

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380026

研究課題名（和文）

リン酸化を介したACC合成酵素の翻訳後制御によるエチレン生成調節機構の解析

研究課題名（英文）

Analysis of mechanism of ethylene biosynthesis by the post-translational regulation of ACC synthase with phosphorylation.

研究代表者

森 仁志 (MORI HITOSHI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20220014

研究成果の概要（和文）：LeACS2のC末端にはCDPKとMAPKのそれぞれによってリン酸化されるセリン残基があり、両リン酸化はLeACS2の細胞内の安定化には必要である。LeACS2を脱リン酸化するために、PP2A型のprotein phosphataseが必要であり、ACC合成酵素を認識するBサブユニットが同定された。

研究成果の概要（英文）：LeACS2 has two phosphorylated serine residues at C-terminal region by CDPK and MAPK. This phosphorylation should be stable for LeACS2 in cells. PP2A type of protein phosphatase dephosphorylates LeACS2. Some B subunits of PP2A recognize ACC synthase specifically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学

キーワード：野菜

## 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-methyl-

cyclopropene)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 (Tatsuki and Mori, JBC, 2001)。申請者はこのリン酸化が  $Ca^{2+}$  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 (Chae et al, Plant Cell, 2003)。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 (Wang et al. Nature, 2004)。ET01 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 (Liu et al, Plant Cell, 2004)。これらの結果を踏まえ、申請者はリ

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、申請者のみならず、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。

## 2. 研究の目的

(1) これまで ACC 合成酵素をリン酸化する protein kinase として LeCDPK2 をクローニングし、生化学的な特徴を解析した。同時に MAP kinase も ACS の C 末端をリン酸化する報告がある。異なる 2 種類の protein kinase が、ACC 合成酵素の同じ C 末端領域の異なるセリン残基をリン酸化するので、その生理的な意義を明らかにする必要がある。

(2) ACC 合成酵素を脱リン酸化する protein phosphatase (ACS-PPase) を同定する。

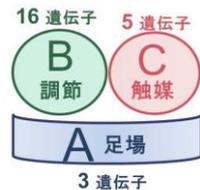
提唱している ACC 合成酵素の翻訳後制御機構モデルに従えば、ACC 合成酵素を脱リン酸化する ACS-PPase の働きが ACC 合成酵素の寿命を決定しており、この翻訳後制御機構の最も重要な要因である。ACS-PPase を同定し、その cDNA をクローニングして生化学的な特徴、発現様式を解析する。このことにより ACS-PPase による ACC 合成酵素の翻訳後制御機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) これまでに LeACS2 をリン酸化する protein kinase として LeCDPK2 をクローニングしたので、LeCDPK2 によってリン酸化された LeACS2 のアミノ酸残基を、ペプチド断片を逆相カラムクロマトグラフィで単離して明らかにする。また、LeACS2 も MAP kinase

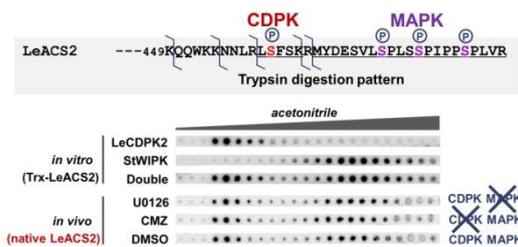
でリン酸化される可能性があるので、LeCDPKの場合と同様にリン酸化部位を明らかにする。これらのリン酸化がどのような生理現象と関わっているのか明らかにする。

(2) シロイヌナズナには PP2A と呼ばれる protein phosphatase (PPase) があり、これは 3 つのサブユニット A (3 種類)、B (16 種類)、C (5 種類) から構成されている。1 種類の A サブユニット RCN1 を欠損した突然変異体 *rcn1* にはエチレン生成量が多いと報告されている。そこで RCN1 を含む PP2A の中に ACC 合成酵素を脱リン酸化する PPase があると仮定できる。野生型と変異体 *rcn1* の黄化芽ばえ抽出液からそれぞれの PP2A 群を、アフィニティカラムクロマトグラフィーで精製して質量分析機器で差を明らかにする。



#### 4. 研究成果

(1) 傷害トマト果実に  $^{32}\text{P}$ -リン酸を投与して LeACS2 をリン酸化した。その時 CDPK の阻害剤あるいは MAPK の阻害剤を投与してそれぞれの活性を抑制した。その後、抗 LeACS2 抗体で LeACS2 を免疫沈降して回収し、トリプシンで分解した。精製したペプチドを逆相カラムクロマトグラフィーで分離して、どのペプチドがどちらの kinase でリン酸化されたか明らかにした。その結果、主に CDPK あるいは MAPK だけでリン酸化された場合も、LeACS2 として組織内に残っている分子は両方の kinase でリン酸化されたものであった。



このことは LeACS2 がリン酸化によって安定化するために、CDPK と MAPK の両方でリン酸化されることを意味している (Kamiyoshihara et. al, Plant J., 2010)。

(2) protein phosphatase (PPase) の PP2A は阻害剤マイクロシスチン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で精製することができる。A サブユニット RCN1 を欠損した変異体 *rcn1* から精製された PP2A は、野生型から精製された PP2A が持っているサブユニットを欠損している。そこで両者を精製後、iTRAQ 試薬で標識し、質量分析計によって解析した。その結果、変異体 *rcn1* には含まれないが、野生型に含まれるサブユニットとして B 型の B<sup>''</sup> type が 3 つ見つかった。これらの特異的な抗体を作成し、これらが正しいか否か明らかにするために、研究を進める必要がある。

#### 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 1 件)

① Kamiyoshihara, Y., Iwata, M., Fukaya, T., Tatsuki, M. and Mori, H. (2010) Turnover of LeACS2, a wound-inducible 1-amino- cyclopropane-1-carboxylic acid synthase in tomato, is regulated by phosphorylation/dephosphorylation. *Plant J.*, 64: 140-150. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04316.x

[学会発表] (計 5 件)

① Mori, H.: Analysis of the protein phosphatase involved in the post-translational regulatory mechanism of ACC synthase. Ethylene 9<sup>th</sup>, 2012, March, Rotorua, New Zealand

② Kamiyoshihara, Y. and Mori, H.: The

turnover of LeACS2, wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in tomato, is regulated by phosphorylation/dephosphorylation. 20th International Conference on Plant Growth Substances, 2010, June-July, Tarragona, Spain

③ 上吉原裕亮、森仁志：トマト ACC 合成酵素 LeACS2 の安定化には 2 カ所のリン酸化部位が必要である。園芸学会平成 23 年度秋季大会、平成 22 年 9 月、大分

④ 上吉原裕亮、森仁志：ACC 合成酵素の脱リン酸化に関わるプロテインフォスファターゼの同定。園芸学会平成 23 年度秋季大会、平成 22 年 9 月、大分

⑤ 森仁志、上吉原裕亮：トマト ACC 合成酵素 LeACS2 の安定化には 2 カ所のリン酸化部位が必要である。植物化学調節学会第 45 回大会、平成 22 年 11 月、神戸

[図書] (計 1 件)

① Mori, H. (2010) Ethylene. In “Comprehensive Natural Products Chemistry II”, Mander, L., Lui, H.-W. (B.), Eds.; Elsevier: Oxford, Vol. 4 No. 2, pp 87 - 90.

## 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