

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19770035  
 研究課題名 (和文) シロイヌナズナの活性酸素種生成酵素 *Atrboh* の活性制御に関する研究  
 研究課題名 (英文) Analysis of activation mechanism of ROS-producing enzyme, *Arabidopsis thaliana rboh*  
 研究代表者  
 賀屋 秀隆 (Kaya Hidetaka)  
 東京理科大学・理工学部・助教  
 研究者番号：80398825

## 研究成果の概要：

活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) は、シグナル伝達物質として、生体防御応答・形態形成において機能する重要な物質である。本研究では、この ROS を生成する酵素シロイヌナズナ *Atrboh* の活性制御機構に関する研究をおこなった。その結果、*AtrbohD*、*AtrbohC* は  $Ca^{2+}$  とタンパク質リン酸化により活性化することを明らかにした。これらの成果は、将来的に病害に強い作物の作出に繋がると考えている。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

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：植物分子，生体防御，シロイヌナズナ，活性酸素種，シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

$O_2^-$ 、 $OH$ 、 $H_2O_2$  等の活性酸素種 (ROS) は、植物の生体防御応答や形態形成においてシグナル伝達物質として機能する重要な物質である。

植物での、ROS 生成には細胞膜に局在する

ヒト NOX2/gp91<sup>phox</sup> (NADPH oxidase /glycoprotein 91 phagocyte oxidase) の植物ホモログである *rboh* (*respiratory burst oxidase homologue*) 遺伝子が関与している。シロイヌナズナには 10 個の *Atrboh* 遺伝子があり、*atrboh* 突然変異体では ROS 生成が

抑制される。分子遺伝学的解析から *AtrbohD*, *AtrbohF* 遺伝子は生体防御応答に関与し, *AtrbohC* 遺伝子は根毛形成に関与することが報告されている。この様に, 突然変異体を用いた分子遺伝学的解析は盛んであるが, *Atrboh* が ROS 生成の酵素本体として機能しているか否かに関する生化学的解析の報告はなく, 活性制御機構についても不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

これまでに, ヒト培養細胞の HEK293T (Human Embryonic Kidney 293 Transformed) にシロイヌナズナの *Atrboh* 遺伝子を異種発現させることで, *Atrboh* 由来の ROS 生成量を高い時間分解能でかつ定量的に測定できる実験系を確立し, *AtrbohD* が ROS 生成能を持つことを明らかにした。そこで, *AtrbohD* の活性化制御機構の解明を目的として, 本研究では下記の点について解析した。

(1) *AtrbohD* の N 末端にある putative EF-hand の  $\text{Ca}^{2+}$  結合, 及び  $\text{Ca}^{2+}$  結合による構造変化と ROS 生成活性量の相関

(2) *AtrbohD* の活性化における分子内相互作用についての検討

(3) *AtrbohD* の蛋白質リン酸化と  $\text{Ca}^{2+}$  結合による ROS 生成の相乗的活性化機構についての検討

(4) *AtrbohD* の ROS 生成活性制御における Rac/ROP (small GTPase) の関与についての検討

## 3. 研究の方法

(1) EF-hand 領域を含むポリペプチドの  $\text{Ca}^{2+}$  結合能と二次構造解析

*AtrbohD* の EF-hand 様モチーフを含む 250–332 番目のアミノ酸領域を pET26b(+) にクローニングし, pET-WT-EF を構築した。同時に, EF-hand 様配列にアミノ酸置換変異を導入したものも構築した。これらを, *E. coli* Rosetta2 に形質導入し, 目的領域を発現させ, ポリペプチドとして精製した。精製したポリペプチドを用いて, 蛍光スペクトル解析・円二色性スペクトル解析により  $\text{Ca}^{2+}$  結合能と二次構造変化を解析した。

(2) 異種発現系を用いた *AtrbohD* の活性化制御機構の解析

シロイヌナズナ *AtrbohD* を形質導入した HEK293T 細胞を用いて, ionomycin あるいは calyculin A 誘導性の ROS 生成を測定した。測定には, ルミノール化学発光法を用いた。

(3) 蛋白質間相互作用解析

BiFC 法 (bi-molecular fluorescent complementation), FRET 法 (fluorescence resonance energy transfer), 酵母 two-hybrid 法, pull down 法により, *AtrbohD* の N 末端領域, C 末端領域間の相互作用を調べた。

(4) 共発現解析

異種発現系を用いた *AtrbohD* と Rac/ROP の共発現実験をおこない, Rac/ROP による *AtrbohD* の活性への関与について, ROS 生成の観点から調べた。

## 4. 研究成果

(1) *AtrbohD* の N 末端にある putative EF-hand モチーフの  $\text{Ca}^{2+}$  結合定数, 及び  $\text{Ca}^{2+}$  結合の伴う構造変化と ROS 生成量の相関

EF-hand モチーフを含むポリペプチド

には  $\text{Ca}^{2+}$  が結合すること、その結合定数 ( $p\text{Ca}_{50}$ ) は  $4.0 \pm 0.03$  であること、さらに、AtrbohD の活性化には  $\text{Ca}^{2+}$  結合に伴う EF-hand 領域の構造変化が重要であることを示唆した。

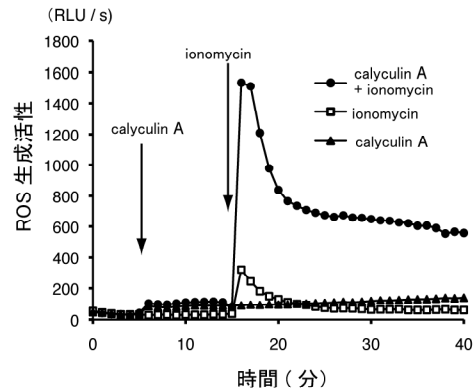
## (2) AtrbohD の活性化における分子内相互作用についての検討

AtrbohD の活性化時に、活性制御領域であると考えられる N 末端領域と触媒領域であると考えられる C 末端領域が相互作用する可能性を検証した。まず、AtrbohD の N 末端、C 末端に蛍光タグを融合したキメラ蛋白質を HEK293T 細胞で異種発現させ、BiFC 法、FRET 法により  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な相互作用について調べた。その結果、両者の相互作用は検出できなかった。これと併行して、酵母 two-hybrid 法、pull-down 法によっても調べたが、相互作用は検出できなかった。これらのことから、AtrbohD の活性化時に N 末端領域と C 末端領域の相互作用はおこっていないか、あるいは、相互作用が弱いため検出できなかった可能性が考えられた。なぜなら、AtrbohF について、酵母 two-hybrid 法により検証したところ、N 末端領域と C 末端領域、N 末端領域同士が相互作用することを明らかにした。これらの結果は、AtrbohF では、活性化時に N 末端領域と C 末端領域とが相互作用することを示唆するものである。また、N 末端領域を介して二量体で機能することも示唆した。今後は、AtrbohD については、技術的な改善をおこない解析する必要がある。

## (3) AtrbohD の蛋白質リン酸化と $\text{Ca}^{2+}$ 結合による ROS 生成の相乗的活性化機構についての検討

AtrbohD は  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアである ionomycin によって活性化される。また、蛋

白質リン酸化を誘導する calyculin A によっても活性化される。そこで、 $\text{Ca}^{2+}$  と蛋白質リン酸化による両者の活性化について調べたところ、AtrbohD では  $\text{Ca}^{2+}$  と蛋白質リン酸化により相乗的に活性化されることを明らかにした (下記図)。



$\text{Ca}^{2+}$  と蛋白質リン酸化による相乗的な活性化は、AtrbohC/RHD2 についても見られることを明らかにした (Takeda *et al.*, Science, 2008)。

## (4) AtrbohD の ROS 生成活性制御における Rac/ROP (small GTPase) の関与についての検討

HEK293T 細胞を用いた異種発現系における共発現解析をおこなった。これまでのところ、AtrbohD の活性における Rac の寄与は観察できなかった。原因として、技術的な問題があることが分かりつつある。実験条件の最適化、細胞株を変更することでこれらの問題が解決すると考えている。

## 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 2 件)

- ① Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y.,

Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., Nara, M., Suzuki, K., Tanokura, M., Kuchitsu, K.. Synergistic activation of Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by  $\text{Ca}^{2+}$  and phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry** (2008) 283, 8885-8892. 査読有り

- ② Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., Dolan, L.. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. **Science** (2008) 319, 1241-1244. 査読有り

[学会発表] (計7件)

- ① 賀屋秀隆・異種発現系を用いたシロイヌナズナ活性酸素種産生酵素 Atrboh の網羅的機能解析・第50回日本植物生理学会年会・2009年3月21日～3月24日・名古屋大学
- ② 路川真貴・活性酸素種生成酵素 AtrbohD,F の新規活性制御因子の探索・第50回日本植物生理学会年会・2009年3月21日～3月24日・名古屋大学
- ③ 木村幸恵・シロイヌナズナの活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼ AtrbohF の  $\text{Ca}^{2+}$  とリン酸化を介した活性制御・日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2008年12月9日～12月12日・神戸ポートアイランド
- ④ 先崎栄里子・シロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 AtrbohD の  $\text{Ca}^{2+}$  による活性化機構の解析・日本植物学会第72回大会・2008年9月24日～9月27日・高知大学

- ⑤ 木村幸恵・異種発現系を用いたシロイヌナズナ活性酸素種生成酵素 AtrbohD と AtrbohF の比較解析・日本植物学会第72回大会・2008年9月24日～9月27日・高知大学

- ⑥ 木村幸恵・活性酸素種生成に関与するシロイヌナズナ AtrbohD の活性化制御における分子内相互作用の解析・第49回日本植物生理学会年会・2008年3月20日～3月22日・札幌コンベンションセンター

- ⑦ 菱沼悠・異種発現系を用いたシロイヌナズナ NADPH オキシダーゼ AtrbohD の活性制御機構の解析・日本植物学会第71回大会・2007年9月7日・東京理科大学

[図書] (計1件)

著者名：武田征士, 賀屋秀隆, Liam Dolan, 朽津和幸

出版社：秀潤社

書名：細胞工学 6月号 HOT PRESS

「植物のストレス応答・形態形成における活性酸素種生成酵素 NADPH oxidase の  $\text{Ca}^{2+}$  を介した活性化メカニズム」

発行年：2008年

ページ：600-601

[その他]

ホームページ等

<http://www.tus.ac.jp/news/news.php?20080229091649>

6. 研究組織

(1)研究代表者

賀屋 秀隆 (Kaya Hidetaka)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：80398825

(2)研究協力者

木村 幸恵 (Kimura Sachie)

東京理科大学・大学院理工学研究科

・博士課程

研究者番号：無し

菱沼 悠 (Hishinuma Haruka)

東京理科大学・大学院理工学研究科

・修士課程

研究者番号：無し

先崎 栄里子 (Senzaki Eriko)

東京理科大学・大学院理工学研究科

・修士課程

研究者番号：無し

河原崎 朋子 (Kawarazaki Tomoko)

東京理科大学・大学院理工学研究科

・修士課程

研究者番号：無し

路川 真貴 (Michikawa Masataka)

東京理科大学・大学院理工学研究科

・修士課程

研究者番号：無し