

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03698

研究課題名(和文) 微小管を介した環境ストレス応答

研究課題名(英文) Microtubule-mediated responses to environmental stress

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：80180826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：一部の藻類と陸上植物で進化したPHS1(Propyzamide-Hypersensitive 1)はチューブリンのリン酸化活性をもつキナーゼ領域とその活性を抑制するMAPキナーゼフォスファターゼ様領域を併せ持つハイブリッド酵素であり、浸透圧変化に応答して素早く活性化される。本研究では、主にin vitroでのPHS1活性化制御再構築実験によりPHS1の自己活性化機構に關与する可能性のあるアミノ酸残基の重要性を検証した。また、ゼニゴケの3つのMAPキナーゼ遺伝子の欠損変異株を用いることにより、PHS1のストレス応答性活性化にはMAPキナーゼは必要ないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は環境変動や生物的ストレスに対して生育プログラムや代謝を恒常的に適応させている。環境ストレス応答は植物ホルモンやグローバルな遺伝子発現の変化をもたらすが、細胞骨格が關与するストレス応答の初期反応の分子機構は未解明の部分が多い。本研究結果はマイルドな乾燥ストレスが微小管再編成をもたらす分子機構に新たな知見をもたらしたものであり、作物や有用植物の乾燥適応戦略を深く理解し、乾燥ストレス下における高収量品種の育種につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：PHS1 (Propyzamide-Hypersensitive 1) has evolved in some green algae and land plants, and is a hybrid enzyme composed of a tubulin-kinase domain and a regulatory MAP kinase phosphatase-like domain. Hyperosmotic stress rapidly activates its tubulin kinase. In this study, in vitro reconstitution experiments with recombinant PHS1 proteins were used to demonstrate functional roles of several candidate amino acid residues that were postulated to be involved in the auto-activation mechanisms. In addition, characterization of liverwort knockout mutants of three MAP kinase genes demonstrated that MAP kinases are not necessary for stress-induced activation of PHS1.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：植物 微小管 乾燥ストレス チューブリン リン酸化 MAPキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境ストレス応答は植物ホルモンやグローバルな遺伝子発現の変化をもたらすが、ストレス応答の初期反応の分子機構は未解明の部分が多い。申請者は、細胞伸長方向が異常なアラビドプシス変異株の原因遺伝子が微小管細胞骨格の形成や動態制御に係ることを明らかにしてきた。これらの微小管制御因子のひとつが、PHS1 (Propyzamide-Hypersensitive 1 ; propyzamide は微小管重合阻害剤)である。

PHS1 は中央部に非典型的なキナーゼ領域を持ち、C 末端に Mitogen-activated protein kinase (MPK)を特異的に脱リン酸化させ不活性化させる MPK フォスファターゼ領域を併せ持つ。PHS1 キナーゼ領域は微小管構成モノマーである チュープリンのトレオニン 349 を特異的にリン酸化するが、このアミノ酸残基はチューブリンが縦に繋がって原繊維を構築する際のチューブリン相互作用部位に位置しているため、リン酸化されたチューブリンは微小管に重合されない(図 1)。すなわち、PHS1 キナーゼが細胞内で活性化されると微小管が速やかに脱重合して消失する。細胞内では PHS1 は不活性な状態にあり、チューブリンはリン酸化されず、微小管は安定である。細胞内での PHS1 キナーゼ活性の抑制には、PHS1 フォスファターゼ活性が必須であり、フォスファターゼ不活性変異を植物細胞で発現させると、チュープリンのリン酸化と微小管の消失が観察される。野生型 PHS1 は環境ストレス(特に高浸透圧ストレス)により速やかに活性化され、植物をストレス処理後 5 分以内にチュープリンのリン酸化、10 分以内に微小管の消失が始まる。*phs1* ヌル変異株では、これらの反応がまったく起こらない。従って、植物細胞がストレス受容後に迅速に PHS1 フォスファターゼを介した PHS1 キナーゼ活性の抑制が解除されると考えられるが、その詳細な制御機構ならびにその生理的意義は不明である。

PHS1 は元来 MPK Interaction Motif (KIM) のシロイヌナズナ優性変異により遺伝学的に同定された。KIM は MPK との相互作用に重要であり(図 2)、PHS1 の活性制御には MPK が関与することが推定される。

2. 研究の目的

PHS1 フォスファターゼが分類されるMPK フォスファターゼは標的MPKと相互作用することにより活性が顕著に増大すること (*Science* 280: 1262-1265 (1998); 図 3)、PHS1 のKIM変異によりPHS1 が細胞内で部分的に活性化されること、大部分の真核生物キナーゼでは活性部位近傍のループ領域のリン酸化により活性化されること (*Trends Biochem. Sci.* 41: 938-953 (2016)) により、図 4 に示すPHS1 活性制御モデルを提唱する。一方、シロイヌナズナ*phs1*変異株がストレスに対して顕著な生育阻害を示さない原因として、PHS1の活性化は一過的であり、恒常的なストレス環境下でも数時間後にはPHS1は不活性化されることが挙げられる。本研究では、これらのモデルを検証し、PHS1の活性化機構の解明につながる基礎データを取得する。

3. 研究の方法

- (1) 大腸菌で発現、精製した組換えタンパク質を用いて、PHS1 の活性制御機構を調べる。
各種の PHS1 変異体及び MPK (野生型と活性化型) と精製チューブリンを反応させ、チューブリンのリン酸化を特異的リン酸化抗体により調べる。PHS1 を活性化するリン酸化アミノ酸残基を同定する。
- (2) ゼニゴケとシロイヌナズナの MPK 欠損変異株を用いて、PHS1 依存的高浸透圧誘導性微小管消失反応に必須な MPK を同定する。
- (3) PHS1 の活性化状態が持続し、微小管脱重合状態が続くような高浸透圧ストレス処理条

件を特定し、その条件における *phs1* 変異株(ゼニゴケとシロイヌナズナ)の表現型を調べる。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 再構築実験系による PHS1 活性化機構の解析

シロイヌナズナ由来のPHS1(野生型および各種変異型)を大腸菌で発現させ、精製した。精製したPHS1と豚由来チューブリン(pT349TUA 修飾がない)をリン酸化反応条件(ATP, MnCl₂ 存在下)で反応させ、pT349TUA 抗体を用いてチューブリンのリン酸化程度を調べた(図5)。キナーゼ不活性型PHS1(K197M)ではチューブリンリン酸化が起こらないが、野生型PHS1ではリン酸化活性が見られた。さらに、フォスファターゼ不活性型PHS1(C792S)またはMPKフォスファターゼ特異的阻害剤(Na₃VO₄)存在下では、キナーゼ活性が大幅に増大した。また、PHS1はリン酸化チューブリンpT349TUAを脱リン酸化する活性を持たなかった。一方、組換えPHS1は自己リン酸化され(図5)、PHS1活性と自己リン酸化程度は相関した。キナーゼ活性化一般様式、動物MPKフォスファターゼの知見(図3)から類推すると、PHS1は自己リン酸化によりプライミングされ、活性化されることが推定された。

活性化に必須なプライミング部位の第一候補として、多くのキナーゼに見られる活性化ループ部位を検討した(図6A)。PHS1とホモロジーがあり立体構造が決定されているアクチンフラグミン・キナーゼ(*EMBO J.* 18: 2923-2929 (1999))との構造比較からPHS1キナーゼ活性化ループPHS1(333-391)を推定した。組換えPHS1タンパク質を用いた*in vitro*リン酸化反応生成物をLC-MS/MSにより解析したところ、推定活性化ループ部位のSer377, Ser 379, Ser385が自己リン酸化されることが判明した(マックスプランク植物育種学研究所、中神弘志博士との共同研究)。また、このループ領域には多くの(全てではない)植物のPHS1で保存されているSer348が存在する(図6B)。推定活性化ループのSer残基の重要性を検証するために、チューブリンリン酸化酵素ドメインPHS1(85-700)の推定活性化ループ部位に存在する14個の全てのSer残基を非リン酸化Ala残基に変異させた変異PHS1(14SA)を作製した。

野生型PHS1(85-700)と変異PHS1(14SA)のリン酸化活性を比較したところ、変異酵素ではPHS1の自己リン酸化程度は若干低下する傾向にあったが、チューブリンのリン酸化活性は両者に有意な差異は見られなかった(図7)。従って、PHS1の推定活性化ループ部位のSer残基はいずれもリン酸化活性のプライミングに関与していないことが判明した。

推定活性化ループ部位以外のチューブリンリン酸化酵素ドメインPHS1(85-700)で、*in vitro*自己リン酸化され、かつ、多くの生物のPHS1で保存されているアミノ酸残基を検索したところ、Tyr422が見つかった。このチロシン残基は陸上植物のPHS1で保存されているが、緑藻のPHS1では必ずしも保存されていない。そこで、このチロシン残基を非リン酸化Phe残基に置換した変異PHS1(Y442F)を上記と同様に作製し、リン酸化活性を調べた(図8)。野生型酵素と比較して、変異PHS1(Y442F)は自己リン酸化レベルとチューブリンリン酸化活性のどちらも大幅に低下(野生型の約20%)していた。この結果は、Y442はPHS1のリン酸化活性に重要であるが、必須ではないことを示唆している。因みに、リン酸化Y422ペプチドに対するリン酸化ペプチド抗体を作製したが、十分な特異性、反応性をもった抗体を得ることができなかった。

このチロシン残基の機能をさらに検証するために、ゼニゴケPHS1欠損変異株(*Mpphs1^{K0}*)にCaMV35Sプロモーターを用いてゼニゴケ野生型PHS1遺伝子、ゼニゴケ変異型PHS1遺伝子(*PHS1^{Y459F}*)を強制発現させた。シロイヌナズナPHS1のY442はゼニゴケPHS1ではY459に相当する。各ゼニゴケ系統を通常生育条件と高浸透圧ストレス条件(0.8 M sorbitolで90分間処理)で培養し、チューブリンの総量(B-5-1-2抗体)とリン酸化チューブリン量(pT349リン

酸化チューブリン特異的抗体)を測定した(図9)。その結果、野生型PHS1と変異型PHS1はどちらも同程度にストレス応答性チューブリンリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。従って、このチロシン残基はin vitroでは酵素活性に寄与しているが、in vivoではチューブリンリン酸化活性に重要ではないと結論した。

(2) PHS1 活性制御に関与する MPK の同定

ゼニゴケの PHS1 遺伝子を破壊した変異株を作製し、高浸透圧処理を行ったところ、野生株で見られるチューブリンのリン酸化と微小管の消失が変異株では見られなかったことから、ゼニゴケにおいてもシロイヌナズナと同様の PHS1 依存的高浸透圧誘導性微小管消失反応が保存されていることが判明した。ゼニゴケゲノムには MPK1、MPK2、MPK3 の3つの MPK 遺伝子が存在する(図10)。河内教授、西浜准教授(京大・生命)との共同研究として、これらのゼニゴケ MPK 遺伝子の破壊株を相同組換えにより作製した。

MPK2 並びに MPK3 の欠損変異株は通常の培養条件下で正常に生育し、形態的にも野生株との違いは見られなかった。これら変異株における高浸透圧処理後(0.8 M sorbitol, 90 分処理)のチューブリンのリン酸化反応を調べたところ、両変異株共に野生株との違いは見られなかった(図11)。

一方、ゼニゴケ MPK1 欠損変異株は致死となったため、西浜らが開発した技術(*Plant Cell Physiol.* 57: 271-280, 2016)を用いて条件的 MPK1 欠損変異株を作製した。MPK1 機能欠損条件下では、ゼニゴケ葉状体はカルス様未分化細胞塊として増殖した。この変異株に上記の高浸透圧処理を行うと、野生株と同様にストレス応答性のチューブリンリン酸化が見られた(図12)。従って、MPK1 はゼニゴケの正常な生育、分化には必須であるが、PHS1 の活性制御には不要であることが判明した。MPK リン酸化シグナル伝達系は PHS1 活性制御の上流経路ではないと考えられる。すなわち、PHS1 は MPK シグナル経路因子(MPK フォスファターゼ)を自己活性調節に取り入れて分子進化したが、MPK 以外のストレス応答機構が活性制御に関わっていると推測される。

(3) 周期的ストレス条件の検討と *phs1* 表現型の解析

周期的ストレス誘導性チューブリンリン酸化を解析するために、シロイヌナズナ植物体の水耕栽培法を確立した。恒常的な高浸透圧ストレス処理(0.4M ソルビトール)を行ったところ、根ではストレス処理1, 2時間後にリン酸化チューブリン量が最大となった後、徐々に低下し、12時間後には高浸透圧がかかっているにも拘らずリン酸化チューブリンは無処理条件と同様の低レベルに戻った。葉では根よりも遅れてリン酸化が進行し、脱リン酸化も遅延した。

4時間ごとに高浸透圧ストレスのオン、オフを繰り返す、周期的なストレス処理を施したところ、ストレス回数が増えるにしたがってリン酸化誘導反応が顕著に低下する「脱感作」現象が観察された。すなわち、植物細胞がストレスに敏感に反応する状態に回復するためには、非ストレス条件のオフ状態が一定時間続くことが必要であった。

ストレスのオン・オフの時間をいろいろと変動させて *phs1* 変異株の生育を観察したところ、野生株と比べて有意な生育の違いは観察されなかった。

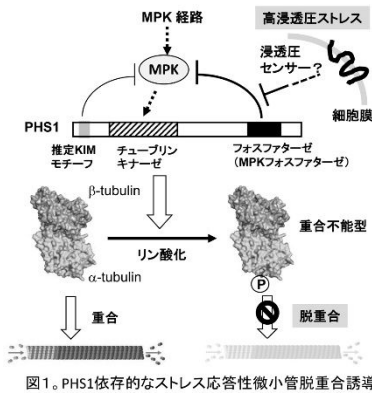


図1。PHS1依存性のストレス応答性微小管脱重合誘導

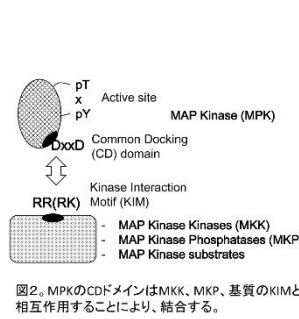


図2。MPKのCDドメインはMKK、MKP、基質のKIMと相互作用することにより、結合する。

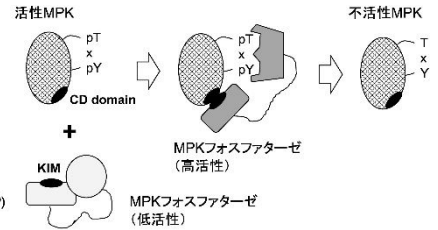


図3。MPKフォスファターゼは基本低活性を持つが、その活性はMPKと相互作用することにより飛躍的に増大する。

図4。PHS1活性制御モデル

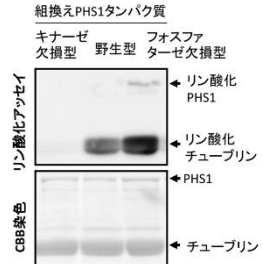
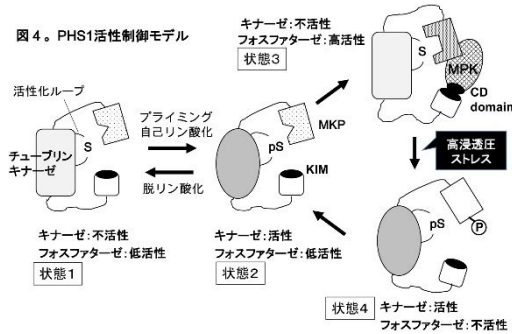


図5。PHS1は単独で活性状態となるが、PHS1フォスファターゼ欠損によりさらに活性が増大する。活性に対応してPHS1のリン酸化程度が増大する。

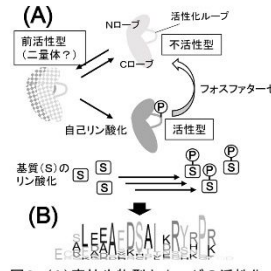


図6。(A)真核生物型キナーゼの活性化機構。NループとCループをつなぐ活性化ループの自己リン酸化により活性化される。文献2より改変。(B) PHS1の推定活性化ループに保存されたセリン残基

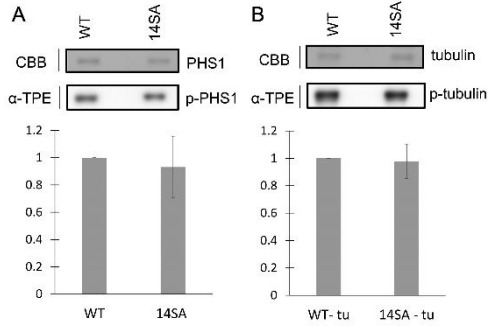


図7。推定活性化ループ14SA変異酵素のリン酸化活性。精製した組換えPHS1(85-700)の自己リン酸化活性(A)とチューブリンリン酸化活性(B)をTPE法を用いて解析した。n = 4

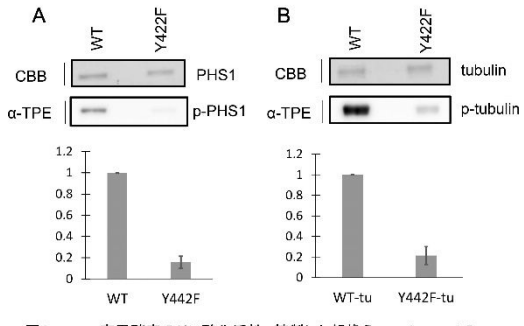


図8。Y442F変異酵素のリン酸化活性。精製した組換えPHS1(85-700)の自己リン酸化活性(A)とチューブリンリン酸化活性(B)をTPE法を用いて解析した。n = 4

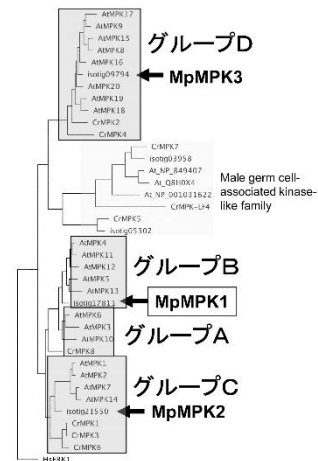


図10。MPK分類。At; *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ), Cr; *Chlamydomonas reinhardtii*, Mp; *Marchantia polymorpha* (ゼニゴケ)

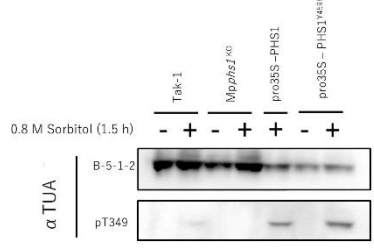


図9。ゼニゴケPHS1欠損変異株を用いた相補実験。野生型およびY459F変異PHS1遺伝子を欠損変異株で発現させ、チューブリン量(B-5-1-2抗体)とリン酸化チューブリン量(pT349抗体)を用いて測定した。

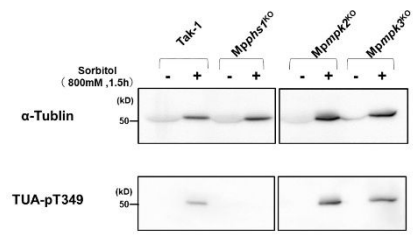


図11。野生株(Tak-1)、PHS1欠損変異株、MPK2欠損変異株、MPK3欠損変異株における、高浸透圧ストレス誘導性のチューブリンリン酸化

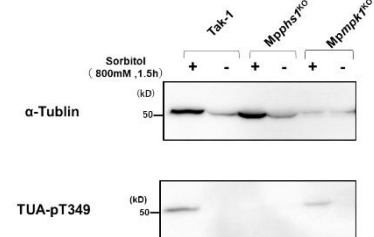


図12。野生株(Tak-1)、PHS1欠損変異株、MPK1条件的欠損変異株における、高浸透圧ストレス誘導性のチューブリンリン酸化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 N. Yagi, S. Matsunaga, and T. Hashimoto	4. 巻 131
2. 論文標題 Insights into cortical microtubule nucleation and dynamics in Arabidopsis leaf cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs203778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.203778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 J.H. Wong, and T. Hashimoto	4. 巻 17
2. 論文標題 Novel Arabidopsis microtubule-associated proteins track growing microtubule ends.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Plant Biol.	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12870-017-0987-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takatani S, Ozawa S, Yagi N, Hotta T, Hashimoto T, Takahashi Y, Takahashi T, Motose H	4. 巻 7
2. 論文標題 Directional cell expansion requires NIMA-related kinase 6 (NEK6)-mediated cortical microtubule destabilization.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-08453-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Soga, C. Yamazaki, M. Kamada, N. Tanigawa, H. Kasahara, S. Yana, K.H. Kojo, N. Kutsuna, T. Kato, T. Hashimoto, T. Kotake, K. Wakabayashi, and T. Hoson	4. 巻 162
2. 論文標題 Modification of growth anisotropy and cortical microtubule dynamics in Arabidopsis hypocotyls grown under microgravity conditions in space.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Physiol. Plant.	6. 最初と最後の頁 135-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pp1.12640	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 J.H. Wong, T. Kato, S.A. Belteton, R. Shimizu, N. Kinoshita, T. Higaki, Y. Sakumura, D.B. Szymanski, and T. Hashimoto	4. 巻 181
2. 論文標題 Basic Proline-rich Protein-mediated microtubules are essential for lobe growth and a flattened cell geometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 1535-1551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.00811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 橋本 隆
2. 発表標題 Ancient stress-responses in the plant lineage employ acute microtubule disassembly
3. 学会等名 KSPB Winter Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 壮英
2. 発表標題 BPP1ファミリー遺伝子の葉表皮細胞の形態形成への関与
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小牧 伸一郎
2. 発表標題 Identification and Characterization of a Putative Borealin in Arabidopsis
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 隆
2. 発表標題 Microtubule-mediated stress responses in plants
3. 学会等名 Actin and Microtubule Cytoskeleton: Bridging Scales from Single Molecules to Tissues (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 隆
2. 発表標題 Microtubule-mediated stress responses in plants
3. 学会等名 Plant Cell & Developmental Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 隆
2. 発表標題 Temporal remodeling of plant microtubule cytoskeleton by fluctuating stresses
3. 学会等名 Plant Cell and Developmental Biology: Approaches to Multiscale Biosystems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ng Lee Mei
2. 発表標題 Stress-induced microtubule depolymerization in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 Plant Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小牧 伸一郎
2. 発表標題 Marchantia Tubulin Kinase MpPHS1 is Essential for Morphological Changes
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 隆
2. 発表標題 ストレス応答性微小管不安定化機構
3. 学会等名 植物細胞骨格研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小牧 伸一郎
2. 発表標題 ゼニゴケPHS1は高浸透圧ストレスに応答した形態変化に必要である
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物細胞機能（橋本研究室） https://bsw3.naist.jp/hashimoto/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	西浜 竜一 (Nishihara Ryu-ichi) (70283455)	京都大学・生命科学研究所・准教授 (14301)	ゼニゴケ変異株の作出における共同研究

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関