

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580121

研究課題名（和文）植物のストレス応答性受容体型キナーゼのシグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文）Functional analysis of stress-responsive receptor-like kinase in plants

研究代表者

氏名（アルファベット）刑部祐里子（YURIKO OSAKABE）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師

研究者番号 50444071

研究成果の概要：

細胞膜は様々な外部環境因子感受の場である。乾燥・塩および低温などの水分ストレスに対する植物の耐性機構に關与する、細胞膜局在性の水分ストレス応答性受容体型キナーゼについて研究を行った。水分ストレス応答に重要な植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）誘導性シロイヌナズナ受容体型キナーゼ RPK1 を過剰発現する形質転換植物体は、ABA による根の伸長抑制、気孔閉鎖等に対し高感受性を示し、さらに乾燥ストレスに対し強い耐性を示した。マイクロアレイ解析の結果、RPK1 過剰発現体では、水分ストレス応答性遺伝子および活性酸素（ROS）応答性遺伝子の発現が上昇していた。さらに、RPK1 過剰発現体は ROS 消去系酵素活性が上昇しており、活性酸素ストレスに対する耐性を示した。以上の結果は RPK1 の高発現により、水分ストレスだけでなく、活性酸素ストレス耐性に關与するシグナル伝達経路が増強されたことを示唆している。また、RPK1 のホモログ遺伝子である RPK2 は葯や花粉の分化発達に重要な因子であることが示され、マイクロアレイ解析の結果、様々な代謝経路やシグナル伝達制御因子の転写を制御することが明らかになった。以上のことから受容体型キナーゼ RPK1 および RPK2 はストレスシグナル伝達に關わる因子であるだけでなく、植物の生長分化を制御する重要な因子であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物生産化学・生物有機化学

科研費の分科・細目：植物生長調節物質

キーワード：植物ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

植物は移動の自由が無い為に、外部環

境変化に柔軟に対応するシステムが高度

に発達してきた。細胞膜は様々な外部環

境因子感受の場であり、植物の分化・発達や様々なストレス応答などの生理機能を制御する。細胞膜局在性受容体タンパク質が外部環境因子をどのように細胞内に伝達し様々な生理応答を制御するかについてその全体像を解析することは、植物の機能維持やストレス適応戦略を明らかにする上で重要である。本研究では、乾燥・塩および低温などの水ストレスに対する植物の適応機構を解明する為に、細胞膜局在性の水ストレス応答性受容体型キナーゼに着目し、ストレス条件下での細胞膜における応答反応、個々の因子間の相互作用、シグナル伝達の調節機構について明らかにすることを目的とした。

研究代表者等は、これまで、水ストレス及びその応答に重要な植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)に誘導性を示す、シロイヌナズナ受容体型キナーゼ RPK1 について解析し、RPK1 遺伝子が種子休眠、根の伸長成長過程、ABA による気孔閉鎖、ABA 応答性遺伝子発現の調節等、様々な ABA 応答反応の制御を行うことを示した¹⁾。RPK1 が細胞膜上で機能する受容体タンパク質であり、ABA シグナル伝達において重要な役割がもつことが示唆された。

¹⁾ Osakabe, Y., et al. (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase 1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 1105-1119.

2 . 研究の目的

RLK 遺伝子はシロイヌナズナゲノム中で 600 以上のメンバーからなる遺伝子ファミリーを形成しているが、その機能が明らかになった例は少ない。最近植物の細胞分化に重要な新規のペプチドホルモンが単離され、これらの受容体は LRR-RLK であると考

えられている。RPK1 は同様に LRR-RLK に分類されるタンパク質である。これまでの研究から RPK1 が ABA/ストレス応答のシグナル伝達因子の一つとして機能する津と考えられたことから、RPK1 がストレスホルモンとして機能するペプチド分子の受容体である可能性も示唆された。本研究は、RPK1 がどのように水ストレス及び ABA シグナルを細胞膜上で受容し細胞内に伝達するかについて、詳細な分子作用機構を明らかにすることを目的とした。本研究により新たな水ストレス及び ABA シグナル伝達機構の存在とその詳細が明らかになる可能性が考えられる。

3 . 研究の方法

これまで研究代表者らは、RPK1 欠失変異体及びアンチセンス形質転換体が ABA 非感受性を示すことを明らかにした。本研究においては RPK1 タンパク質高発現体を用いてその表現型を解析すると共に、RPK1 が受容するシグナル因子を明らかにした。また下流で機能すると考えられる二次メッセンジャーを明らかにした。さらに、RPK1 の唯一のホモログ遺伝子である RPK2 の機能解析を行った。

4 . 研究成果

(1)シロイヌナズナ RPK1 タンパク質高発現体の ABA および乾燥ストレスに対する表現型解析

RPK1 タンパク質の高発現がシロイヌナズナに与える影響を解析するために、CaMV35S プロモーター制御下で RPK1 タンパク質を過剰発現する形質転換植物体を作製し、複数のラインを選抜した。得られた形質転換植物体の ABA に対する応答性を明らかにするために、ABA を含む培地上で生育したところ、

RPK1 高発現体は ABA による根の伸長抑制に対し ABA 高感受性を示した。ABA は乾燥ストレス時に気孔閉鎖を誘導する。RPK1 高発現体は気孔閉鎖の程度がコントロール植物と比較して強いことが明らかになった。さらに、これらの植物体は水分損失が減少しており、乾燥ストレスに対し強い耐性を示すことが明らかになった。

(2)シロイヌナズナ RPK1 タンパク質高発現体の活性酸素 (ROS) ストレスに対する表現型解析

マイクロアレイ解析の結果、RPK1 高発現体では、水分ストレス応答性遺伝子および活性酸素 (ROS) 応答性遺伝子の発現が誘導されていることが明らかになった。RPK1 欠失変異体 *rpk1-1* および RPK1 高発現体の活性酸素ストレスに対する耐性を解析した。その結果、*rpk1-1* はストレス耐性が減少しており、一方で RPK1 高発現体は耐性の増強が見られた。さらに、RPK1 高発現体は ROS 消去系酵素活性が上昇していた。以上の結果は RPK1 の高発現により、水分ストレスだけでなく活性酸素ストレス耐性に関与するシグナル伝達経路が増強されたことを示唆している。

(3) RPK1 タンパク質の水分ストレス条件下における細胞内局在性の解析

RPK1-GFP の局在性の解析の結果、RPK1 は通常の生育条件下では細胞膜に局在し、高浸透圧下では細胞膜および未知の顆粒状の細胞内小器官に局在がみられた。RPK1 の局在する細胞膜の動態が浸透圧条件下で変動することにより、RPK1 の機能が制御されることが示唆された。

(4) RPK1 ホモログ RPK2 の機能解析

RPK2 遺伝子は RPK1 のキナーゼドメインと 71%、細胞外ドメインと 27% の相同性を示す。RPK1 が水分ストレスおよび ABA で転写誘導

されるのに対し、RPK2 はストレス応答性を示さなかった。この遺伝子の機能を明らかにするために欠失変異体の表現型解析を行った。*rpk2-1* および *rpk2-2* は葯の形態が異常になっており、タペート層の分解と内皮の肥厚が抑制され裂開せず、さらに、花粉囊の発達の同調性が失われていることが分かった。*in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果、RPK2 がタペート層で主に発現し、葯および花粉の発達分化に重要な役割を持つことが示唆された。マイクロアレイ解析の結果、*rpk2* 変異体では葯の裂開前後に 400 遺伝子の発現が抑制されており、主に細胞壁や脂質、炭水化物、二次代謝に関わる遺伝子群、ABA や水分ストレスに関わる遺伝子群、キナーゼや転写因子等主にシグナル伝達に関わる遺伝子群等が含まれており、RPK2 が多くの遺伝子の発現を制御する重要な因子であることが示唆された。さらに、RPK2 ではシュートの生長が旺盛になっており、RPK2 は植物の成長分化に役割を持つことが示唆された。

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 1 件)

Mizuno, S, Osakabe, Y., Maruyama, K., Ito, T., Osakabe, K., Sato, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) "RPK2, a novel LRR receptor-like protein kinase controlling tapetum development and pollen maturation in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Journal*, 50, 751-766.

[学会発表] (計 10 件)

(1) 国際学会

Osakabe Y., Shinozaki K., and Yamaguchi-

Shinozaki K. Functional analysis of a leucine-rich repeat receptor like kinase, RPK1, involved in ABA signal Transduction of Arabidopsis. 2007 Gordon Research Conference on "Temperature Stress in Plants"

Osakabe, Y., Mizuno, S., Maruyama, K., Osakabe, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of a leucine-rich repeat receptor like kinase, RPK1, involved in ABA signal transduction of *Arabidopsis*. 7th APSRC International Symposium: Abiotic Stress and Plant Growth and Development, Nov 8, Gwangju, Korea.

(1)国内学会

刑部祐里子・田中秀典・水野真二・刑部敬史・篠崎一雄・篠崎和子 (2007) 水分ストレス誘導性受容体型キナーゼ RPK1 の ABA シグナル伝達機構における機能の解析. 第 30 回日本分子生物学会年会, 12 月 11~15 日, 横浜.

刑部祐里子・田中秀典・水野真二・圓山恭之進・刑部敬史・小林正智・篠崎一雄・篠崎和子 (2008) ABA シグナル伝達機構における水分ストレス誘導性受容体型キナーゼ RPK1 の機能解析. 第 49 回日本植物生理学会年会, 3 月 20~22 日, 札幌.

田中秀典・刑部祐里子・水野真二・篠崎一雄・篠崎和子 (2008) シロイヌナズナ低温誘導性受容体様プロテインキナーゼ LIK1 の機能解析. 第 49 回日本植物生理学会年会, 3 月 20~22 日, 札幌.

刑部祐里子・田中秀典・水野真二・篠崎一雄・篠崎和子 (2008) 水分ストレス誘導性受容体型キナーゼ RPK1 の ABA シグナル伝達機構における機能の解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 12 月 9~12 日, 神戸.

田中秀典・刑部祐里子・水野真二・篠崎一雄・篠崎和子 (2008) シロイヌナズナの低温誘導性受容体様プロテインキナーゼ LIK1 の機能解析.

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 12 月 9~12 日, 神戸.

田中秀典・刑部祐里子・桂彰吾・水野真二・篠崎一雄・篠崎和子 (2008) 特定領域研究「植物の養分吸収と循環系」第 3 回ワークショップ別府 10 月 22~23 日, 別府.

刑部祐里子・田中秀典・圓山恭之進・篠崎一雄・篠崎和子 (2009) 水分ストレス誘導性受容体型キナーゼ RPK1 の ABA シグナル伝達機構における機能解析. 第 50 回日本植物生理学会年会, 3 月 21~24 日, 名古屋

田中秀典・刑部祐里子・桂彰吾・水野真二・篠崎一雄・篠崎和子 (2009) シロイヌナズナのストレス誘導性受容体様細胞質型キナーゼ遺伝子の機能解析. 第 50 回日本植物生理学会年会, 3 月 21~24 日, 名古屋

〔図書〕(計 1 件)

刑部祐里子、篠崎和子、分子生物学辞典第 2 版、村松正実(他)編、(分担執筆)東京化学同人編集部、2008 年.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

刑部祐里子(OSAKABE YURIKO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師
研究者番号: 50444071

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし