

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19370020
 研究課題名 (和文) 気孔孔辺細胞におけるタイプ 1 プロテインフォスファターゼの機能に関する研究

研究課題名 (英文) Functional analyses of the type 1 protein phosphatase in guard cells

研究代表者

島崎 研一郎 (Shimazaki Ken-ichiro)
 九州大学・大学院理学研究院・教授
 研究者番号：00124347

研究成果の概要

植物におけるタイプ 1 プロテインフォスファターゼの役割の研究を気孔孔辺細胞に着目して行い以下の成果を得た。まず、この酵素は触媒サブユニットと調節サブユニットがヘテロダイマーを形成して機能を発揮することから、この調節サブユニットの探索から仕事を開始した。その結果、2つの興味ある調節サブユニットの候補が得られたので詳細に解析した。1つはインヒビター 3 である。まず、機能解析を行うためソラマメのインヒビター 3 のオーソログを探索した。そのシロイヌナズナのオーソログを用いて試験管内での結合実験を行うとインヒビター 3 がタイプ 1 プロテインフォスファターゼの触媒サブユニットとのみ結合し、良く似た配列を持つタイプ 2A プロテインフォスファターゼとは結合せず特異的結合であった。インヒビター 3 は触媒サブユニットの脱リン酸化活性を 10nM の濃度で完全に阻害した。さらに、インヒビター 3 の結合部位に相当するアミノ酸を置換するとこの阻害は消失した。インヒビター 3 と触媒サブユニットが細胞内で結合している事を、それぞれのタンパク質の抗体によって免疫沈降により、証明した。インヒビター 3 と触媒サブユニットを孔辺細胞に同時に発現させるとインヒビター 3 存在時には触媒サブユニットは核と細胞質に存在したが、両者の結合を阻害すると触媒サブユニットは核には存在しなくなった。以上のことから、インヒビター 3 はタイプ 1 プロテインフォスファターゼの調節サブユニットと結論された。そこで、インヒビター 3 の孔辺細胞における機能解析を行うべく、このインヒビター 3 の遺伝子に T-DNA が挿入されたタグラインを取得し、そのホモラインの採取を試みたが、すべて致死になった。その原因を追及すると、胚発生の段階で成長がストップし、発生の初期段階でインヒビター 3 がフォスファターゼ活性を制御し、発生をコントロールするものと推定された。また、このインヒビター 3 の RNAi ラインも同様の表現型を示した。以上から、インヒビター 3 がタイプ 1 プロテインフォスファターゼの調節サブユニットとして機能していることが示された。これは植物細胞では初めての例であるが、気孔孔辺細胞における機能解析は不首尾であった。現在、もう一つの調節サブユニットの解析が進行中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理、分子

キーワード：環境応答

1. 研究開始当初の背景

気孔の光情報伝達系にタイプ1プロテインフォスファターゼが関与する事を発見したが、その証明には、この酵素の触媒サブユニットを不活性化させたものを、一過的かつ過剰に孔辺細胞に発現させるなどの特殊な技術を要した。この酵素は、触媒サブユニットと調節サブユニットがヘテロダイマーを形成して機能を発揮する。シロイヌナズナの場合、非常に相同性の高い9つの触媒サブユニットとそれより遥かに多い数の調節サブユニット（ほ乳動物では少なくとも45個）の存在が予測され、その組み合わせによって基質特異性、活性制御、細胞内局在などが決められると考えられている。従って、特異性が高く、機能に直接結びつくことの多い調節サブユニットに注目して研究する方が、より有効な研究方法となる。しかし、当然のことながら植物細胞では調節サブユニットが同定された例は一つもない。そこで、予備的に、ソラマメのタイプ1プロテインフォスファターゼの触媒サブユニットをベイトにしてソラマメ気孔孔辺細胞の cDNA ライブラリーを対象に酵母 two-hybrid スクリーニングを行った。その結果、短期間のうちに調節サブユニットと考えられる遺伝子7種類が取得された。これらはいずれも触媒サブユニットに対する結合能を持つ以外、互いに共通性がなく、孔辺細胞においてそれぞれ異なる別の働きをもっているものと推定された。得られた遺伝子7種類をシロイヌナズナを含むゲノム情報に照らし合わせると、動物細胞と酵母でインヒビター3と名付けられタイプ1プロテインフォスファターゼに特異的阻害作用を持つが生理的役割の未知な蛋白質、および、植物細胞でアブシジン酸に誘導される事が知られるのみで機能未知な蛋白質 (ABA-responsive protein) が含まれていた。そこで、本研究では手がかりのある2種類の調節因子を出発点としてタイプ1プロテインフォスファターゼの植物細胞における機能解明のための研究を進めることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的はタイプ1プロテインフォスファターゼの孔辺細胞における役割を解明することである。動・植物細胞の多くの代謝、情報伝達等の反応系ではプロテインキナーゼとプロテインフォスファターゼが協調し

て反応スイッチの”ON/OFF”を行っていることは周知の事実である。タイプ1プロテインフォスファターゼ（調節サブユニットと触媒サブユニットとのダイマーになりホロ酵素として機能する）は動物細胞や酵母において、細胞周期、筋肉の収縮、神経伝達、mRNA プロセッシング、タンパク質合成などの反応系で働いている重要な酵素であることが明らかになっている。私たちは、気孔孔辺細胞の青色光情報伝達系を研究する過程で、青色光受容体フォトトロピンとその標的である細胞膜 H⁺-ATPase の情報伝達をタイプ1プロテインフォスファターゼが仲介している事を見いだした。しかし、驚いたことに、この酵素が植物細胞で機能している事が証明された例はなく、上記の報告が最初であった。これまで植物細胞で研究が進まなかった理由は、機能を解明する適切な実験系がない事、動物や酵母に比べてこの酵素の触媒サブユニットのアイソフォームが多数であること（ほ乳動物で3、酵母で2、シロイヌナズナでは9）、その触媒サブユニットが極端に類似しており、機能解明に必要な多重変異体の作出が困難であること、などであろう。本申請では、このタイプ1プロテインフォスファターゼに焦点を当てて、特に、調節サブユニットに着目して研究を行う。

3. 研究の方法

まず、シロイヌナズナのゲノム情報に基づいてタイプ1プロテインフォスファターゼの触媒サブユニット9種類の組織特異的な発現を調べた。これには RT-PCR を用いた。その中から、特に、孔辺細胞に多く発現しているものを選択し、これを酵母 two-hybrid スクリーニングのベイトに用いる。しかし、いずれの触媒サブユニットも発現していたので比較的発現量の多いものを用いた。スクリーニングの対象として、シロイヌナズナ孔辺細胞の cDNA ライブラリーを用いる。多数の調節タンパク質の存在が予測されるので、取りこぼしがないように徹底的に two-hybrid スクリーニングを行った。得られたものを、ソラマメの孔辺細胞 cDNA ライブラリーからすでに得られたものと比較した。

得られた調節タンパク質の推定されるアミノ酸配列から、触媒サブユニットとの結合に必須とされる RVxF モチーフの存在を調べた。この部位にポイントミューテーションを

導入し、再度、両者の結合を調べた。この実験によって結合しなくなれば、得られた相互作用タンパク質が調節サブユニットである強い証拠になる。

GFP と調節サブユニットの融合蛋白質をパーティクルガンによって孔辺細胞に一過的に発現させ、細胞内局在を調べた。これらの中で、生理的反応に関連が予測されるものとそれ以外に選別した。

細胞質に存在した調節サブユニットの T-DNA 挿入株を取得し、表現形の解析を行った。しかし、残念ながらインヒビター 3 に関してホモラインはすべて致死になった。T-DNA ラインが取得できなかったものについては RNAi ラインを作出し、同様に機能解析を行った。

得られた変異株の表現形の解析を継続する。表現形の現れたものには、相補実験を行った。実際にインヒビター 3 によって機能が相補された。同時に、RVxF モチーフを破壊した調節サブユニットの相補実験を行うことによって、表現形が触媒サブユニットを介した PP1 活性を必須とするのか、調節サブユニット単独の影響か区別した。

調節サブユニットと触媒サブユニットとが細胞内で結合していることを確認した。この際、それぞれ発光の異なる蛍光物質でラベルしておき、ソラマメの孔辺細胞に一過的に発現させることにより細胞内の結合を調べた。調節サブユニットのタイプ 1 プロテインフォスファターゼ触媒サブユニット活性への影響を調べる。組み換え触媒サブユニットに組み換え調節サブユニット蛋白質を加え、その活性を測定した。

4. 研究成果

得られた成果を箇条書きにした。

1) タイプ 1 プロテインフォスファターゼの触媒サブユニットと相互作用する複数のタンパク質を酵母 Two-hybrid system により単離した。インヒビター 3 はタイプ 1 プロテインフォスファターゼの複数のイソ酵素のすべてに対して結合能を示したが、良く似たアミノ酸配列を有するタイプ 2A フォスファターゼの触媒サブユニットとはまったく結合しなかった。この事は、組み換えタンパク質を用いた試験管内の実験からも確かめられた。

2) 気孔の青色光情報伝達系の関与の考えられるインヒビター 3 に注目してその機能解析を行った。インヒビター 3 は触媒サブユニットに対する典型的な結合モチーフをもっており、また、触媒活性を nM オーダで阻害した。この阻害は結合モチーフを破壊すると消失した。また、インヒビター 3 をリン酸化すると阻害活性が低下した。

4) インヒビター 3 と触媒サブユニットの細

胞内での結合を確認した。

5) 孔辺細胞に一過的に発現させ、インヒビター 3 の局在部位を核と細胞質であることを示した。触媒サブユニットは主に細胞質に発現したが、インヒビター 3 と同時に発現させると核にも存在するようになった。このとき、インヒビター 3 の結合モチーフを破壊しておく、触媒サブユニット核への局在が消失した。この事実は、インヒビター 3 が触媒サブユニットを核へリクルートし、結合して存在する事を示している。

6) シロイヌナズナのインヒビター 3 破壊株を取得し機能解析を行った。しかし、ホモラインはすべて致死になり、胚発生の段階で発生が停止することが分かった。この表現型はインヒビター 3 を導入する事により回復し、その際、インヒビター 3 の結合モチーフを破壊しておく、その回復が妨げられた。

以上の結果はインヒビター 3 がタイプ 1 プロテインフォスファターゼの調節サブユニットとして機能し、正常な胚発生を維持するのに機能していると考えられた。この成果は植物におけるタイプ 1 プロテインフォスファターゼの働きを初めて示したものである。

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 13 件)

- ① Shin-ichiro Inoue, Toshinori Kinoshita, Atsushi Takemiya, Michio Doi, Ken-ichiro Shimazaki, Molecular Plant, 「Leaf Positioning of Arabidopsis in Response to Blue Light」, Vol. 1, P. 15-26 (2008), 有
- ② Masakazu Inamura, Takashi Yuasa, Tomoko Takahashi, Nagisa Nakamura, Nang Myin Phyu Sin Htwe, Shao-Hui Zheng, Ken-ichiro Shimazaki, Mari Iwaya-Inoue Plant Biotechnology, 「Isolation and characterization of a cDNA coding cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.) calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, VuCIPK1」, Vol. 25, P. 437-445 (2008), 有
- ③ Shin-ichiro Inoue, Toshinori Kinoshita, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Michio Doi, Ken-ichiro Shimazaki PNAS, 「Blue light-induced autophosphorylation

- of phototropin is a primary step for signaling」, Vol. 105, P. 5626-5631 (2008), 有
- ④ Michio Doi, Ken-ichiro Shimazaki Plant Physiology, 「The Stomata of the Fern *Adiantum capillus-veneris* Do Not Respond to CO₂ in the Dark and Open by Photosynthesis in Guard Cells^[OA]」, Vol. 147, P. 922-930 (2008), 有
- ⑤ Masahiro Nishikawa, Kenta Hosokawa, Mai Ishiguro, Hiroki Minamioka, Kentaro Tamura, Ikuko Hara-Nishimura, Yohei Takahashi, Ken-ichiro Shimazaki, Hiroyuki Imai Plant Cell Physiol., 「Degradation of Sphingoid Long-Chain Base 1-Phosphates (LCB-1Ps): Functional Characterization and Expression of AtDPL1 Encoding LCB-1P Lyase Involved in the Dehydration Stress Response in Arabidopsis.」, Vol. 49, P. 1758-1763 (2008), 有
- ⑥ Yusuke Aihara, Ryohei Tabata, Tomomi Suzuki, Ken-ichiro Shimazaki, Akira Nagatani The Plant Journal, 「Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2」, Vol. 56, P. 364-375 (2008), 有
- ⑦ Xiao Zhang, Atsushi Takemiva, Toshinori Kinoshita, Ken-ichiro Shimazaki Plant Cell Physiol., 「Nitric oxide inhibits blue light-specific stomatal opening via abscisic acid signaling pathways in *Vicia* guard cells.」, Vol. 48, P. 715-723 (2007), 有
- ⑧ Kong, S.-G., Kinoshita, T., Shimazaki, K., Mochizuki, N., Suzuki, T., Nagatani, A. Plant J., 「The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses.」, Vol. 51, P. 862-873 (2007), 有
- ⑨ Yohei Takahashi, Toshinori Kinoshita, Ken-ichiro Shimazaki Plant Cell Physiol., 「Protein phosphorylation and binding of a 14-3-3 protein in *Vicia* guard cells in response to ABA.」, Vol. 48, P. 1182-1191 (2007), 有
- ⑩ 武宮淳史, 井上晋一郎, 島崎研一郎 蛋白質・核酸・酵素 増刊号: 植物における環境と生物ストレスに対する応答、「気孔の青色光応答」 Vol. 52, P. 601-605 (2007) 無
- ⑪ Akiko Harada, Ken-ichiro Shimazaki Photochemistry and Photobiology, 「Phototropins and Blue Light-dependent Calcium Signaling in Higher Plants.」 Vol. 83, P. 102-111 (2007) 有
- ⑫ Ken-ichiro Shimazaki, Michio Doi, Sarah M. Assmann, Toshinori Kinoshita Annu. Rev. Plant Biol., 「Light regulation of stomatal movement.」 Vol. 58, P. 219-247 (2007) 有
- ⑬ 武宮淳史, 高橋洋平, 島崎研一郎 低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], 「植物葉の温度を下げる青色光による気孔開口」 Vol. 53, P. 1-5 (2007) 無

[学会発表] (計 9 件)

- ① 島崎研一郎, フォトトロピンによる気孔開口制御の分子機構、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋大学東山キャンパス
- ② 武宮淳史, ホスファチジン酸は青色光による気孔開口を阻害する、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋大学東山キャンパス
- ③ 井上晋一郎, シロイヌナズナ phototropin2 におけるキナーゼアクティベーションループのリン酸化部位の機能解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋大学東山キャンパス
- ④ 蛭子雄太, シロイヌナズナ孔辺細胞におけるアブシジン酸情報伝達の生化学的解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋大学東山キャンパス
- ⑤ 井上晋一郎, 青色光受容体フォトトロピンの自己リン酸化部位の同定とその機能解析、第 49 回日本植物生理学会年会、2008 年 3 月 20-22 日、札幌コンベンションセンター
- ⑥ 原田明子, シロイヌナズナ孔辺細胞における青色光による細胞内カルシウム濃度変化、第 49 回日本植物生理学会年会、2008 年 3 月 20-22 日、札幌コンベンションセンター
- ⑦ 木下俊則, 青色光受容体フォトトロピン 2 重変異体からの気孔開度変異体の単離、第 49 回日本植物生理学会年会、2008 年 3 月 20-22 日、札幌コンベンションセンター

- ⑧ 土井道生、アジアンタム気孔の二酸化炭素不感受性と孔辺細胞光合成に依存した気孔開口、第 49 回日本植物生理学会年会、2008 年 3 月 20-22 日、札幌コンベンションセンター
- ⑨ 田畑亮平、青色光受容体フォトトロピンのシグナル伝達に関連した気孔開度変異体の単離、第 49 回日本植物生理学会年会、2008 年 3 月 20-22 日、札幌コンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

http://cellbio.biology.kyushu-u.ac.jp/s_himazaki/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 研一郎 (Shimazaki Ken-ichiro)
九州大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号 : 00124347

(2) 連携研究者

武宮 淳史 (Takemiya Atsushi)
九州大学・大学院理学研究院・学術研究員
研究者番号 : 80448406