

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570058

研究課題名(和文)植物における光シグナルと環境ストレス応答のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between light signaling and environmental stress responses in plants

研究代表者

坂田 洋一 (Sakata, Yoichi)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50277240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)シグナル伝達を負に制御する脱リン酸化酵素PP2Cを欠損するヒメツリガネゴケは様々な水分ストレスに対して極めて高い耐性を獲得する。一方、暗黒化において組織の緑色が退色せず、緑色を維持する。ABAシグナル伝達と光環境応答のクロストークを明らかにするため、様々なABA関連の変異株を用いて解析を行った。その結果、ABAが暗黒化における退色を負に制御していることが示された。また、PP2C欠損株では暗黒化でクロロフィル合成が活発に行われるとともに、オートファジー機構にも異常があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Protein phosphatase 2C (PP2C) plays a major role in the negative regulation of signaling pathway for a plant hormone abscisic acid (ABA). Disruption of PP2C genes in the moss *Physcomitrella patens* by gene targeting resulted in acquisition of extreme tolerance to osmotic stresses such as desiccation and freezing. On the other hand, the PP2C disruptant stayed green even after prolonged culture in the dark, while the wild type completely etiolated. To understand the crosstalk between ABA signaling and light signaling in the moss, we performed molecular analysis using various ABA-related mutants of *P. patens*. These analyses indicated that ABA plays a negative role in etiolation of chloroplasts in the dark, and further suggested that chlorophyll biosynthesis pathway is activated in the dark-grown PP2C disruptant and PP2C is involved in autophagy machinery.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ABAシグナル伝達 光シグナル PP2C 環境応答 クロストーク 葉緑体

## 1. 研究開始当初の背景

植物の環境適応機構において光シグナルは重要な役割を果たす。例えば、光発芽種子をもつレタスでは、種子の休眠打破には光シグナルが必須であることはよく知られている。また、植物が一定期間低温にさらされることで凍結耐性能が向上するプロセスを低温馴化と呼ぶが、この低温馴化に光シグナルが必須であることがモデル植物シロイヌナズナにおいて示されている。このように、環境要因としての光シグナルを植物の環境応答機構に統合することは、植物が日々変動する環境変化に適応するために重要であると考えられるが、統合機構の分子レベルの解析はほとんど明らかにされていない。

植物の環境ストレス応答機構には植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)が深く関与している。申請者の現在までの研究から、基部陸上植物であるヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)においても、ABAおよびそのシグナル伝達系が環境ストレス応答に重要な役割を果たしていることが明らかとなり(Komatsu et al., 2009, *Plant Mol Biol*; Khandelwal et al., 2010, *Science*; Tougane et al., 2010, *Plant Physiol*)、ABAシグナル伝達系による植物の環境応答機構が陸上植物共通のシステムであることを提唱するに至った。この研究プロセスにおいて、申請者は、光シグナルとABAシグナルのクロストークを裏付ける興味深い現象を見出した。ABAシグナル伝達系の負の制御因子であるGroup A PP2Cを完全欠損するヒメツリガネゴケ(*ppabil*株)はABAシグナル伝達系が恒常的に活性化されており、脱水耐性能や凍結耐性能が大幅に向上している(Komatsu et al., 2013, *Nature Commun*)。

驚くべきことに、この*ppabil*株は暗黒化で培養しても緑色を維持するという現象が観察された。すなわち、ABAシグナル伝達系が恒常的に活性化されることで、暗黒化においても光シグナルが活性化状態となることが明らかとなった。このことは、光シグナル伝達系の少なくとも一部は、ABAシグナル伝達系クロストークしていることを示している。これらの観察から申請者は、光シグナルとABAシグナルのクロストークが光シグナルと環境応答を統合するシステムとして機能しているとの推察に至った。しかしながら、ヒメツリガネゴケはおろか、最も解析の進んでいるモデル植物であるシロイヌナズナにおいても、光シグナルとABAシグナルの相互作用の分子機構についてはほとんど明らかとなっていない。分子遺伝学的解析ツールが充実しているヒメツリガネゴケにおける光シグナルとABAシグナルのクロストークの発見は、その分子機構解明のブレークスルーとなることを期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、光シグナルとABAシグナル伝

達系を介した環境応答機構のクロストークを研究するモデル系としてヒメツリガネゴケを用い、ABA関連変異体を駆使して、光シグナルとABAシグナルのクロストークの分子機構を明らかにし、植物の環境応答における光シグナル機能の実態に迫る。

## 3. 研究の方法

(1) ABAと光シグナルトークは被子植物の種子においてはある程度の研究データが蓄積されているが、ヒメツリガネゴケではほとんど情報が無い。そこで、始めに本研究室が有するヒメツリガネゴケABA合成欠損体を用いて明暗条件下におけるクロロフィル含量の定量を行った。

(2) 暗黒化で緑色を維持し続けるPP2C欠損株において、明暗応答のシグナル伝達に異常が生じているかを検証するために、暗黒化における光応答性遺伝子の発現制御の解析をRNAゲルブロット法により行った。また、(1)の実験において、PP2C欠損株におけるクロロフィル合成・分解の以上が示唆されたため、クロロフィルの合成および分解に関わる遺伝子の暗黒化での発現制御解析も合わせて行った。

(3) 暗黒化における緑色維持とオートファジーの関係性を調査するため、オートファジー阻害剤である3-methyl-adenine (3-MA)を培地に加えて、暗黒化における反応を調査した。

## 4. 研究成果

(1) 野生型株におけるABAの光応答における効果を調査するため、ABAの存在下で野生型株を暗条件で培養したが、明確な効果は認められなかった。一方、暗条件処理前にABA処理を行った場合は退色が抑制された。このことから、明条件下でABAシグナルが活性化することが明暗応答に重要であることが示唆された。さらに、完全に白色化した細胞は細胞死を起こしていることも明らかとなった。これは、長期間の暗処理は、葉緑体の白色体への変換のみならず、細胞死のプロセスも進んでいることを示していることから、ABAシグナル伝達系を介した光シグナルはより幅広い影響を及ぼしていることが明らかとなった。

ヒメツリガネゴケの明暗応答における内生ABAの役割を明らかにするために、内生ABAを欠損するヒメツリガネゴケの作出を試みた。被子植物のABA合成経路において働くzeaxanthineoxidase (ZEP)遺伝子と高い相同性をもつヒメツリガネゴケ遺伝子(PpZEP1)を相同組換えにより破壊した形質転換株を作出した。GC-MSを用いて形質転換株の内生ABA量を測定したところ、通常生育および浸透圧ストレス条件いずれにおいても内生ABAは検出限界以下であった。このABA合成欠損株および野生型株を暗処理した後にクロロフィルの定量を行った結果、ABA合成欠損株は野生型株と比較して有意

にクロロフィル含量が低下していた。このクロロフィル含量の低下は暗処理期間中の ABA 投与により回復した。以上の結果から、ヒメツリガネゴケの明暗応答に内生 ABA が関与していることが明らかとなった (図 1)。

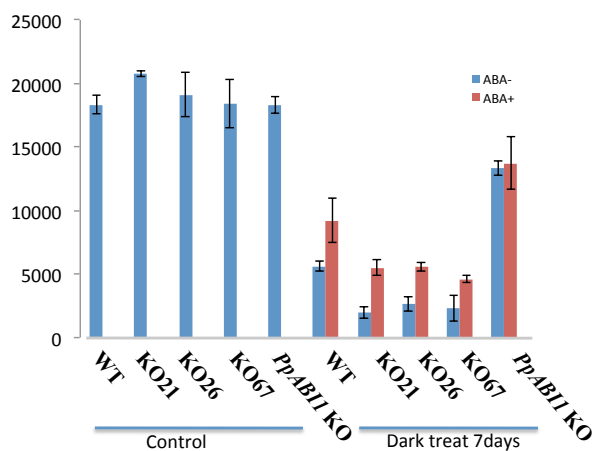


図 1 ヒメツリガネゴケの ABA 関連変異株の明暗条件下におけるクロロフィル含量。KO21, 26, 67; ABA 合成欠損株。PpABI1 KO; *abi1*; PP2C 欠損株

葉緑体機能における ABA の役割を明らかにするために、野生型株に ABA を投与した後に、共焦点蛍光顕微鏡において観察を行った。その結果、野生型株の細胞当たりの葉緑体数は無処理と比較しておよそ 2 倍に増加することが明らかとなった。さらに、ABA シグナル伝達が恒常的に起こっている PP2C 欠損株では、ABA 無処理の状態でも細胞当たりの葉緑体数が野生型株のおよそ 2 倍であった。このことから、ヒメツリガネゴケにおいて ABA は葉緑体の分裂制御に関与していることが示唆された (図 2)。

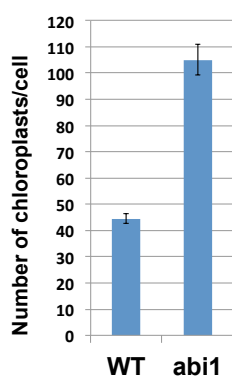


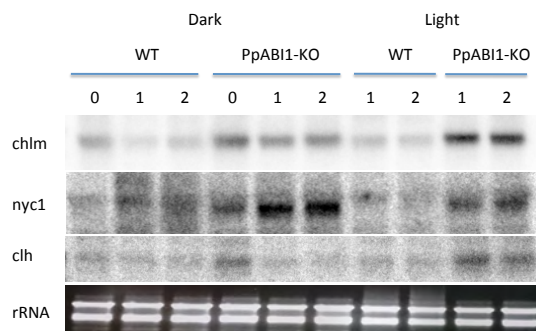
図 2 ヒメツリガネゴケ PP2C 欠損株における 1 細胞当たりの葉緑体数の変化。*abi1*; PP2C 欠損株

(2) ヒメツリガネゴケ PP2C 欠損株の暗黒化における緑色維持機構について、光シグナル伝達経路の異常を疑い、遺伝子発現が明暗により制御される Rubisco サブユニット遺伝子、CAB1 遺伝子の発現を解析した。サーカディアンの影響を避けるため、野生型株およ

び PP2C 欠損株原系体を 48 時間暗黒処理し、経時的にサンプリングを行った。抽出した RNA を用いて RNA ゲルブロット解析を行った。その結果、野生型株と PP2C 欠損株において明所から暗所に応答した遺伝子発現の抑制パターンに変化は観察されなかった。このことは、PP2C 欠損株において光シグナルが恒常的に活性化しているわけではない事を示しており、光合成機能に関連する遺伝子は暗黒化で野生型株と同様の制御を受けていることが示唆された。

上記結果より、ヒメツリガネゴケ PP2C 欠損株の暗黒化における緑色維持機構にはクロロフィルの合成あるいは分解の停止が関与していることが示唆された。そこで、クロロフィル合成・分解の主要経路に位置する遺伝子の発現を上記と同様の条件で解析を行ったが、合成系の遺伝子が暗黒化で活性化されていた (図 3)。一方、分解系で作用するクロロフィラーゼ野生型株と PP2C 欠損株の間に有意な差は観察されなかった。このことからヒメツリガネゴケ PP2C 欠損株の暗黒化における緑色維持機構は、合成系の活性化に起因することが示唆された。

図 3 クロロフィル合成系遺伝子の発現解析



(3) オートファジーは暗所での緑色細胞の白色化に関与していることが報告されている。オートファジーの阻害剤である 3-MA を加えた培地で野生型株および PP2C 欠損株原系体を明所 24 時間処理した後に、暗黒化で培養したところ、野生型株および PP2C 欠損株ともに、緑色を維持していた。このことから、PP2C 欠損株におけるオートファジー異常が暗黒化における緑色維持機構に関与することが示唆された (図 4)。

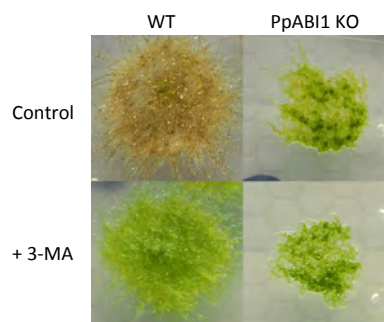


図 4 オートファジー阻害剤を含む培地で暗黒化で生育させた野生型株と PP2C 欠損株

## 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 2 件)

①D. Takezawa, N. Watanabe, T. Ghosh, M. Saruhashi, A. Suzuki, K. Ishiyama, S. Somemiya, M. Kobayashi, Y. Sakata: Epoxy-carotenoid-mediated synthesis of abscisic acid in *Physcomitrella patens* implicating conserved mechanisms for acclimation to hyperosmosis in embryophytes. **New Phytologist**, 206 (2015) 209–219. (査読有) DOI: 10.1111/nph.13231

②Y. Sakata, K. Komatsu, D. Takezawa: ABA as a Universal Plant Hormone. U. Lüttge et al. (eds.), **Progress in Botany** 75 57-96, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2014) (査読有) DOI: 10.1007/978-3-642-38797-5\_2

[学会発表] (計 1 件)

① Y. Sakata: Evolution of ABA signaling pathway in land plants. **The IPGSA 2013** in Shanghai, China, June 18th- 22th (2013) (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 洋一 (SAKATA, Yoichi)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号 : 50277240