

令和元年6月17日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07412

研究課題名(和文) 過酷環境下での植物の生存を支えるアブシジン酸シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism regulating abscisic acid signaling which supports plant survival under harsh conditions

研究代表者

藤田 泰成 (Fujita, Yasunari)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・主任研究員

研究者番号：00446395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、過酷環境下での植物の生存を支えるアブシジン酸(ABA)シグナル伝達制御機構の解析を行った。その結果、1) ABAシグナル伝達系の制御に関係しているPP2Cの役割、2) ダイズのGmERA1AおよびGmERA1Bの乾燥ストレス耐性における役割、3) ABAシグナル伝達系におけるCK2タンパク質リン酸化酵素サブユニットの役割、4) SnRK2タンパク質リン酸化酵素の生育における役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、過酷環境下での植物の生存を支えるアブシジン酸シグナル伝達制御機構の解明を通して、ストレス応答と生育のバランスを担う因子やほかのシグナル経路を統合する因子の役割の一端が明らかになった。また、シロイヌナズナだけでなく、ダイズにおいても、ABAシグナル伝達系を介したストレス応答機構の解明に寄与した。本研究課題の成果を通して、実用的な不良環境耐性作物の作出へ向けた新たな研究基盤の構築に貢献した。

研究成果の概要(英文)：The mechanism regulating abscisic acid signaling plays an important role in plant survival under harsh conditions. Here, we show the role of PP2C involved in ABA/stress signaling pathways, the role of soybean GmERA1A and GmERA1B in drought stress tolerance, the role of subunits of CK2 protein kinase in ABA signaling, and the role of subclass III SnRK2 protein kinases in maintaining the metabolic balance required for Arabidopsis growth under nonstress conditions.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：アブシジン酸 植物 脱リン酸化 遺伝子発現 浸透圧ストレス シグナル伝達 シロイヌナズナ 乾燥ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

干ばつなどの過酷環境下における作物生産性は、植物の浸透圧ストレス応答に密接に関わっている。干ばつなどのストレス時に、植物の浸透圧ストレス応答の引き金となっているアブシジン酸 (ABA) の細胞内濃度が上昇し、受容体に認識され、2C 型脱リン酸化酵素 (PP2C) を介して SnRK2 タンパク質リン酸化酵素やその下流の転写因子 AREB などが活性化される。その結果、ストレス応答遺伝子群が発現し、ストレスに対して応答反応が誘導されることが示されてきた。しかしながら、これまでに明らかにされてきた ABA シグナル伝達系を介したストレス応答に関する研究は、主にシロイヌナズナで進められてきたが、そのほかの植物種における知見は限られている。また、PP2C や SnRK2 の機能も十分に解明できていない点があり、他のシグナル伝達系との関連因子についても不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、過酷環境下での植物の生存を支える ABA シグナル伝達制御機構の解明を目的として、1) ABA シグナル伝達系の制御に関係している PP2C の役割、2) ダイズの GmERA1A および GmERA1B の乾燥ストレス耐性における役割、3) ABA シグナル伝達系における CK2 タンパク質リン酸化酵素サブユニットの役割、4) SnRK2 タンパク質リン酸化酵素の生育における役割について解析を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナとダイズを材料として、遺伝子欠損変異体やウイルスベクター法、プロトプラストを用いた一過的遺伝子発現系、トランスクリプトーム・メタボローム解析技術などを用いて、分子遺伝学的解析、生化学的解析を行った。

4. 研究成果

1) ABA シグナル伝達系の制御に関係している PP2C の役割

ABA シグナル伝達系の制御に関係している PP2C の大腸菌発現タンパク質を用いて、さまざまな濃度の ABA 存在下で *in vitro* の脱リン酸化解析を行い、脱リン酸化能の比較を行った。また、これらのタグ付き大腸菌発現タンパク質を用いて、プルダウンアッセイを行い、PYL1-ABA-PP2C 複合体形成能の比較を行った。これらの結果から、PP2C の脱リン酸化能および ABA 受容体複合体形成能における差が、過酷環境下での PP2C の機能において重要な役割を果たしていることが示唆された。また、超深度顕微鏡やサーモグラフィーを用いて、ABA や日周変化が多重変異体の気孔閉鎖に及ぼす影響を解析した。さらに、さまざまな条件で試験を行い、乾燥ストレスなどの環境変化における変異体の表現型の解析を行った。これら一連の変異体解析の結果から、過酷な環境下での PP2C の生理機能の違いを明らかにした。また、PP2C の多重変異体を用いて、ストレスの種類や強度を変えたさまざまな条件下で RNAseq 解析を行い、過酷環境下での生存に機能する新規の遺伝子群動態を明らかにした。これらの結果から、ABA シグナル伝達系の制御に関係している PP2C の役割の違いについて明らかにした。

2) ダイズの GmERA1A および GmERA1B の乾燥ストレス耐性における役割

シロイヌナズナだけでなく、ダイズにおいても、ABA シグナル伝達機構が過酷環境下での生存にどのように関わっているかを調べるために、PP2C の関与する ABA シグナル伝達経路で働くダイズの GmERA1A と GmERA1B 遺伝子を同定した。ウイルスベクターにより GmERA1A および GmERA1B 遺伝子の発現を抑制したダイズは、葉の水分消失やしおれが抑えられ、ABA 誘導性の気孔閉鎖の感受性が高まった。これらの結果から、GmERA1A および GmERA1B は、ダイズの ABA シグナル伝達系の負の制御因子であり、乾燥ストレス耐性において重要な役割を果たしていることを示した。

3) ABA シグナル伝達系における CK2 タンパク質リン酸化酵素サブユニットの役割

乾燥ストレス応答に関与している PP2C の下流で働く CK2 は、植物が生きていくためには必要なタンパク質リン酸化酵素である。CK2 は、過酷環境下のストレス応答において ABA シグナ

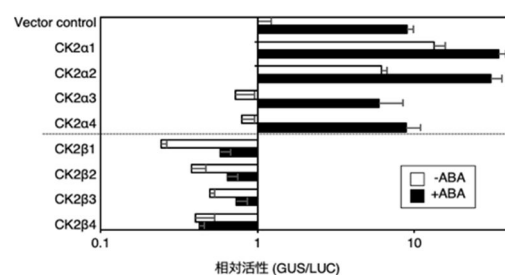


図1. 各CK2サブユニットのABRE配列依存性転写活性化能の解析
CK2α1、CK2α2は、ABAの有無に関わらずABRE配列による転写を活性化する。一方、4個のCK2βは全て ABRE配列による転写を抑制する。8種類あるCK2の各サブユニットを発現するエフェクタープラスミドに加えて、ABRE配列を含むプロモーターをGUSレポーター遺伝子につないだレポータープラスミドとカリフラワーモザイクウイルス35SにLUCレポーター遺伝子につないだ内部発現標準化用プラスミドを用いて、シロイヌナズナ葉肉細胞を用いた一過的発現解析を行なった。-ABAと+ABAは、ABA非添加および2 μM ABA添加区を示す。レポーター活性は、GUS/LUCの値で示し、ベクターコントロールのABA非添加の相対活性の基準値1として示す。(n = 4, Bar = SD)

ル伝達系に関与していることが示されてきたが、CK2 のそれぞれのサブユニットが ABA シグナル伝達系においてどのような役割を果たしているかは、よくわかっていなかった。本研究では、多くの ABA 誘導性遺伝子の転写活性化に必要なシス因子である ABRE 配列をもつレポーター遺伝子を用いたプロトプラストの一過的遺伝子発現系の解析などから、CK2 の 2 つのサブユニット と は、ABA シグナルをそれぞれ正と負に制御することを示した (図 1)。また、ABA 応答遺伝子発現において、CK2 を介した新規経路が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、CK2 が、ストレスのない条件において、ハウスキープング遺伝子として、植物の定常状態の生育に関与していることを示した。これらの結果から、CK2 は、既知の ABA 依存的なシグナル経路と新規の ABA 非依存的なシグナル経路を統合し、ストレス耐性や生育とのバランスを担う因子である可能性が示唆された。

4) SnRK2 タンパク質リン酸化酵素の生育における役割

過酷環境下で重要な役割を果たすサブクラス III SnRK2 タンパク質リン酸化酵素は、非ストレス時においても遺伝子発現がみられる。また、サブクラス III SnRK2 の三重欠損変異体では、非ストレス時に、野生型シロイヌナズナに比べて、生育がよくなる傾向がみられた。これらの知見から、非ストレス時においても、サブクラス III SnRK2 が何らかの役割を果たしていることが示唆された。そこで、サブクラス III SnRK2 の非ストレス時における役割を調べるために、サブクラス III SnRK2 の三重変異体を用いてメタボローム解析とトランスクリプトーム解析を行った。その結果、サブクラス III SnRK2 は、非ストレス時においても、糖代謝に加えて TCA 回路を介した有機酸やアミノ酸の代謝に関与していることが示された。これらの結果から、サブクラス III SnRK2 が、過酷環境下だけでなく非ストレス感受時においても、ストレス応答と生育のバランスを担う重要な鍵因子である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- 1 Ogata, T., Nagatoshi, Y., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., Fujita, Y. Virus-induced down-regulation of GmERA1A and GmERA1B genes enhances the stomatal response to abscisic acid and drought resistance in soybean, PLoS ONE, 12, 2017, e0175650. DOI: 10.1371/journal.pone.0175650 (査読有)
- 2 Nagatoshi, Y., Fujita, M., Fujita, Y. Casein kinase 2 and subunits inversely modulate ABA signal output in Arabidopsis protoplasts. Planta, 248(3), 2018, 571-578. DOI: 10.1007/s00425-018-2919-5 (査読有)
- 3 Nagatoshi, Y., Fujita, Y. Protein kinase CK2 subunits constitutively activate ABA signaling in Arabidopsis. Plant Signal. Behav. 13(11), 2018, e1525998. DOI: 10.1080/15592324.2018.1525998 (査読有)
- 4 Shinya, T., Yasuda, S., Hyodo, K., Tani, R., Hojo, Y., Fujiwara, Y., Hiruma, K., Ishizaki, T., Fujita, Y., Saijo, Y., Galis, I. Integration of danger signals with herbivore-associated molecular pattern signaling amplifies anti-herbivore defense responses in rice. Plant J. 94(4), 2018, 626-637. DOI: 10.1111/tpj.13883 (査読有)
- 5 Yoshida, T., Obata, T., Feil, R., Lunn, J.E., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fernie, A.R. The role of ABA signaling in the maintenance of the metabolic balances required for Arabidopsis growth in non-stressed conditions. Plant Cell, 31(1), 2019, 84-105. DOI: 10.1105/tpc.18.00766 (査読有)

[学会発表](計 15 件)

- 1 Fujita, Y. Signal transduction and drought stress tolerance in crops. FFTC Seminar on Advanced Breeding Methods for Stress-tolerant Food Crops, 2016 Nov. 24-25, Tsukuba, Japan (国際学会)
- 2 藤田泰成 植物の環境ストレス応答出力を最適化する負の制御メカニズム、第 39 回分子生物学会年会 シンポジウム「ネガティブレギュロノミクスで解き明かす植物の生存戦略」、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜 (招待講演)
- 3 小賀田拓也、永利友佳理、山岸紀子、吉川信幸、藤田泰成 リンゴ小球潜在ウイルスによる VIGS 法を用いたダイズ乾燥ストレス耐性制御遺伝子の機能解析。第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜
- 4 小賀田拓也、永利友佳理、山岸紀子、吉川信幸、藤田泰成 VIGS を用いた乾燥ストレス応答に関わるダイズ GmERA1 遺伝子の機能解析。第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月

16-18日、鹿児島

- 5 Ogata, T., Nagatoshi, Y., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., Fujita, Y. Virus-induced down-regulation of GmERA1 genes enhances the stomatal response to abscisic acid and drought resistance in soybean. Plant Biology 2017, 2017 Jun. 24-28, Honolulu, Hawaii, USA. (国際学会)
- 6 Nagatoshi, Y., Ogata, T., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., Fujita, Y. Virus-induced down-regulation of GmERA1A and GmERA1B genes enhances the stomatal response to abscisic acid and drought resistance in soybean. World Soybean Research Conference Ten, 2017 Sep. 10-15, Savannah, Georgia, USA. (国際学会)
- 7 永利友佳理、藤田泰成 ABA シグナル伝達系における Casein kinase II の役割、第 35 回日本植物細胞分子生物学会大会、2017 年 8 月 29-31 日、さいたま
- 8 小賀田拓也、藤田泰成 シロイヌナズナの高温耐性に関する新規因子 HTS1 の同定、第 35 回日本植物細胞分子生物学会大会、2017 年 8 月 29-31 日、さいたま
- 9 Fujita, Y., Ogata, T., Ishizaki, T., Xu, D., Nagatoshi, Y., Maruyama, K., Suenaga, K., Nakashima, K., Urao, T. Molecular biological evaluation of crops transformed with environmental stress tolerance genes. International Workshop on Development of Drought-Tolerant Crops for Developing Countries and Future Prospects, 2017 Nov 29, Tsukuba Japan (国際学会)
- 10 小賀田拓也、藤田泰成 シロイヌナズナの新規因子 HTS1 は高温耐性に関する、第 59 回日本植物生理学会、2018 年 3 月 28-30 日、札幌
- 11 Fuji, M., Tani, R., Yasuda, S., Kobae, Y., Ishizaki, T., Fujita, Y., Sato, Y., Saijo, Y. Damage-associated Plant Elicitor Peptides promote both plant growth and stress responses in rice. 第 59 回日本植物生理学会、2018 年 3 月 28-30 日、札幌
- 12 小林安文、藤田泰成 Na⁺ compartmentalization related to salinity stress tolerance in quinoa seedlings、第 59 回日本植物生理学会、2018 年 3 月 28-30 日、札幌
- 13 藤田美紀、浦野薫、七夕高也、菊池沙安、藤田泰成、豊島真実、篠崎一雄 自動フェノタイプングシステム "RIPPS" を用いた環境ストレス応答解析、第 59 回日本植物生理学会、2018 年 3 月 28-30 日、札幌
- 14 永利友佳理、藤田美紀、藤田泰成 Casein Kinase 2 の 2 つのサブユニット と は、ABA シグナルを逆に制御する、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 28-30 日、横浜
- 15 永利友佳理、藤田美紀、藤田泰成 Protein kinase CK2 の 2 つのサブユニット と は ABA シグナルを逆に制御する、第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年 3 月 13-15 日、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小賀田拓也、永利友佳理、吉田拓也、藤田美紀

ローマ字氏名：Takuya Ogata, Yukari Nagatoshi, Takuya Yoshida, Miki Fujita

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。