

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770042
 研究課題名(和文) SnRK2 プロテインキナーゼと相互作用するカリウムトランスポーターの機能解析
 研究課題名(英文) Functional analysis of potassium transporters interacting with SnRK2 protein kinases in Arabidopsis.
 研究代表者
 梅澤 泰史 (Umezawa Taishi)
 独立行政法人理化学研究所・機能開発研究チーム・研究員
 研究者番号：70342756

研究成果の概要 (和文)：

植物のストレス応答を制御する SnRK2 プロテインキナーゼと相互作用するタンパク質を酵母ツーハイブリッド法によって探索し、カリウムトランスポーター様のアミノ酸配列を持つクローンを 2 種類得た。この遺伝子の機能を解析するために、シロイヌナズナの遺伝子破壊株を単利して、その表現型を調べたところ、塩ストレスを与えたときの K 吸収能力に差が認められた。このことから、今回得られた因子は植物の根において SnRK2 と相互作用し、機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

SnRK2 family act as an important signaling factor for stress responses in plant cells. Here, we screened interacting partners of SnRK2 by yeast two-hybrid analysis, and isolated two potassium transporter-like proteins. To investigate their functions, we established Arabidopsis knockout mutants and checked any phenotypic changes in the mutants. These mutants showed a significant changes in potassium uptake under salt stress. Our results suggested SnRK2 and potassium transporters cooperatively functions in stress responses in root tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・生理学

キーワード：プロテインキナーゼ・カリウムトランスポーター・シロイヌナズナ・リン酸化・環境ストレス・アブシジン酸

1. 研究開始当初の背景

植物は移動の自由を持たないため、外環境の変化に対する生存戦略として独自の応答機構を発達させている。植物に特異的なプロテインキナーゼファミリーである **SnRK2** は、植物の環境応答を制御する細胞内シグナル伝達系で働く重要な因子の一つである。植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) や高浸透圧等によって活性化するという特徴があり、下流のタンパク質をリン酸化して機能を調節することによってシグナルを伝達すると考えられる。**SnRK2** の重要性は数多くの研究によって実証されており、そのシグナル伝達のメカニズムを明らかにすることは、植物の環境応答機構を理解する上で重要である。しかしながら、**SnRK2** の下流の基質タンパク質はほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

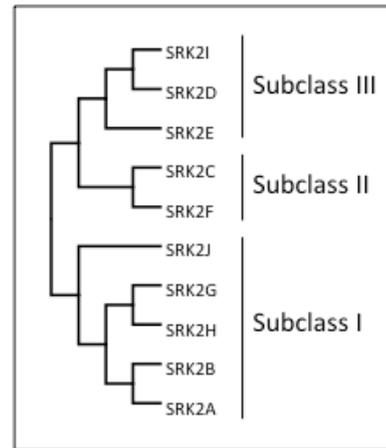
植物のストレス応答において重要な働きをすることが明らかとなっている **SnRK2** プロテインキナーゼのシグナル伝達機構を明らかにするために、**SnRK2** の下流に位置するリン酸化ターゲットを知ることが重要である。そこで、本研究では **SnRK2** と相互作用するタンパク質を網羅的に解析し、有望な候補として二種類のカリウムトランスポーター様の配列を持つ遺伝子を単離した。そこで、この遺伝子のストレス応答における機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

シロイヌナズナに **SnRK2** が 10 個あり、それぞれ SRK2A~J と名付けられている (図 1)。これらは 3 つのサブクラスに分けることができ、そのうちサブクラス III と呼ばれるグループには、SRK2D, E, I の 3 つのメンバーが存在する。このグループはすべて ABA によって強く活性化され、植物の ABA 応答に必須であることがわかっている。特に、SRK2E は別名 OST1 (open stomata 1) とも呼ばれ、植物の葉の表面に存在する気孔の制御に重要である。そこで、本研究ではまず SRK2E と相互作用するタンパク質を探すために、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行った。

Bait として SRK2E に GAL4 DNA 結合ドメインをつないだものを用い、Prey には GAL4 活性化ドメインを結合したシロイヌナズナの cDNA ライブラリーを用いた。その結果、二種類のカリウムトランスポーター様の配列を持つ遺伝子が単離され、EIP1 および EIP2 と名付けた。

これらの 2 つの遺伝子の機能を解析するために、シロイヌナズナの T-DNA タグラインから EIP1 および EIP2 の遺伝子破壊株を単離した。さらに、これら二つの変異体を掛け合わせて二重変異体 *eipleip2* を作成した。これ



Arabidopsis SnRK2 family
(SNF1-related protein kinase 2)

図 1 シロイヌナズナの **SnRK2** ファミリー

らの変異体を用いてストレス耐性などの表現型を調査した。

さらに、EIP1 および EIP2 と SRK2E との関係性を調べるために、それぞれの組換えタンパク質を大腸菌で発現させ、アフィニティー精製を行った。なお、EIP は膜タンパク質であるため、反応には細胞質の領域のみを使用した。これらのタンパク質を用いてリン酸化反応を行い、SRK2E が EIP をリン酸化するかどうかを確認する実験を行った。

4. 研究成果

酵母ツーハイブリッド法で単離した EIP1 および EIP2 は、機能が未同定の遺伝子であったが、カリウムトランスポーターとしての機能を強く示唆するアミノ酸配列を有していた。これらは互いに相同な配列を持つ遺伝子で機能的に冗長であることが予想された。実際、EIP1 および EIP2 の遺伝子破壊株を用いても表現型の差はほとんど観察されなかった。*eipleip2* 二重変異体では、高塩ストレス条件下で K 欠乏の状態においたときのみ、野生型に比べて顕著な耐塩性の低下が認められた。したがって、EIP1 および EIP2 は塩ストレス条件下で K 吸収能力を維持するために必要な遺伝子であることが示唆された。この結果は、EIP1 および EIP2 の根における働きを示していると考えられる。

さて、EIP1 および EIP2 はもともと SRK2E と相互作用する因子として単離されたものである。SRK2E は気孔の開閉に重要であり、気孔で強く発現していることが知られている。しかしながら、今回の変異体では、気孔の開閉に関して表現型にほとんど差がみられなかった。孔辺細胞では別のファミリーのトランスポーターが働いている可能性がある。その候補の一つは内向き整流性チャンネルの KAT1 である。KAT1 は SRK2E によってリン酸化され、活性が調節される K チ

チャンネルである。

一方、EIP1 および EIP2 が SRK2E によってリン酸化されるかどうかを調べる実験では明確な結果が得られなかった。現時点で考えられる可能性は二つある。一つは EIP が SRK2E の基質ではない可能性、もう一つは実験上の問題によってリン酸化が検出されない、という可能性である。この点については、今後引き続き検討していきたい。

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 6 件)

1. *Mizoguchi, M., *Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujira, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. "Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression." *Plant Cell Physiol.* (in press) *equal contribution. (査読有)
2. Hirayama, T. and Umezawa, T. (2010) "The PP2C-SnRK2 complex: The central regulator of an abscisic acid signaling pathway." *Plant Signal. Behav.* 5(2): 160-163. (査読有)
3. Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) "Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis." *Plant Cell Physiol.* 50(12):2123-2132. (査読有)
4. Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B. and Uozumi, N. (2009) "Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SRK2E/OST1/SnRK2.6 protein kinase." *Biochem. J.* 424(3): 439-448. (査読有)
5. Umezawa, T., Sugiyama, Y., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y. and Shinozaki, K. (2009) "Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106(41): 17588-93. (査読有)

6. Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) "Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/ SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/ SnRK2.3 involved in ABA-signaling are essential for the control of seed development and dormancy." *Plant Cell Physiol.* 50(7): 1345-63. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. and Shinozaki, K. "The PP2C-SnRK2 complex : a central regulatory module in abscisic acid signaling." Plant Protein Phosphorylation Symposium, University of Missouri-Columbia, Columbia, MO, May. 26-28, 2010. (口頭発表)
2. 梅澤泰史・平山隆志・篠崎一雄 : タンパク質のリン酸化・脱リン酸化が支配する植物ホルモンアブシジン酸のシグナル伝達経路、第 51 回日本植物生理学会年会シンポジウム 7 「タンパク質の翻訳後修飾と植物の機能制御」、熊本、3 月 22 日 (2010) (口頭発表)
3. Umezawa T. "Type 2C Protein Phosphatases Directly Regulate Abscisic Acid-Activated protein Kinases in Arabidopsis." North Carolina Plant Molecular Biology Consortium Seminar Series, North Carolina Biotechnology Center, Research Triangle Park, NC, Nov. 2, 2009. (口頭発表)
4. Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. and Shinozaki, K. "Physical and functional interactions between 2C-type protein phosphatases and SnRK2 protein kinases in ABA signaling." The 9th International Plant Molecular Biology Congress, St.Louis, MO, Oct. 25-30, 2009. (ポスター発表)
5. Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Anderson, J.C., Peck, S.C., Ishihama, Y. and Shinozaki, K. "A Large-scale Analysis of Phosphorylated Proteins Regulated by ABA or Drought Stress." International Conference Plant Abiotic Stress Tolerance, Vienna, Austria, Feb 2009. (ポスター発表)

[その他]

プレスリリース (2009 年 9 月 22 日)
劣悪環境に応答する植物ホルモン「アブシジン酸」の応答経路を解明

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2009/090922/detail.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅澤 泰史 (Umezawa Taishi)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究キ

ーム・研究員

研究者番号：70342756