

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 7 日現在

機関番号：12401  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26291054  
研究課題名(和文) SnRK2キナーゼを介した植物ストレス応答制御機構の解明

研究課題名(英文) SnRK2 kinase-mediated stress signaling in plants

## 研究代表者

竹澤 大輔 (TAKEZAWA, Daisuke)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20281834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物における乾燥や高浸透圧、低温などの環境変化への応答過程では、ストレスホルモンアブシジン酸(ABA)が細胞の耐性獲得に寄与していると考えられる。しかし、異なる環境シグナルの感知システムや、それらとABAシグナルを統合して制御する因子、およびその作用機作についての理解は進んでいない。本研究では、コケ植物を用い、ABAや低温、乾燥、高浸透圧応答に欠損を持つ変異株の解析するとともに、既知シグナル因子との相互作用解析から、Raf様キナーゼをコードするARK遺伝子の解析をおこない、ストレス情報の統合的制御に関わる因子の同定した。

研究成果の概要(英文)：Environmental signals such as desiccation, hyperosmosis and low temperature affect levels of the stress hormone abscisic acid (ABA), which plays a key role in protection of cells from stress-induced lethal damage. How different environmental signals as well as the ABA signal are integrated to control genes necessary for the cellular tolerance has not been understood. To elucidate mechanisms underlying autonomous responses of plant cells to various environmental stress signals, our study will focus on identification a signaling factor integrating stress signals by analysis of mutants of bryophytes. We identified a Raf-like kinase designated ARK and analyzed interactions between the identified factors and known signaling factors to determine a series of processes necessary for integrative control of the signals.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物 環境 アブシジン酸 プロテインキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

植物は気温の低下や土壌および組織内部の水ポテンシャル低下に反応してアブシジン酸 (ABA) を合成し、気孔の閉鎖を引き起こす一方、凍結や乾燥に対し保護的に働くタンパク質を蓄積して細胞が傷害を受けることを防いでいる。このような環境応答のしくみは、プロテインキナーゼ SnRK2 を介した細胞内情報伝達過程を経て行われることが示されている。SnRK2 は、グループ A プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) により負に制御され、PP2C は ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR と ABA 依存的に阻害される。セン類ヒメツリガネゴケのゲノムには SnRK2、グループ APP2C 及び PYR/PYL/RCAR の遺伝子が存在する。このことから、ABA 情報伝達のしくみは陸上植物の起源に近いとされるコケ植物にも保存され、また、植物に普遍的であると考えられる。しかし、SnRK2 の正の制御機構や、乾燥、低温、高浸透圧などの環境シグナルを統合して制御する因子、およびそれらの作用機作についての理解は進んでいない。

## 2. 研究の目的

筆者らは、ABA 非感受性のヒメツリガネゴケ AR 変異株の解析から、環境応答の制御に関わる遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケ ABA、低温、高浸透圧に非感受性の AR7 株の解析を遺伝子発現、タンパク質、キナーゼアッセイ、および凍結、乾燥、高浸透圧などへの耐性試験により多面的に解析した。全ゲノムの解析と一過的発現系による絞り込みから AR7 責任遺伝子の単離を行った。

## 4. 研究成果

ABA 応答に関わる Raf 様 MAPKKK (ARK) が、

ABA および高浸透圧により活性化するプロテインキナーゼ SnRK2 の活性化に関わっていることを明らかにした。大腸菌で発現し、精製した ARK のキナーゼドメインの GST 融合タンパク質 (GST-ARK\_KD) は、同様に大腸菌で作らせたヒメツリガネゴケ SnRK2 アイソフォーム (PpSnRK2B) をリン酸化し、活性化することがゲル内キナーゼアッセイにより明らかとなった。リン酸化ペプチド解析では、PpSnRK2B のアクチベーションループと呼ばれる活性化領域にある特異的なセリン残基が GST-ARK\_KD によりリン酸化されることが明らかとなった。また、ARK は酵母細胞内で PpSnRK2B と相互作用することが酵母ツーハイブリッド系により明らかとなった。

遺伝子重複が少ないコケを用いた本研究では、シロイヌナズナと比べ遺伝子の制御系を最も単純化した形で解析することができる。シロイヌナズナで重複している相同遺伝子がヒメツリガネゴケでは ARK 一つであり、遺伝子解析が容易となっている。最近の変異株スクリーニングでは約 100 株の ABA 非感受性変異株から、40 以上の ark アリルを同定できた。この結果は、コケが遺伝学的ツールとして有用であることを示す。

また、本研究では、コケのみならず、種子植物の ARK 関連遺伝子の機能解析を進めた。6 つある ARK 相同遺伝子のうち、3 つの遺伝子がコケ ark 変位を相補した。このことは、陸上植物に保存された共通の乾燥応答機構と種子植物における遺伝子の機能分化を示した。植物の乾燥応答に SnRK2 が重要性であることは、シロイヌナズナ SnRK2 変異株を用いた解析で飛躍的に進んだが、高浸透圧や、水ポテンシャルセンシングのしくみを含め、乾燥による SnRK2 の活性化機構は未だ不明のままであり、SnRK2 上流因子を明らかにした筆者らの研究成果は、その解明に大きく寄与したと考えている。

・研究分担者の成果

梅澤は、シロイヌナズナリン酸化プロテオーム解析から、ABA 依存的にリン酸化されるタンパク質の全貌を明らかにした。野生株と ARK 欠損株との比較により、ark が ABA 応答的なリン酸化の大部分の制御に関わっていることを明らかにした。

坂田は、ヒメツリガネゴケの SnRK2 完全欠損体 (SnRK2 null 株) を初めて作出し、ABA 応答が消失することを示した。この株についてもリン酸化プロテオーム解析を進め、SnRK2 下流プロセスの制御機構の解明に取り組んでいる。

## 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 5 件)

1. Ghosh TK, Kaneko M, Akter K, Murai S, Komatsu K, Ishizaki K, Yamato TK, Kohchi T, Takezawa D “ Abscisic acid-induced gene expression in the liverwort *Marchantia polymorpha* is mediated by evolutionarily conserved promoter elements. ” *Physiol Plant* 156: 407-420 (2016)

2. Saruhashi M, Ghosh TK, Arai K, Ishizaki Y, Hagiwara K, Komatsu K, Shiwa Y, Izumikawa K, Yoshikawa H, Umezawa T, Sakata Y, Takezawa D “ Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. ” *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E6388-E6396

3. Takezawa D, Watanabe N, Ghosh TK, Saruhashi M, Suzuki A, Ishiyama K, Somemiya S, Kobayashi M, Sakata Y “ Epoxy-carotenoid-mediated synthesis of

abscisic acid in *Physcomitrella patens* implicating conserved mechanisms for acclimation to hyperosmosis in embryophytes. ”

*New Phytol* 206:209-219 (2015)

4. Hatanaka R, Furuki T, Shimizu T, Takezawa D, Kikawada T, Sakurai M and Sugawara Y Biochemical and structural characterization of an endoplasmic reticulum-localized late embryogenesis abundant (LEA) protein from the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Biochem Biophys Res Commun.* 454(4):588-593 (2014)

5. Akter K, Kato M, Sato Y, Kaneko Y and Takezawa D Abscisic acid-induced rearrangement of intracellular structures associated with freezing and desiccation stress tolerance in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Physiol.* 171:1334-1343. (2014)

[学会発表](計 15 件)

1. Ishizaki Y, Saruhashi M, Hagiwara K, Sakata Y, Umezawa T and Takezawa D Phosphorylation-mediated activation of the Raf-like kinase ARK for response to abscisic acid in *Physcomitrella patens* Cold Spring Harbor Asia 2016-Latest Advances in Plant Development and Environmental Responses, 29 Nov - 2 Dec, 2016

2. Hagiwara K, Saruhashi M, Ishizaki Y, Kawakami M, Fujita M, Sakata Y and Takezawa D Group B3 MAPKKK as the key regulator of ABA and abiotic stress response in the moss

*Physcomitrella patens*

Cold Spring Harbor Asia 2016-Latest  
Advances in Plant Development and  
Environmental Responses, 29 Nov - 2 Dec,  
2016

3. Takezawa D, Murai S, Hori M, Wakida M,  
Takahashi K, Ishizaki K, Nishihama R,  
Kohchi and Komatsu K

Roles of abscisic acid in sugar signaling  
and desiccation tolerance in the liverwort  
*Marchantia polymorpha*

Cold Spring Harbor Asia 2016-Latest  
Advances in Plant Development and  
Environmental Responses, 29 Nov - 2 Dec,  
2016

4. 猿橋正史、石崎優美子、萩原和哉、小松  
憲治、梅澤泰史、坂田洋一、竹澤大輔

ヒメツリガネゴケの ABA シグナル伝達にお  
ける Raf 様キナーゼ ARK アミノ末端領域  
の役割

第 5 7 回日本植物生理学会年会( 2016 年 3 月  
1 8 日 岩手大学、岩手県盛岡市 )

5. 萩原和哉、猿橋正史、Totan Kumar Ghosh、  
石崎優美子、梅澤泰史、坂田洋一、竹澤大輔  
紫外線照射により作製されたアブシシン酸  
低感受性変異株の解析

第 7 9 回日本植物学会大会 ( 2015 年 9 月 6  
日 朱鷺メッセ、新潟県新潟市 )

6. 石崎優美子、猿橋正史、Totan Kumar  
Ghosh、萩原和哉、坂田洋一、竹澤大輔  
コケ植物の凍結及び脱水感受性を制御する  
プロテインキナーゼ ARK の解析

第 6 0 回低温生物工学会年会 ( 2015 年 5 月  
3 0 日 東京工科大学、東京都八王子市 )

7. 坂田洋一、梅澤泰史、竹澤大輔

成長とストレス耐性のクロストーク : アブシ  
ジン酸シグナル伝達機構の進化の視点から  
第 5 6 回日本植物生理学会年会 ( 2015 年 3  
月 1 6 日、東京農業大学、東京都世田谷区 )

8. Takezawa D

Desiccation stress signaling and the role  
of abscisic acid in *Marchantia polymorpha*  
*Marchantia* Workshop 2014 ( December 2014,  
Kobe, Japan )

9. Hagiwara Y, Kaneko M and Takezawa D  
Abscisic acid-induced gene expression in  
*Marchantia polymorpha* is mediated by  
evolutionarily conserved promoter  
elements

*Marchantia* Workshop 2014 ( December 2014,  
Kobe, Japan )

10. Ghosh TK, Takezawa D and Arai K  
Functional analysis of *Marchantia*  
*polymorpha* gene explore the conserved  
positive ABA signaling in liverworts  
*Marchantia* Workshop 2014 ( December 2014,  
Kobe, Japan )

11. Murai S, Soda K, Umezawa T, Shinozaki  
K, Ishizaki K, Kohchi T and Takezawa D  
MpPYL1 as an abscisic acid receptor in  
liverworts  
*Marchantia* Workshop 2014 ( December 2014,  
Kobe, Japan )

12. Takezawa D, Saruhashi M, Ghosh TK and  
Sakata Y  
Characterization of UV-induced mutant  
lines of *Physcomitrella patens* with  
reduced sensitivity to cold and abscisic  
acid

MOSS2014 (September 2014, Beijing, China)

13. Murai S, Umezawa T, Shinozaki K, Ishizaki K, Kohchi T and Takezawa D  
MpPYL1 as an abscisic acid receptor in liverworts  
MOSS2014 (September 2014, Beijing, China)

14. Ghosh TK, Takezawa D, Watanabe N, Saruhashi M, Suzuki A, Ishiyama K, Somemiya S, Kobayashi M and Sakata Y  
Analysis of ABA deficient mutant of Physcomitrella patens reveals the conserved mechanisms for hyperosmotic acclimation in embryophytes  
MOSS2014 (September 2014, Beijing, China)

15. 加藤圭土、Khaleda Akter、村井周平、竹澤大輔  
植物ホルモンアブシシン酸がゼニゴケ無性芽の凍結耐性に与える影響  
Cryopreservation Conference 2014 (2014年10月)

〔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・理工学研究科・准教授  
研究者番号：20281834

### (2) 研究分担者

坂田 洋一 (SAKATA, Yoichi)  
東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：50277240

梅澤 泰史 (UMEAZAWA, Taishi)  
東京農工大学・生物システム応用科学府・  
准教授  
研究者番号：70342756