

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770063

研究課題名（和文） ユビキチン化によるシロイヌナズナ概日時計制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the circadian clock regulation by ubiquitination in Arabidopsis

研究代表者

藤原 すみれ (FUJIWARA SUMIRE)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：50532131

研究成果の概要（和文）：概日時計が正確に約24時間周期のリズムを生み出すことは、高等植物が環境や季節の変化に適応しながら生存して行くうえで必須である。本研究では、時計関連因子とタンパク質のユビキチン化およびユビキチン様修飾の関係を検証した。その結果、時計制御に関わるユビキチンリガーゼ関連遺伝子がシロイヌナズナの耐病性応答を制御する可能性を示唆する結果を得た。さらに、時計の制御に関わるユビキチンリガーゼやその分解ターゲットタンパク質が器官伸長を制御する新規機構の可能性を発見した。

研究成果の概要（英文）：Circadian rhythms are essential for higher plants to survive in the changing environment. In this study, we investigated the relationships between the circadian clock and the protein modifications such as ubiquitination and other ubiquitin-like modifications. We found the possibility that some ubiquitin ligases and substrate proteins might regulate the time-of-day dependent disease resistance. We also found a novel possible regulation mechanism of organ elongation by clock proteins which are targeted by ubiquitination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、概日時計、概日リズム、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

概日時計機構は高等植物が環境に適応しながら生きていくうえで必須であり、突然変異などにより概日リズムに異常が生じると、花成、代謝、形態形成、ストレス耐性などに支障を来す。近年、申請者らの研究により、時計関連タンパク質はリン酸化などのリズムックな翻訳後修飾を受け、その修飾に依存したタンパク質間相互作用により分解・安定化や細胞内局在が複雑に制御されていることが示唆され始めている (Fujiwara et al 2008, Kim et al 2007, Wang et al 2010)。

また、時計関連タンパク質の多くについて、ユビキチン-プロテアソーム分解経路阻害剤処理によりその分解が阻害されること、その多くが昼と夜で分解速度が大きく異なることが報告されているが、実際にどのような機構で時計関連タンパク質がユビキチン化されるのか、また時計制御機構や時計が制御する現象とタンパク質のユビキチン化がどのように関連するのか等の解析はほとんど進んでいなかった。また、タンパク質のユビキチン様修飾である Small Ubiquitin-like modifier (SUMO) 化と時計の関係も未解明であった。

2. 研究の目的

高等植物シロイヌナズナにおいて概日時計が制御する現象や時計本体の制御機構とユビキチン化およびユビキチン様修飾の関係を解析することにより、タンパク質レベルでの時計制御の新規のメカニズムを発見すること、また、概日時計が関わる生理現象の制御とタンパク質ユビキチン化の新規の関係を発見しその仕組みを解明することを目的として研究

を行った。

また、病原菌感染のタイミングによってシロイヌナズナの病害抵抗性の度合いが異なること、また病害抵抗性機構にはタンパク質のユビキチン化が関わるということが知られていることから、抵抗性機構に概日時計が関与する可能性を想定し、本研究で検証することとした。

3. 研究の方法

夜に病原菌を感染させると朝に感染させた場合と比較してシロイヌナズナの病害抵抗性反応 (過敏感細胞死) が起こりにくいことが報告されていることから、各種時計関連遺伝子 (ユビキチンリガーゼやそのターゲット候補含む) の機能欠損株や過剰発現体を明暗周期下で栽培し、朝と夜に病原菌を感染させて過敏感細胞死を観察した。

また、ユビキチン化による制御を受けることが示唆されている時計制御関連遺伝子のうち、転写制御に関わる可能性のある因子に関して、その機能欠損株、過剰発現体、リプレッションドメインを付加した過剰発現体 [Chimeric REpressor Gene-Silencing Technology (CRES-T) 系統] の表現型の解析などを行い、その機能の解明を目指した。

さらに、各種時計制御関連因子のアミノ酸配列を SUMO 化タンパク質データベース (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) により解析し、SUMO 化のコンセンサス配列を持つものを探索した。コンセンサス配列を持つものの一部に関して、タンパク質を抽出し抗 SUMO 抗体によるウエスタン解析を行うことにより、植物体内で実際に SUMO 化を受けているかどうかを検証した。

4. 研究成果

野生型のシロイヌナズナに病原菌を朝と夜に感染させた場合、朝に感染させた場合にのみ過敏感細胞死が観察された。一方、時計制御に関わるユビキチンリガーゼやユビキチン化を介した分解を受ける遺伝子を過剰発現や機能欠損した系統の場合、一部の系統において朝夜関わらず過敏感細胞死が起こる系統や逆に起こらない系統が見つかり、シロイヌナズナの病害抵抗性反応が概日時計とユビキチン化により複雑に制御されることが示唆された。

さらに、ユビキチンリガーゼやユビキチン化による分解を受けると考えられる概日時計制御関連のタンパク質のうち、転写制御に関与すると考えられるものに関して、当該タンパク質の CRES-T 系統や過剰発現体、機能欠損株の解析などから、転写制御因子としての機能を検証した結果、概日時計関連因子が関わるとされる葉柄や胚軸などの器官伸長制御に関して新規の制御機構が存在する可能性を発見した。

また、概日時計関連タンパク質の一部に関して、植物体内で SUMO 化を受けるものを探索したが、本研究で解析した範囲では見つからなかった。しかし、データベース検索により、概日時計関連タンパク質のうち 5 つが SUMO 化を受けるコンセンサス配列を持つことを発見した。そのうち一つは Miller らにより実際に SUMO 化修飾を受ける可能性が報告された (2010)。

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)

①Ishida T, Fujiwara S, Miura K, Stacey N, Yoshimura M, Schneider K, Adachi S, Minamisawa K, Umeda M, Sugimoto K, SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in Arabidopsis, Plant Cell 21(8): 2284-2297
査読あり (2009/08)

[学会発表] (計 3 件)

①藤原 すみれ、光田 展隆、高木 優、弱光下で異常な形質を示すシロイヌナズナ CRES-T 系統の単離・解析、第 52 回日本植物生理学会年会、仙台 (2011/03/22)

②Ishida T, Fujiwara S, Miura K, Stacey N, Yoshimura M, Schneider K, Adachi S, Minamisawa K, Umeda M, Sugimoto K, SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in Arabidopsis、日本植物生理学会第 51 回年会、日本植物生理学会第 51 回年会、熊本 (2010/03/18-21)

③Fujiwara S et al, Post-translational Regulation of the Arabidopsis Circadian Clock through Selective Proteolysis and Phosphorylation of Pseudo-response Regulator Proteins, 9th IPMB Congress, St. Louis, MO, USA (2009/10/28)

[図書] (計 2 件)

①Kim WY, Salome PA, Fujiwara S, Somers DE, McClung CR, Two-Component Signaling

Systems (Methods in Enzymology, Part C),
Characterization of Pseudo-Response
Regulators In Plants (Chapter 19), pp.
357-378, Elsevier (2010/03)

②藤原すみれ(海老原史樹文・井澤毅編)、「光
周性の分子生物学」第3章 植物概日時計の
光同調機構 pp27-37、シュプリンガー・ジャ
パン (2009/07)

[その他]
ホームページ等
[http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-grr/bou
nce.html](http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-grr/bou
nce.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 すみれ (FUJIWARA SUMIRE)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物ブ
ロセス研究部門・研究員

研究者番号 : 50532131

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし