HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the phosphorylation of Arabidopsis ubiquitin ligase ATL31 in nutrient response [an abstract of entire text]
Author(s)	安田, 盛貴
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：理学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11556号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59523
Type	doctoral thesis
File Information	Shigetaka_Yasuda_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏　名　　安田　盛貴

学 位 論 文 題 名

Studies on the phosphorylation of Arabidopsis ubiquitin ligase ATL31 in nutrient response

（栄養応答におけるシロイヌナズナユビキチンリガーゼ ATL31 のリン酸化に関する研究）

自ら動くことができない植物は，自身が置かれている環境の変化に常に晒されている。これに適応するために，植物は優れた環境応答能力を獲得してきた。様々な環境要因の中で，栄養条件は植物の生育を左右する重要な要因のひとつである。特に光合成で得られた糖と，土壌中から吸収した無機窒素は，タンパク質合成における炭素源（C）および窒素源（N）として供給される。したがって，C と N 双方の量を適切に維持することが，生命活動を行う上で必要不可欠である。これを果たすために，植物は C と N の量比（C/N）を感知し，それに応じて自身の代謝・成長を制御している（C/N 応答）。しかし，植物がどのように C/N を感知しそのシグナルを伝えているのか，その詳細は未だ明らかになっていない。著者は，C/N 応答の分子機構解明を目的に，シロイヌナズナを用いて以下の解析を行なった。

1. ATL31 による 14-3-3 タンパク質のユビキチン化制御機構の解析

ATL31 は細胞膜局在型ユビキチンリガーゼである。ユビキチンリガーゼはタンパク質分解経路のひとつであるユビキチン・プロテアソーム系において，分解の標的となるタンパク質の認識・ユビキチン化を担っている。先行研究から，ATL31 は 14-3-3 のユビキチン化を介して，発芽後成長時における C/N 応答を制御していることが明らかになった（Sato et al., *Plant J*, 2009; Sato et al., *Plant J*, 2011）。そこで著者は，ATL31 による 14-3-3 のユビキチン化制御を明らかにするために，ATL31 と 14-3-3 の詳細な相互作用解析を行なった。

14-3-3 は，リン酸化セリン/スレオニン残基を含む特徴的な配列を標的としてタンパク質に結合する。モチーフ検索から，ATL31 の C 末領域に存在する 4 つの配列が 14-3-3 結合部位の候補に挙がった。そこで，これらの配列内でリン酸化が予想されたセリン/スレオニン残基（Thr-209，Ser-247，Ser-270，Ser-303）にアラニン置換を導入し，14-3-3 との相互作用に与える影響を解析した。その結果，これらすべての配列が 14-3-3 との相互作用に関与することが示された。さらに，MS 解析から Thr-209 と Ser-247 のリン酸化が示された。次に，リン酸化 Thr-209 を含む周辺配列の合成ペプチドを用いた相互作用阻害実験，および *in vitro* における ATL31 のリン酸化と 14-3-3 をプローブに用いた far-Western blotting を実施した。その結果，14-3-3 結合部位のリン酸化が ATL31 と 14-3-3 との相互作用に必須であることが明らかになった。最後に，すべての 14-3-3 結合部位にアラニン置換を導入した変異型 ATL31 過剰発現株（*35S-ATL31-4A*）を作出し，発芽後成長時における C/N 応答を解析した。*35S-ATL31-4A* は通常型 ATL31 過剰発現株とは異なり，高 C/低 N 条件下における生育阻害が緩和せず，14-3-3 タンパク質の蓄積も抑制されなかった。以上の解析から，ATL31 の 14-3-3 結合部位のリン酸化に応じて，14-3-3 のユビキチン化が制御されることが明らかになった（Yasuda et al., *J Biol Chem*, 2014）。

2. ATL31 の 14-3-3 結合部位をリン酸化するプロテインキナーゼの解析

次に，ATL31 の 14-3-3 結合部位をリン酸化するプロテインキナーゼの探索を進めた。異なる C/N 条件で 14-3-3 結合部位のリン酸化を解析した結果，低 C/高 N 条件下に比べ，高 C/低 N 条件下ではそのリン酸化が促進されることが分かった。そこで，マイクロアレイデータベースを用いて，高 C/低 N 条件下で遺伝子発現が上昇するプロテインキナーゼを探索したところ，7 個の関連遺伝子が同定された。興味深いことに，そのうちの 3 個が CIPK をコードしていた（CIPK7/12/14）。CIPK は SnRK サブファミリーに属するプロテインキナーゼであり，Ca^{2+}結合タンパク質である CBL と結合することで活性化する。また，CBL は複合体の細胞内局在性も決定しており，結合する CBL の種類によって異なる局在を示す。CIPK-CBL 複合体は栄養応答において重要な機能を担うことから，著者は CIPK に焦点を当て解析を進めた。複数の実験結果から ATL31 と CIPK7/12/14 との相互作用が示された。そこで，CIPK14 と ATL31 のリコンビナントタンパク質を用いてリン酸化解析を行なった。その結果，CIPK14 が ATL31 の 14-3-3 結合部位をリン酸化することが示された。CIPK14-CBL8 複合体は細胞膜に局在することが報告されている。解析の結果，CIPK14 による 14-3-3 結合部位のリン酸化は，CBL8 およびCa^{2+}存在下で促進されることが明らかになった。加えて，高 C/低 N 条件下における発芽後成長の阻害は，Ca^{2+}キレート剤である EGTA を加えることでより顕著になった。

以上の解析から，CIPK-CBL 複合体は，C/N に応じた ATL31 の 14-3-3 結合部位のリン酸化を制御している可能性が強く示唆された。

上記の研究通して 1.では 14-3-3 タンパク質の結合に係る ATL31 タンパク質のリン酸化制御と結合後の 14-3-3 のユビキチン化制御に関する詳細な分子機構が明らかになった。また，2.では，上記リン酸化を司るタンパク質キナーゼ CIPK の同定とCa^{2+}による制御の可能性が明らかとなった。