

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840103

研究課題名(和文) アブシジン酸応答を負に制御する新規リン酸化タンパク質SNS1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of SNS1, a novel negative regulator of ABA signaling.

研究代表者

梅澤 泰史 (UMEZAWA, Taishi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70342756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アブシジン酸(ABA)は、植物の環境応答を司る重要な植物ホルモンである。ABAのシグナル伝達系は、受容体、タンパク質脱リン酸化酵素およびタンパク質リン酸化酵素(SnRK2)のコア因子から構成されており、SnRK2による基質のリン酸化がシグナルの出力となっている。SNS1は、我々の以前の研究でSnRK2の基質候補として同定されたが、機能未知であった。そこでSNS1の機能解析を進めた結果、SNS1はABAシグナルを負に制御することや、乾燥耐性に関与することが明らかとなった。また、トランスクリプトーム解析の結果から、SNS1はABA応答性遺伝子の他に、開花関連の遺伝子群に影響を及ぼすことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Abscisic acid (ABA) is a phytohormone which is important for stress responses in plants. Recent studies demonstrated that the ABA signaling pathway consists of three core components, receptor, protein phosphatase and protein kinase (SnRK2), and SnRK2 phosphorylates its substrates to transmit ABA signals. Our previous study have identified SNS1 as a SnRK2 substrate, however, its function was unknown. Then we performed a reverse genetic study, and demonstrated that SNS1 is a negative regulator of ABA signaling either in seeds or vegetative tissues. Furthermore, a transcriptome analysis using RNA-seq revealed that SNS1 regulates a part of ABA-responsive genes, as well as flowering-related genes.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：アブシジン酸 シロイヌナズナ リン酸化 SnRK2 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

アブシジン酸 (ABA) は、植物の乾燥耐性や種子休眠を制御する重要な植物ホルモンである。特に、ABA は乾燥ストレスに応じて合成され、気孔を閉じて蒸散による水分損失を抑えたり、様々な遺伝子発現を誘導して細胞内環境を整える等の作用を持つ。ゆえに、植物の ABA 応答の研究は、乾燥耐性作物の開発にもつながる重要課題である。

近年、ABA 応答を制御する細胞内シグナル伝達経路が明らかにされ、受容体 (PYR/RCAR)、プロテインホスファターゼ (PP2C)、プロテインキナーゼ (SnRK2) の三者からなるコアコンポーネントモデルが提唱された (図 1)。このモデルに従えば、ABA シグナルは SnRK2 が基質タンパク質をリン酸化することによって出力され、その結果 ABA 応答や乾燥耐性が発揮される。したがって、植物の ABA 応答機構をさらに理解する上で、SnRK2 のリン酸化基質を同定することが本質的に重要となる。

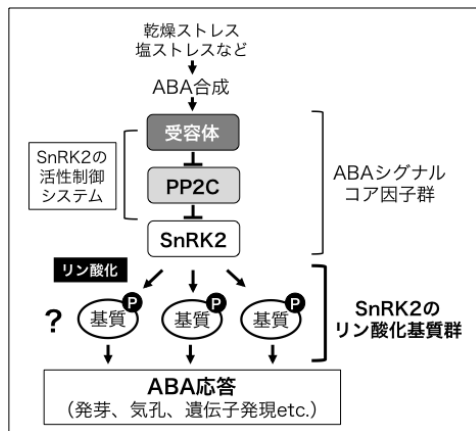


図1 植物のABAシグナル伝達の基本モデル

申請者は、これまでに SnRK2 ファミリーの機能解析や、そのシグナル伝達機構の解明に力を注いできた。その過程で、3 つの SnRK2 を破壊した三重変異体で ABA 応答が劇的に低下することを見出し、これらが ABA シグナル伝達の中核にあることや、SnRK2 のリン酸化基質が ABA シグナルの主要な担い手であることを明らかにした (原著論文 3)。次に、SnRK2 の基質を探索しようとしたが、プロテインキナーゼの基質探索は容易ではなく確立した方法は存在しない。そこで、我々は新しい試みとして、リン酸化プロテオーム解析を基盤とした SnRK2 の基質探索を行った。その概略は、質量分析計によって細胞内の多数のリン酸化タンパク質を定量し、野生型と SnRK2 三重変異体のデータを比較することで、その差分を検出するというものである。理論としては、SnRK2 の基質は野生型では ABA 処理によってリン酸化され、SnRK2 の変異体ではリン酸化が減少あるいは消失するはずである。この実験系の確立には数年を要したが、実際に SnRK2 三重変異体でリン酸化レベルが減少するタンパク質、

すなわち SnRK2 基質候補を複数同定することに成功した (雑誌論文 1)。

リン酸化プロテオーム解析によって同定した SnRK2 基質候補の一つに、機能未知のタンパク質が含まれており、SnRK2-substrate 1 (SNS1) と名付けた (図 2)。SNS1 の遺伝子破壊株を単離したところ、驚いたことに発芽試験で強い ABA 高感受性を示すことがわかった (図 2)。したがって、リン酸化プロテオーム解析という手法で同定された SNS1 が、実際に ABA シグナル伝達を制御する因子であることが証明された。つまり、SNS1 は ABA によって活性化した SnRK2 によってリン酸化され、そして何らかのメカニズムによって ABA のシグナルを抑制すると考えられる (図 2)。これまでの ABA シグナル伝達系の研究では、SnRK2 によってリン酸化を受けるタンパク質は転写因子やイオンチャンネルなどがわかっており、いずれも ABA シグナルを正に制御するものであった。したがって、今回新たに見つかった負の制御因子である SNS1 は、新規な ABA シグナル伝達のメカニズムに関わる可能性があり、その機能解析および分子基盤の理解は重要な研究テーマと位置づけられる。

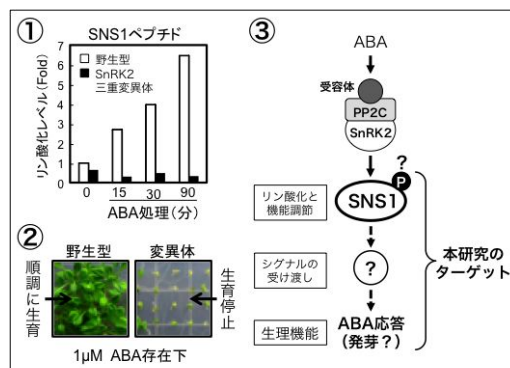


図2 新規なリン酸化タンパク質SNS1について

2. 研究の目的

本研究では、SNS1 の生理機能、SNS1 の相互作用因子、そして SNS1 のリン酸化による機能調節、の3つを主な目的として設定した (図 3)。SNS1 の生理機能を調べるためには、逆遺伝学的な解析がメインとなる。具体的には、遺伝子破壊株や形質転換植物を用意して、ABA 応答や乾燥耐性を調べる。平行して、この課題を達成するために、SNS1 の相互作用因子を酵母ツーハイブリッド法や共免疫沈降法によってスクリーニングする。

については、SNS1 のリン酸化部位に変異を入れたタンパク質を作成し、植物に導入して表現型の変化を観察する。また、SNS1 のリン酸化が相互作用因子との関係に及ぼす影響について生化学的に調査する。以上の研究から、SNS1 の新規な ABA シグナル伝達因子としての機能を同定し、その分子基盤を理解することを目指す。

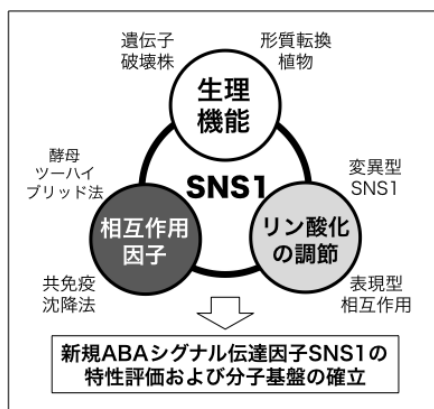


図3 本研究における実験計画の概要

3. 研究の方法

SNS1 機能の逆遺伝学的解析

SNS1 の機能を解析するために、SNS1 の遺伝子破壊株および形質転換植物を入手または作成した。CaMV35S プロモーターの下流に SNS1 遺伝子を接続してプラスミドを作成し、アグロバクテリウム法によってシロイヌナズナに導入して、SNS1 を過剰に発現させた形質転換植物を作成した。

これまでの研究から、SNS1 の遺伝子破壊株が発芽試験において、顕著に高い ABA 感受性を示すことがわかっていたので(図2) 本研究では、発芽以外の生育ステージにおける ABA 応答を調べた。具体的には、ポットに土上下植物体を用いて、給水を停止することで乾燥耐性試験を行った。また、LI-6400 携帯型光合成蒸散速度測定装置を用いて、各個体の光合成速度および蒸散速度を測定した。さらに、野生型および *sns1* 遺伝子破壊株から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

SNS1 相互作用因子のスクリーニング

SNS1 が重要な ABA シグナル伝達因子であることはすでに明らかになっているが、SNS1 がどのように ABA シグナルを制御しているのかについては未解明である。SNS1 は SnRK2 のリン酸化基質として同定された経緯があるので、上流因子は SnRK2 であり、残るは SNS1 の下流因子ということになる。これを明らかにするために、SNS1 の相互作用因子を探索する計画を立てた。まず、酵母ツーハイブリッド(YTH)法によるシロイヌナズナ cDNA ライブラリーのスクリーニングを試みた。

SNS1 遺伝子への変異導入

リン酸化プロテオーム解析では、質量分析計によってリン酸化ペプチドの配列を決定するので、リン酸化部位の情報を取得することができる。リン酸化部位がわかれば、その場所がタンパク質全体に及ぼす影響を調べることが可能になる。一般に、あるタンパク質の機能とリン酸化の関係を調べるためには、リン酸化部位へ変異を導入する実験手法がよく用いられる。リン酸化を受けるセリン

やスレオニン残基を、アラニンに置換すれば非リン酸化型となり、アスパラギン酸やグルタミン酸などの酸性アミノ酸に変えると擬似リン酸化型となることが知られている。そこで、非リン酸化型や擬似リン酸化型の SNS1 を作成するために、プラスミドベクターにクローニングされた SNS1 遺伝子に対して、site-directed mutagenesis 法によって変異を導入した。その後、得られた変異型 SNS1 遺伝子を植物に導入し、形質転換植物を作成した。

4. 研究成果

SNS1 の生理機能

SNS1 の生理機能を明らかにするために、遺伝子破壊株 (*sns1*) および形質転換植物 (*SNS1ox*) を用いて表現型の調査を行った。乾燥耐性試験の結果、*sns1* では野生型に比べて有意に乾燥耐性が向上していることがわかった。また、そのときの光合成速度を比較したところ、*sns1* では野生型に比べて、乾燥ストレス下での光合成速度が高く維持されていた。反対に、*SNS1ox* では光合成速度が低下していたことから、SNS1 は植物の乾燥耐性を負に制御することが明らかとなった(図4)。

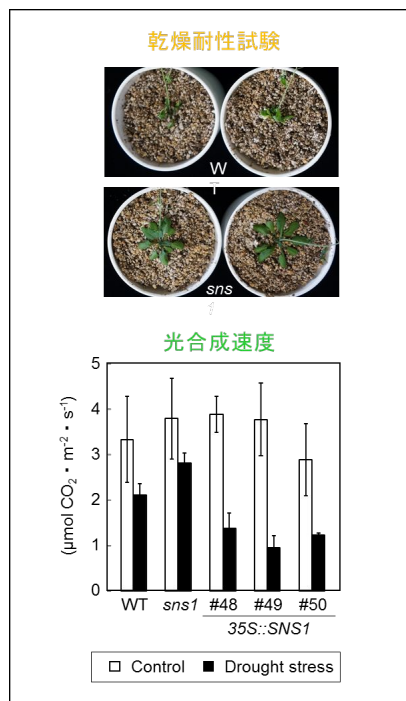


図4 *sns1* 変異株の表現型解析

SNS1 の相互作用因子探索

SNS1 を酵母ツーハイブリッド用のベクターにクローニングし、酵母に導入してシロイヌナズナ cDNA ライブラリーにスクリーニングを行った。その結果、多くの偽陽性が頻発する結果となった。原因を調査したところ、SNS1 を単独で導入した場合でも、酵母内のレポーター遺伝子がある程度活性化されてしまうことがわかった。通常は、相互作用因子が存在した場合にのみレポーター遺伝子が

活性化するように設計されているので、これはバックグラウンド活性であると考えられる。

SNS1 のリン酸化による機能調節

SNS1 のリン酸化部位 (Ser43) に Ala または Asp の変異を導入したコンストラクトを作成し、植物に導入した。表現型調査を行ったが、個体間のばらつきが大きく、各変異遺伝子間で明確な差を認めることはできなかった。今後は、遺伝子発現など、植物体内での変化を中心に解析を進める予定である。

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)

Umezawa, T. (2014) "Screening of kinase substrates using kinase-knockout mutants." *Methods in Molecular Biology* (in press) (査読有)

Umezawa, T., Takahashi, F. and Shinozaki, K. (2014) "Phosphorylation Networks in the Abscisic Acid Signaling Pathway." *The Enzymes* 35: 27-56. (査読有)

Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C. and Shinozaki, K. (2013) "Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid pathway in *Arabidopsis thaliana*." *Sci. Signal.* 6(270): rs8. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

天谷杏奈・中神弘史・平山隆志・梅澤泰史, 「シロイヌナズナ種子におけるアブシジン酸シグナルネットワークのリン酸化プロテオーム解析」, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16 日, 東京農業大学

本多慶匡・杉山直幸・桑村真由里・寺尾亮佑・石塚梢・坂田洋一・竹澤大輔・篠崎一雄・梅澤泰史, 「ヒメツリガネゴケにおける ABA シグナル伝達経路のリン酸化プロテオーム解析」, 第 78 回日本植物学会年会, 2014 年 9 月 13 日, 明治大学

鈴木梨沙・石塚梢・梅澤泰史, 「シロイヌナズナの アブシジン酸応答に関わる機能未知タンパク質 SNS1 の解析」, 第 78 回日本植物学会年会, 2014 年 9 月 13 日, 明治大学

廣谷美咲・高橋史憲・篠崎一雄・梅澤泰史, 「ABA シグナル伝達系における C グループ MAP キナーゼの機能解析」, 第 78 回日本植物学会年会, 2014 年 9 月 13 日, 明治大学

Honda, Y., Sugiyama, N., Kuwamura, M., Terao, R., Ishizuka, K., Sakata, Y., Takezawa, D., Shinozaki, K., Ishihama, Y., Umezawa, T. "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants", The 6th International Symposium

on Frontiers in Agricultural Proteome Research, the 1st AOAPO conference, & the 5th Plant Proteomics Conference in China, 2014 年 6 月 25 日, ハルビン、中国 (招待講演)

寺尾亮佑・篠崎一雄・梅澤泰史, 「シロイヌナズナ ABA 応答性転写因子 AREB1 の Ser45 は SnRK2 のリン酸化標的部位である」, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 21 日, 富山大学

石塚梢・鈴木梨沙・古崎俊則・石井一夫・篠崎一雄・梅澤泰史, 「SnRK2-substrate 1 は ABA シグナル伝達を負に制御する」, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 21 日, 富山大学

本多慶匡・杉山直幸・桑村真由里・寺尾亮佑・石塚梢・坂田洋一・竹澤大輔・篠崎一雄・石濱泰・梅澤泰史, 「ヒメツリガネゴケにおける ABA シグナル伝達経路のリン酸化プロテオーム解析」, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 21 日, 富山大学

Umezawa, T. "Phosphoproteomic approaches towards understanding the ABA signaling network in land plants." Indo-Japan Joint Workshop, 2013 年 12 月 18 日, ハイデラバード大学、インド (招待講演)

Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C., Shinozaki, K. "Integrating genetics and phosphoproteomics reveals a protein phosphorylation network in abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis*." HUP 12th Annual World Congress, 2013 年 9 月 17 日, パシフィコ横浜

梅澤泰史・杉山直幸・高橋史憲・Jeffrey Anderson・坂田洋一・竹澤大輔・石濱泰・Scott Peck・篠崎一雄, 「遺伝学とリン酸化プロテオミクスの融合によるアブシジン酸シグナル伝達系の包括的な解析」, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜 (招待講演)

Umezawa, T. "Phosphoproteomic approaches to understanding ABA signaling networks in plants." Gordon Research Conference, 2013 年 7 月 29 日, 香港科技大学、香港 (招待講演)

Umezawa, T., Sugiyama, N., Anderson, J.C., Takahashi, F., Ishihama, Y., Peck, S.C., Shinozaki, K. "Integrating genetics and phosphoproteomics reveals a protein phosphorylation network in abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis*." 24th International Conference of Arabidopsis Research 2013, 2013 年 6 月 27 日, シドニ、オーストラリア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅澤 泰史 (UMEZAWA, Taishi)

東京農工大学大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 70342756