

研究題目 プロテオーム解析による新奇気孔開口シグナル伝達因子の同定

研究組織

研究代表者：井上 晋一郎（東海国立大学機構 名古屋大学 大学院理学研究科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

植物の体表に存在する気孔は、太陽光に含まれる青色光に応答して開口し、光合成に必要な二酸化炭素の吸収を支える重要な器官である。気孔の開口は、気孔孔辺細胞において青色光受容体である phototropin (phot)がシグナル伝達を経て細胞膜 H⁺-ATPase を活性化することが必要であるが、phot がどのように細胞膜 H⁺-ATPase を活性化するのか、シグナル伝達の詳細は不明である。

そこで本研究では、プロテオーム解析により phot と細胞膜 H⁺-ATPase の細胞内相互作用パートナーを明らかにし、気孔開口における未知のシグナル伝達因子を同定する。同定された因子の機能解析により、気孔開口の分子メカニズムの理解を前進させることを目的とする。

[1-2]研究の方法・経過

本研究では、phot と細胞膜 H⁺-ATPase の相互作用因子の同定に、近接依存性ビオチン標識法を採用する。人工的に改変したビオチンリガーゼ(TurboID と AirID)を phot と細胞膜 H⁺-ATPase に融合させたタンパク質をシロイヌナズナに導入し、細胞内の相互作用パートナーをビオチン化修飾させ、プロテオーム解析によりビオチン化されたタンパク質を網羅的に同定する。

遺伝子組換え植物の準備段階において、TurboID を融合する細胞膜 H⁺-ATPase は世代を超えて安定に維持できないことが分かったため、融合させるビオチン化酵素は AirID に絞り準備を進めた。今年度の後半にようやく組換え植物が完成したため、細胞膜 H⁺-ATPase と細胞内で相互作用するタンパク質の探索を進めた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

今年度のプロテオーム解析の結果から、細胞膜 H⁺-ATPase の相互作用パートナー候補が 300 個ほど得られた。データベースを駆使して、その中から細胞内局在の不適切なタンパク質や構造タンパク質を除き、気孔開口のシグナル伝達を仲介しそうな候補タンパク質をさらに絞った。現在、候補タンパク質をコードする遺伝子の遺伝子破壊株の作成を進めている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

シグナル伝達因子の遺伝子重複性と、変異体の致死性の問題により、気孔開口メカニズムの研究において遺伝学的な探索は行き詰まっている。そのため、逆遺伝学的アプローチがこの問題を打開すると考え、本研究の相互作用パートナー探索を着想し、実施した。期待通り、多くの細胞内相互作用パートナー候補が得られ、今後の研究進展が大いに期待できる。

近年、近接依存性ビオチン標識法によるタンパク質間相互作用の検出や相互作用パートナー探索は急速に進歩し普及が進んでいるが、植物研究においてはまだ数えるほどしか実施されていない。そこで本研究では、この新しい相互作用パートナー探索法を導入し、停滞する気孔開口メカニズムの理解を前進させたい。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今年度はプロテオーム解析の条件検討を兼ねていたため、細胞膜 H^+ -ATPase の相互作用パートナーのみ探索を行った。今年度の知見を活かし、今後は *phot* の相互作用パートナー探索も進めたい。

また、今回同定した候補タンパク質に関して、細胞膜 H^+ -ATPase との相互作用を *in vitro* pull-down assay や BiFC 法などの別の手法により確認し、有力な候補から機能解析を進める。候補タンパク質をコードする遺伝子の T-DNA 遺伝子破壊植物をリソースセンターから取得し、気孔開口の表現型を詳細に解析する。