

## 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

植物の表皮に存在する気孔は、一対の孔辺細胞で構成された穴であり、太陽光に含まれる青色光に応答して開口する。植物は、気孔を介して光合成に必要な二酸化炭素を大気から体内に取り込むため、気孔の開口は植物の光合成と成長を支える重要な光応答である。

気孔開口は、孔辺細胞が青色光に応答して膨張することにより誘導される。この孔辺細胞の膨張は、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<sup>+</sup>-ATPase を活性化し、この酵素が様々なイオンの取り込みを駆動することにより達成される。ところが、青色光を受容した phot がどのように細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase を活性化するのか、シグナル伝達の詳細は明らかになっていない。これまでの研究により、シグナル伝達因子の遺伝子重複性と、変異株の致死性の問題により、気孔開口メカニズムの解明における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た。

そこで本研究では、プロテオーム解析を行い、phot と細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の細胞内相互作用パートナーを新たに明らかにする。同定された相互作用因子の機能解析により、最終的には気孔開口における未知のシグナル伝達因子を同定し、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<sup>+</sup>-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。まず、人工的に改変したビオチンリガーゼ(AirID)を phot と細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase に融

合させたタンパク質(phot1-AirID、AirID-AHA1、AHA1-AirID)と、対照として AirID を細胞膜にリクルートしたタンパク質 (MD-AirID) をシロイヌナズナに導入し、融合タンパク質を安定して発現する形質転換植物を作成した。それらの植物を使い、細胞内の phot と細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase 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した。このときのプロテオーム解析を、酵素学研究拠点の小迫英尊教授との共同研究により進めた。

遺伝子組換え植物の作成段階において、AirID を融合する phot は世代を超えて安定に維持されないことが明らかになったため、今年度は細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase に AirID を融合させた AirID-AHA1 や AHA1-AirID を発現する植物を用いてプロテオーム解析を進めた。MD-AirID を発現する植物と比較して、AirID-AHA1 や AHA1-AirID を発現する植物において特異的にビオチン化され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で、対照である MD-AirID を発現する植物に比べ、AirID-AHA1 と AHA1-AirID を発現する植物において2倍以上の強度でビオチン化されたタンパク質を500個以上検出した。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。その結果、現段階において細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の相互作用パートナーとして30個ほど候補を得ている。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入手や作成を進めている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究では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結果となった。

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の有用性を証明し、この手法により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 AirID を融合した phot や細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase を発現する形質転換植物を作成し、そのうち細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の方でプロテオーム解析まで進めることができた。phot1-AirID を発現する植物に関しては、今後さらに形質転換植物作成を続け、世代を経ても発現が維持される株を選抜してパートナー探索を進めたい。また、今年度の知見を活かし、今後は細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の活性を変化させるような刺激の有無で相互作用パートナー探索も進めたい。さらに、今回同定した候補タンパク質に関して、細胞膜 H<sup>+</sup>-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、もしくはゲノム編集により作成し、気孔開口の表現型を詳細に解析する。