

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 30日現在

機関番号：82110
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570056
 研究課題名（和文）
 シロイヌナズナにおけるユビキチン様タンパク質RUB/Nedd8修飾制御機構の解明
 研究課題名（英文）
 Elucidation of protein modification system with related ubiquitin protein, RUB/Nedd8, in Arabidopsis
 研究代表者
 大野 豊（OONO YUTAKA）
 独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹
 研究者番号：30343940

研究成果の概要（和文）：

RUB/Nedd8 という小型タンパク質によるタンパク質修飾機構について、研究代表らが発見した植物ホルモン・オーキシンの情報伝達に関わる新規因子SMAP1遺伝子の機能との関連に着目し、解析した。遺伝学的手法や阻害剤を用いた解析の結果、SMAP1は、RUB/Nedd8修飾に関わる因子と相互作用して植物の発生や生長を制御しているということが明らかになってきた。

研究成果の概要（英文）：

Protein modification system by a small protein, RUB/Nedd8, was elucidated with taking into account functional relationship of a novel auxin-signaling factor, SMAP1. Genetic analyses and inhibitor examination revealed that SMAP1 is involved in plant growth and development via its interaction with components associated with RUB/Nedd8 modification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物分子機能 ユビキチン様タンパク質

1. 研究開始当初の背景

RUB/Nedd8修飾とは、ユビキチンと類似した小型タンパク質RUB/Nedd8が標的タンパク質に共有結合するタンパク質修飾の一つである。この修飾によって、CULLINタンパク質や、ガン抑制因子であるp53やp73などのタンパク質が修飾され、これらが関与しているユビキチン依存性タンパク質分解などが調節される。植物では、オーキシンやエチレンなどの植物ホルモンのシグナル受容や、光形態形

成、環境応答など広範囲のシグナル伝達においてRUB/Nedd8修飾（以下植物についてのみ述べる時は単にRUB修飾）が重要な役割を果たしており、RUB修飾制御が正常でない植物では、多面的な著しい形態・生育異常が起こる。RUB/Nedd8修飾機構では、ユビキチン修飾と類似した酵素反応カスケードにより標的分子が修飾され（RUB/Nedd8化）、CSN（COP9シグナロソーム複合体）という巨大タンパク質複合体のイソペプチダーゼ

活性によって脱RUB/Nedd8化反応がおこる。しかし、RUB修飾の調節機構や生物学的意義についてはまだ疑問点や不明点が多く、RUB修飾に関わる未解明因子の探索・同定およびその機能解析が急務である。

研究代表者らは、植物ホルモンであるオーキシンの作用阻害剤の研究過程において、イオンビーム誘発シロイヌナズナ変異体 *aar1* (*anti-auxin resistant 1*) を分離し、この変異体で異常がみられる合成オーキシン 2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) の感受性に関わる責任遺伝子として *SMAP1* (*small acidic protein 1*) さらにその相同遺伝子 *SMAP2* を同定した。*SMAP* 類似遺伝子は、動植物ゲノムにおいて広く保存されていることから、動植物に共通した重要な生命現象に関わる遺伝子であることが推定された。研究代表者らの先行研究により、*SMAP1* 遺伝子の機能については、1) *SMAP1* とともに、*CUL1* (*CULLIN1*)、*TIR1* (*CUL1* とともにユビキチンリガーゼを構成するオーキシン受容体)、*DCL1* (*DEFECTIVE IN CULLIN NEDDYLATION1*) -like など RUB 修飾に関連した遺伝子の欠失変異体と同様の変異体スクリーニングで取得された、2) RUB 活性化酵素変異体 (*axr1*) と *aar1* の二重変異シロイヌナズナでは、根端分裂組織が形成されず胚発生後致死となる、3) 免疫沈降やプルダウンアッセイで、*SMAP1* は CSN 複合体と物理的に結合している、といった予備的知見を得ており、*SMAP1* は RUB 修飾制御に関わる新規因子である可能性が推定された。

2. 研究の目的

本研究では、RUB/Nedd8 によるタンパク質修飾機構について、植物ホルモン・オーキシンの情報伝達に関わる新規因子 *SMAP1* 遺伝子の機能との関連に着目し、解析することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、まず、*SMAP1* が CSN 複合体と物理的に結合しているという予備実験結果を踏まえ、酵母ツーハイブリッド法により *SMAP1* が結合する CSN サブユニットを明らかにし、それを手掛かりに *SMAP1* の機能を推定することを試みた。しかし、後述する様に、このアプローチには *SMAP1* タンパク質の特性が原因と思われる問題が発生し、研究計画の変更を余儀なくされた。そこで、遺伝学的側面から *SMAP1* と CSN との関係を調べるため、*SMAP1* と CSN の機能が欠失した二重変異体の作成と解析および *SMAP1* 遺伝子による相補試験を行った。また、*SMAP1* と RUB/Nedd8 化に

関わる因子との機能的な関係を調べるため、RUB/Nedd8 化阻害剤 MLN4924 を利用し、MLN4924 を入れた培地上で野生型と変異体・形質転換体を育成することにより、MLN4924 に対する感受性の比較を行った。さらに、RUB 修飾の状態が、*SMAP1* の有無でどのように変化するかについて調べるため、抗 *CUL1* (*CULLIN1*) 抗体を用い、変異体や形質転換体中の幼苗や花よりタンパク質を抽出し、ウエスタン法により RUB 化 *CUL1* と非 RUB 化 *CUL1* の存在比を調べた。

4. 研究成果

(1) *SMAP1* と CSN との相互作用

研究代表者らの先行研究から、*SMAP1* は標的タンパク質からの脱RUB/Nedd8化反応を行うCSN複合体と物理的に結合していることが明らかになっていた。CSN複合体は8つのサブユニットからなる巨大なタンパク質複合体である。*SMAP1* がCSNのどのサブユニットと相互作用するかを調べるために、酵母ツーハイブリッド法を試みた。酵母ツーハイブリッド法では相互作用を調べたい2つのタンパク質をそれぞれ酵母GAL4タンパク質のDBD (DNA Binding Domain) とAD (Activation Domain) に融合タンパク質の形で発現させ、2つのタンパク質に相互作用 (結合) があると、転写活性化因子が構築され、マーカー遺伝子の発現として相互作用が検出されるように設計されている。ところが、まず、*SMAP1* をGAL4のDBDと連結し、CSNサブユニットを連結しないGAL4-ADと共に酵母内で発現させてみたところ、転写活性があることを示す強い陽性反応がみられた。このことは、*SMAP1* が単独で酵母内で転写活性化活性があるかGAL4-ADと相互作用する能力があることを示唆するものであった。しかし、これでは、*SMAP1* とCSNサブユニットの相互作用を調べることが困難であったので、*SMAP1* をGAL4-ADと連結し、各CSNサブユニットをGAL4DBDの融合タンパク質として酵母内で発現させ、GAL4AD-*SMAP1* との相互作用を調べを試みた。しかしながら、*SMAP1* と明確な相互作用を示すサブユニットは検出できず、*SMAP1* が直接CSNと結合しているのではなく、CSN以外のタンパク質の介在のもとCSNと相互作用している可能性が示唆された。一方、*SMAP1* 単独で酵母内で転写活性化活性があることから、酵母内で*SMAP1* と強く相互作用する酵母由来の因子があることが示唆され、それが、CSNサブユニットと*SMAP1* の相互作用を阻害していることも考えられ

た。

つぎに、*SMAP1*と*CSN*との相互作用を遺伝学的な手法により調べるため、*CSN*サブユニットに異常のある変異体*csn5a-1*と*SMAP1*遺伝子が欠失したシロイヌナズナ変異体*aar1-1*とを交配し、二重変異体の作成をおこなった。その結果、*aar1-1 csn5a-1*二重変異体では、*csn5a-1*単独の変異体で見られる胚軸が短く生長が遅いといった形質がより増強された(図1)。この二重変異体は生長が著しく悪く、種子を得るのが困難なほどであったが、*csn5a-1*変異をヘテロで持つ個体を用い、交配により、*csn5a-1 aar1-1*の二重変異の背景に35Sプロモーターでドライブした*SMAP1-GFP*を導入した形質転換体を作成したところ、二重変異体の著しい形態異常が緩和され(図1)、種子も得られるようになった。また、これとは別に、*csn5a-1*単独の変異体に35S:*SMAP1-GFP*遺伝子を導入・発現させたところ、*csn5a-1*変異体の特徴である矮化形質が部分的に解消された。このことから、*SMAP1*は不完全な*CSM*機能による形態変化を部分相補する活性を持つことが示唆された。以上の結果から、*SMAP1*は*CSN*の機能を補強するような方向で機能していることが推定された。

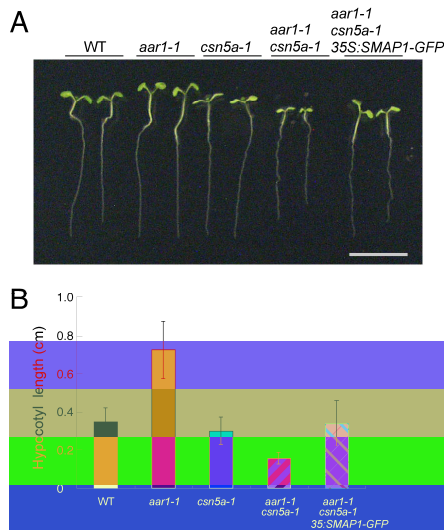


図1 *CSN5A*と*SMAP1*の遺伝学的相互作用。発芽7日目の幼苗の写真(A, Bar = 1cm)と胚軸長(B)。

(2) RUB/Nedd8 化阻害剤 MLN4924 に対する反応

*SMAP1*とRUB化に関わる因子との機能的な関係をさらに調べるため、RUB/Nedd8化阻害剤MLN4924を用い、この薬剤に対する野生型シロイヌナズナと*aar1-1*変異体の反応を比較した。まず暗所で発芽させた幼苗では、野生型において、MLN4924によって胚軸長の低下、フック形成阻害、子葉の展開が引き起こされ

た。*aar1-1*では、野生型に見られるこれらの変化に加え、子葉へのアントシアニンの蓄積が顕著にみられ、MLN4924に対する感受性が増加していることが分かった(図2)。また、明所で発芽させた幼苗(野生型)では、胚軸や根の生長阻害に加え、重力に対する感受性の低下等がみられるのであるが、*aar1-1*では、MLN4924による根の重力屈性の阻害の程度がより激しく(図3)、明所で育成した幼苗においても、*aar1-1*が野生型よりMLN4924に対する感受性が増加している事が明らかとなった。つぎに、同様の解析を、*SMAP1*遺伝子をRNAiで不活化した形質転換体や、*aar1-1*バックグラウンドにおいて*SMAP1-GFP*を*SMAP1*プロモーター制御下で発現させた形質転換体を用いて行った。その結果、野生型と*aar1-1*のMLN4924に対する感受性違いは、*SMAP1*の存在に依存している事が明らかになった。

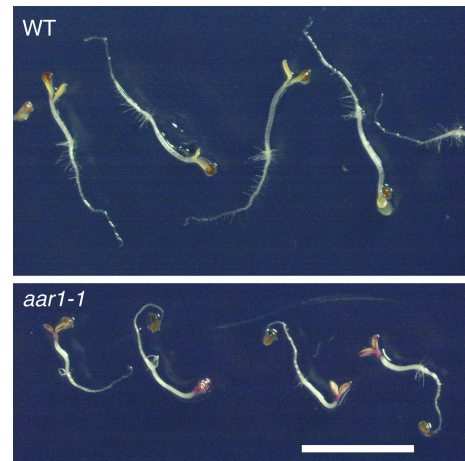


図2 MLN4924(10 μM)を含む培地上で育成した発芽4日目の暗所芽生え。Bar = 0.5 cm

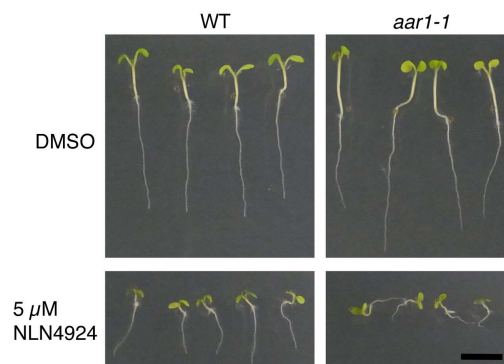


図3 MLN4924(5 μM)及びDMSO(対照)を含む培地上で育成した発芽5日目の幼苗。Bar = 0.5 cm

(3) SMAP1 と RUB 修飾

SMAP1とRUB修飾の関係調べるため、野生型、*aar1-1*、*axr1-12*、*csn5a-1*および二重変異体や形質転換体の幼苗や花からタンパク質を抽出し、RUB化の状況を主要な被RUB修飾タンパク質であるCUL1タンパク質の抗体を用いてウエスタン法によって調べた(図4)。野生型に対し、*axr1-12*では非RUB化CUL1(単にCUL1)に対してRUB修飾されたCUL1(RUB-CUL1)の量は減少しており、*csn5a-1*では、増加していた。しかしながら、野生型と*aar1-1*では顕著な差が見られなかった。また、*csn5a-1*と*csn5a-1 aar1-1*二重変異体および*csn5a-1 aar1-1*二重変異体背景をもつ35S:SMAP1-GFPを導入した形質転換体における比較でもRUB化の状況にはっきりした違いがみられなかった。一方、RUB活性化酵素変異体(*axr1-12*)に35S:SMAP1-GFPあるいは35S:GFP-SMAP1を発現させた個体では、*axr1-12*に比べて、RUB-CUL1が僅かに増加していた。

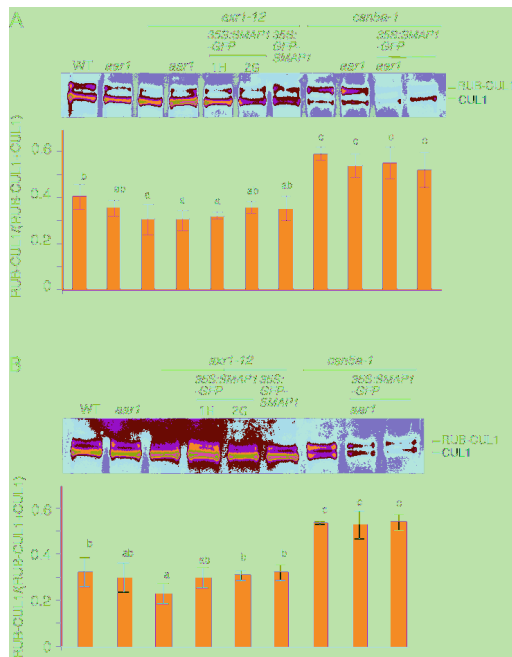


図4 変異体や形質転換体におけるRUB化CUL1と非RUB化CUL1の割合。全タンパク質を発芽7日目の幼苗(A)または花(B)より抽出し、CUL1抗体を用いたウエスタンブロットによりCUL1のRUB化の程度を調べた。

(4) まとめと今後の展望

以上の解析により、SMAP1はRUB化に関わる因子と相互作用して植物の発生や生長を制御していると考えられた。その一方でCUL1とRUB-CUL1の存在比は、SMAP1の有無で特殊な条件の場合を除き、はっきりした違いがみられなかった。このことは、SMAP1が直接RUB修飾

には関与しないことを示唆しているとも考えられる。このような例はCAND1 (Cullin Associated and Neddylation-Dissociated 1) タンパク質のケースでもみられる。CAND1は非RUB化CUL1と結合することによりCUL1をサブユニットとして含むCullin RING型ユビキチンE3リガーゼ複合体の会合を制御しているが、シロイヌナズナの*cand1*変異体ではCUL1とRUB-CUL1の存在比について野生型との違いは検出されていない。一方、ウエスタン法では検出できない程度のCUL1とRUB-CUL1の存在比の違いがSMAP1の有無で生じている可能性も考えられる。この僅かな違いが、野生型と*aar1*の生理的な違いを引き起こしている可能性も否定出来ない。

SMAP1遺伝子は、シロイヌナズナより同定された遺伝子であるが、非常によく保存された類似の未解析遺伝子が動物ゲノムにも存在しており、動植物に共通の重要な生命現象に関わる遺伝子であることが推定される。SMAP1タンパク質は、わずか62個からなり、そのC末端にフェニルアラニンとアスパラギン酸残基に富んだ高度保存領域がある。この領域は既知の機能ドメインとは全く類似性がなく、SMAP1は新規性の高いタンパク質であると考えられる。RUB/Nedd8修飾は、細胞分裂をはじめとする様々な生命現象に重要な役割を果たしており、新たな抗ガン剤としてRUB/Nedd8活性化酵素をターゲットとした薬剤も開発され注目されている。MLN4924もそうして開発された薬剤のひとつである。シロイヌナズナを用いた研究は、これまでも光形態形成におけるCSN重要性の発見や、オーキシン情報伝達のSCFを介した制御機構の解明など、この分野の研究の進展に大きく貢献してきた。SMAP1のRUB/Nedd8修飾における機能をより詳細に解析することにより、SMAP1の関与する未知のタンパク質分解調節機構を明らかにできるとともに、シロイヌナズナSMAP1研究で得られた知見をもとに、哺乳動物のSMAPホモログの機能を解析することで、将来的に、ユビキチン分解制御系をコントロールすることによる治療薬や抗ガン剤等の開発にもつながることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Nakasone A, Fujiwara M, Fukao Y,

Biswas KK, Rahman A, Kawai-Yamada M, Narumi I, Uchimiya H, Oono Y.
SMALL ACIDIC PROTEIN 1 acts with RUB modification components, the COP9 signalosome and AXR1, to regulate growth and development of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 査読有り 160 (2012) 93-105.
doi: 10.1104/pp.111.188409

② Oono Y., Narumi I.
Genetic interaction between COP9 signalosome and SMAP1 that function in the 2,4-D response in *Arabidopsis*. JAEA-Review 査読有り 2011-043 (2012) 99.

③ Biswas KK, Oono Y.
New insights to auxin signaling through the use of small molecules. Biological Science in Space 査読有り 25 (2011) 45-55.
<http://dx.doi.org/10.2187/bss.25.45>

[学会発表] (計4件)

① Oono Y., Nakasone A, Fujiwara, M, Fukao Y, Biswas KK, Rahman A, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Narumi I.
SMALL ACIDIC PROTEIN 1 acts with RUB modification components, the COP9 signalosome and AXR1, to regulate growth and development of *Arabidopsis thaliana*. 10th International Congress on Plant Molecular Biology
2012年10月21日-2012年10月26日
ICC Jeju (韓国 チェジュ)

② 大野 豊、鳴海 一成
ユビキチン様タンパク質 (RUB) 修飾における SMALL ACIDIC PROTEIN 1 (SMAP1) の役割
第53回植物生理学会年会
2012年3月16日
京都産業大学 (京都府)

③ 大野豊, 中曾根光, 鳴海一成 2,4-D 応答に関わる遺伝子 Small Acidic Protein 1 (SMAP1) の COP9 シグナロソームとのシロイヌナズナにおける遺伝学的相互作用
第52回日本植物生理学会
2011年3月20-22日
東北大学 (仙台)

④ Oono Y., Nakasone A, Uchimiya H, Narumi I.
Genetic Interaction between AXR1 and SMAP1 that Mediate 2,4-D response in *Arabidopsis*.

21st International Conference on Arabidopsis Research
2010年6月6~10日
パシフィコ横浜 (横浜)

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: 植物のオーキシンおよびオーキシン系除草剤の感受性に関わる新規遺伝子
発明者: 大野 豊、ラーマン アビドゥール
権利者: 独立行政法人日本原子力研究開発機構
種類: 特許
番号: 第4942082号
取得年月日: 2012年3月9日
国内外の別: 国内

[その他]

http://www.taka.jaea.go.jp/rab_div/gr/r/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 豊 (OONO YUTAKA)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹
研究者番号: 30343940

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

坂本 綾子 (SAKAMOTO AYAKO)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹
研究者番号: 00354960
佐藤 勝也 (SATO KATSUYA)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹
研究者番号: 90370402
千葉 智樹 (CHIBA TOMOKI)
筑波大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 00311423