

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18555

研究課題名(和文)ジベレリン信号伝達に關与するNtCDPK1の自己リン酸化の生理的意義の解明

研究課題名(英文)Physiological importance of autophosphorylation of NtCDPK1 involved in gibberellin signal transduction

研究代表者

伊藤 岳 (Takeshi, Ito)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号：30636139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまで不明であったNtCDPK1の自己リン酸化の生理的な役割を明らかにした。まず、NtCDPK1の自己リン酸化部位を同定した。続いて、NtCDPK1の自己リン酸化により基質RSGとの結合能が低下するだけでなく、自己リン酸化によりRSGに対するリン酸化が抑制されることを明らかにした。また、RSGとは逆にミエリン塩基性タンパク質はNtCDPK1の自己リン酸化によりリン酸化されやすくなることが示された。これらの結果から、自己リン酸化によりRSGが一過的にリン酸化される機構や自己リン酸化により基質の選択性が変化する機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The tobacco calcium-dependent protein kinase, NtCDPK1, was previously shown to be autophosphorylated in a calcium-dependent manner. Here, we investigated the functional importance of autophosphorylation in NtCDPK1. Autophosphorylation sites of NtCDPK1 were shown to be located in the variable N-terminal domain. The autophosphorylation reduced the binding affinity of NtCDPK1 for RSG. Furthermore, the autophosphorylation decreased the phosphorylation efficiency of RSG, yet increased that of myelin basic protein. Autophosphorylation sites of NtCDPK1 were phosphorylated in response to GAs in plants. The substitution of these autophosphorylation sites with Ala enhanced the NtCDPK1 overexpression-induced sensitization of seeds to a GA biosynthetic inhibitor during germination. These results suggest new functions of autophosphorylation in CDPKs, namely, the autophosphorylation can prevent the excessive phosphorylation of substrates and alter the substrate preference of CDPKs.

研究分野：植物生理学・分子生物学

キーワード：自己リン酸化 キナーゼ カルシウム ジベレリン 基質認識 基質特異性 タンパク質リン酸化酵素  
植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 (CDPK) は植物や一部の原生生物にのみ存在するキナーゼである。CDPK は、進化の過程でカルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 (CaMK) とカルモジュリンが融合して誕生したと考えられており、一つのタンパク質分子内にカルシウムの認識機能とキナーゼ活性をもつユニークなタンパク質である。動物のカルシウム信号伝達の主要な構成因子である PKC や CaMK が植物では欠失していることから、CDPK は植物のカルシウム信号伝達において中心的な役割を果たすと考えられる。CDPK は、シロイヌナズナでは 34 遺伝子、イネでは 29 遺伝子から成るファミリーを形成している。CDPK は、低温や塩、乾燥ストレスへの耐性、耐病性、活性酸素種の産生、気孔の開閉、根の形成、花粉管の伸長、未成熟種子のデンプンの蓄積、ABA や GA などの植物ホルモンの信号伝達に参与することが知られている。マラリア原虫では、*PbCDPK4* のノックアウトによる雄性配偶子の形成不全が報告されており、CDPK はマラリア治療薬の分子標的の候補として注目されている。このように CDPK は農業・医療への応用が期待されることから、国内外で盛んに研究されている。

CDPK は Ser/Thr タンパク質リン酸化酵素で、N 末端非保存領域、触媒領域、自己阻害領域、カルシウムと結合する 4 つの EF ハンドモチーフから成るカルモジュリン様領域で構成されている (図 1)。近年、原生生物の CDPK の結晶構造解析から、カルシウム非存在下では自己阻害領域と触媒領域の結合によりキナーゼ活性が阻害されていること、カルシウムがカルモジュリン様領域に結合することで、自己阻害領域が触媒領域から離れ、CDPK はキナーゼ活性を示すことが明らかになった。多くの CDPK で、N 末端非保存領域はミリスチル化やパルミトイル化などの脂質修飾を受けることが知られているが、それ以外の N 末端非保存領域の機能的な重要性は不明であった。

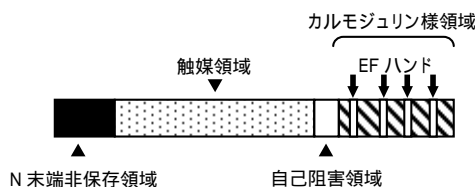


図 1. CDPK の模式図

タバコの bZIP 型転写因子 RSG はジベレリン (GA) 生合成酵素遺伝子を標的遺伝子とし、GA の内生量調節に参与している。RSG の機能は 14-3-3 タンパク質によって負に制御されている。14-3-3 は RSG の Ser-114 のリン酸化依存的に RSG と結合し、RSG を細胞質に空間的に隔離する。カルシウム依存性タンパク

質リン酸化酵素 NtCDPK1 は RSG の Ser-114 をリン酸化し、RSG と 14-3-3 の結合を促進する酵素として単離された (図 2)。NtCDPK1 はカルシウム依存的に RSG と結合し、RSG をリン酸化する。NtCDPK1 を過剰発現させたタバコは GA 生合成酵素遺伝子の発現が低下し、発芽率が低下することが示された。これまでに CDPK の N 末端非保存領域の機能は不明であったが、研究代表者らは、N 末端非保存領域が RSG との結合に重要であることを明らかにした。また、シロイヌナズナの CDPK である AtCPK9 の N 末端非保存領域を NtCDPK1 のものと置換したキメラ CDPK は RSG のリン酸化活性を示したことから、N 末端非保存領域を改変することで、CDPK の基質特異性を改変することができる可能性が示された。続いて、研究代表者らは、NtCDPK1 が RSG と 14-3-3 と三者複合体を形成し、RSG がリン酸化されると、NtCDPK1 は 14-3-3 を RSG に受け渡すことを明らかにした (図 3)。NtCDPK1 は基質をリン酸化するだけでなく、RSG と 14-3-3 の結合を促進するスキャフォールドタンパク質として機能することが示された。この機能により、シグナル伝達の特異性が高められると考えられた。

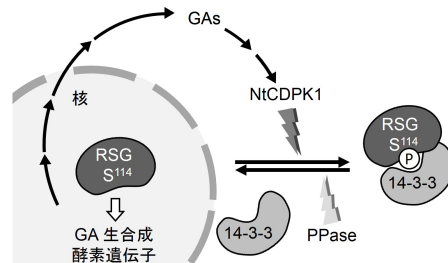


図 2. RSG の機能制御モデル

2. 研究の目的

RI 標識した ATP を用いたリン酸化解析により、NtCDPK1 は in vitro で自己リン酸化されることが明らかになった。植物に GA を処理すると NtCDPK1 のリン酸化が観察されるが、そのリン酸化が in vitro での自己リン酸化と同じ部位で生じているかは明らかになっていない。NtCDPK1 だけでなく、多くの CDPK が in vitro で自己リン酸化されることが報告されている。これまでに、CDPK の自己リン酸化の生理的な意義は不明であったが、研究代表者らは、NtCDPK1 は自己リン酸化されると RSG との結合能が低下することを見出した。この RSG 結合能の低下は、NtCDPK1 の RSG リン酸化能を抑制し、RSG の過剰なリン酸化を防ぐと考えられる。多くのキナーゼの活性化に重要な activation loop 内の自己リン酸化部位は、CDPK では擬似的なリン酸化状態を示す Asp/Glu に進化の過程で置換されており、NtCDPK1 は自己リン酸化を必要とせず、カルシウムのみで活性化される。したがって、NtCDPK1 は多くのキナーゼとは異なる領域が自己リン酸化されることで、RSG の機能が制御されると考えられた。本研究は、

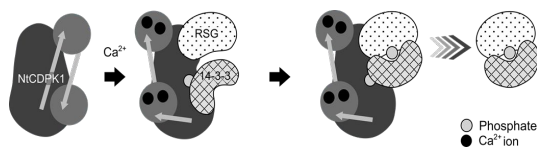


図 3. 14-3-3 転移モデル

NtCDPK1 の自己リン酸化部位を同定し、NtCDPK1 の自己リン酸化が基質のリン酸化に与える影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

GA の内生量調節に関与する NtCDPK1 は基質の RSG をリン酸化するだけではなく、自己リン酸化されることも明らかになった。本研究は NtCDPK1 の自己リン酸化の生理的意義を明らかにすることを目的とし、以下の研究を行った。

1) NtCDPK1 の自己リン酸化部位を質量分析で同定した。GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) を融合した NtCDPK1 を発現するコンストラクトを作成し、タンパク質発現用の大腸菌株で大量培養し、GST 融合タンパク質精製カラムを用いて精製した。NtCDPK1 は自己リン酸化反応を行った後、トリプシン消化を行い、MALDI-TOF-MS を用いて解析した。

2) 自己リン酸化部位に非リン酸化変異である Ala 置換、または疑似リン酸化変異である Asp 置換を導入し、RSG のリン酸化能やキナーゼ活性への影響を調べた。質量分析により同定された自己リン酸化部位を Ala に置換した。Ala 置換により自己リン酸化が起こらなくなることを Phos-tag SDS-PAGE を用いて調べた。Phos-tag SDS-PAGE はアクリルアミドに添加した Phos-tag がリン酸化タンパク質をトラップし、泳動を遅らせることで、リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離する技術である。続いて、自己リン酸化部位を疑似リン酸化状態を示す Asp に置換し、RSG のリン酸化能やキナーゼ活性への影響を調べた。カゼインやミエリン塩基性タンパク質は様々なキナーゼに効率良くリン酸化されることから、キナーゼ活性の測定に利用される。自己リン酸化部位に変異を導入した NtCDPK1 のリン酸化能を RSG とカゼイン、ミエリン塩基性タンパク質で比較し、自己リン酸化が基質特異的なリン酸化に影響を与えるのか、それともキナーゼ活性自体に影響を与えるのかを調べた。

3) アミノ酸置換が NtCDPK1 過剰発現植物の発芽率に与える影響を調べた。NtCDPK1 を過剰発現するタバコでは RSG の機能が抑制されるため発芽率が低下する。自己リン酸化部位を Ala や Asp に置換した NtCDPK1 を過剰発現するタバコを作製し、NtCDPK1 の自己リン酸化部位のアミノ酸置換が発芽率に与える影響を調べた。

4) Phos-tag SDS-PAGE を用いて、植物細胞内で起こるリン酸化が in vitro での自己リン酸化と同じ部位で起こるかを調べた。植物に GA を処理すると NtCDPK1 がリン酸化されることが明らかになっているが、in vitro での自己リン酸化と同じ部位でリン酸化されるかは不明であった。Phos-tag SDS-PAGE を用いて、植物細胞内における NtCDPK1 のリン酸化部位が in vitro での自己リン酸化部位と同じであることを調べた。

化と同じ部位で起こるかを調べた。植物に GA を処理すると NtCDPK1 がリン酸化されることが明らかになっているが、in vitro での自己リン酸化と同じ部位でリン酸化されるかは不明であった。Phos-tag SDS-PAGE を用いて、植物細胞内における NtCDPK1 のリン酸化部位が in vitro での自己リン酸化部位と同じであることを調べた。

### 4. 研究成果

CDPK は植物のカルシウム信号伝達において中心的な役割を果たしており、遺伝学的な解析から多くの生理的な機能が明らかにされてきた。しかしながら、分子レベルでの CDPK の機能制御機構に関して未解明な点が多い。CDPK は多くのキナーゼとは異なり、触媒領域の activaton loop 以外の部位が自己リン酸化されると予想されていたが、その生理的な意味の解明には至っていなかった。研究代表者は、始めに NtCDPK1 の自己リン酸化部位を同定した。CDPK の基質認識に重要な N 末端非保存領域が自己リン酸化されることを明らかにした。さらに、NtCDPK1 の自己リン酸化により RSG との結合能が低下するだけでなく、自己リン酸化により RSG に対するリン酸化が抑制されることを見出した。すなわち、自己リン酸化により、RSG が一過的にリン酸化される機構の存在が示唆された。また、RSG とは逆にミエリン塩基性タンパク質は NtCDPK1 の自己リン酸化によりリン酸化されやすくなることが示された。したがって、自己リン酸化される前に RSG を、自己リン酸化された後に別の基質をリン酸化する機構の存在が推定された。このような、自己リン酸化によって基質特異性が変更される機構の解析は前例がなかったことから、本研究により植物分野だけでなく情報伝達の研究としても特に興味深い成果が得られたと考えている。また、NtCDPK1 を過剰発現するタバコでは RSG の機能が抑制されるため発芽率が低下するが、自己リン酸化部位を Ala に置換した NtCDPK1 を過剰発現するタバコでは発芽率がさらに低下することが示された。これまでに、CDPK は主にカルシウム濃度に応じて活性が調節されると考えられてきたが、自己リン酸化による CDPK の基質リン酸化の制御機構が明らかになったことから、CDPK によるカルシウムの信号伝達機構を新たな視点で説明できると考えている。

### 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4件)

1. Takeo, K., and Ito, T. (2017). Subcellular Localization of VIP1 is Regulated by Phosphorylation and 14-3-3 proteins. FEBS Lett. in press. 査読有

2. Ito, T., Ishida, S., Oe, S., Fukazawa, J., and

Takahashi, Y. (2017). Autophosphorylation Affects Substrate-Binding Affinity of Tobacco Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase1. Plant Physiol. in press. 査読有

3. Fukazawa J., Ito T., Kamiya Y., Yamaguchi S., and Takahashi Y. (2015). Binding of GID1 to DELLAs Promotes Dissociation of GAF1 from DELLA in GA Dependent Manner. Plant Signal. Behav. 10: e1052923. 査読有

4. Ito T., and Takahashi Y. (2015). Phosphatase protection assay: 14-3-3 binding protects the phosphate group of RSG from λ protein phosphatase. Bio-protocol. 5: e1395. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1. 大橋由紀, 高橋竜平, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介. ジベレリンによるシロイヌナズナの花成制御. 第74回中国四国植物学会, 2017年5月13-14日, 高知県高知市.

2. 勝部隆義, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2017). GAF1 とその相互作用因子によるジベレリン生合成酵素遺伝子の転写制御. 第74回中国四国植物学会, 2017年5月13-14日, 高知県高知市.

3. 森 亮太, 藤井麻耶, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2017). DELLA を介したジベレリンとジャスモン酸のクロストーク制御. 第74回中国四国植物学会, 2017年5月13-14日, 高知県高知市.

4. Fukazawa J., Ito T., and Takahashi Y. (2016). DELLA-GAF1/IDD2 complex regulates gibberellin homeostasis and signaling. 22nd The International Conference on Plant Growth Substances, June 21-25, 2016, Toronto, Canada.

5. 伊東裕太, 伊藤岳, 高橋陽介. ジベレリンとオーキシンによる茎部の伸長制御機構の解析. 第73回中国四国植物学会, 2016年5月14-15日, 鳥取県米子市.

6. 勝部隆義, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介. GAF1 複合体による GA 生合成酵素遺伝子の転写抑制機構の解析. 第73回中国四国植物学会, 2016年5月14-15日, 鳥取県米子市.

7. 伊藤岳, 石田さらみ, 高橋陽介. カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 の自己リン酸化による機能制御の解析. 第57回日本植物生理学会, 2016年3月18-20日, 岩手県盛岡市.

8. 伊藤岳, 岡村僚太, 佐久間哲史, 山本卓, 高橋陽介. EPR1 の新規転写抑制モチーフの機能解析. 第38回日本分子生物学会, 2015年12月1-3日, 兵庫県神戸市.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 岳 (Ito Takeshi)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：30636139

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )