

平成30年12月17日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18652

研究課題名(和文) 乾燥および高温ストレスによる転写因子の安定化機構の種横断的解析

研究課題名(英文) Interspecific analysis of stabilization mechanism of a transcription factor in response to drought and heat stresses

研究代表者

溝井 順哉 (Mizoi, Junya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20469753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのDREB2Aは、脱水および高温ストレスに応答した遺伝子発現制御において重要な転写因子である。DREB2Aタンパク質は通常は速やかに分解されるが、ストレス下では安定化し、下流遺伝子の発現を活性化させる。しかしながら、ストレスに応じたDREB2Aの安定性制御メカニズムは明らかになっていなかった。

本研究では、DREB2Aの安定性がストレス依存的なリン酸化状態の変化によって制御されることを見出した。リン酸化される配列の類似性と機能的保存性から、同様の機構が他の植物でも機能していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DREB2A is a transcription factor that plays important roles in response to drought and heat stresses in Arabidopsis. While DREB2A is rapidly degraded under normal conditions, it is stabilized in response to these stresses to activate expression of downstream stress-responsive genes. However, the mechanism underlying the conditional changes of DREB2A stability in response to stresses remains to be elucidated.

In this study, we found that stress-dependent change of DREB2A phosphorylation enables stability regulation according to environmental changes. As an important sequence motif for phosphorylation is functionally conserved among angiosperms, similar regulatory mechanisms is expected to function in other angiosperms.

研究分野：植物科学

キーワード：植物 非生物ストレス応答 高温ストレス 転写因子 翻訳後制御 リン酸化 プロテインキナーゼ 安定性制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 乾燥や高温のストレスは、植物の生存を脅かし、生産を著しく低下させる環境要因である。環境破壊や気候変動によって、作物がこのようなストレスを受ける頻度は高まっている。一方、シーケンス技術や育種技術が急速に発達していることから、植物のストレス耐性メカニズムの解明を実際の育種に生かすことができる環境が整ってきている。植物のストレス耐性メカニズムにおいて、遺伝子発現の変化は重要なステップであり、シロイヌナズナ、イネ、ダイズにおいては、乾燥や高温のストレスに応答して数千の遺伝子の発現が誘導される(文献)。このとき、発現誘導を担っているのがストレス応答性の転写因子であり、これらの転写因子が活性化されることが、初期応答の重要な反応である。例えば乾燥や高温への応答では、AREB/ABF 転写因子群の ABA に応答したリン酸化制御、HSF 転写因子群の HSP90 による核移行制御がそれぞれ明らかになっている(文献)。

(2) DREB2 型転写因子は陸上植物で保存された転写因子で、シロイヌナズナの DREB2A は、乾燥、高温の両方に応答した遺伝子発現応答で、重要な機能を担っていることが明らかになっている。過去および申請者らの研究で、DREB2A は通常の条件下で安定性が極めて低いこと、DREB2A 内に存在する負の活性調節領域(NRD, Negative Regulatory Domain)が、DREB2A の分解を促進していること、乾燥または高温のストレスを受けることで安定性が上昇して核内に蓄積すること、このような蓄積量の上昇が下流遺伝子誘導にとって重要であることが明らかになった(文献)。一方で、申請者らは、イネやダイズにおける DREB2 型転写因子を単離・解析し、これらの植物においても DREB2A オルソログが乾燥、高温の両ストレス下で機能していることを明らかにしている(文献)。ストレスによる DREB2A オルソログの安定化が植物間で保存された重要なステップである可能性が示唆される一方、このようなストレスに応答した安定化がどのようなメカニズムで起こっているのかは全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) NRD による DREB2A タンパク質の分解促進の分子機構を明らかにする。さらに、ストレスによりこの分解系が制御されるメカニズムを明らかにし、上流の解明につなげる。

(2) NRD 以外のドメインが DREB2A タンパク質の分解に関わっている可能性を検証する。また、見出したドメインがストレスによる安定化に参与する可能性を検討する。

(3) 以上で見出した安定性制御メカニズム

が、他の植物でも機能するかどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) DREB2A のオルソログの配列を収集して配列を比較し、保存されているドメインやモチーフを見出した。保存されているドメインを欠失した DREB2A 断片、保存されているモチーフに点突然変異を加えた変異型 DREB2A を作出し、一過的発現系を用いて活性や安定性を比較した。また、これらの DREB2A 断片や変異型 DREB2A を発現する形質転換シロイヌナズナを作出し、通常条件下およびストレス条件下での導入した DREB2A タンパク質の安定性や下流遺伝子の発現を調べた。さらに、これらの形質転換シロイヌナズナの表現型についても解析した。

(2) 以上の解析から NRD がリン酸化されている可能性が見いだされたため、通常条件下およびストレス条件下における野生型 DREB2A および上述の変異型 DREB2A について、リン酸化レベルを解析した。また DREB2A のリン酸化についての知見を得るために、全長 DREB2A および DRE2A の断片を基質とし、シロイヌナズナの核タンパク質による *in vitro* リン酸化系を用い、リン酸化部位を決定した。また、プロテインキナーゼ阻害剤を用い、DREB2A をリン酸化するプロテインキナーゼの絞り込みを行った。

4. 研究成果

(1) DREB2A オルソログの配列を比較した結果、DNA 結合ドメイン以外にも、保存されたモチーフが存在していることが明らかになった。NRD に相当する部分では、Ser/Thr のクラスターおよび酸性アミノ酸を含む親水性配列が保存されていた。この保存配列を欠いた変異型 DREB2A について、一過的発現系や形質転換体を用いて解析した結果、この保存配列が NRD の機能にとって重要であることが明らかになった。そこで、このクラスター内のアミノ酸残基に点突然変異を導入し、これらの変異型 DREB2A についても一過的発現系や形質転換体を用いた解析を行った結果、特に Ser/Thr のクラスターに同時に変異を導入したときに効果が大きく、Ala 置換では DREB2A タンパク質の安定性が上昇し、形質転換体においては下流遺伝子の発現が活性化して、高温ストレス耐性が向上した。一方、Asp 置換では DREB2A タンパク質の安定性はあまり上昇せず、形質転換体においては下流遺伝子の発現も野生型 DREB2A を発現した場合と同様に維持されて、高温耐性の向上も見られなかった。以上の結果から DREB2A の NRD に依存した安定性制御においては、保存された Ser/Thr クラスター配列が重要であることが示された。さらに、これらの Ser/Thr がリン酸化されている可能性が示された。

(2) DREB2A がリン酸化されている可能性につ

て検証するため、in vivo でのリン酸化レベルを調べた。その結果、DREB2A は通常時はリン酸化されていること、前述の Ser/Thr クラスターがリン酸化に重要であることが示された。またプロテアソーム阻害剤を用いた実験から、DREB2A はリン酸化により不安定化させる可能性が見いだされた。実際に、invitro 実験系において、DREB2A はリン酸化されることが示され、さらに質量分析計を用いた解析の結果、NRD 内のいくつかの Ser/Thr がリン酸化サイトとして同定された。プロテインキナーゼ阻害剤を用いた解析から DREB2A はカゼインキナーゼ 1 (CK1) によってリン酸化されることが示唆された。さらに、植物体への CK1 の選択的阻害剤処理により DREB2A のリン酸化が阻害され、DREB2A の安定性が向上した。したがって、NRD におけるリン酸化が DREB2A の分解を促進していることが示唆された。

(3) ストレス条件下での DREB2A のリン酸化レベルを調べた結果、高温時に蓄積する DREB2A は非リン酸化型であることが明らかになった。以上の結果から、高温ストレス下では DREB2A のリン酸化レベルが低下し、その結果、リン酸化に依存した分解が機能しなくなって DREB2A が安定化して蓄積するという安定性制御メカニズムの存在が示唆された。

(4) 保存配列を欠いた DREB2A 断片の解析から、NRD 以外の複数の保存配列が通常時の DREB2A の分解に関わっていることが示唆された。また、高温ストレス下では上述の NRD のリン酸化を介した分解系だけでなく、別の保存配列を介した分解系も不活性化される可能性が見いだされた。DREB2A のストレスに応答した安定化には NRD を介した制御系を含む複数の経路が関与していると考えられる。

(5) これまで、通常時は不安定な DREB2A がストレスシグナルを受けて安定化する機構は不明であった。本研究により、NRD はリン酸化レベルに依存して条件的に分解制御できる配列であること、高温ストレスのシグナルは NRD のリン酸化レベルの低下という形で DREB2A に伝わって安定化させることが明らかになった。今回 DREB2A のリン酸化に関わるプロテインキナーゼについて手掛かりが得られたことから、今後、ストレスによって NRD のリン酸化レベルが低下する機構についての解明が進み、高温ストレスの受容や伝達に関わる初期応答の上流機構の解明につながると期待される。

(6) 一方で、NRD を介した制御系を含む複数の経路が DREB2A の安定性制御に関与していることも示唆された。今後これらの制御系が細胞内のどのような変化にそれぞれ応答しているのかを明らかにしていくことで、植物

がストレスシグナルをどのように感じ、統合しているかを明らかにする研究につながると期待される。

(7) NRD 内のリン酸化配列は被子植物内で保存されており、実際にダイズ等でもこの配列が DREB2A の分解を促進することを明らかにしている。したがって、本研究で得られた知見は、被子植物一般に適用できると考えられ、例えばリン酸化部位をターゲットにしたゲノム編集等により、作物のストレス耐性を向上できる可能性がある。

< 引用文献 >

Maruyama, K., Todaka, D., Mizoi, J., Yoshida, T., Kidokoro, S., Matsukura, S., Takasaki, H., Sakurai, T., Yamamoto, Y. Y., Yoshiwara, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. *DNA Res* 19, 37-49

Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal* 61, 672-685

Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J. M., Seki, M., Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schöffl, F., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol Genet Genomics* 286, 321-332

Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L.-S. P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Fujita, M., Umezawa, T., Sawano, Y., Miyazono, K., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2008) Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 20, 1693-1707

Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 1292-1309

Morimoto, K., Mizoi, J., Qin, F., Kim, J.-S., Sato, H., Osakabe, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) Stabilization of Arabidopsis DREB2A Is

Required but Not Sufficient for the Induction of Target Genes under Conditions of Stress. PLOS ONE 8, e80457

Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. Mol Genet Genomics 283, 185-196

Mizoi, J., Ohori, T., Moriwaki, T., Kidokoro, S., Todaka, D., Maruyama, K., Kusakabe, K., Osakabe, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) GmDREB2A;2, a Canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-Type Transcription Factor in Soybean, Is Posttranslationally Regulated and Mediates -Dependent Gene Expression. Plant Physiology 161, 346-361

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Mizoi J, Kanazawa N, Kidokoro S, Takahashi F, Qin F, Morimoto K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Heat-induced inhibition of phosphorylation of the stress-protective transcription factor DREB2A promotes thermotolerance of *Arabidopsis thaliana*. J Biol. Chem. doi: 10.1074/jbc.RA118.002662. 査読有

Morimoto K, Ohama N, Kidokoro S, Mizoi J, Takahashi F, Todaka D, Mogami J, Sato H, Qin F, Kim JS, Fukao Y, Fujiwara M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2017) BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 114:E8528-E8536. doi: 10.1073/pnas.1704189114. 査読有

Sato H, Todaka D, Kudo M, Mizoi J, Kidokoro S, Zhao Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2016) The Arabidopsis transcriptional regulator DPB3-1 enhances heat stress tolerance without growth retardation in rice. Plant Biotechnol J. 14:1756-67. doi: 10.1111/pbi.12535. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

溝井順哉他、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

亀井葉子他、ストレス応答性転写因子

DREB2A の複数経路による安定性制御機構の解析、第59回日本植物生理学会年会、2018

溝井順哉他、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

溝井順哉他、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制御、第58回日本植物生理学会年会、2017

金澤夏美他、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

Junya Mizoi et al., Functional analysis of the negative regulatory domain in the post-translational regulation of the AP2/ERF-type transcription factor DREB2A in Arabidopsis. CSHA meeting 2016: Latest Advances in Plant Development & Environmental Response, 2016

溝井順哉他、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可能性、第57回日本植物生理学会年会、2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

溝井 順哉 (MIZOI, Junya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科

・准教授

研究者番号：20469753