

栄養ストレスに応じた植物細胞内リン酸化シグナルダイナミクスを網羅的に解明

近年、私たちの社会生活においてもビッグデータの有用性が高まっています。これは、グローバルかつ大容量のデータを取得・蓄積するシステムやデータ解析プログラムの発展によるものです。こうしたビッグデータは医療や経済活動で幅広く活用されてきています。

私達は、国内および海外の研究者らとの協力しながら、こうしたビッグデータ解析を駆使することで、生命を支える複雑な細胞内システムを包括的に理解する取組みを始めています。その1つとして、植物がどのようにして多様な環境情報を理解・統合し、生存しているのかという問いに答える研究を行っています。植物は動くことができないため、自らが生きる野外フィールドでの環境条件（温度、光、栄養、病原体感染等）を認識し、細胞内の代謝状態を巧みに制御し、個体としての生存を達成しています。

真核生物の細胞内において、タンパク質のリン酸化修飾は、細胞内シグナル伝達系の分子スイッチとして重要な役割を果たします。実際に、これまでに私達の研究からも、植物の栄養シグナル伝達に関与する鍵因子としてリン酸化酵素（キナーゼ）やその標的タンパク質が発見されています。その一方で、数千を超える細胞内のタンパク質を対象としてグローバルなリン酸化シグナル変動の実態を把握することは、これまでの個別遺伝子の機能解析だけでは困難であり、未知のものでした。

本研究では、こうした細胞内のリン酸化シグナルダイナミクスを網羅的に解析し、重要な代謝物の変動や遺伝子発現解析と結びつけることで、これまで未知であった細胞内の栄養応答シグナル伝達ネットワークの全体像を理解することに成功しました。

具体的には、今回私達は、生物に必須の栄養素である糖（炭素、C）と窒素（N）のバランス「C/N バランス」に着目して、この栄養バランスの乱れにより起こるストレスに応答した細胞内リン酸化ダイナミクスを網羅的に解析しました。モデル植物であるシロイヌナズナを材料に使うこともこうした研究を行う上で利点となります。先端的なマスマスプロトリー装置を用いたリン酸化プロテオーム解析という手法を活用することで、細胞内のリン酸化シグナルの網羅的な検出と定量的な比較解析が可能となりました。

その結果、1,785 のリン酸化ペプチドを検出し、193 個のタンパク質のリン酸化レベルがC/N バランスに応じて変化していることが分かりました。その中には、糖や窒素代謝制御に関わる代謝酵素群や輸送体、タンパク質合成（翻訳）関連因子が含まれており、物質代謝レベルでの栄養ストレス適応の全体像が見えてきました。そして、これに加えて、転写因子やキナーゼといった多くのシグナル伝達系タンパク質が含まれていました（図1）。

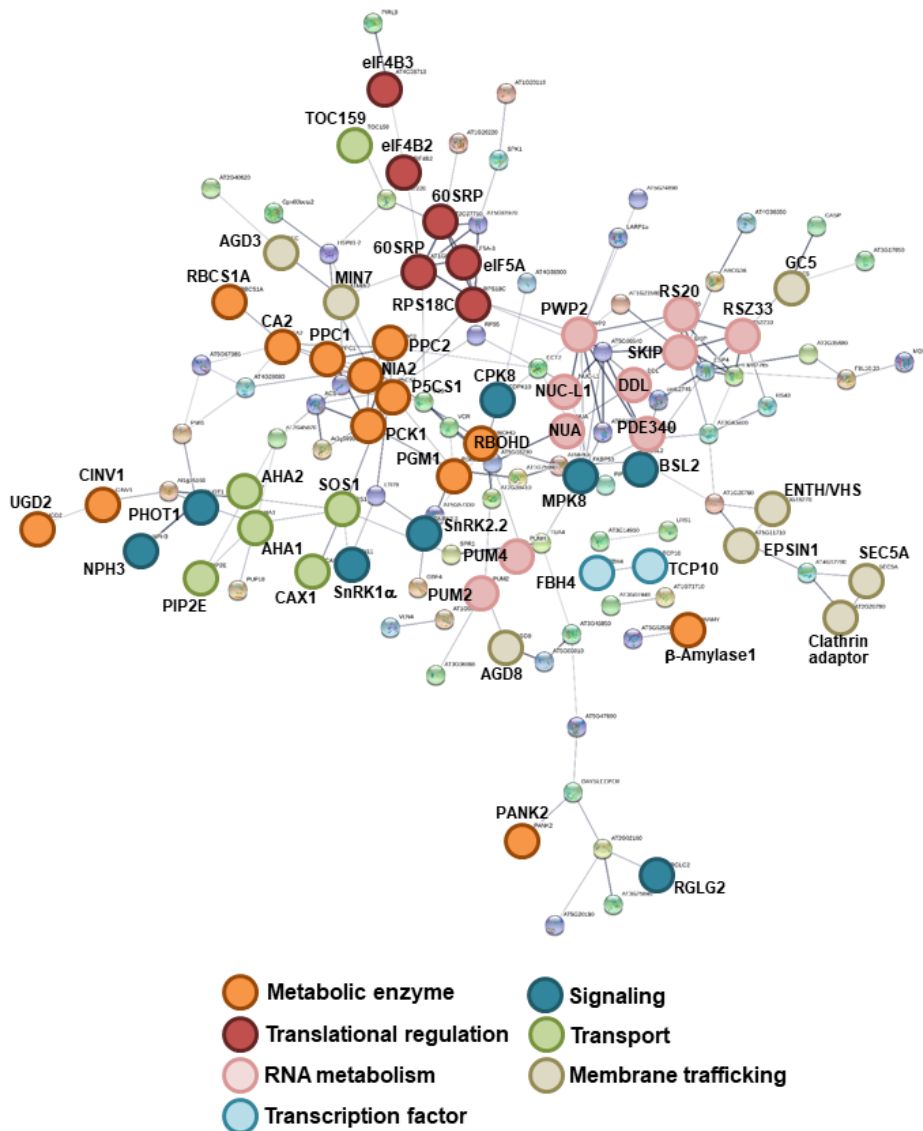


図1 C/N 応答性リン酸化タンパク質ネットワーク

その中でも、特に重要な因子として **SnRK1** というキナーゼのリン化状態が大きく変化することが分かりました。**SnRK1** は、酵母 (**Snf1**) や哺乳動物 (**AMPK**) にも広く保存されているエネルギーセンサーとして知られる因子です。酵母や哺乳動物においては、この因子の活性が **ATP** レベルやある種の糖のレベルに応じて変化することが分かっていますが、最近植物では、それらとは異なる「**トレハロース 6 リン酸 (T6P)**」という植物独自の糖代謝物が **SnRK1** に結合し、直接的にその活性を制御することが報告され注目を浴びています。そこで私達も、C/N に応答した **T6P** レベルを定量してみたところ、細胞内の **T6P** レベルが高 C/低 N バランスに依存して、非常に顕著に増加することが分かりました。このような変動は、**T6P** 合成の前駆体となる代謝物では見られず、C/N に応じた何らかのメカニズムで **T6P** 量が厳密に制御されていることが予想されます。そして、実際に **SnRK1** の変異体で

は、C/N 応答の制御因子やマーカー遺伝子群の遺伝子発現レベルが有意に変動していることが分かり、T6P-SnRK1 モジュールが C/N シグナル伝達系の新規の上流因子として、非常に重要な機能を果たすことが示唆されました。

さらに、本リン酸化プロテオームの結果から、新規の受容体型キナーゼ LMK1 が単離されました。受容体型キナーゼは、細胞膜状に局在し、細胞外のリガンドを受容し、細胞内のシグナル伝達を惹起する重要なタンパク質群です。LMK1 は機能未知タンパク質ですが、同じファミリーに属するタンパク質が、植物の病原体抵抗性の初期シグナル制御に関わることが報告されています。そこで、LMK1 遺伝子をクローニングし、植物体内で一過的に過剰発現させると、LMK1 は細胞膜に局在し、さらに葉の細胞死を促進するという興味深い結果を得ました。細胞死は、植物の病原体抵抗性や老化制御といった生理現象で非常に重要な意義を有します。C/N シグナルは、代謝やバイオマスだけではなく、こうした植物生理現象にも作用することが古くから考えられてきましたが、実際の作用機序に関する知見は長年謎のままでした。今回我々が単離した LMK1 は、受容体型キナーゼとして、こうした栄養シグナルと生理現象を結びつける鍵因子として働いている可能性が示唆されます。

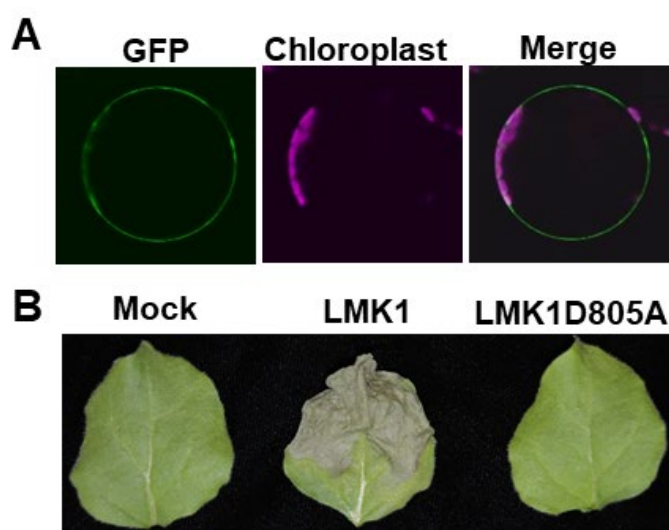


図 2 新規受容体型キナーゼ LMK 1 に細胞死誘導

(A) LMK1-GFP タンパク質細胞内局在性の蛍光顕微鏡観察

(B) LMK1 過剰発現による細胞死誘導 (LMK1D805A: キナーゼドメイン変異型 LMK1)

今回取得したリン酸化プロテオーム解析データは、植物栄養応答の分子機構を理解するためのプラットフォーム構築に貢献し、他の作物種も含めた様々な応用研究の基盤情報となることが期待されます。

本研究は、北海道大学, 理化学研究所, Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research (ドイツ), Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (ドイツ), 奈良先端科学技術大学院大学, Hohenheim 大学 (ドイツ) との共同研究として実施されました。

論文：

Protein phosphorylation dynamics under carbon/nitrogen-nutrient stress and identification of a cell death-related receptor-like kinase in Arabidopsis

Li X, Sanagi M, Lu Y, Nomura Y, Stolze SC, Yasuda S, Saijo Y, Schulze WX, Regina F, Stitt M, Lunn JE, Nakagami H*, Sato T*, Yamaguchi J * *Corresponding authors*

Frontiers in Plant Science 11: 377. 2020

doi: 10.3389/fpls.2020.00377.