

植物の気孔の数を調節する二足のわらじの分子メカニズム

～ ヒトと共通性を持ち、独自で巧妙な情報伝達 ～

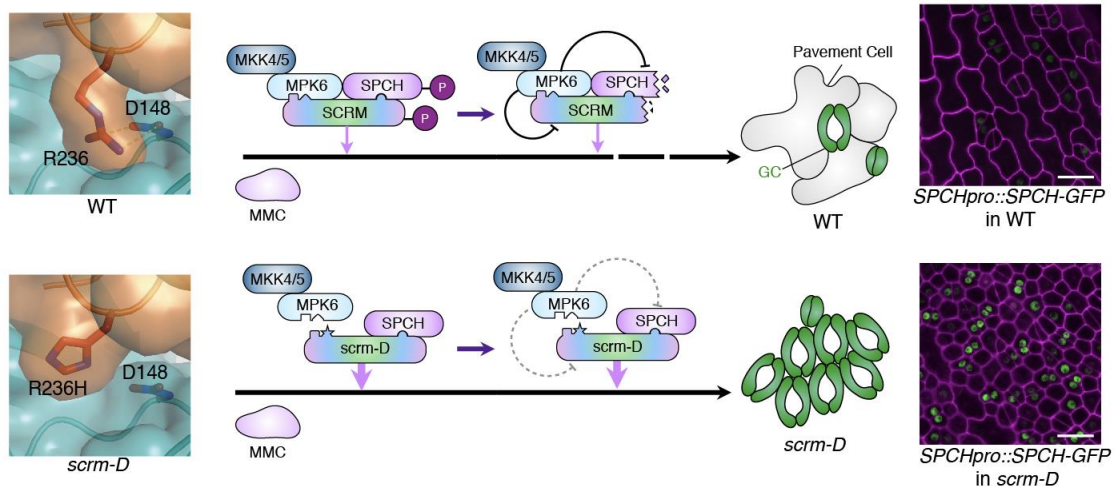
名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM) の鳥居 啓子 主任研究者／客員教授 (米国ワシントン大学教授、ハワードヒューズ医学研究所正研究員)、フロランス・タマ教授らの研究グループは、植物学と構造生物学を組み合わせ、気孔の発生を制御するタンパク質の三次元構造を解くことにより、気孔の数を適切に調節する分子メカニズムを明らかにしました。

気孔は、ほぼ全ての陸上植物に存在し、光合成のためのガス交換や水分の制御を担っています。葉の表面で気孔が正常に働くには、環境に適した数の気孔が一定の間隔で作られることが重要です。研究グループらのこれまでの成果から、代表的な陸上植物であるシロイヌナズナでは、細胞どうしのシグナル交換により、MAP キナーゼカスケード^{注1)}と呼ばれる細胞内情報伝達経路を介して、気孔を作る司令因子スピーチレス

(SPEECHLESS, SPCH) が制御され、気孔の数が増えすぎないように限定されることがわかっていました。今回、細胞内情報がどうやって SPCH に届けられるのかを明らかにするため、SPCH のパートナー因子であるスクリーム (SCREAM) に着目しました。その結果、SCREAM は MAP キナーゼと強く結合する領域を二ヶ所もち、MAP キナーゼと SPCH を細胞核内で間接的に結合させることがわかりました。SCREAM の MAP キナーゼ結合部位に突然変異が起こると MAP キナーゼが SPCH を抑制できず、ほぼ全ての葉の表皮が気孔になってしまいます。さらに、X 線結晶解析^{注2)} による MAP キナーゼの 3 次元構造と *ab initio* 構造モデルを併せて、SCREAM と MAP キナーゼの結合様式を解明しました。MAP キナーゼは、私たちヒトの細胞内情報伝達の根幹をなしており、細胞の増殖や分化、癌化に直接関わっています。本研究から、植物とヒトの MAP キナーゼの構造は殆ど同じであるものの、SCREAM はヒトの MAP キナーゼ基質と共通な結合様式と植物独自の結合様式の 2 つを駆使して「遺伝子発現の司令因子であり、かつ、MAP キナーゼが SPCH に作用するための足場タンパク質である」という「二足のわらじ」の役割をもつことが明らかになりました。今回の発見は、ヒトとの共通性を持ちつつも植物が独自で巧妙な情報伝達の仕組みをもつことを示すものといえます。

【ポイント】

- モデル植物シロイヌナズナの気孔を作る司令因子を制御する分子メカニズムを構造生物学的手法を用いて解明しました。
- 気孔の分化を開始させる司令因子スピーチレス (SPCH) は MAP キナーゼと呼ばれる細胞内情報伝達因子によって制御されますが、SPCH のパートナー因子であるスクリーム (SCREAM) が MAP キナーゼと結合し、シグナル情報伝達を細胞核へ伝えることによって MAP キナーゼと SPCH が間接的に結合し、気孔の数が一定に保たれることがわかりました。
- SCREAM は KRAAM^{注3)} 領域と呼ばれる SCREAM に独自に見られるアミノ酸配列を介して MAP キナーゼに結合することがわかりました。突然変異によって SCREAM が MAP キナーゼに結合できなくなると、MAP キナーゼの基質としてタンパク質リン酸化修飾が起こらず、結果として SCREAM と SPCH の両者が分解されなくなり、表皮細胞の殆ど全てが気孔になります。
- KRAAM 領域と呼ばれる SCREAM の MAP キナーゼ結合配列は、スギゴケやイネ、トマトなどの気孔をもつ陸上植物に広く保存されていることもわかりました。
- 構造生物学的解析から、植物の MAP キナーゼ (MPK6) はヒトの MAP キナーゼと殆ど同じ 3 元立体構造をしているものの、SCREAM はヒトの MAP キナーゼ基質と共通な結合様式と植物独自の結合様式の 2 つを駆使して、「遺伝子発現の司令因子であり、かつ、MAP キナーゼが SPCH に作用するための足場タンパク質である」という二つの役割をもつことが明らかになりました。
- MAP キナーゼは、私たちヒトの細胞内情報伝達の根幹をなしており、細胞の増殖や分化、癌化や細胞死などに直接関わっています。植物の MAP キナーゼも胚発生など様々な発生プロセスのみならず、免疫反応や傷害ストレスの細胞内情報伝達を担っています。植物の MAP キナーゼと SCREAM 以外の基質との結合構造はまだわかっていません。今回の発見は、ヒトとの共通性を持ちつつも植物が独自で巧妙な情報伝達の仕組みをもつことを示すとともに、植物の免疫反応やストレス反応などの仕組みの理解と操作へつながるものです。



【研究背景と内容】

植物の気孔は、陸上植物のほぼ全ての種の光合成器官（葉など緑色の部分）の表皮に散在し、ゼリービーンズのような2つの孔辺細胞が小さな穴を囲んだ形をしています。植物は気孔を介して二酸化炭素を取り込み、光合成の副産物である酸素を大気中に放出することにより、地球環境に貢献しています。また、気孔から蒸散する水蒸気は、私たちが汗をかくように、葉の表面温度を下げる効果も持っています。一方、乾燥条件下では、気孔が閉まることにより枯死を防いでいます。このように植物がガス交換と水分制御をするためには、気孔の数が一定数に保たれ、かつ、散在している必要があります。例えば、気孔が大量に塊ってできてしまうと、ちゃんと閉じることができず、植物は萎れやすくなりますし、気孔の穴を介して病原菌などが入り込んだりします。

過去10数年の本研究グループや他グループによるモデル植物シロイヌナズナを用いた発生遺伝学的研究から、スピーチレス(SPEECHLESS, SPCH)と呼ばれる司令因子と、その二量体パートナー因子スクリーム(SCREAM)によって、気孔発生の遺伝子発現プログラムが開始することがわかっていました。一方、隣接した細胞が気孔にならないよう、気孔系譜の細胞は互いにペプチドホルモンを分泌します。このホルモンは、隣の細胞の受容体に結合し、MAPキナーゼカスケードと呼ばれる細胞内の情報伝達経路を活性化することにより、最終的にSPCHを抑制し気孔の発生を負に制御することがわかっていました。しかし、MAPキナーゼはSPCHと直接は結合しないため、どのようにしてSPCHを抑制するのかわかっていませんでした。また、研究グループは、過去にSCREAMの機能亢進型の突然変異体 *scream-D* を見つけて報告していました。この *scream-D* 変異体では、葉の表面の殆ど全てが気孔になってしまいます。*scream-D* 変異体ではSCREAMタンパク質の1アミノ酸が別のアミノ酸に置換していますが、なぜ、たった1アミノ酸の突然変異で「気孔だらけ（叫び：scream）」の特殊な葉が発生するのか全く解っていませんでした。

SPCHの抑制には、MPK3とMPK6という2種類のMAPキナーゼが関わっていることから、研究グループは、まず、SCREAMの役割を調べました。その結果、SCREAMが糊のようにMPK3/6とSPCHを結びつけていることがわかりました。SCREAMはSPCHと二量体を作ることが知られていますが、一方でSCREAMがどうやってMAPキナーゼと結合するのかはわかっていませんでした。そこで、陸上植物のSCREAMタンパク質の配列を比較検討したところ、SCREAMタンパク質ファミリーにはこのファミリーに特徴的な保存配列KRAAM領域が見つかり、またその近傍にはヒトなど動物で知られるMAPキナーゼ結合配列と似た領域が存在することがわかりました(図1)。解析の結果、KRAAM領域とMAPキナーゼ結合配列様領域の両方が、MAPキナーゼ結合部位であることがわかりました。葉の表皮が気孔だらけになる *scream-D* 変異体では、**KRAAM**配列が**KHAAM**とアミノ酸のアルギニン(R)からヒスチジン(H)残基に変異しています。この *scream-D*(**KHAAM**)変異は、MPK3/6の両者と全く結合できないこともわかりました(図1)。

次に、シロイヌナズナのMPK3およびMPK6タンパク質と様々な陸上植物種のSCREAMタンパク質のKRAAM-MAPキナーゼ結合領域との結合キネティクス^{注4)}を定量解析したところ、様々な植物種のSCREAMタンパク質はシロイヌナズナSCREAMと同じようにMPK3およびMPK6タンパク質と結合することがわかりました。面白いことに、コケのSCREAMタンパク質 (*Physomitrella patens ICE1* と呼ばれています)はMPK3とのみ結合し、MPK6とは結合しませんでし

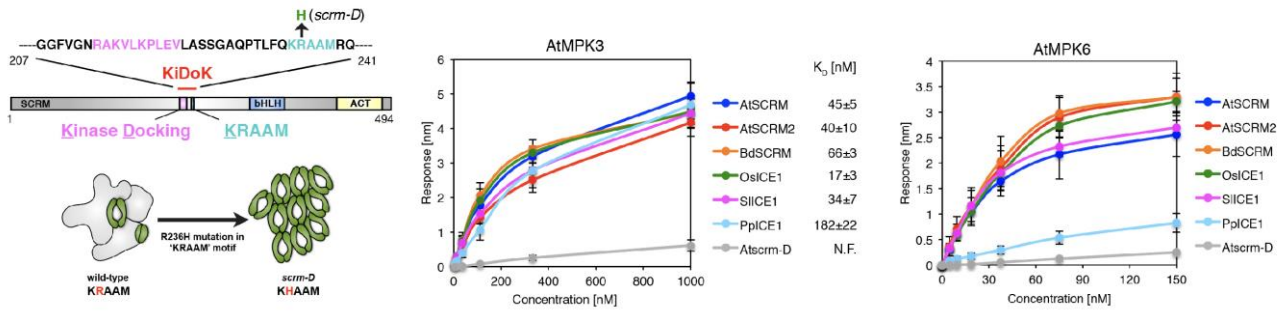


図1：SCREAMタンパク質の模式図（左）および、様々な植物種のSCREAMとMAPキナーゼ（MPK3、中、MPK6、右）の結合の定量解析。アルギニン(R)残基がヒスチジン(H)残基に置換したSCREAMタンパク質(*scrm-D*タンパク質)はMAPキナーゼに結合できず、結果として気孔だらけの葉になってしまう

た。コケのSCREAMにはKRAAM領域は保存されているものの、近傍のMAPキナーゼ結合配列は存在しません(図1)。そこで、同じようにシロイヌナズナSCREAMからもそのMAPキナーゼ結合配列を削り取ったところ、MPK3とは結合するもののMPK6とは結合しないことがわかりました。これまでに、気孔の発生にMPK3とMPK6は全く同じように作用すると考えられていましたが、今回の結果からは、KRAAMとMAPキナーゼ結合配列は、MPK3とMPK6に対して異なる結合能力を持つことが示唆されます。実際に、これらKRAAM領域にさらなる変異を加えたSCREAMや、MAPキナーゼ結合配列様領域を削除したSCREAMをシロイヌナズナに導入したところ、*scream-D*変異と同じように表皮が気孔だらけになってしまいました(図2)。

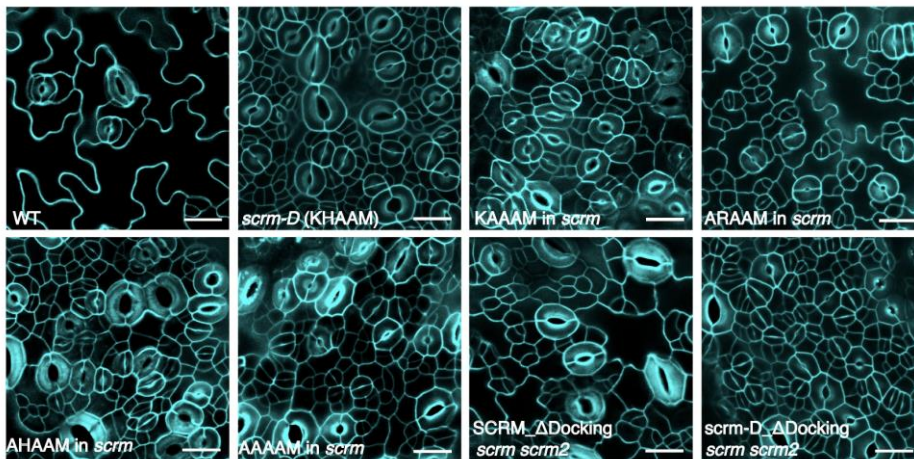


図2：MAPキナーゼと結合できないバージョンのSCREAMは、どれも皆、気孔だらけの葉を作る

次に、MAPキナーゼとSCREAMがどのように結合するのかを解き明かすため、MPK6のX線結晶構造を2.75Å（オングストローム）の解像度で明らかにしました。残念ながらSCRMのKRAAM断片はMPK6と共結晶しなかったため、*ab initio*構造モデル予測法^{注5)}を用いて推定し、実験によって推定モデルの正しさを検証しました。これらの解析から、MPK6のCD領域と呼ばれるMAPキナーゼ基質結合部位にSCREAMのMAPキナーゼ結合配列様領域が結合することがわかりました。一方、KRAAM領域はMAPキナーゼの全く別の部位の結合し、KRAAM領域のアルギニン残基(R236)とMPK6のアスパラギン酸残基(D148)とが相互作用することがわかりました

(図 3A)。この R236 残基は、*scrm-D* 突然変異体でヒスチジン残基に変異しているアミノ酸そのものです。

さらに、シロイヌナズナの MPK6 の三次元構造をヒトの MAP キナーゼ(ERK2)と比較したところ、ほとんど同じ構造であることがわかりました(図 3B)、SCREAM の MAP キナーゼ結合配列様部位は、ヒトの MAP キナーゼが基質と結合する様式と同じように結合することがわかりました。一方、SCREAM の KRAAM 領域と結合する MPK6 部位 (D148) は、ヒト MAP キナーゼと保存されていない植物の MAP キナーゼに独自の配列であることがわかりました。SCREAM の KRAAM 領域は、植物の SCREAM ファミリー因子にしか存在しません。そのため、植物に特異的な MAP キナーゼ結合配列と動植物に保存された結合配列の 2 つを用いて、発生の司令因子にまで細胞内情報伝達が伝わることを示されました。

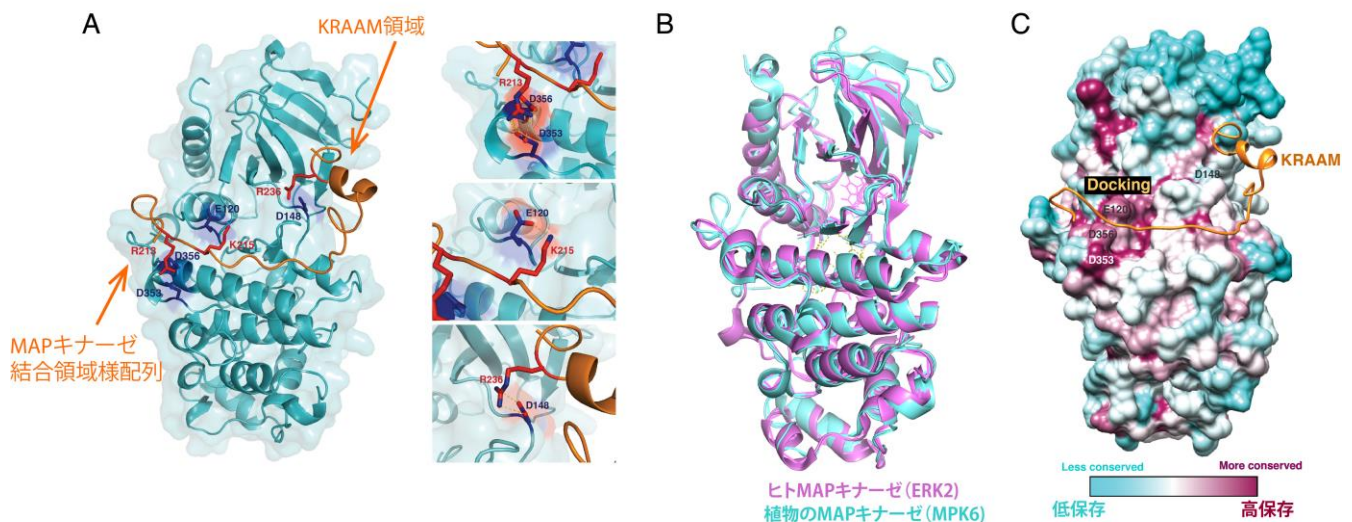


図 3 : 植物の MAP キナーゼ (MPK6) の 3 次元構造と SCREAM との結合様式、および ヒト MAP キナーゼとの比較解析. (A) MPK6 の X 線結晶構造と ab initio モデルによる SCREAM (オレンジ) の結合。SCREAM は KRAAM 領域と MAP キナーゼ結合配列様領域の 2 カ所で MPK6 に結合することがわかった。特に結合に重要なアミノ酸は右に拡大図で示す。(B) ヒト MAP キナーゼ (ERK2) と植物の MAP キナーゼ (MPK6) の 3 次元構造を重ね合わせたもの。非常に似ていることがわかる。(C) 植物の MAP キナーゼ (MPK6) と ヒトの 6 種類の MAP キナーゼを重ね合わせた立体構造。高く保存されている部分はえんじ色、低い部分は水色で示す。SCREAM の MAP キナーゼ結合領域様配列 (オレンジ) は、高度に保存された MAP キナーゼ領域に結合する一方、SCREAM にのみ存在する KRAAM 領域 (オレンジ) は、植物の MAP キナーゼに特異的な領域に結合する。

では、MAP キナーゼと SCREAM が結合できなくなると、どうして気孔だらけの葉ができるのでしょうか？この謎を解くために、さらに生化学的解析を進めたところ、MAP キナーゼは SCREAM タンパク質をリン酸化し、そのリン酸化修飾が目印となって、SCREAM タンパク質と SPCH タンパク質の分解が引き起こされることがわかりました。しかし、KRAAM 配列に変異を持つ SCREAM タンパク質(*scrm-D* タンパク質)は、そもそも MAP キナーゼと相互作用できないため、リン酸化修飾を受けず、結果として SCREAM タンパク質と SPCH タンパク質の両者がほぼ全ての表皮で安定に蓄積するため、どの細胞も気孔に分化してしまうことがわかりました (図 4)。すなわち、本研究によって、細胞内シグナルがどうやって気孔の数の制御に繋がるのか、その詳細が 3 次元立体構造レベルで解明されました。

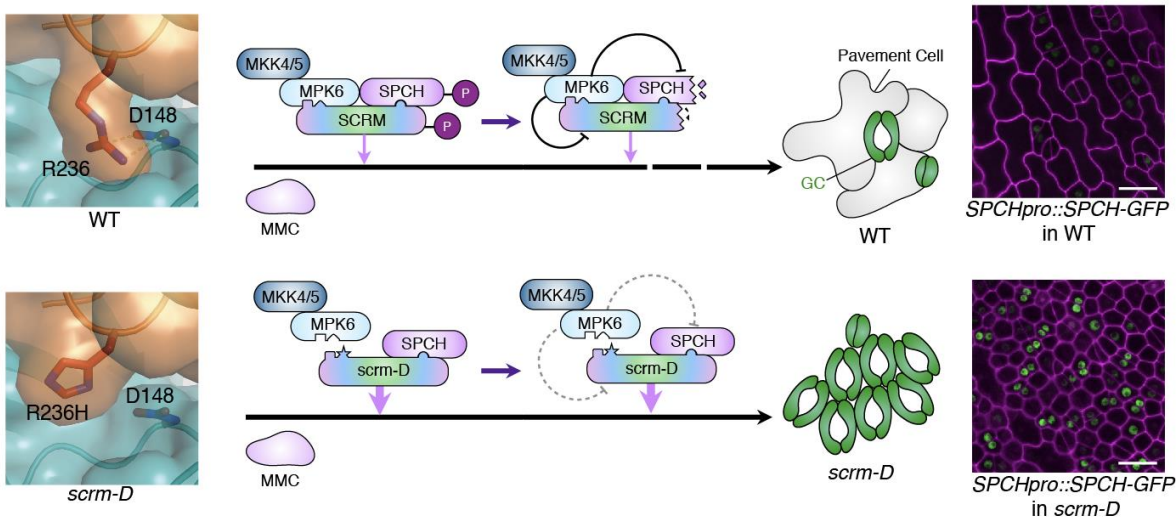


図 4 : MAP キナーゼと SCREAM の結合の 3 次元構造から明らかになった、気孔の数を制御する巧妙な仕組み.

(上) 正常な葉では、SCREAM (SCRM) が KRAAM 領域 (左) と MAP キナーゼ結合配列様領域の 2 カ所 で MAP キナーゼ (MPK6) と結合する。その結果、SCREAM と SPCH の両者が、MAP キナーゼによるリン酸化修飾を受け、分解され、気孔の分化が抑制される。左の分子図は、SCREAM KRAAM 領域のアルギニン残基と MPK6 のアスパラギン酸残基の結合を示す。

(下) *scrm-D* 変異体では、KRAAM 領域のアルギニン残基がヒスチジン残基に置換しており、MPK6 のアスパラギン酸残基と結合できない。その結果、SCREAM はリン酸化修飾を受けず、SCREAM と SPCH の司令因子二量体がほぼ全ての細胞核で蓄積し、気孔だらけの葉ができる。

MAP キナーゼは、私たちヒトの細胞内情報伝達の根幹をなしており、細胞の増殖や分化、癌化や細胞死などに直接関わっています。植物の MAP キナーゼも、胚発生など様々な発生プロセスのみならず、免疫反応や傷害ストレスの細胞内情報伝達を担っています。植物の MAP キナーゼと SCREAM 以外の基質との結合構造はまだわかっていません。今回の発見は、ヒトとの共通性を持ちつつも植物が独自で巧妙な情報伝達の仕組みをもつことを示すとともに、植物の免疫反応やストレス反応などの仕組みの理解と操作へつながるものです。

【用語解説】

- 1) MAP キナーゼカスケード：MAP キナーゼ・カスケードは、MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) -MAP キナーゼキナーゼ (MAPKK) -MAP キナーゼ (MAPK) という3種類のタンパク質リン酸化酵素 (キナーゼ) によって構成される、我々ヒト、植物、真菌にいたる全ての真核生物に存在する、細胞内情報伝達の根幹をなすシステムです。MAP キナーゼカスケードは、細胞の外の刺激や状態を細胞内に直接伝えるため、細胞の増殖、運命決定、細胞死、癌化に直接関わっています。MAP キナーゼは、標的タンパク質の特定のアミノ酸にリン酸基をつけます (リン酸化修飾)。それによって、標的タンパク質の活性や蓄積量などが変化し、細胞の増殖、発生、分化が引き起こされ、その異常によって癌化が起こります。
- 2) タンパク質 X 線結晶解析：タンパク質の三次元立体構造をオングストローム (1000000000 分の 1 メートル) という高解像度で観る方法。タンパク質の結晶に強い X 線ビームを照射して様々な角度の X 線回折写真を撮影し、コンピューターを用いて分析することにより、結晶中のタンパク質の構造を原子レベルで決定します。今回の研究のタンパク質結晶構造は、米国のローレンス・バークレー国立研究所で撮影されたものですが、国内では、例えば、Spring 8 などで行われています。
- 3) KRAAM モチーフ：陸上植物に幅広く存在する SCREAM タンパク質の中で保存されたアミノ酸配列領域。保存された K(リジン)-R(アルギニン)-A(アラニン)A-(アラニン)M-(メチオニン)の頭文字をとったものです。鳥居らによって 2008 年に命名されました。
- 4) 結合キネティクス：2つの分子 (薬剤と標的酵素など) が結合する反応の動的作用 (結合の速度、親和性、可逆性、標的結合部位の数など) を定量的に解析する方法。2つの分子がどのように相互作用し、それがどのような意味を持つのかを理解するためには、結合キネティクスを解析する必要があります。
- 5) *ab initio* 構造モデル予測法：タンパク質の構造がわからない場合、そのタンパク質のアミノ酸の配列情報に基づいてタンパク質の構造を「一から」作り上げる方法。タンパク質の折りたたみをコンピューターを用いて計算し、立体構造をモデル化します。近年のコンピューターの計算力と計算アルゴリズムの爆発的な向上に伴い、パワフルな予測法となってきました。

【論文情報】

掲載雑誌： **Nature Plants**

論文名： Bipartite anchoring of SCREAM enforces stomatal initiation by coupling MAP Kinases to SPEECHLESS.

(SCREAMは2つのMAPキナーゼ結合部位を介してSPEECHLESSにつなぐことにより気孔の発生を制御する)

著者： Putarjunan, A., Ruble, J., Srivastava, A., Zhao, C., Rychel, A.L., Hofstetter, A.K., Tang, X., Zhu, J.K., Tama, F., *Zheng, N., and *Torii, K.U. *Nature Plants*,

DOI： [10.1038/s41477-019-0440-x](https://doi.org/10.1038/s41477-019-0440-x)

論文公開：2019年6月17日17時（英国時間／日本時間：6月18日1時）

【研究費】

日本学術振興会科学研究費助成事業国際研究拠点形成促進事業費補助金新学術領域
「植物多能性幹細胞」

日本学術振興会科学研究費助成事業新学術領域研究（研究領域提案型）
「マルチレゾリューション法を用いたタンパク質複合体の高解析度動的解析」

日本学術振興会科学研究費助成事業国際共同研究加速基金（国際活動支援班）
「動的構造生命科学研究領域における海外ネットワーク形成を目指した支援活動」

【WPI-ITbMについて】（<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/>）

文科省の世界トップレベル拠点プログラム（WPI）の一つとして採択された名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所（ITbM）は、従来から名古屋大学の強みであった合成化学、動植物科学、理論科学を融合させることで研究を進めています。ITbMでは、精緻にデザインされた機能をもつ全く新しい生命機能の開発を目指しています。ITbMにおける研究は、化学者と生物学者が隣り合わせで研究し、融合研究を行うミックス・ラボという体制をとっています。このような「ミックス」をキーワードに、化学と生物学の融合領域に新たな研究分野を創出し、トランスフォーマティブ分子を通じて、社会が直面する環境問題、食料問題、医療技術の発展といった様々な議題に取り組んでいます。