

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14731

研究課題名（和文）重力応答性のタンパク質細胞内局在を可能にする分解制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms underlying protein degradation enabling protein localization in response to gravity.

研究代表者

中村 守貴（Nakamura, Moritaka）

基礎生物学研究所・植物環境応答研究部門・特任研究員

研究者番号：90808560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：重力屈性反応における重力シグナリングは、アミロプラスト沈降による重力感受とオーキシン輸送制御とをつなぐ、重力感受細胞内の重要な情報伝達プロセスである。本研究課題では、重力シグナリングの鍵因子であるLAZY1ファミリーの量的制御と時空間的細胞内挙動を解析することで、重力シグナリングの分子機構の理解を目指した。本研究により、LZY3はユビキチン化され、ユビキチン-プロテアソーム経路を介して量的制御を受けている可能性を見出した。さらには、高感度のライブイメージング技術によりLZY3の可視化に成功し、LZY3がアミロプラスト沈降に伴って重力方向側の細胞膜へと局在変化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

これまでの研究では、LAZY1ファミリーの分子レベルでの研究は十分にされていなかった。また、LAZY1ファミリーが重力シグナリングで機能するにも関わらず、上流のプロセスであるアミロプラスト沈降との関連性に着目した研究は全くされていなかった。本研究により、LZY3はユビキチン化されることで存在量が低く保たれていることが明らかになり、重力シグナリングにおけるLAZY1ファミリーの量的制御の重要性を示すことができた。さらには、アミロプラスト動態とLZY3の細胞内動態を時空間的に関連つけたことにより、今後、LAZY1ファミリーを中心とした重力シグナリングの分子機構の理解が進むと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Gravity signaling is an important process that controls directional auxin transport following amyloplasts relocation in gravitropism. In Arabidopsis, LAZY1 family proteins are shown to play a key role in gravity signaling. However, it is still uncertain how LAZY1 family proteins are involved in gravity signaling possibly due to their low abundance or high turnover rate. Here, this study revealed that LZY3, a member of LAZY1 family, is ubiquitylated, suggesting that the abundance of LZY3 is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. In addition, high-sensitive live cell imaging technique successfully enabled the visualization of LZY3, despite its low abundance. Further imaging analysis revealed that LZY3 changes its localization toward the lower side of the cell following amyloplasts relocation in response to gravistimulation.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：重力屈性 重力シグナリング LAZY1ファミリー タンパク質分解 細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

重力屈性とは、植物器官が重力方向を認識し成長方向を制御する重要な生長反応である。例えば、シロイヌナズナを水平方向に傾けたとき、花茎は重力とは反対方向へと屈曲し（負の重力屈性）、根は重力方向へと屈曲する（正の重力屈性）。高等植物の重力屈性は、以下の連続した4つの素過程から構成される。(1) 重力感受: 重力感受細胞内に存在するアミロプラスト（デンプンの高蓄積により比重を増した色素体）が重力方向へと沈降することで、重力方向が認識される。(2) 重力シグナリング: アミロプラストの位置という物理的情報が生化学的シグナルに変換され重力感受細胞内で伝達される。(3) 細胞間情報伝達: オーキシンの方向性を持った細胞間輸送により重力情報が重力感受細胞から隣接組織へと伝達する。(4) 器官の偏差成長: オーキシン偏差分布により器官が屈曲する。このように、重力シグナリングは、アミロプラスト沈降による重力方向の入力をオーキシンの方向性を持った輸送に反映させる、重力感受細胞内の重要な情報伝達プロセスである。

シロイヌナズナに6つ存在するLAZY1ファミリーの内、重力感受細胞で発現し機能するLZY1、LZY2、LZY3を欠損した *lzy1 lzy2 lzy3* 三重変異体のコルメラ細胞（根端部に位置する根の重力感受細胞）内では、アミロプラストは重力方向へと正常に沈降する。しかしながら、オーキシン輸送体 PIN3 の根端部における発現分布と重力方向側へのオーキシン極性輸送に異常が見られ、根の重力屈性反応に異常を示す。これらの結果から、LAZY1ファミリーは、アミロプラスト沈降後に重力方向側へのオーキシン輸送制御を可能にする、重力シグナリングの鍵因子であることが明らかにされていた。しかしながら、LAZY1ファミリーが重力感受細胞内においてどのような時空間的細胞内挙動を示し、その機能を発揮しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

研究開始当初、LAZY1ファミリーのうち根の重力屈性への貢献度が高いLZY3に着目した解析から、以下3点の予備的な結果が見出されていた。

(1) 自身のプロモーターで発現させた機能的なLZY3-mCherryの蛍光は極めて弱く、従来の観察方法ではコルメラ細胞内では蛍光が検出できない。しかしながら、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解阻害剤MG-132の処理後、強い蛍光がコルメラ細胞内の細胞膜上に観察できる。

(2) 野生型の側根は重力方向に対して斜め下に伸長する。一方、*lzy1 lzy2 lzy3* 三重変異体の側根は重力方向に対して斜め上に伸長する重力屈性異常を示す。エストラジオールを用いた発現誘導によりLZY3-mCherryを *lzy1 lzy2 lzy3* 内で中程度に発現させると、側根の伸長方向が斜め下向きに回復する。しかしながら、LZY3-mCherryを過剰に発現させる、つまり、存在量を過剰にさせると、側根の伸長方向が上下両方向にランダムにばらつくという重力屈性異常を示す。以上2つの予備的な結果は、ユビキチン化による量的制御がLZY3の重力シグナリングにおける機能に重要な役割を担っている可能性を示唆する。しかしながら、LZY3のタンパク質分解制御機構は明らかにされておらず、この制御とアミロプラスト沈降との関連性も明らかにされていなかった。

(3) 生きた細胞内において、自身のプロモーターで発現させた機能的なLZY3-mCherryの蛍光は従来の観察方法では検出できない。しかしながら、固定・透明化した側根コルメラ細胞内ではLZY3-mCherryの検出が可能となり、LZY3-mCherryは重力方向側の細胞膜上に極性局在することが示されている。以上の予備的な結果は、LZY3はアミロプラスト沈降に応答してダイナミックに細胞内局在を変化させている可能性が高いことを示している。しかしながら、LZY3の細胞内局在制御とアミロプラスト沈降との直接的な関連性は未だ明らかにされていなかった。

そこで本研究では、LZY3が機能を発揮する上で重要となる自身の量的制御機構の解明を目指した。さらには、高感度のライブイメージング技術を用いることで、LZY3の分子挙動とアミロプラスト動態を時空間的に関連付け、LAZY1ファミリーを中心とした重力シグナリングの分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) LZY3の量的制御に関わるタンパク質分解機構の解明

上述した通り、LZY3が重力シグナリングにおいて機能を発揮するためには、ユビキチン化による量的制御が重要な役割を担っている可能性がある。そこで本研究では、ユビキチン化タンパク質を検出する生化学的手法により、LZY3のユビキチン化を直接的に検証した。

(2) LZY3の量的制御とアミロプラスト沈降との関連性の検証

アミロプラスト沈降依存の物理的刺激が増強する過重力条件を利用し、LZY3の量的制御とアミロプラスト沈降との関連性を検証した。さらには、LZY3の存在量を増加させる阻害剤のスクリーニングを行った。

(3) LZY3の細胞内局在制御とアミロプラスト沈降との関連性の検証

アミロプラスト沈降とLZY3の細胞内局在変化の関連性を直接的に検証するため、重力方向を保ちながら高感度のライブイメージングを可能にする横倒し垂直ステージ共焦点顕微鏡を用い、重力方向変化に伴ったLZY3-mCherryの細胞内動態イメージング解析を行った。

4. 研究成果

(1) LZY3 の量的制御に関わるタンパク質分解機構の解明

先行研究において、自身のプロモーターで LZY3-mCherry を発現させた *LZY3p:LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* では、LZY3-mCherry の蛍光が従来の観察方法では検出できないことが示されていた。また、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解阻害剤である MG-132 を処理した後、LZY3-mCherry 蛍光がコルメラ細胞内で検出できるようになることが示されていた。そこで、先行研究の再現性をとるため、*LZY3p:LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* に対して MG-132 を処理した後、LZY3-mCherry の詳細な蛍光観察を行った。先行研究同様、コントロール処理した *LZY3p:LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* では LZY3-mCherry の強い蛍光は観察されなかった。一方、MG-132 処理後においては、LZY3-mCherry の強い蛍光がコルメラ細胞内の細胞膜上に観察された。以上の結果から、LZY3 はユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解経路により量的制御を受けている可能性が強く示唆された。

次に、LZY3 がユビキチン化されているかどうかを直接的に検証するため、ユビキチン化タンパク質を検出するための生化学的解析を進めた。まず、MG-132 処理の有効性が立証された *LZY3p:LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* に対して、MG-132 処理後のユビキチン化タンパク質の検出を試みた。しかしながら、LZY3-mCherry がユビキチン化されていることを示唆する結果は得られなかった。LZY3 は一部の組織のみで発現していることを考慮すると、MG-132 処理後においても LZY3-mCherry タンパク質量が十分ではなく、自身のプロモーターを利用した *LZY3p:LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* は生化学的解析には適していないことが考えられる。そこで次に、植物全体で発現するプロモーターとエストラジオールによる発現誘導を利用した *G10-90p:XVE>>LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* を用いて解析を行った。コントロール処理した *G10-90p:XVE>>LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* においては、ユビキチン化された LZY3-mCherry は検出されなかった。一方、エストラジオールによる LZY3-mCherry の過剰発現誘導と MG-132 処理をした *G10-90p:XVE>>LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* においては、ユビキチン化された LZY3-mCherry が検出された。

以上の結果は、LZY3 がユビキチン化され、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解経路により量的制御を受けている可能性を強く示唆している。今後は、LZY3 をユビキチン化する E3 ユビキチンリガーゼを同定・解析していくことで、LZY3 の量的制御機構がさらに解明されていくと考えられる。

(2) LZY3 の量的制御とアミロプラスト沈降との関連性の検証

上述の通り、LZY3 はユビキチン化されることにより量的制御を受けている可能性がある。そこで、アミロプラスト沈降が LZY3 の量的制御機構に関与している可能性を考え、アミロプラスト沈降依存の物理的的刺激が増強する過重力条件を利用することで、コルメラ細胞内での LZY3 存在量の変動を解析した。遠心機を用いて *LZY3p:LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* に過重力を与えたのち、直ちにコルメラ細胞内の LZY3-mCherry 蛍光を観察した。しかしながら、過重力により LZY3-mCherry の蛍光が強くなる、つまり、LZY3-mCherry の存在量が増加する結果は得られなかった。このことから、過重力条件は LZY3-mCherry 存在量に影響を与えない可能性が示された。

そこで、他の可能性を考え、細胞骨格の重合・脱重合に影響を与える阻害剤、脂質合成に影響を与える阻害剤、タンパク質のリン酸化に影響を与える阻害剤、小胞輸送に影響を与える阻害剤等を含む約 20 種の阻害剤について、LZY3-mCherry 存在量を増加させる阻害剤のスクリーニングを行った。各阻害剤を *LZY3p:LZY3-mCherry/lzy1 lzy2 lzy3* に処理した後、コルメラ細胞内の LZY3-mCherry の蛍光観察を行った結果、LZY3-mCherry 蛍光強度を増加させる、つまり、LZY3-mCherry 存在量を増加させる複数の阻害剤を見出すことに成功した。

今後は、LZY3-mCherry 存在量を増加させた阻害剤の作用機序に着目し解析を進めていくことで、LZY3-mCherry の量的制御機構がさらに解明されていくと考えられる。

(3) LZY3 の細胞内局在制御とアミロプラスト沈降との関連性の検証

上述した通り、自身のプロモーターで発現させた LZY3-mCherry の蛍光は従来の観察方法では検出できず、LZY3-mCherry の細胞内局在とアミロプラスト動態との直接的な関係性は不明なままであった。そこで、重力方向を保持したまま高感度のライブイメージングを可能にする横倒し垂直ステージ共焦点顕微鏡を用い、LZY3-mCherry の細胞内動態イメージング解析を行った。興味深いことに、高感度のライブイメージング技術により自身のプロモーターで発現させた LZY3-mCherry 蛍光が生きた細胞内で検出可能となり、コルメラ細胞内の LZY3-mCherry の動態を捉えることができた。さらには、重力刺激後のアミロプラスト沈降に伴い、LZY3-mCherry が新たな重力方向側の細胞膜へと局在変化する様子が観察された。

今後は、横倒し垂直ステージ共焦点顕微鏡を用いたライブイメージングに、高度な画像解析技術を組み込むことで、アミロプラスト動態と LZY3-mCherry 動態との間の時空間的な関係性を定量的に示す必要があると考えられる。さらには、これら技術を利用し、LZY3-mCherry 動態に影響を与える阻害剤や変異体等を同定・解析していくことで、LAZY1 ファミリーを中心とした重力シグナリングの分子機構の解明が進むと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Furutani M, Hirano Y, Nishimura T, Nakamura M, Taniguchi M, Suzuki K, Oshida R, Kondo C, Sun S, Kato K, Fukao Y, Hakoshima T, Morita MT	4. 巻 11
2. 論文標題 Polar recruitment of RLD by LAZY1-like protein during gravity signaling in root branch angle control	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41467-019-13729-7	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 Nakamura M, Nishimura T, Morita MT	4. 巻 52
2. 論文標題 Bridging the gap between amyloplasts and directional auxin transport in plant gravitropism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 54～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.pbi.2019.07.005	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 Nakamura M, Nishimura T, Morita MT	4. 巻 70
2. 論文標題 Gravity sensing and signal conversion in plant gravitropism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 3495～3506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/jxb/erz158	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 西村岳志、中村守貴、森田（寺尾）美代	4. 巻 54
2. 論文標題 重力屈性における重力感受とシグナリングのメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 102～107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村守貴, 古谷将彦, 近藤智恵美, 西村岳志, 谷口雅俊, 森田（寺尾）美代
2. 発表標題 重力感受細胞内で極性局在するLZY3は RLD1をリクルートする
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村守貴
2. 発表標題 重力シグナリング因子LZY3の重力感受細胞内における局在解析
3. 学会等名 第8回植物エンドメンブレンミーティング
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村守貴, 西村岳志, 近藤智恵美, 古谷将彦, 谷口雅俊, 森田（寺尾）美代
2. 発表標題 重力感受細胞内における重力シグナリング因子LZY3の局在解析
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 中村守貴
2. 発表標題 重力シグナリング因子LZY3に着目した重力屈性制御機構の解析
3. 学会等名 第7回植物エンドメンブレンミーティング
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----