

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K07443
 研究課題名(和文)細胞膜プロトンポンプ活性のライブイメージング技術の確立と応用

研究課題名(英文)Live-imaging of PM H⁺-ATPase activity

研究代表者

高橋 宏二 (Takahashi, Koji)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：40283379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生命活動に重要な細胞膜H⁺-ATPase(プロトンポンプ)の活性状態を可視化するために、H⁺-ATPaseと14-3-3タンパク質の二分子間相互作用を利用した蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)や円順列変異体蛍光タンパク質を利用したG-CaMP型のセンサータンパク質の作出をこころみた。細胞レベルでの解析により、プロトンポンプ活性化剤の処理でシグナル強度の変動が認められたため、形質転換植物体においてセンサータンパク質の機能評価を行っているが、実用化レベルには至っていない。今後、センサータンパク質の構成要素を再検討し、活性化状態の可視化の実現を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜プロトンポンプの活性状態は、特異抗体を用いたウエスタンブロットや免疫組織染色により細胞膜プロトンポンプのリン酸化状態をモニターすることでより直接的に活性状態を知ることができるが、操作が煩雑であることや操作中の脱リン酸化などにより正確なリン酸化状態をモニターすることが技術的に難しいこと、また、生きた組織や細胞における細胞膜プロトンポンプのリン酸化状態を知ることはできなかった。本研究の結果により、いまだ実用化レベルには至っていないがリアルタイムに活性化状態を可視化できる可能性を示唆することができた。本システムの実用化後、可視化された活性を指標にプロトンポンプ活性制御の機構解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：To visualize the plasma membrane H⁺-ATPase activity, I tried to produce the bio-image sensor using fluorescence resonance energy transfer (FRET) or circularly permuted fluorescent protein which can detect the bimolecular interaction between plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 protein. Transient expression analysis using mesophyll cell protoplasts revealed that fusicoccin, H⁺-ATPase activator induce a small change in signal intensity of the bio-sensor. Therefore, the function of these sensor protein is being evaluated in the transgenic plants, but it has not reached the practical level. In the future, we will re-examine the sensor protein and aim to visualize the activation state of plasma membrane H⁺-ATPases.

研究分野：植物生理学

キーワード：プロトンポンプ オーキシン 酸成長

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の起電性ポンプである細胞膜 H^+ -ATPase (プロトンポンプ) は細胞内外の pH の変動や恒常性維持および細胞膜電位調節を介した二次輸送体の活性制御を司るなど生命活動における重要なタンパク質である。細胞膜プロトンポンプは C 末端側に自己阻害領域をもち、C 末端から 2 番目のスレオニン残基のリン酸化とその部位への 14-3-3 タンパク質の結合により高活性状態になることが知られており、環境シグナルに応答して厳密に制御されている。細胞膜プロトンポンプの活性状態は電気生理学的手法を用いた膜電位測定でモニターすることが可能であったが、リン酸化による細胞膜プロトンポンプの活性調節機構が明らかとなつて以来、特異抗体を用いたウエスタンブロットや免疫組織染色により細胞膜プロトンポンプのリン酸化状態をモニターすることでより直接的に活性状態を知ることが可能となった。一方で、特異抗体を用いた細胞膜プロトンポンプ活性のモニタリングは非常に有効であるが、操作が煩雑であることや操作中の脱リン酸化などにより正確なリン酸化状態をモニターすることが技術的に難しいこと、また、生きた組織や細胞における細胞膜プロトンポンプのリン酸化状態を知ることができなかった。

シロイヌナズナの細胞膜プロトンポンプである AHA1 と AHA2 の二重欠損変異体が胚性致死であることから胚発生の初期段階から細胞膜プロトンポンプは植物の生育に必須で重要な役割を果たしていることが示唆されているが、これまでの活性測定的手法ではその役割を解明するには至らなかった。細胞膜プロトンポンプ活性のライブイメージング技術は、現在報告者らを取り組んでいる気孔開口やオーキシン作用における細胞膜プロトンポンプの活性調節機構解明に寄与することはもちろん、上記のようにこれまで同定されてこなかった細胞膜プロトンポンプ機能と役割の発見を含め、細胞膜プロトンポンプを中心とした研究領域が拡大することを期待している。細胞膜プロトンポンプ活性のライブイメージングを実現化することにより、気孔開口、光屈性における偏差成長、胚発生、篩部伴細胞での糖取り込み、無機イオンの輸送など広範囲にわたる細胞膜プロトンポンプの生理機能や役割を詳細に検討することが可能となる。アクセプタータンパク質を融合した 14-3-3 タンパク質を組織特異的プロモーター制御下で発現させることにより特定の組織での細胞膜プロトンポンプの活性を特異的に検出することも可能となる。また、細胞膜プロトンポンプの活性制御に関わる因子の変異体スクリーニングやケミカルスクリーニングをハイスループットで行うことも可能となり、活性制御機構の全貌を解明することにつながると期待された。

2. 研究の目的

細胞内外の pH 調節や膜電位制御を介した二次輸送体の活性調節を司る細胞膜 H^+ -ATPase (プロトンポンプ) の活性を生体内において簡便に検出すること、および検出の時間・空間分解能を飛躍的に向上させることを目的に、活性化型プロトンポンプと 14-3-3 タンパク質の二分子間相互作用を利用した蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) や生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) によるプロトンポンプ活性の可視化技術の確立を目指す。この研究により、細胞膜プロトンポンプ活性のライブイメージングが可能となり、植物の生活環全般にわたる細胞膜プロトンポンプ機能のプロファイルを明確にするとともに活性制御機構解明への強力なツールを得ることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 機能的なドナータンパク質融合 AHA2 (*Arabidopsis H⁺-ATPase2*) を発現する形質転換植物の作出

生体内における正確なプロトンポンプ活性の可視化を実現するためには、ドナータンパク質の融合がプロトンポンプの機能や活性制御に影響を及ぼしてはならない。そのために、プロトンポンプへのドナータンパク質の融合部位を検討した。

(2) 効率的な蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) が起こるアクセプタータンパク質と 14-3-3 タンパク質の検討

ドナーとアクセプター間の距離や配向が FRET の効率を決定する重要な要因であるため、14-3-3 タンパク質に融合するアクセプタータンパク質 (YFP) の融合部位やリンカーの長さを調整し、効率的な FRET を実現する 14-3-3-アクセプター融合タンパク質 (YFP-GF14) を作製した。アクセプタータンパク質を 14-3-3 タンパク質の N 末端に融合し、FRET の効率を観察した。アクセプタータンパク質の融合部位やリンカーの長さの検討はシロイヌナズナ葉肉細胞プロトプラストでの一過的発現系で確認した。

(3) 細胞膜プロトンポンプ活性の可視化に用いる細胞内タンパク質相互作用検出ツールの検討
FRET の効率を高めるためそれぞれの改変型タンパク質 (Cerulean と Citrine) を用いることや、励起光による植物の青色光応答誘導を軽減するため、緑色域の Clover と赤色域の mRuby2 の組合せの検討も行った。

(4) G-CaMP 型センサータンパク質の作出

二分子間相互作用を利用したセンサータンパク質以外に、14-3-3 タンパク質と H⁺-ATPase および円順列変異体型 GFP を1分子内にもつ G-CaMP 型のセンサータンパク質の作出も試みた。さまざまなリンカー配列をもつコンストラクトを作成し、葉肉細胞プロトプラストでの一過的発現系による機能評価をおこなうとともに、形質転換植物体の作成にもとりかかっている。

(5)リン酸化アミノ酸の H⁺-ATPase 活性への影響評価

C 末端から2番目のアミノ酸残基のリン酸化レベル制御を保持したまま、H⁺-ATPase 活性自体を低下させる変異タンパク質の作出を試みるため、これまで活性に影響を及ぼすことが知られているリン酸化アミノ酸(C 末端から2番目のアミノ酸残基以外)に変異を導入した。

4. 研究成果

研究を開始するにあたり、シロイヌナズナの細胞膜 H⁺-ATPase (AHA1) 遺伝子とプロモーター領域および3'非翻訳領域をクローニングした。さらに、FRET のドナータンパク質として用いる緑色蛍光タンパク質 (GFP) の二量体化による GFP 融合細胞膜プロトンポンプのアーティファクトな複合体構造をとることを避けるために Q69M と A206K に変異を導入した単量体型 GFP の作成を行った。続いて、単量体型 GFP と融合した細胞膜プロトンポンプと、FRET のアクセプタータンパク質として用いる各種蛍光タンパク質と融合した 14-3-3 タンパク質のコンストラクトを作成した。これらのコンストラクトをシロイヌナズナの葉肉細胞プロトプラスト (MCP) への一過的発現系で蛍光タンパク質融合タンパク質の発現を確認し、GFP の融合が H⁺-ATPase のリン酸化に影響を及ぼさないか否かを中心に検討した。その結果、単量体型 GFP を AHA1 の N 末端側に融合したコンストラクトでは AHA1 プロモーター制御下で MCP 内で正常サイズの融合タンパク質の合成が認められ、また、H⁺-ATPase 活性化剤であるカビ毒素フシコクシン処理により、GFP-AHA1 の C 末端スレオニン残基のリン酸化レベル上昇が確認された。この結果は、GFP 融合 H⁺-ATPase が正常にリン酸化制御されることを示唆する。

次に、二分子間相互作用を検出するために、14-3-3 タンパク質と mCherry 蛍光タンパク質との融合タンパク質のコンストラクトを作製して MCP にて一過的発現を行い、タンパク質発現の確認を行った。さらに、GFP-AHA1 と mCherry-14-3-3 タンパク質の共発現による FRET の検出を行ったところ、フシコクシン処理依存的な FRET はわずかに検出された。GFP と mCherry の組み合わせ以外の蛍光タンパク質でもコンストラクトを作成して検討したが、おおきな改善は認められなかった。GFP と AHA1 および mCherry と 14-3-3 タンパク質間のリンカーペプチドについてもリンカー無しから 20 アミノ酸配列まで 4 種類のアミノ酸長で検討したが、20 アミノ酸リンカーでわずかに FRET の効率が上昇した。これまでの結果は MCP での一過的発現系による観察のため、さらなる評価を行う目的で組換え植物体 (シロイヌナズナ) の作出を行って検討したが、それぞれの蛍光タンパク質の発現は観察できたもののフシコクシンや生理学的刺激による効果的な FRET の検出はごくわずかであり、実用化には至らなかった。

この状況を打開するために、続いて、FRET を利用した分子間相互作用の検出ではなく、G-CaMP 型のセンサータンパク質の作出を試みた。つまり、円順列変異体型蛍光タンパク質 (主に GFP) の N 末端側と C 末端側に、それぞれ 14-3-3 タンパク質と AHA1 を融合させたタンパク質コンストラクトを作製した。リンカー配列にさまざまな工夫を施したところ、MCP 一過的発現系において、フシコクシン処理依存的な蛍光シグナル強度の増大がわずかではあるが認められた。現在、植物体における機能評価を試みるために形質転換シロイヌナズナの作出を行っているところである。フシコクシン処理による効果を確認めるとともに、生理的な刺激による蛍光シグナル強度の変更の観察を行う予定である。

細胞膜 H⁺-ATPase の C 末端から 2 番目のスレオニン残基のリン酸化に伴う活性化をリアルタイムに評価するシステムの確立はまだ完成には至っていない。活性を保持する H⁺-ATPase の高発現系を作出すると植物細胞や植物体に影響を及ぼすために発現量をあまり高めることができないことが蛍光シグナルの検出を困難にさせているのかもしれない。そこで、当初の計画にはなかったが、C 末端から 2 番目のスレオニン残基以外のリン酸化アミノ酸に変異を施した AHA1 の作出を試みた。標的アミノ酸は、T881、S889、S931 である。これらのアミノ酸の Ala 置換体や Glu 置換体および Asp 置換体の作出をおこなった。これらのアミノ酸に変異を施した変異 AHA1 の C 末端から 2 番目のスレオニン残基のリン酸化レベルと酵素活性を評価を試みているところである。この解析の結果、リン酸化制御は正常であるが、酵素活性が低下していることになると、この変異 AHA1 をセンサータンパク質の構成要素として利用することにより、高発現させても植物体には影響を及ぼさず、C 末端から 2 番目のスレオニン残基のリン酸化レベルのみを評価できるセンサータンパク質の作成につながるのかもしれない。また、G-CaMP 型センサーと組み合わせることで、より効果的なセンサータンパク質の作成も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koji Takahashi, Anzu Minami, Shin-ichiro Inoue, Toshinori Kinoshita
2. 発表標題 Brassinosteroid enhances phosphorylation level of the penultimate residue of plasma membrane H ⁺ -ATPases
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋宏二、打田直行、萩原伸也、山田遼太郎、伊丹謙一郎、鳥居啓子、木下俊則
2. 発表標題 改変TIR1と合成オーキシンをを用いたbump-and-hole法によるオーキシシ誘導性胚軸伸長の解析
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Takahashi, Toshinori Kinoshita
2. 発表標題 Regulation of plasma membrane H ⁺ -ATPase in response to environmental signals
3. 学会等名 JTPB2019 Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----