

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04450

研究課題名(和文) ACC合成酵素のリン酸化状態を通してエチレン生合成を調節するホスファターゼの解析

研究課題名(英文) Analysis on the phosphatase regulated ethylene biosynthesis by phosphorylated ACC synthase.

研究代表者

森 仁志 (Mori, Hitoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20220014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：エチレン生合成経路の鍵となるACC合成酵素は、プロテインキナーゼCDPKとMAPKのそれぞれによってリン酸化される。ACC合成酵素のリン酸化・脱リン酸化はACC合成酵素の細胞内の安定化には必要である。PP2A型のprotein phosphataseがACC合成酵素を脱リン酸化することを明らかにした。ACC合成酵素を認識するBサブユニットの同定を行い、トマトのB"タイプを候補として同定した。

研究成果の概要(英文)：ACC synthase, ACS, which is rate limiting key enzyme of plant hormone ethylene biosynthesis is phosphorylated by protein kinase CDPK and MAPK respectively. Phosphorylated ACS is stable and dephosphorylated one is unstable in cell. I identified B" type subunit of PP2A type protein phosphatase in tomato as candidate that recognizes ACS as target.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：エチレン生合成 ACC合成酵素 リン酸化 脱リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

エチレンはガス状の植物ホルモンであり、高等植物の一生を通じて様々な成長段階で重要な働きをしているが、とりわけ果実の成熟や野菜・花卉の老化など、園芸作物に与える影響は極めて大きく、エチレンの作用を人為的に制御することは、園芸分野において重要である。そのためエチレン生合成経路の1-アミノシクロプロパンカルボン酸(ACC)合成酵素やACC酸化酵素、さらにエチレン受容体のクローニングが盛んに行われ、エチレン生成を抑制させる、あるいは感受性を低下させた形質転換体の作出が試みられ、実用化に向けて進展しつつある。また、実用性の高いエチレン作用阻害剤1-MCP (1-methylcyclopropene)とエチレン受容体との結合様式の解析を通してより効率的なエチレン作用の抑制効果を目指した研究も行われている。

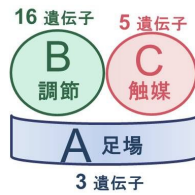
エチレン生合成経路においてACC合成酵素は律速段階を触媒する酵素であり、エチレン生合成経路の中で最も重要な酵素である。この酵素の調節は主に転写段階で制御されていると考えられてきたが、我々はACC合成酵素がリン酸化され翻訳後も制御されていることを初めて示し、そのリン酸化部位を明らかにした(Tatsuki and Mori, JBC, 2001)。我々はこのリン酸化がCa<sup>2+</sup>依存性タンパク質リン酸化酵素(CDPK)によることも明らかにしている(Kamiyoshihara et.al, Plant J, 2010)。この報告と前後して、エチレンを過剰生成するシロイヌナズナの突然変異体*eto2*, *eto3*の原因遺伝子がACC合成酵素そのものであることが報告された。つまり、*eto2*の変異部位はC末端のリン酸化部位周辺のア

ミノ配列が変異したものであり(Vogel, et al, PNAS, 1998)。 *eto3*の場合はリン酸化部位の近傍のバリン残基が、負の電荷を持ったアスパラギン酸残基に変異して恒常的にリン酸化状態のようになったものであった(Chae et al, Plant Cell, 2003)。さらに2004年にはシロイヌナズナのエチレン過剰生成突然変異体*eto1*の原因遺伝子が明らかになった(Wang et al. Nature, 2004)。ET01タンパク質はACC合成酵素と結合し、さらにプロテアソーム分解系のタンパク質因子CUL3 (E3リガーゼとして働く)と結びつける新奇アダプタータンパク質として働き、ACC合成酵素をプロテアソームによる分解に導く。その後、ACC合成酵素のリン酸化はCDPKだけではなく、C末端の異なるアミノ酸部位がMAP kinaseによってもリン酸化されることが明らかになった(Liu et al, Plant Cell, 2004)。これらの結果を踏まえ、我々はリン酸化によるACC合成酵素の翻訳後制御機構を提唱している。つまりACC合成酵素は翻訳後直ちにリン酸化され、リン酸化型が細胞内で働くが、役目が終わるとphosphataseにより脱リン酸化され、新奇タンパク質(EOL)が結合して分解が進む。この翻訳後制御機構モデルは、我々のみならず、最近のエチレン関連のレビューに関連の研究者が同様のモデルを提唱しており、エチレン研究関係者の注目度は高い。さらに、protein phosphataseを長く研究してきたDeLongのグループもこの課題に取り組んできた(Skottke et al, PLoS Genet, 2011)。エチレンの発生を制御するためにはACC合成酵素のリン酸化・脱リン酸化を調節するprotein phosphataseを同定することが重要である。

## 2. 研究の目的

ACC 合成酵素を脱リン酸化する protein phosphatase PP2A を同定する。

提唱している ACC 合成酵素の翻訳後制御機構モデルに従えば、ACC 合成酵素を脱リン酸化する protein phosphatase PP2A の働きが ACC 合成酵素の寿命を決定しており、この翻訳後制御機構の最も重要な要因である。protein phosphatase PP2A はサブユニット A, B, C から構成されている。サブユニット B が基質を認識すると考えられているので、16 種類の中から ACC 合成酵素を認識するサブユニット B を同定し、生化学的な特徴、発現様式を解析する。このことにより PP2A による ACC 合成酵素の翻訳後制御機構を明らかにする。

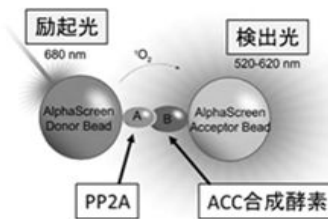


## 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナには PP2A と呼ばれる protein phosphatase (PPase) があり、これは 3 つのサブユニット A (3 種類), B (16 種類), C (5 種類) から構成されている。1 種類の A サブユニット RCN1 を欠損した突然変異体 *rcn1* にはエチレン生成量が多いと報告されている。そこで RCN1 を含む PP2A の中に ACC 合成酵素を脱リン酸化する PPase があると仮定できる。野生型と変異体 *rcn1* の黄化芽ばえ抽出液からそれぞれの PP2A 群を、アフィニティカラムクロマトグラフィーで精製して質量分析計で差を明らかにする。

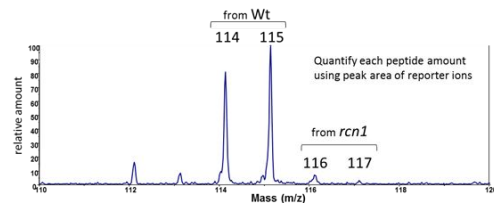
(2) シロイヌナズナから推定された PP2A 各サブユニットに類似するトマトの PP2A サブユニットを検索して cDNA を単離する。PP2A 各サブユニットおよび ACC 合成酵素の cDNA を鋳型にして in vitro transcription

/translation によってタンパク質を合成する。in vitro translation の時に PP2A のサブユニットには FLAG-tag を付け、ACC 合成酵素にはビオチンを付加する。これらを使い、2 分子の結合を検出できる AlphaScreen 法を用いて解析する。



## 4. 研究成果

(1) protein phosphatase (PPase) の PP2A は阻害剤マイクロシスチンをリガンドにしたアフィニティカラムクロマトグラフィーで精製した。A サブユニット RCN1 を欠損した変異体 *rcn1* から精製された PP2A は、野生型から精製された PP2A が持っているサブユニットを欠損している。そこで両者を精製後、iTRAQ 試薬で標識し、質量分析計によって解析した。その結果、変異体 *rcn1* には含まれないが、野生型に含まれるサブユニットとして B 型の B<sup>α</sup>, B<sup>β</sup>, B<sup>δ</sup> を同定した。



(2) 推定したシロイヌナズナサブユニット B<sup>α</sup>, B<sup>β</sup>, B<sup>δ</sup> と類似するトマトのサブユニットの cDNA を単離した。これらを鋳型にして小麦胚芽無細胞タンパク質合成系による in vitro transcription/translation を用いて各サブユニットを合成した。in vitro translation の時に PP2A のサブユニットには

FLAG-tag を付け、ACC 合成酵素 SIACS2 と SIACS4 にはビオチンを付加した。これらを使い、2 分子の結合を検出できる AlphaScreen 法を用いて解析した。しかし、AlphaScreen 法でタンパク質間相互作用を明らかにすることができなかった。基本的に AlphaScreen 法でタンパク質間相互作用を明らかにするために必要なタンパク質量が少ないのか、条件が適正でないのか課題は残る。もう一つの課題である「ACC 合成酵素をリン酸化状態で B サブユニットと反応させる」点も解決できなかった。ACC 合成酵素をリン酸化酵素 CDPK でリン酸化する、あるいは ACC 合成酵素のリン酸化されるセリン残基をアスパラギン酸残基に変換して擬リン酸化状態にして、タンパク質間相互作用を解析するという戦略が考えられるが、まだ成果が出ていない。候補として想定した B サブユニットが適切でない可能性も残る。これまで、in vitro での解析を試みてきたが、細胞内での反応を考慮すると、原点に戻って細胞内で ACC 合成酵素と相互作用している PP2A を同定する戦略を今後の解析として考えつつある。

## 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 8 件)

1. Yamauchi, T., Yoshioka, M., Fukazawa, A., Mori, H., Nishizawa, N., Tsutsumi, N., Yoshioka, H. and Nakazono, M. (2017) An NADPH Oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. *Plant Cell*, 29, 775-790. 査読有

2. Fukushima, K., Fang, X., Alvarez-Ponce, D., Cai, H., Carretero-Paulet, L., Chen, C., Chang, T.-H., Farr, K. M., Fujita, T., Hiwatashi, Y., Hoshi, Y., Imai, T., Kasahara, M., Librado, P., Mao, L., Mori, H., Nishiyama, T., Nozawa, M., Pálfalvi, G., Pollard, S.T., Rozas, J., Sánchez-Gracia, A., Sankoff, D., Shibata, T. F., Shigenobu, S., Sumikawa, N., Uzawa, T., Xie, M., Zheng, C., Pollock, D. D., Albert, V.A., Li, S. and Hasebe, M. (2017) Genome of pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nat. Ecol. Evol.*, 1, 0059. 査読有

3. Aohara, T., Mizuno, H., Kiyomichi, D., Abe, Y., Matsuki, K., Sagawa, K., Mori, H., Iwai, H., Furukawa, J. and Satoh, S. (2016) Identification of a xylem sap germin-like protein and its expression under short-day and non-freezing low-temperature conditions in poplar root. *Plant Biotech.*, 33, 123-127. 査読有

4. Bessho-Uehara, K., Wang, D. R., Furuta, T., Minami, A., Nagai, K., Gamuyao, R., Asano, K., Angeles-Shim, R. B., Shimizu, Y., Ayano, M., Komeda, N., Doi, K., Miura, K., Toda, Y., Kinoshita, T., Okuda, S., Higashiyama, T., Nomoto, M., Tada, Y., Shinohara, H., Matsubayashi, Y., Greenberg, A., Wu, J. Z., Yasui, H., Yoshimura, A., Mori, H., McCouch, S. R. and Ashikari, M. (2016) Loss of function at RAE2, a previously unidentified EPFL, is required for awnlessness in cultivated Asian rice. *ProNAS*, 113, 8969-8974. 査読有

5. Mizukami, G. A., Inatsugi, R., Jiao, J., Kotake, T., Kuwata, K., Ootani, K., Okuda, S., Sankaranarayanan, S., Sato, Y., Maruyama, D., Iwai, H., Garénaux, E., Sato, C., Kitajima, K., Tsumuraya, Y., Mori, H.,

Yamaguchi, J., Itami, K., Sasaki, N. and Higashiyama, T. (2016) The AMOR arabinogalactan sugar chain induces pollen-tube competency to respond to ovular guidance. *Curr. Biol.*, 26, 1091-1097. 査読有

6. Sun, Y., Feng, Z., Tomura, T., Suzuki, A., Miyano, S., Tsuge, T., Mori, H., Suh, J-W., Iizuka, T., Fudou, R. and Ojika, M. (2016) Heterologous production of the marine myxobacterial antibiotic haliangicin and its unnatural analogues generated by engineering of the biochemical pathway. *Scientific Reports*, 6, 22091. 査読有

7. Yamauchi, T., Shiono, K., Nagano, M., Fukazawa, A., Ando, M., Takamura, I., Mori, H., Nishizawa, N.K., Kawai-Yamada, M., Tsutsumi, N., Kato, K. and Nakazono, M. (2015) Ethylene biosynthesis is promoted by very-long-chain fatty acids during lysigenous aerenchyma formation in rice roots. *Plant Physiol.*, 169, 180-193. 査読有

8. Song, X. J., Kuroha, T., Ayano, M., Furuta, T., Nagoi, K., Komeda, N., Segami, S., Miura, K., Ogawa, D., Kamura, T., Suzuki, T., Higashiyama, T., Yamasaki, M., Mori, H., Inukai, Y., Wu, J. Z., Kitano, H., Sakakibara, H., Jacobsen, SE. and Ashikari, M. (2015) Rare allele of a previously unidentified histone H4 acetyltransferase enhances grain weight, yield, and plant biomass in rice. *ProNAS*, 112, 76-81.

査読有

〔学会発表〕(計3件)

(1) 森仁志、村上恭子：ランンキュラス塊根の吸水発芽時に発現する  $\alpha$ -galactosidase タンパク質の発現解析。平成 30 年度春季大会、平成 30 年 3 月、奈良

(2) 服部桃子、佐藤亜沙子、ロイシャ シュ

テファン、森仁志、白武勝裕、前島正義、河内美樹：モモ葉のホウ素再転流機構解明。第 58 回日本植物生理学会年会、平成 29 年 3 月、鹿児島

(3) 大空岳、安藤佑以、桑田啓子、森仁志、花田耕介、柘植尚志：感染植物の導管液プロテオーム解析によるメロンつる割病菌の病原性関連遺伝子の同定。平成 28 年度日本植物病理学会大会、平成 28 年 3 月、岡山

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

森 仁志 (MORI HITOSHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：20220014