

## 特集：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

## 植物の RING 型ユビキチンリガーゼとプロテアソームの機能

前川 修 吾, 佐古 香 織, 佐藤 長 緒

シロイヌナズナのゲノム中には470を超えるRING型ユビキチンリガーゼ(E3)がコードされており,これは酵母や哺乳動物種と比較して非常に多い。一方で,その具体的な機能についての理解は遅れていた。しかし,最近そのユビキチン化標的分子が明らかになることで,多様な環境ストレス適応機構としてRING型E3の機能が注目されている。また,ユビキチン化タンパク質の分解装置であるプロテアソームの機能についても,植物ホルモン応答や器官サイズ制御といった動物とは違ったユニークな機能性を有することが分かってきている。本稿では,こうした植物RING型E3およびプロテアソーム機能に関する最新の知見を概説するとともに,筆者らが進めてきた膜結合型E3・ATL31とプロテアソームサブユニットRPT2aの機能に関する具体的な研究例を紹介する。

## 1. 植物 RING 型ユビキチンリガーゼの機能

RINGフィンガードメインは,システインとヒスチジン残基を中心に亜鉛イオンを捕捉し,タンパク質相互作用に関与する構造を形成する。ユビキチン結合酵素(E2)と相互作用する場として機能するため,多くのE3に保存されており一群のRING型E3が存在している。RING型E3には単独でE2およびユビキチン化標的タンパク質と結合しうるタイプのものでCullin-RbxのようにSCF複合体の一部として機能するものがあるが,ここでは前者に焦点を当て,植物におけるRING型E3の機能について概説したい。高等植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のゲノム中には470を超えるRING型E3遺伝子がコードされており,非常に多いがそのほとんどは機能未知のタンパク質である<sup>1,2)</sup>。変異体リソースが充実しているシロイヌナズナでは,遺伝学的手法を中心とした解析が進展しており,

ユビキチンリガーゼについてもやはり変異体の表現型に着目した生理学的役割の理解が先行してきた。しかし,近年のプロテオミクス解析技術の普及に伴い,ユビキチン化の標的分子も含めた生化学的な機能についても少しずつ明らかとなってきた。ここではそうした研究結果に関する概要について紹介するとともに,具体的な研究例として筆者らが進めてきた膜結合型E3「ATLファミリー」の機能解析について紹介したい。

## 植物ホルモン ABA シグナル伝達経路

表1にこれまでシロイヌナズナで機能解析が行われた主要なRING型E3についてまとめた。その多くは環境ストレスに対応するための重要なシグナル制御因子として同定されている。その中には植物ホルモン「アブシジン酸(ABA)」のシグナリングに関与する複数のE3が報告されている。ABAは乾燥や低温,塩そして栄養素といった多様な環境ストレスを受容し伝達する植物ホルモンとして広く知られている。近年多くの植物ホルモンの受容・シグナリングがユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)を介したタンパク質分解で制御されることが明らかとなっているが<sup>3)</sup>,特にABAシグナリングではRING型E3の関与が多く報告されている。KEGはABAシグナリングを担う転写因子ABI5をユビキチン化標的とするE3として報告された<sup>4)</sup>。KEGはRINGドメインに加えてキナーゼドメイ

北海道大学大学院理学研究院生物科学部門形態機能学講座 (〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目 北海道大学大学院理学研究院5号館7階01室)

RING-type ubiquitin ligase and proteasome function in plants

Shugo Maekawa, Kaori Sako and Takeo Sato (Faculty of Science, Hokkaido University, Kita-ku N10-W8, Sapporo 060-0810, Japan)

表1 環境ストレス適応に関与するシロイヌナズナ RING 型 E3

	E3	RING 型	生理的機能	基質	Ref.
ABA 経路	KEG	HCa	ABA シグナル伝達	ABI5	4-6
	AIP2	H2	ABA シグナル伝達	ABI3	7
	RHA2a	H2	ABA シグナル伝達		22
	XERICICO	H2	ABA 合成		23
	SDIR1	H2	ABA 応答 (乾燥・塩)		24
	ATL43	H2	ABA 応答 (糖)		12
乾燥・低温	DRIP1/2	HCa	乾燥ストレス	DREB2A	9
	Rma1	HCa	乾燥ストレス	PIP2;1	10
	HOS1	H2	低温ストレス	ICE1	11
栄養素	SIS3	H2	糖応答		13
	NLA	HCa	窒素欠乏ストレス		14-15
	ATL31/6	H2	炭素/窒素バランス応答	14-3-3	27, 35
	BTS	HCa	鉄欠乏ストレス	ILR-3 ?	25
病原体	ATL2	H2	Flg22 シグナル伝達		19
	RING1	H2	FB1 誘導性細胞死		20
	ATL9	H2	うどん粉病菌抵抗性		21

ンも有するユニークな構造をもつ。通常 ABI5 をユビキチン化し分解へ導くが、ABA 処理により自己ユビキチン化活性が亢進し不安定化する。その結果、ABI5 の分解が抑制され下流の ABA 応答性遺伝子発現が誘導されることが明らかとなっている。また、この過程には ABA による KEG の自己リン酸化が関与することや標的である ABI5 の SUMO 化・リン酸化状態の変化も関与し、複雑な翻訳後制御が働くことが考えられている<sup>5,6)</sup>。加えて、他の ABA シグナル制御転写因子である ABI3 を標的とする E3 として AIP2 およびイネ DSG1 も同定されており、ABA シグナリングと UPS の関連の深さが窺える<sup>7,8)</sup>。

### 乾燥・低温ストレス

一方、ABA シグナリングとは別のかたちで乾燥ストレス適応に関わる E3 も報告されている。DRIP1/2 と Rma1 はそれぞれ DREB2A と PIP2;1 がユビキチン化標的分子として同定されている<sup>9,10)</sup>。DREB2A は乾燥ストレス時に遺伝子発現が誘導され、乾燥適応に重要な役割を果たす転写因子である。ただし、恒常的に存在させた場合、植物の生育に悪影響を及ぼすことが知られており、一過的な発現後は速やかに分解を受ける必要がある。DRIP1/2 は UPS を介して DREB2A の過剰蓄積を防ぎ、乾燥ストレス適応を厳密に制御する E3 として機能していると考えられる。Rma1 は膜局在型の E3 で、水透過チャネルである PIP2:1 をユビキチン化し分解へ導くことで植物細胞内の水の吸収や乾燥ストレス適応に寄与している。

また低温ストレス適応を制御する E3 として HOS1 が同定されている<sup>11)</sup>。HOS1 もまた低温ストレス適応を誘導する転写因子 ICE1 をユビキチン化標的としてタンパク質分解へ導くことで、下流の低温誘導遺伝子群の発現を制御することが報告されている。

### 栄養素ストレス

栄養素ストレス適応に関与する E3 はあまり知られていなかったが、近年筆者らの研究も含めて少しずつその存在が明らかとなっている。最も報告が多いのが糖に対する応答性を制御する E3 である。上述の KEG も ABA シグナリングを介して糖応答制御に関与しており、機能欠損変異体は糖に対する感受性が高まり発芽後成長や子葉緑化の阻害が顕著になる<sup>4)</sup>。もう一つ ABA を介した糖応答に関与する E3 が ATL43 である<sup>12)</sup>。ATL43 は膜結合型の E3 であり植物に保存された ATL ファミリー (詳細は後述) の一つであるが、KEG とは逆に機能欠損変異体は糖および ABA に対する感受性が低下することが報告されている。まだユビキチン化標的分子は同定されておらず、詳しい生化学的機能はわかっていない。SIS3 もまた RING 型 E3 であり機能欠損変異体は糖に対する応答性が異常になる<sup>13)</sup>。ただし、この変異体は ABA に対する応答性が正常であることから ABA シグナルとは独立した経路で植物の糖応答に関与していると考えられ、こちらについてもユビキチン化標的の解明が待たれる。

糖に並ぶ重要な栄養素である窒素に関する E3 も報告されている。NLA は窒素欠乏条件での老化誘導に関与する E3 として同定された<sup>14)</sup>。NLA は核に局在し、この遺伝子の欠損変異体では老化時のアントシアニンの蓄積が抑制される。標的タンパク質は未だ不明であるが、変異体のメタボローム解析からアントシアニン合成に関わる二次代謝経路に異常があることが報告されている<sup>15)</sup>。加えて筆者らは、炭素/窒素栄養バランスへの応答を制御する重要因子として膜局在型の新規 E3 である CNI/ATL31 を同定し解析を進めており、これについては次の章で詳しく紹介したい。この他にも糖添加に応答したマイクロアレイ解析から、複数の RING 型 E3 が顕著な発現誘導および抑制を受ける

ことが報告されており<sup>16)</sup>, 今後も糖シグナルに関与する RING 型ユビキチンリガーゼが明らかとなると予想される。

### 病原体ストレス

これまで紹介してきた非生物的 (abiotic) 環境ストレスに対してだけではなく, 病原体感染 (biotic) ストレスと UPS の関与も数多く報告されている<sup>17)</sup>. その中には RING 型 E3 の関与も幾つか報告されているが, 病原体ストレスに関しては特に U-box 型 E3 の関与が詳しく分かっており, 八丈野らの項 (pp. 425-431) に詳しい内容があるためここでは割愛する. イネの EL5 やシロイヌナズナの ATL2, RING1, ATL9 がその例であるが, これらは全て膜結合型 E3 である ATL ファミリーに属していることは興味深い<sup>18)</sup>.

以上のように RING 型 E3 は植物の環境ストレス応答に幅広く関与し, その細胞内局在性や標的分子も多様である

ことが分かる. しかし, これまでに解析がなされ標的分子まで同定されたものは RING 型 E3 のうち数%に満たず, 残りの 90% 以上は機能未知である. 今後, これら E3 の生化学および生理的機能解析が進むことで植物の優れた環境適応機構の実態が明らかになると期待される.

## 2. 膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL ファミリー

前述のようにシロイヌナズナのゲノム中には RING ドメインをもつ遺伝子が 470 以上推定されているが, そのうち疎水性インデックスから膜貫通領域を持つと予測されるものが 110 ある. そして, その中の 80 を ATL (*Arabidopsis Toxicos en Levadura*) ファミリーが占めている. ATL ファミリーは植物のみに広く保存された, 膜貫通 RING 型 E3 ファミリーである<sup>25, 26)</sup>.

ATL ファミリーは N 末側から順に膜貫通領域, GLD モチーフ, RING-H2 ドメインをもっており, C 末側は非保存的なアミノ酸領域となっている (図 1)<sup>25)</sup>. N 末端に存在

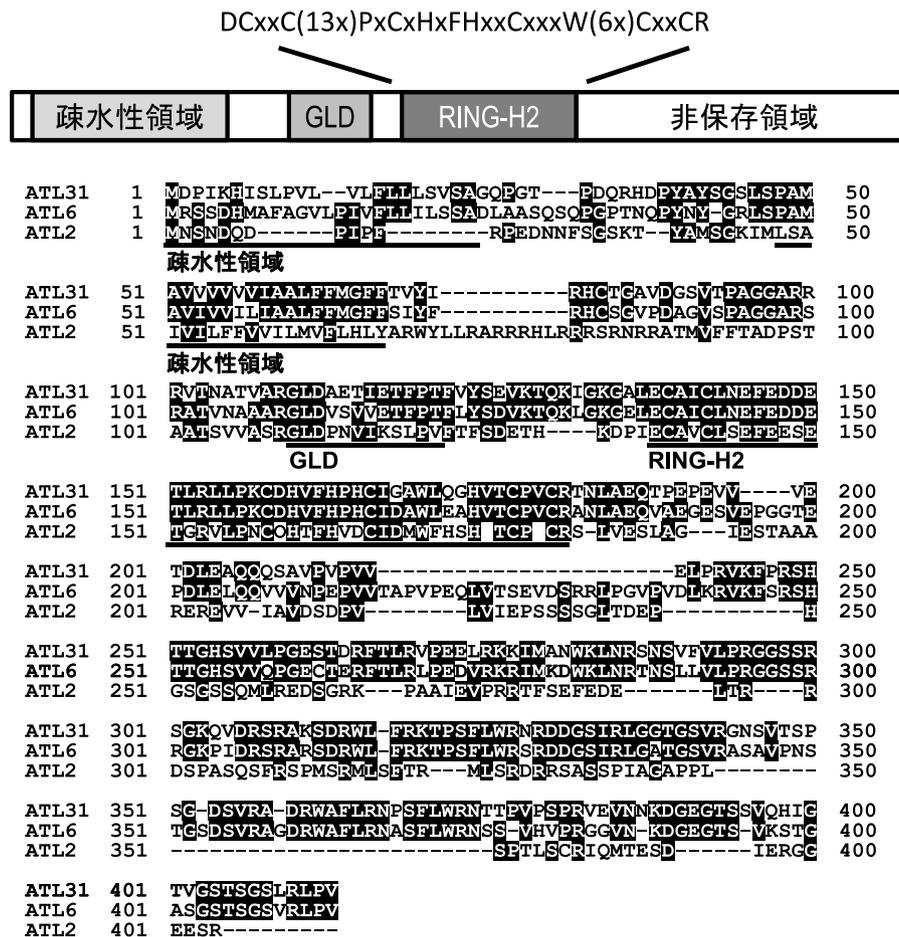


図 1 ATL ファミリーのドメイン構造及び ATL31/6/2 のアミノ酸配列比較

ATL ファミリーは N 末側から疎水性領域, GLD モチーフ, RING-H2 ドメインをもつ. C 末領域は保存性が低く, ユビキチン化標的の結合に機能すると考えられる. ATL31 と ATL6 は ATL2 と比べて C 末領域の保存性が非常に高く, 実際にどちらも同じ標的 14-3-3 タンパク質と結合しユビキチン化していた.

する一つないしは複数の疎水性アミノ酸に富む領域により、全てのメンバーが膜結合型タンパク質であると考えられている。実際にこれまでに個別解析がなされたものは全て細胞膜やER膜などへの局在が示されている<sup>20,21,27</sup>。GLDモチーフは、グリシン(G)、ロイシン(L)、アスパラギン酸(D)で始まる12アミノ酸からなる機能未知のモチーフである。最近、このモチーフがE2との結合の制御に寄与していることが示唆されたが、その役割について詳しくは分かっていない<sup>26</sup>。また、C末領域は、ファミリー内で比較的保存性が低いことから、この領域がユビキチン化標的タンパク質との結合特異性を担うと考えられている。実際に我々が解析したATL31は、非保存的なC末領域で、標的である14-3-3タンパク質と結合していた(後述)<sup>27</sup>。

ATLファミリーはイヌカタヒバ(*Selaginella moellendorffii*: 20 遺伝子)やヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*: 28 遺伝子)などの進化的に古い植物では比較的少なく、シロイヌナズナやイネ(*Oryza sativa*: 121 遺伝子)などの高等植物において広く分布している。このことから、進化の過程で、動くことのできない植物が、変化する外部環境に適応するためにATLファミリーを拡大させてきたことがうかがえる<sup>26</sup>。実際にこれまでにATL2やATL6がキチン処理にตอบสนองして発現が上昇することを始めとして、その多くが病原菌感染時に比較的早く発現が誘導されるとともに、病害抵抗性に機能していることが複数報告されている<sup>19,20,25</sup>。その例として*AtATL9*はキチン処理後に発現が上昇する遺伝子として解析がなされ、そのKO変異体はうどん粉病菌への抵抗性が低下する<sup>28</sup>。あるいはイネのATLである*OsBIRF1*をタバコで過剰発現させるとtobacco mosaic virusや*Pseudomonas syringae* pv *tabaci*への抵抗性が上昇する<sup>29</sup>。また、ATLファミリーは他にもABA応答・ROS制御・日周制御など様々な環境応答への関与が示されている<sup>25,29,30</sup>。以上のようにATLファミリーは様々な環境応答に関与する重要なE3ファミリーであることが示されてきているが、そのユビキチン化標的を同定した例はほとんどなく、今後の大きな課題となっている。

ちなみに、このATLという名前は、シロイヌナズナのcDNA libraryを出芽酵母で(en *Levadura*)過剰発現させたときに毒性(Tóxicos)を示すものとしてATL2が同定されたことに由来する。その後、ATL2の特徴的なドメイン構造(前述)を共通して持つ遺伝子群がATLファミリーと命名された<sup>31</sup>。しかしその後の解析により、その他の多くのATLファミリーメンバーは、酵母に導入されても毒性を示さないことが分かっており<sup>32</sup>、ATLという名前自体は、ファミリーが多様かつ重要な機能を持っていることを考慮すると、あまり意味の無い名前となっている。

### 3. ATL31/ATL6による植物の栄養応答制御

植物は地上部での光合成により得られる糖と根から吸収した各種無機栄養素を材料に生存に必要な全ての代謝物を合成する。地表に固定された植物にとって、環境中の栄養状態を感受し、多様な代謝系を巧みに制御する能力は生きる上で必須となる。栄養素のなかでも糖(炭素源, C)と窒素(N)は基幹代謝を担う重要な因子であり、アミノ酸合成をはじめとした広範な代謝過程において深い関わりをもっている。よって、細胞内のC及びNの絶対量に加えて、両者の量的バランス「C/N」が重要なシグナルとなり、各代謝酵素の活性、さらには発芽後成長や老化といった植物の生活環の重要な転換点が制御される(図2)<sup>33,34</sup>。こうした現象は「C/N応答」として注目されてきたが、一方で解析の困難さからその分子実態についてはほとんど分かっていなかった。

そこで筆者らはC/N応答制御因子の探索のため、野生型が生育できない過激なC/Nストレス条件(300 mM グルコース/0.1 mM 窒素)を用いたスクリーニングを行った。その結果、C/Nストレスに耐性を示し発芽後成長が進行する変異体*cni1-D*(*carbon/nitrogen insensitive 1-D*)の単離に成功した<sup>27</sup>。原因遺伝子を同定すると*cni1-D*ではATLファミリーに属する遺伝子ATL31が過剰発現していることが分かった。また、ATL31の機能欠損(KO)変異体は逆にC/Nストレスに過剰応答することが確認された。引き続き解析から、ATL31が細胞膜に局在しており、実際にRING型E3としてユビキチン化活性を有することが分かった。さらにRINGドメインへの変異により不活性化したATL31過剰発現体(ATL31C143S)はC/Nストレス耐性を示さなかった。こうした結果から、ATL31が膜局在型のE3としてC/N応答を制御する重要な因子であることが強く示唆された。また、ATL31と最も相同性の高いホモログATL6の過剰発現体・KO変異体についても、ATL31と同様のC/N応答性を示した。

ではATL31/6のユビキチン化標的分子は何なのか?これがC/N応答機構を理解するための最も重要な課題であった。そこでプロテオミクス解析を用いたATL31のユビキチン化標的因子探索を試みた。この際、より効果的にユビキチン化標的を同定すべく、前述のRING変異を入れたATL31C143SにFLAGタグを融合したタンパク質を用いて免疫精製を行った。精製産物の電気泳動・染色により特異的なタンパク質がATL31C143Sと共沈降することが確認され、MS解析の結果複数の14-3-3タンパク質が同定された<sup>35</sup>。14-3-3は分子量およそ25 kDaのタンパク質で、シロイヌナズナでは少なくとも13個のアイソフォームが発現していることが確認されている。ホモあるいはヘテロダイマーとなり、リン酸化タンパク質に結合することで酵

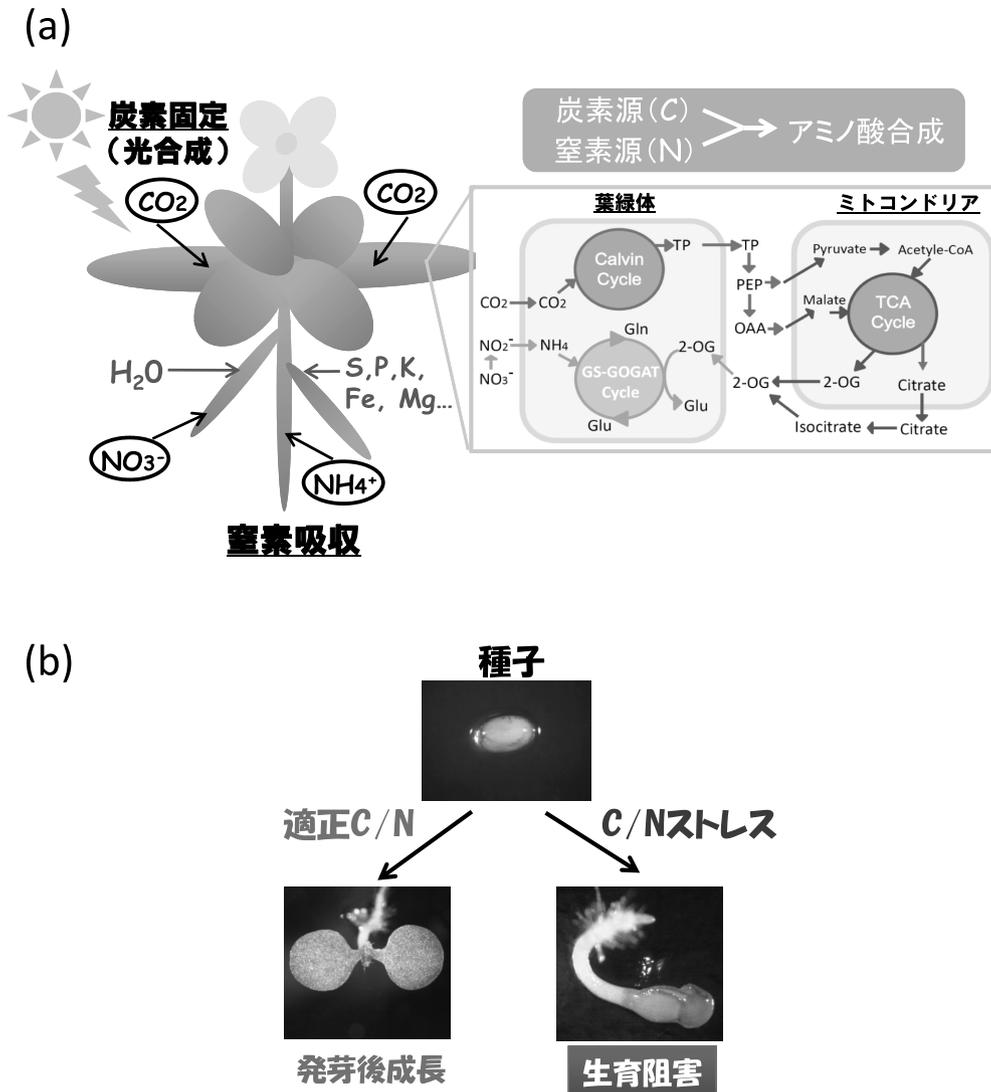


図2 植物の炭素・窒素代謝のクロストークと C/N による成長制御 (C/N 応答)

(a) 植物は光合成により大気中二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ ) を固定することで糖を合成し、根から硝酸 ( $\text{NO}_3^-$ ) やアンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) 等の各種無機栄養素を吸収し代謝に利用している。TCA サイクルの中間産物である  $\alpha$ -ケトグルタル酸 (2-OG) とアンモニウム ( $\text{NH}_4^+$ ) を基質にグルタミン酸を合成する GS/GOGAT サイクルはアミノ酸代謝の根幹であり、炭素・窒素代謝のクロストークの場となっている。

(b) 正常な C/N バランス条件下の種子は発芽し、発芽後成長 (緑化葉の展開・根の伸長) が進行する。一方で、C/N ストレス条件下ではアントシアニンが蓄積し、著しい生育の阻害が起こる。

素活性や安定性、局在性などを制御する多機能分子として知られている<sup>36~38)</sup>。植物において 14-3-3 結合タンパク質の中には、 $\text{H}^+$ -ATPase や硝酸還元酵素、グルタミン・グルタミン酸合成酵素、スクロースリン酸合成酵素など炭素・窒素代謝の主要な酵素群が知られており、C/N 応答との関連も深い<sup>39)</sup>。その後の解析により ATL31 の標的結合部位と考えられていた C 末領域において 14-3-3 が結合し、ポリユビキチン化されることが *in vitro* および *in vivo* 解析により示された (図 3)。ATL31 と ATL6 は C 末領域の保存性が高く、同じ標的をもつことが考えられていたが、実際

に ATL6 もまた 14-3-3 と結合しポリユビキチン化することが確認された<sup>35)</sup>。また、実際の植物 C/N 応答における 14-3-3 タンパク質の挙動を調べた結果、C/N ストレスに応じて 14-3-3 のタンパク質が蓄積すること、さらにその変動は ATL31 の発現量に依存することが分かった。加えて、14-3-3 過剰発現体は C/N ストレス耐性が低下 (ATL31 過剰発現体と逆) することから、14-3-3 は ATL31 のユビキチン化標的分子であると結論付けた。一連の解析結果から、ATL31 は E3 として機能し、C/N に応じた 14-3-3 タンパク質分解を介して、植物の発芽後成長を制御するとい

う新たな栄養応答制御モデルを提唱することができた (図4)<sup>35)</sup>。ATL31は14-3-3の安定性を変化させることで、上記の炭素・窒素代謝鍵酵素群の活性を制御していることも考えられる。

現在は、C/N条件に応じたリン酸化プロテオミクスやメタボロミクス解析を通して、ATL31と14-3-3を中心に広がるC/N応答制御ネットワークの全容解明を目指している。また、架橋剤を用いた免疫沈降/MS解析を行うことで、膜からの可溶化処理で解離してしまっていたようなATL31相互作用因子も含めた機能解析を試みている。こうした実験手法は他のATLファミリー標的タンパク質探索にも有効であると考えられ、今後ATLファミリー全体

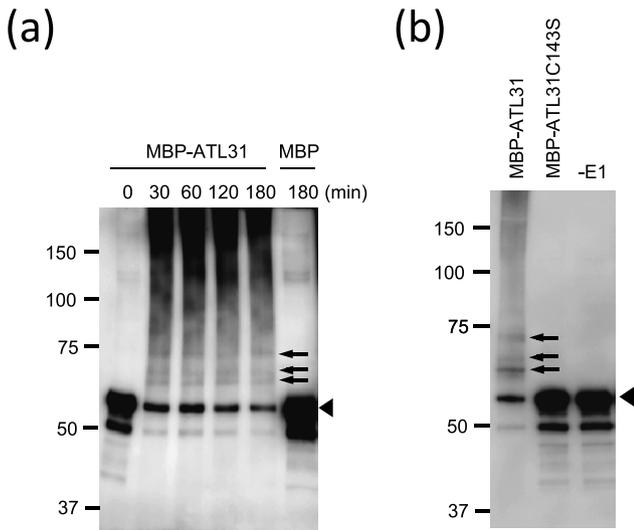


図3 ATL31による14-3-3タンパク質のユビキチン化  
リコンビナントMBP-ATL31およびHis-14-3-3タンパク質を調製し、他のユビキチンカスケード必須因子(E1, E2, ATP, Ub)と共に *in vitro* で反応させた。抗-His タグ抗体を用いたウェスタンブロットングにより14-3-3のユビキチン化を検出した。(a)0, 30, 60, 180分間反応させたサンプルのユビキチン化状態。(b)ATL31のRINGドメインに変異を導入したATL31C143Sを反応に用いた場合およびE1を含まない反応液では14-3-3のユビキチン化は起こっていない。

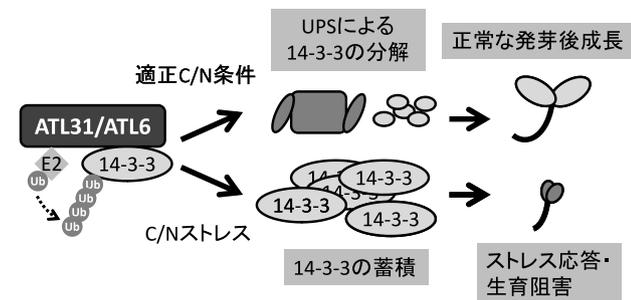


図4 ATL31/6によるC/N応答制御機構のモデル図  
適正なC/N生育条件において、ATL31/6は14-3-3をユビキチン化し、プロテアソーム分解に導くことで正常な発芽後成長が進行する。一方、C/Nストレス条件下では14-3-3の分解が滞り、過剰に蓄積することで生育が阻害される。

の更なる機能解明が進むことが期待される。

#### 4. 植物におけるプロテアソーム機能の概要

26Sプロテアソームは、真核生物においてユビキチン化されたタンパク質の分解を実行する巨大な複合体型プロテアーゼである。26Sプロテアソームは、ペプチダーゼ活性を有し、分解の実行因子である20S活性複合体(20S CP)と、その両端に結合し、20S CPの活性調節やポリユビキチン鎖の認識に機能する19S調節複合体(19S RP)からなる(図5)<sup>40)</sup>。20S CPは、それぞれ7種のサブユニットから構成されるαリングおよびβリングがαββαの順で会合している分子量約750 kDaの円筒型複合体である。βリングによって形成される円筒空洞内の表面がペプチダーゼ活性を示す<sup>41)</sup>。通常、αリングによって構成される基質のゲートが閉鎖されているため、20S CP単独では活性をもたない。このため、20S CPが分解活性を発揮するためには、19S RP, PA28, PA200などのプロテアソーム活性化因子との会合が必要となる。

19S RPは、ユビキチン化された基質タンパク質をATP依存的に分解するために必要不可欠な分子量約700 kDaの複合体である。19S RPを構成するサブユニットは、ATPase活性を持つ6種のRPTタンパク質群とATPase活性を持たない13種のRPNタンパク質群に分類される。19Sは、基底部および蓋部と呼ばれる構造体に分けられ、基底部は、RPT1~6から構成されるATPaseリングとRPN1, RPN2およびRPN10から成る複合体で、20S CPのαリングに直接会合する。蓋部はRPN3, 5~13とRPN15から構成される。

#### 26Sプロテアソーム

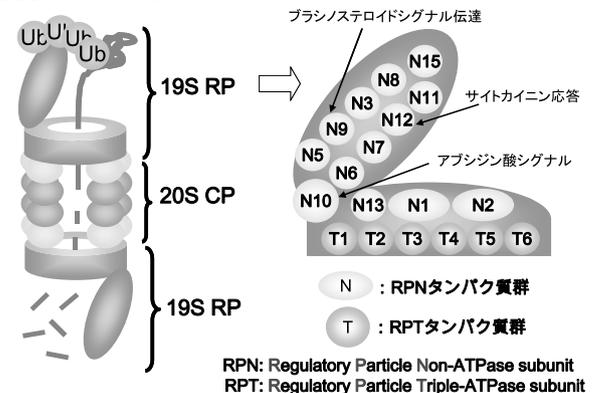


図5 26Sプロテアソームの構造および植物プロテアソームの機能の概要

26Sプロテアソームはタンパク質分解活性を持つ20S CPと、ポリユビキチンの認識や20S CPの活性調節を行う19S RPからなる。19S RPはさらに、ATPase活性をもつRPTタンパク質群とATPase活性を持たないRPNタンパク質群から構成される。RPNサブユニットは、それぞれ多様な機能を持つことが報告されている。

RPN および RPT タンパク質群は、それぞれが固有の機能をもつことが示唆されている。一例を挙げると、RPN10 および RPN13 は標的タンパク質に結合したポリユビキチン鎖を認識し、捕捉する機能をもつ<sup>42,43)</sup>。また、RPN11 は脱ユビキチン化活性をもち、標的タンパク質に付加されたポリユビキチン鎖をはずすことで、標的タンパク質を分解できるよう導くと考えられている<sup>44,45)</sup>。加えて、これまでに高等植物では、プロテアソームサブユニットと植物ホルモンシグナルとの関連性が報告されている。シロイヌナズナ RPN10 の逆遺伝学的解析から、*rpn10* 変異体は多様な表現型を示すことがわかっている。なかでも、*rpn10* 変異体はアブシジン酸 (ABA) に対して高感受性を示した。これは、*rpn10* 変異体では ABA シグナル伝達に機能する転写因子 ABI5 タンパク質が蓄積していたことが要因であった。従って、RPN10 は ABI5 の安定性を制御することによって、アブシジン酸シグナルを制御することが示唆された<sup>46)</sup>。一方、RPN12a はサイトカイニンシグナルの負の制御因子である ARR5 の安定性を制御することによって、サイトカイニンシグナルに関与することが報告されている<sup>47,48)</sup>。

さらに、タバコ (*N. benthamiana*) の RPN9 の解析から、RPN9 ノックダウン変異体ではオーキシン輸送の減衰が観察され、ブラシノステロイドシグナル伝達制御下にある転写因子 BZR1 の蓄積が認められた<sup>49)</sup>。このことから RPN9 はオーキシン輸送およびブラシノステロイドシグナル伝達に重要であることが示唆された。このように、プロテアソームは高等植物のシグナル伝達に重要な役割を果たしている。しかし、これらサブユニットが、どのように特定の標的タンパク質の安定性を制御しているのか、また、その他サブユニットの機能について、いまだ不明な点が多い。

## 5. RPT2a の機能解析

RPT タンパク質群によって形成される ATPase リングは、19S RP と 20S CP の会合や、基質の解きほぐし、ならびに 20S CP 内への輸送に重要な役割を担うことが示唆されている<sup>50)</sup>。前述のように、20S CP 単独では、 $\alpha$  リングのゲートによって閉じられた状態である。基質を分解するためには、この 20S CP のゲートを開く必要があるが、これを RPT2, 3, 5 サブユニットの C 末端にある HbYX モチーフが担っていることが示されている<sup>51)</sup>。これらサブユニットの HbYX モチーフが 20S CP の  $\alpha$  リングにあるポケットに入りこむことによって、19S RP と 20S CP は会合し、ゲートのオープニングが可能となる。加えて、酵母の逆遺伝学的解析から RPT2 の ATPase 活性が生存に必須であり、もっとも 20S CP のゲートの開閉に寄与することが報告されている<sup>52)</sup>。これらの知見から、RPT2 はプロテアソームの制御に極めて重要な役割を担うと考えられる。

シロイヌナズナ RPT2 遺伝子は、*AtRPT2a* と *AtRPT2b* の二つのパラログ遺伝子からなる。これまでに、植物 RPT2 については多くの興味深い報告がなされている。植田らは、*AtRPT2a* 欠損変異体 (*rpt2a* 変異体) は根端分裂組織の静止中心の欠損を示し、根の成長が停止することを明らかにした。この結果から、RPT2a は根端分裂組織および茎頂分裂組織の維持に機能することが示唆された<sup>53)</sup>。また、*rpt2arpt2b* 二重変異体が致死性を示すことから、RPT2 は配偶子形成に必須であることも報告されている<sup>54)</sup>。さらに、RPT2a は、酸化ストレス応答<sup>55)</sup>や亜鉛欠乏応答<sup>56)</sup>にも関与することが報告されている。また、近年 RPT2a は CC-NBS-LRR タンパク質である UNI と相互作用し、UNI を活性化することで形態形成や免疫応答に関与する可能性が示唆されている<sup>57)</sup>。このように、植物 RPT2 は多様な表現型を示し、植物の生育に極めて重要な役割を果たしていることが示唆されている。

筆者らは RPT2 に着目し、その機能の解明を目的とした逆遺伝学的な解析を行った。RPT2 のノックアウト変異体を観察したところ、*rpt2a* 変異体のみが葉器官の巨大化を示し、*rpt2b* 変異体は巨大化を示さないことがわかった<sup>58)</sup>。表皮細胞の観察から、こうした *rpt2a* 変異体の器官の巨大化は、細胞サイズの増大に起因しており、細胞数は変化しないことが明らかになった。この細胞サイズの増大は、“エンドリデュプリケーション” とよばれる細胞質分裂を伴わない DNA 複製が過剰に促進したことが原因であった。さらに、発現解析の結果、*rpt2a* 変異体でみられたエンドリデュプリケーションの過剰促進は、DNA 複製因子の発現上昇が要因であることが示唆された。以上の結果から、*AtRPT2a* を構成因子にもつ 19S RP は、エンドリデュプリケーションを負に制御することで、細胞サイズを制御していることが示された (図 6)。

さらに、最近の筆者らの解析から、RPT2a が“遺伝子サイレンシング”を負に制御することが明らかになった。*rpt2a* 変異体背景の植物体を用いて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、*rpt2a* 変異体では、外生遺伝子のプロモーター領域が過剰に DNA メチル化されたため、遺伝子発現が抑制されたことが示された。また、*rpt2a* 変異体では、外生遺伝子のみならず、トランスポゾンも過剰な DNA メチル化を受けることが明らかになった。一方、パラログ分子である *rpt2b* 変異体では、このような DNA メチル化の促進はみられなかった。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、外生遺伝子ならびにゲノムの特定領域の DNA メチル化を負に制御することが示唆された。また、最近 Lee らによって、*rpt2a* 変異体がクロマチンアセンブリー因子である *CAF1* 欠損変異体とよく似た表現型を示すことから、26S

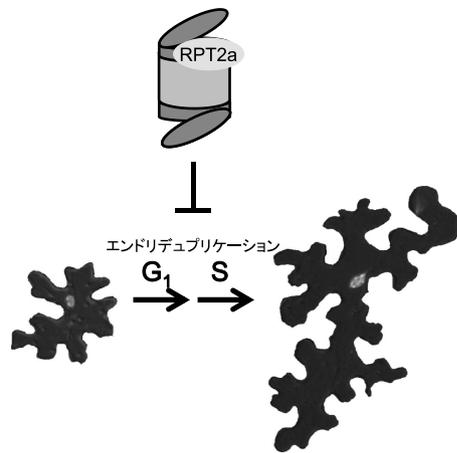


図6 RPT2aを構成因子にもつプロテアソームの機能

エンドリデュプリケーションは、M期をスキップしてG1、S期を繰り返し、DNA量を増大させる細胞周期である。DNA量の増大に比例して細胞サイズが増大することが知られている。筆者らの研究によって、RPT2aを構成因子にもつプロテアソームが、エンドリデュプリケーションを負に制御することで、細胞サイズ制御に機能することが明らかになった。

プロテアソームが、ヒストンH3のターンオーバーを制御し、クロマチン形成に参与する可能性が示唆されている<sup>59</sup>。これらの結果から、先に示したような *rpt2a* 変異体の多様な表現型は、クロマチン形成の異常によって、DNAメチル化やヒストン修飾などエピジェネティックな制御が変化したことによるのかもしれない。

酵母および哺乳類の研究から、19S RPが20S CPと独立して、ヒストンH3の4番目のリシンのメチル化修飾を正に制御することが報告されている<sup>60</sup>。このように、プロテアソームは分解による生命現象の制御のみならず、新規なメカニズムによって、エピジェネティック制御に機能している可能性が示唆されている。エピジェネティック制御は、塩基配列を変化させることなく、遺伝子機能を変化させる機構である。生物はエピジェネティック制御によって、ストレスなどの環境情報を記憶し適応していることがわかってきた。しかし、環境要因をどのように細胞記憶へと変換するかはよくわかっていない。一方、プロテアソームによるタンパク質分解は、シグナル伝達やストレス応答など素早い応答に利用されている。これらのことから、プロテアソームはタンパク質分解によって制御した一過的な環境情報を、分解以外の新たな機構によってエピジェネティックな情報に変換することにより、長期的な細胞記憶の構築に機能しているのかもしれない。26Sプロテアソームの機能解析がブレークスルーとなり、生物のもつ優れた環境適応能力の実態が明らかになることが期待される。

## 文 献

- 1) Smalle, J. & Vierstra, R.D. (2004) *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 555–590.
- 2) Lyzenga, W.J. & Stone, S.L. (2011) *J. Ex. Bot.*, **63**, 599–616.
- 3) Santner, A. & Estelle, M. (2010) *Plant J.*, **61**, 1029–1040.
- 4) Stone, S.L., Williams, L.A., Farmer, L.M., Vierstra, R.D., & Callis, J. (2006) *Plant Cell*, **18**, 3415–3428.
- 5) Liu, H. & Stone, S.L. (2010) *Plant Cell*, **22**, 2630–2641.
- 6) Miura, K., Lee, J., Jin, J.B., Yoo, C.Y., Miura, T., & Hasegawa, P.M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5418–5423.
- 7) Zhang, X., Garretton, V., & Chua, N.H. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 1532–1543.
- 8) Park, G.G., Park, J.J., Yoon, J., Yu, S.N., & An, G. (2010) *Plant Mol. Biol.*, **74**, 467–478.
- 9) Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L.P., et al. (2008) *Plant Cell*, **20**, 1693–1707.
- 10) Lee, H.K., Cho, S.K., Son, O., Xu, Z., Hwang, I., & Kim, W. T. (2009) *Plant Cell*, **21**, 622–641.
- 11) Dong, C., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q., & Zhu, J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8281–8286.
- 12) Serrano, M., Parra, S., Alcaraz, L.D., & Guzman, P. (2006) *J. Mol. Evol.*, **62**, 434–445.
- 13) Huang, Y.D., Li, C.Y., Pattison, D.L., Gray, W.M., Park, S., & Gibson, S.I. (2010) *Plant Physiol.*, **152**, 1889–1900.
- 14) Peng, M., Hannam, C., Gu, H., Bi, Y., & Rothstein, S.J. (2007) *Plant J.*, **50**, 320–337.
- 15) Peng, M.S., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H.L., et al. (2008) *J. Exp. Bot.*, **59**, 2933–2944.
- 16) Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Blasing, O. E., Hohne, M., et al. (2007) *Plant J.*, **49**, 463–491.
- 17) Trujillo, M. & Shirasu, K. (2010) *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 402–408.
- 18) Koiwai, H., Tagiri, A., Katoh, S., Katoh, E., Ichikawa, H., Minami, E., & Nishizawa, N. (2007) *Plant J.*, **51**, 92–104.
- 19) Salinas-Mondragón, R.E., Garcidueñas-Piña, C., & Guzmán, P. (1999) *Plant Mol. Biol.*, **40**, 579–590.
- 20) Lin, S.S., Martin, R., Mongrand, S., Vandenabeele, S., Chen, K.C., Jang, I.C., & Chua, N.H. (2008) *Plant J.*, **56**, 550–561.
- 21) Berrocal-Lobo, M., Stone, S., Yang, X., Antico, J., Callis, J., Ramonell, K.M., & Somerville, S. (2010) *PLoS One*, **24**, e14426.
- 22) Bu, Q., Li, H., Zhao, Q., et al. (2009) *Plant Physiol.*, **150**, 463–481.
- 23) Ko, J.H., Yang, S.H., & Han, K.H. (2006) *Plant J.*, **47**, 343–355.
- 24) Zhang, Y., Yang, C., Li, Y., Zheng, N., Chen, H., Zhao, Q., Gao, T., Guo, H., & Xie, Q. (2007) *Plant Cell*, **19**, 1912–1929.
- 25) Serrano, M., Parra, S., Alcaraz, L.D., & Guzmán, P. (2006) *J. Mol. Evol.*, **62**, 434–445.
- 26) Aguilar-Hernandez, V., Aguilar-Henonin, L., & Guzman, P. (2011) *PLoS One*, **6**, e23934.
- 27) Sato, T., Maekawa, S., Yasuda, S., Domeki, Y., Sueyoshi, K., Fujiwara, M., Fukao, Y., Goto, D.B., & Yamaguchi, J. (2011) *Plant J.*, **68**, 137–146.
- 28) Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., & Somerville, S. (2005) *Plant Physiol.*, **138**, 1027–1036.

- 29) Liu, H., Zhang, H., Yang, Y., Li, G., Yang, Y., Wang, X., Bannayake, B.M., Li, D., & Song, F. (2008) *Plant Mol. Biol.*, **68**, 17–30.
- 30) Morris, K., Thornber, S., Codrai, L., Richardson, C., Craig, A., Sadanandom, A., Thomas, B., & Jackson, S. (2010) *Plant Cell*, **22**, 1118–1128.
- 31) Martinez-Garcia, M., Garciduenas-Pina, C., & Guzman, P. (1996) *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 587–596.
- 32) Aguilar-Henonin, L., Bravo, J., & Guzman, P. (2006) *Curr. Genet.*, **50**, 257–268.
- 33) Coruzzi, G.M. & Zhou, L. (2001) *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 247–253.
- 34) Sato, T., Maekawa, S., Yasuda, S., & Yamaguchi, J. (2011) *Plant Signal Behav.*, **6**, 1465–1468.
- 35) Sato, T., Maekawa, S., Yasuda, S., Sonoda, Y., Katoh, E., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Goto, D.B., Ikeda, A., & Yamaguchi, J. (2009) *Plant J.*, **60**, 852–864.
- 36) Roberts, M.R. (2003) *Trends Plant Sci.*, **8**, 218–223.
- 37) Mackintosh, C. (2004) *Biochem. J.*, **381**, 329–342.
- 38) Chevalier, D., Morris, E.R., & Walker, J.C. (2009) *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 67–91.
- 39) Comparot, S., Lingiah, G., & Martin, T.J. (2003) *Exp. Bot.*, **54**, 595–604.
- 40) Voges, D., Zwickl, P., & Baumeister, W. (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 1015–1068.
- 41) Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., & Huber, R. (1997) *Nature*, **386**, 463–471.
- 42) van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., & Vierstra, R.D. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 6020–6028.
- 43) Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., & Dikic, I. (2008) *Nature*, **453**, 481–488.
- 44) Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, III, J.R., Koonin, E.V., & Deshaies, R.J. (2002) *Science*, **298**, 611–615.
- 45) Yao, T. & Cohen, R.E. (2002) *Nature*, **26**, 403–407.
- 46) Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T.J., Babiychuk, E., Kushnir, S., & Vierstra, R.D. (2003) *Plant Cell*, **15**, 965–980.
- 47) Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Babiychuk, E., Kushnir, S., Durski, A., & Vierstra, R.D. (2002) *Plant Cell*, **14**, 17–32.
- 48) Ryu, M.Y., Cho, S.K., & Kim, W.T. (2009) *Mol. Cells*, **28**, 375–382.
- 49) Jin, H., Li, S., & Villegas Jr, A. (2006) *Plant Physiol.*, **142**, 651–661.
- 50) Finley, D. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 477–513.
- 51) Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., & Goldberg, A.L. (2007) *Mol. Cell*, **7**, 731–744.
- 52) Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S., & Finley, D. (1998) *EMBO J.*, **17**, 4909–4919.
- 53) Ueda, M., Matsui, K., Ishiguro, S., Sano, R., Wada, T., Paponov, I., Palme, K., & Okada, K. (2004) *Development*, **131**, 2101–2111.
- 54) Ueda, M., Matsui, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Okada, K. (2011) *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1628–1640.
- 55) Kurepa, J., Toh-E, A., & Smalle, J.A. (2008) *Plant J.*, **53**, 102–114.
- 56) Sakamoto, T., Kamiya, T., Sako, K., Yamaguchi, J., Yamagami, M., & Fujiwara, T. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 561–567.
- 57) Chung, K. & Tasaka, M. (2011) *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1657–1664.
- 58) Sonoda, Y., Sako, K., Maki, Y., Yamazaki, N., Yamamoto, H., Ikeda, A., & Yamaguchi, J. (2009) *Plant J.*, **60**, 68–78.
- 59) Lee, K.H., Minami, A., Marshall, R.S., Book, A.J., Farmer, L. M., Walker, J.M., & Vierstra, R.D. (2011) *Plant Cell*, **23**, 4298–4317.
- 60) Weake, V.M. & Workman, J.L. (2008) *Mol. Cell*, **29**, 653–663.
-