

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02150

研究課題名（和文）栄養シグナルによる膜交通制御と植物成長最適化機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of membrane trafficking and plant growth in response to nutrient availability

研究代表者

山口 淳二（Yamaguchi, Junji）

北海道大学・理学研究院・特任教授

研究者番号：10183120

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、糖（炭素，C）と窒素（N）栄養バランスである「C/Nバランス」の乱れに起因するストレス応答制御に着目し、それに関わる膜交通因子の翻訳後修飾について詳しい解析を行った。その結果、C/N応答制御に関わるTGN局在型SNAREタンパク質SYP61が植物体内でK63鎖型のユビキチン化を受けており、そのユビキチン化状態がC/Nに応じて変化することを見出した。また、新規にC/N応答に関連するARF-GEFタンパク質を同定し、この因子がリン酸化されていること、C/Nに応じた小胞輸送経路制御に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物のC/N応答は、農作物の光合成活性や収量向上という観点からも重要な生理現象である。本研究から、これまで分かっていなかった細胞内物質輸送制御とC/N応答の関連性について明らかになった。本研究成果は、作物収量を制御する分子基盤の理解に貢献する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the molecular mechanism regulating plant responses to C/N-nutrient availability. We carried out the detailed analyses about the post-translational modifications on the membrane trafficking factors. As results, we found the TGN-localized SNARE SYP61 is ubiquitinated in plant, especially by K63-chain, which is responsive to C/N-nutrient availability in Arabidopsis seedlings. In addition, we identified a ARF-GEF protein as a new candidate of C/N-related membrane trafficking factor. We found the loss-of function mutant of the ARF-GEF showed insensitive phenotype to C/N-nutrient stress. It was also suggested that the ARF-GEF protein might promote vesicle trafficking under C/N-nutrient stress conditions.

研究分野：植物科学

キーワード：環境応答 翻訳後修飾

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は、生育環境の栄養条件に応じて代謝、成長を巧みに制御しながら生存している。特に、細胞内で利用可能な糖(炭素源, C)と窒素(N)の相対量比(C/N バランス)は重要であり、植物はそれを感じて適応する「C/N 応答」能力を有している。C/N は、古くから植物生理学における重要なコンセプトであり、農業現場での具体的な作用点として注目されてきた。その一方で、C/N 応答を制御する上流シグナル機構や代謝変動を担う分子実態については、長年謎に包まれたままである。本研究では、細胞内の膜交通制御による栄養ストレス適応という新たな視点から、植物の優れた環境ストレス応答を支える分子機構を解明する。

### 2. 研究の目的

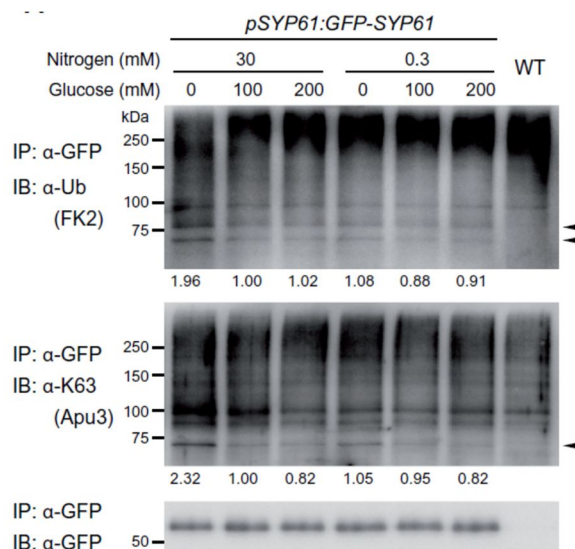
本研究では、「膜交通制御による植物の栄養ストレス適応」という独自の視点から植物の優れた環境ストレス応答を支える分子機構を解明する。膜交通系は、細胞膜上の環境シグナル受容体・伝達因子や輸送体の機能制御に重要な役割を果たす。その一方で、環境シグナルに応じた膜交通系構成因子自体の機能変換に関する知見はほとんど無い。申請者らは、糖(炭素, C)と窒素(N)栄養バランスである「C/N バランス」の乱れに起因するストレス応答制御因子として膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31 を単離し、それまで未知であった C/N 応答シグナルの根幹を担う分子基盤を明らかにしてきた。また、C/N に応答したリン酸化シグナル変動の網羅的解析を実施している。本研究では、こうした解析から得られた知見を基に、翻訳後修飾による細胞内膜交通システムの制御という観点で、植物の C/N 栄養ストレス応答機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、モデル植物シロイヌナズナを材料に、ATL31 のユビキチン化標的である SNARE タンパク質 SYP61 および新規 C/N 応答性膜交通因子の生化学的解析、イメージング解析および生理学的解析を行った。

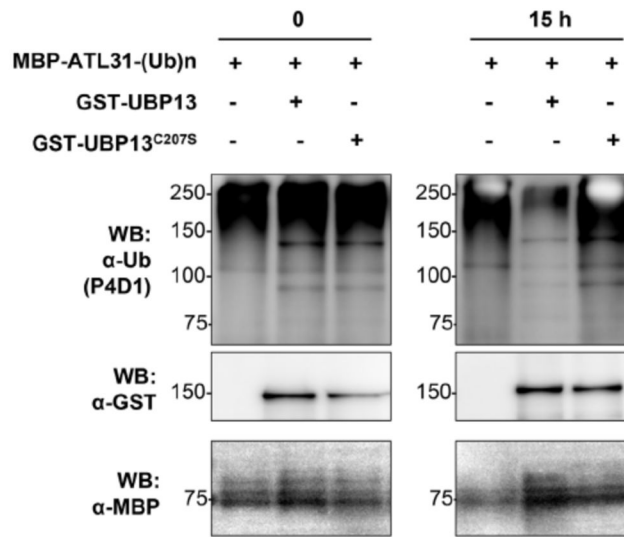
### 4. 研究成果

(1) TGN 局在型 SNARE である SYP61 について、C/N ストレス応答における生理機能および C/N に応答したユビキチン化変動を明らかにした。SYP61 のユビキチン化が C/N 環境に応じて変動し、K63 鎖型のユビキチン化修飾を受けることを明らかにした。また、SYP61 の K63 鎖形成に ATL31 が関与することが分かった。加えて、SYP61 の細胞内局在性が、C/N に応じて TGN と細胞膜間で変化する可能性を見出した。



(2) ユビキチン化シグナルの強度は、標的にユビキチンを付加する反応と除去する反応(脱ユビキチン化)のバランスに左右される。これまで C/N に関わる脱ユビキチン化酵素は分かっていた。本研究結果から、膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31 の相互作用因子として脱ユビキチン化酵素 UBP12/13 を同定した。これらの脱ユビキチン化酵素の機能抑制変異株は、高

C/低N ストレスに高感受性を示すことが分かった。さらに, *in vitro* での脱ユビキチン化アッセイから, UBP13 は ATL31 の形成するユビキチン鎖を切断する活性があることが分かった。加えて, UBP13 の過剰発現株は, C/N に低感受性を示すが, *atl31atl6* 変異株背景での過剰発現では, そのような表現型を示さず, 野生型と同様であることが分かった。これらの結果から, UBP12/13 は ATL31 自身もしくはその標的のユビキチン化レベルに作用することで, C/N 応答制御に関与することが示唆された。



(3) C/N 応答性のリン酸化プロテオーム解析データから, 新たな C/N 応答関連因子として, 膜交通制御に関わる ARF-GEF タンパク質を同定した。この因子の変異株では, 高 C/低 N ストレスに低感受性となることが分かった。加えて, 各内膜系オルガネラマーカのイメージング解析から, 細胞内の特定の小胞輸送経路が, C/N ストレスに応じて活性化している可能性が示唆された。加えて, そうした輸送制御にこの ARF-GEF タンパク質が関与する可能性も示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hasegawa Yoko, Huarancca Reyes Thais, Uemura Tomohiro, Baral Anirban, Fujimaki Akari, Luo Yongming, Morita Yoshie, Saeki Yasushi, Maekawa Shugo, Yasuda Shigetaka, Mukuta Koki, Fukao Yoichiro, Tanaka Keiji, Nakano Akihiko, Takagi Junpei, Bhalerao Rishikesh P, Yamaguchi Junji, Sato Takeo	4. 巻 34
2. 論文標題 The TGN/EE SNARE protein SYP61 and the ubiquitin ligase ATL31 cooperatively regulate plant responses to carbon/nitrogen conditions in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1354 ~ 1374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Luo Yongming, Takagi Junpei, Claus Lucas Alves Neubus, Zhang Chao, Yasuda Shigetaka, Hasegawa Yoko, Yamaguchi Junji, Shan Libo, Russinova Eugenia, Sato Takeo	4. 巻 23
2. 論文標題 Deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 stabilize the brassinosteroid receptor BRI1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e53354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202153354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Maki Yuko, Soejima Hiroshi, Sugiyama Tamizi, Sato Takeo, Yamaguchi Junji, Watahiki Masaaki K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Conjugates of 3-phenyllactic acid and tryptophan enhance root-promoting activity without adverse effects in <i>Vigna angularis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.21.1217a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maki Yuko, Soejima Hiroshi, Sugiyama Tamizi, Watahiki Masaaki K., Sato Takeo, Yamaguchi Junji	4. 巻 39
2. 論文標題 3-Phenyllactic acid is converted to phenylacetic acid and induces auxin-responsive root growth in <i>Arabidopsis</i> plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 111 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.21.1216a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Luo Yongming, Yasuda Shigetaka, Takagi Junpei, Hasegawa Yoko, Chiba Yukako, Yamaguchi Junji, Sato Takeo	4. 巻 636
2. 論文標題 Deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 regulate carbon/nitrogen-nutrient stress responses by interacting with the membrane-localized ubiquitin ligase ATL31 in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55～61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.10.089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP <a href="https://www.sci.hokudai.ac.jp/CSF2-web/">https://www.sci.hokudai.ac.jp/CSF2-web/</a>
--

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 長緒  (Sato Takeo)  (50609724)	北海道大学・理学研究院・准教授   (10101)	
研究分担者	高木 純平  (Takagi Junpei)  (80740331)	北海道大学・理学研究院・助教   (10101)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------