

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440126

研究課題名(和文) CDPKを利用した植物Ca²⁺情報伝達網の追跡及びキナーゼ基質特異性変更への挑戦

研究課題名(英文) Analysis of calcium signaling network in plants and alteration of the substrate specificity of protein kinase using plant CDPK

研究代表者

石田 さらみ (Ishida, Sarahmi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20282725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、カルシウム情報伝達の中核として機能する植物特有のカルシウム依存性タンパク質キナーゼ(CDPK)では、基質認識能と触媒活性が分離可能であることを解明した。この結果から、CDPKは、キナーゼ基質特異性変更研究のモデルに適していると評価している。この成果を足掛かりとしてキナーゼ基質特異性変更の実験系を確立すれば、構成的生物学分野と連携して理論的に計画された情報伝達経路をもつ多細胞生物の創出に挑戦するための有効な実験的基盤を提供できる。本研究では、植物CDPKを利用したキナーゼ基質特異性変更のための実験系の確立を最終目的に、まず、植物CDPKの基質認識機構の詳細について解明を進めた。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that Calcium-dependent protein kinases (CDPK) in plants could be divided to two domains, that is, substrate recognition domain and catalytic domain and estimated CDPKs were suitable as the model system in analysis for altering the substrate specificity of protein kinases. The success in altering substrate specificity of protein kinases is expected to promote a novel signal transduction pathway constructed theoretically. In this research, the mechanism for specific substrate recognition process in plant CDPK was analysed in detail aiming establishment of an examination system for altering the substrate specificity of protein kinases in signal transduction in cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：情報伝達系 カルシウム タンパク質キナーゼ 基質特異性 CDPK

1. 研究開始当初の背景

学術的背景

細胞内情報伝達において、可逆的修飾であるタンパクの質リン酸化は迅速な情報の伝達や方向制御を可能とし、この過程を触媒するタンパク質キナーゼは中心的役割を果たしている。多くの生物種は、進化の過程において遺伝情報を重複させる事により多様性を獲得してきた。タンパク質キナーゼも多様化により巨大な遺伝子ファミリーを形成している。このようなキナーゼの分化は、一から新奇の情報伝達系を創出する事なく、様々な環境刺激への応答を可能にしたと考えられる。しかしながら、このキナーゼファミリーの複雑化は、相同性の高い構造を持つキナーゼ群が如何にして特異的基質を認識し、情報の特異性を確保しているのかという情報伝達の根幹となる問題を我々に提起している。タンパク質キナーゼの基質特異性の操作は、改変された新たな情報伝達経路の構築という分子生物学の大きな目標を実現する。ところが、基質特異性を担うアミノ酸残基の同定は意外な程に困難である。キナーゼ特異性決定要因の第一はキナーゼの触媒領域と基質間の分子識別であり、基質のリン酸化部位コンセンサス配列やその近傍に存在するキナーゼとのドッキングサイト配列が同定されているが、それらは単純かつ曖昧であり、*in vivo*におけるキナーゼの特異性を十分には説明出来ない。さらに共通のリン酸化コンセンサス配列を持つ同一ファミリーキナーゼ群が、如何にして特異的基質を認識仕分けしているのかは殆ど明かにされていない。変異導入によるアミノ酸置換は有効な手段の一つであるが、基質のリン酸化に重要なアミノ酸を探索しても、そのアミノ酸が基質認識に重要なのか、それともリン酸化触媒反応に重要なのかを判別する事は難しい。キナーゼ特異性変更の研究を推進するためには基質認識と触媒反応を分離できる実験系の確立が必須となる。カルシウム情報伝達は、真核生物に普遍的な細胞内情報伝達系の一つであり、幅広い細胞応答を発動する。動物と異なり、植物は C-キナーゼを持たない。さらに、カルシウム貯蔵庫やチャンネル等、多くの点で動物と異なる特有の機構を進化させてきた。そのため、植物のカルシウム情報伝達網を包括的に理解するためには、植物独自の研究展開が必要となる。第一に標的とすべきは、鍵となる因子の機能解明である。植物において C-キナーゼの代わりを果たしているのは、植物界特有のカルシウム依存性タンパク質キナーゼ (Calcium-Dependent Protein Kinase; CDPK) である。様々な植物細胞応答で中核的役割を果たす事が知られているが、その生理的基質については不明な点が多い。植物細胞のカルシウム情報伝達を追跡するためには、CDPK 群の生理的基質を同定していかなばならない。

申請時までの研究成果

我々は植物ホルモン・ジベレリン内生量調節を司りフィードバック制御に働く転写活性化因子、RSG の機能解析を進めてきた (*PLANT CELL*

2000, 2001, 2004)。その過程で RSG をリン酸化し、RSG とその負の制御因子・14-3-3 タンパク質との結合を促進して RSG の機能を抑制するキナーゼの同定に成功した (*PLANT CELL* 2008)。RSG キナーゼは、CDPK の一つ、NtCDPK1 であった。他のキナーゼ同様に CDPK も大きな遺伝子ファミリーを形成し、シロイヌナズナでは 34、イネでは 29 の遺伝子群が報告されている。CDPK 群は N 末可変領域・キナーゼ領域・自己阻害領域・カルモジュリン様領域の 4 部位から構成されており、各アイソタイプ特有である N 末可変領域を除けばアミノ酸配列の保存性は非常に高い。その構造から、動物のカルモジュリンキナーゼ (CaMK) とカルモジュリンが融合して進化したと考えられている。我々は、NtCDPK1 が特異的基質である RSG を認識する分子機構について詳細な解析を進め、その結果、N 末端可変領域が基質・RSG の認識に必須である事、さらに、NtCDPK1 の N 末端可変領域は単独で、*in vivo* において別のアイソタイプの CDPK に RSG キナーゼとしての特性を付与出来る事を証明した (*PLANT CELL* 2010)。

特色・独創的な点、予想される結果と意義

我々は NtCDPK1 の N 末可変領域が基質である RSG の認識に必須である事を解明した。N 末可変領域内の一アミノ酸置換により NtCDPK1 は触媒活性を保持したまま、RSG キナーゼの機能を喪失する。さらに、別のアイソタイプの CDPK (CPK9) の N 末可変領域を CDPK1 のそれと置換したキメラは RSG キナーゼとして植物細胞内で機能する。この成果は、今まで機能が不明であった CDPK の N 末可変領域が基質認識を司る事を解明しただけでなく、CDPK では基質認識と触媒反応が独立した領域に担われている事を示した。即ち、CDPK はこれまで求められてきたキナーゼの基質特異性変更研究のモデル系としての優れた特質を備えていると評価できると考えられた。リン酸化されるタンパク質に対して、そのタンパク質の結合モチーフを CDPK の N 末に付加する事により、特異的キナーゼの創出が可能となる。さらにキナーゼに比べ特異性の低いタンパク質フォスファターゼに応用すれば、制御可能な基質特異的フォスファターゼの開発も視野に入り、新しい情報伝達系の再構成の自由度は大幅に増すと期待された。これまで、キナーゼの基質特異性の変更に成功した例は未だ少ない。改変スキャフォールドを用いて酵母に新奇 MAP キナーゼカスケードを再構築した報告と、大腸菌の二成分制御系のセンサーキナーゼを改変して対応するレスポンスレギュレーターを作製した研究が挙げられるが、共に単細胞生物での成果であった。我々は N 末可変領域の操作により、植物に特徴的な CDPK の基質特異性変更が可能である事を示した。本計画の実施により、理論的に計画された人工的情報伝達経路をもつ多細胞生物の創出という分子生物学の究極の目標に向けて有効な実験的基盤を提供出来る。さらに、応用的に有用な組み換え

生物の開発にも重要な支援となると考える。植物のカルシウム情報伝達において CDPK 群はその中核として機能するが、生理的基質が明確でないため、情報伝達網の解明に進展が見られなかった。本研究により、N 末可変領域を用いた基質探索の有効性が明らかになれば、CDPK が仲介する植物カルシウム情報伝達系の包括的な解析への道が拓かれると期待された。

2. 研究の目的

植物細胞内カルシウム情報網の網羅的解析を行う

植物カルシウム情報伝達の鍵であるキナーゼ、CDPK の基質認識領域を用いて、基質が不明である CDPK 群の基質を網羅的に探索する。CDPK を起点に情報の流れを追跡し、これを突破口に植物細胞内カルシウム情報伝達網の包括的解明に繋げる。

植物において人工的な細胞内情報伝達経路創出のための実験系を確立する

基質認識と触媒反応を分離できる CDPK をモデルとしてキナーゼの基質特異性の変更を試み、タンパク質キナーゼの基質特異性の操作による新しい細胞内情報伝達系の創出に挑戦する。植物ホルモン・ブラシノステロイドの情報伝達を、改変型 CDPK を介して植物ホルモン・ジベレリンで抑制する新たな経路の構成を試みる。

3. 研究の方法

植物細胞内カルシウム情報網の網羅的解析を行う

CDPK の基質認識領域である N 末可変領域を用いて、基質が不明である CDPK 群の標的タンパク質の網羅的探索を展開する。

下記の解析を実施する。

- (1) 酵母 Two-hybrid 法を用いた結合因子の探索及び同定
- (2) リコンビナントタンパク質と共精製される因子の質量分析による同定

植物において人工的な細胞内情報伝達経路創出のための実験系を確立する

CDPK の N 末可変領域の改変によりタンパク質キナーゼの基質特異性を変更できる事を利用し、新奇の情報伝達経路の構築を目指す。

下記の解析を実施する。

- (1) 改変型 CDPK を介してブラシノステロイド情報伝達をジベレリンにより抑制する新たな系を構成する
- (2) 任意の S/T キナーゼの基質に CDPK1 結合配列を付加し、CDPK1 の特異的基質への変換を試みる

4. 研究成果

CDPK は C-キナーゼを持たない植物においてカルシウム情報伝達の中核として機能する植物特有カルシウム依存性タンパク質キナーゼ (CDPK) である。我々は、CDPK では基質認識能と触媒活性が分離可能であることを解明し

た。この結果から、CDPK は、キナーゼ基質特異性変更研究のモデルに適していると評価している。この成果を足掛かりとしてキナーゼ基質特異性変更の実験系を確立すれば、構成的生物学分野と連携して理論的に計画された情報伝達経路をもつ多細胞生物の創出に挑戦するための有効な実験的基盤を提供できる。又、生物が進化の過程において獲得した多様性から特異性を創出した過程を追跡できると考える。さらに、応用的に有用な組み換え生物の開発にも重要な支援となると期待できる。

本研究では、CDPK を用いたキナーゼ基質特異性変更のための実験系の確立を目指すには、まず、植物 CDPK の基質認識機構の詳細についてさらに理解を深める事が必要であると考え、植物細胞内での CDPK の基質認識特性について解析を進めた。

解析の結果、NtCDPK1 はシグナル特異性を堅持し反応効率を上昇させるためのスカフォールド分子として機能するタンパク質キナーゼである事、14-3-3 と NtCDPK1 はこれまで解明されていなかった新規のメカニズムで相互作用する事を明らかにした。

1. NtCDPK1 の自己リン酸化は 14-3-3 との結合に必要であるが、その維持には必須ではない。
2. NtCDPK1 は 14-3-3 と基質 RSG と共にヘテロ 3 量体を形成する。
3. NtCDPK1 は RSG をリン酸化した後に 14-3-3 に転移させ、RSG は 14-3-3 との複合体として NtCDPK から離脱する。

これらの結果は、高い評価を得られる科学雑誌に掲載された。

さらに、植物細胞内カルシウム情報伝達系の包括的理解にむけて、CDPK 群の特異的基質の探索及び同定に着手した。

1. 酵母 Two-hybrid 法のための Library 及び Plasmid 群を作成した。
2. 共精製に用いるリコンビナントタンパク質発現用 Plasmid 群を作成した。

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. Takeshi Ito, Masaru Nakata, Jutarou Fukazawa, Sarahmi Ishida and Yohsuke Takahashi

Scaffold Function of Ca²⁺-Dependent Protein Kinase: Tobacco Ca²⁺-DEPENDENT PROTEIN KINASE1 Transfers 14-3-3 to the Substrate REPRESSION OF SHOOT GROWTH after Phosphorylation.

Plant Physiology (2014) **165**, 1737-1750.

査読あり

<http://www.plantphysiol.org/content/165/4/1737.full?sid=f0ff25db-33ad-4be0-80c3-cf921f3e4552>

2. Takeshi Ito, Masaru Nakata, Jutarou

Fukazawa, Sarahmi Ishida and Yohsuke Takahashi

Phosphorylation-independent binding of 14-3-3 to NtCDPK1 by a new mode.

Plant Signaling & Behavior (2014) 9, e977721-1 - e977721-3

査読あり

DOI:10.4161/15592324.2014.977721

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 大江翔太、伊藤岳、石田さらみ、高橋陽介
ジベレリン信号伝達に關与するタンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 の自己リン酸化による機能制御の解析

日本植物生理学会、2013年3月21-23日

富山大学五福キャンパス(富山県富山市)

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表

石田 さらみ (ISHIDA, Sarahmi)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 20282725

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: