

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657038

研究課題名(和文) プロテインキナーゼの基質特異性の変更

研究課題名(英文) Alteration of substrate specificity of protein kinase

研究代表者

高橋 陽介 (Takahashi, Yohsuke)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90183855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウム依存性タンパク質キナーゼ(CDPK)の一つNtCDPK1は生理的な基質である転写調節因子RSGをN末の変域を介して認識する。NtCDPK1のN末変域は他のCDPKにRSGキナーゼの特性を付与できることを明らかにした。さらにNtCDPK1とRSGの認識にはNtCDPK1の自己リン酸化が関与しており、その自己リン酸化部位はN末変域であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The variable N-terminal domain of NtCDPK1 (Ca²⁺-dependent protein kinase) is required for the recognition of the physiological substrate transcription factor RSG. The substitution of the variable N-terminal domain of another CDPK, with that of NtCDPK1 conferred RSG kinase activities. Furthermore, we showed that autophosphorylation of NtCDPK1 affected the recognition of RSG and the autophosphorylation sites were within the variable N-terminal domain.

研究分野：植物分子生物学

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：信号伝達 転写制御 キナーゼ カルシウム

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼは信号伝達の中心的な役割を担っている。植物では少数のキナーゼが多様化し大きな遺伝子ファミリーを形成している。キナーゼの進化上の分化は、全く新しい信号伝達系を創出することなく、植物の様々な環境刺激への応答を可能にしたと考えられる。しかしこのキナーゼファミリーの複雑化は、よく似た構造のキナーゼがいかにして特異的基質を認識し、信号伝達の特異性を確保しているのかという情報伝達の根幹となる問題を我々に提起している。

代表者らはジベレリン(GA)内生量を調節する転写因子 RSG の機能解析を行ってきた。その過程で RSG のリン酸化により RSG と 14-3-3 タンパク質の結合を促進することで RSG の機能を負に制御するキナーゼが、カルシウム依存性タンパク質キナーゼ(CDPK)の一つ NtCDPK1 であることを見出した。動物や酵母とは異なり植物には C-キナーゼが存在しないので、Ca²⁺が関与する植物の信号伝達で主要な役割を果たすキナーゼは CDPK である。シロイヌナズナには 34、イネには 29 の CDPK がゲノムに存在している。申請者らは、NtCDPK1 による RSG の認識には N 末の可変領域が必須であることを見出した。

2. 研究の目的

CDPK では基質認識と触媒活性が別の領域に担われており、キナーゼの特異性変更の研究のモデル系として優れている。本研究では CDPK の N 末可変領域を介した基質認識の分子機構を明らかにし、それを用いてキナーゼの基質特異性の改変を行い人工的な信号経路の創出を目的とした。

3. 研究の方法

NtCDPK1 の基質認識に関与する N 末の可変領域をシロイヌナズナの CDPK の一つ AtCPK9 のそれと置換したキメラ CDPK を作製し、キメラ CDPK が RSG を認識してリン酸化するか、プルダウン法、in vitro キナーゼアッセイにより調べた。

キメラ CDPK を発現する形質転換植物を作製し in vivo においてキメラ CDPK が RSG キナーゼとして機能するか調べた。質量分析法により NtCDPK1 の自己リン酸化部位を調べた。そのアミノ酸を Ala または Glu に置換し RSG の認識とリン酸化への影響をプルダウン法、in vitro キナーゼアッセイにより調べた。

4. 研究成果

シロイヌナズナの CDPK の一つ CPK9 は RSG と結合せず RSG をリン酸化しない。NtCDPK1 の N 末の可変領域を AtCPK9 のそれと置換したキメラ CDPK は RSG と結合し RSG キナーゼの活性を示した。次にこのキメラ CDPK を発現する形質転換体を作製して in vivo におけるキメラ CDPK が RSG キナーゼとして機能するか調べた。発芽にはジベレリン(GA)が

必要である。GA 生合成阻害剤を投与して、GA 内生量を低下させると植物は GA の恒常性を維持するために GA 合成酵素遺伝子 *NtGA20ox* などの転写量を増大させる。NtCDPK1 は転写因子 RSG の機能抑制により *NtGA20ox* の転写を減少させる。したがって NtCDPK1 の過剰発現植物は GA 生合成阻害剤に対して高感受性を示す。一方、AtCPK9 は RSG をリン酸化しないので AtCPK9 の過剰発現体の GA 生合成阻害剤に対する感受性はコントロールと同じである。NtCDPK1 N 末の可変領域と AtCPK9 の触媒領域で構成されるキメラ CDPK の過剰発現体は NtCDPK1 の過剰発現体と同様に GA 生合成阻害剤に対して高感受性を示した。この結果はキメラ CDPK が in vivo において RSG キナーゼの機能を有することを示している。CDPK の N 末の可変領域の改変により CDPK の基質特異性を人為的に操作できることが示された。

キナーゼの自己リン酸化は広く知られた現象である。多くのキナーゼでは触媒領域のアクティベーションループ内の Ser/Thr がリン酸化されることにより活性化される。CDPK ではこの位置が Asp に置換されており、疑似リン酸化状態であると考えられている。しかし多くの CDPK で自己リン酸化が報告されている。自己リン酸化された NtCDPK1 は RSG との結合力の低下が観察されるので、NtCDPK1 の自己リン酸化は基質認識に影響を与えたと考えられた。そこで本研究では組み換え NtCDPK1 を自己リン酸化させ質量分析により自己リン酸化部位を決定した。その結果、N 末の非保存領域内の 2 つのアミノ酸がリン酸化されることが明らかになった。NtCDPK1 の自己リン酸化部位が他にも存在するか検討するため、これら 2 つのアミノ酸を Ala に置換した変異型 NtCDPK1 (A1/A2) を作製した。A1/A2 はキナーゼ活性を失っていないが、タンパク質のリン酸化を移動度の

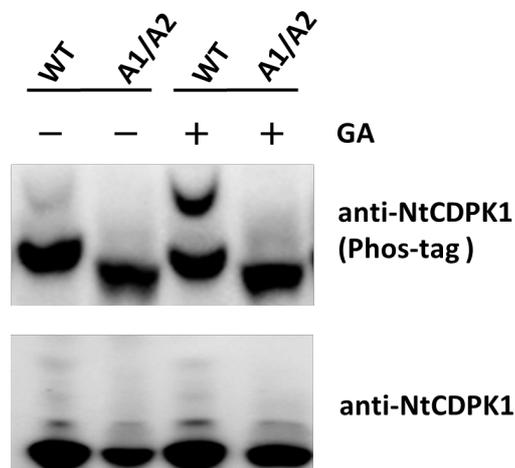


図 1. 植物体における N 末非保存領域のリン酸化。フォスタグを用いた解析。

差として検出できるフォスタグを用いて解析したところ、変異型 A1/A2 は自己リン酸化されないことが示された。したがって NtCDPK1 の自己リン酸化は N 末の非保存領域内の 2 つのアミノ酸だけで起こることが明らかになった。次に *in vivo* においてもこれら 2 つのアミノ酸が自己リン酸化されるか調べた。NtCDPK1 は GA 刺激を受けると自己リン酸化される。NtCDPK1 と変異型 A1/A2 を発現する形質転換体を GA 処理して、リン酸化をフォスタグを用いて調べた(図 1)。その結果、野生型 NtCDPK1 が GA 処理によってリン酸化されるのに対し、変異型 A1/A2 のリン酸化は認められなかった。したがって *in vivo* においても N 末の非保存領域内の 2 つのアミノ酸が自己リン酸化されることが示唆された。NtCDPK1 の N 末の非保存領域は基質認識に重要なので、本研究で明らかになった自己リン酸化が RSG の認識にどのような影響を与えるかを調べるために非リン酸化型変異タンパク質 A1/A2 に加え疑似リン酸化型変異タンパク質 D1/D2 を作製した。これらのタンパク質を用いてキナーゼアッセイを行った。その結果、野生型 NtCDPK1 に比べて A1/A2 はより高い効率で基質 RSG をリン酸化したのに対し、D1/D2 のリン酸化効

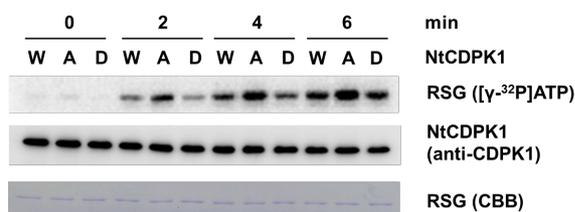


図2. NtCDPK1の自己リン酸化が基質であるRSGのリン酸化に与える影響. Wは野生型 NtCDPK1, Aは非リン酸化型変異をもつ NtCDPK1A1/A2, Dは疑似リン酸化もつ NtCDPK1D1/D2.

率は低下することが示された(図 2)。この結果は NtCDPK1 は GA により活性化されると基質である RSG をリン酸化すると同時に自己リン酸化され、反応産物であるリン酸化 RSG の解離を促進することが示された。NtCDPK1 の自己リン酸化は GA シグナルの過剰な伝達を抑制するフィードバック制御と考えられる。また自己リン酸化された NtCDPK1 は RSG との親和性が低下するので、RSG 以外のタンパク質をリン酸化する可能性が考えられる。NtCDPK1 の N 末非保存領域の自己リン酸化は基質の変更に与えるのかもしれない。

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 3 件)

1. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S.

and Takahashi, Y. (2014) Scaffold function of Ca^{2+} -dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. *Plant Physiol.* in press. 査読有.

2. Ito, T., Nakata, M., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2011) The mechanism of substrate recognition of Ca^{2+} -dependent protein kinases. *Plant Signal Behav.* **6**, 924 - 926. 査読有. DOI: 10.4161/psb.6.7.15604

3. Fukazawa, J., Nakata, M., Ito, T., Matushita, A., Yamaguchi, S. and Takahashi, Y. (2011) bZIP transcription factor RSG controls the feedback regulation of *NtGA20ox1* via intracellular localization and epigenetic mechanism. *Plant Signal Behav.* **6**, 26-28. 査読有. DOI: 10.4161/psb.6.1.14114

[学会発表](計 26 件)

1. 森雅彦, 渡辺哲史, 深澤寿太郎, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリン生合成酵素遺伝子 *AtGA20ox2* のフィードバック制御機構の解析 55 回日本植物生理学会 2014 年 3 月 18 日 富山大学

2. 伊藤岳, 岡村僚太, 佐久間哲史, 山本卓, 高橋陽介 植物の新奇転写抑制モチーフ - 真核生物に保存された転写抑制機構の解析 - 第 55 回日本植物生理学会 2014 年 3 月 19 日 富山大学

3. 深澤寿太郎, 森雅彦, 増谷優次, 宮本知佳, 高橋陽介 ジベレリンの転写代謝システム及翻訳後修飾制御機構 転写研究会ワークショップ 磯部ガーデン(栃木県) 2014 年 2 月 1 日

4. 伊藤岳, 岡村僚太, 高橋陽介 植物の新奇転写抑制ドメイン - 真核生物に保存された転写抑制機構の解析 - 第 36 回日本分子生物学会(神戸) 2013 年 12 月 3-6 日

5. 岡田佳那子, 伊藤岳, 高橋陽介 Ca^{2+} を介する新しい GA 信号伝達経路の探索 第 70 回中国四国植物学会 2013 年 5 月 12 日 徳島大学 優秀発表賞受賞

6. Fukazawa J, Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. "GAF1, A DELLA INTERACTING PROTEIN, REGULATES GIBBERELLIN SIGNALING IN ARABIDOPSIS" 21th International Plant Growth Substances Association Conference, Shanghai (China) 2013.6.21.

7. 宮本知佳, 深澤寿太郎, 高橋陽介 ジベレリンによる転写制御に関与する GAF1 の解析 第 70 回中国四国植物学会 2013 年

- 5月11日 徳島大学 優秀発表賞受賞
8. 寺脇綾香, 伊藤岳, 高橋陽介 DELLA と SCL3 による GA 生合成酵素遺伝子の転写制御機構の解析 第 70 回中国四国植物学会 2013 年 5 月 11 日 徳島大学
 9. 大江翔太, 伊藤岳, 石田さらみ, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達に關与するタンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 の自己リン酸化による機能制御の解析 第 54 回日本植物生理学会 2013 年 3 月 22 日 岡山大学
 10. 中田克, 光田展隆, 高木優, 高橋陽介 JA シグナルを負に制御する bHLH 型転写因子 JAM1 の解析 第 54 回日本植物生理学会 2013 年 3 月 22 日 岡山大学
 11. 深澤壽太郎, 藤木敬大, 森雅彦, 増谷優次, 神谷勇治, 山口信次郎, 高橋陽介 “ジベレリンの転写代謝システム及び成長制御機構の解析” 若手ワークショップ@鬼怒川 (転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム共催) ホテル鬼怒川御苑 (群馬県) 2013 1 月 25 日
 12. 伊藤岳, 大江翔太, 石田さらみ, 高橋陽介 プロテインキナーゼ NtCDPK1 から転写因子 RSG への 14-3-3 の転移モデルの検証 - NtCDPK1 のスキヤフォールド機能 - 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場 2012 年 12 月 14 日
 13. 深澤壽太郎, 藤木敬大, 森雅彦, 増谷優次, 神谷勇治, 山口信次郎, 高橋陽介 “ジベレリンによる DELLA-GAF1 複合体を介した転写調節制御機構の解析” 第 35 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 福岡国際会議場 2012 年 12 月 12 日
 14. Fukazawa J, Murakoshi S, Teramura H, Nasuno K, Nishida N, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y, “GAF1, A DELLA interacting protein, regulates gibberellin signaling in Arabidopsis” *Frontiers in plant biology: From discovery to applications* (Nature conference), Ghent (Belgium), 2012/10/4
 15. 森雅彦, 渡邊哲史, 深澤壽太郎, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリン生合成酵素遺伝子 *AtGA20ox2* のフィードバック制御機構の解析 第 69 回中国四国植物学会 2012 年 5 月 12 日 島根大学
 16. 大江翔太, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達に關与する Ca^{2+} 依存性タンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 の機能制御の解析 第 69 回中国四国植物学会 2012 年 5 月 12 日 島根大学
 17. 竹尾紘一, 伊藤岳, 高橋陽介 シロイヌナズナの転写因子 VIP1/AtRSG の細胞内局在についての研究 第 69 回中国四国植物学会 2012 年 5 月 12 日 島根大学 優秀発表賞受賞
 18. 伊藤岳, 安部悠理, 石田さらみ, 高橋陽介 プロテインキナーゼ NtCDPK1 による 14-3-3 の転写因子 RSG への転移モデルの検証 第 53 回日本植物生理学会 京都 2012 年 3 月 16 日
 19. Fukazawa, J., Murakoshi, S., Teramura, H., Nasuno, K., Nishida, N., Yoshida, M., Kamiya, Y., Takahashi, Y. and Yamaguchi, S. (2012) DELLA-GAF1 complex regulates gibberellin signaling in Arabidopsis. Symposium in 53rd annual meeting of Japanese society of plant physiologists. Kyoto, (Japan), 17th March. 招待講演.
 20. 高橋陽介 CDPK の基質認識機構と機能制御 日本生化学会シンポジウム 一次代謝と高次制御を結ぶタンパク質アセチル化・メチル化ネットワーク 2011 年 9 月 22 日 国立京都国際会館 招待講演
 21. 竹尾 紘一, 伊藤岳, 高橋陽介 シロイヌナズナの転写因子 VIP1/AtRSG の機能解析、2011 年 5 月 15 日 香川大学
 22. 岡田 佳那子, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達に關与する Ca^{2+} 依存的リン酸化酵素 NtCDPK1 の解析、中国四国植物学会、2011 年 5 月 14 日 香川大学
 23. 藤木敬大, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達に關与する転写因子 GAF1 による新たな転写調節モデルの検証、2011 年 5 月 14 日 香川大学
 24. 兼外瑞穂, 渡邊哲史, 伊藤岳, 高橋陽介 *AtGA20ox1* のフィードバック制御における転写因子 ATHB31 の機能解析、2011 年 5 月 14 日 香川大学
 25. 松崎雅広, 伊藤岳, 草場信, 高橋陽介 シロイヌナズナにおける転写因子 EPR1 の新奇機能の解析、2011 年 5 月 14 日 香川大学
 26. 小野晴香, 渡邊哲史, 高橋陽介 転写因子 GAF1 による *AtGA3ox1* の転写制御機構の解析、2011 年 5 月 14 日 香川大学
- [図書](計 1 件)
1. Takahashi, Y. and Ito, T. (2011) Structure and function of CDPK: A sensor responder of calcium. In *Coding and Decoding Calcium Signals in Plants*. S. Luan, ed., Signaling and Communication in Plants 10, 129-146, Berlin: Springer-Verlag. DOI:

10.1007/978-3-642-20829-4_9.

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ppclab/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋陽介 (TAKAHASHI YOHSUKE)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90183855