

植物ホルモンアブシシン酸の応答経路を大規模に解明

～干ばつ・塩・低温等のストレス耐性機構の理解が大きく前進～

◆ 詳 説 ◆

1. 背 景

植物は絶えず外環境の変化にさらされており、それに対応するための独自のメカニズムを持っています。このメカニズムの中心となるのが、植物ホルモンの一種であるアブシシン酸 (ABA) です (図 1a)。たとえば植物が乾燥にさらされた場合、ABA が急速に合成され、植物の様々な環境応答機構のスイッチを入れます。その結果植物はある程度の乾燥ストレスに耐えることができるようになります。

さて、このような ABA の作用は、どのようにして起こるのでしょうか？その仕組みがわかれば、植物の乾燥耐性を改良するための重要な手がかりが得られるかもしれません。そのような観点から、ABA の作用機構が盛んに研究されてきました。大きな進展があったのは ABA 発見から約半世紀を経た 2009 年のことであり、我々を含む複数の研究グループの成果によって「細胞内シグナル伝達系」と呼ばれる仕組みの大部分が明らかとなりました

(前回のプレスリリース参照：<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20090922/>)。

ABA の情報伝達経路は、受容体、タンパク質脱リン酸化酵素 (PP2C) およびタンパク質リン酸化酵素 (SnRK2)^{注5)} と呼ばれる 3 つの中核因子から構成されています。これらの因子が協調して働くことで SnRK2 の活性が調節されており、SnRK2 が標的タンパク質 (基質) をリン酸化すると ABA 応答が引き起こされます (図 1b)。しかしながら、タンパク質リン酸化酵素の標的タンパク質を決めるのは技術的に困難であり、SnRK2 の標的タンパク質についてもごく一部の知見にとどまっていた。しかし、植物の ABA 応答機構の全容を解明するためには何とかして SnRK2 の標的タンパク質を明らかにすることが必要であり、重要な課題の一つになっていました。そして、この状況を打開するためには、これまでにない新しい切り口の研究が必要でした。

2. 研究手法と成果

本研究の最大の特徴は、SnRK2 の標的タンパク質をきめるために、最新鋭の「リン酸化プロテオーム」解析技術を利用したことにあります。リン酸化プロテオーム解析は、細胞内に微量に存在するリン酸化タンパク質を大規模かつ好感度に解析することができる先端的な技法です (図 2)。高性能な質量分析計により、どのタンパク質がリン酸化されるか (同定)、タンパク質のどの部分がリン酸化されるか (リン酸化部位)、どの程度リン酸化されるか (定量) といったデータを一挙に取得するのが特徴で、近年の技術革新によって測定性能が飛躍的に向上しています。本研究では、京都大学の石濱泰教授らのグループとの共同研究により、シロイヌナズナから 5000 種以上のリン酸化ペプチドを検出し、ABA あるいは乾燥ストレスに応答する多数のリン酸化タンパク質 (178 個) を同定することに成功しました。これらのタンパク質は ABA 応答や乾燥耐性に関わる可能性が高く、今後の重要な基礎データとなります。

本研究の二つ目の特徴は、本研究グループが独自に作成した変異体植物を用いたことです (図 3)。我々は、以前の研究で ABA 応答に関わる 3 つの SnRK2 遺伝子を破壊した三重変異体 *srk2dei*^{注6)} において、ABA 応答の大部分が失われることを見いだしていました。そこで、野生型と *srk2dei* のリン酸化プロテオームデータの比較解析を基本コンセプトとし、野生型で ABA に応答したリン酸化タンパク質群の中から、*srk2dei* でリン酸化が抑制されるものを 35 個同定して SnRK2 標的タンパク質の候補 としました。

さらに、本研究ではリン酸化部位周辺モチーフ (パターン) 解析やトランスクリプトーム解析を組み合わせることで重要なリン酸化タンパク質を絞り込んでいき、実際に 3 つの例 について詳しく解析を行いました。その結果、① ABA 応答性遺伝子発現を制御する AREB1 転写因子^{注7)} に 新たな活性調節機構 が存在すること、② 動物等でもよく知られたタンパク質リン酸化酵素である MAP キナーゼ^{注8)} 経路の一つが SnRK2 の制御下にある こと、および③ 機能未知のリン酸化タンパク質 SNS1 が ABA シグナ

ルを負に制御する新規のシグナル伝達因子であること (図 4)、など多くの新事実を明らかにすることができました (図 5)。これらの結果はリン酸化プロテオーム解析を行ったからこそ得られたものであり、いずれもこれまでに知られていなかった ABA 応答機構を明らかにする研究成果として注目されます。

3. 今後の期待

本研究のリン酸化プロテオーム解析では、シロイヌナズナ植物体から 5000 個以上のリン酸化ペプチドについて解析を行い、ABA 処理や乾燥ストレスによってリン酸化の制御を受けるタンパク質を多数同定しています。また、SnRK2 の標的タンパク質の候補もリストアップすることができました。これらのリン酸化タンパク質の中には、植物の乾燥耐性や耐塩性などのストレス応答に重要なものが含まれている可能性が高いのですが、本研究ではその全てを調べたわけではありません。したがって、今後研究を進めていくことで、さらに新しいメカニズムを発見できる可能性があります。また、それらの新しい因子を用いて植物のストレス耐性を遺伝子工学的に改良したり、他のシグナル伝達経路との関係を調べたりといった発展研究につながることを期待されます。

また、本研究はリン酸化プロテオーム解析技術を本格的に植物科学の分野に導入し、実際に重要なタンパク質を同定したという点に特徴があります。本研究において、ABA シグナル伝達に関する新しい知見が多数得られた事実は、この技術の有用性・可能性を端的に示しています。リン酸化プロテオーム解析は汎用性の高い技術であるため、同様のアプローチが他の植物種や他のシグナル伝達系の研究にも適用可能です。我々は、リン酸化プロテオーム解析技術が植物科学研究のさまざまな分野に対して大きな可能性を秘めており、特にタンパク質リン酸化酵素の標的タンパク質を決めるための方法論として有効であると考えています。

<掲載論文>

Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C. and Shinozaki, K.

“Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid pathway in *Arabidopsis thaliana*.” *Sci. Signal.* 6, rs7 (2013)

<参考図>

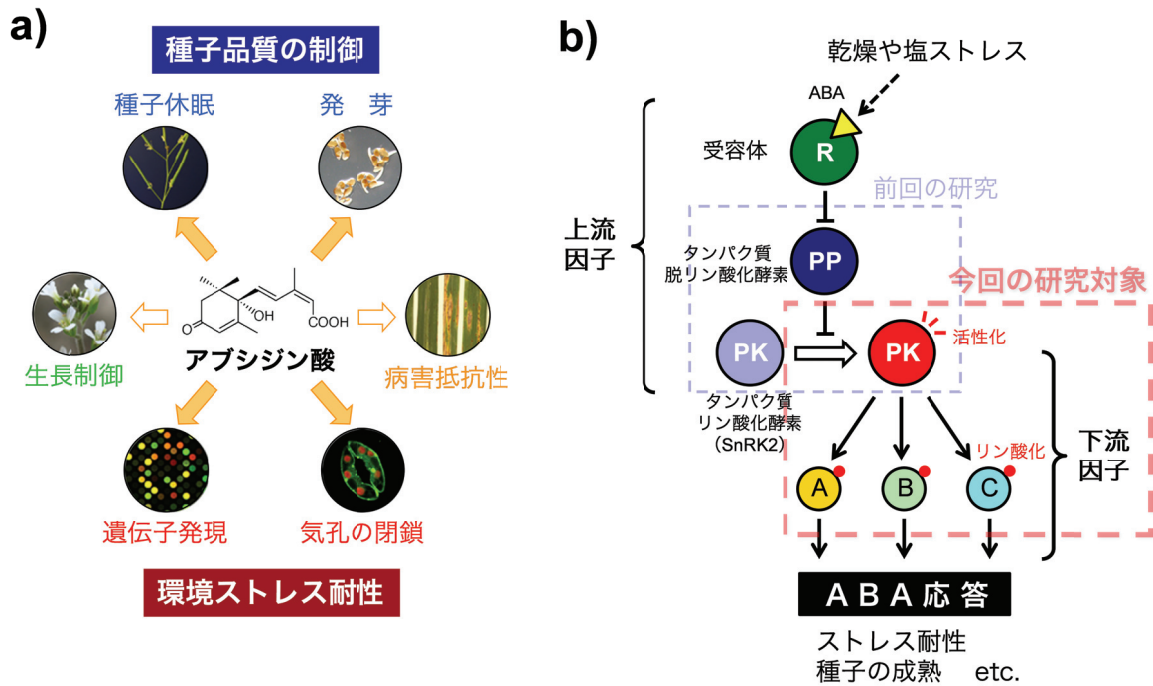


図 1 ABA の生理作用と細胞内シグナル伝達機構

a) ABA の生理作用は多岐にわたっており、代表的なものとして種子品質の制御と環境ストレス耐性の制御が挙げられる。b) ABA の細胞内シグナル伝達機構は、受容体 (R)、タンパク質脱リン酸化酵素 (PP2C, PP)、タンパク質リン酸化酵素 (SnRK2, PK) の 3 つの主要因子で構成される。SnRK2 が ABA 存在下で活性化し、下流の標的タンパク質をリン酸化することで ABA 応答のスイッチが ON になる。今回研究対象としたのは、SnRK2 によってリン酸化される下流のタンパク質群である。



図 2 リン酸化プロテオーム解析技術

植物に ABA あるいは乾燥ストレスを与え、全タンパク質をトリプシンで消化したペプチド断片を出発材料とする。通常、全タンパク質中に含まれるリン酸化タンパク質は微量なので、精製しなければならない (本研究では、京都大学石濱泰教授らが開発した HAMMOC 法^{注9)} を用いた)。精製したリン酸化ペプチドを質量分析装置で解析し、どのタンパク質がリン酸化されているか (同定)、どの部分がリン酸化されているか (リン酸化部位)、どの程度リン酸化されているか (定量) といった情報を取得する。

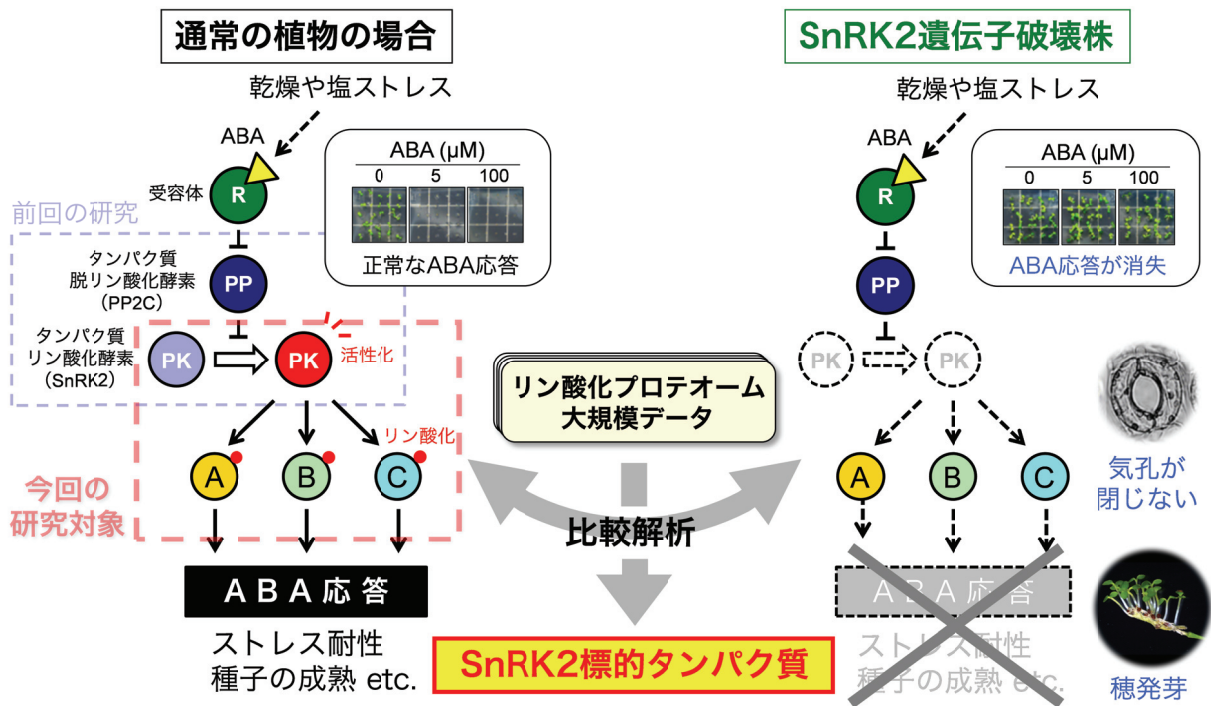


図3 本研究のコンセプト

ABA 応答に関与する 3 つの SnRK2 を全て破壊した変異体である *srk2dei* は、ABA 応答の大部分が失われている。この変異体の中では、タンパク質リン酸化酵素である SnRK2 が存在しないので、本来 ABA に応答するタンパク質のリン酸化が抑制されるのではないかと予想した。そこで、本研究では野生型と *srk2dei* のリン酸化タンパク質を比較解析することで、SnRK2 の標的タンパク質の同定を試みた。

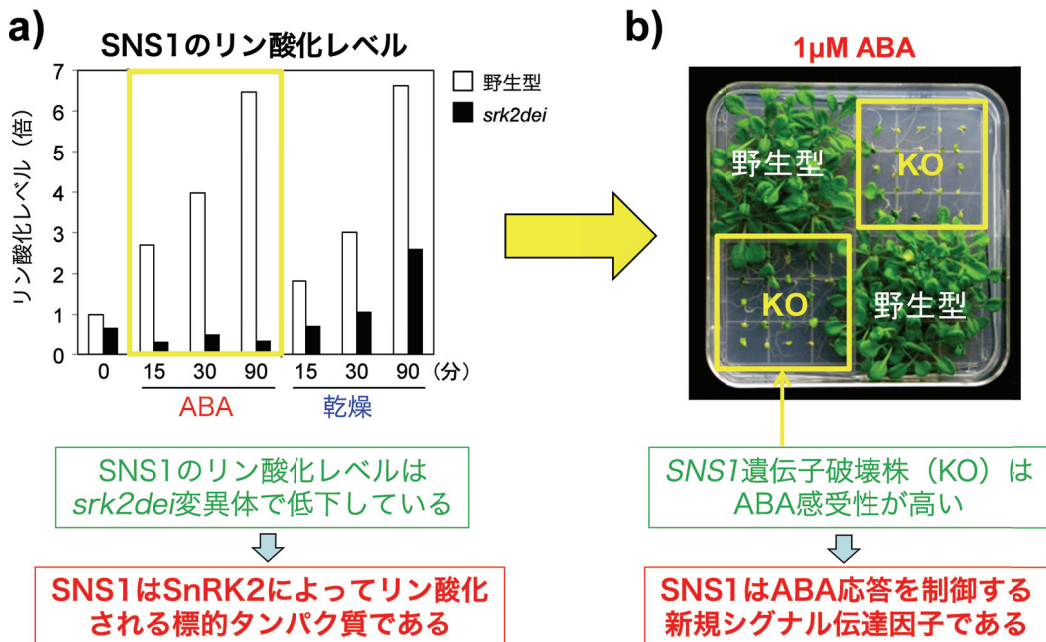


図4 リン酸化プロテオーム解析によって見つかったタンパク質の例

a) SNS1 (SnRK2 substrate 1) は ABA によってリン酸化され、*srk2dei* でリン酸化が低下するタンパク質として見出された。したがって、SNS1 は SnRK2 の標的タンパク質である可能性が高い。b) *SNS1* 遺伝子を破壊したノックアウト変異体 (KO) を解析したところ、野生型に比べて強い ABA 感受性を示した。このことから、SNS1 は ABA 応答を負に制御する新規シグナル伝達因子であることがわかった。

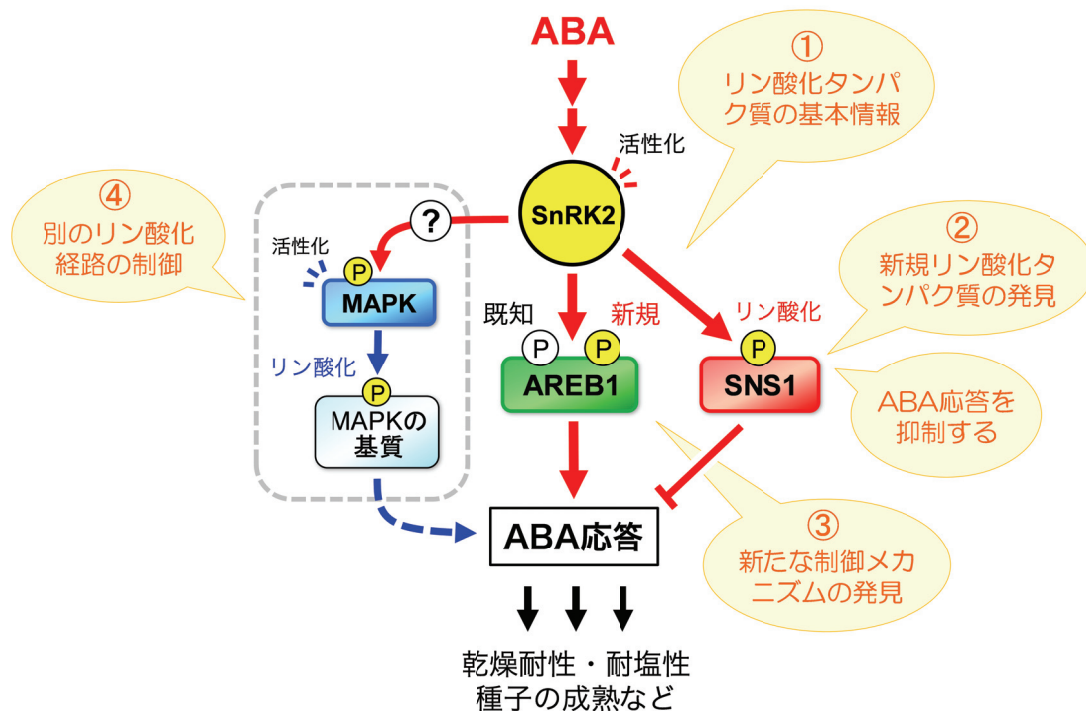


図5 本研究でわかったことのまとめ

リン酸化タンパク質を大規模に解析したことにより、①ABAや乾燥ストレスによる多数のリン酸化タンパク質の変動、②新規なリン酸化タンパク質（例：SNS1）の同定（ABA応答を抑制する因子である）、③既知の因子の新しい制御メカニズムの発見（例：AREB1転写因子^{注7)}）、④別のリン酸化経路（例：MAPK^{注8)}）がSnRK2の制御下にあること、等々多くのことが明らかとなった。

<補足説明>

注1) Science Signaling

世界でもっとも権威のある科学雑誌「Science」の姉妹誌（週刊）で、生物のシグナル伝達に関する優れた原著論文や解説記事を掲載する。2008年9月よりオリジナル論文の掲載をスタートした比較的新しい雑誌である。なお、Scienceの姉妹誌は本誌とScience Translational Medicineの二誌のみである。Science Signalingの日本語要約記事が下記サイトより閲覧可能となっている。（http://www.cosmobio.co.jp/aaas_signal/）

注2) アブシジン酸（ABA）

植物ホルモンは、比較的low濃度で作用する植物生長調節物質であり、アブシジン酸（ABA）はその1つである。英語名 abscisic acid、分子式 $C_{15}H_{20}O_4$ で表される。ABAの代表的な生理作用として、気孔の閉鎖、乾燥耐性の獲得、種子成熟・休眠、落葉など器官脱離の促進などが挙げられる。また、最近では病害抵抗性にかかわっていることが示唆されており、ほかの植物ホルモンとの相互作用も盛んに研究されている。

注3) シグナル伝達経路

生体内で、ある種のシグナルがほかのシグナルに変換され、連続して伝わる過程のことを指す。生命現象を制御するもっとも基本的なプロセスである。一般的にその担い手はタンパク質であることが多く、シグナル伝達因子と呼ばれる。シグナル伝達因子の中にはさまざまな種類があるが、

タンパク質のリン酸化にかかわる因子はそのうちの1つである。この場合、シグナルがタンパク質のリン酸基という形に変換されて伝わることになる。

注4) リン酸化プロテオーム解析

リン酸化されたタンパク質を大規模に解析する技術の総称。いくつかの方法があるが、本研究では後述の HAMMOC 法によるリン酸化ペプチドの精製と、高速液体クロマトグラフィーに接続された質量分析計による一斉解析を組み合わせた手法を採用している。近年の技術革新により、現段階で数千種オーダーのリン酸化タンパク質を捉えることが可能になっている。

注5) SnRK2 (SNF1-related protein kinase 2)

植物に特異的に存在するタンパク質リン酸化酵素の1種で、シロイヌナズナには9個の SnRK2 (SRK2A~J) が存在する。そのうち、SRK2D、E、I の3つが ABA によって強く活性化し、下流の標的タンパク質をリン酸化することで ABA 応答を正に制御する。ABA シグナル伝達における中枢因子の一つに数えられている。

注6) *srk2dei* 三重変異体

ABA 応答に関与する3つの SnRK2 (SRK2D,E,I) が全て破壊された三重変異体。ABA 応答の大部分が失われる劇的な表現型を示す。たとえば、高濃度の ABA 存在下でも問題なく発芽したり (通常は発芽できない)、気孔が常に全開となるため乾燥に異常に弱い、種子が休眠しないために穂発芽しやすい、数百種の ABA 応答性遺伝子の発現に異常が見られる等々、あらゆる ABA 応答が影響を受ける。

注7) AREB1 転写因子

ABA-responsive element-binding protein 1 の略。遺伝子発現を直接的に制御する転写因子の一つで、塩基性ロイシンジッパー型に分類される。植物の ABA 応答性遺伝子の発現を制御する主要な転写因子の一つとして知られている。リン酸化による AREB1 転写活性の制御は以前から知られていたが、今回の研究で新たなリン酸化部位による制御メカニズムが明らかとなった。

注8) MAPK キナーゼ

Mitogen-activated protein kinase の略。タンパク質リン酸化酵素の一種で、真核生物に広く保存されている。様々なシグナル伝達に関与しており、もっともよく研究されているタンパク質リン酸化酵素の一つである。植物には20種程度が存在しており、病害応答や植物ホルモン、活性酸素等の刺激によって活性化する他、細胞分裂制御や形態形成等に関わることが知られている

注9) HAMMOC 法

ヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィーの略で、京都大学の石濱泰教授、杉山直幸准教授らによって開発されたリン酸化ペプチドの精製技術。酸化金属 (酸化チタンなど) に対するリン酸基の親和性を利用しており、本法ではさらにヒドロキシ酸を競合剤として加えることで、リン酸化ペプチドの精製効率が飛躍的に向上した。