

博士論文

定量プロテオミクスによる陸上植物の
アブシジン酸シグナル伝達ネットワークの大規模解析

Analysis of protein phosphorylation networks of abscisic acid
based on quantitative proteomics in *Arabidopsis thaliana* seeds and
Physcomitrella patens

東京農工大学大学院

生物システム応用科学府 生物機能システム科学専攻

平成 27 年度博士後期課程入学 天谷 杏奈

指導教員 梅澤 泰史

目次

第 1 章 シロイヌナズナ種子のリン酸化プロテオーム解析によるアブシジン酸シグナル伝達経路の解明

1.1 序論

1.2 実験方法

1.2.1 CAPS 解析と半定量的 PCR による遺伝子に導入された変異の検出

1.2.2 シロイヌナズナの種子の発芽試験

1.2.3 シロイヌナズナの種子の ABA 処理

1.2.4 シロイヌナズナの種子のタンパク質抽出 (LC-MS/MS 用)

1.2.5 リン酸化ペプチドの濃縮

1.2.6 nanoLC-MS/MS システムを用いたシロイヌナズナ種子の質量分析

1.2.7 ゲル内リン酸化実験

1.3 結果

1.3.1 ahg1ahg3abi1 の ABA 感受性

1.3.2 シロイヌナズナ種子のリン酸化プロテオーム解析の概要

1.3.3 野生型と ABA 応答性の変異体の比較分析

1.4 考察

第2章 ヒメツリガネゴケのプロテオームデータ解析による ABA 応答性タンパク質の探索

2.1 序論

2.2 実験方法

2.2.2 *P.patens* の生育条件と ABA 処理

2.2.3 *P.patens* の原糸体からのタンパク質抽出

2.2.4 リン酸化ペプチドの濃縮

2.2.5 nanoLC-MS/MS システムによる解析

2.2.6 主成分分析

2.2.7 モチーフ解析

2.2.8 *in vitro* キナーゼアッセイ

2.3 結果

2.3.1 *ppab1a/b* と AR7 の ABA 感受性

2.3.2 リン酸化プロテオーム解析結果概要

2.3.3 野生型と ABA 応答性の変異体の比較分析

2.3.5 *P.patens* における ABA 応答性リン酸化ペプチドの分類

2.3.6 ABA 応答性ペプチドの *in vitro* リン酸化実験

2.4 考察

第1章 シロイヌナズナ種子のリン酸化プロテオーム解析によるアブシジン酸シグナル伝達経路の解明

1.1 序論

アブシジン酸 (ABA) は植物ホルモンの一つで、多岐にわたる生理的プロセスに関与する。種子の成熟、休眠の誘導と維持、気孔閉鎖など、高等植物に特徴的なプロセスと、細胞の分裂・伸長阻害や低温・乾燥耐性促進などコケ植物を含めた陸上植物に共通のプロセスが存在する。ABA は陸上植物が環境の変化に対して適応するために必要不可欠な情報伝達物質である。近年の集中豪雨や猛暑日などの異常気象によって農業に甚大な被害を与えているため、このような気象の下でも安定して収穫できる作物を開発することが解決策の一つとなる。そのためには、環境の変化に対して適応するために必要不可欠な情報伝達物質である、ABA 応答のメカニズムを解明することは重要である。

最近の研究によって高等植物の ABA シグナル伝達経路が明らかになりました。細胞内の ABA シグナル伝達経路は PYR/PYL/RCAR 受容体とグループ A の 2C 型プロテインフォスファターゼ (PP2C) とサブクラスIIIの SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2) の3つの主要な構成因子から成る。ABA 非存在下では、PP2C は直接 SnRK2 を脱リン酸化する。シロイヌナズナではグループ A 型の PP2C ファミリーは 9 個のメンバーから構成される。このグループに所属している AHG1 と AHG3 の機能欠損変異体である *ahg1-1* と *ahg3-1* は野生型と比較して休眠性が向上し、低濃度の ABA で初期の実生の生長が遅れる (Nishimura et al., 2007; Yoshida et al., 2006)。ABI1 や ABI2 の T-DNA 挿入体も *ahg1-1* や *ahg3-1* 程度ではないが休眠性の向上と初期の実生の生長が遅れた。よって、これらの PP2C は種子の休眠の維持や初期の実生の生長における ABA シグナル伝達経路で負の制御因子として機能することを示している。SnRK2 ファミリーは 3 つのサブクラスに分けられ、サブクラスIIIの SnRK2.2、SnRK2.6 と SnRK2.3 が ABA シグナル伝達に主要に関与する。この 3 つの SnRK2 を欠失させた *srk2dei* 変異体は高い湿度の条件下に置くと休眠性が低下によって莢の中でも発芽してしまう穂発芽がおこる (Nakashima et al., 2009)。よって、サブクラスIIIの SnRK2 は種子が休眠を維持するのに重要な役割を果たすことを示している。環境ストレスや特定の発生段階で ABA レベルが上昇すると ABA-受容体の結合体が PP2C と相互作用することで、フォスファターゼ活性を阻害する。これによって、SnRK2 は活性化され、ABA-responsive element (ABRE) binding proteins (AREB)、ABRE-binding factor (ABF) や ABA-INSENSITIVE 5 (ABI5) のような basic leucine zipper (bZIP) 転写因子やイオンチャネルなどの様々な基質がリン酸化される。よって、ABA シグナル伝達経路においてタンパク質のリン酸化が重要であることがわかる。しかし、SnRK2 に直接リン酸化され、ABA 応答に関与するリン酸化タンパク質は少数しか見つかっていない。

質量分析計の精度の向上とリン酸化ペプチドを濃縮する技術が確立したため、大規模で *in vivo* のリン酸化タンパク質を同定することができるリン酸化プロテオーム解析が様々な組織や処理条件で行われるようになった。当研究室でも、シロイヌナズナの実生でリン酸化プロテオーム解析を行い 2204 個のリン酸化タンパク質を同定することに成功した (Umezawa et al., 2013)。また、SnRK2 の破壊株 (*srk2dei*) のリン酸化プロテオームデータを比較解析に用いることで、SnRK2 の基質を同定することができた。そこで、主要な ABA シグナル伝達構成因子 (ABA 受容体、PP2C、SnRK2) によって制御されているリン酸化タンパク質を明らかにするために、シロイヌナズナの種子でもリン酸化プロテオーム解析を行った。PP2C 三重機能欠損型変異体 (*ahg1ahg3abi1*) のリン酸化プロテオームデータを比較解析に用いることで、先ほど示したようなリン酸化タンパク質を同定しようとした。実生と同じように SnRK2 破壊株を用いることが有効であったが、この変異体からは十分な量の種子を採取するのが難しいためかわりに PP2C 三重機能欠損変異体を用いることにした。

1.2 実験方法

1.2.1 CAPS 解析と半定量的 PCR による遺伝子に導入された変異の検出

AHG1 と *AHG3* に導入されていたミスセンス変異を確認するために CAPS 解析を行った。サーマルサイクラーを使って、*AHG1* と *AHG3* の遺伝子断片を増幅した後、それぞれ制限酵素 *AflIII* と *BspHI* で 37°C、overnight で消化を行った。消化後、遺伝子断片を電気泳動で流した。

ABII には T-DNA が導入されているので、全長の遺伝子を増幅するプライマーを設計し、サーマルサイクラーを用いて増幅を行った。増幅後の遺伝子産物を電気泳動に流した。

1.2.2 シロイヌナズナの種子の発芽試験

シロイヌナズナの種子を 50 個ほどエッペンチューブに入れ、70% エタノール 1ml で洗浄後、滅菌溶液（1% 次亜塩素酸、0.02% Triton X-100）を 1 ml 加え 10 分間振盪させることで滅菌する。滅菌溶液を捨て滅菌した蒸留水を 1 ml 加え、良く混ぜてから蒸留水を捨てた。この操作を 5 回繰り返すことで、種子の周りについている滅菌溶液を洗い流した。シロイヌナズナ種子を 0、0.1、0.5、1 μM ABA が含まれた GM 培地に播種した後に春化处理を行った（4°C、3 日間、遮光）。春化处理後、グロースチャンバーで 22°C、白色光（50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）、銘記 16 時間 / 暗期 8 時間の条件 2 週間生育した。1 日ごとに発根、発芽、緑化している種子の数を数えた。

1.2.3 シロイヌナズナの種子の ABA 処理

シロイヌナズナの長角果が完全に茶色になり、dry seed になったら種子を採取し、3 カ月程貯蔵し ABA 処理を行った。1 サンプル シロイヌナズナ種子を約 75 μl ずつ用意し、濾紙の上で 2 ml の蒸留水を 4°C、3 日間種子に吸水させた。濾紙で種子に付いている水を除去後、50 μM ABA を 2 ml 吸水させた濾紙で 0、1、3、10 時間 ABA 処理を行った。ABA 処理後濾紙で種子に付着した水をふき取り、ジルコニアボール 4~5 個と一緒にマイクロチューブに入れ液体窒素で凍らせた。

1.2.4 シロイヌナズナの種子のタンパク質抽出（LC-MS/MS 用）

抽出バッファー（10mM Tris (pH9.0)、8M Urea、Phosphatase Inhibitor Cocktail2 1/50 量、Phosphatase Inhibitor Cocktail3 1/50 量）を当日調整した。ジルコニアビーズとシロイヌナズナの種子の入ったバイアルを Shake man2 を使って粉砕した。液体窒素から取り出したバイアルを、Shakeman2 で最高速度、9 秒ほど振り、液体窒素で凍らせた後、再度 9 秒振った。抽出バッファーを 1ml 加え、Shake man で一瞬振り、バッファーに浸透させた。室温で 30 分反応させ、時々上下に混ぜた。13000rpm、25°C、10 分間遠心分離を行った。上清を 200 μl

チップで計 800 μl 取った。BCA 法によってそれぞれのサンプルのタンパク質濃度を測定した。

1.2.5 リン酸化ペプチドの濃縮

タンパク質の濃度測定結果を基に、全てのサンプルのタンパク質濃度が同じになるように調整した。1 サンプル 400 μg になるようにタンパク質抽出液をエッペンチューブに分注し、10 mM DTT (1 M DTT を 50 mM NH_4HCO_3 で 100 倍希釈) を加え 25 $^\circ\text{C}$ 、30 分間静置後 (還元)、50 mM IAM (500 mM IAM を 50 mM NH_4HCO_3 で 10 倍希釈) を加えて 25 $^\circ\text{C}$ 、20 分間、遮光下でアルキル化した。1/2 LysC (100 μg LysC を 200 μl 50 mM NH_4HCO_3 で希釈) を加え、25 $^\circ\text{C}$ 、3 時間でタンパク質を分解後、最初の溶液量の 4 倍以上の 50 mM NH_4HCO_3 を加え、1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Trypsin を加えて 25 $^\circ\text{C}$ 、一晚培養することでタンパク質をさらに分解した。

SDB-XC Empore disk membranes (3M, Haverhill, MA, USA) を詰めた Stage Tips を用いて脱塩された。1 カラム 400 μg のサンプルを脱塩した。Hydroxyl acid-modified metal oxide chromatography (HAMMOC) を用いてリン酸化ペプチドの濃縮を行った。リン酸化ペプチドの濃縮には、C8-Stage Tips と TiO_2 bulk beads (Titanshere ; GL Sciences Inc., Torrance, CA, USA) を使って MOC tips を用いた。

1.2.6 nanoLC-MS/MS システムを用いたシロイヌナズナ種子の質量分析

濃縮されたペプチドは LTQ-OrbitrapTM (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)、UltiMate[®]3000 RS nano-LC システム (Dinex, Sunnyvale, CA, USA) と HTC-PAL[®] autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) の機器が用いられた。ReproSil[®] C18 (3 μm ; Dr. Maisch, HPLC GmbH, Ammerbuch, Germany) が self-pulled needle (150 mm length \times 100 μm inside diameter, 6 μm opening) に詰められ、5 μL サンプルを導入し、500 nL/min の流動速度で流した。mobile phases は 0.5% acetic acid (A) と 0.5% acetic acid と three-step linear gradient の 80% acetonitrile (B) で構成される。80% acetonitrile (B) は 5–10% B を 5 分間、10–40% B を 60 分間、40–100% B for 5 分間、さらに 100% B を 10 分間行った。mass spectrometry (MS) scan range は mass/charge ratio を (m/z) 300–1,400, また top 10 precursor ions の条件に当てはまるペプチドのみ、続けて tandem mass spectrometry (MS/MS) scans が行われた。

液体クロマトグラフィーによる分析が終了後、MASCOT search (Matrix Science, Boston, MA, USA) というソフトウェアを用いることで、TAIR version 10 を基に、ペプチドとリン酸化部位が予測された。それぞれのリン酸化ペプチドは、観測された monoisotopic ions の m/z と retention time を基にイオン強度が survey MS scan に統合されることで定量化された。抽出された observed m/z が 5 mDa の ion chromatogram は 2dical2 を使用することで Peak integration が行われた。それぞれのサンプルの定量的データは total peak area を用いることで標準化され、2つの定量値の間に違いがあるどうか分析するために Student's t-test (n = 4) が行われている。

1.2.7 ゲル内リン酸化実験

ABA 処理時の SnRK2 のリン酸化活性を調べる方法としてゲル内リン酸化実験を行った。基質としてほとんどのキナーゼの基質となるヒストン (Histone from calf thymus Type III-S、SIGMA) を用いた。SnRK2 のゲル内リン酸化実験に使用した試薬を以下に示す。

洗浄液I : 25 mM Tris-HCl (pH7.5)、5 mM NaF、0.1 mM Na₃VO₄、0.5 mg/ml BSA、0.1 % Triton X-100、0.5 mM DTT

Renature Buffer: : 25 mM Tris-HCl (pH7.5)、5 mM NaF、0.1 mM Na₃VO₄、1 mM DTT

Reaction Buffer : 40 mM HEPES-KOH (pH7.5)、0.1 mM EGTA、20 mM MgCl₂、1 mM DTT

洗浄液II : 5% トリクロロ酢酸、1% ピロリン酸ナトリウム

粗抽出タンパク質 96.7 µg/ 37.5 µl と 7.5 µl の 6×サンプルバッファーを混合し 3 分間煮沸した。サンプルを 0.5 mg/ml ヒストンを含む SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、140V の低電圧で 120 分間電気泳動した。電気泳動後、ゲルを 100 ml 洗浄液Iが入ったタッパーを加え、室温で 30 分間振盪した。この操作を 3 回繰り返して、ゲルを洗浄した。次にタッパーに Renature Buffer を 100 ml 入れ、低温室 (4°C) で振盪して、タンパク質をリホールディングした。この操作を 5 繰り返し、最初の 3 回は 30 分間、4 回目は 10 時間以上、5 回目は 30 分間行った。タッパーに Reaction Buffer を 100 ml を入れ 1 時間振盪した。その後プラスチックバッグにゲルを入れ、1.85 MBq[γ-³²P]ATP (PerkinElmer) と 20 µM ATP を 12.5 ml Reaction Buffer と混ぜ、室温で 2 時間振盪した。振盪後、100 ml 洗浄液IIで 30 分間振盪してゲルを洗浄した。これを 4 回繰り返し、余分の放射線物質を取り除いた。ゲルを 5% グリセロールで 5 分間振盪した。ゲルを濾紙の上に乗せラピドドライ (ATTO) を用いて、完全に乾燥させた。オートラジオグラフ用いて、リン酸化シグナルを検出した。

1.3 結果

1.3.1 *ahg1ahg3abil* の ABA 感受性

クレード A 型との PP2C の *ABII*、*AHG1*、*AHG3* は ABA シグナル伝達経路の主要な構成因子であり、この 3 つの PP2C が種子の発芽時の ABA 応答に大きな影響を与えている (Nishimura et al., 2007; Yoshida et al., 2006)。そこで、種子の発芽時の ABA 応答に *ABII*、*AHG1*、*AHG3* がどれほどの影響を与えるか確認を行うために、その変異体の種子を岡山大学の平山隆先生から譲り受けた (*ahg1ahg3* #832、*ahg1ahg3* #2135、*ahg1ahg3* #2136、*ahg1ahg3abil* #1、*ahg1ahg3abil* #2)。

最初に、この機能欠損変異体に目的の遺伝子に変異が導入されているか確認を行った。*AHG1*、*AHG3* にはミスセンス変異が導入されているので、CAPS 解析を行った。変異が導入されている場合のみ、制限酵素によって遺伝子産物が分断される。*ahg1ahg3* #832、*ahg1ahg3* #2135、*ahg1ahg3* #2136、*ahg1ahg3abil* #1、*ahg1ahg3abil* #2 では *AHG1* と *AHG3* の遺伝子産物が分断していたが、野生型では分断されていなかった (図 1)。このことから変異体には *AHG1* と *AHG3* に変異が導入されていることが確認できた。

ABII には T-DNA が導入されているので、全長の遺伝子を増幅するプライマーを設計し、遺伝子を増幅を行った。*ABII* に T-DNA が挿入されている場合、正常に増幅されず、電気泳動後バンドが現れない。*ahg1ahg3abil* #1、*ahg1ahg3abil* #2 ではバンドが現れなかったのに対して、野生型と *ahg1ahg3* #832 ではバンド現れた (図 1)。よって、*ahg1ahg3abil* #1、*ahg1ahg3abil* #2 では *ABII* に T-DNA が導入されていることが確認できた。*ahg1ahg3* #832、*ahg1ahg3* #2135、*ahg1ahg3* #2136、*ahg1ahg3abil* #1、*ahg1ahg3abil* #2 には目的の遺伝子に変異が導入されていた。

ahg1ahg3、*ahg1ahg3abil* の種子の発芽時の ABA 感受性を確認するために、発芽試験を行った (図 2)。シロイヌナズナの種子を 0、0.1、0.5、1 μ M ABA が含まれた GM 培地で 2 週間育成し、発根率、発芽率、緑化率を観察した。その結果、*ahg1ahg3abil* #2 のみ野生型と比較して発根率に違いが見られた。発芽率と緑化率では、野生型と比較して変異体で変化が見られた。特に、*ahg1ahg3abil* #2 の種子の発芽時の表現型に変化が見られた。よって、種子の発芽と緑化時に *ahg1ahg3*、*ahg1ahg3abil* は ABA 高感受性を示し、特に *ahg1ahg3abil* #2 は特に高いことが確認できた。

リン酸化プロテオーム解析に必要なサンプル数が多く、種子の数も大量に必要だったので、発芽率が悪くないが ABA 高感受性を示す *ahg1ahg3abil* #1 を実験材料に用いることにした。今後、*ahg1ahg3abil* #1 を PP2C 三重変異体と表記します。

1.3.2 シロイヌナズナ種子のリン酸化プロテオーム解析の概要

リン酸化プロテオーム解析を行うために、シロイヌナズナ種子の野生型と PP2C 三重変異体は 50 μ M ABA で 0、1、3、10 時間 ABA 処理を行い、これを 4 反復用意した。シロイヌ

ナズナ種子の総タンパク質をトリプシン消化し、HAMMOC でリン酸化ペプチドの濃縮を行い、LC-MS/MS システムを使って分析を行った。その結果、269 個のタンパク質に属する 308 個のリン酸化ペプチドを同定できた。705 個あるリン酸化部位のうち、主要なリン酸化アミノ酸残基であるセリンは 69.6%、スレオニンは 23.5%、チロシンは 6.8% だった(図 3A)。この割合はシロイヌナズナ実生の割合と類似していた(Umezawa et al., 2013)。植物のリン酸化プロテオーム解析によって得られる主要なリン酸化アミノ酸残基の割合は類似していることから、HAMMOC によるリン酸化ペプチドの濃縮は成功できたことが示せた。

シロイヌナズナ種子の野生型における ABA 応答性のリン酸化ペプチドを同定するために label-free phosphopeptide quantification 法を用いた。それぞれのリン酸化ペプチドは ion current chromatogram の peak area を使うことで定量化された。定量を標準化した後、野生型と比較して ABA 処理したサンプルの定量値が 2 倍以上または半分以下になっているリン酸化ペプチド群を ABA 応答性のリン酸化ペプチドの候補群としました。22 個の upregulated リン酸化ペプチド候補群 (表 1) と 46 個の downregulated リン酸化ペプチド候補群 (表 2) をそれぞれ得ることができた。

1.3.3 野生型と ABA 応答性の変異体の比較分析

シロイヌナズナ種子ではグループ A 型の PP2C 機能欠損変異体の *ahg1* と *ahg3* では ABA 応答性の SnRK2 が活性化し続けている(Umezawa et al., 2009)。種子の発芽時の表現型からも、*ahg1ahg3abi1* の ABA 応答性タンパク質のリン酸化レベルは上方制御される。リン酸化プロテオームデータの中から以下の条件に当てはまるリン酸化ペプチドを選択した。条件 1) シロイヌナズナの種子の野生型で ABA によってリン酸化レベルが 2 倍以上増加、または 1/2 倍以下減少した ABA 応答性ペプチド (表 1、2)。条件 2) PP2C 三重変異体でのリン酸化レベルが野生型の 2 倍以上である (表 3)。条件 1 に当てはまる ABA 応答性リン酸化ペプチドのうち上方制御されているのは 21 個、下方制御されているのは 46 個だった。条件 2 では 15 個 PP2C 依存的なリン酸化ペプチド候補群を得た。条件 2 に当てはまる 15 個のリン酸化ペプチドのうち、条件 1 にも当てはまるリン酸化ペプチドは上方制御では 0 個だったのに対して、下方制御では 11 個当てはまった (図 4)。よって、上方制御の ABA 応答性リン酸化ペプチド候補群は PP2C によって制御されていない。反対に、下方制御の ABA 応答性リン酸化ペプチドの候補群の大半は PP2C によって制御されていることが分かった。

上方制御の ABA 応答性リン酸化ペプチド候補群には、主要な ABA 構成因子によって制御されている既知のリン酸化タンパク質は同定されなかった (表 1)。また先ほど示したように PP2C 依存的なリン酸化ペプチドの候補群は一つも存在しなかったことから、リン酸化プロテオーム解析に用いた種子は ABA 応答を示していない可能性がある。採取したばかりの種子を数カ月常温で貯蔵する ABA 感受性も低下し、休眠も低下することが分かっている (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006)。そこで、リン酸化プロテオーム解析と同じ ABA 処理条件で ABA 応答を示しているか、ABA 応答性の SnRK2 の活性を調べることがで

きるゲル内リン酸化実験を行った。その結果、3日間吸水した種子では(無処理)では、SnRK2の活性化が見られたのに対して、吸水後に30分間ABA処理を行うだけでその活性化が見られなかったことから、ABA処理によってABA応答性のSnRK2の活性を低下させた。

1.4 考察

この第1章の実験では、PP2C機能欠損変異体のリン酸化プロテオームデータの比較解析によってシロイヌナズナ種子のPP2C依存的なABAシグナル伝達経路を解明することを目指して実験を行っていました。シロイヌナズナ種子のリン酸化プロテオーム解析によって、308個のリン酸化ペプチドが同定することに成功した。2012年にLouis J. Meyer達によって本研究と同様にLC-MS/MSを用いることでシロイヌナズナ種子のリン酸化タンパク質の同定を行っている。この研究では408個のリン酸化ペプチドに所属する、172個のタンパク質が同定された(Meyer et al., 2012)。ほぼ同じ数のリン酸化ペプチド数が同定されたことから、リン酸化プロテオーム解析のプロトコールの確立には成功できた。

3日間春化処理(4°C、遮光)を行った後、50 μ M ABAをシロイヌナズナ種子に1、3、10時間処理した結果、22個のABA-upregulatedリン酸化ペプチド候補群(表1)と46個のABA-downregulatedリン酸化ペプチド候補群(表2)をそれぞれ同定することができた。ABA-upregulatedリン酸化ペプチド群の中には糖新生に関わる酵素である、phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK)とpyruvate orthophosphate dikinase (PPDK)が同定された(表1)。糖新生は種子が実生に生長するのに重要な栄養を得るために必要である。種子は吸水開始と同時に生命維持に必要な様々な反応を再開し始め、休眠打破によって発根すると、同時に実生の構成と生長のために種子の貯蔵物質から糖を合成する。*pck1*と*ppdk*変異体の実生は野生型と比較して種子の貯蔵物質から合成された糖が減少し、実生の生長が遅れる(Eastmond et al., 2015)。よって、PCK1とPPDKは実生の生長に必要な糖の合成で重要な役割を果たすことを示している。今回の解析によって、PPDKは455番目のチロシン残基リン酸化されていることがわかった。PPDKはPPDK-regulatory protein (PDRP)によって455番目のチロシン残基がリン酸化され、これによってPPDKは不活性化状態になることが示されている(Astley et al., 2011)。よって、ABA処理を10時間行うことで、PPDKは不活性化されたことを示唆している。ABA-downregulatedリン酸化ペプチド群の中にはphosphoenolpyruvate carboxylase 1 (PPC1)とphosphoenolpyruvate carboxylase 2 (PPC2)が同定された。この2つのタンパク質はPEPからoxaloacetateを得る反応を触媒することで、炭素や窒素の代謝に関与する(Gregory et al., 2009)。この酵素はリンの欠乏に応答して11番目のセリン残基をリン酸化することで活性化する。同定されたPPC1とPPC2のリン酸化部位が11番目のセリン残基であり、このリン酸化部位が含まれるリン酸化ペプチドが減少していることからPPC1とPPC2がABA処理して3時間で不活性化されていることを示している。発芽試験でABA処理1、3、10時間後いずれの処理時間でも種子の発芽は見られなかったことから、総合して考えると、種子が発芽した後の実生の発生に必要な糖やエネルギーがなくなることから、上記であげた酵素は不活性化されたと考えられる。よって、種子の発芽を抑制にはABAシグナル伝達経路が大きな役割を果たすが、PP2C依存的リン酸化ペプチド群の中にこれらのリン酸化ペプチドはなかった(表3)。よって、これらの背景に示したような

ABA 受容体/PP2C/SnRK2 シグナル伝達経路によってそのリン酸化は制御されていない。ABA とは独立した発芽を抑制するメカニズムが存在の可能性を示している。

ABA-upregulated リン酸化ペプチド群の中に、ヒストン脱アセチル化酵素である HD2A が同定された。HD2A の活性は糖によって誘導され、種子の発芽の抑制に関与する (Colville et al., 2011) 。HXK1 とは独立したシグナル伝達経路であることから、HD2A のシグナル伝達経路はグルコース/HXK1/ABA シグナル伝達の上流または全く独立していると推測されている (Colville et al., 2011; Rolland et al., 2006) 。よって、HD2A は ABA とは異なる要因によってリン酸化された可能性がある。

野生型と比較して *PP2C* 三重変異体で定量値が 2 倍以上増加かつ統計的に差があることを証明されたリン酸化ペプチドを *PP2C* 依存的なリン酸化ペプチド群とした。*PP2C* 三重変異体との比較解析の結果、*PP2C* 依存的なリン酸化ペプチド候補群は全て ABA によって下方制御されていることから (図 4)、1) ABA によって上方制御されたリン酸化タンパク質候補群は *PP2C* と独立して制御されている、または 2) 今回の ABA 処理条件で ABA 応答が誘導されていない可能性を示唆している。ABA によって上方制御されたリン酸化タンパク質群では ABA とは独立して種子の発芽に関与する HD2A が含まれていることから 2 番の仮定の可能性が高い。

第2章 ヒメツリガネゴケのプロテオームデータ解析による ABA 応答性タンパク質の探索

2.1 序論

現生している陸上植物の中で、最基部で分岐したのがコケ植物であることから、よく高等植物と比較されている (Hanada et al., 2011; Knight et al., 1995; Rensing et al., 2008; Wang et al., 2013)。コケ植物のストレス応答のメカニズムは一部被子植物に保存されている。例えば、どちらの植物でも ABA がストレス応答の中心的な役割を果たす (Cutler et al., 2010; Takezawa et al., 2011; Umezawa et al., 2010)。このことから、コケ植物と被子植物の間で ABA シグナル伝達経路のメカニズムが保存されているか調べるきっかけになった。

最近の研究によって高等植物の ABA シグナル伝達経路が明らかになりました。細胞内の ABA シグナル伝達経路は PYR/PYL/RCAR 受容体とグループ A の 2C 型プロテインフォスファターゼ (PP2C) とサブクラス III の SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2) の 3 つの主要な構成因子から成る。ABA 非存在下では、PP2C は直接 SnRK2 を脱リン酸化する。しかし、環境ストレスや特定の発生段階で ABA レベルが上昇すると ABA-受容体の結合体が PP2C と相互作用することで、フォスファターゼ活性を阻害する。これによって、SnRK2 は活性化され転写因子やイオンチャネルなどの様々な基質がリン酸化される。よって、ABA 応答におけるリン酸化シグナル伝達ネットワークの重要性がわかる。

リン酸化プロテオミクスは最近発展してきた技術で *in vivo* で大規模にリン酸化タンパク質を検出できる解析方法である。リン酸化プロテオミクスによって以下の 3 つの解析結果を得ることができる。1) リン酸化されたタンパク質の同定、2) リン酸化部位の同定、3) *in vivo* でのリン酸化レベルの測定することができる。これらの解析方法によって複雑なリン酸化ネットワークを明らかにする基盤にすることができ、タンパク質のリン酸化の変動を捉えることができる。以前の実験では、シロイヌナズナ実生の野生型と SnRK2 欠損変異体 (*srk2dei*) をリン酸化プロテオーム解析の実験材料として使用することで、野生型と比較したときにリン酸化変動がみられる多数のリン酸化ペプチドを検出することができた (Umezawa et al., 2013)。この方法によってシロイヌナズナの SnRK2 の基質をいくつか同定することができた。よって、変異体をリン酸化プロテオーム解析に実験材料に用いることは、ABA シグナル伝達経路の解明に有効であることがわかった。

Physcomitrella patens はコケ植物のモデル植物で、明確な ABA 応答を示す。*P. patens* において ABA は乾燥耐性、低温順化、原糸体の生長の遅延で重要な役割を果たす。ABA 応答は形態の大きな変化と ABA 応答性遺伝子の発現が伴う。*P. patens* は主要な 3 つの ABA シグナル伝達構成因子を持ち、4 個の PYL と 2 個のグループ A 型の PP2C (PpABI1A と PpABI1B) と 4 個のサブクラス III の SnRK2 (PpSnRK2A-D) から構成される。以前の論文で *ppabi1a/b*

二重変異体を用いることで、*P. patens* の PP2C の機能が明らかにされた (Komatsu et al., 2013)。*ppab1a/b* は ABA 高感受性を示すことから、2 つの PP2C は *P. patens* でも ABA シグナル伝達の負の制御因子として機能することが明らかにされた。さらに、変異誘発した *P. patens* の中から野生型と比較して ABA 非感受性を示す変異体をスクリーニングすることによって取得した AR7 を使用した。AR7 は ARK を欠失しており、ABA 応答性の SnRK2 や遺伝子発現や乾燥や低温に対する耐性を含むさまざまな ABA 応答が示されない (Saruhashi et al., 2015; Stevenson et al., 2016)。ARK は SnRK2 を直接 *in vitro* でリン酸化す Raf-like タンパク質キナーゼをコードすることから、AR7 は *P. patens* の ABA 依存的な SnRK2 の上流に存在するタンパク質キナーゼであることがわかる (Saruhashi et al., 2015)。

野生型と ABA 応答性変異体から得られたリン酸化プロテオームデータの比較解析とシロイヌナズナと *P. patens* の比較解析によって、*P. patens* の ABA シグナル伝達のタンパク質リン酸化ネットワークを明らかにするとともに、陸上植物における ABA シグナル伝達の進化過程を調べた。

2.2 実験方法

2.2.1 *Ppatens* の生育条件と ABA 処理

Physcomitrella patens の亜種である *patens*(Gransden)が野生型として用いられた。野生型、ppab1a/b、AR7 の原系体の組織を BCDAT 培養液で 25°C、光に当て続けた ($50\text{--}80\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$)。(\pm)-ABA(10 μM ; Sigma, St. Louis, MO, USA)が培養液に加えられ、組織を 0、15、30、90 分後に集めた。サンプルは-80°Cで貯蔵された。

2.2.2 *Ppatens* の原系体からのタンパク質抽出

原系体は液体窒素の中で乳鉢と乳棒を使って粉砕され、extraction buffer H (50 μM Hepes (pH7.5)、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na_3VO_4 、25 mM NaF、50 mM β -glycerphosphate、10% glycerol、2 mM dithiothreitol (DTT)、proteinase inhibitor cocktail (Sigma)) に入れ攪拌した。タンパク質懸濁液は Miracloth を使ってフィルターにかけ、17,000g で 20 分間遠心分離を行い、上清を回収し、Bicinchoninic acid (BCA)法でタンパク質濃度を測定した。

2.2.3 リン酸化ペプチドの濃縮

500 μg のタンパク質は尿素を混ぜ、最終濃度の 8 M に調整した。この溶液は DTT で還元され、ヨードアセドアミドを用いてアルキル化した。Lys-C でタンパク質をペプチドに分解し、トリプシンを用いてさらに分解した。これらの分解されたサンプルは SDb-XC Empore disk membranes (3M, Haverhill, MA, USA) を詰めた Stage Tips を用いて脱塩された。Hydroxyl acid-modified metal oxide chromatography (HAMMOC) を用いてリン酸化ペプチドの濃縮を行った。リン酸化ペプチドの濃縮には、C8-Stage Tips と TiO_2 bulk beads (Titanshere; GL Sciences Inc., Torrance, CA, USA) を使って MOC tips を用いた。

2.2.4 nanoLC-MS/MS システムによる解析

濃縮されたペプチドは LTQ-OrbitrapTM (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)、UltiMate[®]3000 RS nano-LC システム (Dinex, Sunnyvale, CA, USA) と HTC-PAL[®] autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) の機器が用いられた。ReproSil[®] C18 (3 μm ; Dr. Maisch, HPLC GmbH, Ammerbuch, Germany)が self-pulled needle (150 mm length \times 100 μm inside diameter, 6 μm opening) に詰められ、5 μL サンプルを導入し、500 nL/min の流動速度で流した。mobile phases は 0.5% acetic acid (A) と 0.5% acetic acid と three-step linear gradient の 80% acetonitrile (B)で構成される。80% acetonitrile (B)は 5–10% B を 5 分間、10–40% B を 60 分間、40–100% B for 5 分間、さらに 100% B を 10 分間行った。mass spectrometry (MS) scan range は mass/charge ratio を (m/z) 300–1,400、また top 10 precursor ions の条件に当てはまるペプチドのみ、続けて tandem mass spectrometry (MS/MS) scans が行われた。

液体クロマトグラフィーによる分析が終了後、MASCOT search (Matrix Science, Boston, MA,

USA) というソフトウェアを用いることで、Phypa v1.2 データセット (<https://www.cosmoss.org/>)を基に、ペプチドとリン酸化部位が予測された。それぞれのリン酸化ペプチドは、観測された monoisotopic ions の m/z と retention time を基にイオン強度が survey MS scan に統合されることで定量化された。抽出された observed m/z が 5 mDa の ion chromatogram は Mass Navigator v1.2 (Mitsui software, Tokyo, Japan)を使用することで Peak integration が行われた。それぞれのサンプルの定量的データは total peak area を用いることで標準化され、2つの定量値の間に違いがあるどうか分析するために Student's t -test ($n = 3$) が行われている。全ての raw data ファイルは Japan Proteome Standard Repository/Database (jPOST)に保存されている。

2.2.6 主成分分析

R を用いて主成分分析を行った。Excel の各列にリン酸化ペプチドのサンプルごとの定量値を記された csv データを R に読み込み、prcomp 関数で主成分分析を行った。PC1 と PC2 を軸としたプロット図を作成した。

2.2.7 モチーフ解析

Perl でリン酸化部位を中心とした 13mer のアミノ酸配列を全てのリン酸化部位から取得した。Motif-X というソフトウェアを用いて、統計的に有意なモチーフの解析を行った。

パラメーターは、以下の通りである。

Foreground format: pre-aligned

Central character: S

Width: 13

Occurrences: 20

Significance: 0.000001

Background: ヒメツリガネゴケ用に作ったデータを使用

Background format: pre-aligned

Background central character: S

2.2.8 in vitro キナーゼアッセイ

2.3 結果

2.3.1 *ppab1a/b* と AR7 の ABA 感受性

外因性の ABA によって *P. patens* の野生型の原糸体の生長は遅延し、brood cell というストレス耐性の細胞に形態変化する *ppab1a/b* の原糸体は恒常的に ABA 応答性の形態を示す。AR7 の原糸体は ABA 処理によってほとんど変化を示さない (Bhyan et al., 2012; Komatsu et al., 2013) (図 6 A)。

両方の変異体の ABA 応答は ABA によって活性化されたタンパク質キナーゼを検出できるゲル内キナーゼアッセイによって調べた。野生型と *ppab1a/b* 変異体では ABA によって活性化されたタンパク質キナーゼが ABA 応答を示すのに対して、AR7 では活性化されなかった。これらの結果は *ppab1a/b* と AR7 の過去の論文と一致する。 (Komatsu et al. 2013, Saruhashi et al) (図 6 B)。図 5 は東京農業大学 生命科学部 バイオサイエンス学科 坂田洋一先生の研究室の方達からいただいたデータである。

2.3.2 リン酸化プロテオーム解析結果概要

リン酸化プロテオーム解析を行うために、野生型と *ppab1a/b* と AR7 は 10 μ M ABA に 0、15、30、90 分間処理を 3 反復行った。*P. patens* の総タンパク質をトリプシン消化し、HAMMOG でリン酸化ペプチドの濃縮を行い、LC-MS/MS システムを使って分析を行った。合計で 1,870 のタンパク質の 4,630 個のリン酸化ペプチドと 6,444 個のリン酸化部位が同定された。よって、この実験結果は 5,288 個のリン酸化ペプチドと 2,204 個のタンパク質が同定されたシロイヌナズナの実生のリン酸化プロテオームデータと比較することができる (Umezawa et al., 2013)。*P. patens* のリン酸化アミノ酸残基の割合 (図 7 A) はセリン (Ser)、スレオニン (Thr)、チロシン (Tyr) はそれぞれ 79.5、16.9、3.6% でシロイヌナズナの実生の割合と似ていた。

P. patens の野生型における ABA 応答性のリン酸化ペプチドを同定するために label-free phosphopeptide quantification 法を用いた。それぞれのリン酸化ペプチドは ion current chromatogram の peak area を使うことで定量化され、サンプル間のクロマトグラムが一貫しているかマニュアルで確認された。定量データを標準化した後、野生型と比較して ABA 処理したサンプルの定量値が 2 倍以上または半分以下になっているリン酸化ペプチド群を ABA 応答性のリン酸化ペプチド群としました。143 個の upregulated グループと 8 個の downregulated グループをそれぞれ得ることができた。

2.3.3 野生型と ABA 応答性の変異体の比較分析

グループ A PP2C *ppab1a/b* 欠損変異体では主要な ABA 応答が活性化し続けている。一方、ABA 非感受性の AR7 変異体では ABA シグナル伝達が抑制されている。*ppab1a/b* と AR7 の表現型よりそれぞれ ABA 応答性タンパク質のリン酸化レベルが上方制御と下方制

御される。表現型同様、野生型と *ppabilab* と AR7 のリン酸化プロテオームプロファイルが大きく異なる (図 6A)。リン酸化プロテオームデータの中から以下の条件に当てはまるリン酸化ペプチドを選択した。条件 1) *P. patens* の野生型で ABA によってリン酸化レベルが 2 倍以上増加した ABA 応答性ペプチド。条件 2) *ppabila/b* でのリン酸化レベルが野生型の 2 倍以上である。条件 3) AR7 でのリン酸化レベルが野生型の半分以下である。この条件に当てはまるリン酸化ペプチドの数を図 8B に示した。条件 1 によって 143 個の ABA 応答性のリン酸化ペプチドを得た。条件 2 と条件 3 ではそれぞれ 398 個と 248 個の PpABI1 A/B または ARK 依存的なリン酸化ペプチドを得た。条件 2 に当てはまる 398 個のリン酸化ペプチドのうち、23 個のペプチドは条件 1 も当てはまった。このことより、いくつかの PpABI1 A/B 依存的なリン酸化ペプチドは ABA に依存していることがわかりました。一方、条件 1 に当てはまるリン酸化ペプチドの 88.1% は ARK 依存的であることから、ARK と ABA シグナル伝達経路の大部分が一致しているという仮説を立てることができた。

この 3 つの条件に当てはまるいくつかのリン酸化ペプチドの各処理区におけるリン酸化レベルを図 8 に示した。例えば、全ての条件に当てはまる Ca²⁺-binding protein は野生型で ABA 応答を示し (条件 1)、*ppabil a/b* でリン酸化レベルが増加し、AR7 ではリン酸化レベルが減少していた (条件 2、3) (図 9A)。いくつかの高等植物の ABA シグナル伝達因子のオルソログのリン酸化パターンはいくつかの条件に当てはまる。例えば、ABA シグナル伝達の中心的な制御因子の SnRK2 は野生型や *ppabila/b* において ABA 応答でリン酸化されるのに対し、AR7 ではリン酸化レベルが減少する (図 9B)。特に、SnRK2 の *ppabila/b* におけるリン酸化レベルは ABA 応答によって上方制御したままで、この結果は ABA 応答によって *ppabila/b* で PpSnRK2 が活性化される過去の研究と一致している (Komatsu et al., 2013)。反対に、SnRK2 のリン酸化レベルは AR7 で欠失しているのに対し、AREB/ABF-like bZIP タンパク質や他の他のタンパク質は SnRK2 と似たリン酸化パターンを示す (図 9C)。シロイヌナズナでは AREB/ABF は SnRK2 の基質としてよく知られている。高等植物では SnRK2-bZIP 経路は ABA 応答性遺伝子の発現する主要な制御システムの一つである (Yoshida et al., 2014)。また、米やシロイヌナズナでは AREB/ABF 型 bZIP タンパク質の様々な部位はリン酸化させる (Kagaya et al., 2002; Furihata et al., 2006)。私たちの結果は Phypa_38931 からのいくつかのリン酸化ペプチドを検出し、この中の一つ (NFGpSMNMDEFLK) は、シロイヌナズナの AREB/ABF タンパク質のリン酸化ペプチドの DFGpSMNMDELLK と似ていた (Umezawa et al., 2013)。陸上植物では AREB/ABF 型 bZIP タンパク質のリン酸化部位が高度に保存されていて、変異体を使った実験によってこのリン酸化部位は転写活性に関与する可能性がある (図 10)。同定された Ser-1030 を持つリン酸化ペプチドを ARK からもう一つの例を挙げると、野生型では ABA 応答性のリン酸化を示し、*ppabila/b* では少し下方制御され、AR7 ではリン酸化レベルが 0 だった (図 9D)。興味深いことに、このパターンは PpSnRK2B にとっても似ている。このことは、ヒメツリガネゴケでは ARK が SnRK2 の活性を制御していることを示唆している (Saruhashi et al., 2015)。

2.3.4 *P. patens* における ABA 応答性リン酸化ペプチドの分類

タンパク質キナーゼは特定のモチーフのリン酸化する傾向がある。よって、リン酸化部位周辺のアミノ酸配列はリン酸化タンパク質を分類し、どのシグナル伝達経路に関与するか予測することができる。私たちは Motif-X というソフトウェアを使用してリン酸化プロテオームデータでモチーフ解析を行った。私達のデータから様々なモチーフが検出され、5つのモチーフのグループに分けた。グループ 1、[-pS/pT-G-]; グループ 2、[-K/R-x-x-pS/pT-]; グループ 3、[-S-x-x-pS/pT-]; グループ 4、[その他]に分類された (図 10A と B)。その中でグループ 2 は、シロイヌナズナの実生のリン酸化プロテオームデータからも検出されたが、グループ 1 と 3 はシロイヌナズナでは検出されなかった (Umezawa *et al.*, 2013)。

それぞれのモチーフグループの定量的なデータが図 10B を示し、グループ 1 のモチーフは ABA 応答によって上方制御され、*ppab1a/b* で上方制御され、AR7 は下方制御されたリン酸化ペプチドで検出された。グループ 2 と 3 モチーフはグループ 1 と比較して、PP2C と ARK によって明確に制御されていない。しかしながら、グループ 1~3 モチーフは野生型の ABA 応答性リン酸化ペプチドで多く存在し、PP2C 依存的なグループでは統計的に有意なモチーフのグループが検出されず、かわりに酸性アミノ酸のモチーフが検出された (図 10C)。一方、ARK 依存的なグループではグループ 1 と 2 が検出された。

2.3.5 ABA 応答性ペプチドの *in vitro* リン酸化実験

SnRK2 は ABA シグナル伝達の主要なタンパク質キナーゼであり、様々な SnRK2 の基質がこの論文で同定された ABA 応答性リン酸化ペプチドに関与する可能性がある。*in vitro* phosphorylation アッセイによって、SnRK2 がこの研究で選択されたリン酸化ペプチドをリン酸化できるかどうか検討した。私たちは 15 個のリン酸化ペプチドを潜在的な SnRK2 の基質と 2 つの SnRK2 の標的のモチーフである [-K/R-x-x-pS/pT-] をもたない 2 つのペプチド (No.4 と No.7) (Furihata *et al.* 2006, Umezawa *et al.* 2013). *in vitro* phosphorylation アッセイに 3 つのヒメツリガネゴケの SnRK2 とシロイヌナズナの SnRK2 (SRK2E/OST1) によって合計で 17 個のタンパク質を基質がリン酸化されるかどうか確認した (図 11)。

私たちのデータは選択した 15 個のペプチドの内 12 個が *in vitro* で PpSNRK2 によってリン酸化されることを示した。このことは私たちのリン酸化プロテオームデータのいくつかは SnRK2 の基質を含むことがわかった。一方、SRK2E/OST1 は 9 つのタンパク質をリン酸化した。ペプチドの No.8、11、12、17 は SRK2E/OST1 より PpSnrk2 の方が強くリン酸化された。予測通り、ペプチド No.4 と 7 はどの SnRK2 にもリン酸化されなかった。

2.4 考察

SnRK2 と PP2C を介して下流のタンパク質のリン酸化・脱リン酸化することで ABA シグナル伝達経路を制御していることから、リン酸化・脱リン酸化は重要な役割を果たすことがわかる。過去の研究でシロイヌナズナの実生でリン酸化プロテオーム解析を行い、多数の ABA 応答性リン酸化タンパク質を同定することができた (Umezawa et al., 2013; Wang et al., 2013)。そこで、ヒメツリガネゴケの ABA シグナル伝達経路の解明の手掛かりにするために私たちは同じアプローチを使ってヒメツリガネゴケを解析した。その結果、143 個の ABA 応答性リン酸化ペプチド (92 個の遺伝子) をヒメツリガネゴケの野生型と変異体から同定することができた。過去のトランスクリプトーム解析では 92 個の遺伝子のうち 13 個の遺伝子のみ ABA 応答と示された (Saruhashi et al., 2015)。このことは、私たちが得たリン酸化プロテオームデータは異なる階層の細胞内制御に関与することを示唆している。ヒメツリガネゴケの ABA 依存的なリン酸化シグナル伝達経路を分析するために私たちはこのデータを比較解析に用いた。

以前の論文ではシロイヌナズナの SnRK2 依存的なリン酸化シグナル伝達経路を解明するために SnRK2 破壊株を用いている (Umezawa et al., 2013; Wang et al., 2013)。しかし、*P. patens* では SnRK2 の破壊株を用いることができなかった。代わりに ABA 非感受性を示す AR7 を用いることにした。この AR7 では ABA 応答性の SnRK2 の活性がほとんど抑制されている (Saruhashi et al., 2015)。本研究では、多数の ABA 応答性リン酸化ペプチドが AR7 のリン酸化レベルが劇的に減少していたことから (図 7)、88.1% の ABA 応答性リン酸化ペプチドは ARK を介したシグナル伝達経路に関与していることを示している。以前行われたトランスクリプトーム解析でも 89.5% の ABA 応答性の転写物が ARK 依存的であったことから今回得られた結果と一致している (Saruhashi et al., 2015)。私たちは PpSnRK2 のキナーゼの活性化ループに存在する Ser-165 と Ser-169 が *in vivo* でリン酸化され、AR7 では Ser-169 のリン酸化が抑制されることを明らかにした (図 8B)。このリン酸化部位は ARK によって *in vitro* でリン酸化されているが (Saruhashi et al., 2015)、私たちのデータは *P. patens* で SnRK2 の活性は ARK によって制御されていることを証明できた。以前の研究ではこれらのリン酸化部位はシロイヌナズナの SnRK2 の活性化するのに必要であることが示され (Belin et al., 2006; Umezawa et al., 2009)、この部位は高度に保存されている。

さらに AREB/ABF 型 bZIP タンパク質 (Phypa_38931) は ABA 応答によってリン酸化され、AR7 によって抑制された (図 8C)。シロイヌナズナでは AREB/ABF は SnRK2 によって *in vivo* でリン酸化され、ABA 応答性遺伝子の発現を誘導する。リン酸化部位は *P. patens* とシロイヌナズナの間でよく保存されており、リン酸化は *P. patens* における ABA 応答性の遺伝子の転写の制御に関与する (図 9)。似たタイプの転写制御は ABA シグナル伝達経路で *P. patens* とシロイヌナズナの間で保存されている。これらの結果から総合すると、主要な ABA シグナル伝達経路 (例えば、SnRK2-bZIP 経路) は少なくとも部分的に陸上植物で保存されている。

私たちは次に *P. patens* とシロイヌナズナのの違いに着目した。*P. patens* のかなりの数の ABA 応答性ペプチドが ARK 依存的で (図 8B)、*P. patens* 特異的なモチーフがいくつか見つかった (図 11A)。特に、[-pS/pT-G-] のモチーフは明確に PP2C または ARK によって制御されていた (図 11B)。このグループのモチーフはシロイヌナズナでは検出されていなかった。このことから、リン酸化モチーフがコケ植物から被子植物に進化した間に変化したと考えられる。よって、*P. patens* の ABA シグナル伝達経路では SnRK2 または ARK とは異なるいくつかのタンパク質キナーゼやシグナル伝達カスケードが関与している可能性がある。

上記で示した通り、ARK は AR7 に導入されていた遺伝子から同定され、*P. patens* において SnRK2 の活性を制御する (Saruhashi et al., 2015)。私たちのデータでは ARK は Ser-1029 と -1030 でリン酸化され、PpSnRK2B のリン酸化パターンと類似していた (図 9B, D)。このことは ARK が SnRK2 と *in vivo* で関連しているかもしれないことを示している。しかしながら、他の植物では ARK のように SnRK2 の上流で機能するタンパク質キナーゼはまだ見つかっておらず、ARK のオルソログでは Ser-1029 と -1030 は高度に保存されていない。よって、ARK を介した SnRK2 の制御は高等植物でも保存されているかどうかはまだ明らかになっていない。シロイヌナズナでは、SnRK2 の制御には 2 つの仮説が提案されている。1 つ目は、自己リン酸化されるという説と (Fujii et al., 2009)、もう一つは上流のキナーゼが存在するという説である (Boudsocq et al., 2007)。どの説でも ARK のオルソログの機能解析が SnRK2 活性化メカニズムを完全に理解するのに必要である。

私たちは *P. patens* とシロイヌナズナの間でリン酸化部位が異なるいくつかのタンパク質を見つけた。例えば、*P. patens* では Ca²⁺-binding protein Pp1s218_100 (Phypa_144692) は ABA に応答してリン酸化される。しかしながら、Pp1s218_100 のリン酸化の意味は未だわかっていない。このリン酸化は PpABI1 や ARK に依存している (図 9A)。シロイヌナズナには AtSCS というオルソログタンパク質があり、SnRK2 と相互作用する (Bucholtz et al., 2011)。しかしながら、Pp1s218_100 のリン酸化部位は AtSCS の同じ位置には見つかっていない。一方、当研究室での依然尾リン酸化プロテオーム解析では ABA シグナル伝達を負に制御する SnRK2-substrate 1 (SNS1) が同定された (Umezawa et al., 2013)。*P. patens* は SNS1 のオルソログ (Phypa_121053) が存在するが、同じリン酸化部位は見つからなかった。また、SNS1 の破壊株は ABA 応答に変化を示さなかった。これらの結果は、ABA 応答性リン酸化ペプチドは進化の過程で変化したことを示している。

さらに、*P. patens* では PP2C の機能にいくつかの違いがみられる。高等植物での PP2C は直接 SnRK2 を脱リン酸化することで ABA シグナル伝達を負に制御されるが (Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009)、*P. patens* ではこのような制御はされていない (Komatsu et al., 2013)。私たちの結果は PP2C が存在しているにもかかわらず、SnRK2 は ABA 応答でリン酸化することを証明した。PpSnRK2B のリン酸化レベルは PP2C の非存在下でも相対的に低かった (図 8B)。さらに、PP2C 依存的なリン酸化ペプチドのグループでは SnRK2 標的モチーフ (例えば [-K/R-x-x-pS/pT-] や [-pS/pT-x-x-x-D/E-]) は検出されなかった (図 11C)。私た

このデータは PP2C が様々なタンパク質を制御し、いくつかのこのタンパク質は ABA シグナル伝達に関与する。これらの結果から、*P. patens* の PP2C はシロイヌナズナとは異なる方法で機能し、植物の PP2C は陸上植物が進化する過程で SnRK2 を直接制御するようになった。

この実験の一つの目標は陸上植物で ABA シグナル伝達経路がどのように進化してきたか明らかにすることである。しかしながら、*P. patens* とシロイヌナズナの ABA 応答の間には異なる点がいくつも存在することが、このことを難しくしている。例えば、*P. patens* に外因性の ABA を与えると brood 細胞に変化するなど形態的に大きく変化する (Komatsu et al., 2009)。さらにコケ植物は高度な乾燥耐性を示し、高等植物では気孔を閉じることで組織からすばやく水が喪失することを防ぐことで乾燥耐性を獲得するように進化した (Charron and Quatrano, 2009; Frank et al., 2005; Werner et al., 1991)。これはコケ植物と被子植物は長い時間をかけて独立して進化したことを示す (Shaw et al., 2011)。

これらを総合すると、この論文では *P. patens* における ABA 応答性リン酸化シグナル伝達経路を説明していくつもの ABA 応答性リン酸化タンパク質を紹介した。比較解析によってコアな ABA シグナル伝達経路は一部高等植物でも保存されていることを示している。リン酸化プロテオームデータから重要な因子を探索するには、タンパク質同士の相互作用を解析する実験や *in vitro* リン酸化実験や *P. patens* またはシロイヌナズナを使った逆遺伝的解析のような研究が必要である。これらの解析は植物での ABA 応答の分子メカニズムにおいて新しい見解を提供した。

引用文献

Astley, H.M., Parsley, K., Aubry, S., Chastain, C.J., Burnell, J.N., Webb, M.E., and Hibberd, J.M. (2011). The pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins of *Arabidopsis* are both bifunctional and interact with the catalytic and nucleotide-binding domains of pyruvate, orthophosphate dikinase. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *68*, 1070–1080.

Belin, C., Franco, P.-O. de, Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J.-M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S. (2006). Identification of Features Regulating OST1 Kinase Activity and OST1 Function in Guard Cells. *Plant Physiol.* *141*, 1316–1327.

Bhyan, S.B., Minami, A., Kaneko, Y., Suzuki, S., Arakawa, K., Sakata, Y., and Takezawa, D. (2012). Cold acclimation in the moss *Physcomitrella patens* involves abscisic acid-dependent signaling. *J. Plant Physiol.* *169*, 137–145.

Boudsocq, M., Droillard, M.-J., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C. (2007). Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* *63*, 491–503.

Bucholc, M., Ciesielski, A., Goch, G., Anielska-Mazur, A., Kulik, A., Krzywińska, E., and Dobrowolska, G. (2011). SNF1-related Protein Kinases 2 Are Negatively Regulated by a Plant-specific Calcium Sensor. *J. Biol. Chem.* *286*, 3429–3441.

Charron, A.J., and Quatrano, R.S. (2009). Between a Rock and a Dry Place: The Water-Stressed Moss. *Mol. Plant* *2*, 478–486.

Colville, A., Alhattab, R., Hu, M., Labbé, H., Xing, T., and Miki, B. (2011). Role of HD2 genes in seed germination and early seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* *30*, 1969.

Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu. Rev. Plant Biol.* *61*, 651–679.

Eastmond, P.J., Astley, H.M., Parsley, K., Aubry, S., Williams, B.P., Menard, G.N., Craddock, C.P., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., and Hibberd, J.M. (2015). *Arabidopsis* uses two gluconeogenic gateways for organic acids to fuel seedling establishment. *Nat. Commun.* *6*, 6659.

Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* *171*, 501–523.

Frank, W., Ratnadewi, D., and Reski, R. (2005). *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta* *220*, 384–394.

Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.-K. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* *462*, 660–664.

Gregory, A.L., Hurley, B.A., Tran, H.T., Valentine, A.J., She, Y.-M., Knowles, V.L., and Plaxton, W.C. (2009). In vivo regulatory phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase AtPPC1 in phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* *420*, 57–65.

Hanada, K., Hase, T., Toyoda, T., Shinozaki, K., and Okamoto, M. (2011). Origin and evolution of genes related to ABA metabolism and its signaling pathways. *J. Plant Res.* *124*, 455–465.

Knight, C.D., Sehgal, A., Atwal, K., Wallace, J.C., Cove, D.J., Coates, D., Quatrano, R.S., Bahadur, S., Stockley, P.G., and Cuming, A.C. (1995). Molecular Responses to Abscisic Acid and Stress Are Conserved between Moss and Cereals. *Plant Cell* *7*, 499–506.

Komatsu, K., Nishikawa, Y., Ohtsuka, T., Taji, T., Quatrano, R.S., Tanaka, S., and Sakata, Y. (2009). Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* *70*, 327–340.

Komatsu, K., Suzuki, N., Kuwamura, M., Nishikawa, Y., Nakatani, M., Ohtawa, H., Takezawa, D., Seki, M., Tanaka, M., Taji, T., et al. (2013). Group A PP2Cs evolved in land plants as key regulators of intrinsic desiccation tolerance. *Nat. Commun.* *4*, 2219.

Meyer, L.J., Gao, J., Xu, D., and Thelen, J.J. (2012). Phosphoproteomic Analysis of Seed Maturation in *Arabidopsis*, Rapeseed, and Soybean. *Plant Physiol.* *159*, 517–528.

Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., et al. (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 Protein Kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3,

Involved in ABA Signaling are Essential for the Control of Seed Development and Dormancy. *Plant Cell Physiol.* *50*, 1345–1363.

Nishimura, N., Yoshida, T., Kitahata, N., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T. (2007). ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J.* *50*, 935–949.

Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., et al. (2008). The Physcomitrella Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* *319*, 64–69.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* *57*, 675–709.

Saruhashi, M., Kumar Ghosh, T., Arai, K., Ishizaki, Y., Hagiwara, K., Komatsu, K., Shiwa, Y., Izumikawa, K., Yoshikawa, H., Umezawa, T., et al. (2015). Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E6388–E6396.

Shaw, A.J., Szövényi, P., and Shaw, B. (2011). Bryophyte diversity and evolution: Windows into the early evolution of land plants. *Am. J. Bot.* *98*, 352–369.

Takezawa, D., Komatsu, K., and Sakata, Y. (2011). ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *J. Plant Res.* *124*, 437–453.

Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17588–17593.

Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. *Plant Cell Physiol.* *51*, 1821–1839.

Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C., and Shinozaki, K. (2013). Genetics and Phosphoproteomics Reveal a Protein Phosphorylation Network in the Abscisic Acid Signaling Pathway in Arabidopsis thaliana. *Sci Signal* *6*, rs8–rs8.

Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J.,

Rodriguez, P.L., Laurière, C., and Merlot, S. (2009). Protein Phosphatases 2C Regulate the Activation of the Snf1-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in Arabidopsis. *Plant Cell* *21*, 3170–3184.

Wang, P., Xue, L., Batelli, G., Lee, S., Hou, Y.-J., Van Oosten, M.J., Zhang, H., Tao, W.A., and Zhu, J.-K. (2013). Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11205–11210.

Werner, O., Espín, R.M.R., Bopp, M., and Atzorn, R. (1991). Abscisic-acid-induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. *Planta* *186*, 99–103.

Yoshida, T., Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T. (2006). ABA-Hypersensitive Germination3 Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among Arabidopsis Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.* *140*, 115–126.

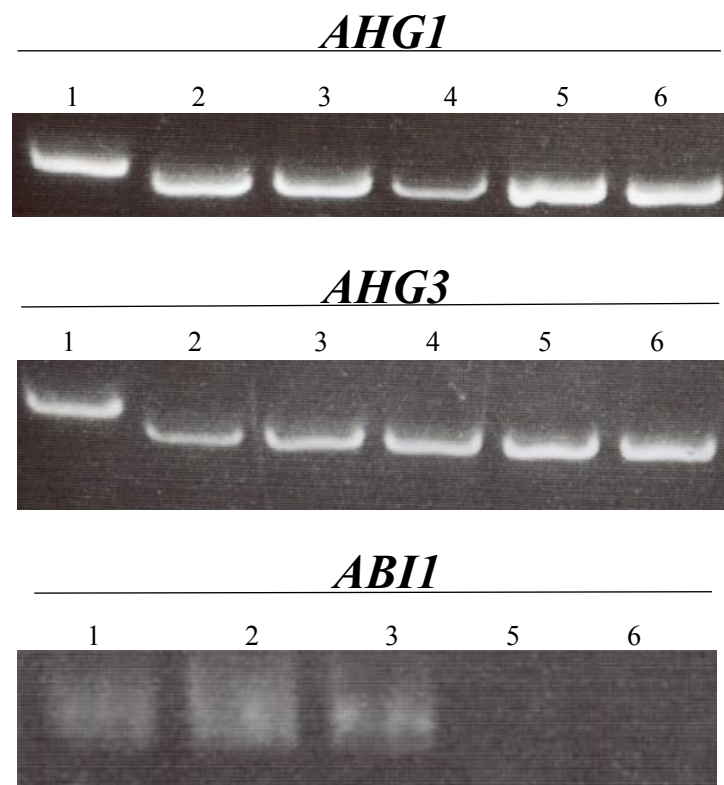


図 1. PP2C 機能欠損変異体に導入されている変異の確認

AHG1、*AHG3* にミスセンス変異が導入されているか、野生型 (レーン 1 番)、*ahglahg3* #832 (レーン 2 番)、*ahglahg3* #2135 (レーン 3 番)、*ahglahg3* #2136 (レーン 4 番)、*ahglahg3abil* #1 (レーン 5 番)、*ahglahg3abil* #2 (レーン 6 番) で確認するために CAPS 解析を行った。また、*ABI1* に導入された T-DNA を確認するために RT-PCR を行った。

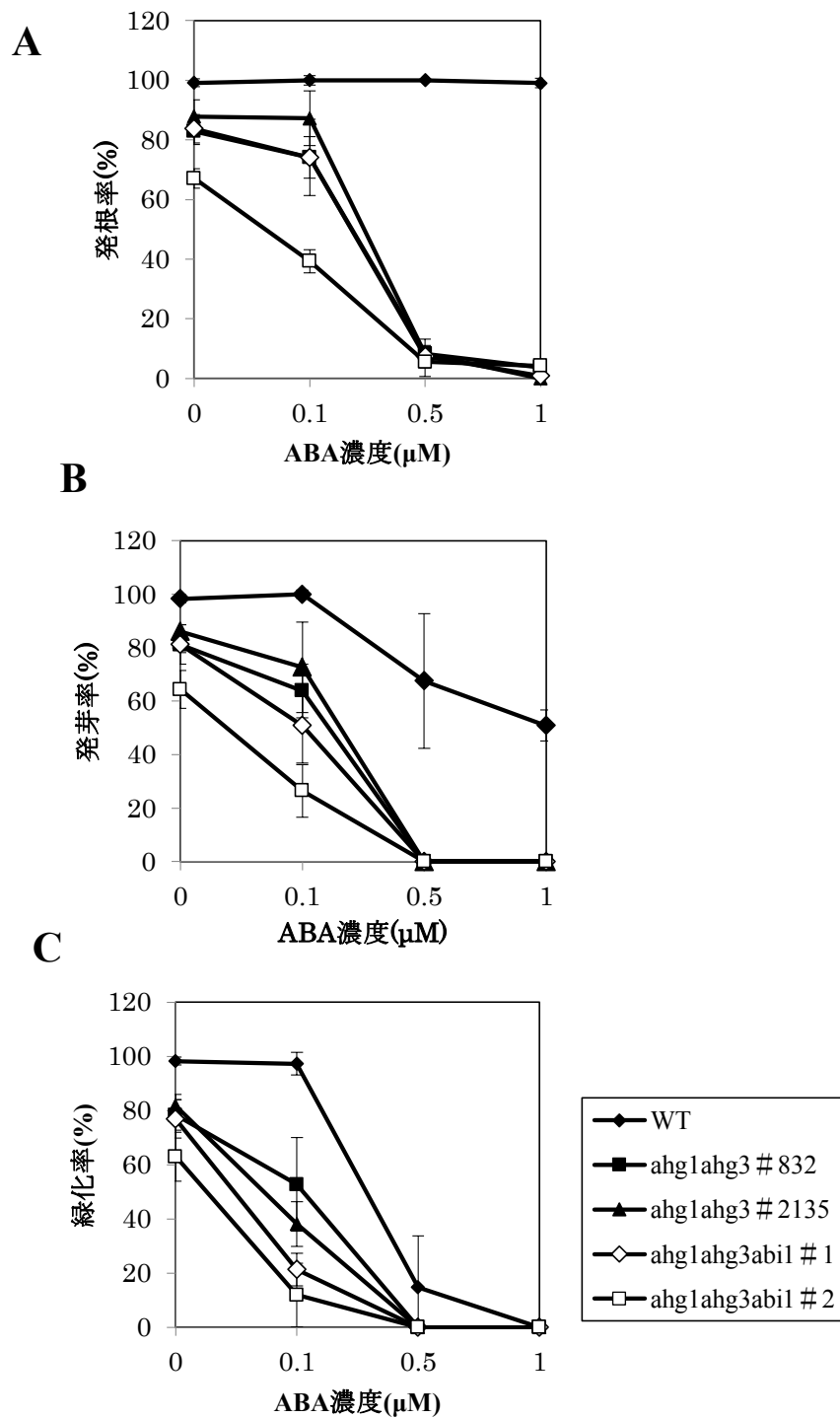
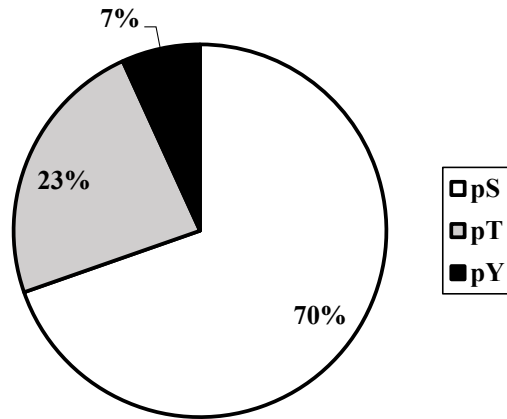


図 2. PP2C 機能欠損変異体 *ahg1ahg3* と *ahg1ahg3abi* の発芽試験

ahg1ahg3 二重機能欠損変異体と *ahg1ahg3abi* 三重機能欠損変異体の種子の発芽における ABA 応答性を調べるために、春化処理後 (4°C、3 日間) 0、0.1、0.5、1 μM の ABA を含んだ GM 培地で 5 日間育成したときの発根率 (A)、発芽率 (B)、緑化率 (C) を観察した。

A



B

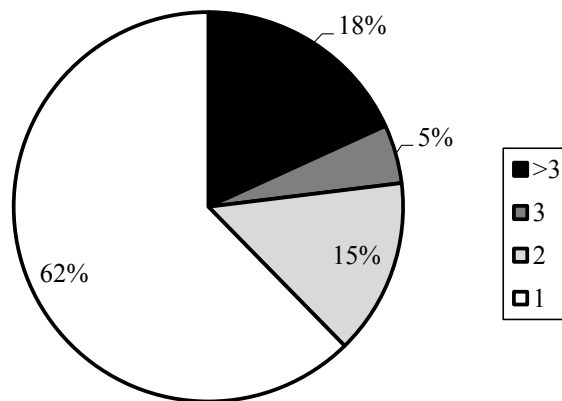


図 3. シロイヌナズナ種子のリン酸化プロテオーム解析の概要

(A) 主要なリン酸化アミノ酸残基の割合を示す。pS はセリン、pT はスレオニン、pY はチロシンを示す。

(B) ペプチドごとのリン酸化部位数の割合を示す。

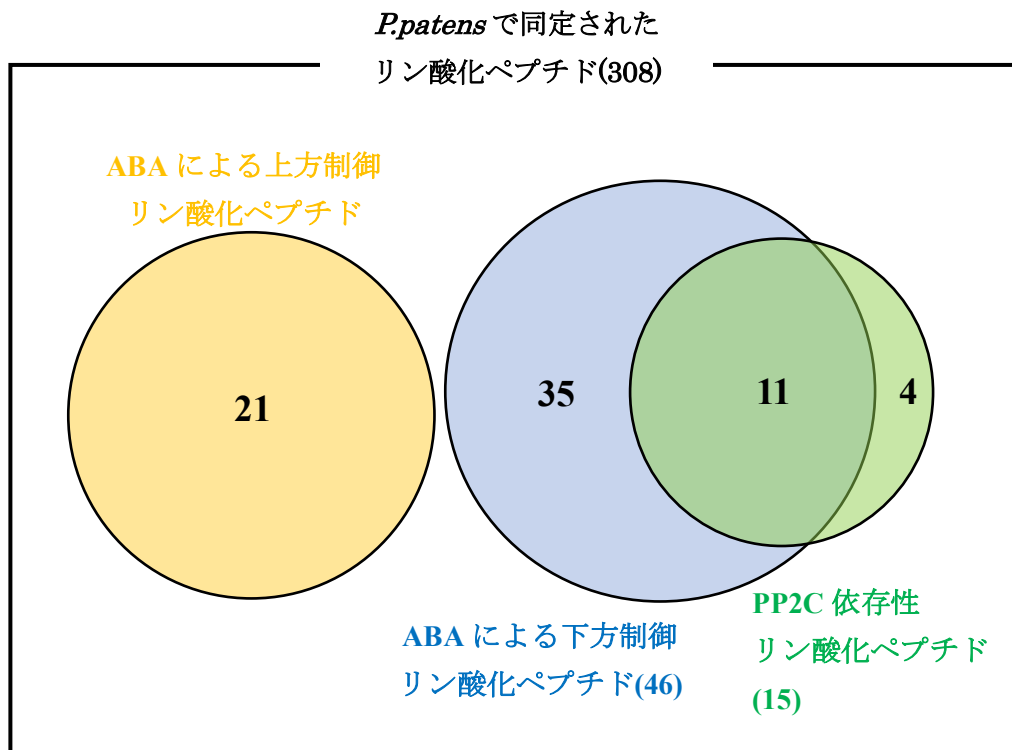


図 4. シロイヌナズナ種子の野生型、*ahg1ahg3abil* のリン酸化プロテオームデータの比較解析

P. patens で同定されたリン酸化ペプチドの中で、ABA によって上方制御、下方制御されたリン酸化ペプチド候補群と PP2C 依存性リン酸化ペプチド候補群のベン図。

表 1. シロイヌナズナ種子の ABA 応答性リン酸化ペプチドの候補群

野生型で ABA によって上方制御されたリン酸化ペプチドの候補群

AGI code	annotation	sequence *	1h	** 3h	10h
AT1G01100.1	60S acidic ribosomal protein family	KKDEPAEEpSDGDLGFLFD	-	-	1.8
AT2G27710.1	60S acidic ribosomal protein family	EEpSDDDMGFSLFE	-	-	1.9
AT5G36880.1	acetyl-CoA synthetase (ACS)	HVESMpSQLPSGAGK	2.4	-	-
AT4G27450.1	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs	VDpSEGVLCGANFK	-	-	2.4
AT3G13460.1	evolutionarily conserved C-terminal region 2(ECT2)	YSDVQRpVSGSGVASpSYSK	-	-	1.9
AT5G07530.2	glycine rich protein 17(GRP17)	RGMSGGGGmpSGpSEGGVpSGpSEGpSMGGMSGVEGVNTK	-	3.3	-
AT2G32120.1	heat-shock protein 70T-2(HSP70T-2)	LMPEPTAIALLYAQQQM TTHDNMGSGpSER	-	2.5	4.1
AT3G44750.1	histone deacetylase 3(HD2A)	TPNIEPQGYpSEEEEEEEVpAGNAAK	-	-	2.9
AT4G02710.1	Kinase interacting (KIP1-like) family protein	LVQKNLMLEKpSIpSYLNpSELESFR	-	3.1	-
AT3G24080.1	KRR1 family protein	AEGNEpSGEDDDFLR	-	-	2.7
AT2G25344.1	LCR14 (low-molecular-weight cysteine-rich 14)	KYFQPSFVLIIFpTVLVLGVGNMSVDQK	39.1	-	-
AT5G01890.1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	MFNGAVpSLLFLFLAVVSARADPTFNDVGLIVFKAGLDDPLSK	-	3.4	3.4
AT4G24800.1	MA3 domain-containing protein	LIDTDGDYHIDPNNDP NYDpSGEEPpELVGATLSDPLDDYKK	-	-	2.2
AT2G39210.1	Major facilitator superfamily protein	MVAApSPGGSMK	-	4.3	-
AT5G19730.1	Pectin lyase-like superfamily protein	CKVpTGTGVLPYLGR	-	2.8	1.8
AT4G37870.1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1)	KTDGSTpTPAYAHGQHHSIFSPATGAVSDSSLK	-	-	2.3
AT4G37870.1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1)	RSAPTpTPINQNAAAAFAAVSEEER	2.2	-	4.0
AT3G56760.1	Protein kinase superfamily protein	LVKVYIMpSpSSLRK	-	-	2.4
AT4G15530.1	pyruvate orthophosphate dikinase(PPDK)	GGMpTSHAAVVAR	-	-	2.1
AT3G05130.1	unknown	QMEMLNpVQSSDKGKLIDQLpSR	-	-	2.3
AT1G60490.1	vacuolar protein sorting 34(VPS34)	LEKLMNKpYER	-	-	5.6

* p はリン酸化部位を示す。p の隣のアミノ酸がリン酸化されている。

** 無処理の野生型と比較して統計的に有意な場合のみ (Student's t test、<0.05)、リン酸化レベルが野生型の何倍か (Fold-change) 示した。4 反復の Fold-change の平均を示した。

表 2. シロイヌナズナ種子の ABA 応答性リン酸化ペプチドの候補群

野生型で ABA によって下方制御されたリン酸化ペプチドの候補群

AGI code	Description	sequence	*	1h	3h**	10h
AT1G24180.1	Thiamin diphosphate-binding fold (THDP-binding) superfamily protein (IAR4)	YHGHpSMSDPGSTYR	-	-	-	0.46
AT1G50140.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	ASEpSRKESPFLNK	-	-	0.58	0.43
AT3G21480.1	BRCT domain-containing DNA repair protein	pSAAFRASAVAARVANQK	-	-	0.30	0.60
AT1G11980.1	ubiquitin-related protein 3 (RUB3)	VKTLTEKQIDIEIElpTDTIER	-	-	0.15	0.18
AT2G42600.1	phosphoenolpyruvate carboxylase 2 (PPC2)	MApSIDAQLR	-	-	0.48	-
AT1G24180.1	Thiamin diphosphate-binding fold (THDP-binding) superfamily protein (IAR4)	YHGHSMpSDPGSTYR	-	-	0.44	0.21
AT1G04635.1	embryo defective 1687 (EMB1689)	YVNPpTKLCIVRSSR	-	-	-	-
AT5G07460.1	peptidemethionine sulfoxide reductase 2 (PMSR2)	SGIpYFYpTPEQEKLARESLEK	-	-	0.17	0.13
AT5G41360.1	homolog of Xeroderma pigmentosum complementation group B 2 (XPB2)	GNAGVVVTYNMIAFGGKRpSEEAKEK	0.57	-	-	-
AT3G63150.1	MIRO-related GTP-ase 2 (MIRO2)	MMLGGKpSpSAGGRpSLR	-	-	0.63	-
AT5G38120.1	4CL8	RpYGA VGLLSCGVEARIVDPNpTGQVMGLNQTGELWLK	-	-	0.49	0.41
AT3G05910.1	Pectin Acetyltransferase 12 (PAE12)	YANQALLSGCpSAGGLAAILR	-	-	0.52	-
AT4G30890.1	ubiquitin-specific protease 24 (UBP24)	pTQSFVpSELSEIFGGQLK	-	-	-	0.51
AT1G64390.1	glycosyl hydrolase 9C2 (GH9C2)	GSSIVSVKVDRpTFVTCR	-	-	0.34	0.50
AT5G25610.1	Responsive to desiccation 22 (RD22)	pYWSpTALPNTPIPNSLHNLLTFDFTEKSTNVQVGK	-	-	-	0.44
AT5G66400.1	RAB18	HHGQEQHLKpSGGGLGMLHR	-	-	-	0.34
AT2G40970.1	MYBC1	LQpSpSpTpTPpTPpTPPPMMNSDFGGGSDTLGSGSIGGEPARTLK	-	-	0.61	-
AT2G42560.1	late embryogenesis abundant domain-containing protein	GSNMPVpSDEGEGETK	-	-	-	0.27
AT3G15670.1	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	AGSYLpSETGEAIK	-	-	0.50	0.43
AT2G40170.1	Early methionine-labelled 6 (EM6)	pSFEAQQH LAEGR	-	-	-	0.53
AT2G42560.1	late embryogenesis abundant domain-containing protein	RDFGEEYGEERpSEK	-	-	0.33	0.29
AT2G40170.1	Early methionine-labelled 6 (EM6)	pSFEAQQH LAEGR	-	-	-	0.48
AT3G15670.1	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	TGGFLpSQTGEHVK	-	-	0.26	0.22
AT3G15670.1	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	TGGFLSpTGEHVK	-	-	0.22	0.22
AT2G42760.1	unknown protein	AMSDEpTMMpTpTpSpSKpTpSLpSSSSDDLFLSPR	-	-	0.58	-
AT4G01930.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	DpYQApSLHIECVV GALSLLMPR	-	-	0.17	0.12
AT5G54430.1	PHOS32	pSGGDDGDVVAASASAHHEHIKDE	-	-	-	0.43
AT5G50600.1	hydroxysteroid dehydrogenase 1 (HSD1)	STLYPESIRpTPEIKpSD	-	-	0.46	0.42
AT5G52300.1	RD29B	GAVTSWLGGKPKpSPR	-	-	-	0.52
AT5G50600.1	hydroxysteroid dehydrogenase 1 (HSD1)	STLYPESIRpTPEIKpSD	-	-	-	0.51
AT3G15260.1	Protein phosphatase 2C family protein	VGLGASASSADpSGK	-	-	0.29	0.27
AT5G58970.1	uncoupling protein 2 (UCP2)	YRGpSIGTLATIAR	-	-	0.48	0.44
AT1G07985.1	Expressed protein	VVGSSpSPTNIHISK	-	-	-	0.48
AT1G57690.1	F-box/RNI-like superfamily protein	NNpSLHHIKKWTEFAMSR	-	-	0.42	0.39
AT5G52300.1	RD29B	LPLSGGpSGVK	-	-	0.31	0.08
AT5G56140.1	RNA-binding KH domain-containing protein	MMMPpSpSLGGGGGGGGpSGGGGGGGGRFpTYpSpSpSLSVPPSPAPpSPNYpSGGLR	0.48	-	-	0.51
AT1G53310.1	phosphoenolpyruvate carboxylase 1 (PPC1)	MApSIDVHLR	-	-	0.39	-
AT4G08940.1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein	QTpYQMLKK	-	-	-	0.60
AT1G54870.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	EHVMEpSSPQFSSSDYQPSNK	-	-	0.55	-
AT5G55893.1	unknown protein	pTAHLNSAISASLVSPK	-	-	0.62	-
AT3G25640.1	unknown	KSILANTSLDpSpSfSpSLpSK	-	-	-	0.51
AT1G15750.1	TOPLESS (TPL)	CSMPLQAALVKEpVVpSVNRVIVSPDGLFGVApYpSR	-	-	-	0.40
AT3G60790.1	F-box family protein	FVpTQGTpVpTEKLMIKTSTYPPVK	-	-	0.16	0.18
AT1G07985.1	Expressed protein	VVGSpSPTNIHISK	-	-	-	0.52
AT5G50600.1	hydroxysteroid dehydrogenase 1 (HSD1)	STLYPESIRpTPEIK	-	-	-	0.46
AT4G10310.1	high-affinity K+ transporter 1 (HKT1)	FVLIIVMfpYGR	-	-	-	0.43

* p はリン酸化部位を示す。p の隣のアミノ酸がリン酸化されている。

** 無処理の野生型と比較して統計的に有意な場合のみ (Student's t test、<0.05)、リン酸化レベルが野生型の何倍か (Fold-change) 示した。4 反復の Fold-change の平均を示した。

表 3. シロイヌナズナ種子の PP2C 依存的リン酸化ペプチドの候補群

AGI code	Description	Sequence	*	ahg1ahg3abil / WT			
				0h	1h	3h	10h
AT1G04710.1	3-KETO-ACYL-COA THIOLASE 1 (KAT1)	INVNGGAIAGHPLGApTGARCVATLLHEMKR		-	-	2.3	-
AT5G24810.1	ABC1 family protein	pYpYATLADGGLVPPPpHSSLSQPPLGSHTHVPK		-	-	6.0	-
AT2G40170.1	Early methionine-labelled 6 (EM6)	pSFEAQQHLAEGR		2.9	-	3.4	-
AT2G40170.1	Early methionine-labelled 6 (EM6)	pSFEAQQHLAEGR		-	1.9	2.2	-
AT3G15670.1	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	TGGFLpSQTGEHVK		-	-	-	2.7
AT3G15670.1	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	TGGFLSpTGEHVK		-	-	2.3	2.2
AT5G41360.1	homolog of Xeroderma pigmentosum complementation group B 2 (XPB2)	GNA GVVVTTYNMIAFGGKRpSEEA EK		-	-	4.1	-
AT3G63150.1	MIRO-related GTP-ase 2 (MIRO2)	MMLGGKpSpSAGGRTpSLR		-	-	1.7	-
AT1G61970.1	Mitochondrial transcription termination factor family protein	pSLGFDVGDVWSSFKKWpISLR		-	-	2.3	-
AT1G54870.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	EHVMEpSSPQFSSSDYQPSNK		-	2.2	-	-
AT3G05910.1	Pectinacetyltransferase family protein	YANQALLSGCpSAGGLAAILR		2.3	-	5.1	73.7
AT5G66400.1	RAB18	HHGQEQHLKEpSGGGLGGM LHR		-	2.2	6.0	-
AT5G66400.1	RAB18	HHGQEQHLKEpSGGGLGGM LHR		-	-	6.1	2.5
AT5G25610.1	RD22	pYWSpTALPNTPIPNSLHNLITFDFTDEKSTNVQVGK		-	-	2.6	2.4
AT4G08940.1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein	QTpYQMLKK		-	-	-	2.7

* p はリン酸化部位を示す。p の隣のアミノ酸がリン酸化されている。

** 無処理の野生型と比較して統計的に有意な場合のみ (Student's t test, <0.05)、リン酸化レベルが野生型の同じ ABA 処理区の何倍か (Fold-change) 示した。4 反復の Fold-change の平均を示した。

表 4. ABA によって下方制御され、PP2C 依存的なリン酸化ペプチドの候補群

AGI code	Description	Sequence	*	ahg1ahg3abil / WT			
				0h	1h	3h	10h
AT2G40170.1	Early methionine-labelled 6 (EM6)	pSFEAQQHLAEGR		2.9	-	3.4	-
AT2G40170.1	Early methionine-labelled 6 (EM6)	pSFEAQQHLAEGR		-	1.9	2.2	-
AT3G15670.1	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	TGGFLpSQTGEHVK		-	-	-	2.7
AT3G15670.1	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	TGGFLSpTGEHVK		-	-	2.3	2.2
AT5G41360.1	homolog of Xeroderma pigmentosum complementation group B2 (XPB2)	GNAGVVVTYNMIAFGGKRpSEEA EK		-	-	4.1	-
AT3G63150.1	MIRO-related GTP-ase 2 (MIRO2)	MMLGGKpSpSAGGRTpSLR		-	-	1.7	-
AT1G54870.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	EHVMEpSSPQFSSSDYQPSNK		-	2.2	-	-
AT3G05910.1	Pectinacetyl esterase family protein	YANQALLSGCpSAGGLAAILR		2.3	-	5.1	73.7
AT5G66400.1	RAB18	HHGQEQLHKEpSGGGLGMLHR		-	-	6.1	2.5
AT5G25610.1	RD22	pYWSpTALPNTPIPNSLHLLTFDFTDEKSTNVQVGK		-	-	2.6	2.4
AT4G08940.1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein	QTpYQMLKK		-	-	-	2.7

* p はリン酸化部位を示す。p の隣のアミノ酸がリン酸化されている。

** 無処理の野生型と比較して統計的に有意な場合のみ (Student's t test、<0.05)、リン酸化レベルが野生型の同じ ABA 処理区の何倍か (Fold-change) 示した。4 反復の Fold-change の平均を示した。

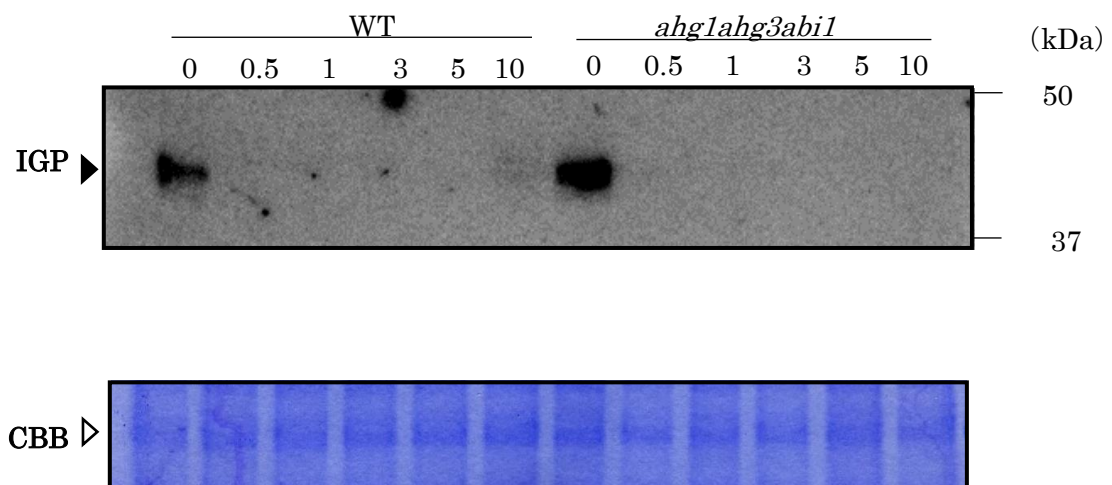


図 5. シロイヌナズナ種子の野生型と *ahg1ahg3abi1* のゲル内リン酸化実験

3 カ月程貯蔵したシロイヌナズナ種子から抽出したタンパク質でゲル内リン酸化実験を行った。野生型と *ahg1ahg3abi1* の種子を吸水後 (4°C、3 日間、遮光)、50 μ M ABA で 0、0.5、1、3、5、10 時間処理を行い、ABA 答性の SnRK2 の活性を検出した。上がゲル内リン酸化実験を行った写真で、下が同じサンプルで CBB 染色した写真である。黒の矢印が ABA 応答性の SnRK2、白い矢印が Rubisco を示している。

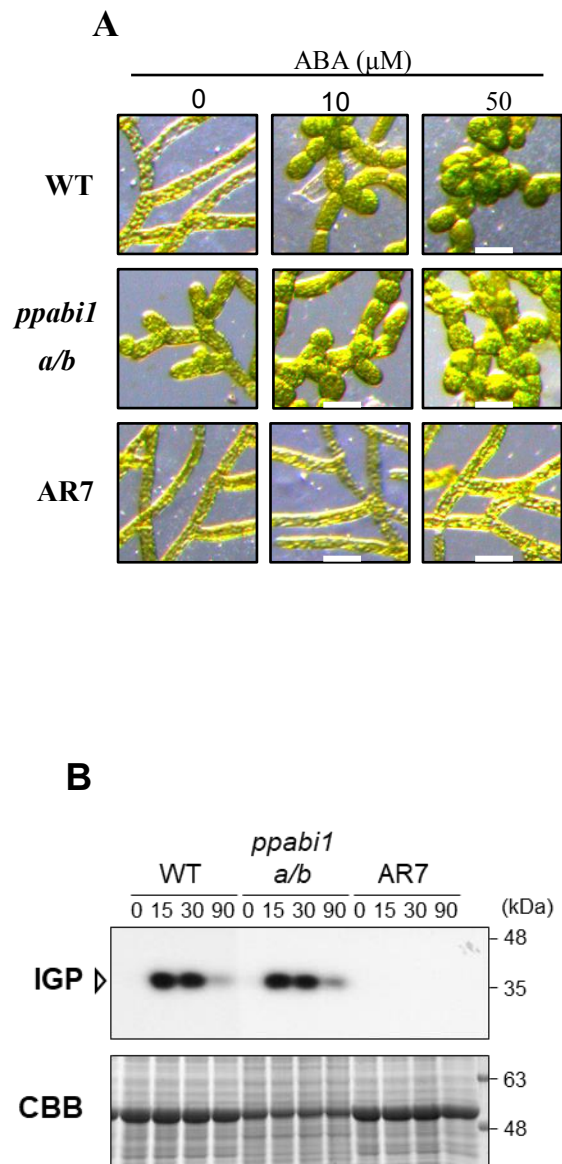


図 6. *Physcomitrella patens* の ABA 応答性変異体である *ppabi1a/b* と AR7

(A) *P. patens* の野生型 (WT), *ppabi1a/b*, AR7 の Abscisic acid (ABA) 応答。植物は 0、10、50 μM ABA の存在下で 1 週間育成した。

(B) WT, *ppabi1a/b*, and AR7 でゲル内リン酸化実験を行った。植物は 10 μM ABA で 0、15、30 分間処理を行った。その後、タンパク質を抽出し、ヒストンを基質として in-gel キナーゼアッセイを行いました。ABA 応答性 SnRK2 の活性化バンドを三角形で示す。

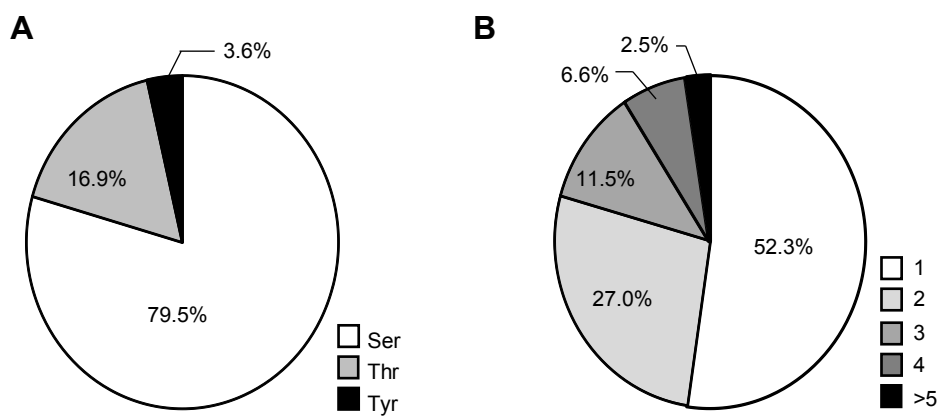


図 7. *P.patens* のリン酸化プロテオーム解析の概要

(A) リン酸化部位のアミノ酸残基の割合

(B) それぞれのリン酸化ペプチドに含まれるリン酸化部位の数の割合

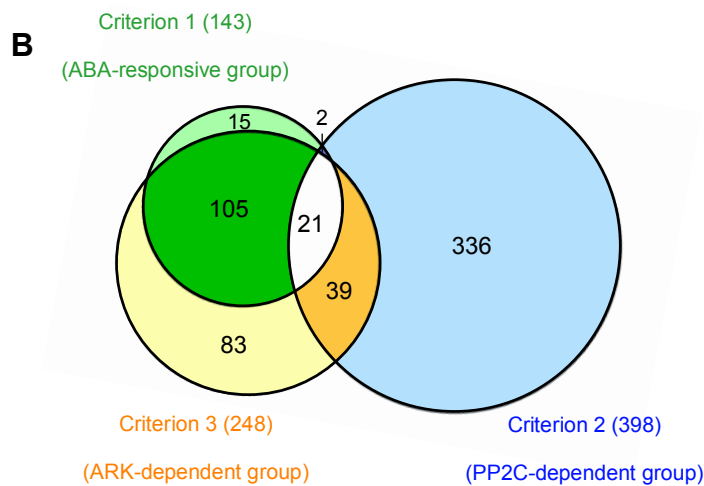
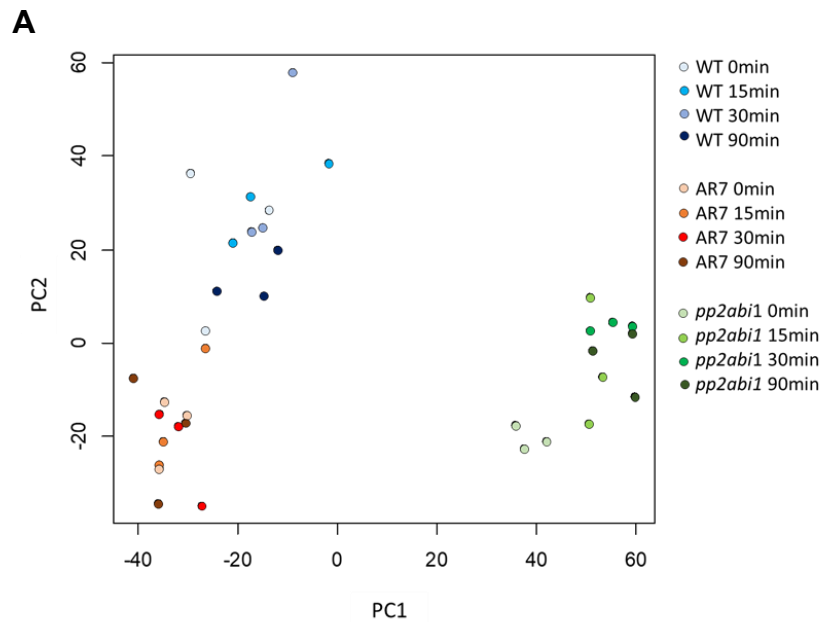


図 8. *P. patens* の野生型、*ppabilab*、AR7 のリン酸化プロテオームデータの比較解析

(A) 野生型、*ppabilab*、AR7 のリン酸化プロテオームデータの主成分分析

(B) リン酸化ペプチドは以下の条件に当てはまるものを選択した。1) *P. patens* の野生型で ABA 応答がみられるリン酸化ペプチド (ピンク)、2) *ppabi1a/b* のリン酸化レベルが野生型に比べ 2 倍以上 (青)、3) AR7 のリン酸化レベルが野生型の半分以下 (黄色)。リン酸化ペプチドのリン酸化レベルの変動が統計的に有意か、student's t-test (P-value < 0.05) によって調べた

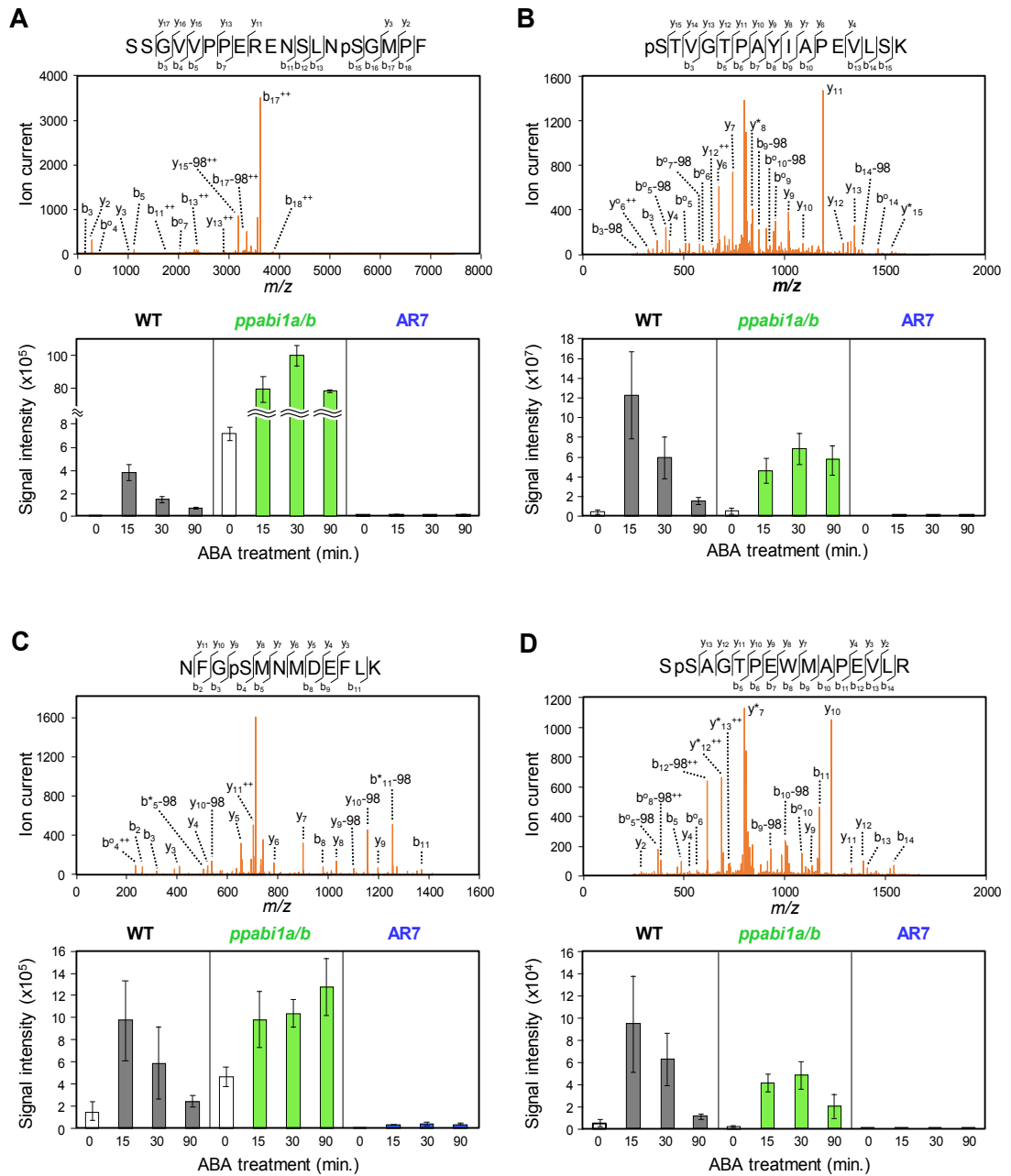


図 9. *P. patens* の ABA 応答性リン酸化ペプチド

Pp1s218_100 (A)、Pp1s116_98 (B)、Pp1s9_249 (C)、Pp1s462_10 (D) のリン酸化ペプチドの定量データ。それぞれ、Ca²⁺-binding EF-hand family protein、PpSnRK2B、AREB/ABF-type bZIP タンパク質、ARK をコードしている。棒グラフのエラーは標準誤差 (n = 3) を示す。

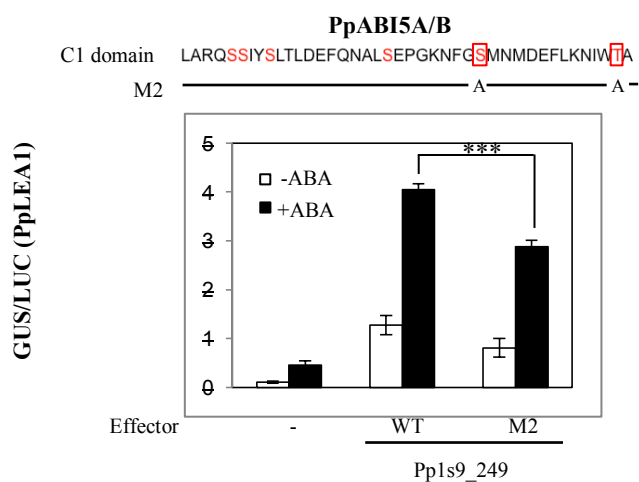


図 10. Pp1s9_249 (PpABI5A/B) の transactivation assay

Pp1s9_249 は一過的に *P. patens* 細胞に発現させ、*PpLEA1* プロモーター: *GUS* または *PpLEA1* プロモーター: *Ubi-LUC* が ABA の存在下または非存在下での発現量が測定された。エフェクターのプラスミドは *Pp1s9_249* (WT) または *Pp1s9_249* (M2) を含む。プロモーターの活性は GUS/LUC 比が評価された。エラーは土スタンドのエラー (n = 3) を示す。

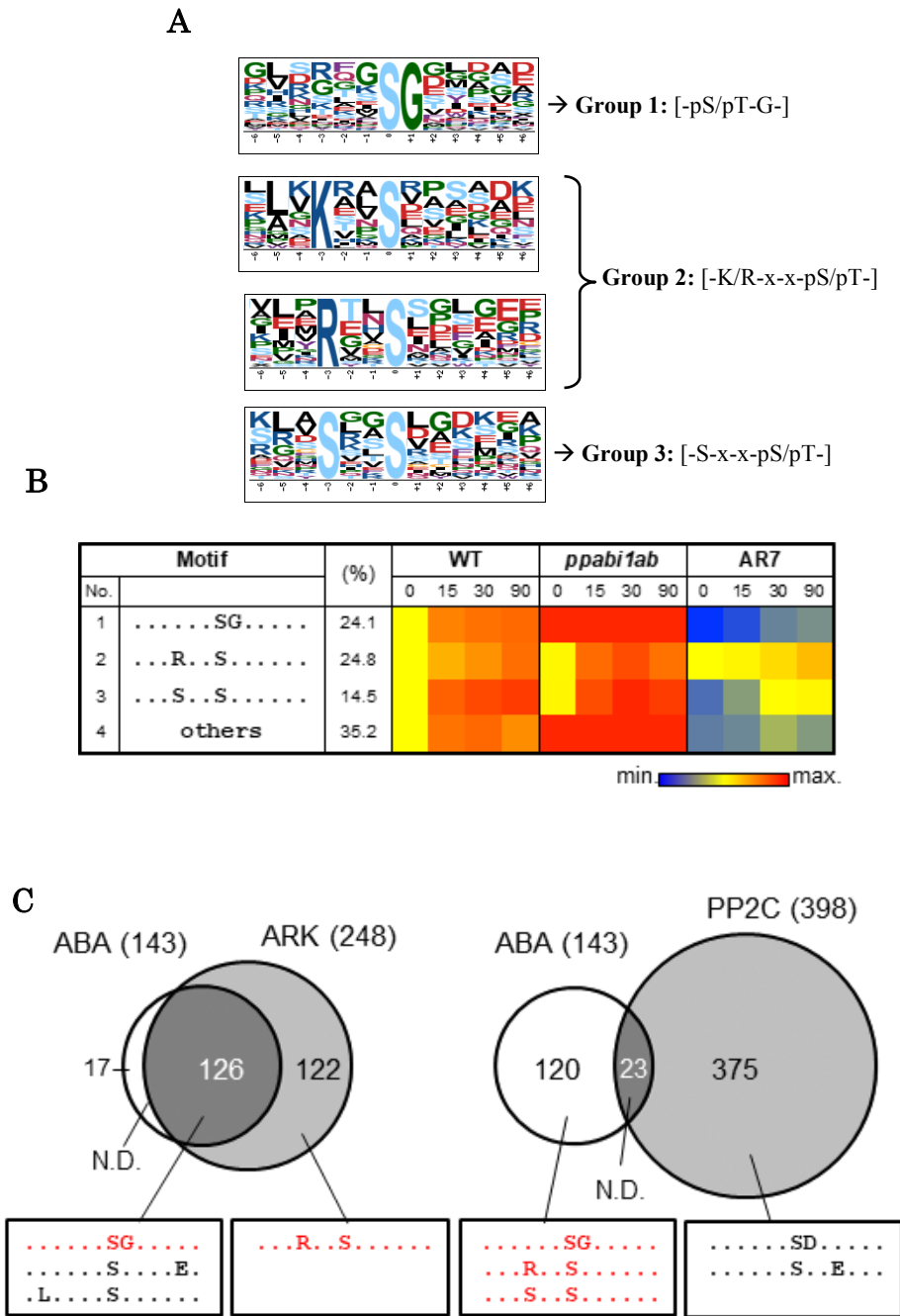


図 11. *P. patens* の ABA 応答性のリン酸化ペプチドのモチーフ解析

(A) 野生型の ABA 応答性リン酸化ペプチドのモチーフ解析。Motif-X を使うことで 3 つのグループのモチーフが検出された。Group 1、[-pS/pT-G-]、Group2、[-K/R-x-x-pS/pT-]とグループ3、[-S-x-x-pS/pT-]である。(B) それぞれのモチーフのグループのリン酸化ペプチドのヒートマップ。0、15、30、90 分間 ABA 処理された野生型、*ppabi1a/b*、AR7 定量的リン酸化ペプチドのデータが集められた。赤と青はそれぞれ上方制御と下方制御を示している。(C) ABA 依存的(白)または PP2C 依存的なグループ(灰色)リン酸化ペプチドのモチーフ解析(左のパネル)と ARK 依存的な(白)または ARK 依存的なグループリン酸化ペプチドの(右パネル)モチーフ解析。

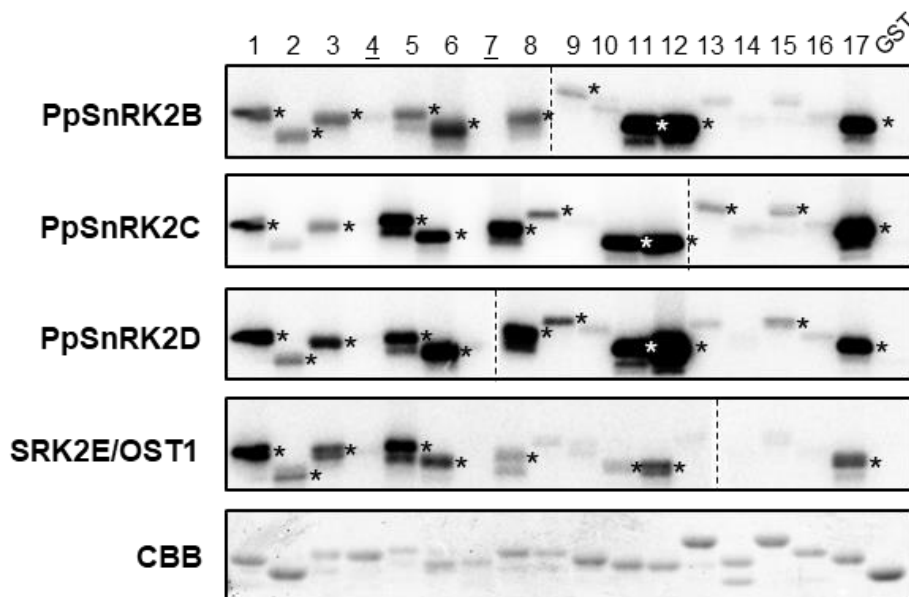


図 12. SnRK2 は *P. patens* の ABA 応答性のリン酸化ペプチドをリン酸化する

ABA 応答性のリン酸化ペプチドと SnRK2 は大腸菌で GST 融合タンパク質として合成された。*In vitro* リン酸化アッセイは SnRK2 (PpSnRK2B, PpSnRK2C, PpSnRK2D, and SRK2E/OST1)、と 1) Pp1s456_22, 2) Pp1s212_8, 3) Pp1s15_390, 4) Pp1s81_42, 5) Pp1s188_92, 6) Pp1s70_258, 7) Pp1s242_81, 8) Pp1s29_327, 9) Pp1s1_419, 10) Pp1s1_419, 11) Pp1s74_123, 12) Pp1s31_291, 13) Pp1s187_77, 14) Pp1s151_2, 15) Pp1s29_119, 16) Pp1s171_52, and 17) Pp1s131_107. の基質を用いて行われた。4, 7, 9, 13 以外のこの実験に用いられたペプチドは ABA 応答性リン酸化ペプチドを含むリストの Table S1 から選択された。*In vitro* での反応後、それぞれの基質のリン酸化レベルをオートラジオグラフィーでイメージングされた。SnRK2 に依存したペプチドのリン酸化はアスタリスクで示されている。CBB 染色はそれぞれのサンプルのタンパク質量を示している。点線は異なるゲルであることを示している。

表 6. CAPS 解析に用いたプライマー

プライマー名	Fw / Rv	遺伝子配列
<i>ahg1-1</i> F	Fw	AGGATGAGCCGTTGTACG
<i>ahg1-1 Afl II</i> R	Rv	CCCTGGTTAATTTTCTTACTT
<i>ahg3-1</i> F	Fw	TGGGATGGAGCTAGGGTTCA
<i>ahg3-1</i> R	Rv	ATCACTCGCCAAGATCAAACAC