

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570063

研究課題名(和文) アブシジン酸の組織間輸送に関わるトランスポーターの探索と解析

研究課題名(英文) Functional analysis of abscisic acid transporters in intertissue signal transfer

研究代表者

黒森 崇 (Kuromori, Takashi)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80332295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：アブシジン酸(ABA)は環境ストレスに応答する植物ホルモンであり、孔辺細胞に作用して気孔閉鎖を誘起します。植物体からの水分蒸散を防ぐ働きとして重要ですが、細胞間や組織間におけるABAの伝達機構についてはほとんど分かっていません。本研究では、ABA合成酵素とABAトランスポーターの遺伝子発現細胞の特定を試み、気孔から離れた維管束組織で発現していることを確認しました。また、維管束組織においてABA合成酵素を誘導すると表皮組織の気孔への影響が観察され、これらの結果はABA組織間シグナル伝播を示唆するものであると考えられました。

研究成果の概要(英文)：Abscisic acid (ABA) is a phytohormone that responds to environmental stresses such as water deficiency. ABA inter-tissue transport mechanisms have not completely been figured out yet. This time, I detected the expression of genes encoding ABA biosynthetic enzymes and ABA transporters mainly in vascular cells. Additionally, I observed that enhancement of ABA biosynthesis in vascular cells induced guard-cell responses, even under normal growth conditions. These results demonstrate that ABA is synthesized in vascular cells and can be transported to target cells in different tissues.

研究分野：分子生物学

キーワード：環境応答 植物ホルモン トランスポーター 組織間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモン「アブシジン酸 (ABA)」は、植物が乾燥などの環境条件の悪化にさらされると、植物にストレス耐性能を付与するホルモンとして知られており、植物の「ストレス・ホルモン」と呼ばれています。植物が乾燥状態になると、ABA は孔辺細胞に作用して気孔閉鎖を起こします。

これまでの ABA 合成酵素に関する研究から、ABA は主に植物体内の維管束組織で合成されていることが分かってきました。一方で、ABA は植物体の表皮組織に位置する孔辺細胞などの(維管束とは離れた)細胞へ作用します。従って、ABA は何らかのメカニズムにより組織間を移動し、機能していることが推測されてきました。

2. 研究の目的

アブシジン酸は、植物体内の主に維管束領域で合成され、表皮にある孔辺細胞に作用して気孔閉鎖を起こすと考えられています。しかし、細胞間や組織間における ABA の伝達機構やその輸送因子はほとんど分かっていませんでした。私たちは ABC トランスポーターに分類される AtABCG25 が維管束における ABA 輸送体の一つであることを報告しました。本研究では、AtABCG25 のファミリー遺伝子の機能解析と、維管束における ABA 合成酵素や ABA 輸送因子の発現細胞の特定を通して、維管束と孔辺細胞の間での ABA 輸送機構の解明を目指しました。

3. 研究の方法

(1) 課題 1 「維管束あるいは孔辺細胞において働く輸送因子ファミリー遺伝子の解析」

ABA 輸送体の一つとして報告した AtABCG25 が属する ABC トランスポーターは大きな遺伝子ファミリーを形成しています。この遺伝子ファミリーの系統樹において、AtABCG25 に最も近い AtABCG9, AtABCG14, AtABCG21 の 3 遺伝子について、植物体における発現様式の解析と、細胞内におけるタンパク質の局在性解析を行いました。

植物体における発現様式の解析のために、各遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、GUS レポーター遺伝子と融合し、形質転換植物を作出しました。

また、細胞内におけるタンパク質の局在性解析のために、各遺伝子の遺伝子コード領域と GFP タンパク質を融合したベクターを作製し、プロトプラストでの一過的発現系による観察、および形質転換植物の作製と観察を行いました。

(2) 課題 2 「維管束において ABA 合成酵素や ABA 輸送因子の発現細胞の特定」

ABA 合成の最後の 3 段階を担う酵素である ABA2、AAO3、NCED3 の 3 つの遺伝子と、維管束で働く ABA 輸送体である AtABCG25、AIT1 の

2 つの遺伝子の、合計 5 つの遺伝子に関して、プロモーター領域をクローニングし、レポーターとして核局在型 GFP を融合して形質転換体を作製し、蛍光シグナルを観察することで発現細胞の特定を試みました。

4. 研究成果

(1) 平成 24 年度は、課題 1 「維管束あるいは孔辺細胞において働く輸送因子ファミリー遺伝子の解析」に関して研究を進めました。

先ず、AtABCG9, AtABCG14, AtABCG21 の 3 遺伝子の植物体における発現様式の解析については、形質転換体による GUS 発現検出を行った結果、AtABCG14 と AtABCG21 は AtABCG25 と同様に主に維管束組織で発現していることが分かりました。また、AtABCG21 に関しては、維管束組織に加えて、表皮組織の孔辺細胞でも発現が見られました。さらに、AtABCG21 は ABA や乾燥ストレス下で発現が強くなることが分かりました。一方で AtABCG9 に関しては花芽部分にのみ発現し、発現の組織特異性が他の遺伝子とは異なることが分かりました。

次に、各遺伝子についてのタンパク質の細胞内局在の解析については、プロトプラストでの一過的発現系、および形質転換植物の観察のどちらの実験においても、AtABCG9、AtABCG14、AtABCG21 は、ABCG25 と同様に細胞膜に局在することが分かりました。

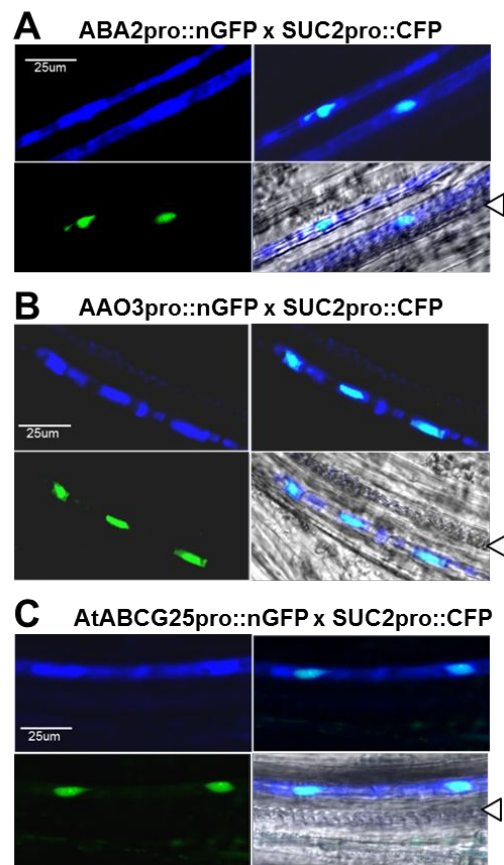


図 1 植物体の維管束組織における GFP と CFP による二重観察による発現細胞層の検出
矢頭は導管の位置を表しています。

(2) 平成 25 年度は、課題 2「維管束において ABA 合成酵素や ABA 輸送因子の発現細胞の特定」について研究を進めました。

まず、ABA 合成酵素のうち ABA2、AAO3 の 2 つの遺伝子に関して、プロモーター領域をクローニングし、核局在型 GFP を融合して形質転換体を作製しました。作製した形質転換植物体について、様々な組織や器官における蛍光観察実験を行った結果、維管束組織の中の師管伴細胞で比較的強く発現していることを見出しました(図 1)。さらに、ABA 輸送因子 AtABCG25 について同様の解析を行ったところ、やはり同じ細胞種において遺伝子発現が観察されました(図 1)。

次に、この細胞種において ABA 合成酵素 NCED3 を強制発現する形質転換植物体を作製したところ、気孔閉鎖が有意に促進され、植物体からの水分蒸散が抑えられる傾向が観察されました(図 2)。この実験結果は、維管束細胞にて誘導した ABA 合成が、維管束から離れた表皮にある孔辺細胞へ影響を与えたことを示しており、組織間における ABA シグナル伝達を示唆していると考えられました。

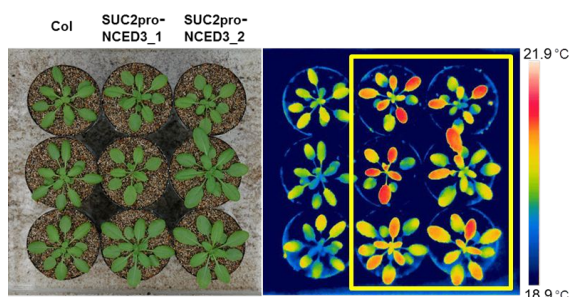


図 2 維管束の ABA 合成誘導による蒸散変化 デジタルカメラ(左)とサーモグラフィー(右)の写真を示しています。各左 1 列が野生型植物 (Col)、右 2 列が師管伴細胞特異的 (SUC2pro) に ABA 合成酵素 (NCED3) を発現させた形質転換植物です。維管束組織のみで ABA 合成誘導したにも関わらず、表皮組織孔辺細胞への影響(黄枠)を視覚化できました。

(3) 平成 26 年度は、平成 25 年度に引き続き、課題 2「維管束において ABA 合成酵素や ABA 輸送因子の発現細胞の特定」について研究を進めました。

ストレスで誘導されるタイプの ABA 合成酵素である NCED3 と、取込型として報告されたもう一つの ABA 輸送体である AIT1 の 2 つの遺伝子に関して、プロモーター領域のクローニングを行い、蛍光蛋白質に融合した形質転換体を作出しました。そして、共焦点観察実験の結果、前者 3 遺伝子とは異なり、維管束組織の比較的広い範囲の細胞において発現が観られることを見つけました。

(4) 今後は、維管束組織の中で、特定の細胞層で発現することが報告されている各種の遺伝子のプロモーター領域のクローニング

を行います。そして、これらのプロモーターと蛍光蛋白質を融合した形質転換体の作出を行い、各種の細胞種特異的なマーカーとすることで NCED3 と AIT1 に関して発現細胞層の特定を試みます。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Miyaji T*, Kuromori T*, Takeuchi Y, Yamaji N, Yokosho K, Shimazawa A, Sugimoto E, Omote H, Ma JF, Shinozaki K, Moriyama Y (*equally contribution). AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. Nat Commun. 6, Article number 5928, 2015, 査読有

DOI: 10.1038/ncomms6928

Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K. Intertissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. Plant Physiol. 164, 1587-1592, 2014, 査読有

DOI: 10.1104/pp.114.235556

Akiyama K, Kurotani A, Iida K, Kuromori T, Shinozaki K, Sakurai T. RARGE II: An integrated phenotype database of *Arabidopsis* mutant traits using a controlled vocabulary. Plant Cell Physiol. 55, Article number e4, 2014, 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pct165

[学会発表](計 12 件)

Kuromori T. Study of inter-tissue transfer and transporters of abscisic acid. 第 56 回日本植物生理学会年会、平成 27 年 3 月 16-18 日、東京農業大学(東京都)

Miyaji T. AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. 第 56 回日本植物生理学会年会、平成 27 年 3 月 16-18 日、東京農業大学(東京都)

黒森 崇、アブシジン酸の組織間輸送とトランスポーターの解析、日本植物学会第 78 回大会、平成 26 年 9 月 12-14 日、明治大学(神奈川県)

Hamasaki H. Reduction in mitochondrial ATP affects a signaling pathway, including SnRK1 and SOG1, to control the *Arabidopsis thaliana* development. International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2014), 28 July - 1 August 2014, Vancouver (Canada)

Kuromori T. Inter-tissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. 第 55 回日本植物生理学会年会、平成 26 年 3 月

18-20 日、富山大学五福キャンパス（富山県）

濱崎英史、シロイヌナズナ SnRK1 と SOG1 はミトコンドリア由来の ATP がシグナル伝達を介して生育を調節するのに関与している、第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

Hamasaki H. Mitochondrial ATP modulates *Arabidopsis thaliana* development through a signaling pathway that involves SnRK1 and SOG1. 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria, 28 October - 1 November 2013, 沖縄残波岬ロイヤルホテル(沖縄県)

Kuromori T. Gene functional analysis of ABC transporter AtABCG25 in stress responses. 16th International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013), 26 - 31 March 2013, 倉敷市芸文館(岡山県)

大開暖香、シロイヌナズナにおける ABC トランスポーター G サブファミリー遺伝子群の機能解析、第 54 回日本植物生理学会年会、平成 25 年 3 月 21-23 日、岡山大学(岡山県)

Hamasaki H. Mitochondrial ATP modulates *Arabidopsis thaliana* development through a signaling pathway that involves SnRK1 and SOG1. 第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24 年 12 月 11-14 日、マリンメッセ福岡(福岡県)

Sakakibara K. Transcriptome independent component analysis lead to the identification of two glycosyltransferases involved in anthocyanin modification in *Arabidopsis thaliana*. 26th International Conference on Polyphenols, 22 - 26 July 2012, Florence (Italy)

Myouga F. Chloroplast functions in abiotic stress response and tolerance. SEB Annual Main Meeting 2012, 29 June - 2 July 2012, Salzburg (Austria)

〔図書〕(計 2 件)

Kuromori T, Shinozaki K. ABA Transport by ABCG Transporter Proteins (Chapter 3). Plant ABC Transporters (Springer Series: Signaling and Communication in Plants, Vol. 22), 2014, pp39-47
DOI: 10.1007/978-3-319-06511-3_3

Kuromori T, Mizoi J, Umezawa T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Stress Signaling Networks: Drought stress (Chapter 13). Molecular Biology (Springer Series: The Plant Sciences,

Vol. 2), 2014, pp383-409

DOI: 10.1007/978-1-4939-0263-7_7-1

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

1.

名称: Ascorbate transporter

発明者: 宮地孝明、表 弘志、森山芳則、黒森 崇、篠崎一雄

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/IB2014/063104

出願年月日: 平成 26 年 7 月 15 日

国内外の別: 国外

2.

名称: アスコルビン酸トランスポーター

発明者: 宮地孝明、表 弘志、森山芳則、黒森 崇、篠崎一雄

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2013-155640

出願年月日: 平成 25 年 7 月 26 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

プレスリリース

植物のビタミン C 輸送体を世界で初めて同定 (2015 年 1 月 5 日)

http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id260.html

英文プレスリリース

How vitamin C helps plants beat the sun (2015 年 1 月 5 日)

http://www.riken.jp/en/pr/press/2015/20150105_1/

RIKEN Research Highlights リリース

Sun safety for plants

(2015 年 2 月 20 日)

<http://www.riken.jp/en/research/rikenresearch/highlights/7958/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒森 崇 (KUROMORI, Takashi)

理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号: 80332295

(2) 研究協力者

杉本 絵理子 (SUGIMOTO, Eriko)

理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ

大開 暖香 (OHIRAKI, Haruka)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(篠崎和子研究室)・大学院生