



Title	Identification of ABI1, new carbon/nitrogen regulator regulates plant C/N response via new pathways in Arabidopsis, and functional characterization of conventional C/N regulators, ATL31 and 14-3-3 in tomato (Solanum lycopersicum L.) [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	陸, 宇
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12733号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65586
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	LU_Yu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏 名: 陸 宇

学 位 論 文 題 名

Identification of ABI1, new carbon/nitrogen regulator regulates plant C/N response via new pathways in *Arabidopsis*, and functional characterization of conventional C/N regulators, ATL31 and 14-3-3 in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

(シロイヌナズナにおける新規炭素/窒素栄養バランス制御因子 ABI1 の単離と既知の炭素/窒素制御因子 ATL31 と 14-3-3 のトマト果実形成における機能解析)

地表に固定され生きる植物は、生息環境に適応するために、多様な環境情報を感知し、応答する優れた能力を有する。私は、植物の栄養環境、特に利用可能な糖(炭素源, C)と窒素(N)量のバランス「C/N」に注目し、研究を進めてきた。シロイヌナズナでは、高炭素/低窒素(高 C/低 N)培地で、子葉の緑化が抑制される一方、アントシアニンを蓄積し、発芽後成長が著しい阻害を受ける。このような現象では、炭素および窒素の絶対量ではなく、その相対的バランスが重要であり、「C/N 応答」と称される。C/N は、発芽後成長に限らず、花成や老化の進行にも影響し、植物のライフサイクル転換点において重要なシグナルとなる。C/N 応答は、古くからその重要性が認識されている一方で、その制御メカニズムは不明のままであった。本研究では植物の C/N 応答制御機構の解明を目指して、モデル植物シロイヌナズナおよびモデル作物種であるトマトを用いた、下記二つの解析に取り組んだ。

1. 新規 C/N 応答制御因子 CNI2/ABI1 の単離と機能解析

C/N 応答機構の分子実態を明らかにすることを目的に、シロイヌナズナ FOX(Full-length cDNA Overexpression)ラインを用いた C/N 応答異常変異体のスクリーニングを行った。その結果、新規 C/N 応答異常変異体 *cni2-D(carbon/nitrogen insensitive 2-D)* を単離した。*cni2-D* 変異体は、野生型が著しい生育阻害を受けるような高 C/低 N 培地でも子葉が緑化し生育できた。さらに原因遺伝子について解析した結果、この変異体は、*ABI1* 遺伝子の過剰発現により、C/N ストレス耐性になっていた。一方、ABI1 機能欠損変異体は C/N ストレスに真逆の過剰応答を示すことから、CNI2/ABI1 が C/N 応答制御因子として重要であることが確認できた。ABI1 は植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)シグナル伝達系の負の制御因子として機能する脱リン酸化酵素である。ABI1 は、脱リン酸化標的である SnRK2 キナーゼ群の活性を制御することにより、下流に広がる広範なリン酸化カスケードおよび遺伝子発現を制御する。さらに、ABI1 自身の活性は、ABA 受容体(PYR/RCAR)との直接結合により負の制御を受けており、ABA シグナル伝達系の最上流に位置する重要な制御因子である。このことから、ABA シグナル伝達系は C/N 応答機構にも関与することが示唆された。ただし、興味深いことに、通常条件と高 C/低 N ストレス条件において植物体内の ABA 含量の差は検出されなかった。また、既知の糖および ABA シグナル伝達因子である *ABI4* や *ABI5* の変異

体は C/N 応答に異常を示さなかった。一方、ABI1 の新たな脱リン酸化標的として報告されはじめた SnRK1 キナーゼ (Rodrigues et al., 2013, Plant Cell) のリン酸化状態は C/N で変動した。実際、SnRK1 経路の下流マーカー遺伝子の発現は、野生型では C/N ストレス時に低下し、一方で ABI1 過剰発現体では非感受性となることが分かった。これらの結果から、ABI1 は、既存の ABA および糖シグナル伝達系とは異なり、SnRK1 を介した新規のシグナル伝達経路を介して C/N 栄養応答を制御することが示唆された。

2. トマト果実における CNI1/ATL31 および 14-3-3 タンパク質の機能解析

上記 CNI2/ABI1 の単離に先立ち、当研究室の先行研究から、C/N 応答制御因子 CNI1 として新規ユビキチンリガーゼ ATL31 が単離された。加えて、そのユビキチン化標的として 14-3-3 タンパク質が同定された。これまでの解析から、ATL31 はユビキチンリガーゼとして機能し、ユビキチン化標的である 14-3-3 タンパク質の安定性制御を介して、植物の C/N 応答を制御することが明らかになっている。ATL ファミリーは、多様な植物種に広く保存された膜局在型ユビキチンリガーゼであるが、シロイヌナズナ以外の植物種における機能はほとんど分かっていない。また、14-3-3 は、特異的なリン酸化モチーフを認識・結合することで、代謝酵素やトランスポーター、転写因子等の多様なタンパク質の機能制御を果たすことが知られている。14-3-3 もまた、植物種を超えて高度に保存されているが、果実の形成・成熟における機能は未知である。本研究課題では、これまでシロイヌナズナを用いて研究してきた C/N 応答制御因子 ATL31 および 14-3-3 機能解析を、モデル作物種のトマト果実を用いた解析に発展させた。

その結果、トマトにおける *ATL31* ホモログ遺伝子 (*SlATL31*) を単離し、SlATL31 タンパク質がユビキチンリガーゼ活性を有することが確認された。また、SlATL31 はトマト 14-3-3 タンパク質と結合することが示されたことから、シロイヌナズナ ATL31 と同様の生化学的機能を有することが示唆された。さらに、トマト果実における 14-3-3 複合体のアフィニティー精製と MS 解析による 14-3-3 標的因子の網羅的同定に成功した。この MS 解析結果から、14-3-3 がトマト果実の成熟過程において、糖代謝や細胞壁合成に関する重要な酵素群を標的因子として制御することが示唆された。トマト果実の成熟過程におけるタンパク質翻訳後修飾による酵素活性制御に関する情報はほとんど得られておらず、この研究成果は、トマト果実の収量および栄養成分を最適化するための基盤情報となることが期待される。

上記の研究課題から、植物の C/N 栄養応答に関する新規制御因子を単離し、C/N 栄養シグナルに関する新たな制御経路の存在を突き止めた。さらに、これまでのモデル植物シロイヌナズナの発芽後成長解析から得られた C/N 応答制御因子について、作物種トマトの果実形成における機能解析へと発展させることで、植物 C/N 応答解析の農学的応用への道を拓いた。