

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840087

研究課題名(和文) MAPキナーゼによるICE1のリン酸化と低温シグナル伝達の調節

研究課題名(英文) Phosphorylation of ICE1 and regulation of cold signaling by MAP kinase

研究代表者

三浦 謙治 (MIURA, Kenji)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00507949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物における低温シグナル伝達機構、低温ストレス応答においてMYC型転写因子ICE1は重要な役割を担っている。ICE1の相互作用因子としてリン酸化に関わると考えられるMAPキナーゼMPK4が単離された。mpk4変異体では低温ストレス感受性を示し、低温誘導性遺伝子の低下もみられた。mpk4変異体を低温ストレスに曝した際の遺伝子発現をマイクロアレイ解析にて調べた。公開マイクロアレイと比較したところ、mpk4変異体における発現変化はmkk2変異体やice1変異体と似ており、CBF2過剰発現体とは逆であり、MKK2-MPK4-ICE1-CBFによる遺伝子発現調節が行われていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：ICE1, MYC transcription factor, plays an important role in cold signaling mechanism and in response to cold stress in plants. MPK4 encoding MAP kinase has been isolated as an interactor of ICE1. The mpk4 mutant exhibited cold sensitivity and several cold-inducible genes were down-regulated in the mutant. The gene expression profile at the time of exposure to cold stress was investigated in the mpk4 mutant by microarray analyses. When compared with published microarray data, expression profile of mpk4 was similar to that of mkk2 or ice1 mutant and was contrary to the CBF2 overexpression plants. These results suggested that cold signaling is regulated by MKK2-MPK4-ICE1-CBF pathway.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：低温シグナル伝達 低温ストレス応答 キナーゼ 植物 サリチル酸

1. 研究開始当初の背景

植物における低温シグナル伝達機構、低温ストレス応答において、MYC 型転写因子である ICE1 は重要な働きを担っている。ICE1 の調節機構として翻訳後修飾因子としてユビキチン化による ICE1 の分解が低温ストレス後 15 時間以降で起こることが明らかになった (Dong et al., PNAS 2006)。また、ICE1 は SUMO 化によりユビキチン化と拮抗することで、ICE1 の安定化に関わっていることが明らかとなった (Miura et al., Plant Cell 2007)。しかし、ICE1 がどのように活性化されるのか、その活性化がどのようなシグナル伝達によってもたらせるのかは分かっていなかった。

一方で、MAP キナーゼカスケードの研究により、MPK4 (MAP キナーゼ) 及び MPK6 は低温によって MKK2 (MAP キナーゼキナーゼ) により活性化され、MKK2 が低温ストレス応答や低温シグナル伝達に関わっていることが明らかとなってきた (Teige et al., 2004)。また、MKK2 は MEKK1 (MAP キナーゼキナーゼキナーゼ) によりリン酸化されることから、MEKK1-MKK2-MPK4 というリン酸化リレーが構成されていることが明らかになってきた (Rodriguez et al., Annu Rev Plant Biol 2010)。

我々は ICE1 の調節機構を明らかにする目的で ICE1 相互作用因子を酵母 2 ハイブリッドスクリーニングにより単離してきた。その中に、MPK4 及び MPK6 が含まれていた。ICE1 相互作用因子としてキナーゼが働くことは、これまで全く報告がなく、我々が単離した MAP キナーゼが ICE1 にどのように働くのかは全分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では MAP キナーゼが ICE1 をどのように調節するか、低温ストレス応答にどのように関わるかを明らかにすることで、MPK の低温シグナル伝達における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、MAP キナーゼ変異体 *mpk4* および *mpk6* を用いて、低温ストレス感受性および低温誘導性遺伝子の発現量を調べることで、これらの MAP キナーゼが低温シグナル伝達及び低温ストレス応答に関わっているかを明らかにした。具体的には、*mpk4* および *mpk6* 変異体およびコントロールとして野生株を低温に曝し、生存率を明らかにすることで、凍結耐性を調べた。低温誘導性遺伝子の発現評価に関して、野生株及び *mpk4* 変異体を低温に曝し、3, 6, 12, 24, 72, 168 時間後にサンプリングを行った。これらの植物体から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製したのち、低温誘導性遺伝子である *DREB1A*, *DREB1B*, *DREB1C*, *COR47*, *KINI*, *COR15A*, *RD29A* 遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。この際、SYBR を用い

て定量化した。

低温誘導性遺伝子の発現調節を包括的に調べる目的で、低温処理 0, 3, 24 時間後の野生株および *mpk4* 変異体から RNA を抽出して、マイクロアレイ解析を行った。これらのマイクロアレイデータを公開されているマイクロアレイデータ (低温処理、サリチル酸処理、*mkk2*, *ice1-D* 変異体、*DREB1C* 過剰発現体) と比較した。

4. 研究成果

(1) ICE1 と相互作用する MAP キナーゼのうち、*mpk4* は低温耐性を示したが、*mpk6* は低温耐性を示さなかった。

ICE1 と MPK との相互作用は酵母 2 ハイブリッド解析により明らかとなった (図 1) が、この相互作用を確認するため、BiFC (bimolecular fluorescence complementation) により、相互作用の確認を行った。この方法では N 末端の YFP に ICE1 を融合させ、C 末端 YFP に MPK を融合させ、ICE1 と MPK が相互作用すれば、完全な YFP として蛍光を発するものである。ICE1-MPK4 及び ICE1-MPK6 では相互作用による YFP 蛍光が観察され、ICE1 は MPK4, MPK6 ともに相互作用をすることが明らかとなった (図 2)。

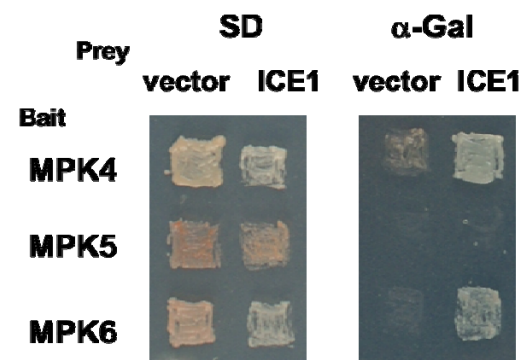


図 1. 酵母 2 ハイブリッド解析による ICE1 と MAP キナーゼとの相互作用。

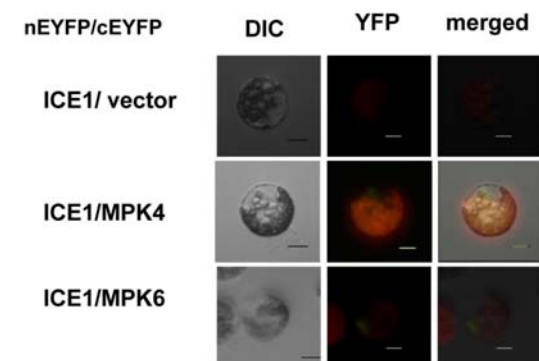


図 2. BiFC 解析による ICE1 と MAP キナーゼとの相互作用。

そこで、これらの変異体を用いて低温ストレス耐性を調べたところ、*mpk4* では著しい低

温ストレス感受性を示したのに対して、*mpk6* は野生株とほとんど変わらなかった。このことから、相互作用を示す MAP キナーゼのうち、*MPK4* が低温ストレス応答に重要な働きを示していることが示唆された (図3)。

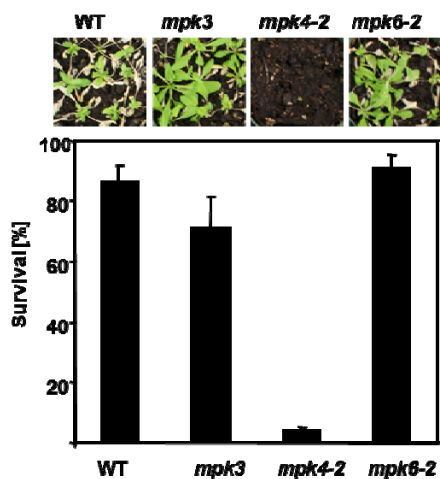


図3. *mpk4* 変異体は低温ストレス感受性を示した。

(2) *MPK4* による低温シグナル伝達の調節

上記研究により、*MPK4* が低温ストレス応答に関わっていることが明らかになったので、*mpk4* と野生株について、*DREB1A*, *DREB1B*, *DREB1C*, *COR47*, *KIN1*, *COR15A*, *RD29A* といった低温誘導性遺伝子の発現を調べた。その結果、*mpk4* 変異体では、これらの遺伝子発現上昇が野生株に比べて低かった (図4)。このことから、*MPK4* は低温シグナル伝達に関与して、これらの低温誘導性遺伝子の発現を調節していることが示唆された。

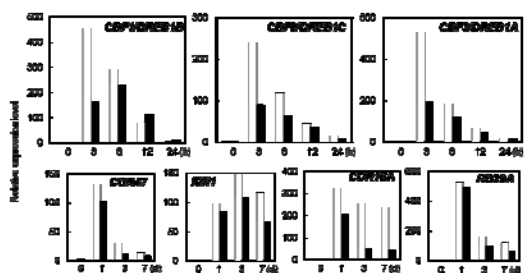


図4. *mpk4* 変異体では低温誘導性遺伝子の発現低下がみられた。

そこで、包括的な発現プロファイルを明らかにする目的で、*mpk4* 変異体と野生株を比較したマイクロアレイ解析を行った。植物を低温ストレス処理を行って 0, 3, 24 時間後にサンプリングした。この植物から RNA を抽出し、品質を検査したのちに、マイクロアレイ解析を行った。本研究により、低温誘導時に *mpk4* 変異体で発現量の変わるものが明らか

となったが、*mpk4* はこれまでも研究が進められており、サリチル酸を蓄積することが分かっている (Gao et al., Cell Res. 2008)。そこで、本研究で得られたマイクロアレイデータと公開済のマイクロアレイデータのうち、低温ストレス応答、サリチル酸応答、*mkk2*, *ice1-D* 変異体及び *DREB1C* 過剰発現体における発現プロファイルを抽出して、*mpk4* 変異体との比較を行った。そうすると、いくつかの低温誘導性遺伝子の発現低下が *mpk4* 変異体で見られた。さらに、*mpk4* 変異体の発現プロファイルはサリチル酸応答および *mkk2* 変異体、*ice1-D* 変異体とよく似ていた (図5)。また、*DREB1C* 過剰発現体とは逆の発現プロファイルを示したことから、*MKK2-MPK4-ICE1-DREB1* といったシグナル伝達の可能性が示唆された。また、この結果はサリチル酸と低温ストレス応答との関連性も示すものである。実際に、先行研究においても、低温ストレス応答を制御する遺伝子として同定された *CAMTA3* (Doherty et al., Plant Cell 2009) がサリチル酸蓄積に負の働きを示す *AtSRI* と同じ遺伝子 (Du et al., Nature 2009) であつたり、*ice1-D* 変異体は低温ストレス感受性を示す一方で、サリチル酸を蓄積して病原菌に抵抗性を示す (Zhu et al., Plant Physiol 2011) という研究が報告されている。これらのことを考慮すると、低温ストレス応答とサリチル酸の蓄積には何らかの関連性があると推測される。

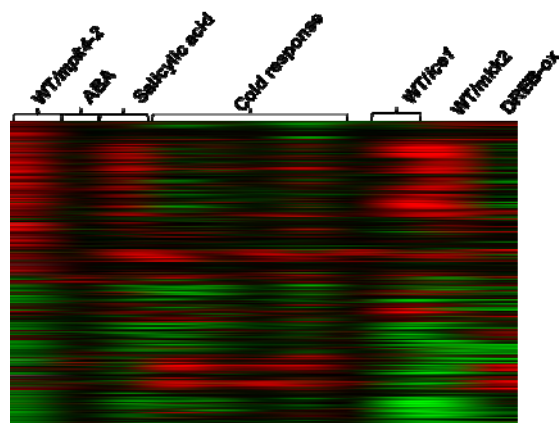


図5. 発現プロファイルの比較。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Yamamoto T, Okuda H, Nozawa R, Furukawa J, Miura K (2015) Enhancement of cold tolerance promotes resistance to aluminum stress. *Int. J. Plant Biol. Res.* 3: 6、査読有
- ② Pitaksaringkam W, Matsuoka K, Asahina M, Miura K, Sage-Ono K, Ono M, Yokoyama

R, Nishitani K, Ishii T, Iwai H, Satoh S (2014) *XTH20* and *XTH19* regulated by ANAC071 under auxin flow are involved in cell proliferation in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.* 80: 604-614、査読有

なし

(3)連携研究者

なし

[学会発表] (計5件)

- ① 奥田大貴、野澤理恵子、古本強、三浦謙治 PIF4 as a negative regulator for cold tolerance to control function of ICE1. 第57回日本植物生理学会 2016年3月18日~20日 岩手大学(岩手県盛岡市)
- ② 三浦謙治、芝勇人、中澤真知子、奥田大貴 Calmodulin-like protein, an interactor of ICE1, for cold signaling and tolerance. 第57回日本植物生理学会 2016年3月18日~20日 岩手大学(岩手県盛岡市)
- ③ 太田賢、佐藤愛子、野澤理恵子、Jian-Kang Zhu、三浦謙治 ICE1 相互作用因子 MYC タンパク質による負の低温シグナル調節。第56回日本植物生理学会 2015年3月16日~18日 東京農業大学(東京都世田谷区)
- ④ 三浦謙治、芝勇人、野澤理恵子、中澤真知子 Calmodulin-like protein, an interactor of ICE1, for cold signaling and tolerance. *The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing* 2016年3月13日~15日 産業技術総合研究所 臨海副都心センター(東京都江東区)
- ⑤ 三浦謙治 低温シグナル伝達機構の分子生物学的研究 第32回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会 奨励賞受賞講演 2014年8月21日 アイーナいわて県民情報交流センター(岩手県盛岡市)

[図書] (計1件)

- ① 三浦謙治、村田芳行 (2015) サリチル酸による気孔閉鎖と乾燥耐性 バイオサイエンスとインダストリー 73、134-136

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.gene.tsukuba.ac.jp/~kmiura/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 謙治 (MIURA Kenji)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00507949

(2)研究分担者