

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570035

研究課題名（和文） 苔類ゼニゴケを用いた植物ストレス応答の進化生理学的研究

研究課題名（英文） Evolutionary and Physiological Studies of Plant Stress Tolerance using the Liverwort *Marchantia polymorpha*.

研究代表者 竹澤 大輔 (TAKEZAWA DAISUKE)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：20281834

研究成果の概要（和文）：アブシジン酸（ABA）は、高等植物の種子休眠や発芽、気孔の開閉に関わることで知られるホルモンであるが、下等陸上植物における研究例は少ない。本研究では苔類ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)を用いて、苔類の ABA 応答の機構を分子レベルで解析し、ABA 応答遺伝子や、ABA 応答に関わるプロモーターの調節配列および ABA 受容体の構造について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Abscisic acid (ABA) is known to be a hormone involved in seed dormancy and germination, as well as stomata closure in flowering plants but its role in lower land plants is not clearly understood. In this study, molecular mechanisms of ABA responses in liverworts were analyzed by using *Marchantia polymorpha*, and identity of ABA-responsive genes, promoter sequence as well as structures of ABA receptors have been clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子・生理科学

キーワード：植物、コケ植物、ストレス、アブシジン酸

## 1. 研究開始当初の背景

アブシジン酸（ABA）の研究は、高等植物の種子や気孔に関わることがほとんどで、下等陸上植物における研究例は少なく、特に、陸上植物の進化の初期に生じたグループである苔類に対する ABA の作用はほとんどわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) を用いて、遺伝子の一過的発

現系、ストレス評価系を確立するとともに、それらを用いて苔類の ABA 応答の機構を分子レベルで解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ゼニゴケ DHN 遺伝子である DHN1-3 のプロモーターに結合した GUS レポーター遺伝子 (DHN-GUS) をゼニゴケ培養細胞に導入する実験を行なった。また、このプロモーターを改変したものや、同時に受容体候補遺伝子などを導入することでこれらが遺伝子発現に与

える影響を調べた。形質転換体の作出は胞子培養へのアグロバクテリアの感染によって行なった。ゼニゴケの細胞構造観察にはTEMおよびCryo-SEMを用いた。

#### 4. 研究成果

ABAはゼニゴケ培養細胞においてDHN1プロモーターのGUSの発現を著しく増大させることが明らかとなった。このABA応答性はプロモーター内のABA応答配列(ABRE)を部位特異的変異により破壊することによって消失した。また、この遺伝子発現は負の制御因子であるMpABI1によって抑制された。

ゼニゴケのABA受容体候補遺伝子であるMpPYL1を単離し、ゼニゴケ培養細胞の一過的発現系においてこの過剰発現がABA誘導性プロモーターを活性化することを明らかにした。また、MpPYL1をシロイヌナズナのABA受容体変異株に導入し、そのABA非感受性表現型を相補することを示した。このことからPYL様受容体が陸上植物進化の極めて初期に獲得されたことが明らかとなった。

ゼニゴケ無性芽の電子顕微鏡による観察により、ストレス耐性の増大に伴い、細胞内構造が劇的に変化することが明らかとなった。これに伴い、葉緑体包膜と原形質膜との相互作用が軽減され、膜の不可逆的構造変化が回避されている可能性が示唆された。また、葉緑体の低温下での忌避運動がABAにより阻害されることが観察され、ABAが葉緑体と原形質膜との相互作用を阻害していることが示唆された。ABA応答が異常なASA1変異株をT-DNAタグラインからスクリーニングして単離した。この変異株では葉緑体の忌避運動自体が観察されなかった。インバースPCRによりASA1のゲノムにおけるT-DNA挿入位置を特定することができた。

ABAや糖が乾燥、凍結後の生存率に影響を与える影響を調べ、乾燥耐性がABAと糖で誘導されることを明らかにした。ABA処理した細胞ではより多くのスクロースを蓄積し、同時に数種のLEAタンパク質が蓄積していることが明らかとなった。

#### 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)

[雑誌論文] (計3件)

1. Bhyan SB, Minami A, Kaneko Y, Suzuki S, Arakawa K, Sakata Y, Takezawa D (2012)  
“Cold acclimation in the moss *Physcomitrella patens* involves abscisic acid-dependent signaling”  
*Journal of Plant Physiology* 169: 137-145
2. Takezawa D, Komatsu K, Sakata Y (2011)  
“Abscisic acid in bryophytes: how a

universal growth regulator in life became a plant hormone?”

*Journal of Plant Research* 124: 437-453

3. Tougane K, Komatsu K, Begum S B, Sakata Y, Ishizaki K, Yamato T, Kohchi T, Takezawa D: Evolutionarily conserved regulatory mechanisms of abscisic acid signaling in land plants: characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-like type-2C protein phosphatase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiology* 152:1529-1543 (2010)

[学会発表] (計21件)

1. Sato, Y., Kato, M., Akter, K., Kaneko, Y. and Takezawa, D.  
Morphological changes in chloroplasts induced by abscisic acid in *Marchantia polymorpha*.  
Marchantia Workshop 2012 Nov15-17, Japan
2. Murai, S., Yasuda, S. and Takezawa, D.  
Abscisic acid receptors in liverworts.  
Marchantia Workshop 2012 Nov15-17, Japan
3. Arai, K. and Takezawa, D.  
Functional analysis of the SNF1-related protein kinase2 to environmental stress in *Physcomitrella patens*.  
Marchantia Workshop 2012 Nov15-17, Japan
4. Kato, M., Sato, Y. and Takezawa, D.  
Characterization of a *Marchantia* mutant with abnormal sensitivity to abscisic acid  
Marchantia Workshop 2012 Nov15-17, Japan
5. Takezawa, D., Akter, K., Kaneko, Y., Murai, S., Kato, M., Sato, Y., Komatsu, K and Sakata, Y.  
Abscisic acid-induced desiccation stress tolerance in gemmae of *Marchantia polymorpha*.  
Marchantia Workshop 2012 Nov15-17, Japan
6. 竹澤大輔  
ゼニゴケ無性芽のアブシジン酸応答とストレス耐性  
第53回日本植物生理学会年会シンポジウム (京都) 2012年3月16-18日
7. 竹澤大輔  
「陸上植物の低温応答におけるカルシウムの『普遍的』役割とは？」  
日本植物学会第76回大会シンポジウム「植物の低温応答におけるカルシウムの役割」

(姫路) 2012年9月15-17日

8. 竹澤大輔、鈴木淳史、渡邊直紀、染宮信之介、小林正智、坂田洋一

「ヒメツリガネゴケアブシジン酸合成欠損株の低温馴化および高浸透圧応答」

日本植物学会第76回大会(姫路)2012年9月15-17日

9. 新井健太、竹澤大輔

「ヒメツリガネゴケ SNF1-related protein kinase 2 のアブシジン酸およびストレス応答における機能」

日本植物学会第76回大会(姫路)2012年9月15-17日

10. Akter, K., Tougane, K., Kaneko, M. and Takezawa, D.

Abcisic acid (ABA)-induced sugar accumulation and stress tolerance of liverwort *Marchantia polymorpha*.

International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change," Dec 8-10, 2011, Japan

11. Kaneko, M., Komatsu, K., Khaleda, A., Sakata, Y., Ishizaki, K., Yamato, K. T., Kohchi, T. and Takezawa, D.

Abcisic acid-induced expression of stress-associated transcripts in the liverwort *Marchantia polymorpha*.

International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change," Dec 8-10, 2011, Japan

12. 竹澤大輔, 小松 憲治, 坂田 洋一 コケ植物の生理学的解析から探る陸上植物共通の ABA 応答機構 日本植物学会第75回大会シンポジウム "Opening a New Era of ABA Research" (東京) 2011年9月17-19日

13. Takezawa, D.

Abcisic acid signaling in *Marchantiophyta*.

*Marchantia* Workshop 2010, Mar. 11, Japan

14. Salma, B., Komatsu, K., Kaneko, M., Akter, K., Sakata, Y., Ishizaki, K., Yamato, K. T., Kohchi, T. and Takezawa, D.

PP2C-mediated abscisic acid signaling in liverworts.

MOSS 2010, Jul. 21-24, Japan, Japan

15. Akter, K., Kaneko, M., Tougane, K. and Takezawa, D.

Effect of abscisic acid on sugar accumulation and freezing tolerance in the

liverwort *Marchantia polymorpha*.

MOSS 2010, Jul. 21-24, Japan, Japan

16. Kaneko, M., Komatsu, K., Akter, K., Sakata, Y., Ishizaki, K., Yamato, K. T., Kohchi, T. and Takezawa, D.

Abcisic acid-responsive gene expression in liverwort *Marchantia polymorpha*.

MOSS 2010, Jul. 21-24, Japan

17. Hatanaka, R., Furuki, T., Shimizu, T., Kikawada, T., Takezawa, D. and Sugawara, Y.

Identification and characterization of a newly synthesized protein in suspension-cultured cells of the liverwort *Marchantia polymorpha* during acquisition of desiccation tolerance.

CRY02010, Jul. 17-20, 2010, United Kingdom

18. 金子緑、小松憲治、Khaleda Akter、坂田洋一、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、竹澤大輔

苔類ゼニゴケにおけるアブシジン酸応答性遺伝子発現の解析

日本植物学会第74回大会(名古屋)2010年9月9-11日

19. 矢羽田正人、竹澤大輔

カルシウムがヒメツリガネゴケ原糸体細胞のストレス応答に与える影響

日本植物学会第74回大会(名古屋)2010年9月9-11日

20. 竹澤大輔

苔類の休眠とストレス応答におけるアブシジン酸の役割

日本植物学会第74回大会シンポジウム(名古屋)2010年9月9-11日

21. 竹澤大輔

コケ植物の凍結・脱水耐性とストレスホルモンの役割

低温生物工学会第55回セミナー(東京)2010年6月25日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹澤 大輔 (TAKEZAWA DAISUKE)  
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：20281834

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：