

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15496

研究課題名（和文）植物の水分欠乏ストレスに対する感知システムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of osmotic stress sensing mechanisms in plants.

研究代表者

相馬 史幸（Soma, Fumiyuki）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・研究員

研究者番号：50869097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、干ばつ下でも生育が低下しない耐性作物の作出のため、植物の持つ水分欠乏感知機構の解明に取り組んだ。水分欠乏ストレス応答では植物ホルモンであるアブシシン酸と、その下流で機能するSnRK2キナーゼが重要であることが示されているが、ストレス初期におけるSnRK2キナーゼの活性化メカニズムには未解明な点が多い。SnRK2と相互作用する因子の網羅的な解析を通して、SnRK2をABA依存的に制御するRAFキナーゼを同定した。乾燥ストレスを受けて生合成あるいは輸送されたアブシシン酸がRAF-SnRK2経路を介してストレス耐性を獲得していることを明らかにした。本研究は国際誌PNASに掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

干ばつ等の水分欠乏ストレスの初期応答において重要なRAFキナーゼを同定した。このRAFキナーゼは高等植物に広く保存されており、ストレス耐性作物の育種マーカーとして利用できる可能性がある。また、このRAFキナーゼをターゲットとした活性調整剤の開発や、ゲノム編集技術により、干ばつ耐性を持つ作物を作出できる可能性がある。これらの研究成果は、地球環境劣悪化による食料問題を解決に貢献できると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Osmotic stresses, such as drought and high-salinity, negatively affect crop productivity. We need to elucidate the osmotic-stress sensing mechanisms in plants to improve stress tolerance. A plant hormone abscisic acid and SnRK2 protein kinases act as master regulators of osmotic stress responses. However, the initial responses of SnRK2s in response to osmotic stress are remain unknown. Then we performed interactome analysis of SnRK2, and we identified RAF kinases as interactors of SnRK2s. We revealed that accumulated or transported abscisic acid in response to osmotic stress activate RAF-SnRK2 cascade for initial response to osmotic stresses. These results were published in the international journal PNAS.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：乾燥ストレス 初期応答機構 SnRK2キナーゼ ストレス耐性作物 アブシシン酸

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

地球規模の環境変動により、干ばつ等の異常気象が生じている。干ばつや塩害などの水分欠乏ストレスは作物の生産性を大きく低下させるため、食糧生産を維持するためには水分欠乏ストレスに対して耐性を持つ作物の開発が急務となっている。植物はこのようなストレスに対する防御機構をすでに数多く備えている。本研究では植物の本来持つストレス耐性獲得機構を分子レベルで解明することで、よりストレスに強い作物の開発に貢献しようと考えた。

水分欠乏ストレス応答機構では植物ホルモンであるアブシシン酸とその下流で機能するサブクラス III SnRK2 タンパク質キナーゼが重要な役割を果たしている。植物が水分欠乏ストレスを受けると、植物体内でアブシシン酸が蓄積し、サブクラス III SnRK2 キナーゼが活性化することでストレス耐性獲得機構が始まる。一方で、ストレスを受けてからアブシシン酸が蓄積するまでの初期応答機構や、サブクラス III SnRK2 キナーゼがアブシシン酸非依存的に活性化させる初期応答機構は明らかにされていない。さらに植物がどのようにストレスを感知しているかについても未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、植物がストレスを感知してから SnRK2 キナーゼを活性化させるまでのストレス感知および初期応答機構を分子レベルで解明することを目的とした。特に SnRK2 キナーゼは水分欠乏時にリン酸化状態が大きく変化することから、SnRK2 キナーゼの上流には、さらなるタンパク質キナーゼの存在が示唆されていた。SnRK2 キナーゼの制御因子を新たに明らかにすることができれば、植物の水分欠乏ストレスの感知機構の一端を解明することができる。

3. 研究の方法

これまでに、タンパク質間の相互作用解析手法である共免疫沈降法と、タンパク質分析手法である液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を組み合わせた手法により、タンパク質間相互作用因子の網羅的解析手法を開発した。過去に本手法を用いて、サブクラス III SnRK2 キナーゼのホモログであるサブクラス I SnRK2 キナーゼの相互作用因子を多数同定することに成功している。本手法を用いて、サブクラス III SnRK2 キナーゼの上流活性化因子の候補をタンパク質間相互作用解析から選抜した。続いて得られた相互作用因子の欠損変異体の解析やリン酸化解析から、サブクラス III SnRK2 キナーゼの活性化因子候補の選抜をおこなった。さらに得られた候補因子の欠損変異体の乾燥ストレス下における表現型解析やトランスクリプトーム解析を行い、乾燥ストレス初期応答の生理学的意義について議論した。

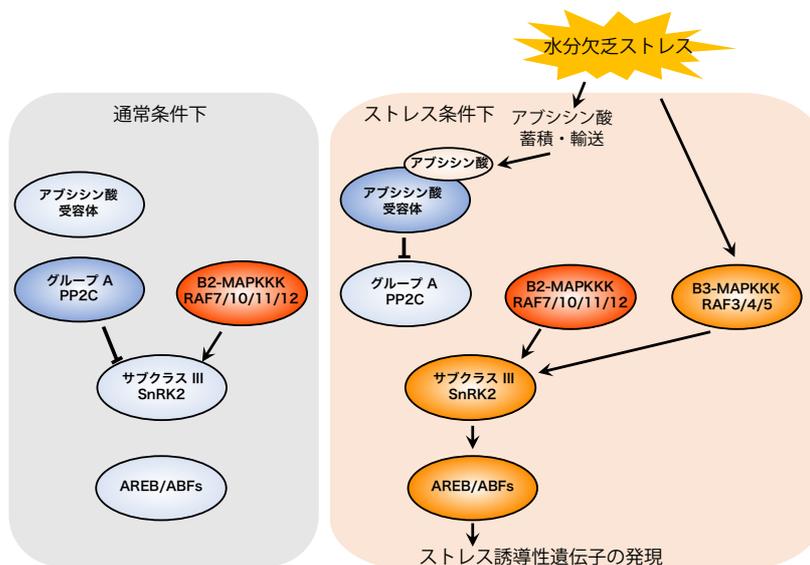
4. 研究成果

共免疫沈降と LC-MS/MS を組み合わせた手法により、サブクラス III SnRK2 の相互作用因子の網羅的な解析を行なった。その結果 B2 グループに属する Raf-like タンパク質キナーゼファミリー (B2-RAF) に属する 4 つのタンパク質 RAF7、RAF10、RAF11 および RAF12 がサブクラス III SnRK2 の相互作用因子候補として同定された。そこで次に、BiFC 法によりサブクラス III SnRK2 キナーゼと B2-RAF の相互作用を解析した結果、両者は細胞質において相互作用していることが示された。次に B2-RAF がサブクラス III SnRK2 キナーゼをリン酸化して活性化できるかを明らかにするためにリン酸化試験を行なった。その結果、B2-RAF はサブクラス III SnRK2 キナーゼを直接リン酸化して活性化していることが示された。本研究を遂行中に、他の研究グループにより B2-RAF と近いファミリーである B3-RAF がサブクラス III SnRK2 の活性化因子であることが報告された。そこで、B2-RAF と B3-RAF によるサブクラス III SnRK2 の活性化の差異を検討した。B2-RAF は浸透圧ストレスやアブシシン酸を添加しても自身のリン酸化活性は変化しなかったが、B3-RAF の活性化は浸透圧ストレス時に非常に強くなることが示された。次に B2-RAF 欠損変異体と B3-RAF 欠損変異体におけるサブクラス III SnRK2 の活性化を評価したところ、B2-RAF 欠損変異体では乾燥ストレス初期におけるサブクラス III SnRK2 キナーゼの活性化が減少していた一方、B3-RAF 欠損変異体では乾燥ストレス後期におけるサブクラス III SnRK2 キナーゼの活性化が減少していた。さらに、B2-RAF 欠損変異体は B3-RAF 欠損変異体よりも強いアブシシン酸被感受性を示した。以上のことから、常時活性型の B2-RAF は乾燥ストレスの初期において蓄積あるいは輸送されたアブシシン酸を介してサブクラス III SnRK2 キナーゼを活性化しており、浸透圧ストレス依存的な B3-RAF は乾燥ストレスの後半でサブクラス III SnRK2 キナーゼを活性化していることが示された (図)。

次に、これまでに示した B2-RAF-SnRK2 リン酸化カスケードの生理学的意義の解明に取り組んだ。B2-RAF キナーゼの欠損変異体では、乾燥ストレス応答性遺伝子の発現誘導が非常に遅くなることが示された。このことは、実際の土植え生育環境下についても証明した。以上のことから、乾燥ストレス初期に機能する B2-RAF-SnRK2 は乾燥ストレス応答性遺伝子の初期誘導に非常に重要であることが示された。以上により、サブクラス III SnRK2 が B2-RAF と B3-RAF による 2 ス

テップの活性化を受けることを初めて明らかにした。今後、B2-RAF や B3-RAF をターゲットとしたゲノム改変や、活性調整剤の開発により作物のストレス強靱下に貢献できると期待される。

本研究で確立した共免疫沈降法と LC-MS/MS を組合わせた相互作用因子の網羅的解析手法を論文として報告した (Soma et al., 2022, Methods Mol Biol)。また、近年の環境ストレス応答におけるシグナル伝達について総説として報告した (Soma et al., 2021, Plants)。B2-RAF-SnRK2 によるアブシシン酸依存的な乾燥ストレス初期応答機構についての成果は、国際紙 PNAS に掲載された (Soma et al., 2023, Proc Natl Acad Sci U S A.)。



RAF-SnRK2 経路が制御する水分欠乏ストレス初期応答機構のモデル図

通常生育条件下では、グループ A PP2C の負の制御によってサブクラス III SnRK2 の活性は抑制されている。植物が水分欠乏状態に晒されると、アブシシン酸が蓄積し、アブシシン酸受容体と結合することで PP2C による負の制御が解除される。その時、B2-RAF はサブクラス III SnRK2 を活性化し下流の AREB/ABF 転写因子の活性化を介してストレス遺伝子の発現を誘導する。よりストレス強度が強くなると、B3-RAF が活性化し、サブクラス III SnRK2 の活性をより高めることでさらなるストレス耐性を獲得する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Soma Fumiyuki, Takahashi Fuminori, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 2462
2. 論文標題 Affinity Purification Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Identify Proteins Interacting with ABA Signaling Components	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)	6. 最初と最後の頁 181 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2156-1_14	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 Soma Fumiyuki, Takahashi Fuminori, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Cellular Phosphorylation Signaling and Gene Expression in Drought Stress Responses: ABA-Dependent and ABA-Independent Regulatory Systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 756 ~ 756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10040756	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 相馬史幸、篠崎和子	4. 巻 74
2. 論文標題 乾燥に対する生存戦略 : 植物は乾燥にどう応答して生き延びているのか (特集 植物の生きる知恵)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 遺伝 : 生物の科学	6. 最初と最後の頁 580-585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 相馬史幸、篠崎和子	4. 巻 4
2. 論文標題 植物における浸透圧ストレスの初期応答機構の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 763-767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 相馬史幸、篠崎和子	4. 巻 78
2. 論文標題 乾燥ストレスに対する植物の初期応答機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 504-506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Soma Fumiyuki, Takahashi Fuminori, Kidokoro Satoshi, Kameoka Haruka, Suzuki Takamasa, Uga Yusaku, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 120
2. 論文標題 Constitutively active B2 Raf-like kinases are required for drought-responsive gene expression upstream of ABA-activated SnRK2 kinases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2221863120	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 相馬史幸、高橋史憲、鈴木孝征、篠崎一雄、篠崎和子
2. 発表標題 RAF-SnRK2キナーゼカスケードを介した乾燥ストレス応答機構の解明
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀岡悠香、相馬史幸、福井あずさ、鈴木孝征、篠崎和子
2. 発表標題 シロイヌナズナの環境ストレス応答におけるRAF様タンパク質キナーゼの機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Soma Fumiyuki、Takahashi Fuminori、Kidokoro Satoshi、Kameoka Haruka、Suzuki Takamasa、Uga Yusaku、Shinozaki Kazuo、Yamaguchi-Shinozaki Kazuko
2. 発表標題 Identification of upstream kinases that regulate SnRK2 kinases in Arabidopsis
3. 学会等名 The 33rd ICAR (国際学会)
4. 発表年 2023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