

氏名	えむでい あぶる からむ あざど MD.ABUL KALAM AZAD
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	甲第354号
学位授与年月日	平成16年 9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Biochemical and Molecular Biological Studies on Plant Oscillation (植物の運動に関する生化学的、分子生物学的研究)
学位論文審査委員	(主査) 柴田 均 (副査) 田中 浄 松富直利 澤 嘉弘 石川孝博

学位論文の内容の要旨

Temperature-dependent tulip petal opening and closing is one type of plant oscillation. Tulip petals open in the morning and close in the evening. This oscillation can be reproduced by changing the temperature from 20°C to 5°C for opening and 5°C to 20°C for closing in the dark. In this case, cut flowers were used in the test tube with $^3\text{H}_2\text{O}$. Following the transfer of completely closed flowers from 5°C to 20°C, petals began to open with the increase of opposite petal aperture and became static after 2 h. In this step the estimated $^3\text{H}_2\text{O}$ content was almost proportional to the opposite petal aperture and became saturated after 2 h. When the opened flowers were transferred from 20°C to 5°C, petals began to close with the decrease of opposite petal aperture and the $^3\text{H}_2\text{O}$ content also proportionally decreased with the opposite petal aperture. Closed flowers incubated at 10°C scarcely opened with very low content of $^3\text{H}_2\text{O}$. This indicates that the temperature-dependent petal oscillation is accompanied with temperature-dependent water transport. Transpiration for water loss by stomata was suggested to be involved during petal opening and closing. Ruthenium red, a Ca^{2+} channel blocker and *O, O'*-bis(2-aminophenyl)ethylene-glycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, a Ca^{2+} chelator, exerted adverse inhibitory effects on petal opening and the transport of $^3\text{H}_2\text{O}$, indicating that a transient elevation in cytosolic free Ca^{2+} concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ may be a crucial factor for temperature-dependent tulip petal opening. However, these inhibitors had

no effect on closing, independent of $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$.

Several proteins especially 90, 75, 52 and 31 kDa in the isolated plasma membrane fraction were phosphorylated in the presence of 25 μM Ca^{2+} at 20°C. The 31 kDa protein that was phosphorylated *in vitro* and *in vivo* at 20°C, reacted clearly with a prepared anti-plasma membrane aquaporin (PM-AQP) raised against a conserved amino acid sequence present in many plant PM-AQPs, and thus it was suggested as the putative PM-AQP. This phosphorylated PM-AQP reacted with the anti-phospho-Ser. A 45 kDa Ca^{2+} -dependent protein kinase (CDPK) in the isolated plasma membrane was characterized by in-gel assay. Thus the phosphorylation of the putative PM-AQP by the CDPK was thought to activate the water channel composed of PM-AQP. Water then accumulated in the cytoplasm of the petals, resulting in petal opening. Dephosphorylation of phosphorylated PM-AQP occurred in the course of petal closing when the flowers were transferred from 20°C to 5°C, and dephosphorylation of the phosphorylated PM-AQP was supposed to inactivate the water channel to interrupt the water transport to the cytosol, leading to the petal closing. But the content of PM-AQP was found to remain almost constant level in both temperatures.

A protein phosphatase holoenzyme (38, 65, and 75 kDa) preparation and a free catalytic subunit (38 kDa) were purified from tulip petals by analyzing their activity toward *p*-nitrophenyl phosphate. These enzyme preparations were characterized as protein phosphatase 2A (PP2A) by biochemical and immunological approaches. The plasma membrane containing the putative PM-AQP was prepared from tulip petals, phosphorylated *in vitro*, and used as the substrate for both of the purified PP2A preparations. Both preparations dephosphorylated the phosphorylated PM-AQP at 20°C, but only the holoenzyme preparation acted at 5°C on the phosphorylated PM-AQP with higher substrate specificity, suggesting that regulatory subunits are required for low temperature-dependent dephosphorylation of PM-AQP in tulip petals. Thus the post-translational modification of PM-AQP by phosphorylation with membrane associated CDPK and reversible phosphorylation with PP2A holoenzyme was supposed to regulate the temperature-dependent oscillation of tulip petals.

論文審査の結果の要旨

植物の運動としては、オジギソウの葉身が閉じることや気孔の開閉などがよく知られており、光、イオンチャンネル、植物ホルモンなどの関与と孔辺細胞での膨圧変化、さらには関与する組織の可塑性などが研究されている。本研究では、チューリップの大型花卉が可逆的に開閉するこ

とに着目し、この現象を植物の運動の一環として捉えたことが端緒となっている。

- ① まず、チューリップ花卉の開閉運動が温度依存的であり、光はまったく関与しないことを明らかにした。すなわち、暗所で、あらかじめ閉じている花卉を 20℃に移動させることで花卉は開き、開いた花を 5℃に戻すと閉じることを観察した。開花時には、茎から $^3\text{H}_2\text{O}$ が花梗を經由して花卉へと移動し、閉じる過程では花卉内の $^3\text{H}_2\text{O}$ が減少したが、茎を經由して戻るわけではなく、蒸散によって減少したと考察された。花卉の開花時には水分が蒸散で失われており、チューリップが水を大量に要求する花であるゆえんであろう。さらに温度依存的な開花がカルシウムのチャンネルブロッカーやキレート剤で見事に阻害されることから、20℃で細胞内カルシウム濃度が上昇しタンパク質のリン酸化が関与して水の移動が起こっている可能性を想定した。
- ② 細胞間の水の移動には、単細胞生物から高等動物にいたるほぼすべての生物に共通して存在するアクアポリンと呼ばれる膜貫通型のタンパク質が関与しており、水チャンネルを構成している。発見者は 2003 年度のノーベル賞を受賞した。高等植物には細胞膜と液胞膜に多型で存在している。またリン酸化を受けて水チャンネルが活性化することが知られている。チューリップ花卉から膜画分を調製し、 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ でリン酸化させると 25 μM カルシウム存在下で細胞膜の 90, 75, 52, 31 kDa のタンパク質がリン酸化されることが明らかとなった。これらのリン酸化は 20℃の *in vivo* でも起きていることを確認した。分子量からアクアポリンの候補として 31 kDa のバンドに着目した。広範な植物の細胞質型アクアポリンに共通するアミノ酸配列部分を抗原として調製した抗体に対して 31 Da のみが反応した。またこのバンドはリン酸化セリンに対する抗体とも反応した。また閉じた状態の花弁では、リン酸化の程度が低いことも確認した。In Gel Assay の結果は細胞膜画分に 45 kDa のカルシウム依存タンパクリン酸化酵素の存在を示した。
- ③ チューリップ花卉から細胞膜型アクアポリンの全長 1151 ヌクレオチドの cDNA をクローニングした。このうちの 858 ヌクレオチドがコードする 286 アミノ酸配列が 30515.01 の分子量で、他の植物由来の細胞質型アクアポリンと 87%以上の相同性を示した。疎水性プロットにより、6 カ所の膜貫通領域が明らかとなり、さらにすべてのアクアポリンに共通して存在する NPA モチーフがループ B とループ E に存在していた。これらの結果は、クローニングした cDNA がチューリップ花卉の細胞膜のアクアポリンをコードすることを強く示唆した。
- ④ チューリップ花卉は温度依存的に開閉する。開花の場合はアクアポリンがリン酸化され、水チャンネルが活性化される。逆反応、すなわち閉じる過程ではアクアポリンが脱リン酸化されるので、リン酸化タンパク質脱リン酸化酵素に着目した。マイクロシスチン-アフィニティクロマトでホロ型 (38,65,75 kDa) と触媒サブユニット(38 kDa)を精製した。これらの精製標品は阻害剤への応答から、タンパク質脱リン酸化酵素 2A であると結論した。両標品は 20℃では、チューリップ花卉のリン酸化されたアクアポリンを脱リン酸化した。しかしながら、興味あることに 5℃では、触媒サブユニットは活性を示さなかったが、ホ

口酵素はリン酸化アクアポリンを脱リン酸化し、さらに 52 kDa バンドには脱リン酸化能を示さなかった。これらの結果は、ホロ型酵素の調節サブユニットが低温を直接感知し、リン酸化されたアクアポリンを脱リン酸化できることを示している。

- ⑤ これらの結果を統合して、以下のことがチューリップ花卉の開閉のメカニズムとして提示された。花卉が 20℃を感知すると細胞内のカルシウム濃度が上昇し、細胞膜に結合したカルシウム依存タンパクリン酸化酵素によりアクアポリンがリン酸化されて、水チャンネルが開き、細胞質に水が流入することで、花卉下部の膨圧が上昇して花卉が開き、開花状態では水の蒸散が続くがその減少分は継続的な補充で賄われている。一方、閉じる過程では、低温(5℃)をタンパク脱リン酸化酵素 2A の調節サブユニットが感知し、アクアポリンを脱リン酸化し、水チャンネルが閉じられる。水の補充が停止するが、しばらく継続する蒸散によって膨圧が低下して花卉が閉じる。

本研究は、花卉の開閉運動のメカニズムを生化学的、分子生物学的に解明したものであり、アクアポリンのリン酸化・脱リン酸化の関与を明らかにした。園芸植物の開花生理や、作物の開花調節に応用できる多くの知見を含んでいる。また、20℃の感知メカニズム、さらにはタンパク脱リン酸化酵素の調節サブユニットによる低温感知機能の分子レベルでの解析など、多くの興味ある知見を提案している。審査委員会は、全委員が一致して、本研究の成果とその内容を評価し、学位論文として十分な価値があると判断した。