

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02196

研究課題名（和文）ACC合成酵素のリン酸化制御によるエチレン生合成調節機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of ethylene biosynthesis regulated by ACC synthase phosphorylation

研究代表者

森 仁志（Mori, Hiroshi）

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） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：エチレン生合成の調節はACC合成酵素のリン酸化状態による翻訳後制御機構である。Protein Phosphatase PP2AはサブユニットA, B, Cから構成されており、Bサブユニットが基質となるリン酸化タンパク質を認識する。研究成果としてシロイヌナズナの突然変異体rcn1（Aサブユニットの欠損体）を用いて、候補となるBサブユニットを同定し、ACC合成酵素を認識するかどうかを検証した。さらにシロイヌナズナと類似性のあるトマトPP2AのBサブユニットの候補となるBサブユニットはいくつか同定したが、生化学的な解析により明らかにすることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸化・脱リン酸化によって酵素活性が活性化・不活性化される機構は、よく知られているが、ACC合成酵素のリン酸化は酵素活性に影響せず、酵素の分解に関与し細胞内の酵素量を制御するという新たな分子機構である。本申請課題で扱ったACC合成酵素のリン酸化を介した制御機構は、これまでに示されたプロテアソーム系とは、標的タンパク質を認識する機構が異なる新しいタンパク質分解系の制御機構である。このような新しい機構が明らかにされることの学術的な意義は高く、生命科学の発展に大きく貢献できると期待できる。

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. Protein phosphatase, PP2A, consists of subunit A, B, C and B subunit recognizes substrate of specific phosphorylated protein. I tried to identify B" type subunit of PP2A type protein phosphatase in tomato as candidate that recognizes ACS as target. Some candidates of 16 kinds B subunits are selected, but cannot identify B" type subunit finally.

研究分野：植物生化学

キーワード：ACC合成酵素 タンパク質リン酸化 タンパク質脱リン酸化

## 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 (Tatsuki and Mori, JBC, 2001) さらにこのリン酸化が  $Ca^{2+}$  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、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。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。シロイヌナズナの B サブユニットを参考にしてトマトから cDNA を単離したが、トマト果実から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直す必要がある。候補として選抜した B サブユニットが、相手となる ACC 合成酵素 SIACS2 と SIACS4 と同時期に発現しているかが問題となる。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。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 を同定するために、組織内で ACC 合成酵素と protein phosphatase を共有結合させる戦略を今後の解析として考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kikuchi Shingo, Asakura Yukari, Imai Midori, Nakahira Yoichi, Kotani Yoshiko, Hashiguchi Yasuyuki, Nakai Yumi, Takafuji Kazuaki, Bedard Jocelyn, Hirabayashi-Ishioka Yoshino, Mori Hitoshi, Shiina Takashi, Nakai Masato	4. 巻 30
2. 論文標題 A Ycf2-FtsHi heteromeric AAA-ATPase complex is required for chloroplast protein import	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2677 2703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.18.00357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Yuri, Ohtsu Mina, Shibata Yusuke, Tanaka Aiko, Camagna Maurizio, Ojika Makoto, Mori Hitoshi, Sato Ikuo, Chiba Sotaro, Kawakita Kazuhito, Takemoto Daigo	4. 巻 10
2. 論文標題 Nicotiana benthamiana RanBP1-1 Is Involved in the Induction of Disease Resistance via Regulation of Nuclear-Cytoplasmic Transport of Small GTPase Ran	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bessho-Uehara Manabu, Yamamoto Naoyuki, Shigenobu Shuji, Mori Hitoshi, Kuwata Keiko, Oba Yuichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Kleptoprotein bioluminescence: Parapriacanthus fish obtain luciferase from ostracod prey	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax4942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax4942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 森仁志
2. 発表標題 エンドウの頂芽優勢に関するタンパク質量の検出法
3. 学会等名 園芸学会 令和2年度春季大会（開催中止）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森仁志
2. 発表標題 エンドウの頂芽優勢に関するタンパク質量の検出法
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（開催中止）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森仁志
2. 発表標題 質量分析計を用いたタンパク質量の検出法
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森仁志
2. 発表標題 質量分析計を用いたタンパク質量の検出法
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. MORI
2. 発表標題 Identification and quantitative measurement of proteins of biosynthesis and signaling plant hormones concerning apical dominance using MRM assays by mass spectrometry
3. 学会等名 Auxins and Cytokinins in Plant Development International Symposium 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. MORI
2. 発表標題 Identification and quantitative measurement of proteins of ethylene biosynthesis using MRM assays by mass spectrometry
3. 学会等名 The XI International Symposium on the Plant Hormone Ethylene (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. MORI
2. 発表標題 Identification and quantitative measurement of proteins of biosynthesis and signaling plant hormones concerning apical dominance using MRM assays by mass spectrometry
3. 学会等名 6th Plant Dormancy Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森仁志
2. 発表標題 質量分析計によるエチレン生合成に関するタンパク質の定量法
3. 学会等名 植物化学調節学会 第53回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森仁志
2. 発表標題 トマト果実のエチレン生合成・シグナル伝達に関するタンパク質量の検出法
3. 学会等名 園芸学会 平成30年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 仁志、村上恭子
2. 発表標題 ランキユラス塊根の吸水発芽時に発現する -galactosidaseタンパク質の発現解析
3. 学会等名 園芸学会 平成30年度春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関