

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570057

研究課題名(和文) 高等植物小胞体チューブ形成におけるリン酸化を介した調節機構の解明

研究課題名(英文) The regulation of tubule formation in the endoplasmic reticulum of higher plant cells

研究代表者

横田 悦雄 (Yokota, Etsuo)

兵庫県立大学・生命理学研究科・助教

研究者番号：80212299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物小胞体膜融合に関与するRHD3の調節機構の解明を試みた。シロイヌナズナの植物体や培養細胞から単離した小胞体の膜融合や、RHD3の会合体形成は、プロテインキナーゼで処理することにより促進された。RHD3のC端部に存在するセリン残基のクラスター部位がリン酸化されており、その部位を変異させたRHD3を発現させた植物体から単離した小胞体の膜融合は、キナーゼ感受性が欠如していた。これらの結果から、RHD3のリン酸化により小胞体膜融合が調節されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the regulatory mechanism of RHD3, a fusogen of endoplasmic reticulum (ER) membrane. The fusion of ER membrane isolated from Arabidopsis seedling and cultured cell, and the oligomerization of RHD3 were enhanced by the treatment with protein kinases. The serine residues in the C-terminus serine cluster of RHD3 were phosphorylated. The membrane fusion enhancement did not occur with isolated ER from seedlings expressing the RHD3 with disrupted phosphorylation sites in the serine cluster. These results indicated that the phosphorylation of RHD3 regulates the ER membrane fusion.

研究分野：植物生理学

キーワード：小胞体 RHD3 リン酸化 キナーゼ フォスファターゼ シロイヌナズナ

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質合成の場である小胞体は、細胞表層ではチューブ状あるいは扁平な袋状の形態を成し、それらが互いに融合して網目状ネットワークを形成している。このネットワークは非常に動的であり、新しいチューブの伸長とネットワークへの融合が絶えず起こっている。チューブ形成には、レティキュロンをはじめとする小胞体膜タンパク質による膜の曲率変化が大きく関与していることが明らかにされていた (Yang and Strittmatter, 2007. *Genome Biol.* 8; 234)。そして小胞体膜融合には、動物細胞や酵母ではダイナミン GTPase の一種であるアトラスチン (Hu et al. 2009. *Cell* 138; 549-561) あるいは Sey1p (Anwar et al. 2012. *J. Cell Biol.* 197; 209-217) が寄与することが報告された。これらのタンパク質は、GTP 依存的に小胞体膜を融合する。そしてその分子機構に関して、GTP がアトラスチンに結合することにより、アトラスチンどうしがダイマー形成、その後 GTP の加水分解エネルギーによる構造変化によってアトラスチンどうしが引き合い膜融合が生じるといったモデルも提示されていた (Morin-Leisk et al. 2011. *J. Cell Biol.* 195; 605-615)。この時、GTPase ドメインが存在するアトラスチン N 端部だけではなく、C 末端部も膜脂肪層に変化を引き起こすため必要であることも示されていた (Bian et al. 2011. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 108; 3976-3981)。一方植物細胞にはアトラスチンのホモログである RHD3 (root hair defective 3) が存在しており、その変異体の小胞体形態が異常を示すことが知られていた (Zheng et al. 2004. *Plant J.* 37; 398-414)。そして細胞内局在や過剰発現体の解析などにより、アトラスチン同様小胞体膜融合への関与が示唆された (Chen et al. 2011. *J. Cell Sci.* 124; 2241-2252)。しかし、その調節機構等全く明らかにされていなかった。ところでタバコ培養細胞 BY-2 をカルシウム・カルシウムイオノフォアで処理すると表層小胞体のネットワークが大きな扁平状袋構造に変化し、イオノフォアを除去するとネットワークが回復する。この時プロテインキナーゼの阻害剤が存在するとネットワークの回復が起こらないことを本研究者は見出した。このことは、リン酸化によって小胞体チューブ形成が調節されていることを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究は、小胞体のチューブ形成における調節機構を解明することを目的とした。特にチューブ形成の前段階である小胞体膜融合への関与が示唆されていた RHD3 に焦点を絞り、リン酸化を介した調節機構の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

変異体も含めたシロイヌナズナ植物体や培養細胞 MM2d からの小胞体単離は、Yokota らの方法 (Yokota et al. 2011. *Plant Physiol.* 156; 129-143) に従い、ショ糖密度勾配超遠心法により行った。小胞体膜融合は、次の方法により評価した。膜融合に伴い放出されるカルシウムイオンを、エクオリンの発光強度変化をルミノメーターで測定することにより定量的に解析する Hu らの方法 (Hu et al. 2009. *Cell*)。ER トラッカーにより小胞体膜を染色し、袋状構造形成を蛍光顕微鏡により確認する Yokota らの方法 (Yokota et al. 2011. *Plant Physiol.*)。また、流れを起こすことにより誘発される袋状構造からの小胞体チューブ状構造の形成も、膜融合の指標とした。

invitro 解析で用いたプロテインキナーゼは、cAMP 依存性プロテインキナーゼ触媒ドメイン (Promega 社) とカゼインキナーゼ II (Merck-Calbiochem 社)、またフォスファターゼはアルカリフォスファターゼ (Sigma 社) を用いた。これらの因子で処理した小胞体サンプルの等電点電気泳動は、O'Farrell の方法 (1975. *J. Biol. Chem.* 250; 4007-4021) に従い行った。

RHD3 に対する抗体の内、GTP 結合部位に対する抗体 (抗 RHD3G 抗体) は、西村いくこ教授の研究グループから供与していただき、C 端部セリン残基クラスター部位 (782 残基から 792 残基) に対する抗体は (抗 RHD3C 抗体)、合成ペプチドをマウスに免疫することにより作製した。なおペプチド合成と KLH とのコンジュゲーションはオペロンバイオテクノロジー社に外注した。

リン酸化タンパク質単離カラムキットは、PhosphoCruz protein purification system (Santa Cruz Biotechnology 社) と Phospho Protein purification kit (Qiagen 社) を用いた。

RHD3 の状態変化は、MM2d から単離した小胞体をプロテインキナーゼや GTP などのヌクレオチドと処理後、更に化学架橋剤である EGS (ethyleneglycol-bis(succinimidyl succinate)) で処理し、抗 RHD3G 抗体によるイムノプロットにより解析した。

RHD3C 端部セリン残基クラスターの変異体を発現させたシロイヌナズナ株は、京都大学西村いくこ教授、上田晴子研究員の研究グループから供与して頂いた。

阻害剤などを用いた薬理的解析には、GFP でラベルされた小胞体を発現しているタバコ培養細胞 BY-2 (Mitsunishi et al. 2000. *Plant Cell Physiol.* 41; 203-212) を用いた。まず細胞をカルシウム・カルシウムイオノフォアで処理し、表層小胞体ネットワークが大きな袋状構造に変化したことを確認した。そして様々なプロテインキナーゼの阻害剤を含む培養液で細胞を洗い、更に阻害剤で処理し、表層小胞体ネットワーク構造の回復程度を調べた。

GFP-RHD3 を発現しているシロイヌナズナ植物体から単離した GFP-RHD3 のリン酸化部位は、質量分析により同定を行ったが、これらの解析は京都大学上田晴子研究員と桑田啓子研究員に依頼した。

#### 4. 研究成果

##### (1)小胞体膜融合におけるプロテインキナーゼの効果

小胞体膜融合は、単離小胞体に GTP を加えることにより誘発される。この融合の程度は、融合時に放出されるカルシウムイオンをエクオリンの発光により検出する方法や、融合した小胞体から流れによって伸長するチューブ構造の観察により評価した。市販されている cAMP 依存性プロテインキナーゼの触媒ドメインやカゼインキナーゼ II で処理することにより、単離小胞体の膜融合は促進され、チューブ構造形成も増加した。GTP 依存的な小胞体膜融合は、主に RHD3 によって起こっていることが示唆されているため、キナーゼ処理などを行った単離小胞体を 2 次元電気泳動にかけ、その後抗 RHD3G 抗体によるイムノプロットにより RHD3 の等電点を解析した。処理していない小胞体中の RHD3 は、等電点 pI2.5 から 5.0 に 8 つのスポットとして検出された。小胞体をキナーゼ処理することにより、酸性側のスポットの強度が大きくなり、逆にアルカリフォスファターゼで処理することにより、アルカリ側の 2 つのスポットに収束した。そして 2 社から購入したリン酸化タンパク質単離カラムに RHD3 が吸着した。これらの結果は、RHD3 がリン酸化タンパク質であることを示している。

##### (2)RHD3 のリン酸化部位の決定

RHD3 の C 端部 782 残基から 792 残基にはセリン残基のクラスターが存在しており、動物細胞や酵母のアトラスチンや Sey1p には保存されていない。GFP-RHD3 を発現させたシロイヌナズナ植物体から GFP-RHD3 を単離して質量分析により解析を行った結果、この部位がリン酸化を受けていることが判明した。ただ、どのセリン残基がリン酸化されているかは同定出来なかった。

##### (3)RHD3 セリン残基クラスターの役割

上述したセリン残基クラスター部位のポリペプチドを合成し、抗体を作製した（抗 RHD3C 抗体）。この抗体は、単離小胞体の膜融合やチューブ構造形成を阻害しなかった。この結果は、この部位は GTP に依存した小胞体膜融合に必要な不可欠ではなく、何らかの調節機構に関与していることを示唆している。そして、この抗体で処理した小胞体はキナーゼ感受性が消失し、抗体処理後にキナーゼで小胞体を処理しても膜融合やチューブ構造形成の促進は起こらなかった。この効果は、抗原ペプチドで抗体を処理することにより相殺された。これらの結果から、キナーゼの標的部位の 1 つが RHD3C 端部セリン残基のクラスターであることが推測された。

次にこの部位を欠損させた RHD3(GFP-RHD3 782-791)、あるいはこの部位のすべてのセリン残基をアラニン残基に置換した RHD3(GFP-RHD3S782-791A)を発現させた変異株を作製し、RHD3 のリン酸化の役割に関して検討した。これらの変異体では生育等に関して顕著な表現型は現れなかった。更に小胞体の形態や流動の速度についても、野生種とほとんど変わらなかった。しかしこれらの変異体から単離した小胞体は、キナーゼ処理によるチューブ構造形成の促進は示さなかった。これらの結果から、RHD3C 端部のセリン残基クラスターのリン酸化により、小胞体膜融合が促進されることが示唆された。

##### (4)リン酸化による RHD3 の状態変化

アトラスチン(Morin-Leisk et al. 2011. J. Cell Biol.)と同様、GTP により RHD3 も会合体を形成し、化学架橋剤である EGS 処理により 240kDa の架橋産物が生成される。なお RHD3 のモノマーの分子量は約 90kDa である。単離小胞体をキナーゼ処理することにより、架橋産物の生成量が増加した。

##### (5)RHD3 のリン酸化を介した小胞体膜融合促進機構のモデル

以上の結果から、RHD3 のリン酸化による小胞体膜融合促進機構について、次のようなモデルを提案した。小胞体膜上に存在する RHD3 の細胞質側に存在している C 端部セリン残基クラスター部位内のセリン残基がリン酸化されることにより、同じ膜上の RHD3 同士が会合体を形成する。そして GTP が付加されることにより異なる膜上の RHD3 の会合体同士が連結して膜融合が起こる。リン酸化による RHD3 会合体の量や頻度が多くなれば、それだけ GTP による RHD3 の連結する膜面積も大きくなるため、膜融合が起こりやすくなると考えられる。

##### (5)今後の課題

RHD3C 端部セリン残基クラスターを欠失させた、あるいはアラニン残基に置換した RHD3 を発現させた変異体では、小胞体の形態や流動速度等に関して顕著な表現型は観察されず、野生種の場合とほとんど変わらなかった。シロイヌナズナには 2 つの RHD3 様タンパク質が発現しており、RHD3 と相互的に機能することが報告されている(Lee et al. 2012. New Phytol. 197; 481-489; Zhang et al. 2013. Front. Plant Sci. 4; 514)。そして、この 2 つの因子の C 端部にはセリン残基クラスターが保存されている。従ってリン酸化可能な RHD3 様タンパク質が、変異体では RHD3 のリン酸化欠損による機能障害を補った可能性が考えられる。一方でセリン残基のクラスター部位やその部位のリン酸化は必ずしも RHD3 の機能、小胞体膜融合にとって不可欠な機構や配列ではなく、ストレスなど特殊な環境下で作用する機構である可能性も考えられる。今後明らかにしていく問題である。そして細胞内で RHD3 に作用しているキナーゼ、更にはフォスファターゼの同定を行う

ことは、RHD3 のリン酸化を介した小胞体膜融合の調節機構をより明らかにしていく上で重要である。タバコ培養細胞を用いて、カルシウム・カルシウムイオノフォアで処理することにより表層小胞体ネットワークを破壊。その後イオノフォアなどを除去することによるネットワーク回復過程における様々なプロテインキナーゼの阻害剤の効果を検討した。その結果、いくつかの阻害剤が回復を抑制することを見出したが、代謝などの阻害による副作用によりネットワーク回復が抑制された可能性も考えられる。そのため現在、表層小胞体ネットワーク内で伸長したチューブの融合過程へのそれらの阻害剤の影響を解析しているところである。

リン酸化部位と推測されるセリン残基のクラスターは、RHD3 だけではなく、膜に曲率を与えることにより偏平状、つまりチューブ状構造形成に関与するレティキュロンタンパク質にも存在している。従ってリン酸化を介した小胞体ネットワーク形成の調節機構は、RHD3 が寄与する膜融合時だけではなく、レティキュロンタンパク質が関与するチューブ伸長や形成時にも機能している可能性があり、この点に関しても明らかにしていく必要がある。

#### 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2件)

1. Tominaga M, Kimura A, Yokota E, Haraguchi T, Shimmen T, Yamamoto K, Nakano A, Ito K. Cytoplasmic streaming velocity as a plant size determinant. *Developmental Cell* 27; 2013. 345-352. 査読有. doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.005.

2. Tominaga M, Kojima H, Yokota E, Nakamori R, Anson M, Shimmen T, Oiwa K. Calcium-induced mechanical change in the neck domain alters the activity of plant myosin XI. *Journal of Biological Chemistry* 287; 2012. 30711-30718. 査読有. doi;10.1074/jbc.M112.34668

[学会発表](計9件)

1. 横田悦雄、織井秀文、田原寛、森安裕二、新免輝男、高木慎吾「アクチン結合タンパク質ピリンの活性はリン脂質により修飾される」第56回日本植物生理学会年会 2015年3月16日 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

2. 上田晴子、横田悦雄、朽名夏磨、西村いくこ「植物の細胞内ダイナミクス」第23回日本バイオイメージング学会学術集会 2014年9月6日 大阪大学銀杏会館(大阪吹田市)

3. 富永基樹、伊藤光二、原田武士、横田悦雄、新免輝男、山本啓一、中野明彦「速度変型キメラミオシン XI の発現により明らか

になってきた原形質流動の機構と制御」第55回日本生理学会年会 2014年3月18日 富山大学五福キャンパス(富山県富山市)

4. 富永基樹、伊藤光二、原口武士、横田悦雄、新免輝男、山本啓一、中野明彦「植物サイズ制御における原形質流動の機能およびミオシン XI メンバーの役割分担」日本植物学会第77回大会 2013年9月15日 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)

5. 富永基樹、木村篤司、横田悦雄、原口武士、新免輝男、山本啓一、中野明彦、伊藤光二「速度変型キメラミオシン XI による原形質流動速度変化が植物サイズに及ぼす影響」日本細胞生物学会第65回大会 2013年6月19日~6月21日 ウィンクあいち(愛知県名古屋)

6. 上田晴子、横田悦雄、朽名夏磨、真野昌二、嶋田知生、田村謙太郎、新免輝男、西村幹夫、西村いくこ「小胞体運動に関わる小胞体タンパク質の解析」第54回日本植物生理学会年会 2013年3月22日 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

7. 横田悦雄、上田晴子、西村いくこ、新免輝男「タバコ培養細胞における小胞体輸送を担うミオシン」日本植物学会第76回大会 2012年9月16日 兵庫県立大学書写キャンパス(兵庫県姫路市)

8. 上田晴子、横田悦雄、朽名夏磨、嶋田知生、田村謙太郎、新免輝男、西村いくこ「小胞体運動の解析から見てきたミオシンとアクチンの意外な関係」日本植物学会第76回大会 2012年9月16日 兵庫県立大学書写キャンパス(兵庫県姫路市)

9. 富永基樹、伊藤光二、小嶋寛明、横田悦雄、山本啓一、新免輝男、大岩和弘、中野明彦「分子レベルから眺める原形質流動」日本植物学会第76回大会 2012年9月16日 兵庫県立大学書写キャンパス(兵庫県姫路市)

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

分子機械学講座ホームページ

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biomecha/index-j.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

横田悦雄（兵庫県立大学・生命理学研究科・助教）

研究者番号：80212299