

氏名 さいとう しゅん や 齋藤 俊也
 授与学位 博士(工学)
 学位授与年月日 平成30年3月27日
 学位授与の根拠法規 学位規則第4条第1項
 研究科, 専攻の名称 東北大学大学院工学研究科(博士課程) バイオ工学専攻
 学位論文題目 植物のイオン輸送体の活性制御機構の解析
 指導教員 東北大学教授 魚住 信之
 論文審査委員 主査 東北大学教授 魚住 信之 東北大学教授 中山 亨
 東北大学教授 梅津 光央

論文内容要旨

【第一章・序論】動物・植物などの高等生物から細菌に至るまで、全ての生物の細胞にはイオン輸送体と呼ばれる膜貫通型タンパク質が存在し、様々な生理的役割を担っている。

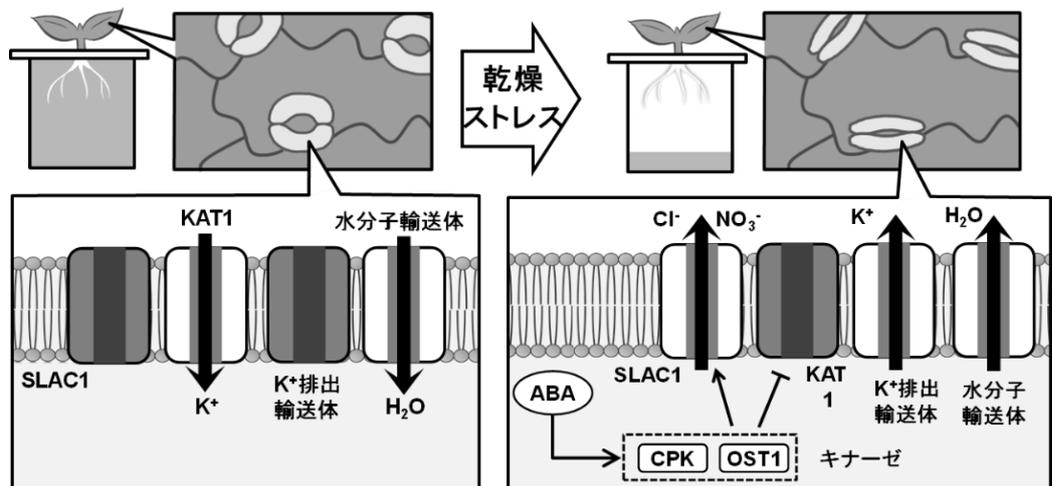


図1 乾燥ストレスに応答した気孔の閉鎖メカニズム

イオン輸送体は必要に応じて、特定のキナーゼ(リン酸化酵素)によってリン酸化されることによりその輸送活性が制御される。特に植物において、この制御機構は塩・乾燥などの環境ストレスへの耐性獲得に重要となる。一例として、乾燥ストレスに応答した気孔の閉鎖メカニズムを図1に示した。植物が乾燥ストレスを感知すると乾燥ストレスホルモンであるABA(アブシジン酸)が生合成され、ABAからのシグナルがCPK6やOST1などのキナーゼに伝達される。その後、キナーゼが気孔の陰イオン排出輸送体SLAC1をリン酸化し活性化させ、またK⁺取込輸送体KAT1をリン酸化し抑制する。最終的に生じた浸透圧差により気孔から水分子が流出することで細胞が収縮し気孔が閉鎖され、蒸散を防ぐことで植物は水分の損失を抑える。このようなイオン輸送体の制御機構の詳細を明らかにすることにより、塩害や乾燥に見舞われた土地でも育成できる植物の創生などが期待される。そこで、本研究ではCa²⁺依存型

キナーゼ CPK6 の脂質修飾の解析^[1], CBL5-CIPK 複合体のターゲット探索^[1], KAT1/AKT2 キメラ輸送体の解析^[2]を行った。

【第二章・Ca²⁺依存型キナーゼ CPK6 の脂質修飾の解析】 タンパク質の翻訳後修飾の一種である脂質修飾(ミリストイル化・パルミトイル化)は、水溶性タンパク質の局在を細胞質から膜へと移行させる。当研究室では以前より Ca²⁺依存型キナーゼファミリーCPK の脂質修飾についての解析を進めており、全 34 種存在する CPK のほぼ全てがミリストイル化することを突き止めている。このことから、脂質修飾が CPK の機能に重要な役目を果たしている可能性が高い。そこで、乾燥ストレスに応答した気孔閉鎖に重要な CPK6(図 1)を代表として用い、脂質修飾と CPK の機能の関係を調査した。まず、脂質修飾欠損型の CPK6 (CPK6 G2A, CPK6 C5S)を作成し、これを気孔の陰イオン輸送体 SLAC1 とともに Oocyte (アフリカツメガエル卵母細胞)に発現させ、SLAC1 の輸送活性を測定した(図 2)。その結果、CPK6 G2A および C5S は SLAC1 の活性化能力を失っていることが明らかとなった。また、ミュンスター大学 Kudla 教授らのグループによる実験で、CPK6 G2A および C5S は細胞膜への局在が損なわれていることが判明した。最後に、気孔の ABA 感受性(図 1)が損なわれている *cpk3cpk6* 二重遺伝子欠損植物に対し、CPK6 もしくは CPK6 G2A, CPK6 C5S を再導入して

ABA 投与による気孔開口度の変化を観察した(図 3)。その結果、CPK6 WT(変異なし)を再導入した植物は気孔の ABA 感受性が回復したのに対し、G2A および C5S を再導入した植物は ABA 感受性の回復は見られなかった。以上から、CPK6 の脂質修飾は乾燥ストレスに応じた気孔閉鎖に必須であることが証明された。

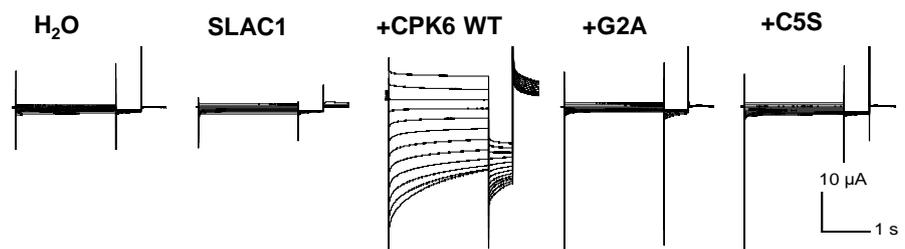


図2 脂質修飾欠損型 CPK6 の SLAC1 活性化能力の解析

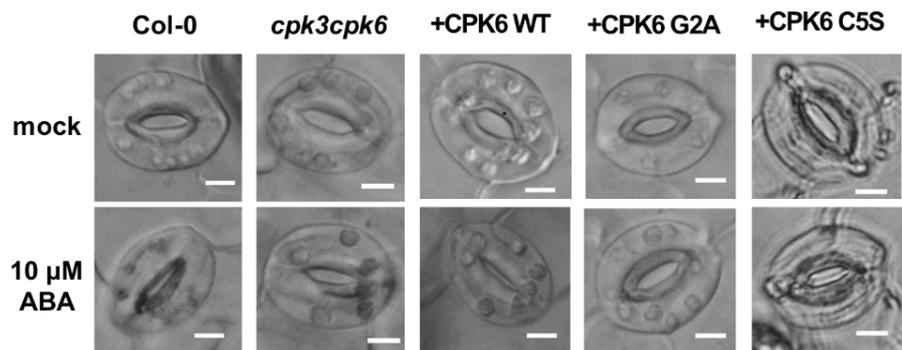


図3 CPK6 再導入植物における気孔の ABA 応答

【第三章・CBL5-CIPK 複合体のターゲット探索】 CPK と同じく Ca²⁺を感知するタンパク質である CBL (Calcineurin B-like protein)は、26 種類存在する CIPK (CBL-interacting protein kinase)と特異的な複合体を形成し様々な輸送体を制御している。全 10 種存在する CBL のうち、CBL5 は種々のストレス応答に関わっていることが示唆されているものの^[3], 具体的にどのような輸送体を制御す

るのかはわかっていない。過去の知見において CBL1-CIPK23 複合体が SLAC1 を活性化し^[4], また CBL5 の気孔への発現が示唆されていたため^[5], CBL5-CIPK 複合体が SLAC1 を活性化する可能性がある。そこで, CBL5 と相互作用する全 11 種類の CIPK (CIPK1, 5, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 24, 26) について, Oocyte に SLAC1 および CBL5 と共に発現させて SLAC1 の輸送活性を測定したところ, CBL5-CIPK11 複合体が特異的に SLAC1 を活性化することが判明した。また, CPK6 と同様, CBL5 に対する脂質修飾が卵母細胞上で SLAC1 を活性化するために必要であることがわかった。しかし, *cbl5* 遺伝子欠損植物は気孔の ABA 感受性(図 1)を示したため, CBL5 は *in vivo* で SLAC1 を活性化している可能性は低くなった。そこで, 各種 CBL5-CIPK 複合体に対して, SLAC1 と関連するイオン輸送体を候補として, Oocyte を用いた輸送活性測定により CBL5-CIPK 複合体のターゲット探索を行った。その結果, CBL5 は SLAC1 のホモログである SLAH2, SLAH3, 気孔の K⁺輸送体 KAT1, KAT2, 師管の Na⁺輸送体 HKT1 を制御していることが判明した。

【第四章・KAT1/AKT2 キメラ輸送体の解析】 気孔の K⁺取込輸送体 KAT1 と根の K⁺両方向輸送体 AKT2 は, 同じ Shaker 型輸送体でありながら発現系によって異なる機能を持つ。Oocyte では KAT1, AKT2 は共に K⁺輸送能力を発揮するのに対し, 酵母では KAT1 のみ機能し, AKT2 は機能しない^[6]。この違いが輸送体のどの部分に起因するかを解析することによって, 輸送体の活性に重要な部位

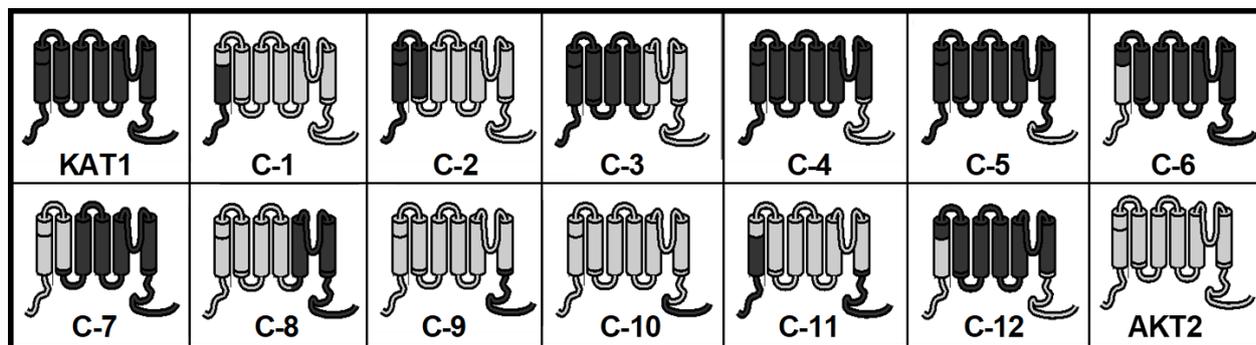


図4 作成した KAT1/AKT2 キメラ輸送体の一覧

の探索を試みた。そのために, 図 4 に示したような KAT1 と AKT2 のキメラ輸送体を 12 種類作成し, これらを酵母および Oocyte に発現させることで, キメラ輸送体の機能の解析を行った。まず, K⁺輸送体欠損酵母に対し KAT1/AKT2 輸送体を発現させ生育試験を行ったところ, K⁺濃度 100 mM の培地では全てのキメラ輸送体発現酵母が生育したのに対し, K⁺濃度 7 mM の培地では KAT1, C-4, C-6, C-7, C-12 を発現させた酵母のみ生育が確認された。次に, Oocyte に各キメラ輸送体を発現させ輸送活性を測定した。これらの輸送特性を KAT1, AKT2 のものと比較した結果, 以下のことが新たに明らかとなった。1. KAT1 の N 末端および C 末端は輸送体の膜電位依存性に関与している。2. AKT2 の N 末端は輸送体の機能自体に重要である。3. AKT2 の N 末端から 2 番目の膜貫通ドメインまでの部分は K⁺輸送の方向を決定づけるのに重要な部分である。

【第五章・結言】 以上により，イオン輸送体の活性制御機構について新たな知見が得られた。今後，塩・乾燥耐性植物の創生や植物の育成効率の工場などへの応用に向け，さらなる研究によりこれらのメカニズムの全貌を解き明かしていく。

【参考文献】 [1]Saito et al., *New Phytologist*. In press. [2]Saito et al., *Channels*. 2017;1-7 [3]Cheong et al., *Mol Cells*. 2010;29(2):159-165. [4]Maierhofer et al., *Sci Signal*. 2014;7(342):ra86. [5]Schmid et al., *Nat Genet*. 2005;37(5):501-506. [6]Cao et al., *Plant Physiol*. 1995;109(3):1093-1106.

論文審査結果の要旨

本研究は、植物の膜内在性イオン輸送タンパク質(以下イオン輸送体)の活性制御機構の詳細を解明し、植物の環境ストレス耐性への応用を目的として行われた。本論文は「植物のイオン輸送体の活性制御機構の解析」と題し、序章を含む以下の全5章から構成されている。

序章(第1章)では、種類を問わず全ての生物にとってのイオン輸送体の普遍的な重要性について述べ、イオン輸送体が必要に応じてリン酸化酵素(キナーゼ)等による活性制御を受けることを論じている。特に植物において、この活性制御機構は塩、乾燥などの環境ストレスへの応答に重要であり、イオン輸送体の活性制御機構を解明することで、環境ストレス耐性植物の創生や植物工場での育成効率の向上などの応用が可能である旨を述べ、本研究の重要性を明確にしている。

第2章では、乾燥ストレスによる気孔閉鎖を担う Ca^{2+} 依存型キナーゼ・CPK6 について、脂質修飾の重要性について論じている。脂質修飾欠損型 CPK6 の細胞内局在解析および電気生理学的な解析から、CPK6 の機能における脂質修飾の重要性を明確に示している。また、*cpk6* 遺伝子欠損植物に対し脂質修飾欠損型 CPK6 を導入し、乾燥ストレスホルモン ABA に対する気孔の応答を解析することにより、乾燥ストレス応答性気孔閉鎖において CPK6 の脂質修飾が必須であることを証明している。

第3章では、 Ca^{2+} センサータンパク質 CBL の中で、環境ストレス応答に関わっていることが示唆されているながら具体的な役割が未解明である CBL5 に着目し、CBL5-CIPK 複合体キナーゼの活性制御対象となるイオン輸送体の探索を行っている。電気生理学的な解析から、CBL5-CIPK 複合体が特定の組合せで、気孔の開閉・根から道管への NO_3^- 輸送・道管から師管への Na^+ 輸送などを行う7種類の輸送体を制御することを明らかにしている。また、脂質修飾欠損型 CBL5 を用いた細胞内局在解析および電気生理学的解析により、CBL5 の脂質修飾が CBL5-CIPK 複合体の機能に重要であることを実証している。

第4章では、2種類の K^+ 輸送体 KAT1 および AKT2 が発現系により異なる機能を発揮することに着目し、KAT1 および AKT2 について機能上重要な部位の探索を行っている。KAT1 と AKT2 を様々な部位で組み合わせたキメラ輸送体を作成し、これらについて酵母を用いた生育相補試験や電気生理学的解析を行うことにより、KAT1 および AKT2 について、これまで明らかにならなかった新たな活性重要部位の同定に成功している。

第5章は、本論文の総括である。

以上の通り本論文は、イオン輸送体を制御する種々のキナーゼやイオン輸送体自体の活性重要部位について詳細に解析することで、植物のイオン輸送体活性制御機構の全容解明に意義深い知見を与えた。本論文に得られた知見は生物の環境ストレス適応制御開発に関する基盤研究として重要なものである。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。