

研究題目 プロテオーム解析による植物のマグネシウム恒常性維持機構の 解明

研究組織

研究代表者：井上 晋一郎（東海国立大学機構 名古屋大学 大学院理学研究科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

必須金属であるマグネシウム(Mg)は、植物体内で多くの細胞内過程に利用されて生命活動を支えている。そのため Mg 恒常性維持は細胞から個体のレベルで適切に調節されている。動物細胞とは異なり、植物細胞は巨大に発達した液胞を持ち、その中にイオンを輸送・蓄積して細胞質の恒常性を維持する機構を持つ。しかしながら、Mg においては生体内動態や機能に関する知見が乏しく、液胞への Mg 輸送がどのように調節されているのかほとんど明らかでない。最近申請者は、液胞内に Mg を輸送して恒常性維持を担う新奇の Mg 輸送体「CST2」を新たに発見した (Inoue et al., (2022) *New Phytologist*)。cst2 変異株の表現型は生育培地の Mg 濃度に依存することから、申請者は CST2 の Mg 輸送活性が植物体内では必要に応じて活性化されているのではないかと考えた。ところが、現時点では CST2 の活性制御機構は全く未知である。

そこで本研究では、プロテオーム解析により CST2 の細胞内の相互作用パートナーを網羅的に同定し、CST2 の活性化を担うシグナル伝達因子を明らかにする。同定された因子の機能解析により、植物の Mg 恒常性維持機構の理解を前進させることを目的とする。

[1-2] 研究の方法・経過

本研究では、CST2 の相互作用パートナーの同定に、近接依存性ビオチン標識法 (BioID 法) を採用する。人工的に改変したビオチンリガーゼ (AirID) を CST2 に融合させたタンパク質をシ

ロイヌナズナに導入し、細胞内の相互作用パートナーをビオチン化修飾させ、小迫研究室との共同研究によりプロテオーム解析を行い、ビオチン化されたタンパク質を網羅的に同定する。同定された候補タンパク質に関して、CST2 との相互作用を *in vitro* pull-down assay や co-immunoprecipitation assay などの手法により確認し、有力な候補から機能解析を進めた。候補タンパク質をコードする遺伝子の T-DNA 遺伝子破壊植物をリソースセンターから取得し、植物体の Mg 恒常性維持や CST2 の Mg 輸送活性に関する表現型を解析した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

今年度のプロテオーム解析とデータベース等を用いた解析の結果から、CST2 の相互作用パートナーの最終候補を 13 個までに絞り込んだ。その中の解析順位最上位と決めたタンパク質 CST2-Interacting Protein 1 (CIP1) に関して機能解析を進めた。その結果、CIP1 が *in vivo* でも *in vitro* でも CST2 と物理的に相互作用することが確認できた。さらに、cip1 変異株は cst2 変異株と同様に、生育条件の Mg 濃度に応答して生育阻害を示し、高 Mg 濃度に高感受性を示すことを見出した。これらの結果から、CIP1 は確かに CST2 と相互作用し、CST2 が仲介する Mg 恒常性維持において重要な機能を担うタンパク質であることが明らかになった。

今後はさらに CIP1 の機能解析を進め、CIP1 が CST2 の Mg 輸送活性にどう影響するのか、CIP1 の発現パターンや細胞内局在が CST2 と同様なのか明らかにし、CST2 との機能的関係性

を詳細に明らかにする。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

CST2 は液胞膜に局在する輸送体タンパク質であり、植物における発現量も多くはないため、生化学的に CST2 の相互作用複合体を単離するのは困難であった。本研究ではこの問題を克服するため、細胞内相互作用因子の探索に BioID 法と組み合わせた質量分析を導入し、確かに CIP1 という新規の CST2 の相互作用パートナーを同定した。近年、BioID 法によるタンパク質の相互作用パートナー探索は急速に普及が進んでいるが、植物研究においてはまだこれまでに数えるほどしか報告例が存在しない。そのため本研究の成果は、植物研究においても相互作用パートナー探索・同定において BioID の手法が有用であることを証明できたと言える。CIP1 以外にも多くの細胞内相互作用パートナー候補が得られているため、今後の研究進展が大いに期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

1. 井上晋一郎「マグネシウム輸送による気孔開口の発見」第 65 回日本植物生理学会年会 シンポジウム「生物の多様な生命金属戦略」、2024 年 3 月、神戸国際会議場
2. 井上晋一郎「近位依存性標識酵素 AirID を利用した植物のマグネシウムホメオスタシス維持機構の解明」第 46 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「BioID 技術が切り拓く細胞から個体レベルまでのタンパク質間相互作用解析」、2023 年 12 月、神戸ポートアイランド
3. 井上晋一郎「液胞を舞台としたシロイヌナズナの Mg ホメオスタシス維持機構の解明」植物の栄養研究会 第 8 回研究交流会、2023 年 9 月、北海道大学

[3-3] 成果資料等

該当しない

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今年度は AirID を融合した CST2 を発現する形質転換植物を用い、BioID 法とプロテオーム解析を行うことで、CST2 の細胞内相互作用パートナーを多数同定することができた。CST2 と同様の機能を担い発現パターンが異なる CST2-Like1 と CST2-Like2 についても、今後形質転換植物の作成を続け、相互作用パートナー探索を進めたい。また、今年度の知見を活かし、今後は CST2 の活性を変化させるような Mg 濃度を変化させた条件下でも相互作用パートナー探索を進めたい。

さらに、今回同定した CIP1 以外の候補タンパク質についても、別の手法により相互作用を確認し、有力な候補から変異株を作成・取得し、Mg 恒常性維持における機能解析を進めたい。