

平成 22 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20770037

研究課題名（和文） 乾燥ストレス耐性に関与する OsCMPK1 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of OsCMPK1 that involved in drought stress tolerance

研究代表者 佐々木 忠将

（東京理科大学基礎工学部 助教）

研究者番号：50432802

研究成果の概要（和文）：イネのレセプターキナーゼ様タンパク質である OsCMPK1 は乾燥ストレス耐性に関与すると考えられる。そこで、*OsCMPK1* 遺伝子の発現量の変動を詳細に定量し、この遺伝子は光依存的な発現パターンを有するが、乾燥ストレスによって発現パターンが大きく崩れることを明らかにした。次に、OsCMPK1 と相互作用する因子の探索を行い、このタンパク質のキナーゼドメインには、乾燥や低温などに応答する複数の因子が含まれていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The rice receptor kinase like protein, OsCMPK1 is thought to be involved in the drought stress tolerance. To analyze the function of OsCMPK1, at first, we investigated the expression patterns of this gene. And we revealed that OsCMPK1 has light dependent expression pattern, but this expression pattern was disrupted by drought stress. Next, we searched the proteins possibly interact to the kinase domain of OsCMPK1. At the results of this analysis, we revealed that some factors response to the drought or cold stresses were included.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 21 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：環境応答・ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

イネのプロテインキナーゼ様タンパク質である OsCMPK1 に関して以下のような興味深い結果を得ている。

(1) OsCMPK1 の C-末端のみを過剰発現させた

組換え体植物には乾燥ストレスに対する耐性が現れた。このことから OsCMPK1 に乾燥ストレス応答に関与していることが示唆された。

(2) RNAi 法により、この遺伝子の発現を抑制

すると明らかな成長阻害を示し、ほぼ全ての個体が枯死した。すなわち、OsCMPK1 は植物の生存に必須のものであることが示唆された。

(3)全長の OsCMPK1 は細胞膜に局在するが、C-末端のタンパク質キナーゼドメインのみを GFP と融合させると、核に移行することがわかった。

2. 研究の目的

上述の結果より、OsCMPK1 は通常、細胞膜に存在するが、乾燥などのストレスにตอบสนองして構造変化を起こし、C-末端領域切断され、細胞膜から切り離され、核内に移行するのであると考えられた。これがタンパク質キナーゼとして機能し、ストレス応答に関与するという仮説を立てた。本研究の目的は、この作業仮説が成り立つかを検証することである。

3. 研究の方法

(1)OsCMPK1 の発現解析：この遺伝子の乾燥ストレスに対する発現量の変動を詳細に定量した。また、OsCMPK1 が低温や塩ストレスに対してどのように反応するかを定量的に解析した。

(2)OsCMPK1 や様々な断片化した部分タンパク質と GFP を融合したタンパク質をレポーターとして用いて、タマネギ表皮細胞およびイネ培養細胞に導入し、これらのタンパク質の局在を調べた。形質導入したイネ培養細胞に関しては、再分化個体を誘導し、イネの根での OsCMPK1 の局在変化を詳細に解析した。

(3)OsCMPK1 と相互作用する因子の探索：OsCMPK1 がどのようなタンパク質を標的として機能するのかを調べるために、Yeast two hybrid 法により OsCMPK1 のキナーゼドメインと相互作用する因子を探索した。

(4)形質転換体を用いた解析：乾燥ストレスに対する応答性を中心にその表現型を解析し、この遺伝子が形質転換体内でどのような生理機能を有するのかを解析した。

4. 研究成果

(1)OsCMPK1 の発現には、組織特異的ではなく植物体全体で弱く発現していることがわかった。そこで、地上部での発現量の変動を詳細に調べたところ、昼間に高く、夜間に低くなる光依存的な発現パターンを有していることがわかった。この光依存的な発現パターンは乾燥ストレスを与えることで大幅に崩れることがわかった。塩ストレスおよび低温ストレスを与えた場合も同様の結果が得られた。

(2)全長の OsCMPK1 に GFP を融合したレポータータンパク質をタマネギ表皮細胞に導入し、細胞内局在を調べたところ、全長の OsCMPK1 は細胞膜に局在することがわかった。

一方、キナーゼドメインを含む C-末端と GFP を融合したタンパク質は核に局在した。この領域の配列を詳細に解析したところ、キナーゼドメインの直前に核移行シグナルと考えられる配列が存在することがわかった。そこで、この配列を含まないキナーゼドメインと GFP を融合したタンパク質を導入したところ、この融合タンパク質は細胞質全体に局在することがわかった。次に、これらの融合タンパク質をイネ培養細胞に導入し、遺伝子組換え体を作製し、イネの細胞での局在を調べた。その結果、全長のタンパク質は細胞膜に、核移行シグナルを含むキナーゼドメインは核に局在することがわかった。

(3)OsCMPK1 と相互作用する因子の探索を行った。その結果、OsCMPK1 のキナーゼ領域と相互作用を示すタンパク質が見つかった。これらの中には、乾燥や低温などに対する応答因子として知られるタンパク質が含まれていた。

これらの結果から、イネの OsCMPK1 は通常、細胞膜に局在するが、乾燥などのストレスにตอบสนองして切断され、核内へと移行すると考えられた。核内へと移行したキナーゼ領域は乾燥や低温などに対する応答因子と相互作用することで機能し、イネの乾燥耐性に関与することが示唆された。

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)

〔学会発表〕(計4件)

佐々木忠将、イネの乾燥耐性に関わる細胞膜局在型タンパク質キナーゼ OsCMPK1 の解析、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜

佐々木忠将、イネの細胞膜に局在するレセプターキナーゼ様タンパク質 OsCMPK1 の機能と生理作用の解析、日本育種学会第115回講演会、2009年3月、つくば

佐々木忠将、イネ細胞膜局在型タンパク質キナーゼ OsCMPK1 の解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月、神戸

佐々木忠将、イネ細胞膜局在型タンパク質キナーゼ OsCMPK1 の発現解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月、神戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 忠将(東京理科大学基礎工学部 助教)

研究者番号：50432802

(2)研究協力者

島田 浩章 (東京理科大学基礎工学部 教授)

研究者番号 : 70281748