

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04383

研究課題名(和文)植物ホルモンアブシシン酸のリン酸化シグナルと選択的スプライシング制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of mRNA alternative splicing and ABA-responsive phosphosignaling

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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：アブシシン酸(ABA)は、植物のストレス応答を司る重要な植物ホルモンである。ABAシグナル伝達経路では、タンパク質のリン酸化が重要であり、申請者らはABAに応じてリン酸化される複数のmRNAの選択的スプライシングに関わる因子を発見した。そこで、選択的スプライシングを網羅的に解析するため、ABA処理を施したシロイヌナズナ野生型およびSnRK2欠損変異体から抽出したRNAを用いてシーケンス解析を行ったところ、170種以上のスプライスバリエーションを発見した。現在、得られたバリエーションの確認を進めるとともに、シロイヌナズナ種子由来のRNAについても同様の解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Abscisic acid (ABA) is a major phytohormone which regulates stress responses in plants. It had been demonstrated that protein phosphorylation is important in ABA signal transduction pathway, and we found several mRNA splicing factors as phosphoproteins in response to ABA. To elucidate splicing events in response to ABA, we performed RNA-seq analysis using Arabidopsis WT and srk2dei mutant, and identified over 170 splice variants were regulated by ABA and SnRK2. We are going to functional analysis of splice variants in ABA signaling, and RNA-seq analysis using Arabidopsis seeds in the same way.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：アブシシン酸 リン酸化 スプライシング プロテインキナーゼ 乾燥耐性 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

アブシシン酸 (ABA) は植物ホルモンの一つであり、植物の環境応答を司る「ストレスホルモン」としての働きや、種子成熟や休眠における生理作用がよく知られている。近年、ABA シグナル伝達系の主要部が明らかとなり、受容体 (PYR/PYL)、タンパク質脱リン酸化酵素 (PP2C) およびタンパク質リン酸化酵素 (SnRK2) のコア因子群とその制御機構が示された (図1、文献1,2)。この系では「タンパク質のリン酸化」が決定的に重要であり、SnRK2 活性がシグナルの出力となっている。最近、申請者はシロイヌナズナの ABA 応答におけるリン酸化タンパク質を大規模に解析し、野生型と SnRK2 三重変異体との比較から、SnRK2 リン酸化基質候補を多数同定することに成功した (文献3)。

本研究の着想のきっかけは、これらの候補タンパク質の中に SR タンパク質ファミリーを複数発見したことであった。この結果は、SR タンパク質の機能が ABA シグナル (SnRK2) によって調節されている可能性を示唆するものである。

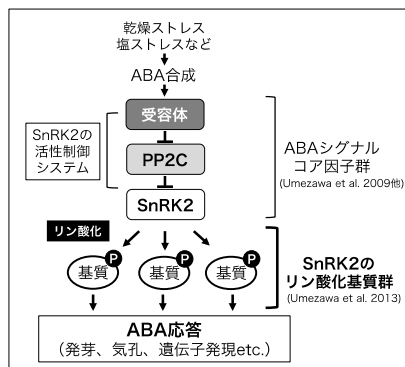


図1 植物のABAシグナル伝達の基本モデル

2. 研究の目的

SR タンパク質とは、セリン-アルギニンリッチタンパク質の略で、代表的なスプライシング調節因子の一種である。スプライソソームを正しいスプライシング部位にガイドする役割を持つとされ、生体内の選択的スプライシングを調節する。植物のSR タンパク質は、シロイヌナズナで18種あり、6つのサブファミリーに分類されるなど、動物に比べて複雑である。しかも、ほとんどのSR タンパク質の機能が未同定で、リン酸化制御についてもよくわかっていない。それぞれのスプライシング制御対象も不明である。最終的にSR タンパク質に着目する決定打となったのは、酵母ツーハイブリッド法によって SnRK2 と SR タンパク質の強い相互作用が認められたことである (図3)。我々が得た結果から、SR タンパク質が ABA シグナルによる制御を受けること、さらにその制御の実体は SnRK2 によるリン酸化であることが強く示唆された。これまでに、ABA が前駆体 mRNA のスプライシング制御に影響を与えることは、いくつかの例から明らかとなっているが、ABA

応答時の選択的スプライシングを体系的に研究した事例はなく、その制御機構も不明である。本研究では、ABA シグナルとスプライシング因子である SR タンパク質群の直接的な関係を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究で明らかにしたいことは、大きく分けて以下の3点である (図2)。

ABA 応答における SR タンパク質群の機能同定

申請者は、ABA シグナルの主要因子である SnRK2 と SR タンパク質群が関係する具体的証拠を得ている。したがって、SR タンパク質群が ABA 応答に関与する可能性が高いため、SR タンパク質遺伝子の機能解析を逆遺伝学的に行いそれらの機能を決定する。この解析は、シロイヌナズナとヒメツリガネゴケの同時平行で行う。ヒメツリガネゴケを用いる理由は、シロイヌナズナと同様のプロテオームデータが既にあることと、基部陸上植物であり進化的な議論ができるためである。

ABA に応答した選択的スプライシングパターンの解明

近年、高性能な次世代シーケンサーを用いて転写産物を高深度に解析し、スプライシングを大規模に調べる「スプライソーム解析」が可能となっている。そこで、本研究ではシロイヌナズナを用いて ABA 応答時のスプライソーム解析を行い、その全貌を捉えることを目指す。さらに、SR タンパク質の変異体等を解析することによって、各々のスプライシング制御範囲を明らかにする。

SnRK2 による SR タンパク質のリン酸化と機能制御

上述のように、SR タンパク質が SnRK2 のリン酸化基質候補として同定され、さらに SnRK2 と SR タンパク質群の相互作用が示された。そこで、SnRK2 による SR タンパク質群のリン酸化、SnRK2 と SR タンパク質の生体内相互作用、および SR タンパク質群のリン酸化による機能調節、の3点に絞った生化学的解析をさらに進めて、機能調節の分子機構を明らかにする。

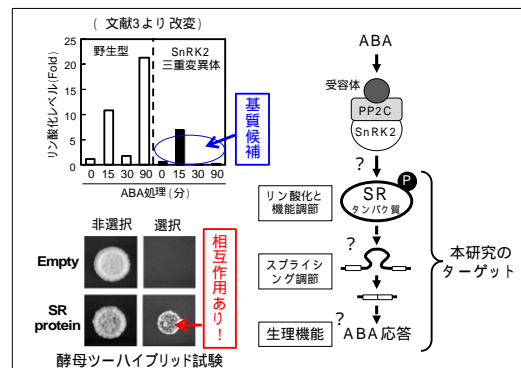


図2 これまでの研究結果と本研究の狙い

リン酸化プロテオーム解析において、SRタンパク質はABAに応答してリン酸化され、SnRK2三重変異体では抑制されたため、SnRK2の基質候補と考えられた。酵母ツーハイブリッド法により、SnRK2とSRタンパク質の相互作用が示された。本研究のねらいは、SRタンパク質のリン酸化制御とABAシグナル伝達における生理機能、および選択的スプライシングの制御、の3点に集約される。

4. 研究成果

ABA 応答における SR タンパク質群の機能同定

本研究で対象とする SR タンパク質 Clone 1~3 は、リン酸化プロテオーム解析によって、SnRK2 下流で制御されるリン酸化タンパク質として同定された。そこで、これらの SR タンパク質が ABA シグナル伝達に与るかどうかを調べるために、ABRC より T-DNA 挿入変異体を入手し、表現型を解析した。それぞれの変異体を ABA を含有する培地に播種し、発芽および発芽後の生育経過を観察した。その結果、Clone 1 および 2 の変異体は、発芽時において ABA 高感受性を示すことがわかった (図 3 および 4)。したがって、これらの SR タンパク質は ABA シグナルを負に制御していると推察された。

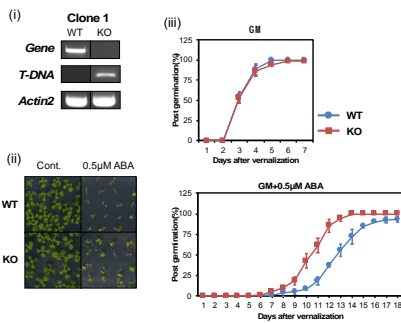


図 3 Clone 1 遺伝子破壊株の表現型解析

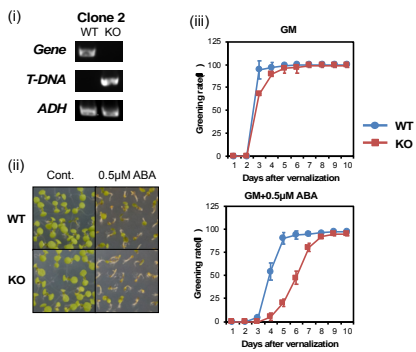


図 4 Clone 2 遺伝子破壊株の表現型解析

ABA に応答した選択的スプライシングパターンの解明

ABA シグナルが mRNA の選択的スプライシングに与えることは、いくつかの報告から明らかとなっている。たとえば、ある種の PP2C は ABA シグナルを負に制御するとともに、自身もスプライシングによる制御を受けている。しかしながら、植物の ABA 応答における選択的スプライシングの全貌は明らかになっていない。申請者らはこの課題に取り組むべく、RNA-seq 解析による網羅的なスプライシングパターンの解析を行うこととした。また、申請者の仮説は、SnRK2 に

よるリン酸化が選択的スプライシングの制御に一定の役割を持つ、というものである。従って、解析には SnRK2 の三重変異体を使用し、野生型のデータと比較解析を行うこととした。ABA 処理を施した植物体をサンプリングし、RNA を抽出して東京農業大学の次世代シーケンサー-illumina High-Seq 2500 で解析した (図 5)。得られたシーケンス結果から、トランスクリプトーム解析と、スプライスバリエーションの解析を行った。トランスクリプトームは情報に従い、RPKM 値に基づいた推定値を各遺伝子について求めた。スプライスバリエーションについては、スプライシングのジャンクション部を含むシーケンスを抽出して解析した。その結果、約 180 種の mRNA の選択的スプライシングが、ABA に応答して、かつ SnRK2 による制御を受ける可能性を示すことができた (図 6)。さらに、同様の方法でシロイヌナズナの種子からも RNA サンプルを調製し、同様の解析を行った。

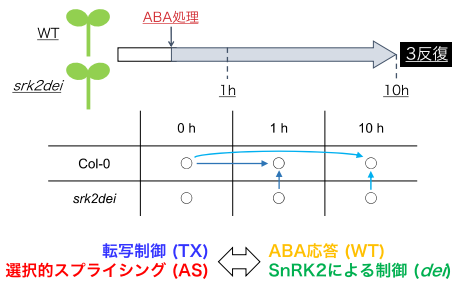


図 5 RNA-seq 法によるスプライシング解析

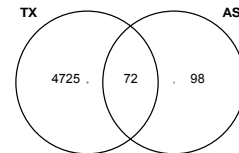


図 6 検出された転写産物とスプライスバリエーション

SnRK2 による SR タンパク質のリン酸化と機能制御

Clone 1~3 は、SnRK2 によって制御を受けるリン酸化タンパク質として単離されたが、SnRK2 の直接の基質かどうかは明らかでない。そこで、大腸菌の発現系を用いて調整した組換えタンパク質を用いて、*in vitro* リン酸化試験を実施した。その結果、Clone 1~3 のいずれも SnRK2 による直接のリン酸化は認められなかった。したがって、Clone 1~3 は SnRK2 以外のプロテインキナーゼの基質である可能性が高い。以前の研究から、MAPK カスケードが SnRK2 の下流で制御されていることが明らかとなっているので、今後は MAPK と Clone 1~3 の関係を調べる予定である。

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21件)

1. Amagai, A., Umezawa, T. et al. (2018) "Phosphoproteomic profiling reveals ABA-responsive phosphosignaling pathways in *Physcomitrella patens*." *Plant J.* 94: 699-708. (査読有)
2. Ariga, H., Sakata, Y. et al. (2017) NLR-locus-mediated trade-off between abiotic and biotic stress adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 3: 17072 (査読有)
3. Yu, X., Umezawa, T. et al. (2017) "Enhancement of abiotic stress tolerance in poplar by overexpression of key *Arabidopsis* stress response genes, *AtSRK2C* and *AtGOLS2*." *Mol. Breeding* 37: 57. (査読有)
4. Saruhashi, M., Umezawa, T., Sakata, Y. et al. (2015) "Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 12(46): E6388-96. (査読有)
5. Ito, T., Umezawa, T. et al. (2015) "Novel abscisic acid antagonists identified with chemical array screening." *ChemBioChem* 16(17): 2471-2478. (査読有)

他

[学会発表](計82件)

1. Ishikawa, S., Umezawa, T. et al. "Comparative phospho- proteomic analysis of dormant and after- ripened seeds of barley" 日本植物生理学会第59回年会、2018年3月28日、札幌コンベンションセンター
2. Hara, Y., Umezawa, T. et al. "Comparative phospho- proteomic analysis of abscisic acid response mutant of *Physcomitrella patens*" 日本植物生理学会第59回年会、2018年3月28日、札幌コンベンションセンター
3. 神山佳明、梅澤泰史 他「ABA シグナル伝達に関わるサブクラス III SnRK2 と MAPKKK の相互作用解析」 日本植物生理学会第59回年会、2018年3月30日、札幌コンベンションセンター
4. 篠澤 章久、坂田 洋一 他「ヒメツリガネゴケにおける SnRK2 遺伝子ファミリーの機能解析」 日本植物学会、2017年9月、野田
5. 勝田祥平、坂田洋一 他「シロイヌナズナ B3 MAPKKK の ABA 応答機構への役割」 日本植物学会、2016年9月16日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

6. Y. Sakata et al. "Insights into the evolution of ABA signaling in plants from the study of bryophytes" 日本植物生理学会、2016年3月18日、盛岡

7. Yoichi Sakata 他 "Functional analysis of SnRK2 in ABA signaling pathway of the moss *Physcomitrella patens*" The MOSS meeting 2015、2015年12月2日、カンクン、メキシコ

他

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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

(2)研究分担者

平山 隆志 (HIRAYAMA, Takashi)
岡山大学資源植物科学研究所・教授
研究者番号: 10228819

坂田 洋一 (SAKATA, Yoichi)
東京農業大学生命科学部・教授
研究者番号: 50277240