

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657033

研究課題名(和文) プロテインホスファターゼが標的とするタンパク質の網羅的解析

研究課題名(英文) Proteomic identification of dephosphorylated proteins by phosphatase protein

研究代表者

深尾 陽一郎 (FUKAO, YOICHIRO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任准教授

研究者番号：80432590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は、植物の様々な生理現象に関わっている。リン酸化タンパク質の同定効率を上げるために、様々なリン酸化ペプチド精製法が検討されてきた。本研究では2種類のリン酸化ペプチド精製カラムを用いて、それぞれ771個(PhosTio)と641個(PolyMac)のリン酸化ペプチドをイネ培養細胞から同定した。さらにイネいもち病菌を処理したイネ培養細胞では、913個(PhosTio)と802個(PolyMac)のリン酸化ペプチドを同定した。これらには新規の病害抵抗タンパク質の候補が含まれていると考えている。

研究成果の概要(英文)：Protein phosphorylation and dephosphorylation by protein kinases and phosphatases regulate many biological events in plants. To identify as many phosphoproteins as possible, several purification methods of phosphopeptides have been established. Here, we used two kind of phosphopeptides purification columns (PhosTio and PolyMac) and each method allowed identifying 771 and 641 phosphopeptides in rice cultured cells. Also, 913 and 802 phosphopeptides were identified in rice cultured cells treated with rice blast fungus. These results indicate that phosphorylation of several proteins are induced responded to pathogen attack and may have a role in disease resistances.

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：プロテインホスファターゼ 脱リン酸化 リン酸化ペプチド精製 HPLC ゼニゴケ イネ培養細胞 PP2
C

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は、動物や酵母において細胞増殖や環境応答に重要な機能を持つことが示されてきた。植物においても植物ホルモン応答や病原体に対する抵抗性に異常を示す変異体の原因がキナーゼタンパク質（以下キナーゼ）やホスファターゼタンパク質（以下ホスファターゼ）であったことから、植物独自のシグナル伝達系における、リン酸化・脱リン酸化反応の重要性が示されている。

研究を開始する以前に、リン酸化タンパク質の網羅的解析がシロイヌナズナとイネで行われ、シロイヌナズナでは2,244個、イネでは3,393個のリン酸化タンパク質が同定されたことで、植物における大規模なリン酸化プロテオミクスが可能となった(Nakagami et al., *Plant Physiol.* 2010)。この研究における重要性の一つは、双子葉植物のシロイヌナズナと遺伝的に遠縁種である単子葉植物イネとの間で、リン酸化タンパク質の半数以上が共通していたことである。つまり、大半のリン酸化タンパク質は少なくとも植物種間ではよく保存されており、モデル植物などの他種で得られたリン酸化タンパク質の情報を、様々な実用植物の研究に応用できることを意味する。しかしながら現段階において、同定されたリン酸化タンパク質がどのキナーゼやホスファターゼに対応しているのかという情報を大規模に得る手段はない。

2. 研究の目的

近年、食料やエネルギー、環境問題といった地球規模の問題解決のために、モデル植物から実用植物の研究へと転換しつつある。しかしながら、現在においても実用植物の多くは技術的な制約から分子生物学的な研究には不向きである。特にプロテオミクスの実用植物への応用は始まったばかりである。ゲノムが解読されたらすぐにプロテオミクスを行うためのデータベースとして利用できるわけではなく、多くの研究者が期待するよりも時間を要する。このため、モデル植物として主たる研究材料に用いられてきたシロイヌナズナの情報資源を実用植物の研究に有効利用するというスタイルが取られてきた。ここで問題となるのが、遺伝的冗長性である。JGIによる苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) のゲノム解析の結果から、シロイヌナズナとゼニゴケにおける推定遺伝子数に大きな違いはないと考えられるが、植物が陸上化した後に多様化した調節因子などの遺伝子数はゼニゴケにおいて圧倒的に少ない。ホスファターゼに関しては、<http://plantsp.genomics.purdue.edu/> にシロイヌナズナとして131個登録されており、これらをゼニゴケゲノムに対してBLAST検索すると、推定47個のホスファターゼが存在したことから、より単純化されたモデルとして有効である。そこで本研究では、先行研究

の情報を活用できるホスファターゼに焦点を絞って研究を行う (Tougane et al., *Plant Physiol.*, 2010; Takezawa *J. Cell. Biol.*, 2003)。

植物におけるタンパク質のリン酸化や脱リン酸化は、生体内のタンパク質機能を制御する上で非常に重要な機構の一つであることから、基礎的研究においても実用作物の応用を考えた上でも研究対象として重要な位置づけにある。多くの研究者にとって、あるキナーゼやホスファターゼが重要な生理機能に關与することが明らかになった場合、次の興味はその基質を特定することである。しかしながら、キナーゼやホスファターゼが必ずしもその基質と直接相互作用していない、あるいは親和性が低いために、例えば免疫沈降などから基質が特定できることは少ない。以上のように、実際にホスファターゼの基質が特定された例は少なく、個々の地道な研究から得られる情報に止まっている。そこで、遺伝的冗長性の低い苔類ゼニゴケを用いて各ホスファターゼが脱リン酸化する基質を網羅的に特定し、植物における普遍的な脱リン酸化反応機構を包括的に理解するための基盤情報取得を目的とする。近年、ゼニゴケでは全ゲノム解読や遺伝子機能解析手法の開発が進み、分子遺伝学的研究に加え、プロテオミクスを行うための環境が整いつつある。本研究が成功すると、シロイヌナズナやイネ、さらには実用植物において同様の研究展開が予想される。ゼニゴケから得られる本研究データは植物が持つ多様性を理解するためには不十分であるが、全植物種におけるリン酸化研究の基盤情報としての重要性が高い。すなわち、ゼニゴケで整備された情報と比較して他の植物種間で保存されている脱リン酸化タンパク質は、植物に普遍的な脱リン酸化タンパク質機構を理解するための基礎データとしての役割を果たすが期待される。

3. 研究の方法

(1) ゼニゴケゲノムからのホスファターゼ遺伝子の抽出と解析

シロイヌナズナゲノムに存在する PP2C ファミリーに属する75個のホスファターゼの配列を用いて、ゼニゴケゲノム配列に対してBLAST検索を行い、相同性の高い遺伝子を絞り込む。その後、それらゼニゴケホスファターゼの変異体作成と、タンパク質発現を行い、ホスファターゼ活性測定を行う。

(2) リン酸化ペプチドの精製系の確立

ゼニゴケから得たタンパク質サンプルをトリプシン消化してペプチド断片とし、脱塩・精製後、リン酸化ペプチドのみをAgilent社 HPLC (1260 infinity) を用いて精製するための実験系を確立する。本解析系の確立のために、堀米博士 (新潟大学) が確立したリン酸化ペプチドの精製法 (Iwase et al., *J.*

Biochem., 2009) を基盤に、HPLC を用いたリン酸化ペプチド精製系を Agilent 社協力のもと確立する。このため、精製系の確立に先だって、堀米博士および Agilent 社との打合せを行った。リン酸化ペプチド精製カラムは実績の高いチタニアカラムを用いる予定であるが、実験系の確立が困難であると判断した場合は、HPLC を用いないリン酸化ペプチド精製カラムなどの利用も検討する。

4. 研究成果

(1) ゼニゴケゲノムからのホスファターゼ遺伝子の抽出と解析

シロイヌナズナにおいて最も研究が進んでいる PP2C ファミリーの 75 遺伝子配列を用いて、ゼニゴケゲノムに対して BLAST 検索を行った。この結果、8 個のホスファターゼタンパク質がシロイヌナズナの PP2C と高い相同性を示した。このことは、ゼニゴケゲノム上に存在する PP2C 遺伝子に関しても遺伝的冗長性が低いことを確認できた。次にこれら 8 つの遺伝子のクローニングを行う予定であったが、(2) の解析状況から計画を変更することにした。

(2) リン酸化ペプチドの精製系の確立

まずは HPLC を用いたリン酸化ペプチドの精製系の確立に取り組んだ。HPLC は Agilent Technologies 社の 1290 Infinity を用いた。リン酸化ペプチドを精製するための HPLC ラインおよびメソッドの組み立ては Agilent Technologies 社の技術スタッフの協力を得て行った。リン酸化ペプチドを保持するためのカラムについて複数検討した結果、選択的吸着能に優れている二酸化チタンを骨格構造とした GL Science 社の Titansphere Tio HPLC カラムは、効率良くリン酸化ペプチドの保持と回収が可能であることを確認した。この検証には市販のカゼインリン酸化ペプチド (alpha-casein : Michrom BioResources 社) を用いた。

次に、生体サンプルから得たリン酸化ペプチドの精製を行った。複数の生体サンプルから得た少量のタンパク質サンプルを用いて検証した結果、イネ培養細胞からプロトプラスト化したサンプルからタンパク質を抽出した場合において、最もリン酸化ペプチドの回収率が高くなることを確認した。このリン酸化ペプチドの回収率の確認は、LC-MS を用いた質量分析により行った。イネ培養細胞をプロトプラスト化せずにタンパク質を抽出し、リン酸化ペプチドを精製したところ、リン酸化ペプチドの回収率が極端に悪くなった。このため、HPLC によるリン酸化ペプチドの精製系の確立は、ゼニゴケではなくイネ培養細胞のプロトプラストを用いて行う事とした。しかし、より多くのリン酸化ペプチドを精製するためにサンプルのスケールアップを図ったところ、イネ培養細胞のプロトプラストを用いた場合でもカラム詰まりが起こり、HPLC を用いた実

験系では大量のリン酸化ペプチドを同定することが困難であることが判明した。

そこで HPLC による精製系の代わりとして、PhosTio (GL Science 社) と PolyMac (AMR 社) を用いてリン酸化ペプチドを精製した。このとき、プロトプラスト化しないイネ培養細胞を用いた検証も行ったが、同定されるリン酸化ペプチドは主に熱ショックタンパク質など細胞内に多量に存在するタンパク質で 100 個にも満たなかった。これに対して、プロトプラスト化した細胞では、それぞれ 771 個 (PhosTio)、641 個 (PolyMac) のリン酸化ペプチドが同定され、より微量なタンパク質も含めて同定される総数が増加した。動物細胞を用いた研究結果と考え合わせると、植物細胞を用いたリン酸化ペプチドの精製では、細胞壁などの成分が阻害する可能性があり、タンパク質調製の段階での工夫が必要であることが分かった。このため、当初の目的を逸脱することになったが、イネ培養細胞のプロトプラストを用いて高いインパクトが得られる実験系を再構築することとした。我が国の主要作物であるイネにおいて、防御応答を引き起こすイネいもち病菌の構成成分キチンを処理し、刺激に応答して変動するリン酸化ペプチドの同定を行う事にした。この結果、PhosTio では 913 個、PolyMac では 802 個のリン酸化ペプチドが同定され、リン酸化が誘導されるタンパク質が増えることが示唆された。今後はこのタンパク質が実際にリン酸化誘導されるかを検証し、論文として報告する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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
<http://bsw3.naist.jp/plantglobal/index.shtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深尾 陽一郎 (FUKAO, Yoichiro)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・特任准教授
研究者番号：80432590

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)
神戸大学・理学研究科・准教授
研究者番号：00452293

藤原 正幸 (FUJIWARA, Masayuki)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・特任助教
研究者番号：70403350