

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06024

研究課題名(和文) 花卉開閉運動に関わる水チャネル・アクアポリンの機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of aquaporins involved in flower opening and closing movements

研究代表者

根本 圭一郎 (Nemoto, Keiichiro)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：60566727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：花の開花は繁殖効率を左右する重要なイベントであり、リンドウなどのボウル型の花の多くは開花した後に何度も繰り返し開閉運動を行うことが知られている。しかし、その詳細はほとんど明らかになっていない。そこで、リンドウの花の可逆的な開花特性に注目し、その分子機序を解析したところ、花の開花は水チャネル・アクアポリンの働きによってもたらされる細胞内への水の流入と細胞肥大によるものであり、さらに、温度と光刺激がアクアポリンのリン酸化と活性化を誘導することで開花が促進されることを見出した。さらに、そのリン酸化を制御する新規プロテインキナーゼを特定し、花が環境刺激にตอบสนองして繰り返し開花する分子機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、花の開花が水の力を利用する仕組みを初めて明らかにしたものである。さらに、花は繁殖に適した環境でのみ花びらを開かせるシステムを有するという植物の巧みな生存戦略の可能性を示す重要な知見になることが期待される。さらに、本成果を発展させることで、花の開花を制御する新たな技術の開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Flower opening is important for successful pollination in many plant species, and some species repeat reversible flower opening and closing movements. This is primarily due to the turgor pressure change caused by the water influx/efflux, which depends on osmotic oscillation in the cells. However, the molecular mechanism(s) involved in flower movement are largely unknown. Using *Gentiana* flowers, we showed that reversible flower opening is regulated by water channel aquaporin GsPIP2. Phosphorylation of the C-terminal serine residue of GsPIP2 is important for the transport activity and correlates closely with the flower re-opening rate. Furthermore, GsPIP2 is phosphorylated and activated by GsCPK16, which is activated by elevated cytosolic Ca²⁺ levels in response to temperature and light stimuli. We propose that reversible flower opening is regulated by GsCPK16-dependent GsPIP2 phosphorylation and activation, with stimulus-induced calcium signals acting as triggers.

研究分野：植物生理学

キーワード：開花 アクアポリン プロテインキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

花は被子植物における生殖器官であり、蕾から花が開く“開花”運動は生殖プロセスの中で最も重要な生理イベントの1つである。一般的に、花の開花は一度きりであると思われているが、リンドウやチューリップなどのボウル型の花の多くは、開花したのち、温度や光環境の変化に応答して何度も開花と閉鎖運動を繰り返す特性を有している。花の開花は、花卉細胞への急速な水流入によって引き起こされる膨圧変化が主な駆動力であると考えられている。細胞膜は主に脂質から構成されるため水分子の透過率が低いため、水分子の選択的な輸送チャネルである水チャネル・アクアポリンが花の開花運動において重要な役割を果たしていることが予想されている。しかしながら、現在までに、アクアポリンが花の開花または閉鎖運動に関与することを実証した報告は存在せず、花の運動性の根底にある分子メカニズムはよくわかっていないのが現状である。花の運動性とアクアポリンの関係性を調査した報告は限られているが、チューリップの花弁を対象にした研究から、アクアポリン PIP2 と推定される分子が花弁の運動と連動してリン酸化されることが示されている。多くの植物種を対象にした研究から、植物 PIP2 のリン酸化はチャネル活性や局在性の調節に重要な機能を果たしていることが明らかになっており、PIP2 リン酸化が花の運動性の制御にも関与している可能性がある。しかしながら、現在までに、植物 PIP2 の機能調節領域をリン酸化する責任プロテインキナーゼは同定されておらず、PIP2 の機能調節機構や花弁運動性の分子機序の詳細は未解明である。

2. 研究の目的

可逆的な花の開閉運動特性を有する園芸作物リンドウをモデルに、花の開閉運動制御機構の解明を試みている。これまでに、コムギ無細胞系を基盤とした生化学的解析によって、花で発現する PIP2 タンパク質をリン酸化する新規なカルシウムイオン依存性プロテインキナーゼ・CPK16 を見出している。そこで、本研究では、同定キナーゼによって PIP2 の活性および局在性がどのように制御されているのかを *in vitro* および *in cell, in vivo* による包括的な視点で解析し、PIP2 リン酸化によって制御される花の開花および閉鎖運動の分子機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リン酸化依存的なリンドウPIP2活性化機構の解析

リンドウ PIP2 の水輸送活性を評価するために、酵母スフェロプラストを用いたバーストアクセス系を試みた。まず、リンドウ CPK16 および PIP2 の野生型、変異体を発現する酵母スフェロプラストを作成した。スフェロプラストを低張液に懸濁すると、その浸透圧差によって細胞内への急速な水流入が生じる。水の流入は、細胞の溶解(破裂)を引き起こすため、経時的に光学密度(OD600nm)を測定することで細胞の水透過率を評価できる。本手法によって、CPK16 依存的な PIP2 リン酸化のチャネル活性への影響を評価した。

(2) CPK16 依存的なリン酸化による PIP2 局在性制御の解析

まず、花の細胞内における CPK16 と PIP2 の相互作用を BiFC 法を用いて解析した。さらに、細胞表面タンパク質ビオチン化ラベリング法を用い、一過的に発現させた野生型およびリン酸化部位変異 PIP2-FLAG タンパク質の局在性を解析した。さらに、カルシウムセンサー・GCaMP3 タンパク質を花冠細胞内で一過的に発現させ、温度および光依存的な細胞内のカルシウム量の変動をモニターした。

(3) 花の開花および閉鎖運動における CPK16 依存的な PIP2 リン酸化の分子機能の解明

PIP2 および CPK16 の開花/閉鎖運動における役割を明らかにするために、ウイルス誘導性ジーンサイレンシング技術(VIGS 法)を用いて発現抑制個体を作成した。作出個体における花弁開閉運動性、PIP2 のリン酸化レベルを解析した。

4. 研究成果

(1) CPK16依存的なリン酸化はPIP2を活性化する

野生型および各種変異型の CPK16 および PIP2 を発現する酵母スフェロプラストを作成し、これらの細胞の水透過率を評価した。その結果、野生型 PIP2 単独よりも、野生型 PIP2 と CPK16 との共発現細胞は高い水透過係数を示した。一方で、CPK16 の標的リン酸化部位 Ser280 残基の Ala 置換変異体 PIP2 (S280A) および不活性型 CPK16 は、野生型 PIP2 単独と同程度の水透過係数であったことから、CPK16 依存的な PIP2 のリン酸化は水チャネル活性の活性化を誘導することが明らかになった。さらに、花冠由来プロトプラストにおいて一過的に発現させた野生型 PIP2 およ

びAla置換変異体PIP2(S280A)を細胞表面タンパク質ビオチン化ラベリング法によって解析したところ、両者の局在性は類似していたことから、CPK16によって触媒されるSer280残基のリン酸化は細胞内の局在性には影響しないことが示唆された。

(2) 環境刺激に応答したカルシウムシグナルが CPK16 を活性化し、細胞膜上において PIP2 をリン酸化する

一過的発現系を用いた BiFC 法によって、PIP2-CPK16 間の相互作用を評価したところ、細胞膜上において顕著な蛍光シグナルが検出された。さらに、CPK16 を高発現する細胞内において、内在性 PIP2 のリン酸化レベルの上昇が認められた。これらのことから、CPK16 は主に細胞膜上で PIP2 と相互作用しリン酸化を触媒していると考えられる。CPK16 のアミノ酸配列を元にした構造予測から、CPK16 はカルシウム結合 EF-hand ドメインを有するカルシウム依存型プロテインキナーゼに分類されることがわかった。このことから、花の開花および閉鎖運動時に細胞内のカルシウム量の一過的な上昇が生じている可能性が考えられる。そこで、カルシウム量に依存して蛍光強度が変化する蛍光タンパク質 GCaMP3 を花冠細胞内で一過的に発現させたところ、花の開花を誘導する低温処理、花の開花を誘導する室温+光刺激時において顕著な蛍光シグナルの上昇が観察された。このことから、温度と光刺激は一時的にカルシウム量の増大を誘導し、それによって CPK16 依存的な PIP2 のリン酸化が引き起こされていることを示唆する。

(3) CPK16 依存的な PIP2 リン酸化は花の開花運動を促進する

PIP2 および CPK16 の花弁内における役割を評価するために、ウイルス誘導性ジーンサイレンシング技術(VIGS 法)を用いて発現抑制個体を作成した。PIP2 遺伝子の発現抑制個体は、コントロールと比較して優位に花の開花が抑制された。同様に、CPK16 遺伝子の発現抑制個体においても、花の開花運動の遅延、内在 PIP2 のリン酸化レベルの低下が観察された。しかしながら、PIP2 および CPK16 遺伝子の発現抑制個体は、花の開花運動に顕著な遅延は観察されなかったことから、PIP2 および CPK16 は主に花の開花運動に関与することが明らかになった。

以上の解析から、リンドウの花の開花運動は PIP2 の機能依存的な水移動によって制御されていることが明らかになった(図1)。さらに、温度と光刺激は細胞内の一過的なカルシウム量の増大と CPK16 依存的な PIP2 のリン酸化を誘導し、その結果、開花運動が促進されることがわかった(図1)。本研究結果は、これまでにほとんど解明されていなかった、水の力を利用して花が開く仕組みの一端を世界で初めて分子レベルで明らかにしたものである。しかしながら、閉鎖運動においては、本研究で注目した PIP2 以外のアクアポリン分子が深く関与している可能性が考えられ、花の運動を制御する複雑な調整機構の存在が示唆される。

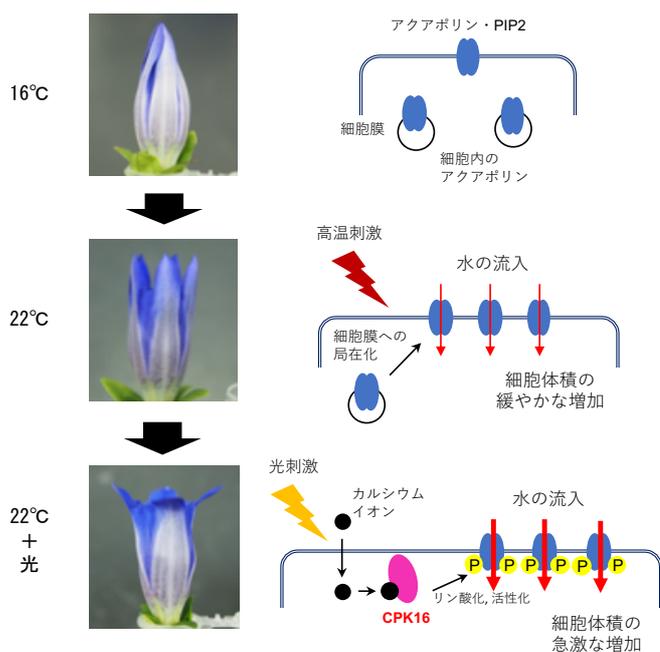


図1. リンドウの花が開くときのアクアポリンの役割

(上段)低温(16°C)に応答して閉じた花におけるアクアポリンは、その大部分が細胞質内に存在する。

(中段)温度が上昇(22°C)すると、アクアポリンは細胞膜上へ移動し、ここを通じて、細胞内への水流入と細胞体積の増加が起こり、花が開く。

(下段)光刺激が細胞内へのカルシウムイオンの流入を引き起こし、本研究で同定した活性化調節因子・カルシウム依存型プロテインキナーゼ・CPK16 がカルシウムイオンと結合し、アクアポリンをリン酸化および活性化することで、細胞内への急速な水流入と細胞体積の増加を誘導し、花の開花が促進される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nemoto Keiichirou, Niinae Tomoya, Goto Fumina, Sugiyama Naoyuki, Watanabe Aiko, Shimizu Motoki, Shiratake Katsuhiko, Nishihara Masahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Calcium-dependent protein kinase 16 phosphorylates and activates the aquaporin PIP2;2 to regulate reversible flower opening in <i>Gentiana scabra</i> (in press)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koac120	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keiichirou Nemoto, Fumina Goto, Aiko Watanabe, Masahiro Nishihara
2. 発表標題 Elucidation of flower opening and closing movement mechanism in Japanese gentian
3. 学会等名 第61回植物生理学会大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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