

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

## プロテオーム解析から解く植物の ユビキチン-プロテアソーム研究

柳川 由紀

質量分析機を用いたプロテオーム解析はタンパク質の同定や修飾部位の決定のためのパワフルなツールである。ユビキチン(以下 Ub)-プロテアソーム系は植物の増殖分化・生長、環境ストレス応答など様々な機構に関与している。本稿では、Ub-プロテアソーム系の基質タンパク質、26S プロテアソームやその相互作用因子、26S プロテアソームのサブユニット修飾、Ub 様タンパク質 NEDD8/Rub 修飾について、主にプロテオーム解析を通して得られた知見について紹介する。植物は動くことができないので、因子を多様化することで環境ストレスに速やかに適応するすべを獲得してきた。本稿では、植物の Ub-プロテアソーム系の因子重複についても、植物の伸長生長や環境ストレス応答の面から解説する。

### 1. はじめに

ゲノムプロジェクトによって植物のゲノム情報の整備が進んだ今日、その情報を元にしたプロテオーム解析が植物の生命現象を理解する上でのパワフルな実験ツールとなってきた。近年の質量分析機の性能向上は、微量タンパク質の同定率を飛躍的に高めたばかりでなく、翻訳後修飾の解析の進歩にも大きく貢献している。

植物は一般的に因子重複が多く、ユビキチン(以下 Ub)-プロテアソーム系の制御因子やプロテアソームによって分解される基質タンパク質に関しても例外ではない。私たち動物は自然環境の変化に対して、足を使って動くという策略によって生存に適した空間へと移動することができる。しかし、植物はいったん根を張ると動くことができないの

で、その場で自然環境の変化に対応する必要がある。この環境変化への適応のために、植物は機能因子を多様化させて、種々の環境変化にいち早く対応して生存するすべを獲得したと考えられている。

本稿では主に網羅的なプロテオーム解析を中心に、タンパク質研究を通じた植物の Ub-プロテアソーム系について考察したい。さらに、Ub-プロテアソーム系を通じた植物の環境適応機構についても言及したい。

### 2. プロテオーム解析による Ub-プロテアソーム系の基質タンパク質

タンパク質の Ub 化は Ub 活性化酵素 (E1), Ub 結合酵素 (E2), Ub リガーゼ (E3) による連続的な酵素反応により行われ、さらに Ub 鎖の伸長活性を有する Ub 鎖伸長因子 (E4) を必要とする場合もある<sup>1)</sup>。タンパク質の Ub 修飾には、Ub が何個も連結するポリ Ub 化と単一の Ub で修飾されるモノ Ub 化がある。モノ Ub 化に関しては、分解を伴わないシグナルとして機能していると考えられているが、ポリ Ub 化は Ub 鎖の違いによりタンパク質分解へと進むものと分解へと進まないものがある。

Ub 化タンパク質をまとめて同定する方法として、質量分析機を用いたプロテオーム解析が有効である。この方法

独立行政法人 理化学研究所 横浜研究所 植物科学研究センター (〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22)

Understanding of Ub-proteasome pathway using proteomic approach in plants

Yuki Yanagawa (RIKEN Plant Science Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan)

を用いた Ub 化タンパク質の網羅的解析が多数報告されており、植物においてはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) とユリ (*Lilium longiflorum*) での報告がある<sup>2-6)</sup>。ここで興味深いことは、同じ植物種を用いた場合でも、使用した材料 (芽生え、培養細胞など) や精製・解析法の違いにより、同定された Ub 化タンパク質に相違が生じることである。使用した材料の違いとしては、シロイヌナズナの芽生えを用いた場合、培養細胞よりも代謝やストレス応答に関連した因子が高い割合で同定された<sup>2,4)</sup>。植物個体では培養細胞に比べてより環境要因に対する応答を必要とするため、環境ストレス応答のために代謝やストレス応答因子の Ub 化制御が活発化したことが高い同定率につながった可能性が高い。

Ub 化タンパク質の網羅的同定のためには、Ub 化タンパク質を濃縮、つまり精製する必要がある。この精製方法の相違がまた同定される Ub 化タンパク質の種類に影響を与える。ポリ Ub 化には、Ub が有する七つのリジン残基、あるいは N 末端のメチオニン残基を介したペプチド結合によって Ub 化のバリエーションが生まれる (図 1)。この鎖の違いが基質タンパク質のその後の運命を決定づけると考えられており、これまでのところ K11, K29, K48, K63 によるポリ Ub 鎖がタンパク質分解シグナルになることが報告されている<sup>1,7-9)</sup>。植物を用いた Ub 化タンパク質のプロテオーム解析では、Ub 結合領域を用いたアフィニティー精製<sup>2,3,5)</sup>、ヒスチジンタグを利用したアフィニティー精製<sup>5)</sup>、抗 Ub 抗体を用いたアフィニティー精製<sup>4,6)</sup>、の報告がある。それぞれ Ub 化タンパク質に対する選択性があり、特に Ub 結合領域に関してはイソペプチダーゼホ

モログ ATUBP14 の Ub associating domain (ISO) と 26S プロテアソームのサブユニット RPN10 の Ub interacting motif (UIM) を比較したところ、ISO は K33 を介した Ub 鎖に対して特異性が高いが、UIM では K11 を介した Ub 鎖に対して特異性が高い<sup>2)</sup>。また、抗 Ub 抗体に関しては、Ub 化タンパク質に特異性があり、遊離の Ub を認識しない FK2 (コスモバイオ社)、ポリ Ub 鎖のみを認識する FK1 (BIOMOL 社)、K48 を介した Ub 鎖のみを認識する Apu2 (ミリポア社)、K63 鎖のみを認識する Apu3 (ミリポア社) など、種々のものが市販されている。これらの精製手法の使い分けによって、Ub 鎖の種類と基質タンパク質との関係性について解明が進むと期待される。

Cullin-Ring 型 E3 である SCF は Skp1, Cullin, F-box タンパク質から構成される (本特集の松井の項 (pp. 432-439) 参照)。Arabidopsis Skp1 Homologue 1 (ASK1) の変異体 *ask1* 変異体と野生型の花芽タンパク質を二次元電気泳動で比較すると、*ask1* 変異体で光応答因子、代謝関連因子、ストレス応答因子などのタンパク質が蓄積した<sup>10)</sup>。ASK1 は種々の F-box タンパク質を含む Cullin-Ring 型 E3 を構成するが、特に F-box タンパク質 Unusual Floral Organs (UFO) は SCF<sup>UFO</sup> として花成制御に関与している<sup>11)</sup>。*ask1* 変異体の植物体では野生型と比べてサイズが小さく、花卉や萼については数と大きさが減少するので<sup>12,13)</sup>、*ask1* 変異体で蓄積した光応答因子、代謝関連因子、ストレス応答因子などのタンパク質は SCF<sup>UFO</sup> などの花成に関わる Cullin-Ring 型 E3 によって分解制御を受けているのかもしれない。ジャスモン酸は植物の病傷害応答、種子発芽・生長に関わる植物ホルモンであり、F-box タンパク質 Coronative

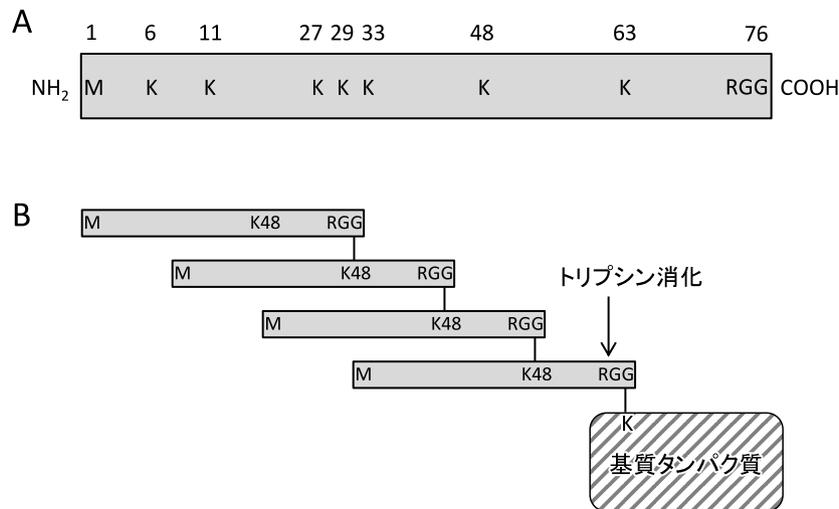


図 1 Ub タンパク質とトリプシン消化部位

(A) Ub の七つのリジン残基と N 末端のメチオニン残基を介して基質タンパク質が Ub 化される。(B) K48 を介した基質タンパク質のポリ Ub 化モデル。Ub の C 末端配列は RGG であるため、トリプシン消化すると GG が付加された基質タンパク質断片が生じる。質量分析機でこの断片を識別することにより Ub 化部位を同定できる。

Insentive 1 (COI1) はジャスモン酸のシグナル伝達を制御する<sup>14,15)</sup>。シロイヌナズナ *coi1-1* 変異体では雄しべが短く、葯が割れて開き、鞘が小さい表現系を示すことから、COI1 は雄性稔性に関与する。シロイヌナズナ *coi1-1* 変異体と野生型の花芽タンパク質を二次元電気泳動で比較すると、代謝関連因子やストレス応答に関わる因子のタンパク質量が変動することが明らかになった<sup>16)</sup>。COI1 は SCF<sup>COI1</sup> として機能するので、これらの因子の SCF<sup>COI1</sup> による量的制御が雄性稔性に必要なのかもしれない。

MG132 は 20S プロテアソームの活性サブユニットを可逆的に阻害するプロテアソーム阻害剤であり、MG132 処理したサンプルでは 26S プロテアソームの基質タンパク質の分解が阻害される。ダイズ芽生えタンパク質を MG132 処理した後、二次元電気泳動で比較すると、MG132 処理の有無でタンパク質量の変動が見られた<sup>17)</sup>。MG132 処理で分解阻害されたタンパク質としてはアルキルヒドロペルオキシド還元酵素が興味深い。アルキルヒドロペルオキシド還元酵素は酸化ストレスに応答し、生体内で発生する過酸化水素を除去するアンチオキシダントである。動物細胞を用いたプロテオーム解析によって、アンチオキシダントであるチオレドキシシン 3 が Cul4B RNAi line で蓄積することが明らかになった<sup>18)</sup>。このチオレドキシシン 3 は Cul4B-Ring 型 E3 のターゲットであり、DDB1-Cul4B-Roc1 複合体がチオレドキシシン 3 の Ub-プロテアソーム依存的な分解に必須である。Cul4B-Ring 型 E3 が活性酸素種に応答し、アンチオキシダントの Ub 化を担うと考えると、ダイズのアルキルヒドロペルオキシド還元酵素も Cul4-Ring 型 E3 によって Ub 化されて、26S プロテアソームによって分解されるのかもしれない。

### 3. 植物プロテアソームとその相互作用因子

シロイヌナズナ、イネ (*Oryza sativa*)、ダイズ (*Glycine max*) などのゲノム情報は植物の 26S プロテアソームサブユニットの多くにパラログの存在を示している。実際に、精製 26S プロテアソームを解析することにより、26S プロテアソームサブユニットにはパラログ (遺伝子重複によってできた類似遺伝子) が含まれていることが明らかになった<sup>19~21)</sup>。シロイヌナズナの RPT2a と RPT2b は 3 アミノ酸しか異なっていないにもかかわらず、*rpt2a* 変異体のみで細胞の核内倍加が促進し、葉面積の拡大が起こる<sup>22,23)</sup>。さらに、RPT2a は根端分裂組織の維持に必要であるが、RPT2b は必ずしも必要としない<sup>24)</sup>。また、RPT2a と RPT5a は亜鉛欠乏時に蓄積する Ub 化タンパク質の分解制御に関わるが、RPT2b と RPT5a は関与しない<sup>25)</sup>。このように 26S プロテアソームサブユニットのパラログが異なる生理機能に関わっているため、植物ではパラログの組み合わせによる多様な 26S プロテアソームが存在すると予測され、今

後の解析が期待される。

イネの 26S プロテアソームのプロテオーム解析により、RPT2 は *N*-ミリスチル化されていることが明らかになった<sup>19)</sup>。*N*-ミリスチル化によってタンパク質の疎水性が高まり、細胞膜への親和性が向上するため、*N*-ミリスチル化はタンパク質の輸送、タンパク質-脂質間相互作用、タンパク質-タンパク質間相互作用を促進させる効果がある。RPT2 の *N*-ミリスチル化は酵母や動物でも保存されているので<sup>26,27)</sup>、RPT2a のミリスチル化は 26S プロテアソームのターゲティングなどの重要な機能に関わっていると推測される。さらなる *N* 末端修飾としては *N*-アセチル化が興味深い。シロイヌナズナの芽生え由来の 26S プロテアソームは  $\alpha$ 5a-b,  $\alpha$ 6a-b,  $\beta$ 4a-b, RPN2a-b, RPN7, RPN8a-b, RPN12a が *N*-アセチル化されているが<sup>21)</sup>、米糠由来の 26S プロテアソームでは RPT6 のみが *N*-アセチル化されている<sup>19)</sup>。酵母の *N*-アセチル基転移酵素の欠失変異体では野生株と比べて 26S プロテアソームのキモトリプシン様活性が高いことから、26S プロテアソームサブユニットの *N*-アセチル化がキモトリプシン様活性に影響を及ぼすと考えられている<sup>28)</sup>。植物種によって *N*-アセチル化されるサブユニットが異なるので、26S プロテアソームの活性制御機構が植物種で違うのかもしれない。あるいは、植物の生理状態や組織の違いがサブユニットの *N*-アセチル化状態の相違をもたらし、このことが 26S プロテアソームのキモトリプシン様活性制御に貢献している可能性もある。

シロイヌナズナ芽生えを材料として、20S プロテアソーム  $\alpha$  サブユニット PAG1 を用いたアフィニティー精製を行ったところ、26S プロテアソームの構成サブユニットだけでなく、Proteasome activator (PA) 200 と相同性のあるホモログも同定された<sup>21)</sup>。さらに、この PA200 を含む複合体を解析したところ、PA200 は 20S プロテアソームと複合体を形成しているが、その複合体中に Regulatory particle (RP) は検出されなかった。また、*pa200* 変異体は種々の光条件、アミノ酸アナログ処理、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理で、野生型と比べて表現型の相違はなく、Ub の蓄積もなかったことから、PA200 は Ub 非依存的なタンパク質分解に関わっている可能性が示唆されている。動物の PA200 は DNA 損傷に応答して RP を含むハイブリッドプロテアソーム (PA200-20S-RP) を形成し、ゲノムの安定性を維持する役割があるので<sup>29)</sup>、植物でも類似の応答機構に関わるハイブリッドプロテアソームが存在するのかが、今後の解析が期待される。

PAG1 を用いたアフィニティー精製より、PA200 の他にも 26S プロテアソームと相互作用する因子が同定された。動物の PAC2 は 20S プロテアソームの分子会合に必要なシャペロンであり<sup>30)</sup>、シロイヌナズナ 26S プロテアソーム

の相互作用因子として PAC2 の植物ホモログ PBAC2 が同定された。PAC2 は PAC1 とヘテロ 2 量体を形成して機能するが、シロイヌナズナゲノムは PAC1 と相溶性の高い因子を有していない (TAIR; <http://www.arabidopsis.org/>)。さらに、動物では PAC3/PAC4 ヘテロ 2 量体も 20S プロテアソームの分子会合シャペロンとして機能しているが<sup>31)</sup>、シロイヌナズナゲノムには PAC3 のみ確認された。また、出芽酵母では PAC3/PAC4 と機能的に類似の Dmp1/Dmp2 が存在しているが<sup>32)</sup>、シロイヌナズナゲノムにはこれら因子と相溶性の高い因子も見つからない。このような植物 20S プロテアソームの分子会合因子の相違は興味深い。

#### 4. タンパク質の NEDD8/Rub 化と脱 NEDD8/Rub 化

Ub プロテアソーム系の制御因子として、Ub 様タンパク質である Neural Precursor Cell-Expressed Developmentally Down Regulated Protein 8 (NEDD8) が知られている。この NEDD8 は Cullin-Ring 型 E3 の活性を制御する因子であり、Cullin タンパク質に NEDD8 が会合すると Cullin-Ring 型 E3 の活性が高まり、逆に解離すると活性が低下する。植物 NEDD8 ホモログは Related to Ubiquitin (Rub) と呼ばれ、シロイヌナズナでは Rub1-3 が存在しており、特に Rub1 について最も解析が進んでいる。Cullin ファミリーの NEDD8 化は NEDD8 特異的な E1, E2, E3 カスケードを介して行われ、基質の Ub 化の役目を終えた Cullin-Ring

型 E3 からの脱 NEDD8 化は COP9 (Constitutive Photomorphogenesis 9) シグナロソーム (CSN) によってなされる<sup>33)</sup> (図 2)。CSN は元々シロイヌナズナの光形態形成を制御する因子として発見されたが、のちに動物でも保存されていることが明らかになった<sup>34)</sup>。CSN は 8 種類のサブユニット CSN1-8 から構成されており、CSN5 が脱 NEDD8 化活性を有している。さらに、動物では CSN が脱 NEDD8 化だけでなく、NEDD8 化された Cullin-Ring 型 E3 と Ub 化タンパク質を解離する過程にも作用するので、植物 CSN も同様に Rub 化 Cullin-Ring 型 E3 と Ub 化タンパク質を解離する機能を有していると考えられる。

プロテオーム解析により、シロイヌナズナの Rub1 化タンパク質とその相互作用因子が明らかになった<sup>35)</sup>。シロイヌナズナは Cullins 1-4 を有しているが、StrepII-HA-Rub1 を用いたアフィニティー精製産物からこれら Cullin ファミリーが同定された。さらに、NEDD8 化因子 (AXR1, ECR1, AXL) や Ub 系の E1, E2 および ASK ファミリー、RBX1, F-box タンパク質などの Cullin-Ring 型 E3 の構成因子、26S プロテアソームのサブユニットも多数同定された。Cullin-Ring 型 E3 としては、植物ホルモン応答に関与する SCF 複合体 (SCF<sup>COI</sup> と SCF<sup>TIR1</sup>) の構成因子が同定された。前述したように SCF<sup>COI</sup> はジャスモン酸シグナルを制御する。また、F-box タンパク質 Transport Inhibitor Response 1 (TIR1) は植物の成長・生育に必要な植物ホルモ

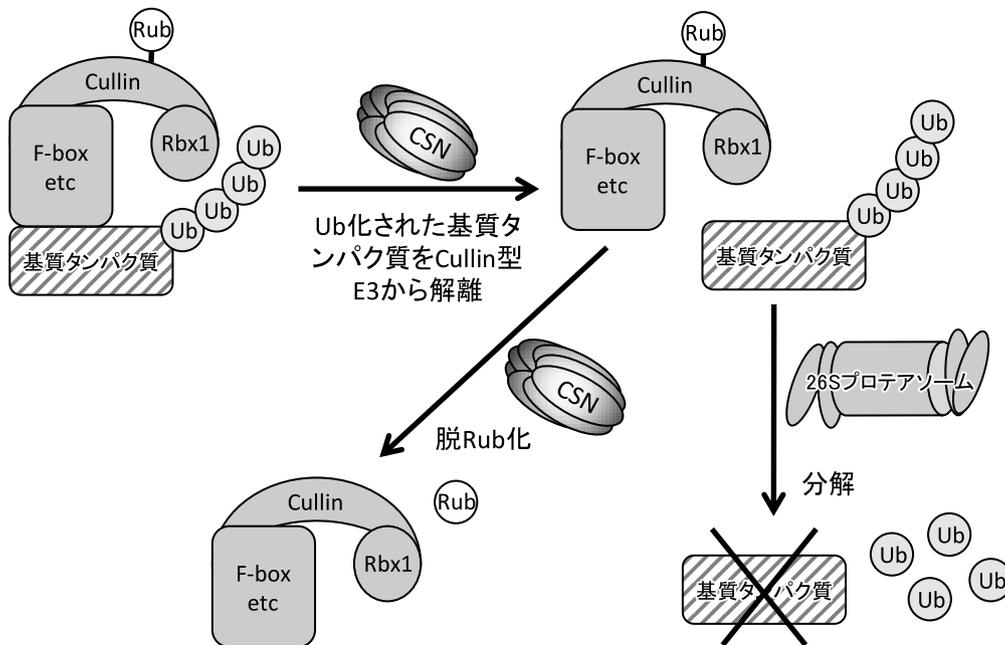


図2 COP9 シグナロソーム (CSN) の機能モデル

Rub 化された Cullin-RING 型 E3 によって基質タンパク質が Ub 化される。動物では CSN が NEDD8 化された Cullin-RING 型 E3 と Ub 化タンパク質を解離するので、植物でも CSN が Cullin-RING 型 E3 から Ub 化タンパク質を解離すると考えられる。Cullin-RING 型 E3 から解離した Ub 化タンパク質は速やかに 26S プロテアソームにトラップされ、分解へと進む。CSN は役目を終えた Cullin-RING 型 E3 から Rub を解離する。

ンであるオーキシンの受容体であり, Aux/IAA 転写抑制因子の分解を制御する<sup>36)</sup>. これらの既知の Rub 化制御関連因子の他に, ヒートショックタンパク質などのシャペロン, 翻訳因子, プロテアーゼ, 14-3-3 タンパク質などのシグナル伝達因子, 代謝酵素などのタンパク質も同定された. シロイヌナズナの C/N バランスに関わる E3 は Ub-プロテアソームによる 14-3-3 タンパク質の分解を制御する<sup>37)</sup>. ヒト細胞では CSN が 14-3-3 $\sigma$  タンパク質の Ub-プロテアソーム依存的な分解を促進する<sup>38)</sup>. シロイヌナズナを用いた Rub1 プロテオームによって 14-3-3 タンパク質が同定されたこと, さらには CSN が脱 Rub 化機能を有していることから, 植物の 14-3-3 タンパク質の制御に CSN による脱 Rub1 化が関わっているのか, 興味深いところである. 代謝酵素としては, 炭酸脱水素酵素, カタラーゼ, 解糖系に関わるエノラーゼなどが同定された. これらは SCF などの Ub 化に関わる因子により制御されるタンパク質として, 共精製されたのかもしれない. あるいは, 動物では Cullin ファミリーだけでなく腫瘍抑制因子 p53<sup>39)</sup>や上皮成長因子受容体 EGFR<sup>40)</sup>なども NEDD8 化されるので, 同定された代謝酵素は Rub1 化される因子である可能性もある. いずれにせよ, これらのタンパク質は Rub1 化/脱 Rub1 化によって制御されると予測されるので, 今後の解析に期待したい. このように Rub1 プロテオーム解析によって既知の Rub1 制御因子以外のタンパク質も同定されたので, Rub1 が制御していると予測される機構は多数あると予測される. にもかかわらず, *rub1* 変異体は野生型の表現系を示す<sup>41)</sup>. Cullin1 は Rub1 だけでなく Rub2 とも相互作用し, *rub1 rub2* 二重変異体では種子が発芽しないことから, Rub1 と Rub2 は機能重複していると考えられる. Rub ファミリーの存在は何を意味しているのか, Rub1-3 に機能分担はあるのか, を明らかにするのは今後の課題である.

## 5. 植物の伸長生長, ストレス応答における Ub-プロテアソーム研究

植物ホルモンは植物によって生産され, 植物の生理調節を制御する物質のことである. 植物の伸長成長はオーキシン, ジベレリン, サイトカイニンなどの種々の植物ホルモンによって制御されており, 種々の植物ホルモンシグナル伝達が Ub-プロテアソーム系によって制御されている. 前述したオーキシンだけでなく, ジベレリンシグナルも植物の生長を促進するが, 植物の生長を抑制する DELLA タンパク質がポリ Ub 化されて分解されることがこのシグナルの鍵となる<sup>42)</sup>. サイトカイニンは植物の生長・分化に関わるが, RPN12a の RNAi line ではサイトカイニン伝達系を負に制御する因子 Arabidopsis Response Regulator (ARR) の発現が低下することが報告された<sup>43)</sup>. アブシジン酸 (ABA)

は種子の成熟, 休眠, 発芽の抑制などを誘導する植物ホルモンであるが, 乾燥や冠水などの水ストレス応答への耐性にも関与していることが知られている. 近年, ABA と Ub-プロテアソーム系との関わりについて解析が進んでおり, シロイヌナズナ E3 である RHA2a や AtPUB19 の変異体では ABA 応答性が変わることが明らかになった<sup>44,45)</sup>. さらに, プロテオーム解析により, 草エンドウ (*Lathyrus sativus*) を ABA 処理すると, 20S プロテアソームの  $\alpha$  サブユニットタンパク質が増加した<sup>46)</sup>. また, シクラメン胚のプロテオーム解析により, ABA 処理が Ub タンパク質の低下をもたらすことも明らかになった<sup>47)</sup>.

乾燥ストレス応答における ABA と Ub-プロテアソーム系の関わりについて解析が進んでおり, 多数の E3 が乾燥ストレス応答因子として報告されている. シロイヌナズナの E3 である AtAIRP2 は乾燥ストレスで誘導される因子であり, AtAIRP2 の過剰発現体では ABA 依存的に気孔の閉鎖が促進される<sup>48)</sup>. 気孔は植物の表皮細胞にあり, 光合成や呼吸のための気体交換を行うだけでなく, 蒸散による大気への水蒸気の放出を行う. そのため, 植物が水不足に陥った際には気孔を閉じることで蒸散を抑えている. EDL3 はシロイヌナズナの F-box タンパク質の一つであり, ASK1, 2, 4, 11, 13, 18 と相互作用する<sup>49)</sup>. EDL3 プロモーター活性が乾燥ストレスや塩ストレスで誘導されるので, EDL3 は SCF<sup>EDL3</sup> として ABA シグナルを負に制御する因子の分解に関与していると推測される. シロイヌナズナの U-box E3 である PUB19 もまた ABA 応答を負に制御する因子である. *pub19* を抑制した植物体では ABA 感受性が高まり, 気孔の閉鎖が促進されることから, PUB19 は ABA 依存的に乾燥ストレスを負に制御している<sup>45)</sup>.

乾燥とは逆に冠水ストレスについても Ub-プロテアソーム系の関与がプロテオーム解析によって明らかになった. 冠水ストレスを受けたダイズでは Ub 化制御因子や 26S プロテアソームのサブユニットの量的変動が起こる<sup>50)</sup>. さらに, 冠水ストレスにさらされた根では Ub 化タンパク質量が減少し, それと連動して Ub 化制御因子である CSN のサブユニットタンパク質が蓄積する<sup>17)</sup>. 冠水ストレスには水ストレスだけでなく, 嫌気状態による影響も含まれる<sup>51)</sup>. ABA 処理するとアルコール脱水素酵素が誘導され, 嫌気ストレスに対する耐性が高まる. ダイズの RING 型 E3 である *GmRFP1* が ABA によって誘導されるので, *GmRFP1* による Ub 化制御が冠水ストレスによるアルコール脱水素酵素の蓄積をもたらすのかもしれない. あるいは, 前述した ABA シグナルに関わる AIRP2 や EDL3 などの因子も冠水ストレス応答に関わっている可能性もある.

植物の正常な生育には窒素やカリウムなどの多量元素だけでなく, 鉄, マンガン, 銅, ホウ素などの微量元素を栄養素として必要とする. しかし, これらの微量元素を過剰

に摂取すると植物の生育に悪影響が及ぶため、植物は微量元素量を制御する機構を発達させた。鉄は根の原形質膜上に局在する鉄トランスポーター IRT1 を介して土壌から取り込まれる。IRT1 は液胞内酵素で分解されることで量的制御を受けており、IRT1 の量的制御によって生体内への鉄の取り込みが調節されている。この IRT1 がモノ Ub 化されることが IRT1 の原形質膜から液胞への輸送に必須である<sup>52)</sup>。液胞は動物のリソソームに相当する機能を有しており、液胞へと輸送された IRT1 は液胞内酵素によって分解される。ホウ素も原形質膜上のホウ素トランスポーター BOR1 によって根から取り込まれる。このホウ素に関して鉄と類似した量的制御機構が存在し、ホウ素が高濃度に存在すると、BOR1 に一つあるいは二つの Ub が付加され、その Ub 化がシグナルとなって BOR1 がエンドソーム経路を介して液胞へと輸送され、液胞内酵素で分解される<sup>53)</sup>。

重金属によって土壌が汚染されると、そこに生育する植物は根から重金属を吸収することで生育阻害等の重大な被害を受ける。カドミウム処理されたシロイヌナズナ培養細胞を用いてプロテオーム解析すると、E1, E2, E3 タンパク質、さらに 20S プロテアソームの  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニット、RPT2a, RPN6 タンパク質が増加した<sup>54)</sup>。また、マメ科植物であるタルウマゴヤシをカドミウム処理すると、RPT2 タンパク質が蓄積した<sup>55)</sup>。このように重金属処理によって Ub-プロテアソーム系の因子が量的に変化するので、植物の重金属ストレス応答に Ub-プロテアソーム系が関与している可能性が高い。

## 6. 終わりに

プロテオーム解析はデータベースの充実度が鍵となるため、現在のところはデータベースが充実しているシロイヌナズナやイネなどのモデル植物を用いた研究が主要であるが、コムギ、ダイズ、トマト、ポプラなど種々の植物のゲノム情報が整備されてきていることから、今後は作物や園芸植物の研究分野でもプロテオーム解析が利用されると期待される。陸上植物は、非維管束植物かつ生殖細胞が孢子であるコケ植物、維管束植物であるが生殖細胞が孢子であるシダ植物、胚珠がむき出しの種子を持つ裸子植物（ソテツ、イチヨウ、マツなど）、胚珠が子房に包まれている種子を持つ被子植物に分類できる。さらに、被子植物はイネ、コムギ、ユリなどの単子葉植物とシロイヌナズナ、ダイズ、ポプラなどの双子葉植物とに分類される。このように植物は非常にバラエティーに富んだ形態や生活環を有していることから、植物種特異的な形態形成やストレス応答機構が存在する。今後多くの植物データベースが充実すると予想されるので、プロテオーム解析を通して Ub-プロテアソーム系が各植物種に特異的な形態形成やストレス応答にどのように関わっているかを明らかにできると期待する。

## 文 献

- 1) Koegle, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T. U., & Jentsch, S. (1999) *Cell*, **96**, 635–644.
- 2) Maor, R., Jones, A., Nühse, T.S., Studholme, D.J., Peck, S.C., & Shirasu, K. (2007) *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 601–610.
- 3) Manzano, C., Abraham, Z., López-Torrejón, G., & Del Pozo, J. C. (2008) *Plant Mol. Biol.*, **68**, 145–158.
- 4) Igawa, T., Fujiwara, M., Takahashi, H., Sawasaki, T., Endo, Y., Seki, M., Shinozaki, K., Fukao, Y., & Yanagawa, Y. (2009) *J. Exp. Bot.*, **60**, 3067–3073.
- 5) Saracco, S.A., Hansson, M., Scalf, M., Walker, J.M., Smith, L. M., & Vierstra, R.D. (2009) *Plant J.*, **59**, 344–358.
- 6) Igawa, T., Fujiwara, M., Tanaka, I., Fukao, Y., & Yanagawa, Y. (2010) *BMC Plant Biol.*, **10**, 200.
- 7) Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C.M. (2000) *EMBO J.*, **19**, 94–102.
- 8) Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., & Rape, M. (2008) *Cell*, **133**, 653–665.
- 9) Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., & Tanaka, K. (2009) *EMBO J.*, **28**, 359–371.
- 10) Wang, X., Ni, W., Ge, X., Zhang, J., Ma, H., & Cao, K. (2006) *Cell Res.*, **16**, 489–498.
- 11) Wang, X., Feng, S., Nakayama, N., Crosby, W.L., Irishi, V., Deng, X.W., & Wei, N. (2003) *Plant Cell*, **15**, 1071–1082.
- 12) Yang, M., Hu, Y., Lodhi, M., McCombie, W.R., & Ma, H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11416–11421.
- 13) Zhao, D., Yang, M., Solava, J., & Ma, H. (1999) *Dev. Genet.*, **25**, 209–223.
- 14) Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., & Turner, J.G. (2002) *Plant J.*, **32**, 457–466.
- 15) Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., & Xie, D. (2002) *Plant Cell*, **14**, 1919–1935.
- 16) Chua, L., Shan, X., Wang, J., Zhang, G., & Xie, D. (2010) *J. Int. Plant Biol.*, **52**, 410–419.
- 17) Yanagawa, Y. & Komatsu, S. (2012) *Plant Sci.*, **185**–186, 250–258.
- 18) Li, X., Lu, D., He, F., Zhou, H., Liu, Q., Wang, Y., Sha, C., & Gong, Y. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 32344–32354.
- 19) Shibahara, T., Kawasaki, H., & Hirano, H. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1474–1483.
- 20) Yang, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C.M., Smalle, J., Ju, Y.-M., & Vierstra, R.D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 6401–6413.
- 21) Book, A.J., Gladman, N.P., Lee, S.S., Scalf, M., Smith, L.M., & Vierstra, R.D. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 25554–25569.
- 22) Sonoda, Y., Sako, K., Maki, Y., Yamazaki, N., Yamamoto, H., Ikeda, A., & Yamaguchi, J. (2009) *Plant J.*, **60**, 68–78.
- 23) Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., Zaitlin, D., Pierce, A.J., & Smalle, J.A. (2009) *Plant Physiol.*, **150**, 178–189.
- 24) 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.
- 25) Sakamoto, T., Kamiya, T., Sako, K., Yamaguchi, J., Yamagami, M., & Fujiwara, T. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 561–567.
- 26) Gomes, A.V., Zong, C., Edmondson, R.D., Li, X., Stefani, E., Zhang, J., Jones, R.C., Thyparambil, S., Wang, G.-W., Qiao, X., Bardag-Gorce, F., & Ping, P. (2006) *Circ. Res.*, **99**, 362–

- 371.
- 27) Kimura, Y., Saeki, Y., Yokosawa, H., Polevoda, B., Sherman, F., & Hirano, H. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.*, **409**, 341–348.
- 28) Kimura, Y., Takaoka, M., Tanaka, S., Sassa, H., Tanaka, K., Polevoda, B., Sherman, F., & Hirano, H. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4635–4639.
- 29) Blickwedehl, J., Agarwal, M., Seong, C., Pandita, R.K., Melendy, T., Sung, P., Pandita, T.K., & Bangia, N. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16165–16170.
- 30) Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Lemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., & Murata, S. (2005) *Nature*, **437**, 1381–1385.
- 31) Hirano, Y., Hayashi, H., Lemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., & Murata, S. (2006) *Mol. Cell*, **24**, 977–984.
- 32) Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., & Tanaka, K. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 228–236.
- 33) Miyauchi, Y., Kato, M., Tokunaga, F., & Iwai, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 16622–16631.
- 34) Schwechheimer, C. & Isono, E. (2010) *Eur. J. Cell Biol.*, **89**, 157–162.
- 35) Hakenjos, J.P., Richter, R., Dohmann, E.M., Katsiarmpa, A., Isono, E., & Schwechheimer, C. (2011) *Plant Physiol.*, **156**, 527–536.
- 36) Maraschin, F.S., Memelink, J., & Offringa, R. (2009) *Plant J.*, **59**, 100–109.
- 37) 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.
- 38) Choi, H.H., Gully, C., Su, C-H., Velazquez-Torres, G., Chou, P-C., Tseng, C., Zhao, R., Phan, L., Shaiken, T., Chen, J., Yeung, S.C., & Lee, M-H. (2011) *Oncogene*, **30**, 4791–4801.
- 39) Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J-C., Hay, R.T., & Lane, D.P. (2004) *Cell*, **118**, 83–97.
- 40) Oved, S., Mosesson, Y., Zwang, Y., Santonlco, E., Shtlegman, K., Marmor, M.D., Kochupurakkal, B.S., Katz, M., Lavi, S., Cesarenl, G., & Yarden, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 21640–21651.
- 41) Bostick, M., Lochhead, S.R., Honda, A., Palmer, S., & Callis, J. (2004) *Plant Cell*, **16**, 2418–2432.
- 42) Wang, F. & Deng, X.W. (2011) *Cell Res.*, **21**, 1286–1294.
- 43) Ryu, M.Y., Cho, S.K., & Kim, W.T. (2009) *Mol. Cells*, **28**, 375–382.
- 44) Bu, Q., Li, H., Zhao, Q., Jiang, H., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q., Wang, D., & Li, C. (2009) *Plant Physiol.*, **150**, 463–481.
- 45) Liu, Y-C., Wu, Y-R., Huang, X-H., Sun, J., & Xie, Q. (2011) *Mol. Plant*, **4**, 938–946.
- 46) Chattopadhyay, A., Subba, P., Pandey, A., Bhushan, D., Kumar, R., Datta, A., Chakraborty, S., & Chakraborty, N. (2011) *Phytochemistry*, **72**, 1293–1307.
- 47) Rode, C., Lindhorst, K., Braun, H-P., & Winkelmann, T. (2011) *Planta*, (on line).
- 48) Cho, S.K., Ryu, M.Y., Seo, D.H., Kang, B.G., & Kim, W.T. (2011) *Plant Physiol.*, **157**, 2240–2257.
- 49) Koops, P., Pelsler, S., Ignatz, M., Klose, C., Marrocco-Selden, K., & Kretsch, T. (2011) *J. Exp. Bot.*, **62**, 5547–5560.
- 50) Nanjo, Y., Skultety, L., Ashraf, Y., & Komatsu, S. (2010) *J. Proteome Res.*, **9**, 3989–4002.
- 51) Komatsu, S., Hiraga, S., & Yanagawa, Y. (2012) *J. Proteome Res.*, **11**, 68–78.
- 52) Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conéjéro, G., Curie, C., Friml, J., & Vert, G. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, E450–E458.
- 53) Kasai, K., Takano, J., Miwa, K., Toyoda, A., & Fujiwara, T. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 6175–6183.
- 54) Sarry, J-E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J.B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J., & Bourguignon, J. (2006) *Proteomics*, **6**, 2180–2198.
- 55) Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F., Valot, B., Gianinazzi-Pearson, V., Aschi-Smiti, S., & Dumas-Gaudot, E. (2009) *Proteomics*, **9**, 420–433.
-