

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891008

研究課題名(和文)陸上植物の環境ストレス応答の進化における多重遺伝子族の形成・機能分化の役割

研究課題名(英文)The role of expansion and functional divergence of gene family in the evolution of environmental stress responses in land plants

研究代表者

安村 友紀 (YASUMURA, YUKI)

お茶の水女子大学・生命情報学教育研究センター・助教

研究者番号：20733893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の環境ストレス応答は、適時に適切な応答を可能にする複雑なメカニズムによって制御される。本研究では、このような複雑な制御機構の構築に、複製された遺伝子が進化の過程でそれぞれ違う機能を獲得することで多様化に貢献したという可能性を検証した。特に、環境耐性を制御するABAとエチレンのシグナル伝達系で機能する2つの複製遺伝子に着目した。遺伝子発現解析や変異株解析により、この2つの遺伝子が同じ制御系で機能していながら、それぞれ別の作用を持つことを示すデータを、植物生理学および分子生物学的手法で得ることができた。これにより、植物の環境ストレス応答の多様化の解明につながる貴重な結果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：Plant stress responses are regulated by complex mechanisms in order for the appropriate responses to be induced as the environment changes. Such complicated regulatory mechanisms are sometimes brought about by duplicated genes that have acquired different function through evolution. Here we focus on two similar genes, which appeared to be involved in the ABA and ethylene signaling pathways, to find out whether they have functionally diverged after the duplication event. The results obtained through physiological and molecular studies both suggested that the two genes exerted different effects, despite the fact that they function within the same regulatory system, indicating a clear sign of functional divergence. This study provided a new insight into how plant stress responses may have diversified during the course of land plant evolution.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物 進化 植物ホルモン シグナル伝達 環境ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の環境ストレス応答とシグナル伝達系

植物の環境ストレス応答は、環境ストレスの種類や程度、他の環境条件、植物の生育段階によって異なり、複合的な要素の絡む条件下で適切な耐性遺伝子を発現するように最適化されている。植物がこのような複雑な制御メカニズムを実現させている要因として近年注目されているのが、複数のシグナル伝達物質の伝達系が連携・相互作用し形成する制御ネットワークである。環境耐性能を制御するABAとエチレンのシグナル伝達系の相互作用については、生理学的データは多数存在するものの、分子レベルでの理解には至っておらず、詳細な分子生物学的研究が待たれている。

(2) エチレンシグナル伝達因子のCTR1とその進化的な経緯

今回注目するのは、エチレンシグナル伝達系において重要な役割を担い、80年代以来広く研究対象にされてきたCTR1(CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1)という、キナーゼ機能をもつタンパクである。ゲノム解析の進展により、従来の研究対象である被子植物にのみならず、広く陸上植物に共有保存されている遺伝子であり、原始陸上植物に近いとされているコケ植物にもホモログCTR1-LIKE(CTR1L)が存在することがわかった。申請者は、先行研究において、CTR1Lがコケ植物にもエチレンシグナル伝達に関わり環境ストレス応答も制御する役割があることを示した。同時に、コケ植物のCTR1LはエチレンのみならずABA応答にも直接的に影響を及ぼすことを示し、陸上植物の進化とともにCTR1の機能が変容したことが示唆された。

また、系統樹解析からは、コケ植物の分離以降、CTR1Lが複製されCTR1とCRG(CTR1-related Group)の2つのグループに分かれ、CTR1多重遺伝子族が形成されたこともわかっていた。

(3) 未研究であるCRGとCTR1が機能分化したことで環境ストレス応答の多様化が可能になった

上記から、CTR1多重遺伝子族に属する遺伝子同士の中で機能分化または特異化があったことが示唆された。一般的に、進化において多重遺伝子族を形成する遺伝子群は、器官や環境ストレスによって異なる発現パターンを獲得する、または、変異によって違う活性を獲得するなどの機能分化を経ることにより、複雑な制御メカニズムを構築したと考えられている。今回、被子植物のCTR1とCRG、コケ植物のCTR1Lに焦点を当て、エチレン・ABA両シグナル伝達系におけるこれらタンパクの機能分化が、陸上植物の多様な環境ストレス応答の制御を可能にしたという仮説を検証する。

2. 研究の目的

上記1(3)の仮説を検証するために設定した研究目的を次にあげる。

(1) コケ植物ヒメツリガネゴケのCTR1L、被子植物シロイヌナズナのCTR1とCRGタンパクが、それぞれどのようにABA両シグナル伝達系に作用するのか比較検証し、CTR1多重遺伝子族の進化に伴う機能の変化について知見を得る。

(2) 被子植物シロイヌナズナのCRGタンパクの役割を解明し、CTR1の機能や役割と比較する。特に、被子植物特有の組織・器官・生長過程において、二つのタンパクの機能の違いがみられるか検証し、(違いがある場合は)機能分化の確証を得る。

3. 研究の方法

(1) コケ植物において、CTR1Lが直接的に作用すると考えられるABAシグナル伝達因子の候補についての情報があり、その候補因子とCTR1Lが結合するか、イーストハイブリッド法を用いて検証する。さらに、シロイヌナズナのCTR1、CRGそれぞれについても同様の方法で調べ、結合特異性や結合強度についてのデータを得る。

(2) シロイヌナズナの環境ストレス応答、エチレン・ABA両シグナル伝達系におけるCRGの役割を決定し、さらにCTR1と比較するために次の3つの方法を用いる。

- ① 植物に環境ストレスを与えた状態、エチレンまたはABA処理を行った状態、さらに異なる発育段階や組織において、CTR1遺伝子とCTR1L遺伝子の発現パターンを解析する。
- ② ctr1変異株、crg変異株、ctr1:crg二重変異株の表現型の比較解析を行う。特に耐乾燥性や冠水応答、エチレン応答、ABA応答、エチレンとABAが相互作用する現象に注目する。
- ③ エチレンまたはABAに反応して発現することで知られる遺伝子が、それぞれの変異株でエチレンまたはABA応答を示すか検証する。

以上により、CTR1とCRGの機能分化を生理学的手法と分子学的手法の2方向から示すことを試みる。

4. 研究成果

(1) コケ植物のCTR1Lと、シロイヌナズナのCTR1やCRGが、それぞれコケ植物やシロイヌナズナのABAシグナル伝達因子と直接結合するかを調べ、結果を表1にまとめる。

まず、それぞれ複数のABAシグナル伝達因子に特異的に結合すること、またその特異性の傾向は類似することが示された。これは、エチレンとABAの二つのシグナル伝達系の連携・クロストークを、CTR1多重遺伝子族に属

するタンパクが担うという説を裏付ける分子生物学的データの一つとして貴重である。

		CTR1L (コケ)	CTR1 (シロイヌ ナスナ)	CRG (シロイヌ ナスナ)
ABAシグナル伝達因子	コケ	A	x	✓
		B	✓	✓✓
		C	x	✓
		D	✓✓	✓✓✓
	シロイヌ ナスナ	2	△	x
		3	△	✓
	6	△	✓	

表1 CTR1L、CTR1、CRGと、ABAシグナル伝達因子の相互作用の有(✓)無(x)と、その程度(✓の数と大きさ)

さらに、CTR1とCRGを比較すると、CRGの方がCTR1よりも高い結合強度をもつ傾向が見られ、タンパクの機能に差があることが示唆された。これは機能分化を示すデータとしても有効であると考えられる。

ただし、今回用いたイーストハイブリッド法は *in vitro* のアッセイであり、また陰性対照の値が通常見られるより高かったなどの問題もあったため、今後は別の方法による検証で確認を得る必要がある。

(2) CTR1 遺伝子と CRG 遺伝子の mRNA 発現レベルを逆転写酵素反応と qPCR を用いて解析した。まず、植物体の組織別に発現レベルを調べると (図1)、発現レベルに顕著な差が見られ、CTR1の方が非常に高いレベルで発現されていることがわかった。しかし、どちらも黄色に変色した古い葉で発現レベルが上昇するという組織別発現パターンは共通しており、そこに注目すべき差異はないと考える。

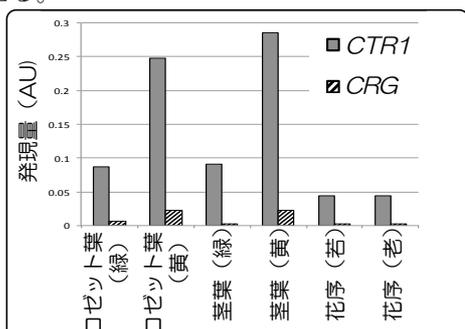


図1 CTR1遺伝子とCRG遺伝子の組織別発現量

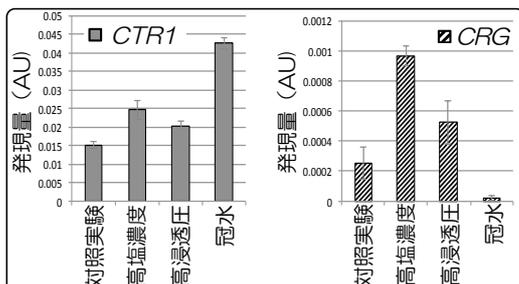


図2 CTR1とCRGの環境ストレス時における発現量

つぎに、環境ストレス応答における CTR1 遺伝子と CRG 遺伝子の mRNA 発現レベルを比較した (図2)。ここでも CTR1 の発現量の多さが顕著である。それぞれのストレス応答性を比べると、全般に CRGの方が高く、敏感に応答しているように思われた。どちらも高塩濃度や高浸透圧によって発現量が上がる傾向は共通しているが、冠水ストレスに対しては CTR1 の発現量は上がり、CRG の発現量が減少するという逆の応答性が観察され、ストレス応答の制御における機能分化を示唆する興味深いデータが得られた。

さらに、ABA やエチレン処理を施した植物体で CTR1 遺伝子と CRG 遺伝子の mRNA 発現レベルを調べると (図3)、CTR1 は ABA 処理に対して無変化である一方で CRG の発現量は減少すること、エチレン処理に対しては CTR1 の発現量は減少するのに対し CRG の発現量は増加すること、そして ABA とエチレンを同時に与えるとどちらの発現量も増加することが観察された。この差異もまた機能分化を示唆するとともに、ABA とエチレンに対する応答性の違いが生理学的にどのような意味を持つのかという点も興味深い。

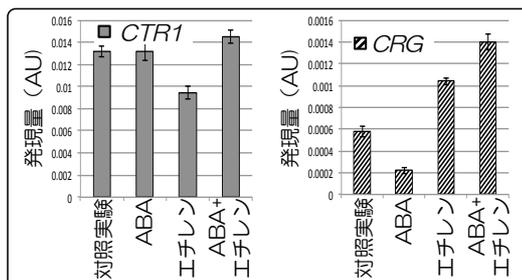


図3 CTR1とCRGのABA/エチレン処理時における発現量

(3) *ctr1* 変異株、*crg* 変異株、*ctr1:crg* 二重変異株の表現型の比較解析を行うために、*ctr1* 変異株と *ctr1l* 変異株をかけ合わせて二重変異株を作成した。一見したところ、*crg* 変異株は野生型に、二重変異株は *ctr1* 変異株に似た表現型を示す (図4)。これは、CTR1 に比べて CRG の発現量が低いためと思われる。

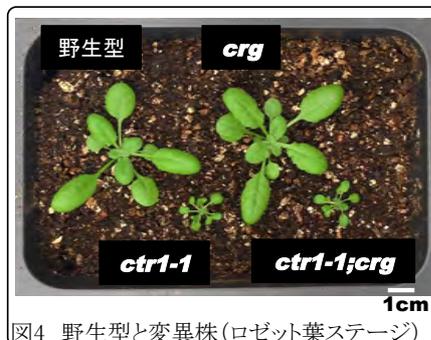


図4 野生型と変異株(ロゼット葉ステージ)

しかし、植物体に環境ストレスや ABA またはエチレン処理を施すと、その応答は上記のパターンと違う傾向が見られた。例えば、高塩濃度ストレス (400mM NaCl) を与えると、野生型はある程度の耐性を示しながらも葉が

枯死するなど敏感に反応するのに対し、*ctr1* は非常に強い耐性を持ち外見上の生育に影響がほとんど出ない。それに比較すると、*crg* 変異株も二重変異株は、それぞれ野生型、*ctr1* 変異株よりも耐性が低下している傾向が観察された。他の環境ストレス（高浸透圧や冠水）に対してもそのような傾向が見られたが、どの場合も差異が微小か、数値化することが難しい事象であり、詳細な検証が困難であった。その中で、発芽率を検証する実験では、データを数値化すること、高い再現性を得ることができた（図5）。通常の培地では三日後にはほぼ100%発芽し双葉も出揃い、この点で野生型と変異株に相違はない。ABA処理を行うとこの発芽率は著しく低下することが知られているが、発芽阻害の度合いにおいて野生型とそれぞれの変異株に差が見られた。野生型に比べて *crg* 変異株、*ctr1* 変異株、*ctr1:crg* 二重変異株の順に発芽阻害の程度が減少しており、*CRG* も *CTR1* もともに ABA 応答に拮抗して機能していること、*CTR1* の方がその貢献度は大きいことが示唆された。一方で、同じように発芽阻害を引き起こす高塩濃度ストレスを与えたところ、今度は *crg* 変異株、*ctr1:crg* 二重変異株、*ctr1* 変異株の順に発芽阻害の程度が減少した。二重変異株において *ctr1* と同等の発芽が見られない理由が *CRG* 遺伝子の欠損であることから、*CTR1* が発芽を阻害するのに対し *CRG* は発芽を促進するという、反対の機能を持つ可能性が示唆された。同様の結果が高浸透圧ストレスを与えた状態でも観察され、類似する遺伝子が同じ状況下で相反して機能することを示す貴重なデータを得ることができた。

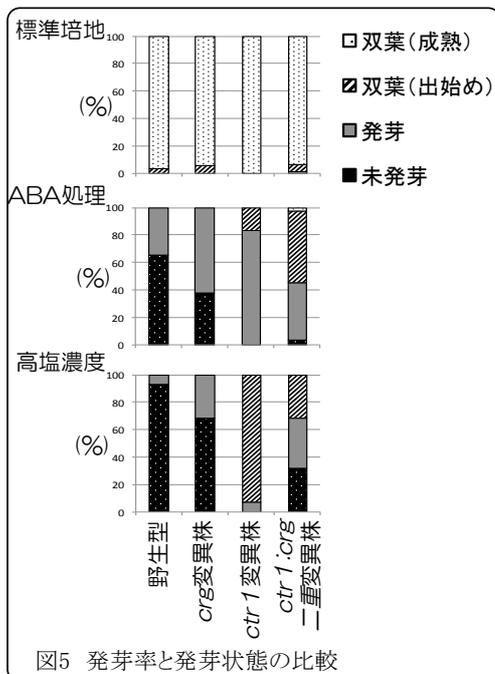


図5 発芽率と発芽状態の比較

(4) 前述の実験結果より、*CTR1* と *CRG* が、エチレンと ABA の二つのシグナル伝達系に直接的に関与すること、環境ストレスに対して逆のストレス応答を引き出すことが示された。

そこで、エチレンや ABA に応答して発現量が変化することで知られる遺伝子に対して、*CTR1* と *CRG* がどのような影響を持つのか調べた。図6に示す2種類の遺伝子 (*ERF1*, *OSR1*) は、エチレン応答性を示す遺伝子である。どの遺伝子もエチレン処理後に発現量が増加する特徴を持つが、このエチレン処理後の発現量を、野生型、*ctr1* 変異株、*crg* 変異株と比較すると、*ctr1* 変異株では発現量が著しく増加し、*crg* 変異株では減少していることが観察された。つまり、*CTR1* がエチレン応答性を抑制するのに対し、*CRG* は促進する機能を持つことが示唆される。

さらに、他の十数個のエチレンまたは ABA 応答性を持つ遺伝子の発現レベルを調べると、*CTR1* の影響をより強く受けるものと、*CRG* の影響をより強く受けるものに分かれることも分かった。このことから、*CTR1* と *CRG* は下流因子へのシグナル伝達においても、相反する機能を持ち、明確に機能分化されていることが分子学的データを持って示された。

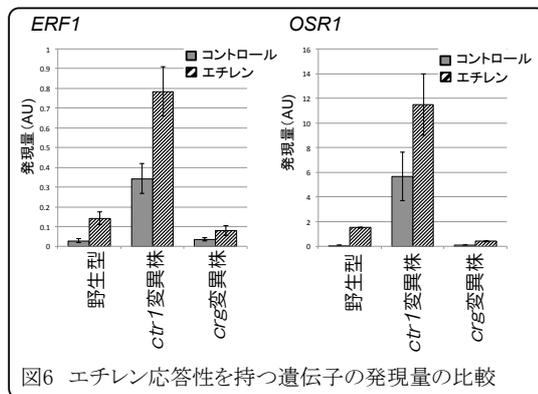


図6 エチレン応答性を持つ遺伝子の発現量の比較

(5) まとめ

CTR1 多重遺伝子族のタンパクが、ABA とエチレンのシグナル伝達系の連携に直接的に関与することを示すことができ、環境ストレス応答の複雑な制御メカニズムに関する新たな知見を得ることができた。また、*CTR1* と *CRG* が明確に機能分化していることを、発現パターンの違い、環境ストレス応答に関する植物生理学的データ、エチレン・ABA シグナル伝達系に関する分子生物学的データを持って示すことができた。より詳細なデータや再現性、別の手法による検証が必要な部分もあるが、大枠において、*CTR1* 多重遺伝子族の機能分化を示せたことから、陸上植物の環境ストレス応答の機能拡大と多様化の解明につながる貴重な結果が得られたと考える。

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 1 件)

① Yasumura, Y., Pierik, R., Kelly, S., Voeselek, L. A. C. J., and Harberd, N. P., An Ancestral Role for CONSTITUTIVE

TRIPLE RESPONSE1 Proteins in Both Ethylene and Abscisic Acid Signalling, Plant Physiology、査読有、169 卷、2015、283-298
DOI: 10.1104/pp.15.00233

〔学会発表〕(計 1 件)

① 安村 友紀、「ヒメツリガネゴケのCTR1はエチレン、ABA両シグナル伝達系に關与する」日本植物学会第79回大会、2015年9月6日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安村 友紀 (YASUMURA, Yuki) お茶の水女子大学・生命情報学教育研究センター・特任助教
研究者番号：20733893

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：