

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H05996・19K21140

研究課題名(和文)植物の塩・乾燥ストレスシグナル経路に介在する機能未知タンパク質CBL5の機能解明

研究課題名(英文)Deciphering the role of CBL5, a protein with unknown function involved in salt and drought stress signaling in plants.

研究代表者

齋藤 俊也(Saito, Shunya)

東北大学・工学研究科・学術研究員

研究者番号：00825226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCBL5の機能を見出すため、下記の2つの実験を行った。
動物細胞に陰イオンチャネルSLAC1・CBL5・CIPK11キナーゼを共発現させLC-MS/MSによりリン酸化を検出した。その結果CBL5-CIPK11はSLAC1の既知リン酸化サイト(S59, S120)とは異なる部位に特異的なリン酸化ターゲットを持つことが示唆された。
cb11, 5, 9三重遺伝子欠損植物の表現型を観察したところ、野生株と比較して気孔の応答に変化が見られた。これはcb11, 9二重欠損株やcb15単一欠損株では見られなかったため、CBL5がCBL1・CBL9と共に気孔開度調節に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CBL5は植物の塩・乾燥耐性において重要なタンパク質とされつつもその機能が明らかになっていなかった。本研究により、その機能の一端を解明することに成功した。これにより植物の環境ストレス耐性応答の複雑な分子機構や、カルシウムイオンが関わる生体内分子シグナリングの全貌解明に一步近づくことができた。また、塩害・乾燥地域でも生育できるような環境ストレス耐性強化作物創成へ向けた指針がまた一つ得られたと言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed the following two experiments to elucidate the function of CBL5.

(1) Anion channel SLAC1, CBL5, and CIPK11 kinase were co-expressed in animal cells, and phosphorylation site of SLAC1 was determined by LC-MS/MS. The obtained results suggest that CBL5-CIPK11 has a specific phosphorylation target other than S59 and S120, well-known SLAC1 phosphorylation sites from previous studies.

(2) Phenotypic observation of cb11, cb15, and cb19 triple knock out plants showed altered stomatal responses compared with wild-type plants. This was not observed in cb11 cb19 double or cb15 single knock out plants, suggesting that CBL5 contributes to the regulation of stomatal opening together with CBL1 and CBL9.

研究分野：応用生物物理化学

キーワード：イオンチャネル 植物 リン酸化酵素 膜タンパク質 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

現在、世界の農地の 5 分の 1 が乾燥・塩害により使用できない状況にあり、将来的な人口増加に伴う食糧不足に対応するため、作物の塩・乾燥ストレス耐性の向上や生産性の向上が求められている (NatResour Forum. 2014)。塩濃度が高い環境下では植物体内に Na^+ が蓄積し、細胞周辺の浸透圧が上昇することにより細胞の脱水を招く。これを防ぐため、植物は根の Na^+/H^+ 対抗輸送体 SOS1 や液胞の Na^+ 輸送体 NHX、篩管の Na^+ 輸送体 HKT1 を活性化させ、 Na^+ の排出や液胞内への格納を行う。乾燥ストレス下では孔辺細胞の Cl^- 輸送体 SLAC1 が活性化することにより浸透圧が調整され気孔の閉鎖が行われる (図 1)。また、植物が正常なアミノ酸合成を行うためには光合成による炭素源の合成と根から吸収した NO_3^- などの窒素源のバランスが重要であり、このバランスを保つために光合成の状況に応じた根の NO_3^- 輸送体の活性調節が行われる。以上のように、植物の塩・乾燥ストレス耐性の発現や栄養源のバランス確保は各種イオン輸送体の活性調節によって行われているが、この活性調節を行うタンパク質の同定や調節の分子機構に関する研究はまだ発展途上である。近年、 Ca^{2+} センサータンパク質 CBL と、CBL 相互作用型キナーゼ CIPK がこれらの輸送体の制御を幅広く行うことが明らかになってきた (Genes. 2016)。シロイヌナズナには 10 種類の CBL と 26 種類の CIPK が存在し特異的な相互作用ネットワークを構築している。この 2 つのタンパク質の組み合わせは 260 通りにもおよび、これまでに CBL4-CIPK24 が SOS1 を、CBL1-CIPK23 が SLAC1 およびそのホモログである根の NO_3^- 輸送体 SLAH2, SLAH3 をリン酸化し制御していることが判明している (PNAS, 2002; Sci Signal. 2014; Plant Cell, 2014)。そのような中 CBL5 に関しては、過剰発現により塩・乾燥・浸透圧ストレスが高まることが報告されている (Mol Cell. 2010)。このことから CBL5 はストレス耐性の発現において重要な機能を担うことが示唆されているが、制御対象となる輸送体や植物体における具体的な機能は明らかになっていなかった。

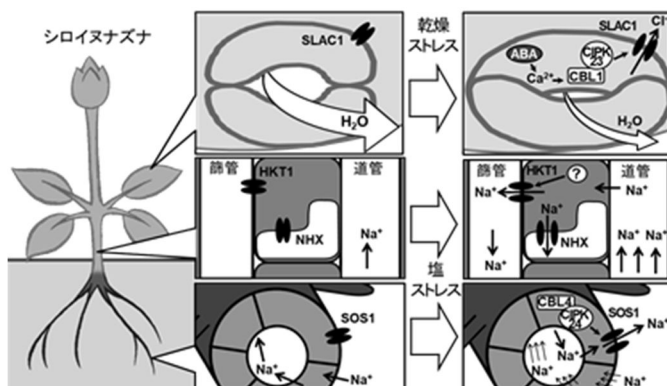


図1 植物の塩・乾燥ストレス耐性発現の分子機構

乾燥ストレス下では孔辺細胞の Cl^- 輸送体 SLAC1 が活性化することにより浸透圧が調整され気孔の閉鎖が行われる (図 1)。また、植物が正常なアミノ酸合成を行うためには光合成による炭素源の合成と根から吸収した NO_3^- などの窒素源のバランスが重要であり、このバランスを保つために光合成の状況に応じた根の NO_3^- 輸送体の活性調節が行われる。以上のように、植物の塩・乾燥ストレス耐性の発現や栄養源のバランス確保は各種イオン輸送体の活性調節によって行われているが、この活性調節を行うタンパク質の同定や調節の分子機構に関する研究はまだ発展途上である。近年、 Ca^{2+} センサータンパク質 CBL と、CBL 相互作用型キナーゼ CIPK がこれらの輸送体の制御を幅広く行うことが明らかになってきた (Genes. 2016)。シロイヌナズナには 10 種類の CBL と 26 種類の CIPK が存在し特異的な相互作用ネットワークを構築している。この 2 つのタンパク質の組み合わせは 260 通りにもおよび、これまでに CBL4-CIPK24 が SOS1 を、CBL1-CIPK23 が SLAC1 およびそのホモログである根の NO_3^- 輸送体 SLAH2, SLAH3 をリン酸化し制御していることが判明している (PNAS, 2002; Sci Signal. 2014; Plant Cell, 2014)。そのような中 CBL5 に関しては、過剰発現により塩・乾燥・浸透圧ストレスが高まることが報告されている (Mol Cell. 2010)。このことから CBL5 はストレス耐性の発現において重要な機能を担うことが示唆されているが、制御対象となる輸送体や植物体における具体的な機能は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

申請者によるこれまでの研究で、CBL5-CIPK11 はアフリカツメガエル卵母細胞系で SLAC1 を活性化することが明らかになったが、実際の植物体内では CBL5 は別の輸送体の制御を行う可能性が高い (New Phytol. 2018)。CBL5-CIPK11 が SLAC1 を活性化したことから、CBL5 は SLAC1 ホモログの SLAH2 や SLAH3 の活性化能力も持つと予想される。また、予備実験にて CBL5 は Na^+ 輸送体 HKT1 と同じ篩管に発現していることを明らかにしている。以前より HKT1 は Ca^{2+} によるシグナリング調節の可能性が示されていることから (Plant Physiol. 2004)、CBL5 が HKT1 の活性を制御している可能性が高い。さらに、CBL1 と CBL9, CBL2 と CBL3 は植物内において互いの機能を相補している可能性があり (Cell, 2006; Cell Res. 2012)、CBL5 もそのような役割を担っている可能性がある。以上の背景に基づいて、CBL5-CIPK による HKT1 と SLAH の機能調節の検出、および植物における CBL5 の機能の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においては当初、図 2 において示された年次計画に従い下記の (1) ~ (4) の計画を遂行する予定であった。

(1) CBL5-CIPK による HKT1 の活性調節 予備実験の結果から、CBL5 は CIPK 全 26 種類のうち CIPK1, 5, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 24, 26 と相互作用する。これら全ての組み合わせの CBL5-CIPK に対して、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理測定により HKT1 に対する活性制御の有無を明らかにする。また、HKT1 において CBL5-CIPK によるリン酸化部位と予想されるアミノ酸残基に対し、アミノ酸置換による疑似リン酸化・脱リン酸化変異を加えた HKT1

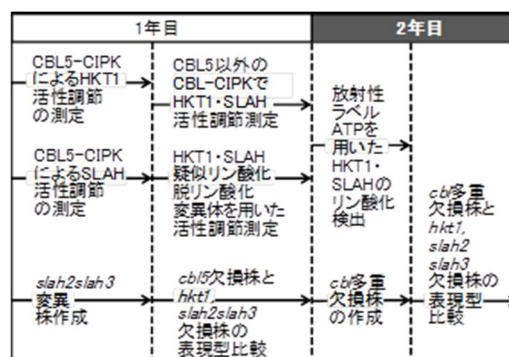


図2 本研究における年次計画(当初)

変異体を準備し、これらの変異体について電気生理測定および放射線ラベル ATP を用いたリン酸化アッセイにより HKT1 のリン酸化部位を同定する。

(2)CBL5-CIPK による SLAH2・SLAH3 の活性調節 項目(1)にて記載した CBL5-CIPK の組み合わせを用い、電気生理測定により SLAH2・SLAH3 に対する活性制御の有無を明らかにする。また、項目(1)と同様に SLAH の疑似リン酸化・脱リン酸化変異体を用いたリン酸化部位の同定を行う。

(3)他の CBL と CBL5 の機能重複性 項目(1)(2)に記載された 11 種類の CIPK のうち、いくつかは他の CBL と相互作用することが報告されている(Genes. 2016)。(1)(2)において活性調節が見られた CBL5-CIPK の組み合わせに対して、CBL5 以外の 9 種類の CBL を用いて電気生理測定を行い、活性調節が CBL5 に特異的か否かを明らかにする。

(4)CBL5 の植物体における機能 項目(1)(2)の結果を踏まえ、*cbl5* 遺伝子欠損植物に対し塩耐性試験を行い、*hkt1* 欠損株と表現型を比較する。また、*cbl5* 欠損株に対し低窒素条件下での育成および道管内の NO₃-濃度の測定を行い、結果を *slah2* 欠損株および *slah3* 欠損株と比較する。SLAH2・SLAH3 については機能が重複している可能性を考え、*slah2 slah3* 二重欠損株を人工授粉により作成する。さらに(3)の結果を踏まえ、CBL5 と機能の重複する CBL を欠損させた *cbl* 多重変異株を人工授粉により作成し、これら多重変異株について上記と同様の実験を行う。

4. 研究成果

(1)CBL5-CIPK による HKT1・SLAH2・SLAH3 の活性調節の有無 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理測定の結果、CBL5-CIPK の全組み合わせ(11 種)のうち、複数の組み合わせが HKT1・SLAH2・SLAH3 の活性制御を行うことが明らかとなった。また、当初想定していた候補のイオンチャンネル以外にも、K⁺チャンネル KAT1・KAT2 が CBL5-CIPK により活性制御を受けることが判明した。

(2)CBL5-CIPK11 による SLAC1 の特異的リン酸化部位の同定 CBL5-CIPK により活性制御されたイオンチャンネルに対し、リン酸化部位の候補残基に疑似リン酸化・脱リン酸化変異を加えたチャンネルで電気生理測定を行った。その結果 CBL5-CIPK は、いずれのチャンネルに対しても、既知のリン酸化部位とは異なる部位をターゲットとしていることがわかったが、リン酸化部位の特定までには至らなかった。そこで、手法を LC-

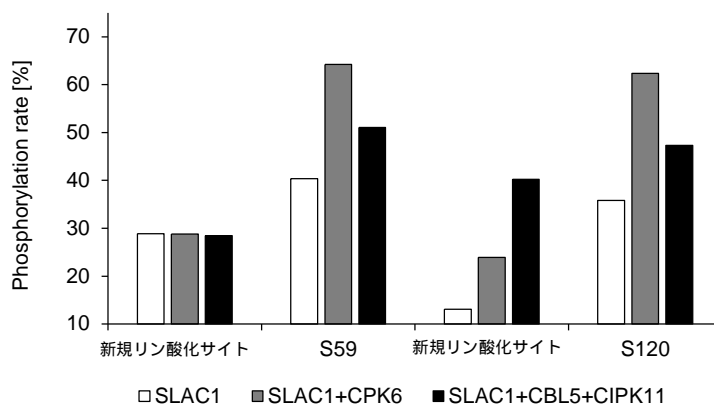


図3 CBL5-CIPK11 による SLAC1 の特異的リン酸化部位

MS/MS によるリン酸化部位検出に切り替え、まずは SLAC1 に対する CBL5-CIPK11 のリン酸化部位を検出した。その結果、既知のリン酸化サイト(Ser59, Ser120)とは異なるアミノ酸残基のリン酸化レベルが増加していたことから、その部位が CBL5-CIPK11 による特異的なリン酸化部位であることが示唆された(図 3)。他のチャンネルに関しては、本年度中に解析を行うことは叶わなかったものの、今後同様の実験手法での解析を行っていく予定である。

(3)他の CBL と CBL5 の機能重複性 (1)で活性調節が見られた CBL5-CIPK の組み合わせに対して、CBL5 の代わりに他の CBL を用いても同様の現象が見られるかを確かめた。その結果、は CBL5 の代わりに CBL1, 4, 9 を用いても同様のイオンチャンネル活性制御が起こることが判明した。このことから、CBL5 は CBL1, 4, 9 と少なくとも一部重複した機能を持つことが示唆された。

(4)*cbl5* 遺伝子欠損植物の表現型について *cbl5* 遺伝子欠損植物に対し塩耐性試験および低窒素条件下での育成を試みたが、野生型と異なる表現型は観測されなかった。(3)の結果より、CBL5 は CBL1, 4, 9 と重複した機能を持つ可能性が高いことから、*cbl5* 遺伝子欠損植物においては CBL5 の働きを他の 3 つの CBL が相補していることが考えられる。そこで、*cbl1, 4, 5, 9* の四重遺伝子欠損植物の作製を試みた。その過程で得られた *cbl1, 5, 9* 三重遺伝子欠損植物に関して、野生株と比較して気孔の応答に変化が見られた。この表現型は *cbl1, 9* 二重欠損株や *cbl5* 単一欠損株では見られなかったことから、CBL5 が CBL1・CBL9 とともに気孔開度の調節に寄与していることが示唆された。*cbl* 四重欠損植物に関しては CRISPR-Cas9 システムによる変異導入時にトラブルが生じ、期間中に完成させることはできなかったが、今後あらためて作製し表現型の評価を行う予定である。また、*slah2 slah3* 二重欠損植物については人工授粉が完了し、現在ホモ遺伝子欠損体の選抜中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shunya Saito and Nobuyuki Uozumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Guard Cell Membrane Anion Transport Systems and Their Regulatory Components: An Elaborate Mechanism Controlling Stress-Induced Stomatal Closure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 9(1-17)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants8010009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shunya Saito and Nobuyuki Uozumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 44(1-11)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shunya Saito and Nobuyuki Uozumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Guard Cell Membrane Anion Transport Systems and Their Regulatory Components: An Elaborate Mechanism Controlling Stress-Induced Stomatal Closure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 9(1-17)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants8010009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shunya Saito and Nobuyuki Uozumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 44(1-11)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shunya Saito, Misaki Sato, Shin Hamamoto, Philipp Koster, Jorg Kudla, and Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 Multiple CBL-CIPK pairs regulate Arabidopsis guard cell ion channels
3. 学会等名 International Workshop on Plant Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunya Saito, Misaki Sato, Shin Hamamoto, Philipp Koster, Jorg Kudla, and Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 Multiple CBL-CIPK pairs regulate Arabidopsis guard cell ion channels
3. 学会等名 International Workshop on Plant Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunya Saito, Shin Hamamoto, Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 Dual lipidation on Ca ²⁺ -dependent kinases governs SLAC1-mediated stomatal closure
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------