

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08190

研究課題名(和文) ユビキチンシグナルによる膜交通制御と環境ストレス適応機構の解明

研究課題名(英文) Ubiquitin signal involved in membrane trafficking for plant environmental stress responses

研究代表者

佐藤 長緒 (Sato, Takeo)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：50609724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膜局在型ユビキチンリガーゼATL31が膜交通制御因子SNAREの機能制御に関わるという発見を突破口に、植物の優れた環境ストレス適応機構の解明に取り組んだ。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。その結果、ATL31がTGNを含む複数の膜コンパートメントに局在すること、ATL31が特定のSNAREタンパク質をユビキチン化することが分かった。また、特定のSNAREタンパク質のユビキチン化状態が環境ストレスにตอบสนองして変動することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、これまで植物において知られていなかった環境ストレス適応の分子機構の一端が明らかになった。細胞内の物質輸送において重要な役割を果たす膜交通系構成因子の翻訳後機能制御の知見はあまり無い。細胞内の物質輸送制御の根幹に関わる因子の翻訳後修飾の存在を突き止めたことで、多様な環境ストレスへの適応戦略の理解につながる可能性がある。今後、作物種等における研究に発展させることで、農業分野へ貢献する研究としたい。

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated the molecular mechanism mediating plant responses to environmental stresses via ubiquitin signal. Ubiquitination is one of the fundamental post-translational modifications with ubiquitin, a conserved 76-amino acid protein present in eukaryotes. We previously identified a membrane localized ubiquitin ligase ATL31 regulating plant adaptation to carbon/nitrogen nutrient stress and defense response to pathogen attack. Proteomic analysis revealed that ATL31 interacts with several membrane trafficking regulators. We also found that ATL31 localized to several endosomal compartments as well as plasma membrane. In addition, we demonstrated that ATL31 physically interacts with and ubiquitinates a regulatory component of membrane trafficking system in Arabidopsis plants.

研究分野：植物科学

キーワード：ユビキチンシグナル 膜交通制御 環境ストレス適応

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地表に固定され生きる植物は、多様な環境ストレスに適応する優れた細胞機能が必要とされる。細胞膜上は、こうした環境シグナルの受容体や伝達因子が存在する場であると同時に、トランスポーターや活性酸素種産生酵素といった物質運搬・合成に関わるタンパク質群の機能する代謝制御の場として、環境ストレス適応における重要な機能を担っている。

申請者らは、モデル植物シロイヌナズナを材料にした変異体スクリーニングから、複数の環境ストレス耐性に重要な因子として新規の膜局在ユビキチンリガーゼ ATL31 を単離した。ユビキチンリガーゼは、特異的な標的タンパク質を認識しユビキチン分子を付加する酵素であり、標的タンパク質の分解や細胞内局在性を制御することで細胞機能制御において重要な役割を果たす。ATL ファミリーは植物種間で広く保存されており、シロイヌナズナでは 90 を超える巨大なファミリーを形成するが、その分子機能に関する実態は不明のままであった。これまでの研究結果から、ATL31 は CIPK キナーゼによるリン酸化により活性制御を受け、植物の炭素/窒素 (C/N) 栄養バランス制御および病原体抵抗性において重要な機能を果たすことを明らかとした (Sato et al., *Plant J*, 2009/2011; Yasuda et al., *J Biol Chem*, 2014; Maekawa et al., *Plant Physiol*, 2014; Yasuda et al., *Mol Plant*, 2017)。しかし、ATL31 がどのような細胞内機能を制御することで、こうした環境ストレス応答に貢献しているかについては不明な点が多い。その後の申請者らの研究から、ATL31 は膜交通系因子群と相互作用する可能性が示唆された。その中でも特に、SNARE タンパク質 SYP61 との関係が注目された。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31 が膜交通制御因子 SNARE の機能制御に関わるという発見を突破口に、植物の優れた環境ストレス適応機構の解明に取り組んだ。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。

### 3. 研究の方法

#### (1) ATL31 による SYP61 のユビキチン化と機能制御機構の解明

*in vitro*/*in vivo*での生化学的解析から、SYP61 ユビキチン化の有無、ユビキチン化パターンを解析する

#### (2) ATL31 と SYP61 によって制御される積荷の同定

プロテオミクス解析とイメージング解析から、ATL31・SYP61 制御下の積荷を特定する。

#### (3) ATL31 による SYP61 を介した膜交通制御の生理学的意義の検証

SYP61 および積荷の変異株を用いて栄養ストレス・病原体感染ストレス応答を検証する。

### 4. 研究成果

本研究から、その結果、ATL31 が TGN を含む複数の膜コンパートメントに局在すること、それが自身のユビキチンリガーゼ活性に応じて変化することが分かった。また、ATL31 が SNARE タンパク質 SYP61 をユビキチン化することが分かった。さらに、*in vitro*ユビキチン化反応後の MS 解析を行い、SYP61 の主要なユビキチン化部位を同定した。これは細胞内における SYP61 ユビキチン化の生化学的機能を考えるうえで重要なデータとなる。さらに、ATL31-SYP61 系により制御されるカーゴタンパク質の特定に向けた小胞プロテオミクスの実験系を確立し、実施した。その

結果，複数のカーゴ候補タンパク質が得られている。こうした成果を基に，今後は，ユビキチン化部位変異型 SYP61 を発現する形質転換シロイヌナズナ株の作出し，生理学的解析を行う。また，小胞プロテオミクスの結果を精査し，ATL31-SYP61 系により制御されるカーゴタンパク質に関する個別解析を行う。カーゴタンパク質の細胞内動態や変異株の C/N 応答性解析を行うことで，ユビキチン化による細胞内膜交通制御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9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

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
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 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 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 Sanagi Miho, Lu Yu, Aoyama Shoki, Morita Yoshie, Mitsuda Nobutaka, Ikeda Miho, Ohme-Takagi Masaru, Sato Takeo, Yamaguchi Junji	4. 巻 35
2. 論文標題 Sugar-responsive transcription factor bZIP3 affects leaf shape in Arabidopsis plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 167 ~ 170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0410a">https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0410a</a>	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 Aoyama Shoki, Yamaguchi Junji, Sato Takeo	4. 巻 1744
2. 論文標題 Methods for Elucidation of Plant Senescence in Response to C/N-Nutrient Balance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 151 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7672-0_14">https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7672-0_14</a>	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 Sato Takeo, Maekawa Shugo, Konishi Mineko, Yoshioka Nozomi, Sasaki Yuki, Maeda Haruna, Ishida Tetsuya, Kato Yuki, Yamaguchi Junji, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 483
2. 論文標題 Direct transcriptional activation of BT genes by NLP transcription factors is a key component of the nitrate response in Arabidopsis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Research Communications	6. 最初と最後の頁 380 ~ 386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.12.135	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 Yasuda Shigetaka, Aoyama Shoki, Hasegawa Yoko, Sato Takeo, Yamaguchi Junji	4. 巻 10
2. 論文標題 Arabidopsis CBL-Interacting Protein Kinases Regulate Carbon/Nitrogen-Nutrient Response by Phosphorylating Ubiquitin Ligase ATL31	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 605 ~ 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2017.01.005	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, Hasegawa Yoko, Lu Yu, Sato Takeo	4. 巻 34
2. 論文標題 Ubiquitin related enzymes and plant-specific ubiquitin ligase ATL family in tomato plants	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.17.0306a	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 Aoyama Shoki, Terada Saki, Sanagi Miho, Hasegawa Yoko, Lu Yu, Morita Yoshie, Chiba Yukako, Sato Takeo, Yamaguchi Junji	4. 巻 491
2. 論文標題 Membrane-localized ubiquitin ligase ATL15 functions in sugar-responsive growth regulation in Arabidopsis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Research Communications	6. 最初と最後の頁 33 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.07.028	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9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤長緒, 長谷川陽子, Yongming Luo, 山口淳二
2. 発表標題 膜交通制御因子のユビキチン化と植物の環境ストレス適応機構
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato T, Hasegawa Y, Fujimaki A, Mukuta K, Uemura T, Nakano A and Yamaguchi J
2. 発表標題 TGN/EE SNARE Associated with Ubiquitin Ligase ATL31 Functions in Carbon/Nitrogen-Nutrient Response in Arabidopsis
3. 学会等名 International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤長緒, 眞木美帆, 久保晃生, 山口淳二
2. 発表標題 窒素栄養シグナルによる転写因子の翻訳後修飾と花成制御機構の解析
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato T, Luo Y, Yasuda S, Hasegawa Y and Yamaguchi J
2. 発表標題 Arabidopsis CIPK protein kinases regulate carbon/nitrogen-nutrient response by phosphorylating membrane-localized ubiquitin ligase ATL31
3. 学会等名 International Workshop on Plant Membrane Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤長緒, 眞木美帆, 青山翔紀, 山口淳二
2. 発表標題 窒素栄養に応答した花成制御に関する転写因子の単離と機能解析
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤長緒, 眞木美帆, 青山翔紀, 伊藤照悟, 阿部光知, 今泉貴登, 山口淳二
2. 発表標題 窒素栄養応答性の花成制御に関する転写因子の機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤長緒, Xingwen Li, 山口淳二
2. 発表標題 糖シグナルによる植物の栄養成長と病原体抵抗性のトレードオフ制御機
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会・シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤長緒
2. 発表標題 糖・窒素栄養による植物の成長相転換制御
3. 学会等名 第3回 植物の栄養研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤長緒, 長谷川陽子, 山口淳二
2. 発表標題 ユビキチンシグナルによる細胞内膜交通制御と植物の環境応答
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="http://www.sci.hokudai.ac.jp/CSF2-web/">http://www.sci.hokudai.ac.jp/CSF2-web/</a> 研究室ホームページ <a href="http://www.sci.hokudai.ac.jp/CSF2-web/">http://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