

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22644

研究課題名(和文)植物の形態多様性を担うE3ユビキチンリガーゼの分子機構の解明

研究課題名(英文)Revealing the molecular mechanism of E3 ubiquitin ligase underlying plant morphological diversity

研究代表者

別所 奏子(別所・上原奏子)(Bessho-Uehara, Kanako)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：90876624

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文): E3ユビキチンリガーゼを介したシグナルネットワークを明らかにするため、植物2種のオーソログ遺伝子を用いた解析を行なった。

イネ種子先端にできる芒の伸長を制御する遺伝子RAE3を同定し、その細胞内局在や遺伝子発現パターンを明らかにした。また、シロイヌナズナにおけるRAE3オーソログ、ATL43の解析を行い、ATL43過剰発現体では鋸歯の喪失や矮化が起きることを見出した。さらにATL43-TurboIDを用いてATL43の相互作用タンパク質を網羅的に同定し、その中でもCIPK9がATL43と相互作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

形態多様性の分子基盤の理解には形態形成の分子機構を解明し、幅広い種で比較を行うことが重要である。種間の遺伝子機能を比較する進化発生生物学的研究はこれまでも行われてきたが、その多くはホメオティック遺伝子等の転写因子に焦点を当てたもので、遺伝子の発現制御に着目したものであった。しかし一方で、翻訳されたタンパク質の量が形態に与える影響については十分に議論されているとは言えない。申請者は、基質タンパク質にユビキチンを付加し分解させる働きを持つE3ユビキチンリガーゼが異種の植物において異なる器官形態を制御することを見出し、E3ユビキチンリガーゼを基点とした新たな形態形成の分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文): To reveal the regulatory network for plant morphology mediated by the E3 ubiquitin ligase, orthologous genes of rice and Arabidopsis was examined.

I identified RAE3, a gene that regulates the elongation of awn which is spine-like structure at the tip of rice seed, and clarified its subcellular localization and gene expression patterns. In addition to that, by collaborative work, we showed that the different genes were selected during rice domestication in Asia and Africa independently. I also analyzed the Arabidopsis RAE3 ortholog, ATL43. I found that ATL43 overexpression caused loss of serrations and dwarf phenotype. Furthermore, ATL43-TurboID which is the proximity labeling technique made us identify ATL43-interacting proteins, among which CIPK9 was found to interact with ATL43.

研究分野：植物生理学

キーワード：E3ユビキチンリガーゼ 相互作用 形態形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

形態多様性の分子基盤の理解には形態形成の分子機構を解明し、幅広い種で比較を行うことが重要である。種間の遺伝子機能を比較する進化発生生物学的研究はこれまでも行われてきたが、その多くはホメオティック遺伝子に代表される転写因子に焦点を当てたものであった^{文献1,2,3}。転写因子は一度に広範な遺伝子の転写レベルを制御することから、形態に大きな影響を与えると予想できる。しかし一方で、翻訳されたタンパク質の量が形態に与える影響については十分に議論されているとは言えない。申請者は、基質タンパク質にユビキチンを付加し分解させる働きを持つ E3 ユビキチンリガーゼが異種の植物において異なる器官形態を制御することを見出した。このことはタンパク質量の変化が形態形成に重要であることを示唆している。本研究では、イネ E3 ユビキチンリガーゼ *RAE3* およびそのシロイヌナズナオースログ *ATL43* の相互作用因子の同定と、基質分解に依存的な形態形成の分子機構の解明を目指す。この目標を達成することで、植物の形態多様性に寄与する新たな分子機構の発見につながる。

2. 研究の目的

本研究では「葉」と「芒」の二つの器官形態を制御する E3 ユビキチンリガーゼの分子機構を明らかにする。これまでの研究で、*Regulator of Awn Elongation 3 (RAE3)* と名付けた遺伝子がイネ種子先端にできる突起状の構造物、芒(“のぎ”と読む)の伸長を制御することを見出してきた。しかし、その細胞内局在や発現パターン、相互作用因子は不明であった。また、*RAE3* のシロイヌナズナオースログ *ATL43* の過剰発現体においては、全身で細胞サイズが縮小し矮化する表現型が確認された。「イネの芒」と「シロイヌナズナの葉」とは一見全く異なる器官のようだが、芒は花に由来し、花は葉の連続相同器官であることから組織学的な類似度は高い。*RAE3/ATL43* という E3 ユビキチンリガーゼの遺伝子転用を仮定し、両者の細胞内局在や発現パターン、および両者に共通/異なる基質を網羅的に同定・比較することで、タンパク質分解を中心とした多様な形態を生み出す分子機構を明らかにすることを目的とする(図1)。

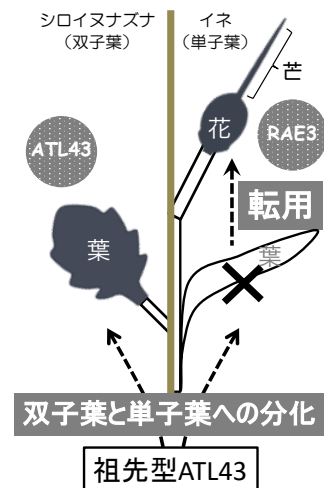


図1. 本研究のコンセプト。双子葉と単子葉での分化後に遺伝子転用が起きたと仮定。

3. 研究の方法

(1) *RAE3* の細胞内局在および発現パターン、タンパク質機能の検証

これまで遺伝学的解析により、*RAE3* がイネの芒伸長を制御することを示してきたがその分子機構については明らかとなっていない。そこで *RAE3*-YFP コンストラクトを用いて、タマネギ表皮細胞におけるボンバードメントおよびイネプロトプラストにおける発現を行い、細胞内局在を観察する。また、葉、茎、根、穂の各器官から RNA を抽出し、qRT-PCR による発現パターンの解析を行う。配列情報から *RAE3* は RING 型 E3 ユビキチンリガーゼをコードしていることがわかっているため、オーキシンドegradation システム^{文献4}を用いて酵母における機能検証を行う。

(2) ATL43 基質の同定

ATL43 の相互作用因子を同定するため、TurboID とよばれる近接タンパク質同定技術を用いる。TurboID は目的タンパク質の半径 10nm 以内に存在するタンパク質に無差別にビオチンを付加する酵素であり、複合体や結合力の弱い相互作用因子も網羅的に同定することができる^{文献 5}。ATL43-TurboID 形質転換体からタンパク質を抽出し、ストレプトアビジンビーズを用いたビオチン化タンパク質の精製および質量分析計を用いた解析を行うことで、予備的に ATL43 の相互作用候補を約 500 同定した。本研究では、再度 ATL43-TurboID の解析を行い、重複して検出されるものを基質候補として絞り込む。さらに BiFC 法により ATL43 と基質候補が実際に相互作用するかを検証することで ATL43 の基質を決定する。

(3) イネ RAE3 相互作用因子の決定

RAE3-TurboID 形質転換イネを用いて(2)と同様の手法で解析を行い、RAE3 の基質を決定する。その後 Gene Ontology 解析や、ATL43 基質との比較解析を行うことで ATL43 と RAE3 基質の共通点・相違点を明らかにする。

4. 研究成果

(1) RAE3 の細胞内局在および発現パターン、タンパク質機能の検証

RAE3-YFP コンストラクトをタマネギ表皮およびイネプロトプラストに導入し、細胞内局在を観察した。RAE3 は N 末端領域に疎水性ドメインを持ち、膜局在型タンパク質だと予想されたため、細胞膜可視化マーカーである FM4-64 による蛍光染色も行った。その結果、タマネギ、イネどちらにおいても FM4-64 と共局在している様子が観察されたことから、細胞膜に局在すると結論づけた。また、イネの各器官を用いた qRT-PCR の結果、幼穂において特異的に高発現していることが明らかとなった。さらに、名古屋大学理学部の小原先生、嘉村先生との共同研究により、RAE3 と OsTIR1 の基質認識部位をスワップしたキメラタンパク質を作成し、酵母内で発現させ、オーキシン依存的な基質 IAA17 の分解が起きるか検証した。その結果、野生型 RAE3 を導入した株においてはオーキシン依存的に IAA17 の分解が観察されたが、RAE3 の RING ドメインに点変異を入れたもの (RAE3 (C136S) と表記) では IAA17 の分解が顕著に抑制された。また野生型 RAE3 では自己ユビキチン化による自己分解も観察されたが、RAE3 (C136S) は全く分解されなかった。さらに野生型 RAE3 を導入したイネでは芒を伸長させたが、RAE3 (C136S) を導入したイネでは芒伸長が見られなかった。すなわち、RAE3 は E3 ユビキチンリガーゼとしての機能を有しており、その機能を欠失することで芒伸長を誘導できなくなることが明らかとなった。

(2) ATL43 基質の同定

35S:ATL43(WT)-TurboID、35S:ATL43(Δ RING)-TurboID、35S:YFP-TurboID コンストラクトをシロイヌナズナに形質転換した T3 系統からタンパク質を抽出し、MS 解析を行うことで、ATL43 の相互作用タンパク質を探索した。解析は独立に 2 回行い、両方で共通するタンパク質を 313 絞り込んだ。それらの GO エンリッチメント解析を行ったところ、小胞輸送やユビキチン修飾依存的なタンパク質異化作用に関わる遺伝子群が濃縮された。ATL43 は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つ膜局在タンパク質であることからこれらは強い相互作用因子であると考え

られる。また、生理的意義のある候補として CIPK9 や TMK1 というキナーゼを見出した。なかでも、これまでに ATL31 が CIPK7, 12, 14 と相互作用し、それらキナーゼによる ATL31 のリン酸化が ATL31 のタンパク質安定性に寄与しているとの報告がある^{文献6}ことから CIPK9 は ATL43 の相互作用因子として特に強い候補と期待した。ATL43 と CIPK9 の BiFC コンストラクトをタバコ葉で一過的に発現させたところ、蛍光が観察されたことから、ATL43 と CIPK9 は相互作用することが示された。今後は CIPK9 のリン酸化が ATL43 の安定性に寄与するか等の検証実験を進める。

(3) イネ RAE3 相互作用因子の決定

研究計画立案時は RAE3-TurboID 形質転換体を用いて RAE3 の相互作用タンパク質も網羅的に同定する予定であったが、産体育休をはさみ、形質転換体がうまく育たなかったため、その計画は断念した。そこで、18 種の双子葉、単子葉植物における RAE3 オースログ遺伝子のタンパク質配列を入手し比較解析を行った。その結果、RAE3 オースログ遺伝子において RING ドメインは広く保存されているが、基質認識部位は双子葉と単子葉で異なることを見出した。また、単子葉の系統内では基質認識部位の保存性が高く、双子葉では低いことが示された。このことは単子葉と双子葉で認識する基質が異なることを示唆している。

本研究のまとめ

本研究では E3 ユビキチンリガーゼ *RAE3/ATL43* の形態制御における分子機構を明らかにすることを目的に、細胞内局在およびその相互作用相手の探索を行なった。その結果、RAE3 の細胞内局在、発現パターン、機能を明らかにした。また、ATL43 の相互作用相手の一つとして CIPK9 を見出した。一方、単子葉と双子葉の RAE3 オースログでは基質認識部位の保存性が異なることから、RAE3 と ATL43 の基質は異なることが示唆された。今後は ATL43 と CIPK9 の詳細な分子間相互作用について明らかにするとともに、RAE3 の相互作用相手も網羅的に明らかにし、RAE3/ATL43 を起点とした形態制御ネットワークの比較を行なっていきたい。

<引用文献>

1. Tsiantis, M., Hay, A. Comparative plant development: the time of the leaf?. *Nat Rev Genet* 4, 169–180 (2003).
2. Ichihashi Y, Aguilar-Martínez JA, Farhi M, Chitwood DH, Kumar R, Millon LV, Peng J, Maloof JN, Sinha NR. Evolutionary developmental transcriptomics reveals a gene network module regulating interspecific diversity in plant leaf shape. *Proc Natl Acad Sci* 111:E2616–E2621 (2014).
3. Glassford W, Johnson W, Dall N, Smith SJ, Liu Y, Boll W, Noll M, Rebeiz M. Co-option of an Ancestral Hox-Regulated Network Underlies a Recently Evolved Morphological Novelty. *Dev Cell* 34(5):520-31 (2015).
4. Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H. et al. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* 6, 917–922 (2009).
5. Branon, T., Bosch, J., Sanchez, A. et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol* 36, 880–887 (2018).
6. Yasuda S, Aoyama S, Hasegawa Y, Sato T, Yamaguchi Y. Arabidopsis CBL-Interacting Protein Kinases Regulate Carbon/Nitrogen-Nutrient Response by Phosphorylating Ubiquitin Ligase ATL31. *Molecular Plant* 10(4):605-618 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kanako Bessho-Uehara, Yoshiyuki Yamagata, Tomonori Takashi, Takashi Makino, Hideshi Yasui, Atsushi Yoshimura and Motoyuki Ashikari	4. 巻 4
2. 論文標題 Exploring the Loci Responsible for Awn Development in Rice through Comparative Analysis of All AA Genome Species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 725-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants10040725	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 Kanako Bessho-Uehara, Kengo Masuda, Diane R. Wang, Rosalyn B. Angeles-Shim, Keisuke Obara, Keisuke Nagai, Riri Murase, Shin-ichiro Aoki, Tomoyuki Furuta, Kotaro Miura, Jianzhong Wu, Yoshiyuki Yamagata, Hideshi Yasui, Michael B. Kantar, Atsushi Yoshimura, Takumi Kamura, Susan R. McCouch, and Motoyuki Ashikari	4. 巻 120
2. 論文標題 Regulator of Awn Elongation 3, an E3 ubiquitin ligase, is responsible for loss of awns during African rice domestication	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 e2207105120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2207105120	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 別所-上原 奏子
2. 発表標題 アフリカイネ栽培化過程で選抜された芒伸長遺伝子RAE3の同定と機能解析
3. 学会等名 第84回 日本植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 別所-上原 奏子
2. 発表標題 イネ栽培化過程で選抜された芒伸長遺伝子RAEsに関する機能解析
3. 学会等名 第10回 東北植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 別所-上原 奏子
2. 発表標題 Spatiotemporal gibberellin biosynthesis underlying the optimal rhizome development in <i>Oryza longistaminata</i>
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所-上原 奏子
2. 発表標題 イネ栽培化過程における芒消失に関わる分子遺伝学的研究
3. 学会等名 第12回 東北植物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 別所-上原 奏子
2. 発表標題 植物の葉・花器官形態を制御するE3ユビキチンリガーゼを軸としたシグナル経路同定に向けて
3. 学会等名 富山大学 生物学科セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 別所-上原 奏子ほか
2. 発表標題 離れた2地域におけるイネ栽培化過程で独立に選択された芒伸長遺伝子についての解析 II
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Cornell University	Purdue University	Hawaii University	他1機関
米国	Carnegie Institution			