

# 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（埼玉大学 大学院理工学研究科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：

### 【1】研究の概要

#### [1-1] 本研究の目的・概要

植物を含めた全ての生物において、マグネシウム(Mg)は多くの細胞内過程に利用されて生命活動を根本から支える必須金属の一つである。そのため Mg は、細胞内で欠乏しても過剰となっても数多の生体応答に支障をきたす。このため、Mg の恒常性は細胞から個体のレベルで適切に維持されている。植物細胞は動物細胞とは異なり、巨大に発達した液胞を持ち、その中に多くのイオンを輸送・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、植物科学において Mg の生体内動態や機能に関する知見は乏しく、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未解明である。

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、申請者らは 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、プロテオーム解析を駆使して 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ことを目的とした。同定された因子に関して変異株を用いた表現型解析を行い、植物の Mg 恒常性維持機構をさらに理解することを目指した。

#### [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) を採用した。この手法では、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、ビオチン化されたタンパク質を網羅的に同定する。このプロテオーム解析を、小迫研究室との共同研究により進めた。

得られた候補タンパク質が CST2 と物理的に相互作用するのか検証するため、*in vitro* pull-down assay と co-immunoprecipitation assay、BiFC assay を行った。また、候補因子のうち CST2-interacting protein 1 (CIP1)と名付けたタンパク質に関して、リソースセンターから T-DNA 遺伝子破壊株を入手し、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調べた。現在、CIP1 を過剰発現する植物の作成を進めている。

### 【2】研究成果

#### [2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

BioID 法と組み合わせたプロテオーム解析の結果から、CST2 と植物体内で相互作用すると考えられる候補タンパク質を 13 種明らかにすることができた。その中で、結合強度が高いことから最も有力だと判断した CIP1 に関して、*in vitro* pull-down 解析、co-immunoprecipitation assay、BiFC assay を行い、CST2 との物理的な相互作用を確認した。その結果、CIP1 と CST2 が *in vitro* と *in vivo* のどちらにおいても物理的に相互作用することを見出した。さらに、2つの *cip1* 変異株アレルは、*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突き止めた。これらの結果から、今回同定した CIP1 は、確かに CST2 と同じシグナル伝達上で機能し、植物の Mg 恒常性維持を仲介す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 は植物細胞における発現量が多くなく、さらに、液胞というオルガネラの膜に局在する輸送体タンパク質であるため、生化学的に CST2 を含む複合体を単離するのは困難であった。また、酵母 Two-hybrid 法のような相互作用因子探索法も上手く機能しなかった。そのため本研究では、より細胞内の相互作用因子を直接探索することができる BioID 法を導入し、CIP1 という新たな CST2 の相互作用パートナーを得ることができた。そのため本研究の成果は、植物におけるシグナル伝達研究において、BioID 法の有用性を証明したと考えられる。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、今後のさらなる研究進展が期待できる。

### 【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

[論文] なし

[書籍]

1. 井上晋一郎 「植物の気孔開口を制御するイオン輸送～マグネシウム輸送のかかわり～」 *化学と生物* 62 (10): 490-496. (日本農芸化学会会誌、2024 年 10 月)
2. 野澤彰、井上晋一郎 「AirID 融合タンパク質発現シロイヌナズナの作出」 *リアルな相互作用を捉える 近接依存性標識プロトコール* 98-108. (羊土社、2024 年 10 月)

[3-2] 学会発表

1. 井上晋一郎 「植物のマグネシウム輸送と気孔開口制御」植物の栄養研究会 第 9 回研究交流会、横浜理研、2024 年 9 月 24～25 日、
2. 井上晋一郎、木下俊則、馬建鋒 「植物の

Mg<sup>2+</sup> 恒常性維持を担う輸送体 CST2 の活性制御機構の解明に向けて」第 3 回生命金属科学シンポジウム、慶應大学、2024 年 6 月 21～23 日

[3-3] 成果資料等  
該当なし

### 【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 に関しても、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関しても、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。