

## 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 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657034

研究課題名(和文) 植物における細胞内局所的タンパク質機能誘導系の構築

研究課題名(英文) Development of a site-specific induction system of protein function in plant cells

研究代表者

青山 卓史(AOYAMA TAKASHI)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80202498

研究成果の概要(和文)：誘導系を用いて遺伝子やタンパク質機能を特定の時間や空間で発現させることは、それら遺伝子やタンパク質が関わる生命現象の分子基盤を解明するための非常に有効な手段となる。本研究では、ケージ化された二量体誘導化合物(Chemical Inducing Dimmer: CID)の紫外線レーザーによる局所的アンケーシングを介して、単一細胞における遺伝子転写誘導、および細胞内でのタンパク質の局在化のための実験系を形質転換シロイヌナズナにおいて確立することを試みた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular basis of mechanisms by which elaborate phenomena in living systems are regulated, it is an effective way that functions of regulatory genes and proteins are artificially induced in a spatio-temporally specific manner. In this study, an attempt was made for developing a site-specific induction system of protein function in plant cells taking advantage of caged CID (Chemical Inducing Dimmer), which can be spatio-temporally uncaged by the irradiation of UV laser.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

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・細胞組織・誘導系・ケージド化合物

## 1. 研究開始当初の背景

人為的誘導系は、遺伝子発現の有無を時間的・空間的に調節できない遺伝学的解析や、生体内で多面的な影響をもたらす環境刺激を用いた生理学的解析などに比べて、非常に積極的かつ直接的な実験系である。これまでに熱ショックプロモーターを利用した遺伝子転写誘導系やステロイドホルモン受容体のホルモン結合ドメインを利用したタンパク質機能誘導系など多くの人為的誘導系が開発され、それらは基礎生物学の進展に大きく貢献してきた。しかし、人為的誘導系の最大の利点である時間的・空間的な制御に関しては未だ十分に満足できる分解能であると

は言えない。例えば、任意の単一細胞における遺伝子転写誘導や、タンパク質機能の細胞内局所的な活性化などは一般的には不可能である。

人為的誘導系の時間的・空間的分解能を高めるためには、誘導の引き金として光を用いることが最も有効な手段である。その場合、紫外線照射により解離する保護基を付け不活化された化合物(ケージド化合物)を前もって生体組織に浸透させておき、それに対して空間限定的な紫外線照射によるアンケーシングで活性化するという方法が考えられる。ケージド化合物の紫外線照射による誘導実験は、神経伝達物質や  $Ca^{2+}$  などの一部の生

理活性物質を対象とした系では有効に活用されている。また、ケージドグルコシルコイドとグルコシルコイド転写誘導系を用いた、紫外線照射による局所的な転写誘導実験も行なわれている。しかし、紫外線照射の標的空間を絞り込むと、標的空間に含まれるケージド化合物の分子数が減るために、アンケーシング後の化合物の拡散による濃度低下のために誘導が起こらない。このことから、ケージド化合物の紫外線によるアンケーシングの系においては時間的分解能に関しては問題ないが、空間的分解能を上げることは限界がある。

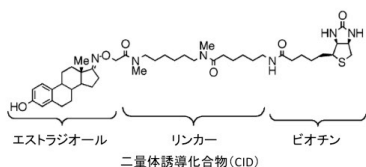
## 2. 研究の目的

本課題研究では、ケージド化合物と二量体誘導化合物 (CID) の手法を組み合わせることにより化合物を細胞内の特定のコンパートメントに固定し、アンケーシング後の拡散を防ぐ。このことにより、紫外線照射された領域限定的に標的タンパク質が活性化され、人為的誘導の空間的分解能が高まることを期待する。具体的には、シロイヌナズナ個体上の根および葉の表皮細胞に対して、(1) 任意の単一細胞における遺伝子転写誘導が行なえる系を確立すること、および(2) 細胞膜上の特定領域に活性化されたタンパク質を局在化させる系を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

CID としてはビオチンとエストラジオールをリンカーでつないだもの (図1 参照) を合成して用いた(1)。ビオチン部分は、ストレプトアビジン (SA) と  $10^{-15}$  M という解離定数で強く結合することが知られており、細胞内局在化シグナルを付加した SA を介して CID を細胞内の特定のコンパートメントに留める働きを期待する。一方、エストラジオール部分は、エストロゲン受容体ドメイン (ER ドメイン) 融合タンパク質に対する結合および活性化のための誘導化合物として用いる。この CID は酵母において SA と ER ドメインに結合しタンパク質の二量体化を誘導することが報告されている(1)。

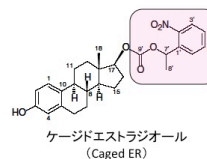
図 1



ケージド CID のアンケーシングのための予備実験として、エストラジオール部分の 3 位の水酸基に保護基が付加されたケージドエ

ストラジオール (図 1 参照) を岡山理科大学の林謙一郎博士から入手した(2)。

図 2



紫外線レーザー照射装置については、COHERENT 社製 OBIS375LX (375nm/16mW) を含むシステムを設計し、Zeiss 社製 Axioplan2 の落射光路に接続して用いた (図 3 参照)。

図 3



紫外線レーザー照射装置

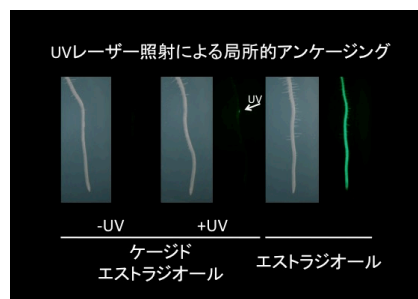
## 参考文献

- (1) Muddana and Peterson, 2004, *Org. Lett.* 6, 1409-1412.
- (2) Hayashi et al. 2006, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 2470-2474.

## 4. 研究成果

(1) 紫外線レーザー照射装置を用いたケージドエストロゲンの局所的アンケーシングの実験を行なった。照射する対象としては、GFP 遺伝子の転写がエストロゲン依存的に起こる形質転換シロイヌナズナの根を用い、ケージドエストラジオールを浸透させた後、紫外線レーザーを部分的に照射し、8 時間後に蛍光顕微鏡により観察した。その結果、紫外線レーザー照射された付近の細胞で GFP が発現することが確かめられた。

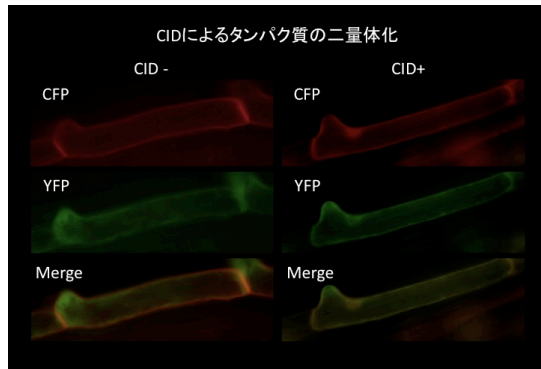
図 4



(2) 合成した CID を介したタンパク質の二量体化の実験を形質転換植物において行なった。用いられたタンパク質は SA と CFP と

の融合タンパク質の C 末端に ROP2 由来の細胞膜局在化シグナルを付加したもの、および MORN ドメインを除いた PIP5K3 の C 末端に ER ドメインと YFP とをつないだものである。それらを発現する根毛細胞を CID で処理したところ、YFP 蛍光の細胞膜局在化が誘導されることが確かめられた。

図 5



今後これらの系を組み合わせ、さらに CID やケージドエストロジオールを改良することにより、単一細胞における遺伝子転写誘導および細胞膜上へのタンパク質の局在化が可能になるものと考えられる。

#### 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 5 件)

- ① Kato, M., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2013) The Ca<sup>2+</sup>-binding protein PCaP2 located on the plasma membrane is involved in root hair development as a possible signal transducer. *Plant J.* 74: 690-700. doi: 10.1111/tpj.12155. (査読有り)
- ② Hayashi, K., Kusaka, N., Ando, K., Mitsui, T., Aoyama, T., and Nozaki, H. (2012) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22: 5663-5667. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.06.090. (査読有り)
- ③ Qing, L. and Aoyama, T. (2012) Pathways for epidermal cell differentiation via the homeobox gene GLABLA2: Update on the roles of the classic regulator. *J. Integr. Plant Biol.* 54: 729-734. doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01159.x. (査読有り)
- ④ Aki, S., Nakai, H., Aoyama, T., Oka, A., and Tsuge, T. (2011) *AtSap130/AtSF3b-3* function is required for reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52:1330-1339. doi: 10.1093/pcp/pcr077 (査読有り)

- ⑤ Luo, Y., Qin, G., Zhang, J., Liang, Y., Song, Y., Zhao, M., Tsuge, T., Aoyama, T., Liu, J., Gu, H., and Qu, L.-J. (2011) D-myo-inositol-3-phosphate affects phosphatidylinositol-mediated endomembrane function in *Arabidopsis* and is essential for auxin-regulated embryogenesis. *Plant Cell* 23:1352-1372. doi: 10.1105/tpc.111 (査読有り)

[学会発表] (計 27 件)

- ① 日本植物生理学会・2013 年度年会、2013 年 3 月 21-23 日、(岡山大学、岡山)、「ケミカルツールによるオーキシン分布の可視化に関する研究」、中村昌一、福永紫穂、古谷将彦、野崎 浩、青山卓史、林謙一郎
- ② 日本植物生理学会・2013 年度年会、2013 年 3 月 21-23 日、(岡山大学、岡山)、「シロイヌナズナの無根毛株を用いたリン酸欠乏時における根毛の役割の解析」、田中奈月、加藤真理子、青山卓史、富岡利恵、深尾陽一朗、倉田理恵、前島正義
- ③ 本植物生理学会・2013 年度年会、2013 年 3 月 21-23 日、(岡山大学、岡山)、「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」、加藤真理子、青山卓史、前島正義
- ④ 第 47 回日本植物化学調節学会年次大会、2012 年 10 月 27 日、(山形大学、山形)、「蛍光オーキシンアナログを用いたオーキシン分布の可視化に関する研究」、中村昌一、福永紫穂、青山卓史、古谷将彦、西村岳志、小柴共一、野崎 浩、林謙一郎
- ⑤ The International Symposium "Cycle and Span of Sustainability", October 27, 2012 (Uji, Japan), "Function of the Root System for Adapting to Severe Soil Conditions", Takashi Aoyama
- ⑥ 第 51 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2012 年 10 月 20 日、(甲子園大学、兵庫)、「ミラクリンの分子進化に関する考察：細胞内局在の視点から」、高井綾子、佐藤麻紀子、伊東茜、中田理恵子、青山卓史、井上裕康
- ⑦ Plant Development and Environmental Interactions - 3rd EMBO Conference on Plant Molecular Biology, May 27-30, 2012 (Matera, Italy), "Involvement of Phospholipid Signaling in Root Hair Development", Naoko Anzai, Yohei Ohashi, Tomohiko Tsuge, and Takashi Aoyama
- ⑧ 日本植物生理学会・2012 年度年会、2012 年 3 月 16-18 日、(京都産業大学、京都)、「リン酸欠乏にตอบสนองした根毛伸長における *PIP5K* の機能」、和田悠貴香、安田敬子、

- 柘植知彦、青山卓史
- ⑨ 日本植物生理学会・2012年度年会、2012年3月16-18日、(京都産業大学、京都)、「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」、田中奈月、加藤真理子、青山卓史、富岡利恵、前島正義
- ⑩ 日本植物生理学会・2012年度年会、2012年3月16-18日、(京都産業大学、京都)、「シロイヌナズナ変異体を用いたホスファチジン酸ホスホヒドラーゼの機能解析」、駿河航、下嶋美恵、中村友輝、谷口幸美、青山卓史、太田啓之
- ⑪ Special Lecture in "Aim for the Top University Project" December 6, 2011 (Tainan, Taiwan), "Role of Phospholipid Signaling in Plant Cell Morphogenesis", Takashi Aoyama
- ⑫ 植物化学調節学会第46回大会、2011年11月1-2日、(宇都宮大学、栃木)、「光標識によるサイトカイニン受容体の結合部位の同定」、安藤和紀、青山卓史、山篠貴史、水野猛、野崎浩、林謙一郎
- ⑬ 植物化学調節学会第46回大会、2011年11月1-2日、(宇都宮大学、栃木)、「細胞内オーキシン分布の可視化に関する研究-IAAのリアルタイムイメージング」、福永紫穂、青山卓史、野崎浩、林謙一郎
- ⑭ 第24回植物脂質シンポジウム、2011年9月19-20日、(東京大学、東京)、「細胞の極性を決めるタンパク質間相互作用」、草野博彰、和田悠貴香、安斎尚子、島田浩章、松井南、青山卓史
- ⑮ 第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、(国立京都国際会館、京都)「味覚修飾タンパク質ミラクリンの細胞内局在検討」、高井綾子、佐藤麻紀子、越地聡美、中田理恵子、青山卓史、井上裕康
- ⑯ 静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成プログラムシンポジウム、2011年9月15日、(静岡大学、静岡)「植物細胞形態形成におけるリン脂質シグナルの役割」青山卓史
- ⑰ 第65回日本栄養・食糧学会大会、2011年5月13-15日、(お茶の水女子大学、東京)「細胞外分泌シグナル配列を持つ味覚修飾タンパク質ミラクリン」、高井綾子、佐藤麻紀子、中田理恵子、青山卓史、井上裕康

[その他]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~molbio/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青山 卓史 (AOYAMA TAKASHI)  
京都大学・化学研究所・教授  
研究者番号：80202498

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし