JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	気孔の数を調節するシグナルが細胞の外から内へ伝達される仕組み
Author(s)	大木，進野
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書：1-4
Issue Date	2016-06-01
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/13696
Rights	
Description	基盤研究(C)（一般），研究期間：2013～2015，課題番号：25440017，研究者番号：70250420，研究分野：構造生物化学

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：１３３０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４４００１７

研究課題名（和文）気孔の数を調節するシグナルが細胞の外から内へ伝達される仕組み

研究課題名（英文）Mechanism for regulating stomatal density by signaling from outside to inside of cells

研究代表者
大木　進野（Shinya, Ohki）

北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・教授

研究者番号：７０２５０４２０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：気孔密度を調節するペプチドホルモンと受容体タンパク質の相互作用を原子分解能で解明することが本課題の目的である。本課題ではまず大腸菌と植物培養細胞を利用して受容体タンパク質の各種ドメイン、フラグメントを調製する系を確立した。その後、これらを構造解析や相互作用実験に使用するため試料条件を探索した。各種デタージェントの効果を検討した結果、有るフラグメントについては有望な条件を見いだすことができ、非標識体試料の2次元NMRスペクトルを測定することに成功した。本課題期間中には本格的な構造解析・機能解析に至らなかったが、今後の展開を大いに加速させる基礎的な成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Purpose of this project is exploring the interaction between peptide hormones regulating stomatal density and their receptors at atomic resolution. First of all, we had established expression systems of some domains and fragments of the receptors using E. coli and/or BY-2. Next, we had extensively searched the adequate sample solution condition for analyzing the interaction. As the result of this screening for estimating the utility of various detergents, we fortunately found a certain condition for the experiments. We successfully measured a two-dimensional NMR spectrum of the unlabeled sample in this condition. Unfortunately, the screening to find the good sample condition took very long time, so that deeper structural analyses were not performed. However, the preliminary results obtained here seem to promote the research work in near future.

研究分野：構造生物化学

キーワード：気孔　ペプチドホルモン　受容体　相互作用

１．研究開始当初の背景

植物の気孔の数を増やす因子は近年まで同定されていなかったが、その働きを持つ分泌性ペプチドホルモン（ストマジェン）が遂に 2010 年に発見された（Sugano, et al. *Nature*(2010) 463, 241)。不思議なことに、このペプチドホルモンのアミノ酸配列は、当時既に知られていた気孔の数を減らすペプチド（EPF1, EPF2; embryo patterning factor）のそれと非常に相同性が高いことが同時に報告された。また、遺伝子データベースの検索の結果、類似のアミノ酸配列を持つペプチドも複数見つかった。これらはよく保存された Cys 残基を６個持ち、分子内に３組のジスルフィド（SS）結合を有していることが確認された。しかも、多くの研究者の実験によってストマジェンも EPF2 もともに同一の受容体膜タンパク質（TMM(too many mouth) と ERECTA）と相互作用をするということがわかってきた。このように相反する生理活性を持つ複数の分子が受容体と相互作用した結果として気孔密度が調節されているらしい。しかしながら、その詳細は不明である。

我々は、この調節メカニズムに興味を持ち、これを分子構造レベルで解明する研究に携わっている。2011 年には、気孔の数を増やすストマジェンの立体構造解析と分子内機能部位の特定に成功した（Ohki, et al. *Nat. Commun.* (2011) 2, 512)（図１）。

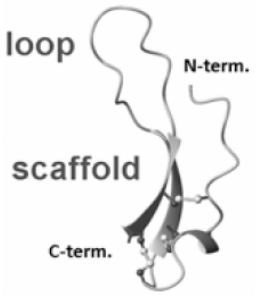

図１　ストマジェンの立体構造

次に明らかにしたいことは、気孔の数を増やす（あるいは、減らす）ペプチドホルモンと受容体膜タンパク質の相互作用である。今日に至るまで、これら受容体の立体構造や相互作用部位は全く明らかになっていない。

気孔の数を調節するメカニズムが明らかになれば、それを基にした農薬の設計と開発が可能になり、食料問題や環境問題の解決に大きな寄与ができるものと期待される。

２．研究の目的

本研究の目的は、気孔密度を調節するペプチドホルモン（ストマジェンと EPF2）とその受容体膜タンパク質（TMM と ERECTA）の相互作用を分子構造レベルで解明し、シグナルが細胞の外から内へどのように伝達されるかを知ることにある。

より具体的な研究の目的を以下に述べる。まず、受容体膜タンパク質全体あるいは相互作用にかかわる部分の立体構造を明らかにすることである。次に、その分子あるいはドメイン、フラグメントのどのアミノ酸残基とペプチドホルモンのどのアミノ酸残基がどのように相互作用するかを明らかにすることである。さらに、その相互作用の前後で受容体膜タンパク質がどのような構造変化をするか、立体構造の安定性や運動性がどのように変わるかを明らかにすることである。これらの実験事実に基づいて、細胞の外から内へどのようにシグナルが伝達されるかを分子・原子レベルで解明する。

３．研究の方法

大腸菌や植物培養細胞を用いた遺伝子組み替え技術で、TMM および ERECTA の細胞外ドメインもしくはその一部分を発現するシステムを構築した。それぞれの試料の N 末端側には、His x 6 タグとエンテロキナーゼ切断配列をタンデムに連結して、発現系を構築した。タバコ培養細胞（BY-2 細胞）を利用した実験試料の調製システムは我々の独自技術である。この方法は SS 結合を有するタンパク質を成熟型の状態で調製することが出来るため、ストマジェンや EPF2 の調製に威力を発揮する。

ソニケーションによる細胞破砕、各種カラム操作、塩析、透析、限外濾過の方法を組み合わせて、試料タンパク質、ドメイン、フラグメントを精製した。

凍結乾燥、限外濾過、減圧濃縮の各種法を利用して高濃度試料の調製を試みた。このとき、温度、塩の種類、塩濃度、pH などの最適条件を検討した。また、試料溶液に対して両親媒性の脂質や試料安定化試薬を試みた。

当初は、試料条件の検討の後で X 線結晶構造解析に供する結晶化の試みや、各種他核多次元 NMR スペクトルを取得しての構造解析と相互作用解析を行う予定であったが、次項に詳細を述べるようにその段階まで研究を進めることが出来なかった。

４．研究成果

初年度には、大腸菌ならびに植物培養細胞 BY-2 を利用して、TMM と ERECTA の研究用試料を発現するシステムを確立した。アミノ酸配列の解析から、それぞれの細胞外ドメインは 100 残基前後で構成される N 末ドメイン端部分とロイシン・リッチ・リピート（LRR）部分から成り立っていることが予測できた（図２）。

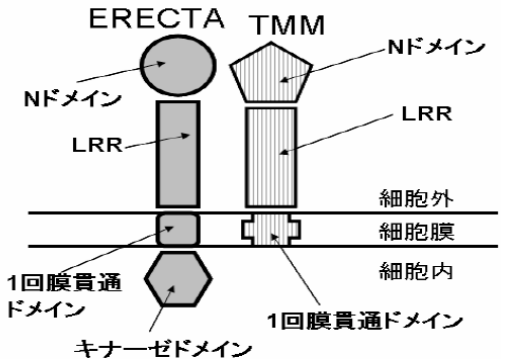

図２　気孔密度を調節するペプチドホルモンと相互作用する受容体膜タンパク質の模式図

そこで、２次構造の予測結果をもとにこれらを幾つかの異なる領域に分割したフラグメント、ならびに、細胞外ドメイン全体を発現する系を構築した。これらのうちいくつかに関しては、発現量も十分にあり、精製方法も確立することができた。しかしながら、どの試料も溶解度が極端に低く、構造解析が可能なレベルまで試料濃度を上げていくことが困難を極めた。特に、LRR そのものや LRR 部分を含むフラグメントについては、糖鎖付加やその生理活性への影響についての報告がないため、全て糖鎖が付加していない状態の試料を取り扱った。これも溶解度が向上しなかった原因のひとつであると考えられる。試料が比較的低濃度の段階でも分子がアグリゲーションを起こしていることを１次元 ^{1}H-NMR スペクトルから確認することが出来た。このため、それ以上の構造情報を取得するための各種分析を行うことができなかった。

２年目には、この状況を打開すべく、塩の種類と濃度、pH、温度など各種の水溶液条件を検討した。しかしながら、構造解析が可能となるような良好なコンディションを見いだすことは出来なかった。

最終年度では、各種デタージェントの活用を試みた。まず、膜タンパク質試料の分子表面に露出している疎水性残基の領域を覆い隠すようにして試料を可溶化する働きを持つ DOPC（1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）や DHPC（1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）等の両親媒性分子を共存させた状態で試料の溶解度を確認した。次に、試料の構造安定性増大や溶解度向上に効果があるとされる COS（choline-O-sulfate; SI サイエンス社製）、stabil-PAC（コスモバイオ社製）など、各種のデタージェントの効果を検討した。安定同位体標識試料も幾つか調製して NMR スペクトルを確認しながら条件検討を行ったが、アグリゲーションの影響で殆どの条件では NMR シグナルが観測できなかった。

これら一連のスクリーニング実験の結果、有るフラグメントについては、詳細な NMR 実験に際して利用可能な程度の良好な NMR スペクトルを与える水溶液条件を見いだすことに成功した。その条件で非標識体の NMR 試料を調製して、良好な２次元 NMR スペクトルを測定することができた。NMR データのうちのひとつを例として図３に示す。

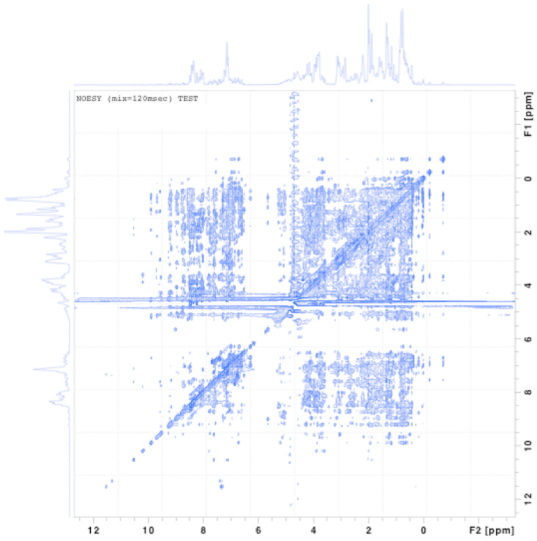

図３　気孔密度を調節するペプチドホルモンと相互作用する受容体膜タンパク質細胞外ドメインの一部に相当するフラグメントの２次元 NOESY スペクトル（混合時間 120msec, 試料温度 25 度, Bruker AVANCE III 800MHz スペクトロメータ（TCI クライオプローブ付き）で測定）

この２次元 NOESY スペクトル中には低磁場シフトしたα ^{1}H など安定な２次構造の形成を示唆する典型的なピークとそれに関係するクロスピークを確認することができる。従って、このスペクトルは、試料が水溶液中で安定な立体構造を保持していることが強く示唆している。

本課題を通して、受容体膜タンパク質の水溶液中での構造解析ならびにペプチドホルモンとの相互作用解析の実験を遂行するにふさわしい条件がほぼ見いだされたと言える。

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１件）

１）　植物の気孔密度を調節する機構，大木進野、森正之，NMR（日本核磁気共鳴学会機関誌），5，26-32，2014（査読あり）

〔学会発表〕（計８件）

１）　SS 結合を有するタンパク質の構造生物学，大木進野，第５回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム，岐阜薬科大学（岐阜県岐阜市），2016 年 3 月 10 日

２）　Protein NMR; From methodology to application, S. Ohki, BICON2015, Jaipur（India），2015.9.20-26

３）　NMR Study of Plant Defensin-like Peptides, S.Ohki, Y.Umetsu & M.Mori, XXVI ICMRBS, Dallas（米国）　2014 年 8 月 24-29 日

４）　植物培養細胞を用いた標識試料の調製方法とその応用例，大木進野，第 53 回 NMR 討論会，大阪大学（大阪府吹田市），2014 年 11 月 4～6 日

５）　植物細胞発現系を用いた植物由来ホルモンの立体構造解析，梅津喜崇、正之、大木進野，第 53 回 NMR 討論会，大阪大学（大阪府吹田市），2014 年 11 月 4～6 日

６）　植物細胞を用いたタンパク質の発現とディフェンシン様ペプチドの NMR 研究，梅津喜崇、森正之、大木進野，第 52 回 日本生物物理学会，札幌コンベンションセンター（北海道札幌市），2014 年 9 月 25～27 日

７）　調製が困難なタンパク質の発現技術の開発，森正之、梅津喜崇、大木進野，第 6 回北陸合同バイオシンポジウム，国民宿舎能登小牧台（石川県珠洲市），2013 年 11 月 8-9 日

８）　調製が困難なタンパク質の発現技術の応用，大木進野、竹内誠、森正之，第 6 回北陸合同バイオシンポジウム，国民宿舎能登小牧台（石川県珠洲市），2013 年 11 月 8-9 日

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.jaist.ac.jp/ms/labo/box/ohki.html

６．研究組織
(1)研究代表者
大木　進野（OHKI SHINYA）
北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・教授
研究者番号：７０２５０４２０

(2)研究分担者
森正之（MORI MASASHI）
石川県立大学・生物資源工学研究所・准教授
研究者番号：００３２０９１１

(3)連携研究者
鈴木守（SUZUKI MAMORU）
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号：４０２８０５０７