

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380198

研究課題名(和文) プロテアソーム構造変換による植物のストレス適応能力の解明

研究課題名(英文) Studies on adaptation ability to environmental stresses during structural transition of plant proteasome

研究代表者

山口 淳二 (YAMAGUCHI, Junji)

北海道大学・理学(系)研究科(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) 15,700,000円、(間接経費) 4,710,000円

研究成果の概要(和文)：26Sプロテアソームは、タンパク質の能動的分解システムの実行機械である。植物のストレス適応に關与するプロテアソームの構造変換機能の解明を実施した。植物プロテアソームに関する詳細なプロテオーム解析を実施し、各サブユニットの同定と定量化を実現した。この手法を病原体感染時等に適用し、重複するサブユニット分子間の量的変動と高頻度の翻訳後修飾について明らかにした[J. Proteome Res. 2013]。これまで哺乳類では、病原体感染時に「免疫プロテアソーム」の出現が報告されていたが、この発見は、植物においても、外的環境変化に回答したプロテアソーム構造の変動により機能適応が実現することを証明した。

研究成果の概要(英文)：The proteasome is a huge protein complex that degrades damaged and selective ubiquitinated proteins, and is related to various environmental stress responses. Although the biochemical characteristic of the proteasome is well-studied in mammals, the details of the plant proteasome remains unclear. Here, we used a proteomics approach to reveal the detailed subunit composition of the plant proteasome. Our 2D electrophoresis and LC-MS/MS analyses combined with affinity purification demonstrated the highly heterogeneous subunit composition of the proteasome due to plant-specific gene duplication and putative post-translational modification in plant cells. Moreover, our studies demonstrated that proteasome activity is affected by post-translational modification in response to pathogen signaling. Our study revealed new insights into the plant proteasome composition and regulatory mechanism, which may contribute to increase pathogen resistance and improved crop yield in agriculture.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：プロテアソーム 環境適応 プロテオーム タンパク質分解 免疫 蛋白質 植物

1. 研究開始当初の背景

細胞周期にはじまり個体形成といった様々な段階の生命事象が、特定の標的タンパク質を能動的に分解することにより直接的に制御されている[能動的タンパク質分解は 2004 年ノーベル化学賞受賞対象課題]。高等植物には、タンパク質分解の実質を担うユビキチン-26S プロテアソーム系に関係する遺伝子群が全遺伝子の 5%以上も存在しており、他の生物種と比較しても類をみないほど多い。これはゲノムワイドでみた高等植物の特徴の一つとされている[Smalle et al., *Annu Rev Plant Biol*, 55: 555 (2004)]。この事実は、高等植物がもつ優れた環境適応能力は、上述のタンパク質分解系を媒介とした環境シグナル制御系が一翼を担うとする仮説を裏付けるものである。

申請者らは、モデル植物シロイヌナズナを用いて、19S プロテアソームを構成するサブユニット RPT2a の機能欠損変異体(*rpt2a*)において、葉器官等が巨大化する現象を発見した。その後の研究により、この原因がエンドリデュプリケーションという細胞周期異常に由来する細胞サイズ増大に起因することを明らかにした [Sonoda et al, *Plant J*, 60: 68-78 (2009); Sako et al, *J. Plant Res*, 123: 701-706 (2010); Sako & Yamaguchi, *Plant Signal & Behav*, 5: 1119-1120 (2010)]。

2. 研究の目的

植物プロテアソームの特徴は、その構成サブユニットの多くが 2 種類のパラログ遺伝子にコードされている点にある。従って、植物が様々なストレスに適応する際に (A シグナルによる 19S の再構成を想定)、このようなプロテアソームの構造変換・機能変換が一翼を担う可能性が考えられる。

このことは、1) 哺乳類で観察される「免疫プロテアソーム」や「胸腺プロテアソーム」のような特殊な機能構造体[Groettrup et al, *Nat Rev Immunol*, 10: 73-78 (2010)等]が、植物では定常的に存在すること、2) そのような再構成に伴うプロテアソームの機能変換が、植物の発生・成長、環境適応のキューとなる可能性、を示唆している。

申請者らが発見した葉サイズが巨大化した変異体は、「器官サイズ制御型」プロテアソームの存在を示唆している。本研究では、上記の背景を基に、様々なストレス適応型プロテアソームの構造ならびに機能的解明を目指す。

本研究課題は、「ストレス適応型」プロテアソームの構造と機能性に着目し、3 課題を実施する。申請者は、すでにプロテアソームがエンドリデュプリケーションを介した器官サイズ制御に関与することを明らかにし

た[Plant J. 2009 他]。さらに現在は、プロテアソームサブユニット構造変動や相互作用因子の存在等も明らかにしている。このようなダイナミックな構造変換に関する報告は、酵母・動物細胞においてもほとんど報告されていない。従って、植物プロテアソームの新たな機能性の発見につながる。これに加えて、ストレス適応制御という命題は、ストレス寛容植物の作出、ひいては植物の生産性に直結する問題である。

3. 研究の方法

「植物プロテアソーム構造の多様性」という視点を基軸として、本研究では、下記 3 課題を効率よく実施、遂行する。

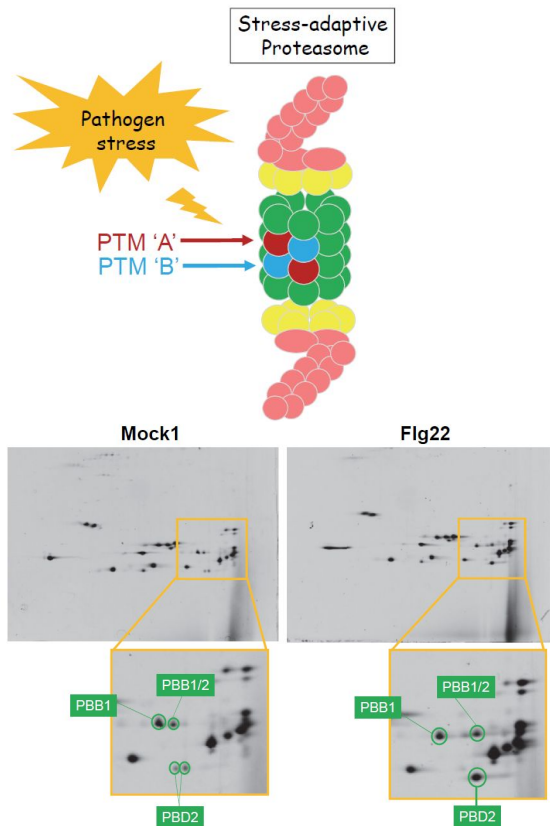
- (1) 計画 1) プロテオミクスを用いたプロテアソームサブユニット構造変換の解明
- (2) 計画 2) プロテアソーム相互作用ネットワークの解明
- (3) 計画 3) サブユニット機能変換を利用したプロテアソーム新機能性の解明

4. 研究成果

- (1) 計画 1) プロテオミクスを用いたプロテアソームサブユニット構造変換の解明 (雑誌論文 7)

細菌やウイルスといった病原体から身を守ることは生物に必須の能力である。私たち人間と同じように、植物もまた病原体の攻撃に対する優れた防御応答機構を備えている。そうした環境ストレス応答において、ユビキチン・プロテアソームシステム (UPS) は、タンパク質の能動的分解を制御することで、様々な細胞機能を制御している。面白いことに、プロテアソームを構成するサブユニットをコードする遺伝子に多くの重複が見られ、酵母やヒトに比べて複雑なサブユニット構成をもつこと、そして何らかの特別な機能制御機構が存在する可能性が示唆されていた。

最新のプロテオミクス解析技術を駆使することで、これまで困難であった植物プロテアソームのアフィニティー精製および詳細なサブユニット構成の実態を明らかにすることに成功した。さらに、病原体感染のシグナル物質となる Flg22 を処理した植物から精製したプロテアソームでは、通常型に比べてサブユニット構成が変化し、プロテアソームのペプチダーゼ活性が上昇していることを発見した。これらの結果は、植物の病原体応答では、何らかの翻訳後制御により植物のプロテアソーム機能変換が起きていることを示唆している。哺乳類のプロテアソームは病原体感染時の抗体産生に重要な関与することが知られているが、植物ではそれとは異なる独自のプロテアソーム機能が防御応答に貢献している可能性があり、より詳細な制御メカニズムの解明が期待される。



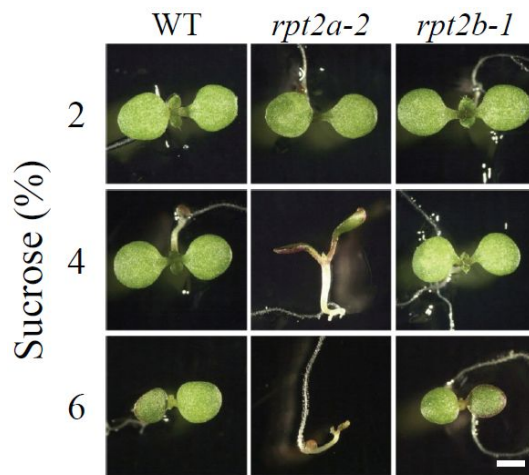
図．環境ストレスに応答したプロテアソームサブユニット機能の翻訳後制御モデル（上）とアフィニティー精製/2次元電気泳動/MS解析結果（下）。

(2) 計画2) プロテアソーム相互作用ネットワークの解明
(雑誌論文9)

ユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)は、タンパク質の能動的分解を制御することで、様々な細胞機能を制御している。植物では、酵母や動物と異なり、プロテアソームを構成するサブユニットの多くに遺伝子重複があり、その機能性の違いが注目されている。シロイヌナズナ RPT2 には、AtRPT2aとAtRPT2bという2つのパラログ分子がある。以前に、RPT2aの変異体(*rpt2a*)のみがエンドリデュプリケーションを伴う細胞分裂異常とそれに伴う器官(葉)サイズの増大を示すことを報告した[Plant J. 60: 68, 2009]。

シロイヌナズナ *rpt2a* 変異体が、糖に対する感受性に違いがあることを見出した。下図のように、培地にスクロースやグルコースを添加すると、*rpt2a* 変異体のみが高濃度の糖に対するストレス感受性が高まる。また、19Sサブユニット遺伝子の発現解析の結果、RPT2a 遺伝子は糖に対する発現促進反応性を示した。糖添加により、ユビキチン化タンパク質の蓄積も観察された。植物の糖応答には解糖系の初発酵素ヘキソキナーゼのアイソザイム HXK1 が関与することが明らかと

なっているが、この変異体 *gin2* 背景では、RPT2a 遺伝子の糖誘導性が解除された。これらのことから、植物の糖応答にプロテアソーム、そして RPT2a が関与することが示された。



図．プロテアソームサブユニット RPT2 欠損変異体の糖応答性-*rpt2a* 変異体のみが糖に対して高感受性を示す。

(3) 計画3) サブユニット機能変換を利用したプロテアソーム新機能性の解明
(雑誌論文10)

ユビキチン-26S プロテアソームシステムは、タンパク質を能動的に分解することによって細胞周期やシグナル伝達など、さまざまな生命現象の制御に機能している。このうち、26S プロテアソームは、実際のタンパク質分解を担う巨大なプロテアーゼである。プロテアソームは60以上のサブユニットからなり、それぞれのサブユニットが特異的な機能をもつことが示唆されている。

RPT2a が“遺伝子サイレンシング”を抑制的に制御することを明らかにした。*rpt2a* 変異体に、外生遺伝子の形質転換を試みたところ、ほとんど形質転換体を得られないという現象に遭遇した。この現象を解析したところ、外生遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化が増加したことが原因であることを突き止めた。DNAのメチル化は遺伝子の配列を変化させることなく遺伝子の発現パターンを変化させるエピジェネティック制御の一つである。これらの結果から、RPT2a を構成因子にもつプロテアソームは、DNAメチル化を負に制御することで、遺伝子発現の制御に関与することを明らかにした。

今回の研究によって、プロテアソームがエピジェネティックと関与することが初めて示された。

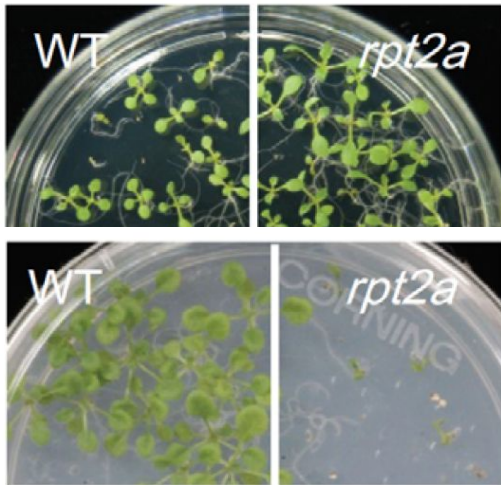


図. *rpt2a*変異体では遺伝子サイレンシングが生じるハイグロマイシン耐性遺伝子を野生型および*rpt2a*変異体に形質転換した植物体のハイグロマイシン耐性を調べた。上は通常培地、下はハイグロマイシン添加培地で生育させた。*rpt2a*変異体は導入した耐性遺伝子の発現が抑制されたため、ハイグロマイシンに感受性を示した。

(4)その他の主要な成果

シロイヌナズナを用いて、ユビキチン/プロテアソーム依存的なタンパク質分解を制御するSCFタイプE3についての網羅的な解析を実施した。シロイヌナズナでは多種類のSCFタイプ型E3が存在し、それらが各組織及び細胞内器官で特異的な役割を果たすと示唆される結果を得た。また、ダイズを用いてユビキチン化タンパク質の網羅的な解析を実施した。(雑誌論文 11, 12)

シロイヌナズナユビキチンリガーゼATL31は、14-3-3タンパク質を標的として基幹代謝C/N制御やCO₂/N制御に関与すること(雑誌論文 1, 3, 4, 15, 16), また膜交通を介して病原体応答に関与すること(雑誌論文 2, 8)を明らかにした。

植物免疫に関与する制御因子NSL2と転写因子ERF9に関する研究を実施した。(雑誌論文 8, 13)

亜鉛欠乏にプロテアソームが関与することを明らかにした。(雑誌論文 14)

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 16件)-全て査読有

1. Yasuda S, Sato T, Maekawa S, Aoyama S, Fukao Y, Yamaguchi J* (2014)

Phosphorylation of Arabidopsis ubiquitin ligase ATL31 is critical for plant C/N-nutrient response under control of 14-3-3 stability. *J. Biol. Chem.* online before publication (印刷中) [10.1074/jbc.M113.533133], 査読有

2. Maekawa S, Inada N, Yasuda S, Fukao Y, Fujiwara M, Sato T, Yamaguchi J* (2014) The carbon/nitrogen regulator ATL31 controls papilla formation in response to powdery mildew fungi penetration by interacting with SYP121 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 164: 879-887 [10.1104/pp.113.230995], 査読有
3. Aoyama S, Huaranca Reyes T, Guglielminetti L, Yu L, Morita Y, Sato T, Yamaguchi J (2014) Ubiquitin ligase ATL31 functions in leaf senescence in response to the balance between atmospheric CO₂ and nitrogen availability in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 55: 293-305 [10.1093/pcp/pcu002], 査読有
4. Aoyama S, Lu Y, Yamaguchi J, Sato T* (2014) Regulation of senescence under elevated atmospheric CO₂ via ubiquitin modification. *Plant Signaling Behavior* e28839 [10.4161/psb.28839], 査読有
5. Chiba Y*, Mineta K, Hirai MY, Suzuki S, Kanaya S, Takahashi H, Onouchi H, Yamaguchi J, Naito S (2013) Changes in mRNA stability associated with cold stress in Arabidopsis cells. *Plant Cell Physiol.* 54: 180-194 [10.1093/pcp/pcs164], 査読有
6. Maruyama Y, Yamoto N, Suzuki Y, Chiba Y, Yamazaki K, Sato T, Yamaguchi J* (2013) Arabidopsis transcriptional repressor ERF9 participates in resistance against necrotrophic fungi. *Plant Sci.* 213: 79-87 [10.1016/j.plantsci.2013.08.008], 査読有
7. Sun HH, Fukao Y, Ishida S, Yamamoto H, Maekawa S, Fujiwara M, Sato T*, Yamaguchi J (2013) Proteomics analysis reveals a highly heterogeneous proteasome composition and the post-translational regulation of peptidase activity under pathogen signaling in plants. *J. Proteome Res.* 12: 5084-5095 [10.1021/pr400630w], 査

読有

8. Maekawa S, Sato T, Asada Y, Yasuda S, Yoshida M, Chiba Y, Yamaguchi J* (2012) The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon/nitrogen response. *Plant Mol. Biol.* 79: 217-227 [10.1007/s11103-012-9907-0] , 査読有
 9. Sun H, Sako K, Suzuki Y, Maekawa S, Yasuda S, Chiba Y, Sato T, Yamaguchi J* (2012) Sugar-inducible RPT2a, a subunit of 26S proteasome, participates in sugar response in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol.* 29: 279-284 [10.5511/plantbiotechnology.12.0409a] , 査読有
 10. Sako K, Maki Y, Kanai T, Kato E, Maekawa S, Yasuda S, Sato T, Watahiki MK, Yamaguchi J* (2012) Arabidopsis RPT2a, 19S proteasome subunit, regulates gene silencing via DNA methylation. *PLoS ONE* 7(5): e37086 [10.1371/journal.pone.0037086] , 査読有
 11. Kuroda O, Yanagawa Y, Takahashi N, Horii Y, Matsui M* (2012) A comprehensive analysis of interaction and localization of Arabidopsis SKP1-LIKE (ASK) and F-Box (FBX) proteins. *PLoS ONE*, 7, e50009 [10.1371/journal.pone.0050009] , 査読有
 12. Yanagawa Y*, Komatsu S* (2012) Ubiquitin/ proteasome-mediated proteolysis is involved in the response to flooding stress in soybean roots, independent of oxygen limitation. *Plant Sci.*, 185-186: 250-258 [10.1016/j.plantsci.2011.11.014] , 査読有
 13. Asada Y, Yamamoto M, Tsutsui T, Yamaguchi J* (2011) The Arabidopsis NSL2 negatively controls systemic acquired resistance via hypersensitive response. *Plant Biotechnol.* 28: 9-15 [10.5511/plantbiotechnology.10.0913a] , 査読有
 14. Sakamoto T, Kamiya T, Sako K, Yamaguchi J, Yamagami M, Fujiwara T* (2011) Arabidopsis thaliana 26S proteasome subunits RPT2a and RPT5a are crucial for zinc deficiency-tolerance. *Biosci. Biotech. Biochem.* 75: 561-567 [10.1271/bbb.100794] , 査読有
 15. Sato T, Maekawa S, Yasuda S, Domeki Y, Sueyoshi K, Fujiwara M, Fukao Y, Goto DB, Yamaguchi J* (2011) Identification of 14-3-3 proteins as a target of ATL31 ubiquitin ligase, a regulator of the C/N response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 68: 137-146 [10.1111/j.1365-3113X.2011.04673.x] , 査読有
 16. Sato T, Maekawa S, Yasuda S, Yamaguchi J* (2011) Carbon and nitrogen metabolism regulated by ubiquitin-proteasome system. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1465-1468 [10.4161/psb.6.10.17343] , 査読有
- (学会発表)(計 10件)・主要な招待発表
1. Yamaguchi J: Regulation of leaf organ size and gene silencing by plant proteasome. The 35th Naito Conference on “The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles”, July 9-12, 2013, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo, Japan.
 2. Yamaguchi J: ATL31 ubiquitin ligase, a regulator of the C/N response in Arabidopsis, is also involved in defence response mediated by membrane traffic system. Challenges in Biology-Big Data and Ethics in “Plants and People Conference”, Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, June 18-19, 2013, Potsdam, Germany.
 3. 山口淳二 : ユビキチン-プロテアソームシステムによる C/N 代謝制御の分子基盤 -シロイヌナズナからマイクロトマトへ- シンポジウム「遺伝子組換え技術を利用した植物の代謝制御」, 日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム, 2012年8月3日~5日, 奈良先端大学院大学(シンポジウム発表), 生駒市
 4. 山口淳二 : 植物を用いた遺伝子技術の将来, 北海道農業研究推進会議生物工学部会, 2012年2月7日, 札幌, 北海道
 5. Yamaguchi J: Plant immunity as host resistance actions against pathogen attack -Arabidopsis NSL2 and the interacting-proteins-, 2011.10.19, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China (seminar)
 6. Yamaguchi J: Metabolic regulation mediated by ubiquitin-proteasome

system in Arabidopsis, 2011.10.18, Chinese Academy of Science, Beijing, China (seminar)

7. 山口淳二: ゲノム科学時代の代謝研究-包括的解析と志の高い個別研究の融合を目指して: 糖代謝・輸送・センシングを例として, 「代謝とメタボロミクス」勉強会-, 新学術領域「植物の高CO₂応答」第2回若手ワークショップ, 2011年10月7日~9日, 休暇村支笏湖, 北海道(セミナー)
8. Yamaguchi J: Plant immunity as host resistance actions against pathogen attack -Arabidopsis NSL2 and the interacting-proteins-, Plenary Lecture on 3rd International Conference on Biosciences and Biotechnology, 2011.-9.21-22, Udayana University, Bali, Indonesia (Plenary lecture)
9. 佐藤長緒, 山口淳二: ユビキチンプロテアソームによるC/N応答制御~ユビキチンリガーゼATL31とその標的を介した代謝制御, 日本植物学会第75回大会シンポジウム「C/Nバランスの研究を通して植物高CO₂応答を読み解く」, 2011年9月17日~19日, 東京大学駒場キャンパス, 東京都(口頭発表)
10. 山口淳二, 佐藤長緒: プロテオミクスを用いた植物ユビキチン-プロテアソームシステムの解明-基幹代謝を例として-, 日本プロテオーム学会新潟学会シンポジウム「植物プロテオーム研究の新展開」, 2011年7月29日~30日, ホテル日航新潟, 新潟県(口頭発表)

〔図書〕(計 5件)

1. 佐藤長緒, 山口淳二* (2013) C/Nバランス調節による植物の代謝・成長戦略, 化学と生物, 51: 763-772
2. Sato T, Sako K, Yamaguchi J* (2013) Chapter 45 Assay for proteasome-dependent protein degradation and ubiquitinated proteins in "Plant Proteomics: Methods and Protocols Second Edition" (edited by J V Jorrin Novo, S Komatsu, W Weckwerth, S Wienkoop), Methods in Molecular Biology, vol. 1072, Springer Protocol, Humana Press, pp. 655-663 (DOI 10.1007/978-1-62703-631-3_45; ISBN 978-1-62703-630-6)
3. Yasuda S, Maekawa S, Sato T,

Yamaguchi J* (2012) Proteomics approach to study metabolic regulation mediated by ubiquitin-proteasome system in Arabidopsis. *in* Frontiers in Agriculture Proteome Research, 39-44 (ISBN 978-4-904633-99-1)

4. 山口淳二*, 畠山鎮次* (2012) 序論: 酵母から動植物まで包括するユビキチン-プロテアソーム系の新展開, 生化学 84: 407-408
5. 柳川由紀*, プロテオーム解析から解く植物のユビキチン-プロテアソーム研究 (2012) 特集タイトル: 酵母から動植物まで包括するユビキチン-プロテアソーム系の新展開, 生化学, 84(6), 448-454.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/~jjyama/keitai2/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 淳二 (YAMAGUCHI, Junji)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号: 10183120

(2) 研究分担者

千葉 由佳子 (CHIBA, Yukako)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 70509546
(平成23~24年度)

柳川 由紀 (YANAGAWA, Yuki)
独立行政法人理化学研究所・植物科学センター・研究院
研究者番号: 90432591
(平成23~24年度)