

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292188

研究課題名(和文) 膜局在型植物ユビキチンリガーゼATL31による環境シグナル伝達調節の包括的解明

研究課題名(英文) Regulation of environmental signalling mediated by membrane-localized plant ubiquitin ligase ATL31

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナATL31は膜在型のユビキチンリガーゼであり、栄養素応答だけでなく防御応答にも関与する。ATL31の相互作用因SYP121は、うどんこ病菌の侵入を阻止するためのパピラと呼ばれる植物細胞壁形成の制御因子である。最終的にATL31がSYP121と共にパピラ形成による防御応答に関与することを明らかにした。一方、C/N栄養素応答の鍵制御因子として3種類のCIPKタンパク質を同定した。CIPKはATL31をリン酸化することで安定化し、これがC/N応答に関係する14-3-3タンパク質の分解を制御していることを明らかにした。これはリン酸化を介した栄養素シグナル伝達の新たな仕組みの発見である。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis ATL31 is a membrane-localized ubiquitin ligase that functions in not only C/N-nutrient response but defense response. We identified SYP121 as a novel ATL31 interactor. SYP121 is an essential factor for plant resistance against powdery mildew fungus and positively regulates the formation of cell wall apposition, called papillae, at the fungal entry site. We finally indicated that ATL31 plays an important role in basal immunity by papilla formation through association with SYP121. The molecular basis of C/N-nutrient signaling also remains unclear. We identified three calcineurin B-like (CBL)-interacting protein kinases (CIPKs) as key regulators of the C/N-nutrient response. Further analyses showed that these CIPKs are required for ATL31 phosphorylation and stabilization, which mediates the degradation of 14-3-3 in response to C/N conditions in Arabidopsis. These findings provide new insights into C/N-nutrient signaling mediated by protein phosphorylation.

研究分野：農学

キーワード：ユビキチンリガーゼ 栄養学 膜交通 蛋白質 植物

1. 研究開始当初の背景

(1)タンパク質の適切な発現、修飾及び分解は、真核細胞のさまざまな機能維持に重要である。ユビキチン(Ub)化を含むタンパク質の様々な修飾は、それぞれの機能に直結した情報をタンパク質に付与する。ユビキチンによるタンパク質の修飾反応(以下、ユビキチン化)では、標的タンパク質の多くは、ポリユビキチン化され、最終的にはプロテアソームによって認識され分解を受ける。ユビキチン化の生化学的反応は、E1, E2, E3(ユビキチンリガーゼ)という3つの酵素を介する生化学的カスケードによって行われる。植物では、1,200をこえるE3が存在している。ヒトの約2倍にあたるこのような多様性の理由としては、動くことのできない植物がE3を様々なセンサーとして用いることで環境の変化に適応しているのではないかと仮説がある。

(2)申請者は、一貫して植物のユビキチン-プロテアソームシステムの新規機能性についての研究を進めてきた。これまでに、植物プロテアソームは、i) 葉などの器官サイズ制御に関与すること [Plant J. 2009], ii) 遺伝子サイレンシングに関与すること [PLoS ONE 2012]; また、ユビキチンリガーゼATL31に関しては、iii) 栄養素代謝調節に関与すること [Plant J. 2009], iv) 病原体抵抗性に関与すること [Plant Mol. Biol. 2012], v) そのユビキチン化標的として14-3-3タンパク質があること [Plant J. 2011], 等を明らかにした。これらの知見は、植物の環境適応に関する上記仮説を裏付けるものとなった。本計画では、ATL31の膜局在性に着目し、細胞の内と外の情報受容・伝達制御にATL31がどのように関与するかについて検討した。

2. 研究の目的

(1)植物膜局在型ユビキチンリガーゼATL31の機能を解明するためには、まずユビキチン化の標的となる基質タンパク質の同定が必須である。IP-MSの常法に従い相互作用タンパク質の道程とその生化学的解析を通して、ATL31の機能性の解明に努めた。

3. 研究の方法

「植物膜局在ユビキチンリガーゼの機能性」という視点を基軸として、本研究では、下記3研究を効率よく実施、遂行した。

- (1) 膜交通を介したALT31の植物免疫制御
- (2) ATL31標的タンパク質14-3-3の基質特異性を介したC/N応答制御
- (3) ATL31のリン酸化修飾とC/N応答制御

4. 研究成果

(1) 膜交通を介したALT31の植物免疫制御 (雑誌論文11)

植物の二大栄養素である糖(炭素源, C)と窒素(N)の代謝はクロストークしている。そのため、環境や生育段階に応じて互いの量的バランス(C/N)を適切に制御することは、植物の健全な生育のみならず、病原体への抵抗反応にも重要である。申請者らはこれまでにシロイヌナズナを用いて、C/N制御因子であるユビキチンリガーゼATL31が、病原性細菌への抵抗性にも機能していることを発見した。

申請者らは、ATL31の新規相互作用因子として細胞膜局在型SNAREであるSYP121を同定した。この*syp121*変異体は、*at131*変異体と同様に、C/Nストレスに過剰応答しました。SYP121は、うどんこ病菌が植物葉に侵入する部位に特異的に集合することで、侵入のバリアーとなる特殊な細胞壁である「パピラ」の形成に重要なはたらきを示す。そこで、ATL31のうどんこ病菌感染時の細胞内局在を観察したところ、通常時は細胞膜にのみ局在しているATL31が、SYP121と同様にうどんこ病菌侵入部位に集合している様子が観察された(図上)。次に、うどんこ病菌への抵抗性を検証した結果、ATL31過剰発現体(35S-ATL31)は*syp121*変異体とは逆に侵入率が低下しており(図下)、それはパピラ形成の速度が増加していた。これらのことから、ATL31はSYP121とともにパピラ形成に関与しており、その結果、C/N応答のみならず、うどんこ病菌への抵抗性に重要なはたらきをもっていることを明らかにした。

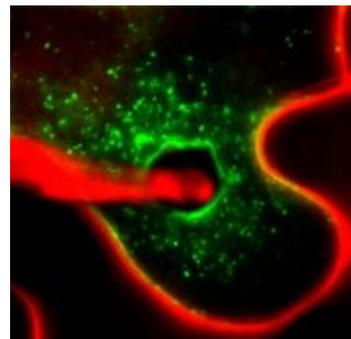


図. うどんこ病菌侵入時のATL31の細胞内局在。赤：細胞壁及びうどんこ病菌。緑：ATL31-GFP。

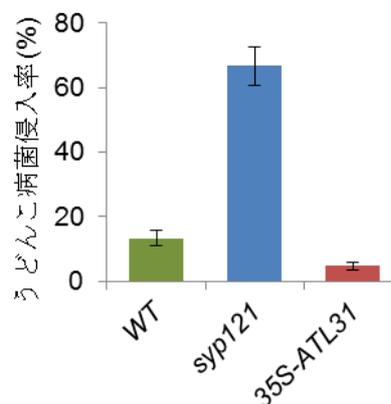


図. 変異株のうどんこ病菌侵入率。

(2) ATL31 標的タンパク質 14-3-3 の基質特異性を介した C/N 応答制御 (雑誌論文 13)

モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、C/N 応答の分子機構解明に取り組んできた。これまでの解析から、ユビキチンリガーゼ ATL31 が 14-3-3 タンパク質のユビキチン化とそれに伴うタンパク質分解を介して、C/N 応答を制御していることを明らかにした。

本研究では、ATL31 のリン酸化が 14-3-3 タンパク質のユビキチン化制御に重要であることを明らかにした。申請者らはまず、ATL31 と 14-3-3 タンパク質の相互作用解析および ATL31 のリン酸化解析を実施した。その結果、ATL31 の C 末領域に存在する 4 か所のセリン/スレオニン残基のリン酸化が、14-3-3 タンパク質との結合に必須であることを突き止めた。そこで、これらのセリン/スレオニン残基を全てアラニンに置換した変異型 ATL31 の過剰発現株 (35S-ATL31-4A) を作出し、その影響を解析した。野生型 (WT) に比べ、野生型 ATL31 過剰発現株 (35S-ATL31) では高 C/低 N 条件下における 14-3-3 タンパク質の蓄積が抑制され、生育阻害が緩和した。しかし、変異型 35S-ATL31-4A はこのような表現型を示さなかった。一方、低 C/高 N 条件下では各植物体間で表現型に差はみられなかった。これらの結果は、ATL31 のリン酸化は 14-3-3 タンパク質のユビキチン化とそれに伴うタンパク質分解を介した C/N 応答制御に必須であることを示している。また、35S-ATL31 における 14-3-3 タンパク質蓄積の抑制は、高 C/低 N 条件下でのみみられたことから、ATL31 のリン酸化は高 C/低 N 条件下では促進し、対照的に低 C/高 N 条件下では抑制されていることが予想された。

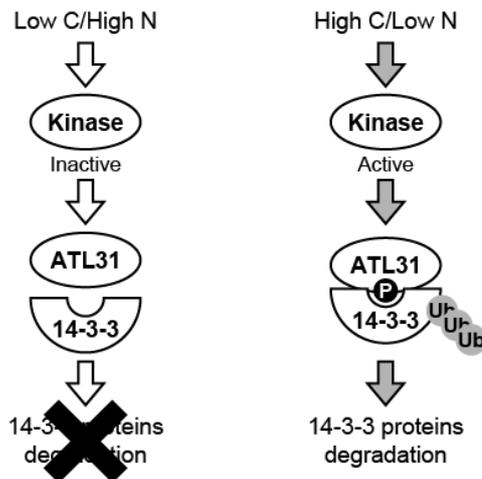


図. ATL31 による 14-3-3 タンパク質のユビキチン化制御のモデル。

(3) ATL31 のリン酸化修飾と C/N 応答制御 (雑誌論文 1)

植物の炭素/窒素バランス「C/N」シグナルの上流シグナル伝達因子として、Ca²⁺依存性

リン酸化酵素 CIPK7/12/14 を同定した。cipk7/12/14 変異体は C/N ストレス下での植物の成長が著しく低下することから、重要な因子であることが示された。さらに、詳細なタンパク質機能解析から、これら CIPKs が既報の C/N 応答制御因子ユビキチンリガーゼ ATL31 を直接のリン酸化標的とし、ユビキチン化標的タンパク質との結合を促進していることを明らかにした。本研究で得られた知見から、植物の C/N 栄養シグナルの統合に Ca²⁺シグナルが関与し、その受容体である CBL-CIPK キナーゼ複合体が C/N 応答制御の上流シグナル伝達機構の分子実態として機能することが明らかになった。

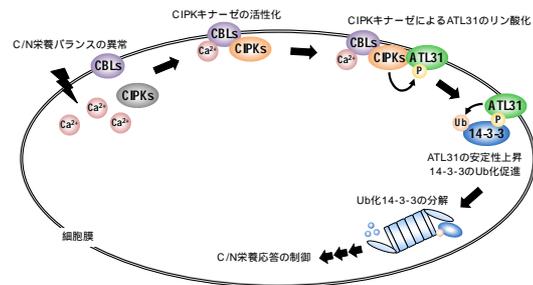


図. C/N 応答におけるリン酸化修飾を介した ATL31 による制御の全容。

(4) その他の主要な成果

ATL31 関連遺伝子導入植物を用いて、高 CO₂ 条件下での応答実験を実施した。高 CO₂ (780 ppm) 条件下では、野生型において老化の促進が観察されるが、ATL31 過剰発現体ではその抑制が、また ATL31KO 変異体ではその亢進が観察できた。これにより、ATL31 が C/N 応答だけでなく、CO₂/N 応答にも関与することを証明した。また、その老化に関与する転写因子 WRKY53 の同定に成功した。(雑誌論文 10, 12)

ATL31 遺伝子の転写制御について検討するため、転写調節因子 WRKY33 について検討した。その結果、WRKY33 が病原体感染時の ATL31 遺伝子発現制御に直接的に作用することを証明した。(雑誌論文 5)

植物の C/N 応答解明のため、C/N 応答変異体のスクリーニングを実施した。その結果、新たな変異体 *cni2-D* を単離した。この変異体は、植物ホルモン ABA のシグナル伝達に関与する *ABI1* 遺伝子が過剰発現していた。詳細な解析の結果、*ABI1* は、ABA の生合成やシグナル伝達に関与するだけでなく、それとは独立して、C/N 応答にも関与していることを証明した。(雑誌論文 7)

ユビキチンリガーゼ ATL ファミリーの機能解析として、ATL31 ATL6 二重変異体の

解析を実施した。2重変異体では、発芽初期の本葉の黄化が観察された。詳細な解析の結果、クロロフィル前駆体である5-アミノレブリン酸合成の阻害が原因であることを明らかにした。(雑誌論文6)

多機能タンパク質 14-3-3 は、植物の糖(炭素)と窒素代謝に重要な酵素群を制御することが知られている。本研究では、形質転換トマトを用いたプロテオミクス解析を行なうことで、トマトの果実形成に関わる 14-3-3 標的酵素群を網羅的に同定した。その結果、多数の糖・窒素代謝制御酵素群が翻訳後リン酸化修飾と 14-3-3 結合を介した機能制御を受けることが明らかとなった。これにより、トマト果実の収量および栄養成分を最適化するための新たな技術基盤の創出につながることを期待される。(雑誌論文3)

植物の窒素同化は、特に硝酸イオンの同化は植物の成長に重要であり、またそれ自身がシグナル物質として細胞内の遺伝子発現を制御することで、個体の成長に大きく影響する。本研究では、硝酸応答性の遺伝子発現マスターレギュレーターである転写因子 NLP の新規標的遺伝子として BTB 型ユビキチンリガーゼ *BT1/2* を同定した。さらに、外性プロモーターによる *BT2* 過剰発現により *nlp* 機能抑制変異体の成長阻害が回復することから、BT タンパク質が植物の成長制御に重要な硝酸シグナル伝達因子であることを明らかにした。(雑誌論文2)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件) - 全て査読有

1. Yasuda S, Aoyama S, Hasegawa Y, Sato T, Yamaguchi J (2017) Arabidopsis CBL-interacting protein kinases regulate carbon/nitrogen-nutrient response by phosphorylating ubiquitin ligase ATL31. *Mol. Plant*, 10: 605-618 [10.1016/j.molp.2017.01.005], 査読有
2. Sato T, Maekawa S, Konishi M, Yoshioka N, Sasaki Y, Maeda H, Ishida T, Kato Y, Yamaguchi J, Yanagisawa S (2017) Direct transcriptional activation of *BT* genes by NLP transcription factors is a key component of the nitrate response in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 483: 380-386 [10.1016/j.bbrc.2016.12.135], 査読有
3. Lu Y, Yasuda S, Li X, Fukao Y, Tohge T, Femie A R, Matsukura C, Ezura H, Sato T, Yamaguchi J (2016) Characterization of ubiquitin ligase SIATL31 and proteomic analysis of 14-3-3 targets in tomato fruit tissue (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Proteomics*, 143: 254-264 [10.1016/j.jprot.2016.04.016], 査読有
4. Huaranca Reyes T, Scartazza A, Lu Y, Yamaguchi J, Guglielminetti L (2016) Effect of Carbon/Nitrogen ratio on carbohydrate metabolism and light energy dissipation mechanisms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.*, 105: 195-202 [10.1016/j.plaphy.2016.04.030], 査読有
5. Huaranca Reyes T, Maekawa S, Sato T, Yamaguchi J (2015) The Arabidopsis ubiquitin ligase *ATL31* is transcriptionally controlled by WRKY33 transcription factor in response to pathogen attack. *Plant Biotech.* 32: 11-19 [10.5511/plantbiotechnology.14.12.01b], 査読有
6. Maekawa S, Takabayashi A, Huaranca Reyes T, Yamamoto H, Tanaka A, Sato T, Yamaguchi J (2015) Double mutant of *at131* and *at16* develops light intensity-dependent pale-green leaves, which is caused by inhibition of 5-aminolevulinic acid biosynthesis. *PLOS ONE* 10(2): e0117662 [10.1371/journal.pone.0117662], 査読有
7. Lu Y, Sasaki Y, Li X, Matsuura T, Mori IC, Hirayama T, Sato T, Yamaguchi J (2015) ABI1 regulates carbon/nitrogen-nutrient signal transduction independent of ABA biosynthesis and canonical ABA signalling pathways in Arabidopsis. *J Exp. Bot.* 66: 2763-2771 [10.1093/jxb/erv086], 査読有
8. Suzuki Y, Arae T, Green PJ, Yamaguchi J, Chiba Y (2015) AtCCR4a and AtCCR4b are involved in determining the poly(A) length of *Granule-bound starch synthase 1* transcript and modulating sucrose and starch metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*

*Physiol.*56: 863-874

[10.1093/pcp/pcv012] , 査読有

9. Lu Y, Yamaguchi J, Sato T (2015) Integration of C/N-nutrient and multiple environmental signals into the ABA signaling cascade. *Plant Signaling Behavior* e1048940 [10.1080/15592324.2015.1048940] , 査読有
10. Aoyama S, Huarancca 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
11. 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
12. 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
13. 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.* 289: 15179-15193 [10.1074/jbc.M113.533133] , 査読有
14. Sako K, Yanagawa Y, Kanai T, Sato T, Seki M, Fujiwara M, Fukao Y, Yamaguchi J (2014) Proteomic analysis of 26S proteasome reveals its direct interaction with transit peptides of plastid protein precursors for their degradation. *J. Proteome Res.* 13: 3223-3230 [10.1021/pr401245g] , 査読有

[学会発表](計 3件) - 主要な招待発表

1. 山口淳二 : 植物の基幹代謝と膜機能を制御するユビキチンリガーゼ ATL31 とそのシグナルネットワークの解明を目指して , 九州大学統合生命科学公開セミナー , 平成 27 年 5 月 18 日 , 九州大学 (福岡県・福岡市)
2. Junji Yamaguchi: ATL31 ubiquitin ligase, a regulator of the C/N response is also involved in defense response mediated by membrane traffic system. Seminar at SSSUP and University of Pisa, February 25, 2015, Pisa, Italy.
3. Junji Yamaguchi: Proteomics approach to study on metabolic regulation and defense response mediated by Arabidopsis ubiquitin ligase ATL31. The 6th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, the 1st AOAP0 Conference and the 5th Plant Proteomics Conference in China, June 23-27, 2014, Harbin, China.

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 2件)

名称: 不定根形成促進剤及び根系発達促進剤
発明者: 山口淳二, 眞木祐子, 副島洋, 綿引雅昭, 佐藤長緒
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特許願 2014-176848 号
出願年月日: 平成 26 年 9 月 1 日
国内外の別: 国内

名称: 不定根発生誘導剤及び根系発達促進剤
発明者: 山口淳二, 眞木祐子, 副島洋, 谷野圭持, 綿引雅昭, 佐藤長緒
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特許願 2016-191025, 2016-191026
出願年月日: 平成 28 年 3 月 25 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.sci.hokudai.ac.jp/CSF2-web/>

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

佐藤 長緒 (SATO, Takeo)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：5060724

(3)連携研究者

佐古 香織 (SAKO, Kaori)
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学
研究センター・研究員
研究者番号：60722395

前川 修吾 (MAEKAWA, Shugo)
北海道大学・大学院理学研究院・学術研究
員
研究者番号：80711209