

	カマル エムテ ァー ムスタファ
氏 名	KAMAL, Md Mostafa
本籍（国籍）	バングラデシュ人民共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連論 184 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当論文博士
研究科及び専攻	連合農学研究科
学位論文題目	Responses of plants to environmental stresses: understanding of basic mechanisms and practical applications（植物の環境ストレスに対する応答：基本的なメカニズムの理解とその応用）
学位審査委員	主査 岩手大学教授 上村 松生 副査 RAHMAN, Abidur（岩手 准教授），豊増 知伸（山形 教授），笹部 美知子（弘前 准教授），春日 純（帯広 助教）

論 文 の 内 容 の 要 旨

Abiotic stresses, such as cold, heat, flood, drought, and salinity, are major limiting factors of global crop and plant production. In the era of unpredictable climate fluctuations due to ongoing global climate change, the abiotic stress extremes are getting more frequent over the years. Sessile plants cannot avoid any extreme environmental factors, and over 90% of field crops experience abiotic stress. Moreover, abiotic stress always occurs in combination in the field, and one abiotic stress can lead to several secondary abiotic stresses. Even though the global climate is treading towards warmer periods, it is not diminishing cold stress threats. For example, reports show that a warmer climate causes extreme and unpredictable out of season cold stress, cold shock, localized frost, and freezing events. Furthermore, reduced length of cold autumns or warm and short winters affect the cold acclimation, vernalization, bud dormancy period in crop and tree plants. Therefore, understanding abiotic stress response and developing sustainable stress tolerance methods are the critical steps towards assuring global food security.

Elucidating how plants sense and respond to cold is essential for identifying genetic and chemical methods that may improve plant performance under low-temperature conditions. However, most studies that focus on cold stress are either under prolonged cold stress or cold acclimation conditions. The molecular mechanisms involved in early cold perception and response are not clearly understood yet. Plant proteins go through cascades of post-translational modifications and form complex signaling pathways that regulate essential biological processes, including the external environmental response. Protein phosphorylation is one of the most common and crucial post-translational modifications, and nearly one-third of proteins are modified through phosphorylation. Identification of differentially phosphorylated proteins in response to environmental factors has led to the discovery of important components of signaling pathways. Mass spectrometry-based methods to quantify phosphoproteome changes are a well-established system for identifying key phosphorylation events involved in stress response. The plasma membrane and its adjacent extracellular and cytoplasmic

sites are the first checkpoints for sensing temperature changes and subsequent events such as signal generation and solute transport. Here, I report a large-scale, comprehensive study on Arabidopsis membrane phosphoproteomics during early cold response events. In this study, I focused on the temporal change in microsomal membrane protein phosphorylation in response to a brief 5 to 60 min cold exposure. Subsequently, using hydroxy acid-modified metal oxide chromatography (HAMMMOC) phosphopeptide enrichment method coupled with a powerful state of the art mass spectrometer, I detected around 1900 peptides. Gene ontology (GO) analysis of these phosphorylated proteins revealed that cold exposures led to rapid phosphorylation of proteins involved in cellular ion homeostasis, solute and protein transport, cytoskeleton organization, vesical trafficking, protein modification, and signal transduction processes. Even under such a brief cold exposure, phosphorylation of ion channel or transporter proteins such as Ca^{2+} (hyperosmolality-gated Ca^{2+} permeable channels/OSCs, Ca^{2+} -ATPases/ACAs), K^{+} (potassium transporters/POTs), $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ ($\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger/NHX), which are involved in maintaining ionic homeostasis inside the cell, indicated that plant cell tries to maintain its ionic balance in steady state under cold. Accumulation of cryoprotectants such as soluble sugar is a crucial defense mechanism to survive under cold extremes. Activation of sugar and monosaccharide transporters, sugar will eventually be exported transporter12 (SWEET12), early responsive to dehydration6/6 like (ERD6/6like) and transmembrane transporter 1/3 (TMT1/3), at such an early stage indicate that plant starts to deploy its defense mechanism as soon as they sense the cold. With phosphorylation motif analysis using the Motif-X algorithm, I identified 16 characteristic target motifs of essential kinases such as receptor-like kinases (RLKs), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), Calcium/Calmodulin dependent protein kinases (CDPK/CaMK), casein kinases (CK), and GSK3/shaggy-related protein kinase (GSK). Further, the kinase-substrate network revealed that the kinases and substrates form a complex network of phosphorylation events even during a brief cold exposure. Ca^{2+} , phosphoinositide, abscisic acid (ABA), auxin, and brassinosteroid (BR) and reactive oxygen species (ROS) mediated signaling pathways were also found to be involved in the early cold response, which gives a further complex response from the plants during cold sensing. Phosphorylation of microtubule-cytoskeleton related proteins (myosin-binding protein7 (MyoB7), myosin motor XI-K/C, and 65-kDa microtubule-associated protein1 (MAP65-1) involved in cytoplasmic streaming and cytoskeleton organization) and vesicle trafficking-related proteins (ARF guanine-nucleotide exchange factor GNOM, Sorting nexin/SNX, vacuolar protein sorting-associated protein41/VPS41, Syntaxin/SYP121/132, and dynamin-related protein/DRP2A/B) gives a clear idea that these proteins and their respective functions are an essential part of the early cold response mechanism.

Subsequently, besides understanding the molecular mechanisms of early cold response in Arabidopsis, I focused on developing a cost-effective, time-, and labor-saving method to improve plant performance against a range of abiotic stresses, including cold. Here I developed a seed treatment method using an optimized level $\bullet\text{OH}$ generated from Fenton/Haber-Weiss reaction. I showed the effects of a single/one-time application of this $\bullet\text{OH}$ to seeds on germination and growth in germinating seedlings under optimum and sub-optimum conditions such as chilling, high temperature, heat, and salinity. A one-time treatment of Arabidopsis seeds with $\bullet\text{OH}$ improved germination and early growth in young seedlings. The treatment effect was also not limited to the germination and early growth stage, and plants from the treated seeds showed an increased daily root growth and increased number of lateral

roots. More interestingly, the treatment effect became prominent under suboptimum conditions. I observed a clear advancement in germination speed after the •OH treatment compared to water treated and H₂O₂ treated seeds. Almost in all the abiotic stress conditions, the •OH seeds took significantly less time to reach 50% germination. Moreover, the germinating seedlings showed faster radical and hypocotyl elongation and cotyledon expansion and greening after the •OH treatment. Under different abiotic stress conditions, such as cold, early germination and seedling survival are essential criteria for assuring a better production.

The outcomes of this •OH treatment were surprising, and the superior effects of •OH treatment than its precursor H₂O₂ led to the question of what molecular mechanisms are behind this better performance. Even though H₂O₂ is frequently used as a seed priming or treating agent that showed promising effects in improving different abiotic stress tolerance, no study ever considered the possible conversion of H₂O₂ into •OH by endogenous Fenton/Haber-Weiss reaction. Therefore, to understand the molecular mechanisms behind increased stress tolerance by •OH treated seeds and seedlings, I employed a mass spectrometry-based proteomics method to study the change in seed proteins under chilling stress. Surprisingly, GO analysis showed that proteins that were exclusively accumulated in •OH treated group were mostly antioxidation-related (such as glutathione reductase1/GR1, dehydroascorbate reductase/DHAR, and ascorbate peroxidase/APX), chaperones (such as heat-shock protein60/HSP60, chaperonin 60 subunit beta1/CPN60B1/LEN1, and calreticulin/CRT), late embryogenesis related (LEA) proteins, and proteins involved stress response, toxin catabolism, embryo development. These results indicate that the •OH enhanced the antioxidant properties of the treated seeds, which may be contributed to maintain a basal ROS level in the embryo and germinating seeds. The treatment also contributed to the maintenance of protein homeostasis, which is essential for cells to perform better under abiotic stress. Overall findings from this study showed the positive sides of •OH in plant performance.

To conclude, I revealed the early cold response events in plants with a first-ever large-scale membrane phosphoproteomic study. The findings from this study will be a valuable resource for scientists to narrow down target genes associated with the proteins for better functional genomic studies in the future. Furthermore, the time and cost-efficient seed treatment with just a one-time application of •OH can potentially solve emerging extreme abiotic stresses. This study also provides a first-ever view of the positive sites of the deleterious reactive oxygen species, •OH. I expect both of my studies will contribute to developing methods to improve stress-tolerant/resistant crop varieties.

(和訳)

寒冷、暑さ、洪水、干ばつ、塩分などの非生物的ストレスは、世界の作物や植物の生産を制限する主な要因である。現在進行中の地球規模での予測不可能な気候変動の時代において、非生物的ストレスに曝される危険性はより頻繁になっている。動けない植物は極端な劣悪環境を回避することはできず、畑作物の90%以上が非生物的ストレスを経験すると言われていた。さらに、野外では津年に複数の非生物的ストレスが同時に発生し、さらには、1つの非生物的ストレスがいくつかの二次的な非生物的ストレスにつながる可能性もある。また、世界の気候は温暖期に向かって進んでいるが、それが寒冷ストレスの脅威を減少させることに繋がっていない。事実、より温暖になった気候は、季節外れの極端で予測不可能な寒冷ストレス、

寒冷ショック、局地的な霜、および凍結を引き起こしている。さらに、秋や冬が暖かく短くなることは、作物および樹木の低温馴化、春化、芽の休眠期間に影響を及ぼす。従って、植物の非生物学的ストレス応答を理解し、植物に対する持続可能なストレス耐性増強手法を開発することは、世界の食料安全保障を確保するための重要なステップと考えられる。

植物が寒冷感知および反応機構の解明は、低温条件下における植物の能力を改善する遺伝的あるいは化学的方法を特定するために不可欠である。ただし、寒冷ストレスに関する多くの研究は、長期の寒冷ストレス暴露や低温馴化に焦点を当てたものとなっており、短期間の寒さの感知とそれに対する反応に関する分子機構は明確に理解されていない。タンパク質は、翻訳後修飾のカスケードを介して外部環境に対する応答など重要な生物学的プロセスを調節する複雑な信号伝達経路を形成する。中でも、タンパク質のリン酸化は最も重要な翻訳後修飾の1つである。環境要因に応答するタンパク質のリン酸化の詳細を理解することは重要な信号伝達経路要素の発見にも繋がりを有する。

本研究では、まず、非生物学的ストレス（特に低温ストレス）応答に関与する主要なリン酸化イベントを特定するため、質量分析と生物情報学的手法を用いたリン酸化プロテオミクスをシロイヌナズナを対象として実施し、温度変化の感知やそれに引き続く信号伝達および溶質輸送などのイベントに重要な役割を果たす生体膜及びその近傍における初期の寒冷応答イベントを理解することを試みた。具体的には、5~60分の短時間の低温曝露に応答したマイクロソームタンパク質のリン酸化をヒドロキシ酸修飾金属酸化物クロマトグラフィー（HAMMMOC）ホスホペプチド濃縮法と質量分析法を組み合わせることで解析した。その結果、約1900個のペプチドを同定した。さらに、同定されたタンパク質の遺伝子オントロジー（GO）分析により、低温曝露が細胞イオンホメオスタシス、溶質およびタンパク質輸送、細胞骨格組織化、小胞輸送、タンパク質修飾、および信号伝達過程に関与するタンパク質の急速なリン酸化をもたらすことを明らかにした。また、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+}/H^{+} イオンのチャネルやトランスポーターのリン酸化も観察され、植物細胞が低温下でイオンバランスを維持しようとしていることを示していた。寒冷適応の重要メカニズムの一つである可溶性糖などの適合溶質の蓄積に関して、糖および単糖トランスポーターのリン酸化も寒冷曝露初期で起こることが確認された。また、Motif-X アルゴリズムを使用したリン酸化モチーフ分析により、キナーゼ分子に見られる特徴的なリン酸化モチーフ16個を特定するとともに、キナーゼ—基質ネットワークは、その両者が短時間の低温曝露に応答してリン酸化の程度を変動させる複雑な関係であることを明らかにした。さらに、 Ca^{2+} 、ホスホイノシチド、アブシジン酸（ABA）、オーキシン、ブラシノステロイド（BR）および活性酸素種（ROS）を介したシグナル伝達経路や微小管細胞骨格関連タンパク質、小胞輸送関連のタンパク質におけるリン酸化も様々に変動しており、低温曝露による複雑で非常に早い植物の応答機構の一端を示していることを示している。

次に、非生物学ストレスに対する短時間での応答機構の理解に加えて、寒さを含むさまざまな非生物学的ストレスに対する植物の応答能力を改善するための費用効果が高く効率的な方法の開発に焦点を当てた。ここでは、フェントン/ハーバーワイス反応から生成されたOHラジカルを用いた種子処理方法を開発した。種子をOHラジカルで1度だけ処理することが、非ストレス条件下に加えて低温、高温、熱、塩分などの非生物学的ストレス条件下でも発芽および発芽初期の実生の成長を促進する効果があることを見いだした。さらに、処理効果は、根の成長の中長期間における促進や側根数の増加という効果をもたらした。また、処理効果は非生物学的ストレス条件で50%発芽に要する時間の短縮をもたらすと同時に、発芽実生は幼根や胚

軸の伸長促進と子葉の拡大および緑化に対する効果を示した。今回見いだされた OH ラジカル処理の非生物的ストレス下における様々な成長促進効果は、低温などの非生物的ストレス条件下における生産性を確保し保証するための重要な貢献をされると考えられる。この OH ラジカル処理は H₂O₂ 処理の効果よりも大きなものであり、その背景にある分子機構を理解する必要があると考えられた。いままで H₂O₂ は種子のプライミング剤として用いられ、多様な非生物的ストレス耐性の改善に効果を示した研究はあるが、植物細胞の中でフェントン/ハーバーワイス反応による H₂O₂ の OH ラジカルへの変換の可能性を検討した研究はほとんど存在しない。そこで、OH ラジカル処理の効果の背後にある分子機構を理解するために、低温ストレス下における種子タンパク質に対する OH ラジカルの影響をプロテオーム手法により解析した。驚いたことに、OH ラジカル処理試料にのみ蓄積されたタンパク質は、そのほとんどが抗酸化関連、シャペロン、LEA タンパク質などでしめられていた。これらの結果は、OH ラジカル処理が種子の抗酸化特性やタンパク質構造および機能維持に関連していることを示している。つまり、OH ラジカル処理は胚および発芽中の種子の活性酸素レベルの調節やタンパク質恒常性の維持を強化し、非生物的ストレス下で細胞機能を維持・改善に結びついている可能性がある。

以上をまとめると、本研究では、大規模な生体膜リン酸化プロテオーム研究から植物における初期の低温応答イベントを初めて明らかにした。この研究結果は、今後、低温応答に関わるタンパク質をコードする遺伝子の絞り込みや機能的ゲノム研究を進めていく上での貴重な情報となりうる。さらに、OH ラジカルを 1 回だけ種子に処理することで非生物的ストレスの影響を緩和することができる効率的な方法を見出すことにつながり、有害な活性酸素種である OH ラジカルが持つ正の効果について光を当てることとなった。今後、これらの研究がストレス耐性改善や耐性作物の作出方法の開発に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨

各種の非生物的ストレスは、作物生産を制限する主要因である。現在進行中の地球規模での予測不可能な気候変動の時代において、作物はより頻繁に非生物的ストレスに曝されている。植物の非生物的ストレス応答を理解し、植物に対する持続可能なストレス耐性増強手法を開発することは、世界の食料安全保障を確保するために重要である。そこで、本研究では、まず、低温ストレスを例にして、非生物学的ストレス応答や信号伝達に関与するタンパク質リン酸化状態を網羅的に明らかにすることを目的にシロイヌナズナを用いたリン酸化プロテオミクス解析を行った。次いで、多くの非生物学ストレス応答に共通して関与している活性酸素種で種子（シロイヌナズナ及びイネ）を処理することにより発芽や初期生長を促進する方法の開発を行った。

リン酸化プロテオミクスにより約 1900 個のペプチドがリン酸化されていることを見いだした。低温暴露によって多くのペプチドのリン酸化程度が変動し、その中でも細胞内イオンホメオスタシス、溶質およびタンパク質輸送、細胞骨格、小胞輸送、タンパク質修飾、および信号伝達過程に関与するタンパク質が急速にリン酸化されることを明らかにした。また、タンパク質リン酸化を担うタンパク質キナーゼ分子に見られる特徴的なリン酸化モチーフ 16 個を特定し、キナーゼとその基質間のネットワークは、短時間の低温曝露に応

答してリン酸化程度を複雑に変動させる関係であることを明らかにした。これらの結果は、低温暴露によるタンパク質リン酸化を介した複雑で非常に早い制御系が存在していることを示している。

リン酸化プロテオミクスの結果から活性酸素制御系タンパク質の関与が明らかになったことから、活性酸素（フェントン/ハーバーワイス反応から生成された OH ラジカル）処理が非生物学的ストレスに対する植物の応答能力を改善するか否かを調べた。その結果、種子を OH ラジカルで 1 度だけ処理することで非ストレス条件下だけではなく、低温、高温、熱、塩分などの非生物学的ストレス条件下でも、発芽および初期生長を促進する効果も持つことを見いだした。さらに、中長期間における根の成長促進や側根数の増加も明らかになった。次に、種子発芽等への OH ラジカル処理効果の分子機構を理解するため、低温ストレス下における種子プロテオミクスを試みた。OH ラジカル処理試料には、抗酸化関連、シャペロン、LEA タンパク質などが多く蓄積していた。これらの結果は、OH ラジカル処理が胚および発芽中の種子の活性酸素レベルの調節やタンパク質恒常性維持を強化し、非生物学的ストレス下で細胞機能の維持・改善に結びついている可能性を示している。

本研究は、低温応答初期イベントを大規模リン酸化プロテオーム研究から初めて明らかにしたもので、低温応答に関する機能的ゲノム研究を進めていく上での貴重な情報となりうる。さらに、その基盤的研究を発展させ、OH ラジカル処理による効率的で応用性の高い非生物学的ストレス緩和が可能な方法の確立に繋がる知見を供給した。以上の貢献から、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Md Mostafa Kamal, Carlos Erazo, Karen K. Tanino, Yukio Kawamura, Jun Kasuga, Bernard Laarveld, Andrew Olkowski, Matsuo Uemura (2020)
A single seed treatment mediated through reactive oxygen species increases germination, growth performance, and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* and rice
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **84**: 2597-2608
DOI: 10.1080/09168451.2020.1808444
2. Md Mostafa Kamal, Shinnosuke Ishikawa, Fuminori Takahashi, Ko Suzuki, Masaharu Kamo, Taishi Umezawa, Kazuo Shinozaki, Yukio Kawamura, Matsuo Uemura (2020)
Large-scale phosphoproteomic study of *Arabidopsis* membrane proteins reveals early signaling events in response to cold
International Journal of Molecular Sciences **21**: 8631
doi:10.3390/ijms21228631

参考論文

1. Md Mostafa Kamal, Daisuke Takahashi, Takato Nakayama, Yushi Miki, Yukio Kawamura, Matsuo Uemura (2020)
Proteomic approaches to identify cold-regulated plasma membrane proteins
Methods in Molecular Biology **2156**: 171-186
doi: 10.1007/978-1-0716-0660-5_13