

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04906

研究課題名(和文)植物イオン輸送体を協奏的に統御する細胞内調節因子の解析

研究課題名(英文)Regulation by intracellular regulators of plant ion transporters

研究代表者

魚住 信之(Uozumi, Nobuyuki)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：40223515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の細胞内の主要イオンの濃度を調節するイオン輸送体は、乾燥・脱水・塩害などの環境ストレス変化に適応して細胞内浸透圧調節や膜電位維持を行っている。輸送体の機能のon-offは、二酸化炭素の吸収や蒸散を担う気孔の開閉、環境ストレス適応、生体膜のエネルギー変換に関与する。環境変化に立ち向かう細胞の恒常性維持と植物全身の養分吸収と排出のバランス調節を行うために、気孔閉鎖を誘導に主要な機能を担う陰イオン輸送体の調節機構を明らかにした。この調節は、細胞内リン酸化酵素で行われ、細胞内の分子と輸送体が協力して環境変化に適応することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の細胞内の主要イオンの濃度を調節する陰イオン輸送体を制御する因子を明らかにした。これにより、乾燥・脱水・塩害などの環境ストレス変化に適応に関与する初期段階の分子レベルの調節系が明らかとなった。二酸化炭素の吸収や蒸散を担う気孔の開閉、環境ストレス適応、生体膜のエネルギー変換に関与することから、植物の養分吸収の改善、地球規模の環境変化に耐性を持つ植物の創出、環境保全、作物育種や環境変化に立ち向かう分子の創成につながる基盤的に知見を獲得した。

研究成果の概要(英文)：Ion transport system play an important role in control of the concentration of major ions in plant cells. They contribute to adjust intracellular osmotic pressure and maintain membrane potential by adapting to changes in environmental stress such as dryness, dehydration and salt damage. The transporter functions are involved in the opening and closing of pores responsible for carbon dioxide absorption and transpiration, environmental stress adaptation, and energy conversion of biological membranes. In order to maintain the homeostasis of cells to cope with environmental changes and to regulate the balance of nutrient absorption and excretion in the whole body of the plant, we elucidated the regulatory mechanism of anion channels mediating induction of stomatal closure. This regulation is performed by intracellular kinases, which indicate that intracellular molecules and transporters cooperate to adapt to environmental changes.

研究分野：環境適応に重要な機能を果たす植物イオン輸送と生体膜エネルギー変換に関する研究分野

キーワード：イオンチャネル シロイヌナズナ 気孔閉鎖 脂質修飾 リン酸化制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物の細胞内の主要イオンの濃度を調節するイオン輸送体は、乾燥・脱水・塩害などの環境ストレス変化に適応して細胞内浸透圧調節や膜電位維持を行っている。輸送体の機能の on-off は、光合成産物の増減にともなう浸透圧の日周リズムにも従っており、二酸化炭素の吸収や蒸散を担う気孔の開閉や過剰イオンを外界へ排出を担う葉先の排水組織や根における排出とも連動していることが予想されている。環境変化に立ち向かう細胞の恒常性維持と植物全身の養分吸収と排出のバランス調節を行うために、気孔閉鎖を誘導する陰イオン輸送体 SLAC1 が機能しているが、その輸送体を調節する機構については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

陰イオン輸送体の SLAC1 の機能活性を生化学的または電気生理学的な手法を駆使して直接イオン輸送体の機能を計測し、細胞内因子と輸送体の相互作用を解析するエフェクター分子とレギュレーター分子の相互関係を明らかにして、機構の明瞭な解明をめざす。

### 3. 研究の方法

膜輸送体調節因子 42 個の CPK/CRK キナーゼと 4 個の CBL の脂質修飾(膜アンカー機能)を調べるために、無細胞翻訳系による脂質付加の検出および卵母細胞・タバコ植物の一過的発現による細胞内局在化の観察を行う。脂質修飾部位に置換を施した CPK6・CBL5 と SLAC1 チャネルを卵母細胞に共発現させて電気生理学的計測する。また、上記遺伝子の植物変異株の表現型を調べる。置換体の無細胞系による脂質修飾の有無、GFP 融合蛋白質を用いた細胞内局在性を行う。この脂質修飾がチャネル不活性化を抑制する可能性を電気生理学的計測で検討する。

### 4. 研究成果

植物のイオン輸送体は複数存在することが分かっているが環境変化に適応して複数のイオン輸送体が協奏的に機能する必要がある。それらをコントロールする役割として細胞内タンパク質の調節が考えられているがそれらに関するデータは少ない。本研究ではカルシウム依存性リン酸化酵素関連タンパク質を対象に、細胞膜への移行と輸送体の調節に関する解析を行った。シロイヌナズナの 34 個の CPK キナーゼと 8 個の CRK キナーゼに脂質修飾を受けるアミノ酸モチーフが存在している。N 末端のアミノ酸であるメチオニンの後にグリシンが存在するタンパク質を対象とした。2 番目のアミノ酸をアラニンに置換したコンストラクトを作成した。さらにミリスチン酸修飾部位の近郊にあるシステイン残基に着目してセリンに置換したタンパク質の構築も行った。これらのタンパク質を小麦胚芽無細胞翻訳系と昆虫無細胞翻訳系の両系で検討を行った。この結果 44 個のタンパク質のうち 40 個のタンパク質においてミリスチン酸修飾が観察された。次にパルミトイル化修飾を検出するために CPK6 および CBL5 のタンパク質を検討することとした。CPK6 と GFP 融合タンパク質を動物培養細胞である COS 細胞に導入し局在性を検討した。その結果、野生体は小胞体もしくはゴルジ体に移行したが、パルミトイル化部位を置換したタンパク質ではこれらの膜に移行せず細胞質に多くが止まることとなった。このことよりパルミトイル修飾も生体膜への移行に重要であることがわかった。次にタバコを細胞に一過的発現を行いこれらのタンパク質の局在性を検討したところ野生株は原形質膜に移行し、置換体は原形質膜以外のところにとどまることとなった。この結果は両脂質修飾が原形質膜への移行を促進することを強く示唆している。また、K 輸送体の膜への移行と組込みを検討し、タンパク質の疎水性も脂質の疎水性も膜挿入に重要である結果となった。

Cl チャネルの SLAC1 の制御因子である CPK6 リン酸化酵素の N 末端領域にある脂質付与アミノ酸を置換体非 (CPK6-G2A, CPK6-C5S) と SLAC1 をアフリカツメガエル卵母細胞に共発現させて、SLAC1 電流を二本刺し膜電位固定法による測定を行った、この結果、ミリスチン酸とパルミチン酸の付与が考えられるアミノ酸が SLAC1 の輸送活性発現に必須であることが分かった。また、脂質修飾の膜局在性とチャネル輸送体の活性化を植物で調べるために、CPK6 の非脂質修飾変異体 (CPK6-G2A, CPK6-C5S) を cpk6 植物に導入して気孔の開鎖度を調べた。この結果、CPK6 のミリスチン酸とパルミチン酸の付与が気孔閉鎖にも必要であることが分かった。以上により、in vitro と in vivo の脂質修飾検出と異種発現系と植物における脂質影響と輸送体活性化および気孔閉鎖に関する結果の両者が一致し、脂質修飾が細胞内因子の活性化と輸送体の機能発現に必要であることが明らかになった。

CBL5 のパルミトイル化を生化学的に調べるため CBL5-C3S, CBL5-C5S と GFP 融合蛋白質を動物培養細胞 COS-1 とタバコ細胞に導入し膜局在化の顕微鏡観察を行った。パルミトイル化部位を置換した CPK6-C5S および、パルミトイル化に影響を与える可能性のあるミリスチン酸部位を置換した CPK6-G2A と野生株を比較したところ、パルミトイル化が細胞内局在性に必要であることが証明された。

Arabidopsis の膜電位依存性 K チャネル (GORK と SKOR) にある Gly2 のミリスチン酸付与アミノ酸モチーフを確認するために、両チャネルの N 末端領域 10 アミノ酸を TNF レポーター蛋白質に融合させて昆虫無細胞翻訳系による、放射性標識したミリスチン酸の取り込みの有無を調べた。しかし、脂質の修飾は検出されなかったことからこの Gly はミリスチン酸付与アミノ酸として機能しないことが分かった。

CBL5 の相互作用に関して yeast two hybrid 法により蛋白質間の相互作用を調べた。CIPK1, 11,

24 とは相互作用を示したが, CIPK 2, 3, 22, 23 とは相互作用しないことが明らかとなった. CBL5 と CIPK1, 11, 24 の相互作用を Bimolecular fluorescence complementation 法を用いて検討した. 両タンパク質をアフリカツメガエル卵母細胞やタバコ細胞 (*Nicotiana Benthamiana*) に発現させることにより細胞膜への移行またはオルガネラにとどまるかについて検討した. その結果, この3種類のすべての組み合わせで相互作用し, この複合体が細胞膜に移行することが明らかになった. 続いて CBL5 の非脂質修飾部位置換体 (CBL5-C3S, CBL5-C5S) および野生型を導入して脂質修飾の影響を検討した. CBL5-C3S は細胞膜への移行が阻害されたが, CBL5-C5S は比較的, 野生型に似ていた. パルミトイル化は Cys 3 を標的として生体膜への移行が行われることが分かった. 以上の結果は, パルミチン酸修飾が必須であることが明らかとなった. CPK5 と CIPK が SLAC1 をリン酸化して輸送活性が調節されることが予想された. 実際にリン酸化を示すために, リン酸化が生じると予測される SLAC1 の細胞内領域の His タグ融合タンパク質を大腸菌で発現させて Ni カラムで精製した. その後, <sup>32</sup>P-ATP を用いた in-gel アッセイによってリン酸化の検出を行ったところ, SLAC1 のリン酸化を検出した.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

- (1) Adams, E., Miyazaki, T., Saito, S., Uozumi, N. and Shin, R.  
Cesium inhibits plant growth primarily through reduction of potassium influx and accumulation in Arabidopsis  
Plant Cell Physiol. 60 (1), 63-76 (2019) 査読有  
doi.org/10.1093/pcp/pcy188
- (2) Saito, S. and Uozumi, N.  
Guard cell membrane anion transport systems and their regulatory components: An elaborate mechanism controlling stress-induced stomatal closure  
Plants 8 (1), 9 (2019) 査読有  
doi.10.3390/plants8010009
- (3) Saito, S., Hamamoto, S., Moriya, K., Matsuura, A., Sato, Y., Muto, J., Noguchi, H., Yamauchi, S., Tozawa, Y., Ueda, M., Hashimoto, K., Köster, P. Qiuyan, D., Held, K., Kudla, J., Utsumi, T. and Uozumi, N.  
*N*-myristoylation and *S*-acylation are common modifications of Ca<sup>2+</sup> regulated Arabidopsis kinases and are required for activation of the SLAC1 anion channel  
New Phytol. 218 (4), 1504-1521 (2018) 査読有  
doi: 10.1111/nph.15053
- (4) Hamamoto, S., Mori, Y., Yabe, I. and Uozumi, N.  
*In vitro* and *in vivo* characterization of modulation of the vacuolar cation channel TRPY1 from *Saccharomyces cerevisiae*  
FEBS J. 285, 1146-1161 (2018) 査読有  
doi: 10.1111/febs.14399
- (5) Kera, K., Nagayama, T., Nanatani, K., Saeki-Yamoto, C., Tominaga, A., Souma, S., Miura, N., Takeda, K., Kayamori, S., Ando, E., Higashi, K., Igarashi, K. and Uozumi, N.  
Reduction of spermidine content resulting from inactivation of two arginine decarboxylases increases biofilm formation in *Synechocystis* sp. PCC 6803  
J. Bacteriol. 200 (9) E00664-17 (2018) 査読有  
doi: 10.1128/JB.00664-17
- (6) Chang, D., Sakuma, S., Kera, K., Uozumi, N. and Arai F.  
Measurement of mechanical properties of single *Synechocystis* sp. strain PCC6803 cells in different osmotic concentrations using robot integrated microfluidic chip  
Lab. Chip 18, 1241-1249 (2018) 査読有  
doi: 10.1039/C7LC01245D
- (7) Toh, S., Inoue, S., Toda Y., Yuki, T., Suzuki, K., Hamamoto, S., Fukatsu, K., Aoki, S., Uchida, M., Asai, E., Uozumi, N., Ayato S. and Kinoshita, T.  
Identification and characterization of compounds that affect stomatal movements  
Plant Cell Physiol. 59, 1568-1580 (2018) 査読有  
doi.org/10.1093/pcp/pcy061
- (8) Oikawa, T., Ishimaru, Y., Munemasa, S., Takeuchi, Y., Washiyama, K. Hamamoto, S.,

Yoshikawa, N., Mutara, Y., Uozumi, N. and Ueda, M.  
Ion channels regulate nyctinastic leaf opening in *Samanea saman*  
Current Biology 28, 2230-2238 (2018) 査読有  
doi:10.1016/j.cub.2018.05.042

(9) Tanudjaja, Ellen, Hoshi, N., Su, Y-S., Hamamoto, S. and Uozumi, N.  
Kup-mediated Cs<sup>+</sup> uptake and Kdp-driven K<sup>+</sup> uptake coordinate to promote cell growth during excess Cs<sup>+</sup> conditions in *Escherichia coli*  
Sci. Rep. 7, 2122 (pp. 1-9), (2017) 査読有  
doi:10.1038/s41598-017-02164-7

(10) Tatsumi, D., Nanatani, K., Koike, Y., Kamagata, K., Takahashi, S., Konno, A., Furuta, T., Sakurai, M. and Uozumi, N.  
Probing native metal ion association sites through quenching of fluorophores in the nucleotide binding domains of the ABC transporter MsbA  
Biochem. J. 474 1993-2007 (2017) 査読有  
doi: 10.1042/BCJ20161051

(11) Saito, S., Hoshi, N., Zulkifli, L., Widyastutib, S, Goshima, S., Dreyer, I. and Uozumi, N.  
Identification of regions responsible for the function of the plant K<sup>+</sup> channels KAT1 and AKT2 in *Saccharomyces cerevisiae* and *Xenopus laevis* oocytes  
Channels, 11 (6), 510-516 (2017) 査読有  
doi: 10.1080/19336950.2017.1372066

(12) Mishima, E., Sato, Y., Nanatani, K., Hoshi, N., Lee, J-K., Schiller, N., von Heijne, G., Sakaguchi, M. and Uozumi, N.  
The topogenic function of S4 promotes membrane insertion of the voltage-sensor domain in the KvAP channel.  
Biochem. J. 473, 4361-4372 (2016) 査読有  
doi:10.1042/BCJ20160746

〔学会発表〕(計6件)

(1) 齋藤俊也, 浜本晋, 魚住信之  
Ca<sup>2+</sup>キナーゼの膜局在化に依存した植物のイオンチャネル活性制御  
第13回トランスポーター研究会年会  
2018年

(2) Shunya Saito, Shin Hamamoto, Nobuyuki Uozumi  
Dual lipidation on Ca<sup>2+</sup>-dependent kinases governs SLAC1-mediated stomatal closure  
International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018  
2018年

(3) 齋藤俊也, 浜本晋, 内海俊彦, 守屋康子, 佐藤陽子, 野口寛人, 戸澤譲, 山内清司, 橋本研志, Joerg Kudla, 魚住信之  
CPK6 キナーゼの膜局在化に依存した気孔閉鎖誘導チャネル SLAC1 の調節  
第12回トランスポーター研究会  
2017年

(4) Nobuyuki Uozumi  
Regulation of plant Cl channels and role of bacterial K/Cs transporters  
CSRS セミナー  
2017年

(5) 魚住信之  
生体金属の吸収, 排出, 循環を司る微生物と植物の膜タンパク質  
生体金属動態研究会  
2017年

(6) Saito, S., Hamamoto, S., Sato, Y., Uozumi, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Utsumi, T., Moriya, K., Tozawa, Y., and Yamauchi, S.  
Lipidation of Arabidopsis CPK6 promotes the plasma membrane targeting and the stomata

closure mediated by activation of SLAC1 in Arabidopsis guard cells  
International workshop on Plant Membrane Biology  
2016 年

6 . 研究組織