

藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書

(西暦) 2026年5月20日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 行彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 東海国立大学機構 名古屋大学

職 名 特任講師 Co-PI

氏 名 下遠野 明恵



【提出書類】

(1) 研究実施概要報告書 (本紙)

添付書類 (A4 版 3 枚以内) : 研究状況を示す写真等の資料

(2) 収支報告書

添付書類 : 助成金を充当した経費の領収書

領収書を添付しない場合 : 支払一覧表と支払部門担当者記名捺印

④

(1) テーマ

※スペースが足りない場合は、枠を追加いただいて構いません。

植物細胞における乾燥ストレス認識機構の解明

(2) 本研究の期間

(西暦) 2025年4月～2026年3月

(3) 本研究の目的

植物は動物と比べて、動けないという生存に不利な条件がある一方で、環境変化への適応能力に秀でていると言われてきた。しかし、この適応能力の発揮に関わる具体的な分子機構は不明瞭な点が多く残されている。申請者はこれまでに様々な環境下で生息する植物たちの環境ストレス認識機構の研究に携わってきており、環境ストレスの情報分子としてペプチド分子とその情報分子の受け手であるロイシンリッチリピート型受容体複合体を見出すことに成功している。

本研究では、環境ストレスのなかでも、植物の生育に重篤な影響を及ぼす乾燥ストレスに着目した。申請者がこれまでに見出してきた、乾燥ストレス応答に寄与する受容体複合体の分子機能を解析することで、細胞内シグナルカスケードの起点に繋がる経路を明らかにし、植物細胞が周囲の乾燥ストレスをどのように認識して標的細胞へ応答を伝達するのかを解明したいと考えた。

(4) 本研究の概要

本研究では、申請者がこれまでに見出した環境ストレスのトランスミッターとして機能するペプチド分子に着目し、ペプチド分子がどのように乾燥ストレス応答と連携しながら生理作用の発揮に寄与するのか、その細胞内シグナル伝達の起点となる現象の解明を目的とした。先行研究において申請者は、乾燥ストレスに関わる受容体複合体の存在を明らかにしており、本研究では特に、その受容体複合体の細胞質側に保存されているキナーゼ活性ドメインに注目した。

まず、当該キナーゼドメインをサブクローニングにより単離し、組換えタンパク質として調製した。その後、リン酸化取り込み法を用いた生化学的解析を行い、キナーゼ活性の評価を実施した。さらに、質量分析装置を用いた解析により、基質タンパク質上のリン酸化部位を同定することに成功した。加えて、同定した基質のリン酸化部位に変異を導入した遺伝子改変植物体を作成し、生理応答試験を行うことで、リン酸化制御と細胞応答との関連性を検証した。

その結果、申請者が見出した機能モジュールは、標的細胞膜上に発現する受容体複合体を介して、環境ストレス応答のハブとして働くタンパク質を直接リン酸化し、その下流の細胞内シグナル経路を活性化することが明らかとなった。さらに、リン酸化部位に変異を導入した植物体では応答性が著しく低下したことから、このリン酸化反応が乾燥ストレス応答において重要な役割を果たしていることが実験的に示された。以上の成果は、ペプチド分子を介したストレス応答ネットワークの分子基盤を理解する上で重要な知見を提供するものである。

(5) 本研究の内容及び成果

申請者は、植物環境情報分子の研究に携わるなかで、環境ストレスの"受け手"として機能する受容体の機能に興味を持ち、この受容体と相互作用する因子と活性化に必要な受容体複合体を発見した。これまでに、受容体と直接相互作用する分子が見つかった例は多くなく、植物が、周囲の環境変動をどのように標的細胞に伝達し対抗する術を備えるのか、という根源的な謎の解明に近づくユニークかつ重要な成果であると考えられる。

本研究において、申請者は、乾燥ストレスを受容する役割を持つ細胞膜上受容体複合体が、標的細胞である孔辺細胞内で、どのように下流の分子ネットワークと連動して作用するのかを分子レベルで明らかにする実験をおこなった。

申請者が見出した受容体の細胞質側には、基質タンパク質をリン酸化により制御するキナーゼドメインが保存されていたことから、この領域全長をクローニングした。次に、大腸菌の系で組み換えタンパク質を発現させるベクターの選別、さらに発現条件における至適条件の検討、また発現が認められる条件で回収した細胞からタンパク質を抽出する条件の検討、また抽出したタンパク質を分画および精製するカラムクロマトグラフィーの方法の検討など数々の予備実験を重ね、最終的に精製度の高い組み換えタンパク質を得ることができた。

モデル植物であるシロイヌナズナには、ロイシンリッチリピート構造をもつ7回膜貫通型キナーゼ(LRR-RK)をコードする遺伝子が200種類以上存在する。これらは遺伝子配列やドメイン構造によって14種類のサブファミリーに分類され、低分子化合物やホルモン分子と相互作用しうると考えられる。申請者が見出した受容体もLRR-RKに属する受容体に大別されるが、異なるサブファミリーで構成されるヘテロな受容体複合体であった。従って、構造変化により、細胞内へと情報が伝達している可能性が高いと考えられた。

そのため申請者は、LRR-RK受容体の細胞内領域にコードされているキナーゼドメインを高次構造から予想し、大腸菌の系で発現できる組み換えタンパク質を精製し、*in vitro*の系におけるリン酸化アッセイを行った。申請者は先行研究でトランスクリプトーム解析を実施し、複数の環境ストレスマーカー遺伝子が短期間で発現量が増大する事実を見出していたことから、これらの遺伝子の活性化に重要な役割を持つことで知られるSRK2Eが、基質の有力候補であると予想した。数々の予備試験を繰り返した結果、LRR-RK受容体側はGSTタグをつけた組み換えタンパク質、SRK2EはMBPタグが最適であることがわかったため、これらのタンパク質を精製し、放射性同位体によるラベルでリン酸化の有無を調べた。さらに、LC-MS/MS解析で特定したリン酸化部位に変異を導入したSRK2Eの活性を測定し、確かに活性化に重要な働きを持つ残基であることが明らかとなった(Fig.1)。さらに、このアミノ酸にリン酸化が起きないように変異を導入した遺伝子組換え植物体を作製し、その植物体を用いた気孔コンダクタンスの測定を行った。その結果、*srk2e*の機能欠損株ではストレスホルモンとして知られるABAの添加に対する不感受性を示すにもかかわらず、SRK2Eの遺伝子全長を導入した場合には野生型と同等の生理応答を示すなど機能回復が見られる一方で、LRR-RKによるリン酸化部位が非リン酸化状態に保たれた機能改変株では*srk2e*機能欠損株とほぼ同程度の不感受性を示した(Fig.2)。

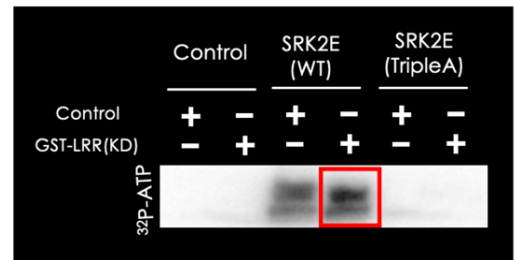


Fig.1 受容体キナーゼドメインによるSRK2Eの活性化が確認された(赤枠)

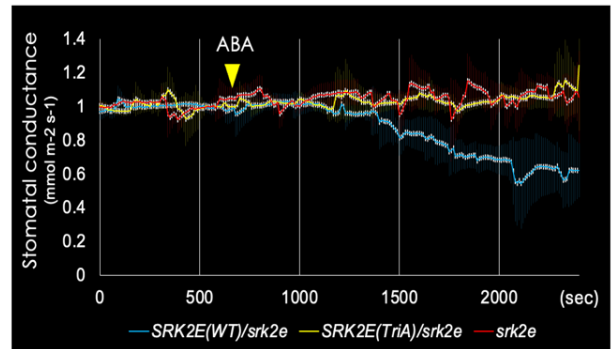


Fig.2 気孔コンダクタンスに基づく相補性試験

以上のことから、SRK2Eタンパク質の生理応答の発揮には、受容体によるリン酸化が重要な働きを有することが、*in vitro*の系ならびに植物体を用いた*in vivo*系の両方で実験的に確かめることができた。

(6) 本研究の考察

本研究では、標的細胞膜上に特異的に発現する受容体複合体の特性に着目し、標的細胞内のシグナルカスケードと受容体を介したシグナル伝達機構が相互に連携していることを明らかにした。LC-MS/MS解析の結果、環境シグナル伝達経路の中核を担うハブタンパク質（SRK2E）の活性中心が直接リン酸化されることを確認した。さらに、ゲル内リン酸化アッセイを用いた*in vitro*実験により、このリン酸化制御がタンパク質の活性化に必須であることを示した。

加えて、当該リン酸化残基がリン酸化を受けないよう変異を導入した機能改変植物体を作製し、ストレス刺激に対する応答性を評価した。その結果、受容体によるリン酸化部位に変異を有する植物体では、環境刺激に対する応答性が著しく低下することが明らかとなった。以上の結果から、受容体複合体を介したリン酸化制御が、標的細胞内のシグナル応答において重要な役割を担うことが示唆された。

これまでに、植物の環境応答に標準を当てた研究例はほとんどなく、本研究の推進により学術的に重要な知見が得られることが期待できる。また、本研究で得られる成果は、将来的には地球温暖化の抑止策などの緊急の問題解決に直結する可能性が期待できる。

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人藤森科学技術振興財団ならびに関係各位の皆様に、篤く御礼申し上げます。

(7) 共同研究者（所属機関名、役職、氏名）

特記なし

(8) 本研究の成果の公表先

[論文発表]

1. **Shimotohno A.***, Matsubayashi Y., Du, Y., Senthilvadivel V., Suzuki T., Kato H., Kesharwani M., Kono M., Mishiro-Sato E., Kano K., Kojima K., Takebayashi Y., Sakakibara H., Soma F., Tama F., Hirota T., Torii K.U., Yamaguchi-Shinozaki K., Fukuda H. "Local peptide signalling induces stomatal closure under drought stress." *Nature Communications* Vol.17, p.177 (2025)

[招待講演]

1. **Shimotohno A.*** "The Role of Peptide-Receptor Modules in Transducing Environmental Stress Signals" *International Plant Growth Substance Association, IPGSA, United States of America* (2025)

[学会発表]

1. **Shimotohno A.*** and Du Y. "Novel Functions of Peptide Molecules in Environmental Stress Adaptation" The 67th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists (2026)

[注] この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。