

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 19 年度博士課程入学
氏名 溝口 昌秀
指導教員名 篠崎 和子

論文題目

シロイヌナズナのタンパク質リン酸化酵素 SnRK2 のサブクラス I および II ファミリーのストレス応答における機能解析

序論

世界では急激な人口の増加により、食糧問題が深刻化している。近年の地球の温暖化や異常気象は農業の生産性を不安定にしている原因の 1 つとなっており、乾燥や高温などの不良環境での植物の生産性を高めることが重要な課題である。移動できない植物が乾燥などの環境ストレスに曝されると、生理的な応答だけでなく細胞内でも積極的な分子レベルでの応答が行われる。植物の環境ストレス応答における細胞内シグナル伝達経路において、タンパク質のリン酸化は重要な位置を占めている。浸透圧ストレスや ABA によって活性化する SnRK2 (SNF1-related protein kinase 2) ファミリーは、植物に固有のプロテインキナーゼであり、ヒメツリガネゴケのような下等植物から高等植物に至るまで高度に保存されている。SnRK2 は C 末端にある酸性アミノ酸に富む配列によってサブクラス I からサブクラス III まで分類され、シロイヌナズナには 10 個 (SRK2A~J/SnRK2.1~2.10) 存在する。シロイヌナズナにおいてはサブクラス III SnRK2 は ABA によって強く活性化し、乾燥ストレスをはじめとする ABA シグナル伝達の主要な構成因子として重要な役割をはたすこと示された。一方、他のサブクラス I および II に関しては、環境ストレス応答に関わることを示唆されているものの、それらの役割は不明である。そこで、本研究ではサブクラス I SnRK2 (SRK2A, B, G, H) およびサブクラス II SnRK2 (SRK2C, F) について、生化学的あるいは逆遺伝学的な手法を中心として植物における機能を解析した。

1. サブクラス II SnRK2 の機能解析

シロイヌナズナゲノムにはサブクラス II SnRK2 の遺伝子は SRK2C/SnRK2.8, SRK2F/SnRK2.7 の 2 個存在している。それらの遺伝子発現解析の結果、SRK2C

は主に根で発現しており、**SRK2F**は植物全体で発現していることが明らかとなった。細胞内局在は**SRK2C**と**SRK2F**どちらも細胞質と核の両方に局在がみられたため、一部の組織では両者が冗長に機能している可能性が考えられた。次に、サブクラス II SnRK2 の二重変異体 *srk2cf* を作成して、植物体の変化を調べた。マイクロアレイ解析の結果から、*srk2cf* において多くの乾燥ストレス応答性遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。さらに、それらの遺伝子の中には、多数の ABA 応答性遺伝子が含まれていることがわかり、さらにサブクラス III SnRK2 の制御下にある遺伝子と多くの重複が認められた。しかし、サブクラス III SnRK2 の 3 重変異体 *srk2dei* に比べると、*srk2cf* の効果は弱いものであった。このことから、サブクラス II SnRK2 の機能は部分的にサブクラス III と重複していることが示唆された。これを裏付けるように、サブクラス II SnRK2 はサブクラス III のリン酸化ターゲットである AREB/ABF ファミリーの転写因子と相互作用すること、さらに AREB/ABF をリン酸化する能力を有することが明らかとなった。しかし、ABA 処理を行ったときの遺伝子発現を見てみると、*srk2cf* と野生型植物の間においてほとんど差が見られなかったことから、ABA シグナル伝達におけるサブクラス II SnRK2 の機能は限定的であり、乾燥ストレスのシグナル伝達因子としてサブクラス III SnRK2 とともに補助的に機能していることが示唆された。

2. サブクラス I SnRK2 の機能解析

シロイヌナズナゲノムにはサブクラス I SnRK2 の遺伝子は **SRK2A/SnRK2.4**, **SRK2B/SnRK2.10**, **SRK2G/SnRK2.1**, **SRK2H/SnRK2.5**, **SRK2J/SnRK2.9** の 5 個存在している。本研究ではサブクラス I SnRK2 のうち、浸透圧ストレスで活性化しアミノ酸配列の相同性が高い **SRK2A**、**SRK2B**、**SRK2G** および **SRK2H** の 4 個の遺伝子を対象に研究を行った。はじめに、4 個のサブクラス I SnRK2 の活性化の条件を検討したところ、サブクラス I SnRK2 はいずれも ABA を含む植物ホルモンでは活性化せず、浸透圧ストレス特異的に活性化することがわかった。さらに、サブクラス I SnRK2 の遺伝子発現パターンは植物全体にわたって重複しており、細胞内局在においても全て細胞質および核で検出されたことから、サブクラス I SnRK2 メンバー間には機能的に高い冗長性が存在することが示唆された。そこで、冗長性の問題を回避するために、4 個の遺伝子すべてをノックアウトした *srk2abgh* 四重変異体を作成して植物での機能解析を行った。マイクロアレイ解析の結果から、乾燥ストレス下の *srk2abgh* 四重変異体において、多くの病害・サリチル酸応答性遺伝子の発現が野生型植物に比べて増加していることが明らかとなった。また、*srk2abgh* において発現が増加していたこれらの遺伝子は、通常は乾燥ストレスによって発現が減少する遺伝子であった。植物

ホルモンの内生量をそれぞれの植物について測定したところ、サリチル酸や ABA 量は *srk2abgh* と野生型植物で差はなかったものの、乾燥時の *srk2abgh* におけるイソロイシン結合型ジャスモン酸の蓄積量が野生型植物の半分程度に減少していた。このことから、*srk2abgh* 変異体では乾燥ストレス時におけるジャスモン酸とサリチル酸の拮抗作用が弱まった結果、サリチル酸応答性遺伝子が強発現しているものと考えられた。*Pseudomonas Pst DC3000* による感染試験において、*srk2abgh* と野生型植物の間に差がなかったことから、サブクラス I SnRK2 はサリチル酸の応答経路に直接関与しているわけではないことが示唆された。一方、ジャスモン酸シグナル伝達を負に制御する因子である MPK3 および MPK6 の活性化において *srk2abgh* と野生型植物の間で乾燥や ABA による活性化に差は見られなかったことから、サブクラス I SnRK2 とジャスモン酸シグナル伝達における役割については今後さらに解析を進める必要がある。

総括

本研究では、シロイヌナズナの 3 種の SnRK2 ファミリーの中で解析の遅れていたサブクラス I およびサブクラス II について詳細な機能解析を行った。先行研究によってサブクラス III SnRK2 の ABA のシグナル伝達経路での主要な因子としての機能解析はすでに行われていることから、本研究によって初めて植物のすべての SnRK2 サブファミリーの役割について議論することが可能となった。本研究の中で新たにわかったことは、まず乾燥ストレス応答においてサブクラス II SnRK2 が確かに ABA のシグナル伝達因子として機能しているということである。さらに、その機能の一部がサブクラス III SnRK2 と重複していることも明らかとなった。一方で、サブクラス I SnRK2 については、メンバーが協調してジャスモン酸とサリチル酸の拮抗作用に作用することが明らかとなり、サブクラス III とは明確に異なる機能を有することが示された。SnRK2 ファミリーを進化的にみると、サブクラス III が蘚苔類から被子植物まですべて存在するが、サブクラス II はシダで、サブクラス III は被子植物で見いだされることからサブクラス III が最も古い起源を持つと考えられる。このうち、サブクラス II と III に機能重複が見られ、サブクラス I は独自の機能を持つという本研究の結果は、SnRK2 ファミリーの進化という観点から見ても妥当である。本研究によって、すべての SnRK2 ファミリーの機能が網羅的に解析され、それぞれの役割を整理することができた。今後は SnRK2 が介在するシグナル伝達ネットワークの全貌解明のために、それぞれの SnRK2 の下流の標的タンパク質や浸透圧ストレスによる活性化制御のメカニズムを明らかにすることによって、植物の環境ストレス応答のより深い理解につながることを期待される。

参考文献

Mizoguchi, M., Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K (2010) Two Closely Related Subclass II SnRK2 Protein Kinases Cooperatively Regulate Drought-Inducible Gene Expression. *Plant Cell Physiol.*