

研 究 報 告 書

「アブシジン酸シグナル伝達の中枢ネットワークを標的とした次世代型環境ストレス耐性植物の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研 究 者: 梅澤 泰史

1. 研究のねらい

近年、地球温暖化や干ばつの増加等の環境変化が農業生産に与える影響が深刻化している。植物が乾燥ストレスや塩ストレスを受けると、植物の光合成力や炭素貯留能が大幅に低下し、生育が抑制される。このような植物の環境ストレス応答において、SnRK2 プロテインキナーゼ群は、シグナル伝達の中枢で働く重要な分子である。そこで本研究では、(A) SnRK2 のリン酸化標的分子の活性制御技術、および (B) SnRK2 を分子標的としたリード化合物の探索、の2つの大課題を設定した。SnRK2 によるシグナル伝達機構を解明し、その知見を利用して光合成能力やストレス耐性を高めた環境ストレス耐性植物を作出することを目指した。

テーマ A では、ABA シグナル伝達におけるタンパク質リン酸化ネットワークを明らかにするために、複数の植物種においてリン酸化プロテオーム解析を行うとともに(実験①)、すでに同定したリン酸化タンパク質のリン酸化部位を改変して、タンパク質の機能改変による植物のストレス耐性の向上を目指した(実験②)。実験①については、ヒメツリガネゴケやオオムギ等の植物を用いてリン酸化プロテオーム解析を行い、多数のリン酸化タンパク質を同定することに成功し、ABA によるリン酸化シグナルを植物主観で比較することが可能となった。一方、実験②についてはリン酸化部位を改変したタンパク質の機能発現が安定せず、当初見込んだようなストレス耐性への影響は認められなかった。そのため、新たに実験③として、リン酸化プロテオーム解析に基づいた SnRK2 相互作用因子の探索を大規模に行った。その結果、新規な相互作用因子を複数同定することに成功した。今後、これらの因子が植物の環境ストレス耐性の向上に応用可能かどうか調べる予定である。

テーマ B では、SnRK2 の活性に影響を及ぼす化合物を大規模に探索した。まず、SnRK2 のキナーゼ活性を指標としたハイスループットスクリーニング系の開発に取り組んだ。SnRK2 の活性を安定して測定する実験系の開発に時間を要したが、ようやく系ができあがり、すでに第一回目のスクリーニングを完了した。再現性や濃度依存性を確認した結果、合計 8 種の候補化合物の選抜に成功した。それらについて、SnRK2 に対する特異性を検討するとともに、実際に植物細胞内における活性の評価を行う予定である。

2. 研究成果

(1) 概要

乾燥や塩、低温などの環境ストレスは、植物の光合成力や炭素貯留能に重大な影響を与える要因の一つである。植物の環境ストレス応答において、SnRK2 プロテインキナーゼ群は、気孔の閉鎖や浸透圧応答を直接的に制御する重要な分子である。そこで本研究では、(A) SnRK2 のリン酸化標的分子の活性制御技術、および (B) SnRK2 を分子標的としたリード化合

物の探索、の2つの大課題を設定した。これによって、SnRK2 によるシグナル伝達経路を利用して光合成能力やストレス耐性を高めた次世代型環境ストレス耐性植物を作出することを目指した。

テーマ A では、先行研究において「SnRK2 の基質群をリン酸化プロテオーム解析の手法で同定した成果を踏まえ、① さらにリン酸化プロテオーム解析の対象とする植物種を拡大し、さらに候補タンパク質の数を増やすこと、および② 同定したリン酸化タンパク質のリン酸化部位を改変して、タンパク質の機能を変化させて植物のストレス耐性を改変することを目指していた。①については、ヒメツリガネゴケやオオムギ等の植物を用いてリン酸化プロテオーム解析を行い、多数のリン酸化タンパク質を同定することに成功した。しかし、②については改変したタンパク質の機能発現が安定せず、当初見込んだようなストレス耐性への影響も見られないという結果となった。

テーマ B では、SnRK2 の活性調節剤を見つけることを目標に、化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニング (HTS) 系を開発した。HTS には精度が求められるため、SnRK2 の活性を安定して測定する系の開発に時間を要したが、ようやく系ができあがり、すでに第一回のスクリーニングは終え、合計 8 種の候補化合物を選抜し、それらについて植物における活性評価を行う段階である。

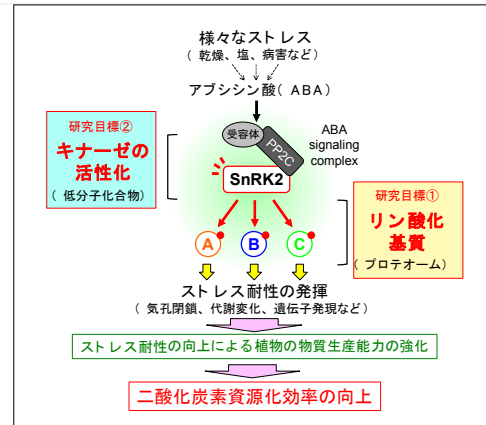


図1 本研究課題の概要

(2) 詳細

研究テーマ A 「SnRK2 のリン酸化標的分子の活性制御技術」

先行研究において、シロイヌナズナを用いたリン酸化プロテオーム解析によって、ABA によって制御される多数のリン酸化タンパク質を同定することに成功した。また、野生型と SnRK2 三重変異体を比較することによって、SnRK2 の基質候補を見いだした。本研究では、さらにリン酸化プロテオーム解析を進めてより多くのリン酸化タンパク質の情報を得ることを実験①とした。また、すでに同定された基質候補には、それぞれリン酸化部位の情報が紐付けられている。一般に、セリンまたはスレオニンのリン酸化の場合、アスパラギン酸またはグルタミン酸への置換による疑似リン酸化型、あるいはアラニンへの置換による非リン酸化型が作成可能である。本研究では、これらの変異タンパク質を用いて、植物の環境ストレス耐性を改変することを実験②とした。

実験① リン酸化プロテオーム解析による新規リン酸化タンパク質情報の取得

まず、リン酸化プロテオーム解析の実験系を自前で立ち上げることが最初の難関であった。サンプル調製から質量分析、データ解析に至る一連のパイプラインを全て構築するには多くのノウハウが必要であり、これらをつなぎ合わせるのに時間を要した。現在ではパイプラインの構築はほぼ完了しており、リン酸化プロテオーム解析をスムーズに行える体制となっている。現在までにヒメツリガネゴケおよびオオムギの解析を終了した。ヒメツリガネゴケにおい

では、シロイヌナズナとの比較から ABA シグナル伝達系に相当部分の相違があるという興味深い結果を得ており、コケ植物が独自の脱水耐性を持つ事実を指示するものではないかと考えている。この結果に関しては、現在論文投稿中である。

実験② リン酸化タンパク質の変異導入が植物のストレス耐性へ及ぼす影響

一方、実験②では、まず改変する標的タンパク質として AREB1 および SNS1 を選んだ。AREB1 は、ABA 応答における中心的な転写因子であり、SNS1 はリン酸化プロテオーム解析で新規に見つけた SnRK2 の基質である。これらのリン酸化部位に変異を導入して、Ser を Asp または Ala に置換した。得られた形質転換植物を用いて表現型を観察したところ、AREB1 および SNS1 のいずれの遺伝子においても、非リン酸化型と疑似リン酸化型で顕著な表現型の差は認められなかった。したがって、当初考えたリン酸化部位の改変による植物の乾燥耐性強化は難しいことがわかった。少なくともシロイヌナズナで明確な表現型が認められないと、作物での研究には進めないため、研究の方向性の転換を迫られた。そこで、新たに実験③を立案した。

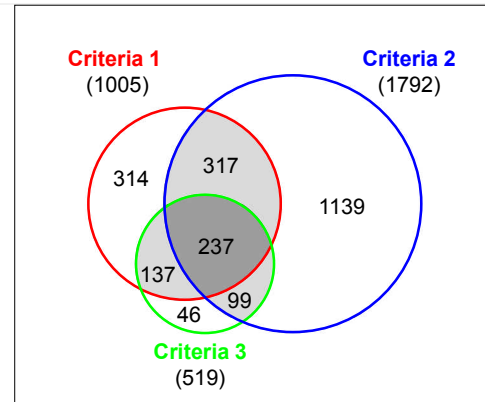


図2 ヒメツリガネゴケのリン酸化プロテオーム解析
Criteria 1: 野生型でABA応答あり、Criteria 2: *ppabi1a/b* 二重変異体 (ABA高感受性) で上方制御、Criteria 3: AR7 変異体 (ABA非感受性) で下方制御

実験③ リン酸化プロテオームデータに基づいた SnRK2 相互作用因子の探索

原点に戻ってリン酸化プロテオームデータを見直し、有用な情報を引き出すことを試みた。その結果、MAP キナーゼ (MAPK) の一つである AtMPK1 が SnRK2 三重変異体で顕著にリン酸化が減少していることに着目した。MAPK は、通常 MAPKKK→MAPKK→MAPK からなる MAPK カスケードによって制御される。そこで、SnRK2 が何らかの MAPKKK を制御しているのではないかと考え、SnRK2 と相互作用する MAPKKK を網羅的に調べた。MAPKKK はシロイヌナズナに約 80 種あるため、タンパク質の合成には簡便なコムギ胚芽抽出液をもちいた *in vitro* 翻訳系を用い、相互作用は Alpha screen 法で検出した。その結果、3 つの MAPKKK が SnRK2 との相互作用因子として同定された。いずれも機能未知の MAPKKK であったため、遺伝子破壊株を単離して解析したところ、二つの変異体で ABA 高感受性の表現型を認めた。さらに、この MAPKKK の近縁遺伝子についても調査を進め、新たに ABA シグナルに関わるものを複数見出した。これらの MAPKKK 遺伝子群は機能的に冗長であると考えられ、ABA シグナル伝達において重要な役

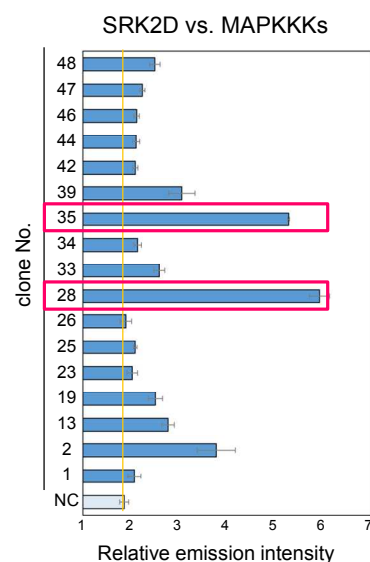


図3 SnRK2とMAPKKK群の相互作用解析
SnRK2とMAPKKKをコムギ胚芽抽出液の*in vitro*翻訳系で合成し、Alpha screen法で相互作用を検出した。

を担っている。これらの MAPKKK 遺伝子群は機能的に冗長であると考えられ、ABA シグナル伝達において重要な役

割を担っている可能性がある。また、当初これらの MAPKKK は SnRK2 の下流と考えていたが、SnRK2 の上流で機能している可能性もあり、詳細な解析を進めているところである。

研究テーマ B 「SnRK2 を分子標的としたリード化合物の探索」

これまでの研究から、SnRK2 プロテインキナーゼが植物の環境ストレス応答の中核で機能していることがわかってきた。SnRK2 はストレスに応じて活性化するプロテインキナーゼであることから、SnRK2 の活性を人為的に制御できれば、植物の環境ストレス応答を改変できるはずである。そこで、本研究の二つ目の課題として、SnRK2 の活性を直接制御できる化合物を同定することを目的とした。そのために、SnRK2 の活性を指標として化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニング (HTS) を行った。

まず、HTS の実験系を確立した。この実験では、SnRK2 の活性を簡便に、しかも精度よく測定する必要がある。そのために、蛍光基質を用いたキナーゼアッセイ系を SnRK2 に最適化した。そして、この測定系を用いて、東京大学創薬機構から提供を受けた化合物ライブラリーをスクリーニングした。約 2 万種の化合物をスクリーニングし、合計 78 個の化合物が陽性と判定された。続いて、二次スクリーニングとして再現性検定を行い、11 個の化合物が陽性として残

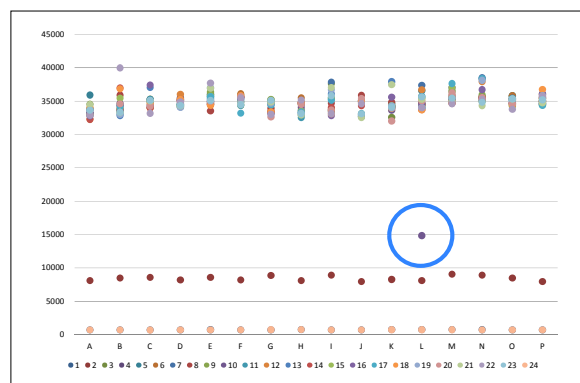


図4 SnRK2 活性を指標とした化合物スクリーニング

った。さらに、濃度検定や阻害率などの測定を行った結果、6 つの化合物が最終候補として残り、いずれも未報告の化合物であった。現在、これらの化合物をシロイヌナズナ培養細胞に処理して SnRK2 の活性を測定する準備を進めている。これまでに、SnRK2 の過剰発現培養細胞株が 5 ライン得られた。現在、これらの培養細胞に実際に化合物を処理して SnRK2 の活性変化を解析中である。

3. 今後の展開

本研究課題では、ABA シグナル伝達におけるタンパク質リン酸化ネットワークを複数の植物種で明らかにすることができた。先行研究において、他のオミクス技術では見つからないものがリン酸化プロテオーム解析によって同定されていることから、このアプローチの有効性は明らかである。今後も引き続き様々な植物種のリン酸化プロテオーム解析を進めて、植物種間で保存されている ABA 応答のリン酸化シグナルネットワークを明らかにしていきたいと考えている。ABA シグナル伝達で重要な役割も持つリン酸化タンパク質を選抜し、それを利用したストレス耐性植物の開発に引き続き取り組んでいきたいと考えている。

また、本研究では SnRK2 の活性を阻害する化合物をスクリーニングすることにも成功した。詳細な解析はこれからであるが、もし SnRK2 の特異的阻害剤を見つけることができれば、モデル植物以外の植物種における ABA シグナル伝達研究にとって、有用な研究ツールとなることが期待される。また、植物の環境ストレス耐性を向上させるためには、SnRK2 を活性化するような化合物が有用であると考えられる。将来的には、SnRK2 の活性化剤のスクリーニングに取り組んでいく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

本研究では、大きく分けて二つの課題を設定した。研究課題 A では、リン酸化プロテオーム解析で大量の情報を取得し、その情報を利用して環境ストレス耐性植物を生み出そうという試みであった。リン酸化プロテオーム解析は順調に進んでおり、ヒメツリガネゴケとオオムギの解析が終了したので、ある程度目標は達成したと考える。一方、環境ストレス耐性植物の作出については、最初に対象とした遺伝子においてリン酸化部位の改変によるストレス耐性の変化が見られなかったことから、この点においては目標達成が困難となった。一方、研究課題 B においては、目標とした SnRK2 の活性に影響を及ぼす化合物の同定に成功したので、達成率は 80%程度と考える。また、課題 A においては研究の方針を転換し、新規な SnRK2 の相互作用タンパク質の同定を試みた結果、新規な MAPKKK ファミリーを発見した。これらはいずれも未報告のものであり、学術上の意義は高いと言える。

・研究の進め方および研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

申請者は本研究課題を遂行するに当たり、リン酸化プロテオーム解析と化合物スクリーニングという二つの未知の課題に取り組んだ。時間はかかってしまったが、リン酸化プロテオーム解析のパイプライン構築、および化合物ライブラリーのスクリーニング系を立ち上げ、それらを研究室内で日常的に行うことができるようになったのは大きな収穫である。今後は、本研究で構築した解析技術を武器として植物の ABA シグナル伝達系の解明にさらに取り組み、将来的には次世代型の作物開発につなげていきたいと考えている。また、それらの解析技術を利用した様々な共同研究が走り始めているので、ABA シグナル伝達に限らず様々な分野に挑戦していきたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

主要な植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)による環境応答には SnRK2 と呼ばれる一群のタンパク質リン酸化酵素が必須である。梅澤氏は、劣悪環境下での植物の成長を向上させるため、この SnRK2 によるシグナル伝達を人為的に制御して植物の乾燥耐性や耐塩性を改良することを目指した。その結果、SnRK2 の標的分子を解明し、その機能改変や SnRK2 の活性を制御する化合物を見出すなどの成果を上げた。特に SnRK2 と相互作用する因子として、新規の MAPKKK を発見し、その ABA シグナルにおける関与を明らかにしたことは、今後の基礎研究としての発展に重要である。更に、研究の過程で様々な新たな手法を導入し、研究を進めたことも評価できる。今後は、成果をモデル植物ばかりでなく作物にも応用し、次世代型環境ストレス耐性植物の作出に発展させていってほしい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Honda, Y., Sugiyama, N., Kuwamura, M., Amagai, A., Ishihama, Y., Takezawa, D., Sakata, Y., Shinozaki, K., Umezawa, T. "Phosphoproteomic profiling of *Physcomitrella patens* reveals the diversity of abscisic acid signaling in land plants." Plant Physiol. (投稿中)
2. Saruhashi, M., Kumar-Ghosh, T., Arai, K., Ishizaki, Y., Hagiwara, K., Komatsu, K., Shiwa, Y., Umezawa, T., Sakata, Y. and Takezawa, D. (2015) "Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2." Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 12(46): E6388-96.
3. Umezawa, T. (2015) "Screening of kinase substrates using kinase-knockout mutants." Methods in Molecular Biology 1306: 59-69
4. Ito, T., Kondoh, Y., Yoshida, K., Umezawa, T., Shimizu, T., Shinozaki, K. and Osada, H. (2015) "Novel abscisic acid antagonists identified with chemical array screening." ChemBioChem 16(17): 2471-2478.
5. Umezawa, T., Takahashi, F. and Shinozaki, K. (2014) "Phosphorylation Networks in the Absciscic Acid Signaling Pathway." The Enzymes 35: 27-56.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表の中で、招待講演のみ以下に記載する。そのほか、台湾中央研究院、国立台湾大学、フランス CNRS、九州大学、名古屋大学、ワシントン州立大学およびオレゴン州立大学等で研究セミナーを行った。また、名古屋大学、九州大学およびオーストラリア CSIRO と新たに共同研究を開始した。

(招待講演)

1. **Umezawa, T.** "A Phosphoproteomic Approach to Understand the Evolution of ABA Signaling Pathway in Land Plants" The 7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, the 2nd AOAPO conference, Jungwon University, Korea, Sep. 23, 2015. (Invited)
2. **Umezawa, T.** "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants" The 6th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, the 1st AOAPO conference, & the 5th Plant Proteomics Conference in China, Harbin, China, June 25, 2014. (Invited)
3. **Umezawa, T.** "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants." Taiwan National University, Taipei, Feb. 12,

2014. (Invited)

4. **Umezawa, T.** "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants." IPMB seminar series, Academia Sinica, Taipei, Feb. 12, 2014. (Invited)
5. **Umezawa, T.** "Phosphoproteomic Approaches Toward Understanding the ABA Signaling Network in Land Plants." Indo-Japan Joint Workshop on "Signal sensing and transduction in photosynthetic organisms - from cyanobacteria to land plants", University of Hyderabad, India, December 16-18, 2013. (Invited)
6. **梅澤泰史・杉山直幸・高橋史憲・Jeffery Anderson・坂田洋一・竹澤大輔・石濱泰・Scott Peck・篠崎一雄**: 遺伝学とリン酸化プロテオミクスの融合によるアブシシン酸シグナル伝達系の包括的な解析、第86日本生化学会大会シンポジウム 2S09a「多様なアプローチから解明が進む植物シグナル伝達研究」、横浜、9月11日～13日(2013)