

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06680

研究課題名(和文)植物水ストレス応答におけるB2/B3-Rafプロテインキナーゼ活性化機構の解明

研究課題名(英文)Activation mechanisms of B2/B3 Raf kinases in plant stress responses

研究代表者

竹澤 大輔 (Takezawa, Daisuke)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20281834

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)：植物には湯水などの水ストレスにตอบสนองして、アブシシン酸(ABA)を合成して水損失を抑制したり、ストレス関連遺伝子を発現して脱水による細胞の傷害を防ぐ仕組みがある。本研究ではABAや高浸透圧により活性化され、下流のSnRK2、さらにはbZIPなどの転写因子の活性化に関わることが明らかとなった。グループB2/B3-RAFプロテインキナーゼ(B2/B3-RAF)の制御機構について明らかにすることを目的とし、ゼニゴケやヒメツリガネゴケの変異株の単離と解析を行った。これらの解析から、B2/B3-RAFのN末端に存在する調節ドメインの役割が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高いレベルの環境ストレス耐性を持つコケ植物は、高い相同組み換え率やゲノム編集効率など、材料としても多くの利点がある。本研究で得られた成果は、被子植物にも保存される環境ストレス耐性の仕組みについても明らかにできると期待され、実際にコケ植物で明らかにされたB3-RAFの重要性は被子植物でも同様であることがのちに示された。こうしたアプローチは、シロイヌナズナなどのモデル系を用いた研究を補完するだけでなく、有用作物で未同定のストレス耐性関連因子の同定に寄与し、社会にも貢献しうる研究である。

研究成果の概要(英文)：Phytohormone abscisic acid (ABA) plays a key role in stomata closure, osmotic stress acclimation, and vegetative and embryonic dormancy in plants. Group B2/B3 Raf protein kinases (B2/B3-Rafs) serve as positive regulators of ABA and osmotic stress signaling in both mosses and liverworts as well as in the angiosperm *Arabidopsis thaliana*. While *P. patens* has a single B3-Raf called ARK, specific members of B3-Rafs among six paralogs regulate ABA and osmotic stress signaling in *A. thaliana*, indicating functional diversification of B3-Rafs. It was also found that the liverwort *Marchantia polymorpha*, belonging to liverworts, has three paralogs of B3-Rafs, MpARK1, MpARK2 and MpARK3, and MpARK4 and MpARK5 with structural variations in the non-kinase region toward the N terminus of the polypeptide. These studies have shed light on the role of the regulatory domains located in the N-terminal domain on the regulation of these Raf kinases.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物 ストレス 環境 プロテインキナーゼ アブシジン酸

1. 研究開始当初の背景

植物は土壌や組織の水ポテンシャル低下を感知してアブシジン酸(ABA)を合成して蒸散を防いだり、ABAとは独立の経路で細胞の保護に働くタンパク質遺伝子を発現し、脱水による細胞の傷害を防いでいる。このような水ストレス応答の機構は維管束植物だけでなくコケ植物にも存在し、陸上の植物に普遍的な機構の存在があると考えられる。しかし、植物の浸透圧センシングの仕組みやABAシグナルとの関連については不明な点が多い。グループB3-RAFプロテインキナーゼ(B3-RAF)がABAや高浸透圧応答において重要であることが示されていたが、これらの分子が環境によって制御されるメカニズムについては不明であった。また、グループB2-RAFに関しては植物における保存性と機能についての研究は極めて限られていた。

2. 研究の目的

本研究は、B2/B3-RAFプロテインキナーゼを介した水ストレス応答機構の解明を目指し、変異株の解析から活性の調節に関わるドメイン構造の解析、特にABAおよび高浸透圧応答に重要な領域の決定し、ARKリン酸化や他の分子との相互作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

GFP融合タンパク質を発現するヒメツリガネゴケ形質転換株から共免疫沈降(Co-IP)し、B3-RAFのリン酸化タンパク質やペプチドの質量分析、タンパク質相互作用などを調べた。また、相互作用タンパク質の配列解析を行い、遺伝子配列情報をもとにゲノム編集株を作成した。作成したゲノム編集株におけるARKタンパク質のリン酸化を、リン酸化ペプチド特異的な抗体を用いてイムノプロット法により検出した。また、RNA-seq解析により、作成したゲノム編集株とark変異株における遺伝子発現プロファイルとの共通性について調べた。ゼニゴケ遺伝子の解析では、B3-RAFだけでなくB2-RAFについても一過的遺伝子発現実験およびゲノム編集株の機能解析を試みた。加えて、シロイヌナズナB3-RAFの変異株を単離し、浸透圧ストレス応答の変化をRNA-seq解析により解析した。

4. 研究成果

(1) 変異株およびドメイン解析によるARK機能調節領域の解析: ヒメツリガネゴケの解析から多数のarkアリルを同定し、ABA応答に必要な領域を特定した。ARKの活性化に関わるリン酸化部位を同定し、そのABA応答的な変化を野生株およびプロテインホスファターゼ(PP2C-A)の欠損株で解析した。ゼニゴケにおいて、複数存在するB3-RAFキナーゼについて、EDRドメインを共通にもつRAFがABA応答に寄与していることを、ゲノム編集の成長解析から明らかにした。また、RNA-seqによりゲノム編集株で変動する遺伝子を同

定した。

(2) グループ B2-RAF キナーゼ機能の解析：ゼニゴケでは B2-RAF についても B3-RAF と同様の機能があることを示した。ゼニゴケにある 3 つの B3-RAF の機能的差異について RNA-seq による遺伝子発現解析、乾燥耐性試験、休眠打破の様子などから明らかにした。

(3) ARK 相互作用タンパク質の解析：ARK-GFP を発現する株の Co-IP と質量分析から、SnRK2 とともに複数の ETR 様ヒスチジンキナーゼ (HK) が ARK と相互作用することを見出した。HK の 4 重変異体において、ARK および SnRK2 の活性化が抑制されており、細胞は ABA 非感受性、高浸透圧感受性を示した。

(4) 維管束植物における B3-RAF キナーゼの機能解析：変異株の解析から、シロイヌナズナ B3-RAF AtARK1 3 の SnRK2 活性化に関わる機能を調べた。3 重変異株 *Atark1/2/3* の解析から、変異株において ABA および浸透圧ストレス応答が低下していることを示した。

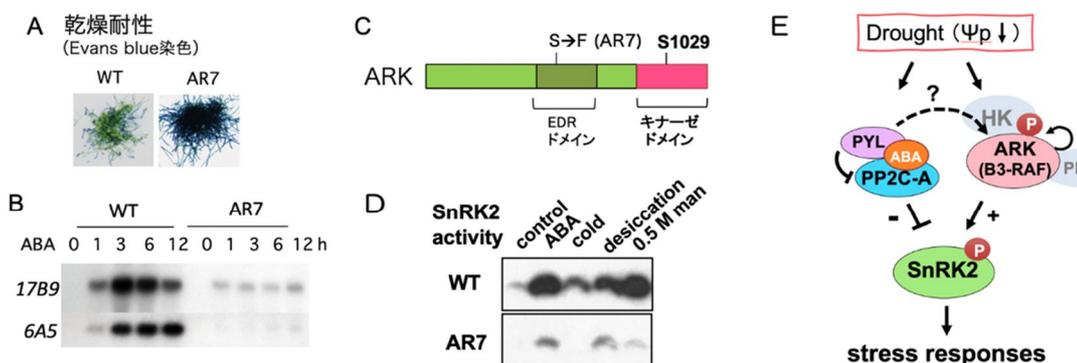


図1 ABA非感受性株AR7の責任遺伝子 ARK はB3-RAFキナーゼはSnRK2を正の制御因子である

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

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 -

1. 著者名 Kamiyama Yoshiaki, Hirotsu Misaki, Ishikawa Shinnosuke, Minegishi Fuku, Katagiri Sotaro, Rogan Conner J., Takahashi Fuminori, Nomoto Mika, Ishikawa Kazuya, Kodama Yutaka, Tada Yasuomi, Takezawa Daisuke, Anderson Jeffrey C., Peck Scott C., Shinozaki Kazuo, Umezawa Taishi	4. 巻 118
2. 論文標題 Arabidopsis group C Raf-like protein kinases negatively regulate abscisic acid signaling and are direct substrates of SnRK2	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 e2100073118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2100073118	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 M, Inoue T, Hiraide M, Khatun N, Jahan A, Kuwata K, Katagiri S, Umezawa T, Yotsui I, Sakata Y, Takezawa D	4. 巻 185
2. 論文標題 Activation of SnRK2 by Raf-like kinase represents a primary mechanism of ABA and abiotic stress responses	5. 発行年 2021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 Jahan Akida, Yamazaki Yuto, Islam Mousona, Ghosh Totan Kumar, Yoshimura Nami, Kato Hirotaka, Ishizaki Kimitsune, Shinozawa Akihisa, Sakata Yoichi, Takezawa Daisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Differential regulations of abscisic acid-induced desiccation tolerance and vegetative dormancy by group B3 Raf kinases in liverworts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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) 10.3389/fpls.2022.952820	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 該当する

1. 著者名 Sk Rahul, Miyabe Marcos Takeshi, Takezawa Daisuke, Yajima Shunsuke, Yotsui Izumi, Taji Teruaki, Sakata Yoichi	4. 巻 637
2. 論文標題 Targeted in vivo mutagenesis of a sensor histidine kinase playing an essential role in ABA signaling of the moss <i>Physcomitrium patens</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.11.009	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 該当する

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ikegami K, Takezawa D
2. 発表標題 The role of protein phosphatase 2C in abiotic stress in the moss <i>Physcomitrium patens</i>
3. 学会等名 12th International Plant Cold Hardiness Seminar (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamazaki Y, Jahan A, Islam M, Shinozawa A, Sakata, Y, Takezawa D
2. 発表標題 Functional analysis RAF-like kinases in streptophytes
3. 学会等名 12th International Plant Cold Hardiness Seminar (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Islam M, Takezawa D
2. 発表標題 Role of ETHYLENE INSENSITIVE3 orthologs in abiotic stress responses in the moss <i>Physcomitrium patens</i>
3. 学会等名 12th International Plant Cold Hardiness Seminar (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishida T, Inoue T, Takezawa D
2. 発表標題 The role of plant Raf-like kinase ARK in cold acclimation of the moss <i>Physcomitrium patens</i>
3. 学会等名 12th International Plant Cold Hardiness Seminar (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上 慶太、平出 真由佳、坂田 洋一、竹澤 大輔
2. 発表標題 Group A プロテインフォスファターゼ に依存しないABA応答制御機構の解明
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 優斗、Akida Jahan、Mousona Islam、坂山 英俊、西山 智明、堀 孝一、太田 啓之、皆川 純、篠澤 章久、坂田 洋一、竹澤 大輔
2. 発表標題 ストレプト植物RAF様キナーゼの機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田 哲也、竹澤 大輔、井上 拓己
2. 発表標題 植物低温応答におけるRaf様プロテインキナーゼARKの役割
3. 学会等名 第67回低温生物工学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野 真彩、Mousona Islam、Akida Jahan、長谷川 綾香、山崎 優斗、篠澤 章久、坂田 洋一、竹澤 大輔
2. 発表標題 重イオンビーム照射によるゼニゴケアブシシン酸低感受性変異株の単離と解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田哲也、井上拓巳、坂田洋一、竹澤大輔
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケの低温馴化におけるRaf様プロテインキナーゼARKの量的変動と耐凍性
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022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
---------	---------