

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18563

研究課題名(和文)浸透圧ストレス感知を制御する分子メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analyses of molecular mechanisms that mediate osmotic stress perception

研究代表者

高橋 史憲(Takahashi, Fuminori)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：00462698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：浸透圧ストレス応答は、乾燥などの様々な環境ストレスの初期応答として、重要なストレス感知メカニズムである。浸透圧ストレスは、キー酵素であるリン酸化タンパク質SnRK2を活性化する。その後、植物の環境応答の要として重要な植物ホルモン、アブシジン酸(ABA)の合成を促し、耐性付与を導く。しかし、その浸透圧ストレスの感受機構は全く明らかになっていない。本研究では、SnRK2の活性を制御する低分子ペプチドに着目し、浸透圧応答に重要な初期の感受機構、とくに、細胞間シグナルを介した浸透圧ストレスの初期応答に関わるペプチドシグナルの解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Osmotic stress responses are important mechanisms of early stress perception for adapting abiotic stress conditions including drought stress. One of the protein kinases, SnRK2, is a key phosphorylation enzyme, and activated by osmotic stress conditions. This activation leads to the accumulation of one of the important phytohormone, abscisic acid (ABA), and the acquisition of stress resistance in planta. However, there remain unclear the perception mechanism of osmotic stress conditions. In this study, we focused on one of the small peptides mediating the activation of SnRK2 protein kinase. We analyzed the perception mechanisms of early osmotic stress conditions. Especially we elucidated the peptide signaling mediating cell-to-cell communications in response to early osmotic stress responses.

研究分野：植物の環境ストレス応答機構の解明

キーワード：環境応答 植物ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

浸透圧ストレス応答は、乾燥や塩ストレスの初期応答として、細胞間シグナルを介して、ストレスシグナルを素早く全身に伝達するストレス感受シグナルとして働く。このシグナルは、葉の維管束柔組織で多く作られるアブシジン酸 (ABA) 合成を促す (文献)。しかし、植物はどのように浸透圧ストレスを感受し、維管束柔組織での ABA 合成を促しているのかは、全く分かっていない。

一方、植物ホルモンの ABA は、植物の環境応答の要として重要な物質である。我々は、これまでにこの ABA によるシグナル伝達機構を解析し、ABA 合成に重要な役割を果たすキナーゼ *NCED3* 遺伝子の同定と機能解析を行った (文献)。またサブクラス III に属する SnRK2 リン酸化タンパク質が、ABA シグナルを制御する仕組みをリン酸化プロテオーム技術などを用いて明らかにしてきた (文献)。

## 2. 研究の目的

浸透圧ストレスを感受し、ABA 合成を促す初期応答のメカニズムは、今まで全く解析されていない。近年、サブクラス I, II, III の SnRK2 が *NCED3* の発現制御に関わることが報告されたが (文献)、浸透圧ストレスの感知、および SnRK2 の活性化に関わるキナーゼは、全く同定できていない。本研究では、浸透圧依存的に細胞外に放出される低分子ペプチドに着目し、ペプチドシグナルによる浸透圧ストレスの感知メカニズムを詳細に解析することを試みた。

## 3. 研究の方法

浸透圧で活性化する SnRK2 は 10 遺伝子あり、3 つのサブクラスに分類される。植物体に合成ペプチドを外から加え SnRK2 の活性化を解析する。SnRK2 が活性化される場合、ペプチドは浸透圧ストレス感知の初期応答シグナルとして SnRK2 を制御していると考えられる。ペプチドと SnRK2 の相互作用、またはハブ因子を介した複合体形成の可能性を検討する。またペプチドシグナルは ABA の蓄積も制御すると考えられる。ペプチド処理に依存した ABA の蓄積量や、ABA が引き起こす気孔の開鎖、蒸散量の変化も解析する。これらの研究を通して、ペプチドによる SnRK2 活性化を介した浸透圧ストレス制御機構を解析し、浸透圧ストレス感知を制御する分子メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

まずはじめに、ペプチドによる SnRK2 タンパク質の活性化制御に関して研究を進めた。ペプチドの RNAi 抑制変異体を作成し、浸透圧ストレス時の SnRK2 の活性化に関して、ゲル内リン酸化法を用いて解析を行った。SnRK2 は浸透圧処理後 1 分から 10 分以内の早い段階で、タンパク質のリン酸化を介した活

性化がおこる。しかし、ペプチド抑制変異体を用いた解析から、この早い SnRK2 の活性化が抑制されていることを明らかにした。この結果は、標的ペプチドが SnRK2 の上流で機能していることを示すだけでなく、細胞内でおこる素早いリン酸化シグナル伝達系も制御していることを示す重要な結果を得たことになる。一方、SnRK2 は 10 遺伝子からなるファミリーを形成し、サブクラス I と II が浸透圧応答、サブクラス III が ABA 応答に関わることが示されている。今回の実験から、ペプチドは全ての SnRK2 の活性を制御することが示唆されたことから、ペプチド-SnRK2 モジュールは、細胞内での浸透圧応答における、非常に初期で上流の制御因子群であるという重要な知見となる結果を得ることに成功した。

次にペプチドに結合する相互作用因子の解析を行った。はじめにペプチドと SnRK2 との結合を検証したが、両者の直接的な結合作用を見いだすことはできなかった。そこでハブ因子を介したペプチドとの相互作用に関して、研究を進めていくこととした。In silico データ解析を行い、候補タンパク質の絞り込みを行った。その結果、候補遺伝子を約 30 遺伝子に絞り込むことに成功した。その後、SALK institute から候補遺伝子の遺伝子破壊植物体の種子を取り寄せ、single および double mutants ライブラリーを作成した。このライブラリーを用いて、ペプチドおよび SnRK2 タンパク質が制御する下流マーカー遺伝子の発現変動を指標にすることで、相互作用因子のスクリーニングを行うこととした。マーカー遺伝子は、ABA 処理誘導性遺伝子群の中から代表となる 3 遺伝子に着目し、発現解析を行った。その結果、1 つの double mutant は乾燥ストレス処理において、マーカー遺伝子の発現が顕著に低下していることを明らかにした。これはこの mutant の原因となる 2 遺伝子が、ペプチド-SnRK2 シグナル伝達系に関与していることを示唆する。この 2 遺伝子は受容体キナーゼであることからペプチド-受容体-SnRK2 複合体を形成すると考えられる。

また、ペプチドのプロモーター領域と GUS タンパク質を融合させた形質転換植物の解析から、ペプチドは根や葉の維管束柔組織で主に発現していることを明らかにした。これはペプチドがストレス依存的に細胞外に放出され、根から市丈夫に移動しやすい組織で機能している可能性を示唆する。これらの研究を通して、ペプチドによる SnRK2 活性化を介した浸透圧ストレス制御機構を解析し、浸透圧ストレス感知を制御する分子メカニズムの一端を明らかにすることに成功した。

## <引用文献>

Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Shinozaki K, Nakazono M,

Kamiya Y, Koshihara T, Nambara E.  
Drought induction of Arabidopsis  
9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs  
in vascular parenchyma cells  
Plant Physiology, 147(4), 2008, 1984-1993

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto  
M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y,  
Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.  
Regulation of drought tolerance by gene  
manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid  
dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid  
biosynthesis in *Arabidopsis*  
Plant Journal, 27(4), 2001, 325-333

Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M,  
Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki  
K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K.  
Type 2C protein phosphatases directly  
regulate abscisic acid-activated protein  
kinases in *Arabidopsis*  
Proc Natl Acad Sci USA, 106(41), 2009,  
17588-17593

Umezawa T, Sugiyama N, Takahashi F,  
Anderson JC, Ishihama Y, Peck SC,  
Shinozaki K.  
Genetics and phosphoproteomics reveal a  
protein phosphorylation network in the  
abscisic acid signaling pathway in  
*Arabidopsis thaliana*  
Science Signaling, 6(270), 2013, rs8

Fujii H, Verslues PE, Zhu JK.  
*Arabidopsis* decuple mutant reveals the  
importance of SnRK2 kinases in osmotic  
stress responses *in vivo*  
Proc Natl Acad Sci USA, 108(4), 2011,  
1717-1722

## 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 9 件)

\*高橋史憲、鈴木健裕、刑部祐里子、別役  
重之、近藤侑貴、堂前直、福田祐穂、篠  
崎和子、\*篠崎一雄

A small peptide modulates stomatal  
control via abscisic acid in  
long-distance signalling  
*Nature*, 査読有、vol.556、2018、  
pp.235-238  
doi: 10.1038/s41586-018-0009-2

Selvaraj Michael Gomez、石崎琢巳、  
Valencia Milton、小川諭志、Dedicova  
Beata、小賀田拓也、吉原今日子、圓山恭  
之進、草野都、齊藤和季、高橋史憲、篠  
崎一雄、中島一雄、\*石谷学

Overexpression of an *Arabidopsis*  
*thaliana* galactinol synthase gene  
improves drought tolerance in  
transgenic rice and increased grain  
yield in the field  
*Plant Biotechnology Journal*, 査読有、  
Vol.15 (11)、2017、1465-1477  
doi: 10.1111/pbi.12731

森本恭子、大濱直彦、城所聡、溝井順哉、  
高橋史憲、戸高大輔、最上惇郎、佐藤輝、  
Qin Feng、Kim June-Sik、深尾陽一朗、  
藤原正幸、篠崎一雄、\*篠崎和子  
BPM-CUL3 E3 ligase modulates  
thermotolerance by facilitating  
negative regulatory domain-mediated  
degradation of DREB2A in *Arabidopsis*  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有、Vol.114  
(40)、2017、E8528-E8536  
doi: 10.1073/pnas.1704189114

城所聡、米田考志、高崎寛則、高橋史憲、  
篠崎一雄、\*篠崎和子  
Different cold-signaling pathways  
function in the responses to rapid and  
gradual decreases in temperature  
*The Plant Cell*, 査読有、Vol.29 (4)、  
2017、pp.760-774  
doi: 10.1105/tpc.16.00669

相馬史幸、最上惇郎、吉田拓也、阿部倉  
緑、高橋史憲、城所聡、溝井順哉、篠崎  
一雄、\*篠崎和子  
ABA-unresponsive SnRK2 protein  
kinases regulate mRNA decay under  
osmotic stress in plants  
*Nature Plants*, 査読有、Vol.3、2017、  
16204  
doi: 10.1038/nplants.2016.204

大濱直彦、草壁和也、溝井順哉、Zhao  
Huimei、城所聡、小泉慎也、高橋史憲、  
石田哲也、柳澤修一、篠崎一雄、\*篠崎和  
子  
The transcriptional cascade in the  
heat stress response of *Arabidopsis* is  
strictly regulated at the level of  
transcription factor expression  
*The Plant Cell*, 査読有、Vol.28 (1)、  
2016、181-201  
doi: 10.1105/tpc.15.00435

高崎寛則、圓山恭之進、高橋史憲、藤田  
美紀、吉田拓也、中島一雄、明賀史純、  
豊岡公德、篠崎和子、\*篠崎一雄  
SNAC-As, stress-responsive NAC  
transcription factors, mediate  
ABA-inducible leaf senescence  
*The Plant Journal*, 査読有、Vol.84(6)  
2015、1114-1123

doi: 10.1111/tpj.13067

\* 高橋史憲、Tilbrook Joanne、Trittermann Christine、Berger Bettina、Roy J. Stuart、関原明、篠崎一雄、\*Tester Mark

Comparison of leaf sheath transcriptome profiles with physiological traits of bread wheat cultivars under salinity stress  
*PLoS One*, 査読有、Vol.10(8) 2015、e0133322  
doi: 10.1371/journal.pone.0133322

最上惇郎、藤田泰成、吉田拓也、月居住史、中神弘史、野村有子、藤原徹、西田翔、柳澤修一、石田哲也、高橋史憲、森本恭子、城所聡、溝井順哉、篠崎一雄、\*篠崎和子

Two distinct families of protein kinases are required for plant growth under high external  $Mg^{2+}$  concentrations in *Arabidopsis*  
*Plant Physiology*, 査読有、Vol.167(3) 2015、1039-1057  
doi: 10.1104/pp.114.249870

[学会発表](計 30 件)

高橋史憲、鈴木健裕、刑部祐里子、別役重之、堂前直、福田裕穂、篠崎和子、篠崎一雄

乾燥ストレスにおける気孔の応答に関わるペプチドの解析

第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

石川慎之祐、高橋史憲、Maria Barrero J.、中神弘史、Gubler F.、篠崎一雄、梅澤泰史

オオムギ休眠種子および後熟種子の比較リン酸化プロテオーム解析

第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

佐藤裕太、最上惇郎、相馬史幸、佐藤花繪、高橋史憲、篠崎一雄、篠崎和子

シロイヌナズナにおいて SnRK2 タンパク質キナーゼの活性化を仲介する上流制御因子の探索

第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

相馬史幸、最上惇郎、高橋史憲、佐藤裕太、篠崎一雄、篠崎和子

シロイヌナズナにおける mRNA デキャッピング活性化因子 VCS を制御する上流キナーゼの探索

第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

原百合絵、石川慎之祐、天谷安奈、桑原真由里、高橋史憲、水門佐保、杉山直幸、石濱泰、竹澤大輔、坂田洋一、篠崎一雄、梅澤泰史

ヒメツリガネゴケのアブシシン酸応答変異体を用いたリン酸化プロテオーム解析

第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

溝井順哉、金澤夏美、秦峰、城所聡、高橋史憲、篠崎一雄、篠崎和子

シロイヌナズナのストレス応答性転写因子 DREB2A の環境条件依存的リン酸化を介した分解制御

第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

高橋史憲、鈴木健裕、刑部祐里子、別役重之、堂前直、福田裕穂、篠崎和子、篠崎一雄。

A small peptide mediates dehydration stress responses in long-distance signaling

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology、2018 年 1 月 Tahoe City (USA)

高橋史憲、Selvaraj Michael Gomez、石崎琢巳、Valencia Milton、小川諭志、Dedicova Beata、小賀田拓也、吉原今日子、圓山恭之進、草野都、斉藤和季、中島一雄、石谷学、篠崎一雄、

The rice overexpressed Galactinol Synthase 2 gene improves drought tolerance and grain yield in field

2017 年度農理工学際連携コース発表会、2017 年 12 月、総合研究院ホール(千葉・野田)

高橋史憲、鈴木健裕、刑部祐里子、別役重之、堂前直、福田裕穂、篠崎和子、篠崎一雄

A mobile peptide mediates dehydration

stress responses in long-distance signaling

IGER International Symposium on Long-distance Signaling in Plants、2017年11月、坂田・平田ホール(愛知・名古屋)

#### 高橋史憲

干ばつに強い稲の実証栽培に成功  
アグリビジネス創出フェア 2017、2017年10月、東京ビックサイト(東京・江東区)

溝井順哉、金澤夏美、秦峰、城所聡、高橋史憲、篠崎一雄、篠崎和子  
シロイヌナズナのストレス応答性転写因子 DREB2A の翻訳後調節におけるリン酸化の解析  
日本植物学会第81回大会、2017年9月、東京理科大学(千葉・野田)

石川慎之祐、高橋史憲、水門佐保、Maria Barrero J.、中神弘史、Gubler F.、篠崎一雄、梅澤泰史

オオムギ休眠種子および後熟種子の比較リン酸化プロテオーム解析  
日本植物学会第81回大会、2017年9月、東京理科大学(千葉・野田)

高橋史憲、鈴木健裕、刑部祐里子、別役重之、堂前直、福田裕穂、篠崎和子、篠崎一雄  
植物がもつ、乾燥ストレスの感知メカニズム  
アグリバイオ公開シンポジウム、2017年7月、東京理科大学葛飾キャンパス図書館ホール(東京・葛飾)

高橋史憲、別役重之、福田裕穂、篠崎和子、篠崎一雄  
Analysis of stomatal controls under drought stress responses  
Plant Biology 2017、2017年6月、Hawaii (USA)

#### 高橋史憲

Identification of a small peptide mediating drought stress responses

第58回日本植物生理学会年会、2017年3月、鹿児島大学(鹿児島・鹿児島)

相馬史幸、最上惇郎、吉田拓也、阿部倉緑、高橋史憲、城所聡、溝井順哉、篠崎一雄、篠崎和子  
浸透圧ストレス下におけるアブシシン酸非応答性 SnRK2 を介した mRNA 分解制御  
第58回日本植物生理学会年会、2017年3月、鹿児島大学(鹿児島・鹿児島)

城所聡、米田孝志、高崎寛則、高橋史憲、篠崎一雄、篠崎和子  
シロイヌナズナの低温応答における CAMTA ファミリー転写因子の機能解析  
第58回日本植物生理学会年会、2017年3月、鹿児島大学(鹿児島・鹿児島)

金澤夏美、溝井順哉、高橋史憲、篠崎一雄、篠崎和子  
ストレス応答性転写因子 DREB2A におけるリン酸化に関する解析  
第58回日本植物生理学会年会、2017年3月、鹿児島大学(鹿児島・鹿児島)

大濱直彦、草壁和也、溝井順哉、趙美、城所聡、小泉慎也、高橋史憲、篠崎一雄、篠崎和子  
植物の高温ストレス応答の初期で働く転写因子 HsfA1 の活性抑制機構の解析  
第58回日本植物生理学会年会、2017年3月、鹿児島大学(鹿児島・鹿児島)

佐藤花繪、最上惇郎、相馬史幸、高橋史憲、篠崎一雄、篠崎和子  
シロイヌナズナにおけるプロテインキナーゼ SnRK2 を介した浸透圧ストレス応答を制御する新規相互作用因子の探索  
第58回日本植物生理学会年会、2017年3月、鹿児島大学(鹿児島・鹿児島)

②① 高橋史憲  
Abscisic acid-mediated stomatal responses via small peptide in Arabidopsis  
Cold Spring Harbor Asia、2016年11月、淡路夢舞台(兵庫・淡路)

②② 高橋史憲、Tilbrook Joanne、Trittermann Christine、Berger Bettina、Roy J. Stuart、関原明、篠崎一雄、Tester Mark  
Comparison of leaf sheath transcriptome profiles with physiological traits of bread wheat cultivars under salinity stress  
第57回日本植物生理学会年会、2016年3月、岩手大学(岩手・盛岡)

②③ 高崎寛則、圓山恭之進、高橋史憲、藤田

美紀、吉田拓也、中島一雄、明賀史純、豊岡公德、篠崎和子、篠崎一雄  
ストレス誘導性 NAC 型転写因子 SNAX-As はアブシジン酸(ABA)による葉の老化を制御する  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月、岩手大学(岩手・盛岡)

②4 相馬史幸、最上惇郎、吉田拓也、阿部倉緑、高橋史憲、溝口昌秀、梅澤泰史、城所聡、溝井順哉、篠崎一雄、篠崎和子  
シロイヌナズナにおけるサブクラス I SnRK2 の機能解析  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月、岩手大学(岩手・盛岡)

②5 大濱直彦、草壁和也、溝井順哉、趙美、城所聡、小泉慎也、高橋史憲、石田哲也、柳澤修一、篠崎一雄、篠崎和子  
植物の高温ストレス応答の初期で働く転写因子 HsfA1 の活性制御機構の解析  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月、岩手大学(岩手・盛岡)

②6 廣谷美咲、吉村亮、野元美佳、高橋史憲、多田安臣、梅澤泰史  
Functional analysis of MAP kinase cascade in ABA signaling  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月、岩手大学(岩手・盛岡)

②7 石川慎之祐、高橋史憲、水門佐保、Jose Maria Barrero、Frank Gubler、梅澤泰史  
オオムギの休眠種子および後熟種子のリン酸化プロテオーム解析  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月、岩手大学(岩手・盛岡)

②8 小林孝博、久保佑太、樋尾隼平、溝口剛、Alexander Graf、高橋史憲、篠崎一雄、白須賢、市村和也  
Two U-box ubiquitin ligases positively contribute to MAMP-responsive MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 pathway in *Arabidopsis*  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月、岩手大学(岩手・盛岡)

②9 氷室泰代、石山賀奈子、高橋史憲、田中翔太、中野雄司、小林正智、篠崎一雄  
Effect of FPX on callus induction, regeneration and transformation in *Brachypodium*  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月、岩手大学(岩手・盛岡)

③0 高橋史憲、Tilbrook Joanne、Trittermann Christine、Berger Bettina、Roy J. Stuart、関原明、篠崎一雄、Tester Mark

Correlation of Leaf Sheath Transcriptome Profiles with Physiological Traits of Bread Wheat Cultivars Under Salinity Stress  
Plant Biology 2015、2015 年 7 月、Minneapolis (USA)

〔図書〕(計 4 件)

高橋史憲、篠崎一雄  
ニュートンプレス  
植物が乾燥を防ごうとするしくみを解明!  
2018、1

高橋史憲  
フジサンケイビジネスアイ  
乾燥に強くなる植物ペプチドを発見  
2018、1

高橋史憲、篠崎一雄  
大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 ライフサイエンス統合データベースセンター  
乾燥ストレス応答において根から葉への長距離のシグナル伝達にかかわるペプチドはアブシジン酸を介して気孔の開閉を制御する  
2018、4

浦野薫、圓山恭之進、高橋史憲、篠崎一雄  
Elsevier  
Encyclopedia of Applied Plant Science : Second Edition、Water Relations of Plants : Drought stress  
2016、8-15

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: METHOD FOR INCREASING RESISTANCE TO DEHYDRATION STRESS OF A PLAN  
発明者: 高橋史憲、篠崎一雄  
権利者: 国立研究開発法人理化学研究所  
種類: 特許  
番号: 62274856  
出願年月日: 平成 28 年 1 月 5 日  
国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等  
<http://genediscovery.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 史憲 (TAKAHASHI, Fuminori)  
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員  
研究者番号: 00462698