

氏名	猿橋 正史
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第1009号
学位授与年月日	平成28年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Group B MAPKKK を介した ABA シグナル伝達機構の解析
論文審査委員	委員長 准教授 竹澤 大輔 委員 教授 森安 裕二 委員 教授 金子 康子 委員 准教授 島山 晋 委員 東京農業大学 教授 坂田 洋一

論文の内容の要旨

植物ホルモンアブシシン酸（ABA）は、維管束植物において、植物体で水ストレスに応答して合成され、気孔の閉鎖や遺伝子発現誘導を引き起こす。また、種子においては、休眠、脱水耐性獲得に関与している。基部陸上植物ヒメツリガネゴケにも存在し、ABA 処理により、原糸体の乾燥、凍結などの水ストレス耐性が向上することが報告されている（Sakata Y. et al., 2014）。高等植物において、ABA は次のように伝達されることが提唱されている。ABA 非存在下において type 2C protein phosphatase (PP2C) は、脱リン酸化により Subclass III SnfI-related kinase 2 (SnRK2) の活性を抑制している（Umezawa T. et al., 2009, Vlad F. et al., 2009）。水ストレスなどに応答して ABA が合成され、PYRABACTIN RESISTANCE/PYR-Like/Regulatory component of ABA receptor (PYR/PYL/RCAR) に受容されると、PP2C による SnRK2 の抑制が解除されることで、SnRK2 が活性化し、下流ヘシグナルが伝達される（Soon FF. et al., 2012）。主要な ABA シグナル伝達因子である、PYR/PYL/RCAR, Group A PP2C, Subclass III SnRK2 は、ヒメツリガネゴケゲノムにも、それぞれ、4 遺伝子、2 遺伝子、4 遺伝子コードされている。（Sakata et al., 2014）2013 年 Komatsu らによって、Group A PP2C 完全欠損株 (ppabil) が作出された。Ppabil 株は、予想どおり、乾燥耐性が劇的に上昇し、ABA 応答性遺伝子発現やタンパク質の蓄積が見られた。一方予想に反して、ABA 非存在下においては、SnRK2 の活性が最大にならず、ABA に誘導性の SnRK2 の活性上昇が見られた。この結果は、上記のような、PP2C による SnRK2 の活性抑制モデルと矛盾するものだった。このことから、Komatsu らは、PP2C が、SnRK2 より下流因子を抑制していること、また、ABA 応答して SnRK2 を活性化する因子の存在を示唆した（Komatsu K. et al., 2013）。

ヒメツリガネゴケにおける、ABA シグナル伝達経路を理解するために、UV 照射による変異導入により、ABA 低感受性 AR7 株が作出された。AR7 株は、ABA 誘導性の水ストレス耐性の向上がほとんど検出されず、ABA シグナル伝達の重要な因子に変異があることが予想された。さらに、AR7 株は、低温誘導性の凍結耐性向上や、高浸透圧耐性も失われていた（Minami A. et al., 2006）。

本論分では、第1章1項において、AR7株のABAに応答したSnRK2の活性化が失われていることを示した。この結果は、AR7株において、SnRK2の活性を制御する上流因子が欠損していることを示唆した。AR7株の全ゲノムシーケンスと、一過的発現系解析による原因遺伝子の絞込み、ゲノム上の塩基置換株の作出により、AR7株のABA応答性減少の原因がMAPKKK Raf-like kinaseに属する遺伝子であることをつきとめた。この遺伝子は、ABAや非生物的ストレス応答に重要な因子であることから、ABA and abiotic-stress responsive Raf-like kinase (ARK)と名づけた。ARKは、ABAシグナルの重要な制御因子であるSnRK2を活性化していることを示した。

第1章の2項において、ARK遺伝子のシロイヌナズナ相同遺伝子を使用し、AR7株の相補実験を試みた。この結果、MAPKKK GroupB2に属する2遺伝子とMAPKKK Group B3に属する3遺伝子が、AR7株のABA応答性を回復させることができることが明らかとなった。相同遺伝子が、SnRK2活性が失われているAR7株のABA応答性を回復させたため、シロイヌナズナにおいても、MAPKKKがSnRK2を活性化する機構が存在するが示唆された。

第1章3項において、ARKのリン酸化部位の特定を行った。ABAやエチレンなどシグナル伝達においてリン酸化は重要な役割を担っている。また、タンパク質リン酸化酵素において、kinase domain内のリン酸化が、活性に影響していることが様々な報告から明らかとなっている。ARKにおいても、リン酸化による制御機構が存在する可能性がある。ARK-GFP過剰発現株から、抗GFP抗体ビーズでARKタンパク質を精製し、nano LC-MS-MS解析に供することで、リン酸化部位の特定をおこなった。その結果、Activation loop内のセリン1029, 1030がリン酸化されていることが予想された。予測リン酸化部位変異配列を作成し、一過的発現系解析や、AR7株を宿主とした過剰発現株を作成することで、この部位の重要性を確かめた。

第1章4項においては、ARKのDeletion解析を行うことで、N-terminal regionの役割を考察した。その結果、N-terminal regionは、ABAに応答したARKの活性に必須であることが明らかとなった。また、N-terminal regionには、負の制御ドメインが存在することが示唆された。ARKにおいて哺乳類Rafで報告されているような、auto-inhibitionによる制御が存在することを予想した。

第2章においては、AR7株と同様にUV照射による変異導入を行い、新規のABAシグナル伝達因子の特定を試みた。UV照射により、多数のABA低感受性株を取得したが、大部分の株で、ARK遺伝子の変異が疑われた。ABAスクリーニングによる変異株の取得では、ARK以外の因子の特定は難しいことが明らかとなった。また、取得した、ABA低感受性株の配列解析により、第5エキソンにARKの活性に重要な領域が存在することを予測した。

論文の審査結果の要旨

本論文は、猿橋氏が行った植物の環境応答におけるグループ B3-MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (B3-MAPKKK) の機能解析および UV 照射により得られたコケ変異株の解析結果についてまとめたものである。植物において乾燥や低温の情報は植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) を介して伝達されている。ABA は種子植物では種子登熟や気孔を介した蒸散の制御に関連するホルモンでもあるが、乾燥や低温シグナルの情報伝達機構については不明な点も多い。

猿橋氏は、第 1 章「ABA 低感受性 AR7 株の解析」において、低温、乾燥およびアブシジン酸への反応に欠損を持つヒメツリガネゴケ変異株 AR7 の解析を行った。マイクロアレイ解析から、およそ 90% の ABA 誘導性遺伝子の発現が、AR7 株で低下していることが明らかとなった。高速シーケンサーによる野生株との比較ゲノム解析から、野生株と比較してアミノ酸が変異している 47 遺伝子を同定した。これら遺伝子の解析をさらに進め、AR7 変異の原因遺伝子 *ARK* を同定した。1148 アミノ酸からなる *ARK* タンパク質は動物のがん原遺伝子 Raf に類似する B3-MAPKKK であることが明らかとなり、AR7 変異株では 532 番目のセリン (Ser532) がフェニルアラニンに変異したために低温、乾燥および ABA への反応ができなくなったと考えられた。そこで、猿橋氏は *ARK* 遺伝子のノックイン (遺伝子置換) 株を作出し、成長解析、凍結耐性試験および遺伝子発現解析から株生化学的な解析から、*ARK* の S532F 置換がタンパク質の機能を欠損させることを証明した。In vitro キナーゼアッセイなどから、*ARK* が植物の環境ストレス応答に関わるプロテインキナーゼ「SnRK2」をリン酸化し、活性化することが示唆された。リン酸化部位の MS 解析から、SnRK2 の「活性化ループ」と呼ばれるドメイン内のセリンが *ARK* によりリン酸化されることがわかった。これまで ABA により SnRK2 が活性化する機構についてのモデルが提唱されているが、*ARK* は、それとは異なる機構で SnRK2 を活性化し、乾燥や低温など複数の環境情報を統合して働く上流因子であることがわかった。*ARK* と同様の機能を持つ遺伝子は主要作物を含めたすべての陸上植物グループに存在するが、シロイヌナズナの B3-MAPKKK もコケの *ARK* 同様、AR7 株の ABA 非感受性を相補することが実験的に示され、植物の環境応答における B3-MAPKKK の普遍的な役割が明らかとなった。AR7 株における変異が触媒活性とは直接関係のない N 末端ドメインに見つかったことから、第 1 章の終わりでは、*ARK* の活性調節における N 末端ドメインの機能解析を行った。一過的発現系を用いたドメイン欠失解析から、猿橋氏は N 末端ドメインのアミノ酸 441-471 に負の制御領域があることを明らかにした。また、AR7 株で変異が見つかった Ser532 を含む 472-786 には *ARK* の活性化に必要な領域があることを明らかにした。

また、第 2 章「UV 照射を利用した変異株の作成と解析」では、紫外線を変異原としてヒメツリガネゴケの原系体細胞から効率よく変異株を単離するプロトコルを確立し、およそ 100 株の ABA 非感受性株を新たに単離した。これら変異株に上記の *ARK* 遺伝子を導入したところ、その多くで ABA 応答が回復したため、これら変異株では *ARK* 遺伝子に変異があることが示唆された。配列の解析からは、予想通り、これら変異株は *ARK* 遺伝子に欠損を持つことが明らかとなった。*ARK* 変異部位については AR7 と同じ Ser532 に変異が導入されていた株が複数株同定されたほか、*ARK* のナンセンス変異も単離された。これらナンセンス株は、原系体の成長が抑制され、莖葉体の成長が顕著であったことから、*ARK* は植物の成長応答においても機能していることが示唆された。さらに、猿橋氏は *ark* のサプレッサーについてもスクリーニングを行った。*ark* 株は塩感受性の成長を示すため、変異処理した原系体細胞を異なる濃度の NaCl で処理後、成長する変異株を単離した。これら株について一過的遺伝子発現系で解析したところ、ABA 応答が部分的に回復していることが明らかとなった。

以上の研究は、ABA シグナルにおける植物 B3-MAPKKK の役割について明確な証拠を示すとともに、環境応答機構の理解に新たな知見を加えた。本学位論文の内容を5人の審査委員会で詳しく審査した結果、背景、実験方法、結果、考察について適切に記述されており、実験結果についても信頼できる手法に基づいて行われていると判断された。

研究内容の一部については、申請者を筆頭著者とした論文が米国科学アカデミー紀要 (*PNAS*) に掲載された。また、共著論文が *New Phytologist* 誌に発表されている。

以上のことから、審査委員会は本論文が博士（理学）の学位授与位に十分な内容を含んでいると判断し、合格と判定した。