

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 18日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23657031

研究課題名（和文）

イノシトールリン脂質の動態を制御する新規タンパク質と細胞機能調節の解明

研究課題名（英文）

Biochemical properties and physiological role of novel proteins involved in regulation of phosphatidylinositol phosphates.

研究代表者

前島 正義 (Maeshima Masayoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80181577

研究成果の概要（和文）：PCaP1 および PCaP2 はそれぞれの N 末端のミリストイル化により安定的に細胞膜に局在する。両分子の N 端 20 数残基はホスファチジルイノシトールリン酸（PIP）およびカルモジュリン/カルシウム（CaM/Ca）複合体と結合する能力を有する。CaM/Ca の結合が優先するため、細胞内カルシウム濃度が上昇した場合には CaM/Ca が生成し、PCaP に結合していた PIP を遊離させる。したがって、PCaP がカルシウムシグナルを PIP シグナルに変換する役割を果たしていると推定される。本研究における PCaP の機能欠失株の表現型解析により、少なくとも PCaP1 は気孔の閉口プロセスに、また PCaP2 は正常な根毛の先端成長に不可欠であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Plasma membrane-associated  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins (PCaPs) of *Arabidopsis thaliana* is a novel-type proteins that bind to the calmodulin (CaM)/Ca complex and phosphatidylinositol phosphates (PIPs) at their N-terminal parts. PCaPs are myristoylated and stably associated with the plasma membrane. PCaPs bind PIPs at resting state of cells and CaM/Ca when the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  level is increased. Thus, it is estimated that PCaPs function as transducers from Ca-signaling to PIP-signaling. During the present study, we demonstrated that PCaP1 is involved in closure of stomata in leaves and that PCaP2 regulates root hair tip growth via processing  $\text{Ca}^{2+}$  and PtdInsP signals on the plasma membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物分子機能、

## 1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質（PIP, Phosphatidylinositol phosphate）はPIP<sub>1</sub>, PIP<sub>2</sub>, PIP<sub>3</sub>に分類され、それぞれ代謝上の結びつきが深く、固有の細胞機能をもつ。PIPの

相互変換には特異性の高い各種キナーゼ等がはたらく。動物 (Annu Rev Biophys, 2008, 37:175; Trends Cell Biol, 2010, 20:25) および植物 (Trends Plant Sci, 2008, 14:171)

で変換酵素の解明が進み細胞機能調節の役割が解明されつつある。PIPは細胞の分裂と分化、極性形成、プログラム細胞死などの現象に関わっていると推定されている。

これまでの研究はPIPsの相互変換に関わる酵素およびホスホリパーゼCなど集中している。申請者は細胞膜に結合する新規カチオン結合タンパク質 (plasma membrane cation-binding protein, PCaP) を見出し、この分子がイノシトールリン脂質 (PIP<sub>2</sub>、PIP<sub>3</sub>) と結合すること、そしてカルモジュリン/Ca複合体 (CaM/Ca) とも結合することを発見した。しかもPCaPにCaM/Ca結合すると、PIPsはPCaPから遊離することが明らかとなった。このことはPCaPがPIPシグナルとCaシグナルのクロスポイントに位置していることを示唆している。PCaPの研究を通して、世界の誰も想像しなかった情報制御の概念を提案できると判断し、萌芽研究として開拓に挑戦することとした。

## 2. 研究の目的

イノシトールリン脂質 (PIP) は、カルシウムと並んで細胞内シグナリングの主要な要素である。PIPは分子種が多く、それぞれが役割を異にする。申請者は特定のPIP分子種に結合する細胞膜タンパク質PCaPを見出し、PCaPがPIPを結合すること、その結合がカルモジュリン/Ca複合体の存在で解離することを見出した。このことは、CaシグナルをPIPが増幅あるいは情報変換する可能性、また既存のPIPを結合することで機能をマスクする可能性を示唆している。この仮説あるいは可能性を生化学的、分子細胞生物学的に実証し、まったく新しい情報変換の概念を提案することに挑戦することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

課題「イノシトールリン脂質の動態を制御する新規タンパク質と細胞機能の調節」を達成するため、以下の項目を設定し、生化学的、分子生物学的、分子遺伝学的な手法により実験に取り組んだ。

(1) PCaP分子内のイノシトールリン脂質PIPの結合領域の決定： PCaP分子のN端領域とそれ以外の領域 (CC領域) を、個別ポリペプチドとして大腸菌で合成し、精製した分子を実験試料とする。PIPとの相互作用は、各種PIPを塗布したアレイシートを用いて、N端領域およびCC領域が各種PIPに結合するか否かをアッセイする。

(2) リガンド (CaM/Ca、Ca<sup>2+</sup>) 結合領域の決定と構造変換の有無： 上記の実験で調製したN端領域とCC領域を試料として、<sup>45</sup>Caに対する結合能を検定する。またCaM結合樹脂を用いて、両領域のCaMに対する結合能をカルシウムの有無で比較する。

(3) 植物細胞内でのPCaPタンパク質の生理的刺激応答の量と動態変化の解明： GFPを付加したPIP分子を発現する植物株を作出し、高濃度の塩、金属イオンを与える、あるいは高温、低温条件に曝すことで、PIPの量あるいは細胞内局在を観察する。

(4) 遺伝子欠失株、変異分子導入株における生理特性、表現型の解明： T-DNA挿入株、あるいはRNAi法によるノックダウン株を作出し、生理的な表現型を解析する。

## 4. 研究成果

上記の4項目に沿って成果を説明する。

(1) PCaP分子内のイノシトールリン脂質PIPの結合領域の決定： PCaP1およびPCaP2はいずれも塩基性アミノ酸であるリジン残基に富む20数残基の配列をもっている。このN端領域とそれ以外の領域

(CC領域) を、個別ポリペプチドとして大腸菌で合成し、精製した分子を実験試料として、PIPとの相互作用を検定したところ、N端領域のみがPIPとの結合活性を示し、CC領域はPIPとの結合能を全く示さなかった。すなわち、PIP1とPIP2のN端20数残基がPIPとの結合領域であり、かつPI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(3,5)P<sub>2</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub>、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>にのみ結合する特異性をもつことが明らかになった。なお、植物にはPI(3,4,5)P<sub>3</sub>は存在しないので、生理的にはPIP<sub>2</sub>が重要な結合リガンドであると推測される。

(2) リガンド (CaM/Ca、Ca<sup>2+</sup>) 結合領域の決定と構造変換の有無： 上記の実験で調製したN端領域とCC領域を試料として、<sup>45</sup>Caに対する結合能を検定したところ、N端を欠いたポリペプチド、すなわちCC領域に結合することが明らかになった。また、CaM結合樹脂を用いて、両領域のCaMに対する結合能をカルシウムの有無で比較したところ、N端領域を欠いたCC領域はCaM結合能はなく、N端領域のみがCaMと結合することが判明した。加えて、PCaPとCaMの結合にはカルシウムの存在が不可欠であった。

すなわち、PCaPはCaM/Ca複合体とのみ結合することが明らかになった。そして、結合したCaM/Caは、それまで結合していたPIPを遊離させることも明確になった。すなわち、PCaPのN端領域はPIPとCaM/Caが競合的に結合し、かつCaM/Caの結合の優先性が高い。これらを総合すると、細胞膜に局在するPCaPは、通常はPIPと結合し、結合しているPIPの情報伝達能力をマスクしている。しかし、一旦刺激が加わり、細胞質カルシウム濃度が上昇するとCaM/Caが形成され、これがPCaPと結合することで、それまでトラップされていたPIPを放

出することで、PIPによる情報伝達のスイッチを入れる。別の言い方をすれば、細胞内のカルシウムシグナルを、膜脂質PIPシグナルに変換する装置としてPCaPが存在する、というモデルを提案できる。

(3) 植物細胞内でのPCaPタンパク質の生理的応答の量と動態変化の解明： GFPを付加したPIP分子を発現する植物株を作出し、高濃度の塩、金属イオンを与える、あるいは高温、低温条件に曝すことで、PIPの量（蛍光強度）あるいは細胞内局在（細胞膜からの遊離、あるいは他のオルガネラへの移動）を観察した。いずれの刺激に対しても蛍光強度（PCaPのタンパク質量）および細胞膜局在に変化は見られなかった。

(4) 遺伝子欠失株、変異分子導入株における生理特性、表現型の解明： PCaP1についてはT-DNA挿入株、PCaP2についてはRNAi法によるノックダウン株を作出し、生理的な表現型を解析した。T-DNA挿入の*pcap1*株は、孔辺細胞の膨潤収縮運動、すなわち気孔の閉口に障害がみられた。すなわち、気孔は暗条件で閉じるが、*pcap1*株は完全には閉口せず半開口状態となる。このことは、PCaP1が気孔の開閉調節、とくに閉口プロセスに関わっていることを示している。

一方、PCaP2のノックダウン株は根毛が長くなる特徴を示した。さらにPCaP2のN端領域のみを発現させると根毛は短くなるか生じなくなる（無根毛）。このことから、PCaP2は根毛の適切な先端成長のための調節役（ブレーキ機能）を果たしており、異常なPCaP2（N端領域のみの分子）が多量に存在する場合は、ブレーキ機能が増進して根毛成長を抑制し、PCaP2の量が少ない場合は根毛の先端成長を促進すると推

定される。

以上の研究成果は学会等で発表したほか、以下の学術論文として公表した。

#### 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 12 件) 以下 1 2 編はいずれも査読を経て掲載された論文である。

- (1) Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., Fujiwara, M., Maeshima, M. (2011) The iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 155: 1893-1907.
- (2) Oliveira, L.M.N., Sobreira, A.C., Sobreira, A.C.M., Costa, J.H., Otoch, M.L.O., Maeshima, M., Fernandes de Melo, D. (2011) Chilling-induced changes of vacuolar proton pumps of hypocotyls from *Vigna unguiculata*. *Plant Growth Regulation*, 64: 211-219.
- (3) Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M., Tsukaya, H. (2011) Keep an eye on PPI: The vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase regulates postgerminative development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 2895–2908.
- (4) Fukuda, M., Satoh-Cruz, M., Wen, L., Crofts, A.J., Sugino, A., Washida, H., Okita, T.W., Ogawa, M., Y. Kawagoe, Y., Maeshima, M., Kumamaru, T. (2011) The small GTPase Rab5a is essential for intracellular transport of proglutelin from Golgi apparatus to the protein storage vacuole and endosomal membrane organization in developing rice endosperm. *Plant Physiol.*, 157: 632-644.
- (5) Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Sakata, A., Maeshima, M., Tsukaya, H. (2012) Regulation of pyrophosphate levels by the H<sup>+</sup>-PPase is central for proper resumption of early plant development. *Plant Signaling & Behavior*, 7: 38-42.
- (6) Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., Miller, W.A. (2012) Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathogens*, 8(4): e1002639.
- (7) Kawachi, M., Kobae, Y., Kogawa, S., Mimura, T., Krämer, U., Maeshima, M. (2012) Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for the function, ion selectivity and structure of Arabidopsis MTP1. *FEBS J.*, 279: 2339-2356. (cover illustration)
- (8) Tomioka, R., Takenaka, C., Maeshima, M., and Tezuka, T., Kojima, M., Sakakibara, H. (2012) Stimulation of root growth induced by aluminum in *Quercus serrata* Thunb. is related to activity of nitrate reductase and maintenance of IAA concentration in roots. *American J. Plant Sciences*, 3: 1619-1624.
- (9) Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., Lee, Y. (2013) The ABCA9 transporter facilitates seeds storage lipid synthesis at the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 773-778.
- (10) Wang, B., Bailly, A., Zwiewka, M., Henrichs, S., Azzarello, E., Mancuso, S., Maeshima, M., Friml, J., Schulz, A., Geisler, M. (2013) *Arabidopsis* TWISTED

DWARF1 functionally interacts with auxin exporter ABCB1 on the root plasma membrane. *Plant Cell*, 25: 202-214.

(11) Kato, M., Aoyama, T., Maeshima, M. (2013) A Ca<sup>2+</sup>-binding protein PCaP2 located on the plasma membrane is involved in root hair development as a possible signal transducer. *The Plant J.*, In press. doi: 10.1111/tpj.12155

(12) Tanaka, N., Kawachi, M., Fujiwara, T., Maeshima, M. (2013) Zinc-binding and structural properties of the histidine-rich loop of *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane zinc transporter MTP1. *FEBS Open Bio*, In press

[学会発表] (17件)

(1) Segami, S., Makino, S., Miyake, A., Asaoka, M., Maeshima, M.: Dimerization of GFPs fused to H<sup>+</sup>-pyrophosphatase influences the morphology and dynamics of vacuoles. International Workshop on Plant Membrane Biology, Okayama, March 26-31, 2013

(2) 加藤真理子、青山卓史、前島正義: シロイヌナズナ新奇 Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質 PCaP2 は Ca<sup>2+</sup>シグナルをホスファチジルイノシトールシグナルに変換し、根毛伸長に寄与する。日本植物生理学会 2013 年度年会、岡山、2013 年 3 月 21-23 日

(3) 田中奈月、加藤-藤原真理子、青山卓史、富岡利恵、倉田理恵、深尾陽一朗、前島正義: シロイヌナズナ無根毛変異株を用いたリン酸欠乏時における根毛の役割の解析。日本植物生理学会 2013 年度年会、岡山、2013 年 3 月 21-23 日

(4) 相羽孝亮、長崎-武内菜穂子、前島正義: 細胞膜局在型新規Ca結合タンパク質PCaP1の構造とリガンド結合の解析。日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡国際会議場

(5) 三宅愛、瀬上紹嗣、前島正義: 液胞膜可視化で

見えること: シロイヌナズナの根端細胞は高温下で中心液胞化が促進される。日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡国際会議場

(6) 三輪智佳、永田千咲子、林優紀、木下俊則、前島正義: 新規情報変換分子 PCaP1 の生理機能とくに気孔閉口における役割の解明。日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡国際会議場

(7) 田中奈月、河内美樹、前島正義: 液胞膜亜鉛輸送体MTP1のイオン選択性と輸送機能を支えるHis領域の役割。日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡国際会議場

(8) 加藤真理子、青山卓史、前島正義: シロイヌナズナ新奇 Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質 PCaP2 は Ca<sup>2+</sup>シグナルをホスファチジルイノシトールシグナルに変換し根毛伸長に寄与する。日本分子生物学会大会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場

(9) 田中奈月、加藤真理子、青山卓史、富岡利恵、倉田理恵、深尾陽一朗、前島正義: シロイヌナズナ無根毛変異株の養分吸収と環境耐性に関する分子生理学的研究。日本植物学会第76回大会、兵庫県立大学、2012 年 9 月 14-17 日

(10) Kawachi M., Kogawa, S., Fukao, Y., Kraemer U., Tanaka N., Maeshima M.: Molecular diversity of zinc transporters in plants. Symposium on Transport of Functional Small Molecules in Plants. Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Kyoto, March 22-25, 2012

(11) 田中奈月、加藤真理子、青山卓史、富岡利恵、前島正義: 根毛をもたないシロイヌナズナ変異株NR23の分子生理学的な特徴。日本植物生理学会2012年度年会、3月16-18日、京都、2012年

(12) 秋田瑞穂、長崎菜穂子、大内雄矢、水藤百江、前島正義: 新規カルモジュリン結合タンパク質 PCaP1 の分子機能の解明。日本生化学会大会、京都、2011年9月21-24日

- (13) 永田千咲子、長崎-武内菜穂子、三輪智佳、木下俊則、前島正義：気孔開閉に関わる新規情報伝達タンパク質PCaP1の分子特性と高CO<sub>2</sub>応答。日本生化学会大会シンポジウム、京都、2011年9月21日。
- (14) Maeshima, M., Tshuchira, A., Segami, S.,: The JSPS Colloquium in Stavanger on "Abiotic stress from genes to biosphere.", Stavanger, Norway, August 21-25, 2011.
- (15) Ouchi, Y., Nagatani, A. and Maeshima, M.: A calcium-binding proteins, CCaP1 and CCaP2, are induced by a long-period dark in Arabidopsis thaliana. The Scandinavian Plant Physiology Society Meeting 2011, Stavanger, Norway, August, 2011.
- (16) 三輪智佳、大内雄矢、水藤百江、前島正義：細胞膜型カルシウム結合タンパク質PCaP1により発現抑制されるSKS6の分子生物学。日本生化学会中部支部例会、静岡県立大学、2011年5月28日
- (17) 秋田瑞穂、長崎-武内菜穂子、大内雄矢、水藤百江、前島正義：細胞膜結合性新規カルモジュリン結合タンパク質PCaP1の分子生物学的解析。日本生化学会中部支部例会、静岡県立大学、2011年5月28日

[図書] (計3件) 以下は分担執筆である。

- (1) Kawachi, M., Kobae, Y., Tomioka, R., Maeshima, M. (2011) The role of membrane transport in the detoxification and accumulation of zinc in plants. *In A Soil Biology Series: Detoxification of Heavy Metals*. Springer-Verlag. pp. 129-142. ISBN978-3-642-21407-3
- (2) Kawachi, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Kato, M., Maeshima, M. (2011) Application of radioisotope in biochemical analysis: Metal binding proteins and metal transporters. *In Radioisotopes - Applications in*

Bio-Medical Science (ISBN 978-953-307-748-2), Ed by Singh, N., pp. 115-126, InTech.

- (3) Ferjani, A., Segami, S., Asaoka, M., Maeshima, M. (2013) Regulation of PPI levels through vacuolar membrane H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *In Progress in Botany*, Vol. 75, ed. U. Luetge, Springer. In press.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
前島正義 (MAESHIMA MASAYOSHI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：80181577
- (2) 研究分担者 なし  
( )  
研究者番号：
- (3) 連携研究者 なし  
( )  
研究者番号：