

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770051

研究課題名 (和文) 気孔孔辺細胞におけるタイプ1プロテインホスファターゼの機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of protein phosphatase 1 in stomatal guard cells

研究代表者

武宮 淳史 (TAKEMIYA ATSUSHI)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：80448406

研究成果の概要 (和文)：

植物表皮に存在する気孔は、青色光に応答して開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや蒸散を介した水の損失など、植物と大気間のガス交換を行う。本研究では Ser/Thr プロテインホスファターゼ 1 (PP1) が気孔の青色光情報伝達を仲介する分子機構について調べ、この過程に関わる PP1 調節サブユニットを同定するとともに、PP1 により脱リン酸化される基質タンパク質候補を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Stomata in the epidermis of aerial plants open in response to blue light, which facilitates gas exchange between leaves and atmosphere, allowing the uptake of CO<sub>2</sub> for photosynthesis and the loss of water via transpiration. In this study, we investigated the molecular mechanism of blue light signaling mediated by protein phosphatase 1 (PP1) in guard cells, and identified the regulatory subunit and putative substrate proteins of PP1 in this process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、気孔、青色光、プロテインホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

陸上植物の表皮に存在する気孔は、一對の孔辺細胞により構成される開閉可能な孔であり、光、特にシグナルとして作用する青色光に応答して開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや蒸散を介した水の消失など、植物と大気間のガス交換を促進する。青色光受容体フォトトロピンにより受容された光シグナルは、未知の情報伝達系を経て細

胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase を活性化し、気孔開口の駆動力を形成する。以前の阻害剤を用いた薬理的解析により、上記の情報伝達に何らかの Ser/Thr 型プロテインホスファターゼが関わる可能性が示唆されていたが、その実体は長らく不明であった。

これまでの研究により私たちは、青色光情報伝達に関わるプロテインホスファターゼの実体がタイプ1プロテインホスファター

ゼ (PP1) であり、この酵素がフォトトロピンからのシグナルを  $H^+$ -ATPase へ伝達することを明らかにした。PP1 は細胞内において触媒サブユニットと調節サブユニットからなるホロ酵素を形成し、ホロ酵素の活性、細胞内局在、基質特異性は調節サブユニットの性質により決められる。そのため、孔辺細胞において青色光情報伝達に関与する特別な調節サブユニットが存在する可能性が考えられた。また PP1 は脱リン酸化酵素であることから、青色光に応答して PP1 により脱リン酸化される基質タンパク質の存在が考えられた。しかしながらこれまでにこの反応に関わる PP1 調節サブユニットや PP1 により脱リン酸化される基質タンパク質の実体については明らかにされておらず、これらの因子の同定は青色光情報伝達の解明に重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、タイプ 1 プロテインホスファターゼ (PP1) を介した気孔の青色光情報伝達の分子機構を解明することである。私たちはこれまでに、PP1 が青色光受容体フォトトロピンから気孔開口の駆動力を形成する細胞膜  $H^+$ -ATPase に至る未知の情報伝達を仲介することを明らかにした。さらに最近、PP1 は青色光による気孔開口を仲介するのみならず、アブシジン酸による気孔開口阻害の標的因子となる可能性を見出した。これらの結果から、孔辺細胞における PP1 の機能調節は気孔の開閉制御に重要であることが示唆されるが、これまでに PP1 の活性・細胞内局在・基質特異性を決定する調節サブユニットや、PP1 により直接脱リン酸化される基質タンパク質については全く分かっていない。そこで本研究では、PP1 を介した情報伝達に焦点を当て、特に PP1 調節サブユニットや基質タンパク質に着目して研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) PP1 調節サブユニットの同定とその機能解析

① PP1 触媒サブユニットをベイトとして、酵母 Two-hybrid スクリーニングを行った。ライブラリーにはシロイヌナズナとソラマメの孔辺細胞由来の cDNA ライブラリーを用いた。PP1 調節サブユニットには RVxF モチーフという触媒サブユニットとの結合に必須の配列があり、このモチーフの有無や、アミノ酸置換によるモチーフの破壊が触媒サブユニットとの結合を低下させるか等を調べることで、調節サブユニットかどうかを判断し

た。得られた因子について、*in vitro* pull-down アッセイや *in vivo* 共同免疫沈降法により結合の再確認を行った。

② PP1 触媒サブユニットの阻害剤であるミクロシスチンを共有結合させたセファロースビーズを利用し、シロイヌナズナのタンパク質に対してアフィニティークロマトグラフィーを行った。得られた結合タンパク質を SDS-PAGE で分離し、銀染色により検出後、質量分析により同定した。同定されたタンパク質の中から調節サブユニットを選定し、解析候補とした。

③ 単離した PP1 調節サブユニットを GFP と融合し孔辺細胞に一過的に発現させ、細胞内局在を調べた。青色光情報伝達に関与する因子は細胞膜か細胞質局在の可能性が高いため、どちらかに局在するものを解析対象とした。

④ 候補因子の T-DNA 挿入変異株の入手と過剰発現株の作製を行い、表皮における気孔開口、ガス交換法による生葉における気孔開口を測定し、青色光応答に異常を示すものを選抜した。こうして得られた気孔開口変異株から孔辺細胞プロトプラストを調製し、青色光によるフォトトロピンと  $H^+$ -ATPase のリン酸化など、詳細な生化学的解析を行った。

(2) PP1 により脱リン酸化される基質タンパク質の同定

① 青色光照射前後の孔辺細胞プロトプラストからサンプルを回収し、二次元電気泳動によりタンパク質を分離した。材料には大量の孔辺細胞プロトプラストが調製可能なソラマメを用いた。

② リン酸化の検出には、リン酸化に伴う電気泳動度の変化を指標とした 2D-DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) 法を用いた。

③ 青色光に応答した脱リン酸化が PP1 を介した反応かを確かめるため、PP1 に高い選択性をもつ阻害剤であるトートマイシンにより脱リン酸化が抑えられるかを調べた。このようにして絞り込んだ脱リン酸化スポットについて、質量分析によるタンパク質の同定を試みた。

## 4. 研究成果

(1) PP1 調節サブユニットの同定とその機能解析

① 孔辺細胞に発現する PP1 調節サブユニットを単離した。PP1 触媒サブユニットをベイトとした酵母 two-hybrid スクリーニングおよびマイクロシスチン-セファロースビーズと

の共同沈降物の質量分析から、多数のPP1結合因子を得た。これらの中にはPP1 Regulatory Subunit2 (PRS2) と名付けた植物に特有なタンパク質が含まれていた。

②アミノ酸置換解析から、PRS2の配列中のSVHWはRVxFモチーフとして働き、PP1触媒サブユニットとの結合に必須であることがわかった。

③GFP融合PRS2の解析から、PRS2は主に細胞質に局在することがわかった。

④シロイヌナズナのPRS2遺伝子の欠損変異株を入手し気孔の反応を調べたところ、この変異体では青色光による気孔開口の低下が見られた。

⑤この変異株から孔辺細胞プロトプラストを単離し気孔の青色光反応を解析したところ、この変異体ではH<sup>+</sup>放出とH<sup>+</sup>-ATPaseのリン酸化が野生株の約50%にまで低下していたが、フォトリポピンの自己リン酸化は正常に見られた。

⑥この変異体に野生型の遺伝子を形質転換すると気孔の表現型は相補されたが、触媒サブユニットとの結合能を欠いた変異型遺伝子では相補されなかった。

以上の結果から、PRS2はPP1調節サブユニットとして機能し、フォトリポピンとH<sup>+</sup>-ATPase間の情報伝達を制御することが示唆された。

(2) PP1により脱リン酸化される基質タンパク質の同定

①二次元電気泳動と質量分析を利用したプロテオミクス的手法によるPP1の基質タンパク質の解析を行った。ソラマメ孔辺細胞を材料に、遠心分画法により可溶性タンパク質とマイクロソーム膜画分を調整し、情報伝達因子の濃縮をはかった。また、タンパク質試料をIMAC ( Immobilized Metal Affinity Chromatography) にかけて、リン酸化タンパク質の精製・濃縮をおこなった。こうして調整したタンパク質を実際に二次元電気泳動にかけたところ、多くのリン酸化タンパク質が効率的に回収・分離されることが分かり、孔辺細胞を材料とした効果的なリン酸化タンパク質の分析手法が確立された。

②確立した分析手法をもとに、2D-DIGE ( two-dimensional difference gel electrophoresis) による青色光に反応したタンパク質リン酸化反応の解析を行った。その結果、青色光に反応してリン酸化レベルが変動するスポットを13ヶ所見出した。③あらかじめPP1選択的阻害剤であるトートマイシンを処理した孔辺細胞プロトプラストでは、上

記の青色光に反応したタンパク質リン酸化反応が阻害された。

④検出されたスポットをゲルから切り出し質量分析を行ったところ、いくつかのタンパク質が同定候補として検出された。現在のところこれらのタンパク質の孔辺細胞における機能については不明であるが、これらの中には青色光情報伝達に関わる因子が含まれている可能性が考えられる。

## 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5件)

- ① Atsushi Takemiya, Ken-ichiro Shimazaki, Phosphatidic acid inhibits blue light-induced stomatal opening via inhibition of protein phosphatase 1, *Plant Physiol.*, 査読有, 153, 2010, 1555-1562
- ② Shin-ichiro Inoue, Atsushi Takemiya, Ken-ichiro Shimazaki, Phototropin signaling and stomatal opening as a model case, *Current Opinion in Plant Biology*, 査読有, 13, 2010, 587-593
- ③ Yuki Hayashi, Suguru Nakamura, Atsushi Takemiya, Yohei Takahashi, Ken-ichiro Shimazaki, Toshinori Kinoshita, Biochemical characterization of in vitro phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, *Plant & Cell Physiology*, 査読有, 51, 2010, 1186-1196
- ④ Atsushi Takemiya, Chie Ariyoshi, Ken-ichiro Shimazaki, Identification and Functional Characterization of Inhibitor-3, a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 in Plants, *Plant Physiol.*, 査読有, 150, 2009, 144-156
- ⑤ 井上晋一郎、武宮淳史、島崎研一郎、青色光受容体フォトリポピンに依存した植物の生長制御、光合成研究、査読なし、19, 2009, 4-8

[学会発表] (計13件)

- ① 武宮淳史、矢野貴之、山内翔太、有吉千絵、島崎研一郎、PP1調節サブユニットPRS2は気孔の青色光情報伝達を制御する、第52回日本植物生理学会、3/19-21, 2011、東北大学

- ② 矢野貴之、武宮淳史、島崎研一郎、2D-DIGE (Two-dimensional difference gel electrophoresis)を用いた孔辺細胞青色光情報伝達におけるリン酸化タンパク質の探索、第52回日本植物生理学会、3/19-21, 2011、東北大学
- ③ 堤俊文、武宮淳史、原田明子、島崎研一郎、シロイヌナズナ孔辺細胞青色光情報伝達におけるRPT2の機能解析、第52回日本植物生理学会、3/19-21, 2011、東北大学
- ④ 武宮淳史、気孔の青色光シグナル伝達の分子機構、第486回三学会合同福岡例会、12/4, 2010、九州大学
- ⑤ Atsushi Takemiya, Yohei Takahashi, Ken-ichiro Shimazaki, Protein phosphatase 1 regulates stomatal movements by integrating ABA and blue light signaling in guard cells, 20th International Conference on Plant Growth Substances, 6/28-7/2, 2010, Taragona, Spain
- ⑥ 堤俊文、武宮淳史、原田明子、島崎研一郎、孔辺細胞青色光情報伝達におけるRPT2の機能解析、第60回日本植物学会九州支部会、5/22-23, 2010、九州大学
- ⑦ 武宮淳史、有吉千絵、島崎研一郎、Inhibitor-3はPP1調節サブユニットとしてシロイヌナズナの初期胚発生に機能する、第51回日本植物生理学会年会、3/18-21, 2010、熊本大学
- ⑧ 島崎研一郎、井上晋一郎、武宮淳史、気孔孔辺細胞における青色光シグナルのイオン輸送への変換、第51回日本植物生理学会年会、3/18-21, 2010、熊本大学
- ⑨ 相原悠介、山本隆晴、武宮淳史、鈴木友美、加藤詩子、梅田真郷、田中一馬、島崎研一郎、長谷あきら、青色光受容体フォトリポソームの”Flippase-kinase”としての役割の解明、第51回日本植物生理学会年会、3/18-21, 2010、熊本大学
- ⑩ Atsushi Takemiya, Ken-ichiro Shimazaki, Protein phosphatase 1 is a central regulator of blue light-dependent stomatal opening mediated by phototropins, Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology “Biology of Sensing”, 12/2-4, 2009, 京都大学
- ⑪ 中村英、武宮淳史、島崎研一郎、木下俊則、気孔孔辺細胞において青色光により活性化される細胞膜H<sup>+</sup>-ATPaseのリン酸化反応の解析、第15回日本光生物学協会

年会、8/19-20, 2009、自然科学研究機構 岡崎コンフェレンスセンター

- ⑫ Ken-ichiro Shimazaki, Atsushi Takemiya, Type 1 protein phosphatase is a crosstalk point between phototropin and abscisic acid signaling in guard cells, 15<sup>th</sup> International Congress on Photobiology, 6/18-23, 2009, Dusseldorf, Germany
- ⑬ Atsushi Takemiya, Ken-ichiro Shimazaki, Inhibition of blue light-dependent stomatal opening by phosphatidic acid through abscisic acid signaling pathway in guard cells, 15<sup>th</sup> International Congress on Photobiology, 6/18-23, 2009, Dusseldorf, Germany

[その他]

ホームページ等

[http://cellbio.biology.kyushu-u.ac.jp/s\\_himazaki](http://cellbio.biology.kyushu-u.ac.jp/s_himazaki)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武宮 淳史 (TAKEMIYA ATSUSHI)

九州大学・大学院理学院・助教

研究者番号：80448406