

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02162

研究課題名（和文）ユビキチン修飾による病原体の認識受容と機能発現制御機構の全容解明

研究課題名（英文）Studies on pathogen recognition and functional expression for plant immunity mediated by ubiquitin modification

研究代表者

山口 淳二（Yamaguchi, Junji）

北海道大学・理学研究院・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、植物に特有の膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31の機能に着目し、植物の病原体抵抗性（植物免疫）における細胞内シグナル伝達機構の解析を行った。病原体感染時のMAMPs応答におけるATL31のユビキチンリガーゼ活性の変動やタンパク質翻訳後修飾について詳しい解析を行い、MAMPsに応答したATL31のリン酸化変動とそれに共益したユビキチンリガーゼ活性の変動を明らかにした。また、ATL31の形成するユビキチンシグナルの詳しい解析を行い、ATL31が主にK63型ユビキチン鎖の形成を介して、植物免疫シグナル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

植物の病原体抵抗性（植物免疫）は、農作物の収量向上を実現する上で重要な植物生理現象である。本研究で、これまで分かっていなかった植物免疫におけるユビキチンシグナルの関与が示された。本研究成果は、植物免疫を制御する分子基盤の理解や複数の環境ストレスに対する植物の適応機構の解明に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the function of ATL31, a membrane-localized ubiquitin ligase conserved in plants, and investigated the signal transduction mechanism regulating pathogen resistance in plants. Our biochemical analyzes demonstrated that ATL31's ubiquitin ligase activity was changed in response to MAMPs. We also found the specific ubiquitin chain type signals are involved in the ATL31-mediating pathogen attack signals in plant cells.

研究分野：農学

キーワード：ユビキチンリガーゼ 植物免疫 病原体認識受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は、動くことができないが故に、激しい生物ストレス(病原体感染)や他複数の環境ストレスに直接かつ長時間晒される。従って、植物は、そのような環境変動に適応する術を内包している。申請者らの研究から、そのしくみの一翼を担うのが、ユビキチン修飾による多様な標的タンパク質の機能変換にあることが示唆されている。ユビキチン修飾の多様化の実質を担うのがユビキチンリガーゼ(E3)である。植物では、1,400を超えるE3が存在しており、E3遺伝子の多様性こそが植物の優れた環境適応能力の中心を担っていると考えられる。最近の申請者らの研究から、植物に特有の膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31 が栄養ストレス応答や病原体抵抗性に関与することが見出されており、細胞膜上でのシグナル伝達制御への関与が示唆されている。全ての生物にとって、感染防御(免疫)の初発は、病原体の認識である。そして、生物が病原体を認識するための手段として、病原体由来の特定物質の分子パターン MAMPs を利用することが明らかとなっている。MAMPs を認識する受容体は病原体(またはパターン)認識受容体と総称され、主に細胞膜上に局在し、機能している。こうした病原体認識受容体の機能制御やその下流でのシグナル伝達におけるユビキチンシグナルの関与が注目されているは、まだ未解明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、植物に特有の膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31 の機能に着目し、植物の病原体抵抗性(植物免疫)における細胞内シグナル伝達機構の解明を目指し取り組んだ。病原体感染時の MAMPs 応答における ATL31 の翻訳後修飾やユビキチンリガーゼ活性の変動、相互作用因子の探索等を行い、その機能解明を試みた。

3. 研究の方法

モデル植物シロイヌナズナを材料に、生化学的および生理学的、分子遺伝学的解析を行った。

具体的には、以下の3課題を実施した。

計画1) 膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31 のユビキチンリガーゼ活性・細胞内局在性解析

計画2) 膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31 の相互作用因子の解析

計画3) 病原体認識受容体の機能発現における ATL31 の機能解析

4. 研究成果

(1) 病原体感染時の MAMPs 応答における ATL31 のユビキチンリガーゼ活性の変動やタンパク質翻訳後修飾について詳しい解析を行い、MAMPs に応答した ATL31 のリン酸化変動とそれに共益したユビキチンリガーゼ活性の変動を明らかにした。また、ATL31 の形成するユビキチンシグナルの詳しい解析を行い、ATL31 が主に K63 型ユビキチン鎖の形成を介して、植物免疫シグナル制御に関与する可能性を見出した。

(2) ATL31 の相互作用因子として TGN/EE (トランスゴルジ網/初期エンドソーム) に局在する SNARE タンパク質 SYP61 が同定された(図1)。SYP61 はカーゴタンパク質等の膜交通に関与する制御因子として知られている。*in vitro*と*in vivo*における解析の結果、SYP61 タンパク質は K63 結合型のユビキチン修飾がなされることが発見され、そしてその一部が ATL31 によって触媒されることが示唆された(図2)。加えて、SYP61 をノックダウンした植物では、ATL31 機能欠損株と同様に、C/N 栄養ストレスに高感受性を示したことから、SYP61 は ATL31 と協調的に植物環境ストレス応答において重要な役割を果たしていることが示唆された。

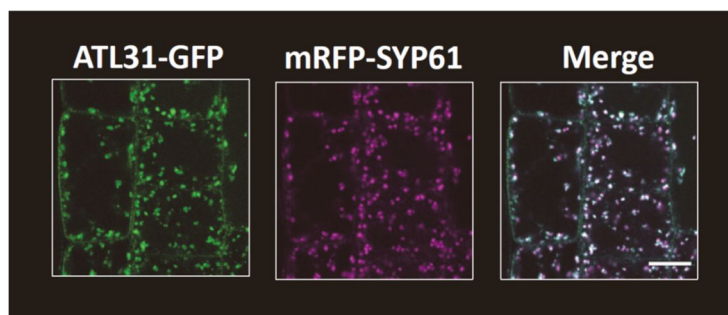


図1 ATL31-GFP と mRFP-SYP61 の共局在解析

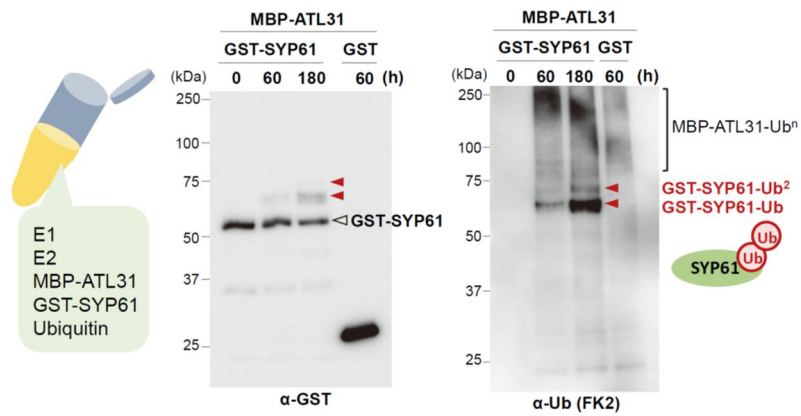


図2 *in vitro* ユビキチン化アッセイ

(3) その他の ATL31 相互作用因子として、脱ユビキチン化酵素 UBP13 を同定した。リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の生化学的解析から、UBP13 は ATL31 が形成するユビキチン鎖切断活性を有することが分かった。また、遺伝学的解析から、この脱ユビキチン化酵素が ATL31 の機能制御に関与することも示された。

(4) また、MAMPs シグナル伝達の上流で機能する因子と ATL31 の相互作用解析も実施し、複数の候補因子を得ている。今後はこうした因子との関係性をより詳しく解析していくことで ATL31 を介したユビキチンシグナルが植物免疫シグナル制御で果たす役割の全容解明につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maki Yuko, Soejima Hiroshi, Sugiyama Tamizi, Sato Takeo, Yamaguchi Junji, Watahiki Masaaki K.	4. 巻 -
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 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maki Yuko, Soejima Hiroshi, Sugiyama Tamizi, Watahiki Masaaki K., Sato Takeo, Yamaguchi Junji	4. 巻 -
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 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
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 BR11	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 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 <i>Arabidopsis</i>	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 Sanagi Miho, Aoyama Shoki, Kubo Akio, Lu Yu, Sato Yasutake, Ito Shogo, Abe Mitsutomo, Mitsuda Nobutaka, Ohme-Takagi Masaru, Kiba Takatoshi, Nakagami Hirofumi, Rolland Filip, Yamaguchi Junji, Imaizumi Takato, Sato Takeo	4. 巻 118
2. 論文標題 Low nitrogen conditions accelerate flowering by modulating the phosphorylation state of FLOWERING BHLH 4 in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2022942118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2022942118	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, Aoyama Shoki, Fukao Yoichiro, Chiba Yukako, Sato Takeo, Yamaguchi Junji	4. 巻 36
2. 論文標題 Involvement of the membrane-localized ubiquitin ligase ATL8 in sugar starvation response in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 107 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.19.0328a	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 -

1. 著者名 Arae Toshihiro, Morita Kotone, Imahori Riko, Suzuki Yuya, Yasuda Shigetaka, Sato Takeo, Yamaguchi Junji, Chiba Yukako	4. 巻 60
2. 論文標題 Identification of Arabidopsis CCR4-NOT Complexes with Pumilio RNA-Binding Proteins, APUM5 and APUM2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2015 ~ 2025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz089	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 -

1. 著者名 Lkhamkhuu Enkhsukh, Zikiyara Kazunori, Katsura Hitomi, Tokutomi Satoru, Hosokawa Takafumi, Usami Yoshihisa, Ichihashi Mitsuyoshi, Yamaguchi Junji, Monde Kenji	4. 巻 37
2. 論文標題 Effect of circularly polarized light on germination, hypocotyl elongation and biomass production of arabidopsis and lettuce: Involvement of phytochrome B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.19.1219a	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 -

1. 著者名 Li Xingwen, Sanagi Miho, Lu Yu, Nomura Yuko, Stolze Sara Christina, Yasuda Shigetaka, Saijo Yusuke, Schulze Waltraud X., Feil Regina, Stitt Mark, Lunn John E., Nakagami Hirofumi, Sato Takeo, Yamaguchi Junji	4. 巻 11
2. 論文標題 Protein Phosphorylation Dynamics Under Carbon/Nitrogen-Nutrient Stress and Identification of a Cell Death-Related Receptor-Like Kinase in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 377 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00377	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 該当する

1. 著者名 Maki Yuko, Soejima Hiroshi, Kitamura Toru, Sugiyama Tamizi, Sato Takeo, Watahiki Masaaki K., Yamaguchi Junji	4. 巻 38
2. 論文標題 3-Phenyllactic acid, a root-promoting substance isolated from Bokashi fertilizer, exhibits synergistic effects with tryptophan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 9 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0727a	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Luo Y, Takagi J, Claus LAN, Zhang C, Yasuda S, Hasegawa Y, Yamaguchi J, Shan L, Russinova E and Sato T
2. 発表標題 Deubiquitinating enzymes limit the degradation of brassinosteroid receptor BRI1 in Arabidopsis
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 2. 長谷川陽子, Thais Huarancca Reyes, 植村知博, Anirban Baral, 羅永茗, 前川修吾, 安田盛貴, 深尾陽一朗, 中野明彦, 高木純平, Rishikesh P. Bhalerao, 山口淳二, 佐藤 長緒
2. 発表標題 SNAREタンパク質SYP61はユビキチンリガーゼATL31と共にシロイヌナズナのC/N栄養応答を制御する
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Luo Y, Lu Y, Yamaguchi J, Sato T	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Protocol, Humana, New York, NY	5. 総ページ数 417
3. 書名 Chapter 21, Proteomic analysis of 14-3-3 targets in tomato fruit tissues. In "Plant Proteomics: Methods and Protocol, Third Edition" (edited by J.V. Jorrín Novo, L. Valledor, and M.A. Castillejo) Methods in Molecular Biology, vol. 2039	

1. 著者名 眞木祐子, 山口淳二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 農山漁村文化協会	5. 総ページ数 248
3. 書名 植物に対する乳酸菌培養液の機能性, 最新農業技術『土壌施肥』 第12巻, <環境ストレスに強くするバイオスティミュラント>	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 不定根発生誘導剤及び根系発達促進剤	発明者 眞木裕子, 副島洋, 山口淳二, 谷野圭 持, 綿引雅昭, 佐藤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6706949号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 不定根発生誘導剤及び根系発達促進剤	発明者 眞木裕子, 副島洋, 山口淳二, 綿引雅 昭, 佐藤長緒	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6779490号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

山口 淳二 教授 YAMAGUCHI Junji https://www2.sci.hokudai.ac.jp/faculty/researcher/junji-yamaguchi 北海道大学大学院理学研究院形態機能学講座 https://www.sci.hokudai.ac.jp/CSF2-web/
--

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)	

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		
ドイツ	Max Planck Institute	University of Hohenheim	