

研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19380018  
研究課題名（和文） ACC 合成酵素のリン酸化を介した翻訳後制御によるエチレン生合成調節機構の研究  
研究課題名（英文） Study on post-translational regulation of ethylene biosynthesis by phosphorylation/dephosphorylation of ACC synthase.  
研究代表者  
森 仁志 (MORI HITOSHI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：20220014

研究成果の概要：エチレンの生合成経路の鍵となる ACC 合成酵素はリン酸化によって、その酵素の安定性が制御されている。この研究では ACC 合成酵素の脱リン酸化を担う protein phosphatase (PPase) の同定を試み、PPase の一つである PP2A が ACC 合成酵素の脱リン酸に関わること、そのうちの 2 つの B サブユニットが ACC 合成酵素の認識に関わると推測することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：植物生化学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：エチレン、ACC 合成酵素、代謝回転、リン酸化、脱リン酸化

#### 1. 研究開始当初の背景

エチレンはガス状の植物ホルモンであり、高等植物の一生を通じて様々な成長段階で重要な働きをしているが、とりわけ果実の成熟や野菜・花卉の老化など、園芸作物に与える影響は極めて大きく、エチレンの作用を人為的に制御することは、園芸分野において重要な課題である。そのためエチレン生合成経路の 1-アミノシクロプロパンカルボン酸

(ACC) 合成酵素や ACC 酸化酵素、さらにエチレン受容体のクローニングが盛んに行われ、エチレン生成を抑制させる、あるいは感受性を低下させた形質転換体の作出が試みられ、実用化に向けて進展しつつある。また、実用性の高いエチレン作用阻害剤 1-MCP (1-methylcyclopropene) とエチレン受容体との結合様式の解析を通してより効率的なエチレン作用の抑制効果を目指した研究も

行われている。エチレン生合成経路において ACC 合成酵素は律速段階を触媒する酵素であり、エチレン生合成経路の中で最も重要な酵素である。この酵素の調節は主に転写段階で制御されていると考えられてきたが、申請者は ACC 合成酵素がリン酸化され翻訳後も制御されていることを初めて示し、そのリン酸化部位を明らかにした。申請者はこのリン酸化が Ca<sup>2+</sup> 依存性タンパク質リン酸化酵素 (CDPK) によることも明らかにしている。この報告と前後して、エチレンを過剰生成するシロイヌナズナの突然変異体 *eto2, eto3* の原因遺伝子が ACC 合成酵素そのものであることが報告された。つまり、*eto2* の変異部位は C 末端のリン酸化部位周辺のアミノ配列が変異したものであり (Vogel, et al, PNAS, 1998)、*eto3* の場合はリン酸化部位の近傍のバリン残基が、負の電荷を持ったアスパラギン酸残基に変異して恒常的にリン酸化状態のようになったものであった。さらに 2004 年にはシロイヌナズナのエチレン過剰生成突然変異体 *eto1* の原因遺伝子が明らかになった。ETO1 タンパク質は ACC 合成酵素と結合し、さらにプロテアソーム分解系のタンパク質因子 CUL3 (E3 リガーゼとして働く) と結びつける新奇アダプタータンパク質として働き、ACC 合成酵素をプロテアソームによる分解に導く。その後、ACC 合成酵素のリン酸化は CDPK だけではなく、C 末端の異なるアミノ酸部位が MAP kinase によってもリン酸化されることが明らかになった。これらの結果を踏まえ、研究代表者はリン酸化による ACC 合成酵素の翻訳後制御機構を提唱している。つまり ACC 合成酵素は翻訳後直ちにリン酸化され、リン酸化型が細胞内で働くが、役目が終わると phosphatase により脱リン酸され、新奇タンパク質 (EOL) が結合して分解が進む。この翻訳後制御機構モデルは、

研究代表者のみならず、最近のエチレン関連のレビューに関連の研究者が同様のモデルを提唱しており、エチレン研究関係者の注目度は高い。この ACC 合成酵素のリン酸化を介した翻訳後制御機構を解析することによって、エチレン生合成調節機構を明らかにし、園芸作物の品質向上に資することができる。

## 2. 研究の目的

ACC 合成酵素 LeACS2 を脱リン酸化する protein phosphatase を同定する。

提唱している ACC 合成酵素の翻訳後制御機構モデルに従えば、ACC 合成酵素を脱リン酸する PPase の働きが ACC 合成酵素の寿命を決定しており、この翻訳後制御機構の最も重要な要因である。この PPase を同定し、その cDNA をクローニングして生化学的な特徴、発現様式を解析する。このことにより PPase による ACC 合成酵素の翻訳後制御機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) LeACS2 のリン酸化配列近傍のリン酸化生成ペプチドと親和性のあるタンパク質を検索することによって、PPase の同定を試みた。具体的には、リン酸化されるセリン残基 (Ser460) を中心に 12 アミノ酸残基のペプチドを合成した。セリン残基 (Ser460) を通常の phospho-Ser の代わりにリン酸基とセリン残基の結合を介している酸素原子を炭素原子に置換した phosphono-Ser にして擬リン酸化セリン残基とした。ペプチドの C 末端には光親和性架橋官能基を付加して合成した。紫外線を照射すると近傍のタンパク質 (アミノ酸残基) と共有結合を形成するので、このペプチドと親和性を持っているタンパク質を捕まえることが期待された。

(2) シロイヌナズナの突然変異体 *rcn1* は

PPase2A (A, B, Cサブユニットから構成される)のAサブユニットに変異があり、黄化芽ばえにおいては野生型に比べてエチレン生成量が高い。PPase2Aの特異的阻害剤マイクロシスチン LR をリガンドにしたアフィニティカラムクロマトグラフィーを行うと、A, B, Cサブユニットが結合したPPaseが結合した。そこで、このアフィニティカラムクロマトグラフィーを野生型、*rcn1*突然変異体抽出液に対して行い、両者をiTRAQ試薬で修飾して質量分析計で解析し、両者の各サブユニットの発現量を定量した。

#### 4. 研究成果

(1) リン酸化部位を含むLeACS2のC末端側の配列に基づきリン酸化ペプチドを合成し、このペプチドに結合するprotein phosphataseを探索した。その結果、二次元電気泳動上でPPaseの一つであるPP2Aと同じ挙動を示すタンパク質が検出された。また、それとは異なる位置に、別のタンパク質も検出された。このタンパク質の方が量的に多かったので、10Kgのトマト果実を出発材料にして、イオン交換クロマトグラフィ、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィ、リン酸化ペプチドをリガンドにしたアフィニティクロマトグラフィを行い、部分精製した。そのタンパク質をゲルからきりだし、トリプシン消化後、質量分析計で解析した。その結果、そのタンパク質が、ペプクチンメチルエステラーゼ(PME)であることが明らかとなった。PMEに脱リン酸活性があることは知られていないし、事実、脱リン酸活性は検出されなかった。また、PMEがリン酸化ペプチドに結合する活性があるか否か、検討したが、結合活性はなく、PMEは精製上のartifactであると結論した。

(2) シロイヌナズナ変異体のうち、PP2Aの

Aサブユニットに変異を持つ*rcn1*に着目した。解析の結果、*rcn1*ではACC合成酵素活性およびエチレン生成量が増加していることが確認された。またオーキシン処理すると、野生型も*rcn1*も*AtACS4*が同程度に誘導されるが、ACC合成酵素活性、エチレン生成量ともに、*rcn1*変異体の方が有意に多かった。これらのことは、ACC合成酵素*AtACS4*の翻訳後制御を示唆している。PP2AはA, BおよびCサブユニットからなる三量体で、それぞれのサブユニットに複数のアイソザイムが存在し、それらの組み合わせにより複数のPP2Aアイソザイムが存在する。このうち、Bサブユニットが基質特異性を決定している。このことから、*rcn1*ではRCN1(Aサブユニット)を欠損するため、ACC合成酵素を認識するBサブユニットが機能していないことが予測された。そこで、PP2Aの特異的阻害剤microcystin LRをリガンドとしたaffinityカラムを調製した。このカラムを使って野生型と*rcn1*から、それぞれ黄化芽ばえで発現しているPPase群をほぼ網羅的に精製することに成功した。量比を定量できるiTRAQ法を用い、質量分析によって両者のBサブユニット組成を比較した。その結果、野生型のみに見られるBサブユニットが2つ同定されており、これがACC合成酵素の認識に関わると推測された。

#### 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 6件)

- ① Shimizu-Sato, S., Tanaka, M. and Mori, H. (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.*, 69, 429-435. 査読有
- ② Ito-Inaba, Y., Hida, Y., Mori, H. and Inaba, T. (2008) Molecular identity of

uncoupling proteins in thermogenic skunk cabbage. *Plant Cell Physiol.*, 49, 1911-1916. 査読有

- ③ Hattori, Y., Nagai, K., Mori, H., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ashikari, M. (2008) Mapping of three QTLs that regulate internode elongation in deepwater rice. *Breed. Sci.*, 58, 39-46. 査読有
- ④ Shimizu-Sato, S., Ike, Y. and Mori, H. (2008) *PsRBRI* encodes a pea retinoblastoma-related protein that is phosphorylated in axillary buds during dormancy-to-growth transition. *Plant Mol. Biol.*, 66, 125-135. 査読有
- ⑤ Hattori, Y., Miura, K., Asano, K., Yamamoto, E., Mori, H., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ashikari, M. (2007) A major QTL confers rapid internode elongation in response to water rise in deepwater rice. *Breed. Sci.*, 57, 305-314. 査読有
- ⑥ Saha, S., Mori, H. and Hattori, K. (2007) Synergistic effect of kinetin and benzyl adenine plays a vital role in high frequency regeneration from cotyledon explants of Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria*) in relation to ethylene production. *Breeding Sciences*, 57: 197-202. 査読有

[学会発表] (計 20件)

- ① 森本和成: カラマツ木部柔細胞の深過冷却能に関与する可溶性蛋白質の解析。第50回日本植物生理学会年会、平成21年3月24日、名古屋
- ② 上吉原祐介: エチレン生合成調節におけるプロテインホスファターゼ2Aの調節

サブユニット RCN1 の機能解析。第50回日本植物生理学会年会、平成21年3月23日、名古屋

- ③ 服部洋子: 浮イネ遺伝子 *Snorkel1* および *Snorkel2* の解析。第50回日本植物生理学会年会、平成21年3月23日、名古屋
- ④ 水上茜: 花粉管に誘引物質応答能を与える母体因子 AMOR の解析。第50回日本植物生理学会年会、平成21年3月23日、名古屋
- ⑤ 間瀬圭介: NuERF4 は AAL 毒素に誘導される細胞死を促進する。第50回日本植物生理学会年会、平成21年3月23日、名古屋
- ⑥ 齋藤弘子: シロイヌナズナのポレンコート構成成分の同定とその生合成機構の解析。第50回日本植物生理学会年会、平成21年3月23日、名古屋
- ⑦ 加藤大明: ジャガイモ葉における S-ニトロソ化タンパク質の探索。第50回日本植物生理学会年会、平成21年3月23日、名古屋
- ⑧ 中西華代: カルシウム依存キナーゼは環境ストレスに応答して細胞内で酸化される。第50回日本植物生理学会年会、平成21年3月21日、名古屋
- ⑨ 重實由香利: ‘ベニバナアマ’ における花形特異的な花粉タンパク質の同定。園芸学会平成21年度春季大会、平成21年3月21日、東京
- ⑩ 永田雅靖: *LeACS2* と *LeACS4* の RNA interference 形質転換トマト系統のホモ固定と果実遺伝子発現解析。園芸学会平成21年度春季大会、平成21年3月20日、東京
- ⑪ Ohno Yusuke: Functional analysis of BRU1, a nuclear factor involved in

genome integrity and epigenetic regulation in *Arabidopsis*. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、平成20年12月12日、神戸

- ⑫ 中西華代:植物のカルシウム依存キナーゼは過酸化水素に応答して細胞内で酸化される。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、平成20年12月11日、神戸
- ⑬ 佐藤(志水) 佐江:エンドウの腋芽が休眠に至る過程で特異的に発現する遺伝子群の同定。園芸学会平成20年度秋季大会、平成20年9月28日、津
- ⑭ 村山秀樹:セイヨウナシ果実の軟化に関わるポリガラクトツロナーゼの動態に関する研究。園芸学会平成20年度秋季大会、平成20年9月27日、津
- ⑮ 田草川真理:高等植物におけるミトコンドリア核のDNA結合タンパク質の解析。日本植物学会第72回大会、平成20年9月26日、高知
- ⑯ 佐々木成江:質量分析計を用いた真正粘菌ミトコンドリア核様体タンパク質の網羅的解析の試み。日本植物学会第72回大会、平成20年9月25日、高知
- ⑰ 佐藤(志水) 佐江:トマト‘ルネッサンス’の単為結果性に関する研究。平成19年度園芸学会秋季大会、平成19年9月30日、高松
- ⑱ 上吉原裕亮:トマト果実成熟に関わるACC合成酵素LeACS2およびLeACS4の翻訳後制御機構。平成19年度園芸学会秋季大会、平成19年9月29日、高松
- ⑲ Mori, H. : Apical dominance is controlled by interaction between cytokinin biosynthesis/degradation and auxin in stem. International

Plant Growth Substances Association. 19<sup>th</sup> Annual Meeting, 2007, July, 22nd, Puerto Vallarta, Mexico

- ⑳ Kamiyoshihara, Y. : The C-terminal region of ACC synthase is involved in its turnover. International Plant Growth Substances Association. 19<sup>th</sup> Annual Meeting, 2007, July, 22nd, Puerto Vallarta, Mexico

[図書] (計3件)

- ① 森仁志 (2007) 第9章 成長をつづけるためのしたたかな戦略。朝日選書821 植物の生存戦略「じっとしているという知恵」に学ぶ(「植物の軸と情報」特定領域研究班 編、朝日新聞社) 234ページ(p185-p209).
- ② 森仁志 (2007) 第3章 栽培の生理 3. 頂芽優勢、腋芽促進の機構、園芸生理学 分子生物学とバイオテクノロジー (山木昭平 編、文永堂出版) 314ページ(p38-p49).
- ③ 森仁志 (2007) 第7章 成熟、老化の生理 1. 果実の成熟制御機構 1) エチレン合成と情報伝達系、園芸生理学 分子生物学とバイオテクノロジー (山木昭平 編、文永堂出版) 314ページ(p173-p189).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 仁志 (MORI HITOSHI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 20220014