

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22276

研究課題名（和文）カルシウムシグナリングはなぜ多様性を発揮できるのか：情報変換分子の解明

研究課題名（英文）Why calcium signaling can exhibit diversity: elucidation of signal-transducing molecules

研究代表者

前島 正義（Maeshima, Masayoshi）

中部大学・その他の部局・副学長

研究者番号：80181577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Ca濃度変化を多様な生理応答に変換する仲介役として細胞膜結合型Ca結合タンパク質PCaPを見出した。PCaPにはホスファチジルイノシトールリン酸が結合しているが、Ca増加によりCaM/Caが形成されるとこの脂質を離す。PCaPがCaシグナルを脂質シグナルに変換している可能性が高い。PCaPのN末端側25残基をシロイヌナズナに導入すると、同時に複数のシュートを生じた。コケ植物にもPCaP類縁分子が存在する。同様にコケに過剰発現させると、細胞分裂部位数が増加した。植物種を超えてPCaPが細胞の分裂・分化での情報変換に大きな役割を發揮しているものと推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ca<sup>2+</sup>はメッセンジャーイオンとして広く知られているが、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化がなぜ多様な生理現象を起こすのかの説明は十分ではない。Ca<sup>2+</sup>濃度上昇→Ca/カルモジュリン複合体形成→標的タンパク質という経路で説明される。本研究により、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇→Ca/カルモジュリン複合体形成→ホスファチジルイノシトールリン酸情報→標的分子という流れを仲介する分子PCaPを見出した。PCaPはCaシグナリングを脂質シグナルに変換し、細胞応答の多様性を支えると考えられる。植物ウイルス感染応答、植物免疫応答、根毛形成、水分屈性、気孔閉口などの現象に関与することも明らかにし、新しい展開の契機を与えた。

研究成果の概要（英文）：PCaP, a plasma membrane-bound Ca-binding protein, was found to mediate the conversion of Ca<sup>2+</sup> concentration changes into a variety of physiological responses. Introduction of the N-terminal 25 residues of PCaP into *Arabidopsis thaliana* produced multiple shoots at early stage of growth. PCaP orthologue is also present in mosses. Similarly, overexpression of the N-terminal of PCaP in moss increased the number of cell division sites. We hypothesized that PCaP plays a major role in information conversion in cell division and differentiation across plant species.

研究分野：生化学、植物分子細胞生物学

キーワード：情報変換 細胞膜 カルシウムシグナリング 脂質シグナリング

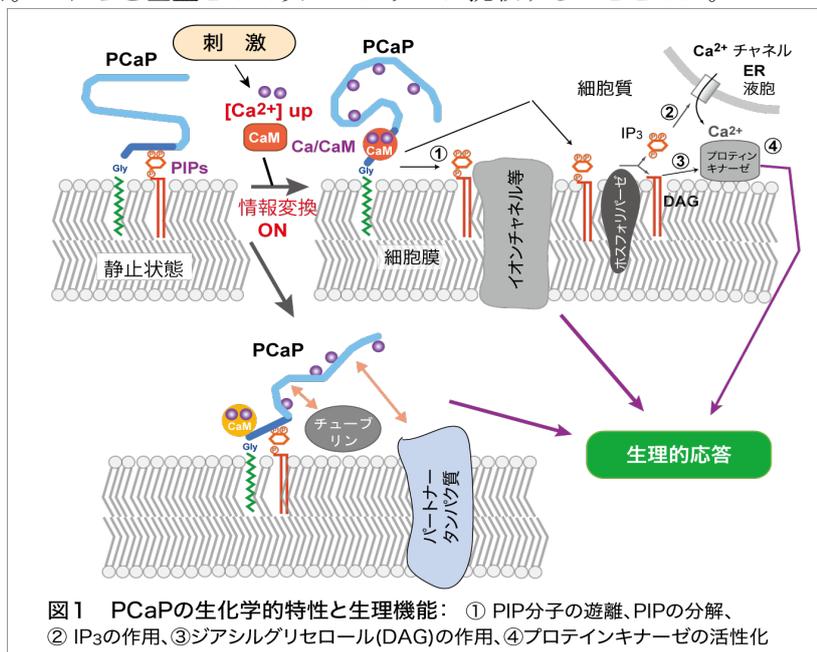
## 1. 研究開始当初の背景

生命科学の疑問「カルシウムシグナリングはなぜ多様性を発揮できるのか」に挑戦し理解することを大きな目標とした。細胞内シグナリングは、カルシウム(Ca)、サイクリック AMP、イノシトールリン脂質 (IP)が仲介し、細胞内外の情報に応じて、時空間特異的に情報を的確に伝える。なかでも Ca は二次メッセンジャーとして、鍵となる役割を果たしている。細胞質での Ca<sup>2+</sup>は極めて低い濃度(細胞外、オルガネラの1万分の1)に精密に維持され、Ca<sup>2+</sup>濃度の一過的な上昇により、例えばカルモジュリン (CaM) が Ca<sup>2+</sup>と複合体 (Ca<sup>2+</sup>/CaM) を形成して CaM 依存性キナーゼを活性化し、標的タンパク質の機能を調節する。植物では光・ホルモン・病理・機械刺激応答、重力屈性等、Ca<sup>2+</sup>情報が介在する反応は多様である。では、Ca<sup>2+</sup>の濃度変化は、なぜ多様な応答を引き起こすことができるのだろうか? 情報の分岐経路はどのようになっているのかは大きな疑問として残されている。

情報伝達における Ca<sup>2+</sup>の重要性が広く研究され深く理解されている。一步踏み込み、Ca<sup>2+</sup>を介する情報伝達により多様な生物応答が成立するのはどのような機構によるのか、またイノシトールリン脂質 (IP)シグナルとの関連性、という課題意識をもつ研究者は少なくない。本研究開始の背景には、Ca<sup>2+</sup>濃度変化がどのようにして多様かつ得意的な生理応答を引き起こすのかという大きな疑問があった。

カルシウムに関わる膜輸送系 (Ca<sup>2+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体)や Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質の素過程・素子の研究をする過程で、Ca<sup>2+</sup>情報をつなぎ、変換する機構を解明することの重要性を感じていた。対象とする PCaP 分子は、既知のタンパク質機能ドメインをもたず、脂質修飾を受けて細胞膜に結合し、かつ Ca<sup>2+</sup>および Ca/CaM 複合体および PIP と競合的に結合し、微小管等のパートナー分子とも相互作用する。多面的な相互作用を支える特徴として、N 末端側以外は、一般的な二次・三次構造ではなく天然変性型タンパク質であることも明らかにした(Nagasaki *et al.* 2007, 2008a, 2008b)。PCaP に関心を示す研究者も増え、米国グループとの共同研究で、病原ウイルスの細胞間拡散に PCaP が関与するなどの知見も発表した(Vijayapalani *et al.* 2012)。PCaP の可視化により、局在の特徴も発表してきた (Kato *et al.* 2013, Nagata *et al.* 2016)。これらを基盤として次のステップに挑戦することとした。

ミリスチル化により膜に結合する PCaP は、細胞膜において、Ca 濃度変化を Ca/CaM 複合体の結合として受信し、IP シグナルに変換する役割を担うと推定している(図1)。こうした特徴は PCaP が新規な情報変換機能をもつことを推測させ、この分子の解明に挑戦することが、カルシウムシグナリングの新たな領域を拓くことにつながると確信し、本研究を開始した。



## 2. 研究の目的

申請者らは細胞膜結合型 Ca 結合タンパク質 PCaP を見出し特性を明らかにした。PCaP の N 末端領域は Ca/CaM とホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) に拮抗的に結合し、Ca/CaM が形成されると、PCaP は結合していた PIP を遊離する。PCaP が Ca シグナルを IP または PIP シグナルに変換するハブ機能を果たしている可能性がある(図1)。PCaP を分子生理学的、生化学的に解析することで、Ca シグナリングの多様性の機構解明につなげることを研究の目的とした。とくに、PIP および CaM/Ca 複合体が競合的に結合する N 末端領域に注目し、この領域を過剰発現させた株を調製し表現型を解析することにより PCaP の生理的役割を明らかにすることを目的とした。さらに、PCaP と相互作用(結合する)分子の探索を進め、情報の流れを特定することをもう一つの目的とした。

### 3. 研究の方法

モデル植物シロイヌナズナには PCaP1 と PCaP2 の分子種があり、PCaP1 がほぼ全組織に発現し、PCaP2 は根毛に特異的である。両分子の N 端領域は正に荷電し、負に荷電した PIP と結合する。PCaP1 の遺伝子欠失株は、病原ウイルス応答、気孔閉口、花粉管・胚軸伸長に異常が見られ、PCaP2 遺伝子欠失株では正常な根毛が形成されないなど、顕著な表現型がみられる。多様な表現型は PCaP の果たす役割の多様性を反映していると考えられる。図 1 でいえば、PCaP と直接相互作用するタンパク質は何か、Ca<sup>2+</sup>上昇で遊離した PIP はどのような局在変化を示すのか、作用点において、どの分子が PIP、イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>)、ジアシルグリセロールと相互作用するのか等の解明が、シグナリング多様性を解く鍵となる。本研究では、PCaP が植物成長のどのプロセスで顕著な役割を果たすのかを明確にするため、さらには PCaP と相互作用する分子を探索するため以下の実験を実施した。

- (1) PIP および CaM/Ca 複合体が競合的に結合する N 末端領域に注目し、この領域 (N 端 25 残基) をシロイヌナズナに過剰発現させた株を調製し表現型を観察した。
- (2) 植物進化過程の基部に位置するコケに注目し、コケにシロイヌナズナ PCaP 同様の分子が存在するか否かを検証した。すなわち、植物に普遍的な分子であるか否かを検討した。具体的にはゼニゴケを解析対象とした。
- (3) ゼニゴケに PCaP を過剰発現することで、その成長と形態にどのような変化 (表現型) が生ずるのかを検証した。
- (4) PCaP と結合する分子を生化学的手法 (PCaP 抗体を用いた免疫共沈法) により探索した。

### 4. 研究成果

上記それぞれの実験により下記の成果を得た。

- (1) PCaP の N 端領域を過剰発現させた変異株の表現型を見出すことは困難を極めたが、実生が成長する過程で、同時に複数のシュートが形成される事例が観察された。野生株には見られない特徴的な現象であった。この形質は変異株の後代まで安定的に継承されることも確認した。これはシュートメリステム形成の異常であり、PCaP が正常なメリステム形成に関わっていると推測される。
- (2) ゼニゴケにはシロイヌナズナ PCaP1 の類縁分子が存在し (MpPCaP)、一次構造での 43% の一致率 (類似性 63%) を示し、とくに N 端領域は極めて相同性が高いことが判明した。さらにリコンビナント MpPCaP を合成した。これを用いて特異的な抗体も調製し、ゼニゴケにこの分子が存在することを免疫化学的にも証明した。また、細胞膜に強く結合し、さらにホスファチジルイノシトールリン酸とも結合することを明らかにした。植物普遍的な分子であり、タンパク質として機能している可能性が高いと判断した。
- (3) ゼニゴケに PCaP を過剰発現させたところ、顕著な成長抑制が観察され、さらに葉状体の分裂部位が異常に増えて歪んだ形態を示すことが明らかになった。継代培養しても、その特徴が継続することも明らかにした。シロイヌナズナ同様にメリステムの正常な形成に不可欠な分子であると考えられる。
- (4) ゼニゴケの PCaP と結合する分子を免疫共沈法により探索したところ 16 kD タンパク質が見出された。なお、この分子を質量分析法等で同定する必要があるが、達成できていない。

これらの結果は、PCaP が植物に広く存在する分子であり、正常なメリステム形成に不可欠であることを強く示唆している。これまで、PCaP が病理応答、気孔閉口、根の水分屈性、根毛形成に明確に関わっていることを明らかにしてきたが、本研究により、さらに形態形成の初期過程、すなわちメリステム形成にも関わる情報変換分子として機能していることが強く示唆された。

本研究は、研究全般において名古屋大学の田中・高田奈月特任助教に協力いただいたことを明記し感謝申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashizume Hiroshi, Kitano Hidemi, Mizuno Hiroko, Abe Akiko, Yuasa Genki, Tohno Satoe, Tanaka Hiromasa, Ishikawa Kenji, Matsumoto Shogo, Sakakibara Hitoshi, Hirose Yoji, Maeshima Masayoshi, Mizuno Masaaki, Hori Masaru	4. 巻 57
2. 論文標題 Efficacy of periodic cold plasma treatment in a paddy to produce white-core grains in brewer's rice cultivar Yamadanishiki	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 161 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2023.2215914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Yoichi, Kawashima Terumi, Naganawa Mayuko, Mikami Toshiyuki, Maeshima Masayoshi, Ishiguro Sumie	4. 巻 63
2. 論文標題 Letter to the Editor: Speedy Plant Genotyping by SDS-Tolerant Cyclodextrin-PCR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1025 ~ 1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto, Y., Kawamura, A., Suzuki, T., Segami, S., Maeshima, M., Polyn, S., De Veylder, L., Sugimoto, K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Transcriptional activation of auxin biosynthesis drives developmental reprogramming of differentiated cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 4348-4365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakanishi, Y., Kawashima, T., Naganawa, M., Mikami, T., Maeshima, M., and Ishiguro, S.	4. 巻 63
2. 論文標題 Speedy plant genotyping by SDS-tolerant cyclodextrin-PCR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1025-1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Giovannoni Moira, Marti Lucia, Ferrari Simone, Tanaka Takada Natsuki, Maeshima Masayoshi, Ott Thomas, De Lorenzo Giulia, Mattei Benedetta	4. 巻 44
2. 論文標題 The plasma membrane-associated Ca <sup>2+</sup> -binding protein, PCaP1, is required for oligogalacturonide and flagellin-induced priming and immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant, Cell and Environment	6. 最初と最後の頁 3078 ~ 3093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Rahman, A., Kawamura, Y., Maeshima, M., Rahman, A., and Uemura, M.	4. 巻 61
2. 論文標題 Plasma membrane aquaporins PIPs act in concert to regulate cold acclimation and freezing tolerance responses in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant & Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 787-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim, A., Chen, J., Khare, D., Jin, J.Y., Maeshima, M., Zhao, Y., Marinoia, E., Hwang, J.-J., Lee, Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Non-intrinsic ATP binding cassette proteins ABCI19, ABCI20 and ABCI21 modulate cytokinin response at endoplasmic reticulum in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Report	6. 最初と最後の頁 473-487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-019-02503-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda, M., Mieda, M., Sato, R., Kinoshita, S., Tomoyama, T., Ferjani, A., Maeshima, M., and Segami, S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Lack of vacuolar H <sup>+</sup> -pyrophosphatase and cytosolic pyrophosphatases causes fatal developmental defects in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00655	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 Hashizume, H., Kitano, H., Mizuno, H., Abe, A., Yuasa, G., Tohno, S., Tanaka, H., Ishikawa, K., Matsumoto, S., Sakakibara, H., Nikawa, S., Maeshima, M., Mizuno, M., and Hori, M.	4. 巻 vol.2020
2. 論文標題 Improvement of yield and quality of rice grain by periodic cold-plasma treatment with rice plants in paddy field	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plasma Processes & Polymers	6. 最初と最後の頁 e2000181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ppap.202000181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Giovannoni, M., Marti, L., Ferrari, S., Tanaka-Takada, N., Maeshima, M., Ott, T., De Lorenzo, G., and Mattei, B.	4. 巻 In press
2. 論文標題 The plasma membrane-associated Ca <sup>2+</sup> -binding protein PCaP1 is required for oligogalacturonide and flagellin-induced priming and immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant, Cell and Environment	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22541/au.161821112.26916822/v1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato, M., Tsuge, T., Maeshima, M., and Aoyama, T.	4. 巻 99
2. 論文標題 Arabidopsis PCaP2 modulates the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signal on the plasma membrane to attenuates root hair elongation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 610 ~ 625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka-Takada, N., Kobayashi, A., Takahashi, H., Kamiya, T., Kinoshita, T., and Maeshima, M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Plasma membrane-associated cation-binding protein PCaP1 is involved in hydrotropism of Arabidopsis roots.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant & Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1331 ~ 1341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uno, H., Tanaka-Takada, N., Hattori, M., Fukuda, M., and Maeshima, M.	4. 巻 132
2. 論文標題 A cell-wall protein SRPP provides physiological integrity to the Arabidopsis seed.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-018-01083-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimata Yusuke, Kato Takehide, Higaki Takumi, Kurihara Daisuke, Yamada Tomomi, Segami Shoji, Morita Miyo Terao, Maeshima Masayoshi, Hasezawa Seiichiro, Higashiyama Tetsuya, Tasaka Masao, Ueda Minako	4. 巻 116
2. 論文標題 Polar vacuolar distribution is essential for accurate asymmetric division of Arabidopsiszygotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.	6. 最初と最後の頁 2338 ~ 2343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1814160116	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asaoka Mariko, Inoue Shin-ichiro, Gunji Shizuka, Kinoshita Toshinori, Maeshima Masayoshi, Tsukaya Hirokazu, Ferjani Ali	4. 巻 60
2. 論文標題 Excess pyrophosphate within guard cells delays stomatal closure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 875 ~ 887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz002	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Ryosuke, Maeshima Masayoshi	4. 巻 100
2. 論文標題 The ER-localized aquaporin SIP2;1 is involved in pollen germination and pollen tube elongation in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 335 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-019-00865-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤良介、佐藤心郎、澤田有司、平井優美、榎元廣文、朝比奈雅志、堀部貴紀、柘植尚志、前島正義
2. 発表標題 高い環境適応性をもつサボテンの代謝物の組成と組織内分布
3. 学会等名 日本植物生理学会松江年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中奈月、小林啓恵、高橋秀幸、Liam Dolan、前島正義
2. 発表標題 細胞膜カルシウム結合分子PCaPを介した細胞内情報の新しい変換機構の解明.
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田知美、奥村綾子、土平絢子、前島正義、且原真木、奈良久美
2. 発表標題 時計因子ELF3は胚軸における水輸送調節にどのように関連しているのか？
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬上紹嗣、島田貴士、嶋田知生、西村いくこ、前島正義
2. 発表標題 GFPやTagRFPIによるオイルボディ・液胞形態と植物生長への人為的影響.
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueda, M., Kimata, Y., Kato, T., Higaki, T., Kurihara, D., Segami, S., Terao-Morita, M., Maeshima, M., Hasezawa, S., Higashiyama, T.
2. 発表標題 Live-cell imaging of the polarization dynamics of plant zygote: polar vacuolar distribution is essential for accurate asymmetric division.
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中奈月, 水谷未耶, 奥田慎平, 西浜竜一, 河内孝之, 前島正義, Liam Dolan
2. 発表標題 新規情報伝達タンパク質PCaP1 のメリステム形成への影響
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------