化が欠損もしくは低下しているはずである。この実験においても、ABA 経路と浸透圧経路の区別をするため、単離表皮を用いたゲル内リン酸化アッセイに取り組みが、比較的少量のタンパク質が必要となるため、困難が予想される。その場合には、TKO 背景に *aba2-1* 変異を導入した株を掛け合わせにより作出し、内因性 ABA を欠損する TKO 株を用いて実験を行う。

#### ABA および乾燥ストレスに応答した遺伝子発現の網羅的解析

現在までに定量的 PCR により、TKO 株においては浸透圧応答のマーカー遺伝子である COR15a, RD29B や RAB18 の浸透圧応答性が低下していることを確認している。一方で、ABA 応答性マーカー遺伝子においては、応答性が向上したものと低下したものが確認され、現在のところ一貫した傾向が見出せない。そこで、RNA-seq を用い、AtARK の欠損が ABA および浸透圧ストレスに応答した遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析する。これにより、AtARK が浸透圧経路で働くのか、ABA 経路で働くのかを明らかにする。

#### AtARK と相互作用するヒスチジンキナーゼの探索

申請者の研究グループではすでに、コケ植物において ARK と相互作用するヒスチジンキナーゼの同定に成功している (未発表データ)。これらはシロイヌナズナにおいてはエチレン受容体として機能することが示されているヒスチジンキナーゼのグループに属している。これまで、ABA シグナル伝達とエチレンシグナル伝達には相互作用があることが明らかにされているが、その実態は不明のままである。そこで、これらエチレン受容体として機能するヒスチジンキナーゼのグループに着目し、これらが AtARK と相互作用するのかを、酵母ツーハイブリッド法および蛍光タンパク質を用いた生体内タンパク質相互作用解析法 (BiFC 法) を用いて解析する。

上記の一連の研究により、今まで明らかにされてこなかった浸透圧による SnRK2 活性化機構の分子基盤を明らかにする。また、ヒスチジンキナーゼが ARK の上流制御因子である可能性を示すことができれば、ヒスチジンキナーゼを本体とする植物の浸透圧センサー機構の解明へ発展させることが可能となる。

#### 4. 研究成果

1) B3 MAPKKK (AtARK1, 2, 3 と名付ける) を欠損するシロイヌナズナ (TKO) を作出し、リーフディスクを用いて ABA、乾燥ストレス、浸透圧ストレスを与えて気孔閉鎖を調査したところ、乾燥ストレス及び浸透圧ストレスを与えた際の TKO の気孔閉鎖は野生型株と比較して有意に遅延することが明らかになった。一方、ABA に応答した気孔閉鎖に差は認められなかった。このことから、AtARK は浸透圧変化に応答した気孔閉鎖を ABA 非依存的に制御することが示された。

2) RNA-seq を用い、AtARK の欠損が ABA および浸透圧ストレスに応答した遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析した。その結果、AtARK の欠損は浸透圧応答性遺伝子の発現に影響を与える一方で、ABA 応答性遺伝子発現には影響はほとんど与えないことが明らかとなった。

3) AtARK の各単一欠損変異株を用いて、SnRK2 の活性化に与える影響をゲル内リン酸化実験により調査したところ、SnRK2 の活性化には AtARK2 が主に働いていることを明らかにした。

4) subclass I SnRK2 は ABA 非依存的に浸透圧により活性化される。近年の研究報告で、subclass I の活性化には B4 MAPKKK が関与していることが示された。そこで、AtARK が subclass I SnRK2 の活性化に関わるかを、AtARK TKO を用いてゲル内リン酸化実験により解析したところ、AtARK は低浸透圧条件 (300 mM マンニトール) において subclass I SnRK2 の活性に重要な役割を果たしている事が示された。

5) AtARK と同じく B3 MAPKKK に属するエチレンシグナル伝達系の負の制御因子 CTR1 はバクテリア二成分制御系のヒスチジンキナーゼに相同性を有するエチレン受容体と物理的に相互作用して機能が制御される例が報告されていることから、ARK の活性制御を行う上流因子としてエチレン受容型ヒスチジンキナーゼに着目し、酵母ツーハイブリッド法を用いて総当たりに解析を行なったところ、AtARK3 と ETR1 および ERS1 との相互作用が確認された。AtARK3 と ETR1 および ERS1 が *in vivo* で小胞体において相互作用することをタバコの葉を用いた BiFC 法により確認した。このことから、AtARK の活性制御にヒスチジンキナーゼが関与していることが示唆された。

6) 酵母ツーハイブリッドシステムを用いて、AtARK3 と ETR1 の相互作用に必要なそれぞれの

領域を解析したところ、ヒメツリガネゴケ ARK と PpHK5 との相互作用領域として検出された保存領域を介していることが示された。

7) AtARK の活性化ループ内のセリンをアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化 AtARK が SnRK2 と相互作用することが示された。このことから、AtARK リン酸化の生物学的意義が明らかとなった。

#### 研究期間全体を通じて実施した研究の成果

本研究課題を通じて、ヒメツリガネゴケにおいて見出された SnRK2 上流キナーゼとしての B3-RAF の機能が被子植物であるシロイヌナズナにおいても保存されていることが明らかとなった。一方、これまでの解析からは、シロイヌナズナ B3-RAF の活性制御機構はヒメツリガネゴケと異なっていることが示唆された。

## 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 3件）

1. 著者名 Komatsu Kenji, Takezawa Daisuke, Sakata Yoichi	4. 巻 43
2. 論文標題 Decoding ABA and osmostress signalling in plants from an evolutionary point of view	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 2894 ~ 2911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.13869	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 Islam Mousona, Inoue Takumi, Hiraide Mayuka, Khatun Nobiza, Jahan Akida, Kuwata Keiko, Katagiri Sotaro, Umezawa Taishi, Yotsui Izumi, Sakata Yoichi, Takezawa Daisuke	4. 巻 185
2. 論文標題 Activation of SnRK2 by Raf-like kinase ARK represents a primary mechanism of ABA and abiotic stress responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 533 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiaa046	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 Nakano Yuki, Kusunoki Kazutaka, Hoekenga Owen A., Tanaka Keisuke, Iuchi Satoshi, Sakata Yoichi, Kobayashi Masatomo, Yamamoto Yoshiharu Y., Koyama Hiroyuki, Kobayashi Yuriko	4. 巻 11
2. 論文標題 Genome-Wide Association Study and Genomic Prediction Elucidate the Distinct Genetic Architecture of Aluminum and Proton Tolerance in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00405	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 Shohei Katsuta, Goro Masuda, Hyeokjin Bak, Akihisa Shinozawa, Yoshiaki Kamiyama, Taishi Umezawa, Daisuke Takezawa, Izumi Yotsui, Teruaki Taji, Yoichi Sakata	4. 巻 324
2. 論文標題 Arabidopsis Raf like kinases act as positive regulators of subclass III SnRK2 in osmostress signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.14756	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 Toriyama Tsukasa, Shinozawa Akihisa, Yasumura Yuki, Saruhashi Masashi, Hiraide Mayuka, Ito Shiori, Matsuura Hideyuki, Kuwata Keiko, Yoshida Mika, Baba Tadashi, Yotsui Izumi, Taji Teruaki, Takezawa Daisuke, Sakata Yoichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Sensor histidine kinases mediate ABA and osmostress signaling in the moss <i>Physcomitrium patens</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 175.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.10.068	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増田 悟郎, 勝田 祥平, 朴 赫鎮, 篠澤 章久, 神山 佳明, 梅澤 泰史, 竹澤 大輔, 四井 いずみ, 太治 輝昭, 坂田 洋一
2. 発表標題 B3-MAPKKKを介したsubclass SnRK2の活性制御機構の解析
3. 学会等名 植物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Goro Masuda, Shohei Katsuta, Hyeokjin Bak, Akihisa Shinozawa, Yoshiaki Kamiyama, Taishi Umezawa, Daisuke Takezawa, Izumi Yotsui, Teruaki Taji, Yoichi Sakata
2. 発表標題 Arabidopsis B3-MAPKKKs are positive regulators of subclass III SnRK2 in osmostress signaling
3. 学会等名 植物生理学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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