学位論文題名

Studies on Nutrient Responses Mediated by Ubiquitin-Proteasome System in Arabidopsis

(シロイヌナズナにおけるユビキチン・プロテアソームシステムを介した
栄養応答に関する研究)

学位論文内容の要旨

地表に固定され動けない植物は、自らが生存している場所での栄養環境に適応していかなければならない。特に、炭素源 (C) である糖と主要栄養素である窒素 (N) の獲得は植物の発生・成長を大きく左右する。これらは、タンパク質合成を代表として、物質代謝の全体において密接に関わりあっている。そのため、植物は、炭素と窒素の代謝調節に関する個別のシグナリング機構に加えて、細胞内の炭素および窒素代謝物の相対量比 (C/N バランス) を感知し、環境に適応する能力、すなわち C/N 応答機構を備えている。このような植物の C/N 応答は、古くから、発芽後成長や花成といった植物の一生を左右する重要な成長相を制御する因子として知られていた。その一方で、そのシグナリング機構の分子実体については未だに謎のままであった。私は、モデル植物シロイヌナズナを用いて、C/N 応答を制御する分子機構の実態解明を目指し研究を行った。

1. 新規 C/N 応答制御ユビキチンリガーゼ *ATL31* の単離

C/N 応答制御機構の実態解明を目指し、新規 C/N 応答変異体のスクリーニングを進めた。その結果、高糖/低窒素という C/N ストレス条件に耐性を示す変異体 *cnl-D* (*carbon/nitrogen insensitive1-D*) の単離に成功した。*cnl-D* は、野生株が通常成長不能となり枯死するような極限 C/N 条件下において、子葉が緑色化し、本葉の展開も観察された。この変異体の原因遺伝子 *ATL31* は、RING finger motif をもつ機能未知のユビキチンリガーゼをコードしており、*ATL31* 遺伝子の過剰発現により極限 C/N 条件に対して耐性を示すことを明らかにした。in vitro 解析より、*ATL31* タンパク質はユビキチンリガーゼ活性を保持することを確認した。また、*ATL31* 遺伝子の欠損変異体では過剰に C/N 応答することも明らかにした。さらに、アミノ酸置換により E3 活性を失った変異型 *ATL31* を過剰発現させた形質転換体は、C/N ストレスに耐性を示さなかった。これらの結果より、*ATL31* はユビキチン-プロテアソームシステムを介して植物 C/N 応答を制御していることが示された。

2. ユビキチンリガーゼ ATL31 のユビキチン化標的タンパク質 14-3-3 の単離

ユビキチン-プロテアソームシステムでは、ポリユビキチン鎖を付加されたタンパク質を特異的に分解することで、細胞内の多様な現象を制御している。ユビキチンリガーゼは特異的タンパク質を直接認識し、ユビキチン化を行うことで標的タンパク質の安定性を制御する重要な機能を有する。ATL31 による C/N 応答制御機構の詳細を明らかにするため、ATL31 によるユビキチン化標的タンパク質について検討した。ATL31 にエピトープタグを付加し、免疫沈降および MS 解析を行った結果、ユビキチン化標的候補分子として 14-3-3 タンパク質群が同定された。14-3-3 は多くのリン酸化タンパク質に結合し、その活性を制御する分子であり、C および N 代謝に関わる酵素群の活性制御においても重要な役割を担うことが知られている。*in vitro* および *in vivo* において ATL31 と 14-3-3 タンパク質が結合することが確認された。また ATL31 は *in vitro* において 14-3-3 タンパク質をユビキチン化することが示された。さらに、野生型植物体内では C/N ストレスにより特異的な 14-3-3 タンパク質が蓄積し、一方で ATL31 過剰発現体ではその蓄積が起こらないことが示された。これらの結果より、ATL31 は C/N 条件に応じて、14-3-3 タンパク質の分解制御することで、植物 C/N 応答を制御することが示された。

上記の研究を通して、私は、植物 C/N 応答がユビキチン-プロテアソームシステムを介した特異的タンパク質により制御されていることを明らかにした。これは、高等植物では勿論、先行して研究がなされていた大腸菌や単細胞植物等の C/N 応答解析では得られていない初めての知見である。さらに、その制御機構の分子実態として新規ユビキチンリガーゼ ATL31 が機能し、ATL31 により 14-3-3 タンパク質の安定性が制御されていることを明らかにした。こうした知見は、14-3-3 により制御される既知の C/N 大代謝関連因子と新規のシグナル制御機構を繋ぐユニークな発見である。これを基に、不明な点が多かった植物 C/N 応答制御ネットワークの全容解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二
副 査 教 授 山 本 興 太 朗
副 査 教 授 内 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Studies on Nutrient Responses Mediated by Ubiquitin-Proteasome System in Arabidopsis

(シロイヌナズナにおけるユビキチン・プロテアソームシステムを介した
栄養応答に関する研究)

地表に固定され動けない植物は、自らが生存している場所での栄養環境に適応していかなければならない。特に、炭素源 (C) である糖と主要栄養素である窒素 (N) の獲得は植物の発生・成長を大きく左右する。これらは、タンパク質合成を代表として、物質代謝の全体において密接に関わりあっている。そのため、植物は、炭素と窒素の代謝調節に関する個別のシグナリング機構に加えて、細胞内の炭素および窒素代謝物の相対量比 (C/N バランス) を感知し、環境に適応する能力、すなわち C/N 応答機構を備えている。このような植物の C/N 応答は、古くから、発芽後成長や花成といった植物の一生を左右する重要な成長相を制御する因子として知られていた。その一方で、そのシグナリング機構の分子実体については未だに謎のままであった。私は、モデル植物シロイヌナズナを用いて、C/N 応答を制御する分子機構の実態解明を目指し研究を行った。

1. 新規 C/N 応答制御ユビキチンリガーゼ ATL31 の単離

C/N 応答制御機構の実態解明を目指し、新規 C/N 応答変異体のスクリーニングを進めた。その結果、高糖/低窒素という C/N ストレス条件に耐性を示す変異体 *cni1-D* (*carbon/nitrogen insensitive 1-D*) の単離に成功した。*cni1-D* は、野生株が通常成長不能となり枯死するような極限 C/N 条件下において、子葉が緑色化し、本葉の展開も観察された。この変異体の原因遺伝子 *ATL31* は、RING finger motif をもつ機能未知のユビキチンリガーゼをコードしており、*ATL31* 遺伝子の過剰発現により極限 C/N 条件に対して耐性を示すことを明らかにした。*in vitro* 解析より、*ATL31* タンパク質はユビキチンリガーゼ活性を保持することを確認した。また、*ATL31* 遺伝子の欠損変異体では過剰に C/N 応答することも明らかにした。さらに、アミノ酸置換により E3 活性を失った変異型 *ATL31* を過剰発現させた形質転換体は、C/N ストレスに耐性を示さなかった。これらの結果より、*ATL31* はユビキチン-プロテアソームシステムを介して植物 C/N 応答を制御していることが示された。

2. ユビキチンリガーゼ ATL31 のユビキチン化標的タンパク質 14-3-3 の単離

ユビキチン-プロテアソームシステムでは、ポリユビキチン鎖を付加されたタンパク質を特異的に分解することで、細胞内の多様な現象を制御している。ユビキチンリガーゼは特異的タンパク質を直接認識し、ユビキチン化を行うことで標的タンパク質の安定性を制御する重要な機能を有する。*ATL31* による C/N 応答制御機構の詳細を明らかにするため、*ATL31* によるユビキチン化標的タンパク質について検討した。*ATL31* にエピトプタグを付加し、免疫沈降および MS 解析を行った結果、ユビキチン化標的候補分子として 14-3-3 タンパク質群が同定された。14-3-3 は多くのリン酸化タンパク質に結合し、その活性を制御する分子であり、C および N 代謝に関わる酵素群の活性制御においても重要な役割を担うことが知られている。*in vitro* および *in vivo* において *ATL31* と 14-3-3 タンパク質が結合することが確認された。また *ATL31* は *in vitro* において 14-3-3 タンパク質をユビキチン化することが示された。さら

に、野生型植物体内では C/N ストレスにより特異的な 14-3-3 タンパク質が蓄積し、一方で ATL31 過剰発現体ではその蓄積が起らないことが示された。これらの結果より、ATL31 は C/N 条件に応じて、14-3-3 タンパク質の分解制御することで、植物 C/N 応答を制御することが示された。

上記の研究を通して、私は、植物 C/N 応答がユビキチン-プロテアソームシステムを介した特異的タンパク質分解により制御されていることを明らかにした。これは、高等植物では勿論、先行して研究がなされていた大腸菌や単細胞植物等の C/N 応答解析では得られていない初めての知見である。さらに、その制御機構の分子実態として新規ユビキチンリガーゼ ATL31 が機能し、ATL31 により 14-3-3 タンパク質の安定性が制御されていることを明らかにした。こうした知見は、14-3-3 により制御される既知の C/N 代謝関連因子と新規のシグナル制御機構を繋ぐユニークな発見である。これを基に、不明な点が多かった植物 C/N 応答制御ネットワークの全容解明が期待される。

これを要するに、著者は、植物の C/N 応答についてユビキチン-プロテアソームシステムが関与すること、ならびにこれに 14-3-3 タンパク質が関与すること等の新知見を得たものであり、今後の植物基幹代謝制御ならびに植物の生産性向上に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。