

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580125

研究課題名（和文） 植物受容体様タンパク質による環境ストレス応答機構の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis of environmental stress response mechanism mediated by plant receptor-like proteins

研究代表者

刑部 祐里子 (OSAKABE YURIKO)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・研究員

研究者番号：50444071

研究成果の概要（和文）：

受容体型キナーゼ RPK1 過剰発現植物が高い乾燥耐性および酸化ストレス耐性能を持つことを示した。RPK1 は複合的なストレス環境など、自然の複雑な環境条件下での植物の適応反応に機能することが示唆された。さらに、システインリッチリピート (CRR) 受容体型キナーゼ CRK36 が、植物の浸透圧ストレスおよびアブシジン酸応答を負に制御を行う新規因子であることを示した。CRK36 は細胞質型キナーゼ ARCK1 と受容体複合体を形成して下流のシグナル伝達を制御し、ストレス下における光合成の制御を行うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Overproduction of a receptor-like kinase (RLK), RPK1, in the transgenic *Arabidopsis* plants enhanced tolerance to drought and oxidative stresses. Our data suggested that RPK1 functions on the adaptive mechanisms to the complex stressful environment. The cysteine-rich repeat RLK, CRK36, is a novel factor, which negatively controls the responses to osmotic stress and abscisic acid. CRK36 forms a receptor complex with a receptor-like cytosolic kinase, ARCK1, and they negatively regulate the expression of ABA-responsive transcription factors, *ABI4* and *ABI5*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：受容体, ストレス, シグナル伝達, ペプチド

1. 研究開始当初の背景

移動の自由が無い植物は、外部環境変化に応じて生長や分化を制御するシステムが発達してきた。細胞膜上において様々な外部環境条件が感受され植物の分化・発達やストレス応答などが制御される。細胞膜局在性受容体タンパク質によって、どのように外部環境が細胞内に伝達され、様々な生理応答が制御されるかは、植物の機能維持やストレス適応戦略に強く関わる。本研究では、乾燥・塩および低温などの水ストレスに対する植物の適応機構を解明する為に、細胞膜局在性の水ストレス応答性受容体型キナーゼに着目し、ストレス条件下での細胞膜における応答反応、個々の因子間の相互作用、シグナル伝達の調節機構について明らかにすることを目的とした。

受容体型キナーゼ (*RLK*) 遺伝子はシロイヌナズナゲノム中で 600 以上のメンバーからなる遺伝子ファミリーを形成しているが、その機能が明らかになった例は少ない。その中でも、細胞外にロイシンリッチリピート (LRR) ドメインをもつ RLK (LRR-RLK) が、植物の生長、分化、環境応答などに重要な分泌性の低分子ペプチドの受容体として機能することが明らかになってきた。

研究代表者等はこれまで、水ストレス条件下において誘導性を示すシロイヌナズナの *RLK* 遺伝子群について解析を行った。LRR-RLK に分類される *RPK1* 遺伝子について解析した結果、*RPK1* 遺伝子が種子休眠、根の伸長成長過程、乾燥などの水ストレス時に重要な植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) による気孔閉鎖、ABA 応答性遺伝子発現の調節等、様々な ABA 応答反応の制御を行うことを示した。しかし

ながら、*RPK1* のシグナル伝達経路の下流因子など、そのシグナル伝達機構の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

これまでの研究から *RPK1* が水分ストレス応答のシグナル伝達因子の一つとして機能すると考えられた。*RPK1* は LRR-RLK に分類されるタンパク質であることから、*RPK1* が水ストレス時に機能するペプチド分子の受容体である可能性が示唆された。そこで本研究は、*RPK1* が役割を持つ水ストレスシグナル伝達経路について、その分子機構の詳細を明らかにすることを目的とした。さらに、細胞膜上での水ストレスシグナル伝達経路の全貌を明らかにすることを目的として、水ストレス時に機能する新規 *RLK* 遺伝子の探索と同定を試みた。

3. 研究の方法

1) *RPK1* タンパク質を高発現する形質転換シロイヌナズナを作成し、水ストレス条件下および ABA 存在下における植物の生長、気孔閉鎖、ストレス耐性などの表現型を解析した。*RPK1* タンパク質高発現植物体を用いてマイクロアレイ解析を行い、*RPK1* シグナル伝達経路の増強により、遺伝子発現が上昇する遺伝子群を明らかにした。*RPK1* と酸化ストレス応答との関わりを明らかにするために、*RPK1* タンパク質高発現植物体および欠変異体を用いて、成熟葉における酸化ストレス下における光合成活性を測定し、酸化ストレス耐性を試験した。活性酸素種 (ROS) 消去能を明らかにするために、*RPK1* タンパク質高発現植物体のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性を測定した。*RPK1* 細胞内キナーゼドメインのストレス応答における機能を明らかにするために、キナーゼ活性に重要なアミノ酸残基に変異を導入し

てキナーゼ不活性型 RPK1 を作出し、そのタンパク質を高発現する形質転換植物体の水ストレスに対する表現型解析を行った。

2) 細胞膜上での水ストレスシグナル伝達経路の全貌を明らかにすることを目的として、新規の水ストレス応答性 RLK 遺伝子の探索を行った。細胞質型 RLK (RLCK) 遺伝子である *ARCK1* の欠失変異体の水ストレスに対する表現型解析を行った。*ARCK1* 受容体複合体の存在を明らかにするために、*ARCK1* と共調して発現する *RLK* 遺伝子を同定し、システインリッチリピート (CRR) RLK である *CRK36* を見だし、その RNAi 植物体および *ARCK1* 変異体との多重変異体の水ストレスに対する表現型およびマイクロアレイ解析を行った。さらに光合成阻害剤であるノルフルラゾンに対する表現型解析を行った。*CRK36* と *ARCK1* の植物細胞内での相互作用および水分ストレス条件下におけるリン酸化反応の制御の有無について解析を行った。

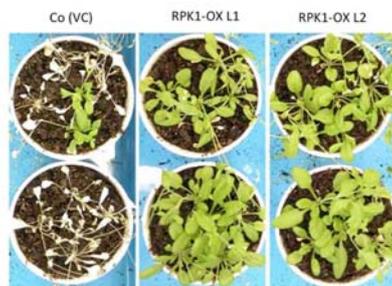


図 1. RPK1 タンパク質高発現シロイヌナズナ (RPK1-OX L1 および L2) の乾燥ストレス耐性. (VC; コントロール植物体)

4. 研究成果

我々は RPK1 タンパク質を高濃度に蓄積する過剰発現植物を作出した。*RPK1* 欠失植物体は乾燥ストレスに対し弱い一方で、RPK1 高発現植物はストレス耐性が向上していることが明らかになった(図 1)。RPK1 高発現植物は、ABA への感受性が上昇し、気孔の閉

鎖が素早く起こっていることで、植物体内の水分の損失を防いでいた。以上のことは、植物細胞中に高濃度に存在する RPK1 タンパク質が関与する情報伝達の増強が行われ、ストレスシグナルが下流因子に強く伝達されたことによるものと考えられた。RPK1 高発現植物を用いたマイクロアレイ解析の結果、多数のストレス耐性獲得に機能すると考えられる遺伝子の発現が上昇していた。これらの遺伝子には、生物において様々なストレスなどの二次メッセンジャーとして働く活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) に応答する遺伝子が多数存在していた。キナーゼ不活性型 RPK1 タンパク質の過剰発現植物は以上のような表現型は示さなかった。さらに、RPK1 高発現植物では、ROS 消

去に働く SOD 活性が上昇していた。酸化ストレスは植物の生産性を強く抑制するが、RPK1 高発現植物では酸化ストレスそのものに対して高い耐性能を

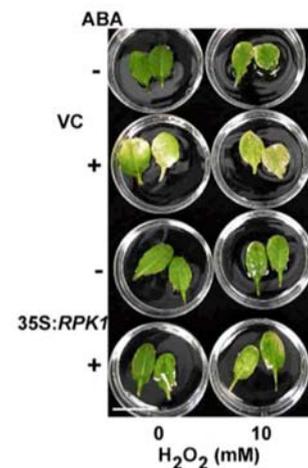


図 2. RPK1 タンパク質高発現シロイヌナズナ (35S:RPK1) の酸化ストレス耐性. ABA の前処理によりコントロール植物は強いストレスを受けるが、RPK1 タンパク質高発現体は耐性を示す. (VC; コントロール植物体)

示した(図 2)。高発現体は酸化ストレスに対して高い光合成活性を維持し耐性能を

示した。ROS は気孔閉鎖における ABA シグナル伝達経路において、二次メッセンジャーとして働くことが知られており、RPK1 は ROS の生成の調節を行うことで乾燥ストレス/ABA シグナル伝達経路に働くことのみなら

ず、実際の自然環境下での、複合的なストレスなど、自然の複雑な環境条件下での植物の適応反応に機能することが示唆された。

ARCK1 および CRK36 変異体を解析した結果、これらの植物が高塩ストレスおよび ABA に対し、高感受性を示すことが明らかになった。さらに、CRK36 は細胞質型 RLK ある ARCK1 と植物細胞内において受容体複合体を形成し、CRK36 が ARCK1 を塩ストレス条件下においてリン酸化することで下流のシグナル伝達を制御し(図 3)、ABA 応答に重要な転写因子 *ABI4* および *ABI5* の発現を制御することが明らかになった。

以上の結果から、CRK36-ARCK1 受容体複合体が、植物の水ストレスおよび ABA 応答に対し新規の負のフィードバック制御を行うことが示唆された。また、*CRK* 遺伝子抑制により、光合成抑制剤ノルフラゾン応答性遺伝子が発現抑制され、*CRK* 抑制体のノルフ

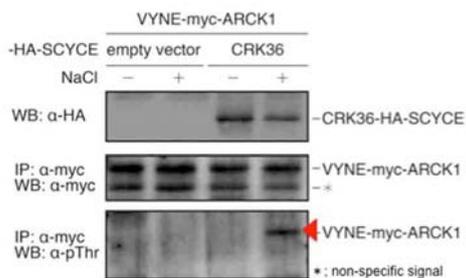


図 3. CRK36 および ARCK1 共発現植物体における、CRK36 存在下での塩ストレス依存的な ARCK1 のリン酸化

ルフラゾン応答も増大した。浸透圧ストレス応答における新規の負のシグナル伝達により、光合成の制御が行われることが明らかとなった。以上の結果より、植物の水ストレス応答を制御する細胞膜からの新規のシグナル伝達経路の存在が明らかとなった。RPK1 や CRK36 シグナル伝達経路を利用することにより、ストレス耐性植物の育種に役立てられる可能性が示された。

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 8 件)

1. Tanaka, H., Osakabe, Y., Katsura, S., Shinji, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Abiotic stress-inducible receptor-like kinases are involved in negative regulation of ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.*, in press. 査読有り

2. Osakabe, Y.*, Kawaoka, A., Nishikubo, N., and Osakabe K*. (2012) Responses to environmental stresses in woody plants; key to survive and longevity. *J. Plant Research*, 125, 1-10. *Corresponding author. 査読有り

3. Yamada, K., Kanai, M., Osakabe, Y., Ohiraki, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) The monosaccharide absorption activity of *Arabidopsis* roots depends on the expressional profiles of transporter genes under high-salinity conditions. *J. Biol. Chem.*, 286, 43577-43586. 査読有り

4. 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., 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. 査読有り

5. Osakabe, Y.*, Kajita, S., Osakabe, K. (2011) Genetic engineering of woody plants; current and future targets in a stressful environment. *Physiologia Plantarum*, 142, 105-117. *Corresponding author 査読有り

6. Osakabe, Y., Mizuno, S., Tanaka, H., Maruyama, K., Osakabe K, Todaka, D., Fujita, Y., Kobayashi M, Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Overproduction of a membrane-bound receptor-like protein kinase1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 285,

9190-9201. 査読有り

7. Osakabe, K. **Osakabe, Y.**, and Toki, S. (2010) Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 12034-12039. 査読有り

8. Kinoshita, A., Betsuyaku, S., **Osakabe, Y.**, Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., and Sawa, S. (2010) RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis. *Development*, 137, 3911-3920. 査読有り

[学会発表] (計 20 件)

1. **刑部祐里子**, 田中秀典, 篠崎一雄, 篠崎和子 (2012) **植物環境応答の調節と受容体型キナーゼシグナリング** 第 5 3 回日本植物生理学会年会, 3 月 16-18 日, 京都. 招待講演
2. 田中秀典, **刑部祐里子**, 桂彰吾, 水野真二, 圓山恭之進, 草壁和也, 溝井順哉, 篠崎一雄, 篠崎和子 (2012) シロイヌナズナの水分ストレス誘導性受容体様キナーゼ遺伝子の機能解析. 第 5 3 回日本植物生理学会年会, 3 月 16-18 日, 京都.
3. 徐劭旭, **刑部祐里子**, 田中秀典, 篠崎一雄, 篠崎和子 (2012) シロイヌナズナのストレス誘導性 K⁺/H⁺ 交換輸送体様遺伝子 *AtKEA5* の機能解析. 第 5 3 回日本植物生理学会年会, 3 月 16-18 日, 京都.
4. 大堀鉄平, 森脇崇, 溝井順哉, 城所聡, 渡邊慶太郎, 圓山恭之進, **刑部祐里子**, 篠崎一雄, 篠崎和子 (2012) *DAIS* の環境ストレス応答に関する *DREB2A* 相同遺伝子の機能解析. 第 5 3 回日本植物生理学会年会, 3 月 16-18 日, 京都.
5. 佐藤輝, 溝井順哉, 田中秀典, 圓山恭之進, 秦峰, **刑部祐里子**, 篠崎一雄, 篠崎和子 (2012) シロイヌナズナにおいて乾燥・高温ストレス誘導性遺伝子発現を制御する転写因子 *DREB2A* の新規相互作用因子 *NF-YC10* の機能解析. 第 5 3 回日本植物生理学会年会, 3 月 16-18 日, 京都.
6. 大開暖香, 黒森崇, **刑部祐里子**, 山田晃嗣, 桂彰吾, 長町啓太, 篠崎一雄, 篠崎和子 (2012) シロイヌナズナ ABC トランスポーター G サブファミリーの遺伝子機能解析. 第 5 3 回日本植物生理学会年会, 3 月 16-18 日,

京都.

7. **刑部祐里子**, 桂彰吾, 有永直子, 長町啓太, 田中秀典, 山田晃嗣, Seo Souk, 安保充, 吉村悦郎, 篠崎一雄, 篠崎和子 (2012) シロイヌナズナにおけるカリウムトランスポーター KUP6 を介した浸透圧ストレス応答と成長制御 第 5 3 回日本植物生理学会年会, 3 月 16-18 日, 京都

8. **Osakabe, Y.**, Katsura, S., Arinaga, N., Nagamachi, K., Tanaka, H., Yamada, K., Seo, S., Abo, M., Yoshimura, E., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) Control mechanism of osmotic stress response and plant growth by potassium transporter in *Arabidopsis*. 4th International Workshop on Plant Abiotic Stress: From Systems Biology To Sustainable Agriculture, Nov. 18-19, Limassol, Cyprus.

9. Satoh, H., Mizoi, J., Tanaka, H., Qin, F., **Osakabe, Y.**, Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) Analysis of an interactor with the transcription factor DREB2A regulating water- and heat-stress-inducible gene expression in *Arabidopsis*. 4th International Workshop on Plant Abiotic Stress: From Systems Biology To Sustainable Agriculture, Nov. 18-19, Limassol, Cyprus.

10. **刑部祐里子**, 田中秀典, 篠崎一雄, 篠崎和子 (2011) 植物の受容体型キナーゼによる環境ストレス応答と化学制御第 84 回日本生化学会大会, 9 月 23 日, 京都, 招待講演.

11. Tanaka, H., **Osakabe, Y.**, Katsura, S., Mizuno, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) Functional analysis of abiotic stress-inducible genes encoding receptor-like kinases in *Arabidopsis*. 12th International Symposium on Plant Protein Phosphorylation, Sep 14-16, Tübingen, Germany.

12. Todaka, D., Nakashima, K., Ito, Y., Maruyama, K., **Osakabe, Y.**, Fujita, Y., Matsukura, S., Yoshiwara, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) Functional analysis of a rice PIF transcription factor that functions as a key regulator of internode elongation in response to drought stress. *Plant Biology* 2011, Aug 6-10, Minneapolis, USA.

13. **刑部祐里子**, 田中秀典, 篠崎一雄, 篠崎

和子(2011) 蕨田セミナー「ストレス耐性と受容体型キナーゼシグナル伝達調節」, 7月14日, 東京, 招待講演

14. Tanaka, H., **Osakabe, Y.**, Katsura, S., Mizuno, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Functional analysis of stress-induced receptor-like cytosolic kinase gene in Arabidopsis. Cold Spring Harbor Asia Conference: From Plant Biology to Crop Biotechnology, Oct. 25-29, Suzhou, China.

15. **刑部祐里子** 「植物の受容体型キナーゼによる環境ストレス応答と生長制御」東京理科大学総合研究機構知識インターフェース研究部門講演会, (2010) 代表者: 朽津和幸, 7月14日, 東京理科大, 招待講演

16. **Osakabe, Y.**, Katsura, S., Arinaga, N., Yamada, K., Tanaka, H., Seo, S., Kodaira, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Control mechanism of osmotic stress response and plant growth by potassium transporter in Arabidopsis. The 21st International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010), Jun 6-10, Yokohama, Japan.

17. **刑部祐里子** 「植物の受容体型キナーゼによる環境ストレス応答と生長制御」農芸化学若手セミナー, (2010) 代表者: 村田芳行, 5月7日, 岡山大学, 招待講演

18. 田中秀典、**刑部祐里子**、桂彰吾、水野真二、篠崎一雄、篠崎和子 (2010) シロイヌナズナの水分ストレス誘導性受容体様細胞質型キナーゼ遺伝子の機能解析, 第52回日本植物生理学会年会, 3月20-22日, 宮城

19. 木下温子、別役重之、**刑部祐里子**、篠崎和子、福田裕穂、澤進一郎 (2010) 茎頂分裂組織における CLV3 シグナル受容機構の解析. 第52回日本植物生理学会年会, 3月20-22日, 宮城

20. 田中秀典、**刑部祐里子**、桂彰吾、水野真二、篠崎一雄、篠崎和子 (2009) シロイヌナズナの水分ストレス誘導性受容体様細胞質型キナーゼ遺伝子の機能解析, 第32回分子生物学会年会, 12月9-12日, 横浜

[図書] (計2件)

1. 刑部敬史、**刑部祐里子**、土岐精一「高等植物において特定の遺伝子だけを標的として破壊する技術」化学と生物 (2011) 9,

592-594.

2. 刑部敬史、**刑部祐里子**、土岐精一「人工制限酵素を利用した高等植物における標的遺伝子特異的改変技術の開発」バイオインダストリー (2011) 6, 53-57.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

刑部 祐里子 (OSAKABE YURIKO)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・研究員

研究者番号: 50444071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし