

## 「キナーゼ活性の光操作による植物の細胞伸長機構の解明」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：四方 明格

## 1. 研究のねらい

真核生物に保存されたタンパク質リン酸化酵素である AGC キナーゼファミリーは、細胞の形態変化、増殖、分化など、多様な細胞機能を制御するシグナル伝達過程で中心的な役割を担っている。動物の AGC キナーゼである AKT が複数の下流標的因子のリン酸化を介して、生存や増殖、代謝、成長などの多様な細胞機能を制御する様に、1 つのキナーゼが複数の細胞機能の制御に関わる例も多い。このようにキナーゼの役割は複雑であり、その生理機能の解析は容易ではない。従来、キナーゼの生体内での機能を明らかにするために、キナーゼ活性を阻害する薬剤を利用した薬理学解析や、キナーゼの欠損変異体・条件的過剰発現系などを利用した解析が専ら行われてきた。しかしながら、阻害剤処理は空間分解能が低く不可逆性である事や、欠損変異体や過剰発現を用いた解析では時間分解能の高い結果を得ることは難しいため、生体内でキナーゼをよりフレキシブルに操作できる手法が求められてきた。そこで本研究では、AGC キナーゼの活性自体を、生体内において光で直接操作することを可能にする技術の開発を進めた。この技術を用いることで、AGC キナーゼの働く時期や場所を細胞内で正確に操作することが可能となり、キナーゼ制御下にある多様な細胞機能を自在に調節できるようになると期待される。このことは、AGC キナーゼが制御する多様な細胞機能の理解を促進し、その制御機構研究において大きなインパクトとなり得る。

この光操作法の開発にあたり、植物細胞を用いて系の確立を進めた。特に研究者がこれまで研究を進めてきた植物の根毛細胞とそこで機能する AGC キナーゼに着目し、その操作がモデルケースとなると考えた。根毛細胞においてこの AGC キナーゼは細胞の伸長制御、特に伸長方向の制御に関わることが示唆され、AGC キナーゼの活性を光で調節することで、細胞の伸長方向を操作可能であると予想された。この関係性の直接的証明は未だ為されていないため、その実証に光遺伝学は最適であると判断した。また、これまでに植物細胞における光遺伝学的手法の導入は殆ど進んでおらず、本研究がそのフロントランナーとなり得ると考えた。さらに、植物の成長や発生に重要な役割をもつ植物 AGC キナーゼ群や動物 AGC キナーゼの光操作へと発展させ、それらの生理機能の解明へと波及させることを最終的な目標とした。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

光により活性調節される唯一の天然 AGC キナーゼとして、フォトロピンが知られる。フォトロピンは光受容を担う LOV 光モジュールを N 末端に、キナーゼドメインを C 末端にもち、

光依存的な LOV 光モジュールの構造変化がキナーゼ活性の調節に関与すると考えられている。本研究では、この活性調節機構に着目し、LOV 光モジュールを任意の AGC キナーゼに付加することで、光によるキナーゼ活性の調節を試みた。結果として、想定した様式ではフォトトロピンの様な光活性化型キナーゼの創出には至らなかったが、植物 AGC キナーゼの一つに LOV 光モジュールを融合した結果、当初は予想もしなかった光不活性化型キナーゼを得た。この人工キナーゼにおいて光による活性調節に関わる領域をアミノ酸残基置換により探索した結果、20 アミノ酸から成るモチーフ (LSLIM と命名) を同定することに成功した。また、LOV 光モジュールと LSLIM 或いはその改変配列を利用することで、光応答性を持たない植物 AGC キナーゼに、キナーゼの光不活性化能を付与することに成功した。さらに、LSLIM の改変配列および LOV 光モジュールを導入した AGC キナーゼをシロイヌナズナの根毛細胞において発現させ、青色光を細胞内の局所部位に照射することで、根毛の伸長方向変化を誘導することに成功した。以上のことは、LSLIM (或いはその改変配列) および LOV 光モジュールを植物 AGC キナーゼに導入することで、生体内において機能的な光不活性化型 AGC キナーゼを創出できることを示している。

また、既存の光遺伝学ツールを利用したキナーゼ活性の光操作技術の開発を同時に進めた結果、光増感タンパク質である miniSOG を利用することで、光依存的にキナーゼ活性を低下させ、根毛の伸長方向を操作することに成功した。これらの解析から、既存の手法では直接的証明が困難であった「AGC キナーゼが根毛の伸長方向を直接制御すること」を初めて証明するに至った。以上のように本研究の成果は、光遺伝学的手法の導入により植物細胞においても高い時間・空間解像度での細胞生物学的解析が可能であり、その利用がこれまで困難であった命題の解決に極めて有用であることを示している。

## (2) 詳細

### 光不活性化型キナーゼの制御領域の同定

天然の光活性化型の植物 AGC キナーゼであるフォトトロピンに由来する LOV 光モジュールを或る植物 AGC キナーゼに融合することで、光によりキナーゼ活性が低下する性質をもつ人工 AGC キナーゼを偶然にも創出した。この新奇な制御機構を明らかにするため、キナーゼ領域にアミノ酸残基置換を行ない、試験管内実験により制御領域の探索を行なった。その結果、20 アミノ酸から成るモチーフ LSLIM がその光制御に重要であることを明らかにした。多くの AGC キナーゼに LOV 光モジュールのみを付加しても光に対する応答性は見られないが、これらの人工キナーゼに LSLIM をさらに導入することで、青色光依存的にキナーゼ活性を低下させることが可能となった (図1)。このことは、LOV 光モジュールと LSLIM を導入することで、任意の植物 AGC キナーゼの活性を光により制御できることを示唆する。

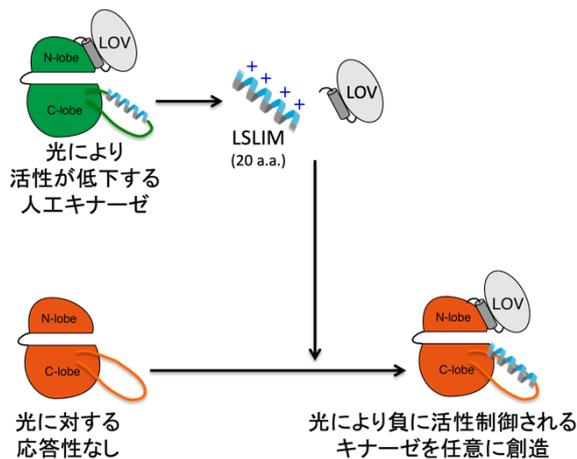


図1.本研究で確立した光で不活性化する人工 AGC キナーゼの概要  
光によりキナーゼ活性が低下する人工キナーゼの研究から得た知見に基づき、光応答性を本来持たない任意の植物 AGC キナーゼに光不活性化能を付与することが可能である。

### 光不活性化型 AGC キナーゼを利用した根毛の細胞成長の光操作

本研究で確立した光不活性化型 AGC キナーゼが生体内において機能することを示すため、シロイヌナズナの根毛の細胞成長を指標とした解析を行なった。根毛細胞で発現する AGC キナーゼは根毛の伸長方向の制御に関わるため、光不活性化型 AGC キナーゼを AGC キナーゼの欠損変異体背景において発現させ、根毛細胞に局所的な青色光照射を行うことで根毛の伸長方向を制御できると期待された。その結果として、根毛の伸長方向を操作することに成功した(図2左)。また、既存の光遺伝学ツールであり、対象の光依存的な不活性化を導く miniSOG を利用した場合においても、LOV-LSLIM 系と同様の結果を得た。以上のように、本研究で確立した人工キナーゼが生体内において機能し、根毛の伸長方向を操作するという目的が達成された。

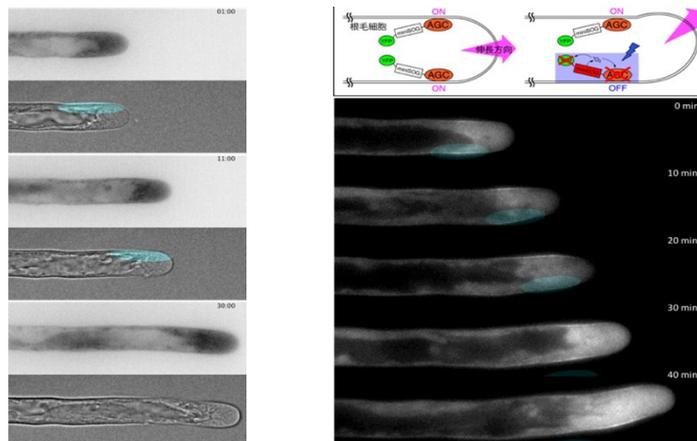
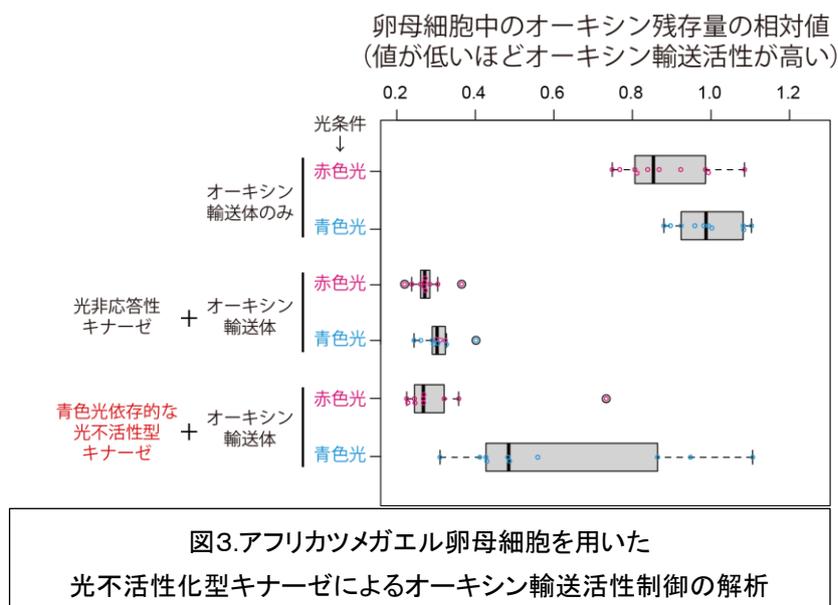


図2.本研究で確立した光遺伝学ツールによる根毛の伸長方向の光操作

(左) LOV 光モジュール及び改変型 LSLIM を導入した人工キナーゼを発現する根毛に対して、青色光を 10 分間、局所的に照射した(シアンで示す)。照射開始から 29 分後には根毛が照射部位とは逆の方向に伸長を確認できる。(右)miniSOG を融合した AGC キナーゼを発現する根毛に対して、強い青色光を 25 分間、シアンで示した部位に照射した。照射部位とは逆の方向に成長方向が変化する様子を捉えることができる。

### 光不活性化型キメラ AGC キナーゼによるオーキシンの輸送体の制御

植物において AGC キナーゼファミリーは多様な役割を持つが、最も重要な役割の一つに植物ホルモンであるオーキシンの輸送制御があり、生体内においてオーキシン輸送体をリン酸化し、その活性を亢進させる役割をもつ。オーキシンの輸送制御を担う AGC キナーゼは複数あるが、その内の一つのキナーゼに対して、本研究で確立した手法を適応した。試験管内実験においてこの人工 AGC キナーゼは光により活性が低下した。このキナーゼが生体内において機能するかを検証するために、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた異種発現系によるオーキシン輸送実験を行なった。光不活性化型キナーゼとオーキシン輸送体を卵母細胞において発現させ、光条件の違いによって、放射性同位体標識したオーキシンの輸送量に差異が生じるかを調べた。その結果、期待したように、青色光依存的にオーキシン輸送活性を低下させることができた(図3)。この結果は、光不活性化型キナーゼが生体内において機能し、オーキシン輸送体の活性を光依存的に調節できることを示唆する。



### 3. 今後の展開

本研究では光不活性化型の植物 AGC キナーゼを創出する技術基盤の構築と、その応用展開を行なった。今後の研究展開として、本研究期間中に解明するに至らなかった植物の細胞伸長の分子機構について、本研究で開発した光遺伝学ツールを用いて引き続き研究を進める。さらに、光不活性化型 AGC キナーゼのクライオ電子顕微鏡を用いた分子構造解析を進め、その動作原理を理解することで、本技術をキナーゼの普遍的な光操作技術へと昇華させることを目指す。

応用展開の一つとして、本研究では植物ホルモンであるオーキシンの輸送制御に関わる AGC キナーゼの光操作に成功した。オーキシンは植物の成長や発生に関わる最も重要なホ

ルモンの一つであり、植物科学におけるその関心は高い。植物体内でオーキシンの分布を制御する技術はこれまでなく、本研究の成果は植物科学に革新をもたらし得ると期待している。現在、開発したツールが植物体において利用できることの実証を進めている。

#### 4. 自己評価

本研究は植物で利用可能な光遺伝学ツールを開発し、特に植物の根毛細胞の伸長方向制御に関わる AGC キナーゼを光により操作することを第一の目標とした。結果として、これまで証明が困難であり、研究者自身が最も明らかにしたかった、AGC キナーゼと植物の細胞伸長との関係を証明することができた。この点において、研究目的は達成されたと言える。領域会議に参加し異分野の研究に関する最新の知見を得ること、分野外の研究者と交流することで、研究の進め方や自らの研究の裾を広げることにつながったことは大きい。領域代表やアドバイザー、研究者との議論を通じて、応用展開において重要な植物ホルモンであるオーキシンの輸送を制御し得る光遺伝学ツールを開発できたことは、今後の植物科学の進歩への貢献、そして植物科学における光遺伝学の普及の推進などを鑑みてもその波及効果は計り知れない。このことは、革新的な光操作技術の確立を目指す、さきがけ光操作領域の目的にも良く合致すると考える。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件(2022年3月末現在)

##### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものも含む)

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

###### 招待講演

H. Shikata, N. Yanagisawa, Y. Sato, T. Higashiyama, C. Schwechheimer. “Distribution of two phospholipids specifies a dynamic plasma membrane domain for re-orientation of root hair tip growth.” 第 61 回日本植物生理学会年会(シンポジウム講演)、2020 年 3 月、大阪

H. Shikata. “Fine-tuning of growth direction by dynamically distributed lipids and kinases in root hairs” SFB924 seminar(招待講演)、2021 年 10 月、オンライン(ドイツ)

H. Shikata. ”Development of photoinactivatable protein kinases to manipulate plant cell growth” 第 59 回日本生物物理学会年会(シンポジウム講演)、2021 年 11 月、オンライン(仙台)

H. Shikata. “Polarized growth of root hairs is modulated by the plasma membrane domain-localizing AGC kinases” SFB924 Mini-symposium(招待講演)、2022 年 1 月、ドイツ・フライジング

###### 著作物

H. Shikata and P. Denninger. “Plant optogenetics: applications and perspectives” *Current Opinion in Plant Biology*, 2022 年, *in press*.

(さきがけ研究で得た経験を基に、植物における光遺伝学の利用とその展望についてまとめた総説)