

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2007 ～ 2008  
 課題番号： 19580106  
 研究課題名（和文） 植物アクアポリンの機能解析とその制御メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Studies on Functional Analysis and Regulation Mechanism of Plant Aquaporins  
 研究代表者  
 柴田 均 (SHIBATA HITOSHI)  
 島根大学・生物資源科学部・教授  
 研究者番号： 40032601

## 研究成果の概要：

チューリップ花卉の開閉は温度依存的であり、開花のためには水の花弁への輸送が必須で、水チャンネルの活性化が起こる。水チャンネルを構成するアクアポリンの分子種を同定するために、細胞質アクアポリン遺伝子 4 種類をクローニングし、TgPIP2:2 が水の輸送に関与することを機能面から確認した。またアクアポリンがリン酸化されて活性型になり、脱リン酸化で不活性化されることを確認した。TgPIP2:2 も分子内でリン酸化を受ける 3 種のセリン残基 (Ser35, Ser116, Ser274) を特定した。また、PIP2:2 が花弁、茎、葉、塊茎、根いずれの組織においても最も発現量が多い分子種であり、根から花弁にいたる水の輸送に関与している可能性を指摘した。

TgPIP2:2 を酵母（ピキア）に発現させ、水チャンネル活性を図る手法を新たに導入した。リン酸化脱リン酸化の阻害剤が活性に影響したことから、簡便に水チャンネル活性を測定できる系であるとともに調節機構を検証するための優れた方法であると結論した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：水チャンネル、アクアポリン、タンパク質リン酸化/脱リン酸化、花卉開閉  
 温度依存的応答

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる生物の生命維持に不可欠の水は、6ヶ所の膜貫通領域と 2ヶ所に特徴的な NPA モチーフを持つアクアポリンと総称されるたんぱく質が構成する水チャンネルを介して輸送される。アクアポリンは植物では細胞膜や液胞膜に存在し、水のみを特異的に通過させるチャンネルとされてきたが、最近では

グリセロール、尿素、二酸化炭素、アンモニア、ホウ酸(ホウ素)などの低分子を通すものも報告されている。液胞膜のアクアポリンは発現量を変化させることで活性調節されるが、細胞質型アクアポリンは Ser 残基のリン酸化により活性化する翻訳後調節を受けている。換言すればプロテinkinase とプロテインフォスファターゼが水チャンネル調節の主役を演じ

ている。われわれは水の輸送と花卉開閉を関連させるために大型で開花期間中開閉を繰り返すチューリップ花卉を材料としてきた。チューリップ花卉は昼間開いているが、夕方には閉じる。朝方気温の上昇とともに開く。チューリップ花卉の開閉は温度依存的であり光は全く関与しない。閉じた状態を暗所 20°Cに移すとアクアポリンがリン酸化され水が茎を経由して花卉へ移動し基部での膨圧上昇により開花状態となり、5°Cに戻すと脱リン酸化され水の供給が停止し徐々に閉じることを明らかにした。アクアポリン分子のリン酸化については、45 kDa の Ca<sup>2+</sup>依存膜結合型タンパクリン酸化酵素を検出し、花卉から精製したタンパク脱リン酸化酵素 2A が脱リン酸化に関与していることを報告した。この温度の変化に対する応答はどのような機構で起きるのか植物にとって重要な水の移動と花卉の開閉を関連させる必要があった。

## 2. 研究の目的

開く過程で花卉へ水の移動が起こり花卉下部での膨圧上昇が開くことに関係すること確認されたので、水を優先的に通すチャンネルを構成するアクアポリンに着目し、20°Cを感知して水が通過できる活性型への変化、5°Cで起きる水が通れない不活性型への変換を分子のレベルで明らかにする。すなわち、細胞質型アクアポリンの温度に対応したリン酸化と脱リン酸化について詳細に検討することとした。アクアポリン PIP2:2 のリン酸化と脱リン酸化による調節に関わる 4 種類の Ser 残基のリン酸化と水チャンネル活性を関連させる。液胞膜アクアポリンの開花への関与の有無を明確にする。

## 3. 研究の方法

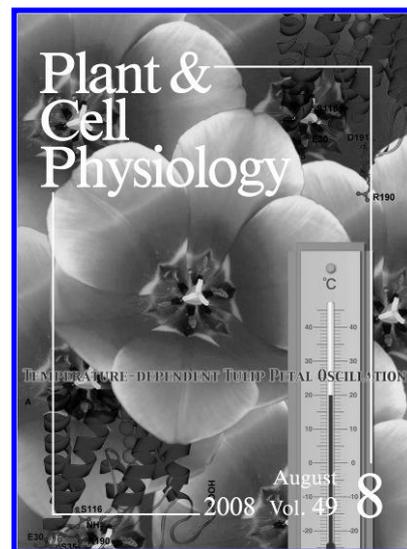
植物においてアクアポリンをコードする遺伝子は多数存在する。チューリップ花卉の細胞膜に存在するアクアポリン遺伝子を単離し、アフリカツメガエルの卵で発現させ、浸透圧変化に伴う破裂を観察することで水を通す水チャンネル活性を測定する。更にタンパク質のリン酸化や脱リン酸化を阻害する薬剤を卵に注入しておいて、薬剤の水チャンネル活性に及ぼす効果を観察する。リン酸化されるセリン残基を部位特異的置換法により特定する。一方、酵母 (*Pichia pastoris*) でアクアポリン遺伝子を形質転換し酵母の膜系で植物由来アクアポリンを発現させ、調製したスフェロプラストの浸透圧変化への応答を分光光度計で追跡することで水チャンネル活性を測定する方法を採用し、浸透圧や pH 変化さらには薬剤の影響を調べることで、花卉の細胞膜に存在するアクアポリンがいかに修飾されることで、水チャンネル活性が活性化したり、不活性化されるのかを明らかにする。また形質転換するアクアポリン遺伝子に存在する Ser をあらかじめ他のアミノ酸例えば Ala に置き換えて、リン酸化にともなう水チャンネル活性を検証することで、リン酸化に関与する Ser 残基を

特定する。

## 4. 研究成果

われわれは水の輸送と花卉開閉を関連させるために大型で開花期間中開閉を繰り返すチューリップ花卉を材料としてきた。チューリップ花卉の開閉は温度依存的であり光は全く関与しない。閉じた状態を暗所 20°Cに移すとアクアポリンがリン酸化され水が茎を経由して花卉へ移動し基部での膨圧上昇により開花状態となり、5°Cに戻すと脱リン酸化され水の供給が停止し徐々に閉じることを明らかにした。アクアポリン分子のリン酸化については、45 kDa の Ca<sup>2+</sup>依存膜結合型タンパクリン酸化酵素を検出し、花卉から精製したタンパク脱リン酸化酵素 2A が脱リン酸化に関与していることを報告した。4 種類の細胞膜型アクアポリン遺伝子をクローニングし、このうち水チャンネル活性が確認できた PIP2-2 において Ser35, Ser116, Ser274 がリン酸化される部位であろうと結論した。また PIP2-2 がすべての組織において最も発現量が多い分子種であり、根から花卉に至る水の輸送に PIP2:2 が関与している可能性を指摘できた。花卉の老化過程では開閉運動能力が減少し、PCD 指標が出現する契機は、活性酸素やエチレンではなく、これまで植物では報告がなかったエネルギーの枯渇であるとの結論を得た。

花卉から 4 種類の細胞質型アクアポリン遺伝子を単離できた。卵母細胞での実験から TgPIP2-2 と名付けた遺伝子にコードされるアクアポリンに強いミスチャンネル活性が確認された。このアクアポリンは 4 種のセリン残基を持つが、それぞれを他のアミノ酸に置換させた結果から、3 種のセリンがリン酸化を受けることで活性型になり、水が通れる孔が開くことを確認した。コンピューターグラフィックスでモデルを構築し、上記のリン酸化状態と脱リン酸化状態での水チャンネルの開閉を再現した。



これらの成果のうちで、Plant & Cell Physiology, 2008 年 8 月号に発表した内容が表紙

に採択され、水チャンネルを構成するアクアポリンの Ser 残基の位置を推定した三次元ホモロジーモデルが開花状態のチューリップ花弁、温度依存性を示すための温度計とともに掲載された。

最近の研究ではアクアポリンが構成するチャンネルが、水以外にも二酸化炭素、アンモニア、砒素、グリセリン、尿素などを通すものが次々と発見され、植物体でもっと多量に存在する水の吸収、運搬、蒸散、膨圧変化などの機能とともに、低分子のチャンネルとして、今後の研究に対する指針を与えることができた。すなわち今後の課題として、

- ①植物における水チャンネルの制御メカニズムを明らかにし、
- ②イネやトウモロコシなど主要な作物の水輸送に関連する学術面への進展を図ることと、
- ③施設園芸分野で問題となっている夏季の高温時に萎れや水の移動抵抗が生じる原因を水チャンネルの制御または不活性化の視点から解明し、
- ④アジア地域での劣悪な栽培条件となっている乾季における異常早魃による乾燥や、大規模なデルタ地帯でしばしば被る塩障害を緩和できる作物育種への展開を図る。

#### 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 Abul Kalam Azad, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa and Hitoshi Shibata: Temperature-dependent stomatal movement in tulip petal controls water transpiration during flower opening and closing. **Annals of Applied Biology**, 150: 81-87 (2007)
- ② Abul Kalam Azad, Takayuki Ishikawa, Takahiro Ishikawa, Yoshihiro Sawa, and Hitoshi Shibata: Intercellular energy depletion triggers programmed cell death during petal senescence in tulip. **Journal of Experimental Botany**, 59: 2085-2095 (2008)
- ③ Abul Kalam Azad, Maki Katsuhara, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa and Hitoshi Shibata: Characterization of Four Plasma Membrane Aquaporins in Tulip Petals: A Putative Homolog is Regulated by Phosphorylation. **Plant and Cell Physiology**, 49: 1196-1208 (2008)
- ④ Abul Kalam Azad, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa and Hitoshi Shibata: Heterologous Expression of Tulip Petal Plasma Membrane Aquaporin in *Pichia pastoris* for Water Channel.

#### Applied and Environmental

**Microbiology**, 75: 2792-2797 (2009)

[学会発表] (計2件)

- ① Abul Kalam Azad, Maki Katsuhara, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa and Hitoshi Shibata, *Xenopus oocytes* と *Pichia pastoris* で発現させたチューリップ花弁由来アクアポリンの水チャンネル活性: ホモログ TgPIP2;2 はリン酸化によって制御される、第49回日本植物生理学会年会要旨集, pp. 305 札幌(2008)
- ② Abul Kalam Azad, Maki Katsuhara, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa and Hitoshi Shibata, Molecular Cloning, Functional and Expression Analysis of Four Homologues of Plasma Membrane Aquaporin Subfamilies of the Tulip Petal *Tulipa Gesneriana*. The 5<sup>th</sup> International Conference of Aquaporin. Exploring new functions of Aquaporin. pp. 93, Nara, Japan (2007)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 均 (SHIBATA HITOSHI)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：40032601

(2) 研究分担者

且原 真木 (KATSUHARA MAKI)

岡山大学・資源生物学研究所・准教授

研究者番号：00211847

石川 孝博

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：60285385

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：