

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650093

研究課題名(和文)カルシウムとイノシトールリン脂質の情報変換を制御する新規分子と細胞機能調節の解明

研究課題名(英文)Molecular properties of signal transducing proteins on the plasma membrane

研究代表者

前島 正義 (Maeshima, Masayoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80181577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜での情報変換に関わるPCaP1とPCaP2に注目し、次の成果を得た。根毛特異的に発現するPCaP2が根毛の形成と伸長に不可欠であること、すなわち根毛先端でのCaシグナルをホスファチジルイノシトールシグナルに変換することを明らかにした。また、PCaP2のN端23残基ペプチドを植物に発現させると無根毛株が得られるので、この株を用いて根毛の水と無機イオン吸収等における役割を解明した。PCaP1の構造上の特徴に加えて、膜リン脂質、Ca²⁺およびMg²⁺との結合について詳細な知見を得た。またPCaP1の機能欠失株における気孔閉鎖障害を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated molecular properties of the plasma membrane Ca²⁺-binding proteins, PCaP1 and PCaP2, at biochemical and molecular biological levels. We found that PCaP2 is essential for formation and tip growth of root hairs using loss-of-function mutant lines of PCaP2. Our key finding is that PCaP2 transduces a Ca²⁺ signal to phosphatidylinositol signal on the plasma membrane at tip of root hair. When the N-terminal peptide of PCaP2 was introduced to plants under the control of CaM 35S promoter, no root hair was observed in the transformant. Using this mutant, we quantified physiological functions of root hair, such as absorption of water and mineral ions. Also we obtained structural information of PCaP1 on the binding to membrane phospholipids and metal ions and found that loss-of-function mutant of PCaP1 has a defect in stomatal closure in the dark.

研究分野：生化学

キーワード：細胞内情報変換 細胞膜 カルシウム ホスファチジルイノシトール 情報伝達

1. 研究開始当初の背景

課題:「カルシウムとイノシトールリン脂質の情報変換を制御する新規分子と細胞機能調節の解明」

細胞内情報伝達および情報変換に関わるイノシトールリン脂質 (phosphatidylinositol phosphate, PIP) は、PIP₁、PIP₂、PIP₃に分類され、それぞれ代謝的関連が密であり、固有の細胞機能をもつ。PIPの相互変換には特異性の高い各種キナーゼ等がはたらく。動物 (*Annu Rev Biophys*, 2008, 37:175; *Trends Cell Biol*, 2010, 20:25) および植物 (*Trends Plant Sci*, 2009, 14:171) でPIP分子種間の相互変換酵素 (ホスファターゼ、キナーゼ) の解明が進み細胞機能調節の役割が解明されつつある。PIPは細胞の分裂と分化、極性形成、プログラム細胞死などの現象に関わっていると推定されている。

これまでの研究はPIPsの相互変換に関わる酵素およびホスホリパーゼCなど集中していた。申請者は、細胞膜に結合する新規カチオン結合タンパク質 (plasma membrane cation-binding protein, PCaP) を2種 (PCaP1とPCaP2) 見出し、両分子がイノシトールリン脂質 (PIP₂、PIP₃) と結合すること、そしてカルモジュリン/Ca複合体 (CaM/Ca) とも結合することを発見した。しかもPCaPにCaM/Ca結合すると、PIPsはPCaPから遊離することが明らかとなった。このことはPCaPがPIPシグナルとCaシグナルのクロスポイントに位置していることを示唆している。PCaPの研究を通して、世界の誰も想像しなかった情報制御の概念を提案できると判断し、萌芽研究としての開拓に挑戦することとした。

2. 研究の目的

イノシトールリン脂質 (Phosphatidylinositol phosphate, PIP) は、カルシウム (Ca) と並んで細胞内シグナリングの主要な要素である。PIPは分子種が多く、それぞれが異なる役割を担っている。特定のPIP分子種に結合する細胞膜タンパク質 PCaPを見出し、PCaPがPIPを結合すること、その結合がカルモジュリン/Ca複合体の存在で解離することを明らかにした。このことは、CaシグナルをPIPが増幅あるいは情報変換する可能性、また既存のPIPを結合することで機能をマスクする可能性を示唆している。この仮説あるいは可能性を生化学的、分子細胞生物学的に実証し、新しい情報変換、すなわち、細胞内CaシグナルをPIPシグナルに変換するという分子とその作用機作の存在を提案することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

下記の具体的な実験研究方法により PCaP1 および PCaP2 の生理機能の解明を進めた。

(1) PCaP1およびPCaP2について、遺伝子欠失株、変異分子導入株における生理特性、表現型を解析する。PCaP1は気孔を中心、PCaP2は根毛を中心とした。PCaP2およびPCaP1をGFPにより可視化し、各分子の細胞特異的な発現、細胞内局在を詳細に検討した。

(2) PCaP1については、N端領域25残基のみのペプチド、N端25残基を欠失した変異型PCaP1を合成し、ノーマルなPCaP1と比較することで、各部位の役割 (金属結合、リン脂質結合、両領域の相互作用) を定量的、定性的に測定した。

(3) PCaP2のN端23残基のみを過剰発現させた株を作出し根毛の生じない株を作出し、その無根毛株を野生株と比較することで根毛の生理機能を定性的、定量的に解析する。

(4) ホスファチジルイノシトールリン酸 (PtdInsPs) は静止状態ではPCaP1およびPCaP2が膜上でトラップしていると推定されている。一般にPtdInsPsは、情報刺激を受けて加水分解され、情報伝達分子PIPが生ずる。そのPIPによる機能調節の一環として、液胞膜H⁺-PPaseとの相互作用を解明する。合わせて、H⁺-PPaseのどの部分が結合するのかを検討し、また、H⁺-PPaseの細胞内存在状況を可視化して検討した。

(5) PCaP1内のPIPの結合領域の構造的特性の解明とPCaPを利用したPIP蛍光プローブの開発を検討する。

(6) 多様な植物種におけるPCaP分子とそのシステムの普遍性を検討する。

4. 研究成果

本テーマに関連して、下記の研究成果を得た。一部の実験については、最終的な結論に至っていないので本稿では割愛する。

(1) 根毛特異的に発現する PCaP2 に注目し、PCaP2 に関わる種々の変異株を作出し、それぞれの根毛を形態的に解析し、PCaP2 が根毛の形成と伸長に大きく関わっていることを明らかにし、論文[発表論文(5)*Kato et al., 2013]として公表した。従前より、根毛の先端成長にはカルシウムシグナルが不可欠であることが知られていたが、それがどのように先端伸長に結び付くのが不明であった。この研究に PCaP2 の根毛形成と伸長における重要な役割を明らかにすることができた。すなわち、根毛伸長に先立って、根毛の先端から流入するカルシウムが増大することで、細胞内のCa/カルモジュリン(CaM)が形成され、この

Ca/CaM が PCaP2 に結合し、すでに PCaP2 に結合していたホスファチジルイノシトールリン酸(PtdInsPs)を遊離させ、遊離した PtdInsPs はホスホオリパーゼの作用によってジアシルグリセロール(DAG)と PIP に加水分解される。生じた PIP が先端伸長、とくに細胞内小胞輸送を正にコントロールする。このプロセスの鍵となる部分、すなわちカルシウムシグナルを PIP シグナルに変換する機構を PCaP2 が担っていることを明らかにした。

(2) 上記(1)の研究の過程で、PCaP2 の N 端 23 残基のみを含むペプチドを CaMV の 35S プロモーター制御下で植物に発現させると、根毛が形成されにないという表現型が見出された。この株を NR23 と名付け、従来根毛が形成されにないとされている変異株とは異なり、リン酸欠乏、エチレン処理等によっても根毛が一切形成されない理想的な株であることを明らかにした。その基礎の上に立ち、野生株と NR23 を比較することで、根毛は根の吸水能力の 50%を担うこと、鉄、亜鉛、イオウ、カルシウム等の吸収の 20-50%を担うことなどを定量的定性的に明らかにし、論文[発表論文(2)* Tanaka et al., 2014]として公表した。

(3) PCaP1 のタンパク質化学的な解析を進め、分子の N 端領域は α ヘリックス構造をとること、膜リン脂質との結合には N 端領域(Lys に富む)が必要であること、分子の N 端領域とそれ以外の領域は相互作用する可能性が高いこと、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を結合し得ることを明らかにした(論文未発表)。また、病気抵抗性に関わるタンパク質と相互作用する可能性も得た。また、PCaP1 の遺伝子欠失株は、葉の気孔閉口に支障が生ずることを、従来とは異なる手法で明らかにした(論文未発表)。

(4) PIP の一種である $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ および $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ は液胞膜プロトンポンプ H^+ -PPase に結合し、このことは孔辺細胞液胞膜 H^+ -PPase の機能調節に関わり、結果として気孔の開閉に関わっていることを明らかにした[発表論文(6)*]。また、関連して H^+ -PPase の機能を支える分子機構[発表論文(3)*]、 H^+ -PPase を緑色蛍光タンパク質を酵素機能を損なわずに付加することで液胞膜を可視化した植物株を作出し、細胞分裂後の液胞構造のダイナミクスを明らかにした[発表論文(4)*]。加えて、根の伸長域の組織では H^+ -PPase と共に PCaP1 が強く発現していることを、PCaP1-GFP を導入した株で明らかにした。

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 18 件)

*印は本課題にとくに関連する論文

(1) Tanaka, N., Fujiwara, T., Tomioka, R.,

Krämer, U., Kawachi, M., and Maeshima, M. (2015) The histidine-rich loop of *Arabidopsis* vacuolar membrane zinc transporter AtMTP1 is involved in sensing cytosolic level of zinc. *Plant Cell Physiol.*, 56: 510-519. doi: 10.1093/pcp/pcu194

(2)* Tanaka, N., Kato, M., Tomioka, R., Kurata, R., Fukao, Y., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2014) Characteristics of a root hair-less line of *Arabidopsis thaliana* under physiological stresses. *J. Exp. Botany*, 65, 1497-1512. doi: 10.1093/jxb/eru014

(3)* Asaoka, M., Segami, S., and Maeshima, M. (2014) Identification of the critical residues for the function of vacuolar H^+ -pyrophosphatase by amino acid screening based on the 3D structure. *J. Biochem.*, 156, 333-344. doi: 10.1093/jb/mvu046

(4)* Segami, S., Makino, S., Miyake, A., Asaoka, M., and Maeshima, M. (2014) Dynamics of vacuoles and H^+ -pyrophosphatase visualized by monomeric green fluorescent protein in *Arabidopsis*: Artifactual bulbs and native intravacuolar spherical structures. *Plant Cell*, 26, 3416-3434. doi: 10.1105/tpc.114.127571

(5)* Kato, M., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2013) A Ca^{2+} -binding protein PCaP2 located on the plasma membrane is involved in root hair development as a possible signal transducer. *Plant J.*, 74, 690-700. doi: 10.1111/tpj.12155

(6)* Bak, G., Lee, E.J., Lee, Y., Kato, M., Segami, S., Heven, S., Maeshima, M., Hwang, J.U., and Lee, Y. (2013) A role of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in vacuolar structure change in guard cells of closing stomata. *Plant Cell*, 25, 2202-2216. doi:10.1105/tpc.113.110411

(7) Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., and Lee, Y. (2013) The ABCA9 transporter facilitates seeds storage lipid synthesis at the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 773-778. doi:10.1073/pnas.1214159110

(8) Wang, B., Bailly, A., Zwiewka, M., Henrichs, S., Azzarello, E., Mancuso, S., Maeshima, M., Friml, J., Schulz, A., and Geisler, M. (2013) *Arabidopsis* TWISTED DWARF1 functionally interacts with auxin exporter ABCB1 on the root plasma membrane. *Plant Cell*, 25, 202-214. doi:10.1105/tpc.112.105999

(9) Tanaka, N., Kawachi, M., Fujiwara, T., and Maeshima, M. (2013) Zinc-binding and structural properties of the histidine-rich loop of *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane

zinc transporter MTP1. *FEBS Open Bio*, 3, 218-224. doi: 10.1016/j.fob.2013.04.004

(10) Ferjani, A., Ishikawa, K., Asaoka, M., Ishida, M., Horiguchi, G., Maeshima, M., and Tsukaya, H. (2013) Enhanced cell expansion in *KRP2* overexpressor is mediated through increased V-ATPase activity. *Plant Cell Physiol.* 54, 1989-1998, doi:10.1093/pcp/pct138

〔学会発表〕 (計 21 件)

加藤真理子、柘植知彦、前島正義、青山卓史
シロイヌナズナ根毛における Ca^{2+} 結合タンパク質 PCaP2 とホスファチジルイノシトール-4,5 二リン酸の細胞内動態. 日本植物生理学会年会. 東京農大、2015 年 3 月 16-18 日

加藤真理子、前島正義、青山卓史：根毛伸長時間におけるシロイヌナズナ Ca^{2+} 結合タンパク質 PCaP2 とホスファチジルイノシトール-4,5 二リン酸の細胞内動態. 植物脂質科学研究会シンポジウム、静岡市産学交流センター、2014 年 11 月 28、29 日

田中奈月、高橋秀幸、前島正義：新規シグナル変換分子 PCaP1 は植物の水分屈性に関与している. 日本生化学会大会、京都国際会議場、2014 年 10 月 15-18 日.

相羽孝亮、長崎-武内菜穂子、前島正義：細胞膜局在型新規 Ca^{2+} 結合タンパク質 PCaP1 の構造とリガンド結合の解析. 日本生化学会大会、パシフィコ横浜、2013 年 9 月 11-13 日

田中奈月、加藤真理子、奥田祥平、富岡利恵、倉田理恵、深尾陽一朗、青山卓史、前島正義：根毛の生理機能とそれを支える膜結合型タンパク質. 日本植物生理学会年会 2014 年度年会、富山、2014 年 3 月 18-20 日

〔図書〕 (計 1 件)

Ferjani, A., Segami, S., Asaoka, M., and Maeshima, M. (2013) Regulation of PPI levels through vacuolar membrane H^+ -pyrophosphatase. *In Progress in Botany*, Vol. 75, ed. Lüttge, U., Beyschlag, W., and Cushman, J., pp. 145-166, Springer-Verlag, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-38797-5_5

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前島正義 (MAESHIMA, Masayoshi)

研究者番号：8 0 1 8 1 5 7 7

(2) 研究分担者：設定せず

()

研究者番号：

(3) 連携研究者：設定せず

()

研究者番号：