

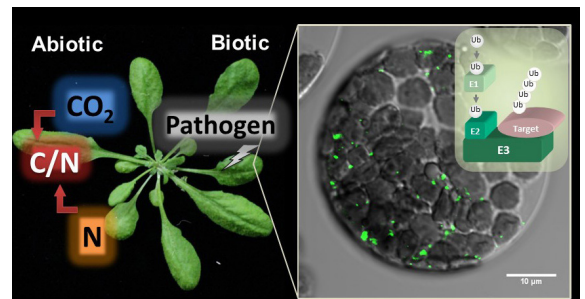
共焦点レーザー顕微鏡システムが捉えた、 TGN/EE局在型SNAREタンパク質SYP61と ユビキチンリガーゼATL31の 植物C/Nストレス耐性への貢献

生物は様々な環境変化にさらされる中で、恒常性を保ちながら自身の生育を最適化させている。糖（炭素源, C）と窒素（N）は代謝の根幹を担う栄養であり、近年、CやNのそれぞれの存在量に加えて、その相対量比（C/Nバランス）も植物の代謝や相転換を制御するシグナルとなることが明らかになりつつある。糖を供給する光合成の活性や土壌中の窒素量は、季節や昼夜の日照条件、降雨等で絶えず変動している。また、現在、大気中の二酸化炭素量の増加も進行している。C/Nバランスの乱れはバイオマスの低下や老化促進といった生育の阻害につながることから、持続可能な農作物の生産を考える上でも、植物のC/Nストレスへの適応機構の理解は重要である。

北海道大学大学院理学研究院の佐藤長緒先生、高木純平先生、長谷川陽子氏は、植物の環境適応機構、特に炭素/窒素栄養応答とこれに関係した病害応答・発生制御機構の解明を目指し、細胞内シグナル伝達に着目し研究を行ってきた。これまでの研究で、モデル植物シロイヌナズナにおけるC/Nストレス応答制御因子として膜局在型ユビキチンリガーゼATL31を同定し、ATL31が標的である14-3-3のユビキチン化を介してC/Nストレス応答を制御することを明らかにした。しかしながら、膜貫通ドメインがATL31の機能に重要であることが示唆されていたものの、ATL31の細胞内局在やその制御機構についてはまだ分かっていなかった。

本アプリケーションノートでは、ATL31の局在制御に着目して植物のC/Nストレス適応機構の解明を目指した最新論文の内容を中心に、共焦点レーザー顕微鏡システムが貢献した植物の研究事例について紹介する。

キーワード：共焦点レーザー顕微鏡システム、炭素/窒素栄養応答、SNAREタンパク質、ユビキチンリガーゼ、トランスゴルジ網（TGN）、初期エンドソーム（EE）、シロイヌナズナ



植物のストレス適応を制御するユビキチンリガーゼ

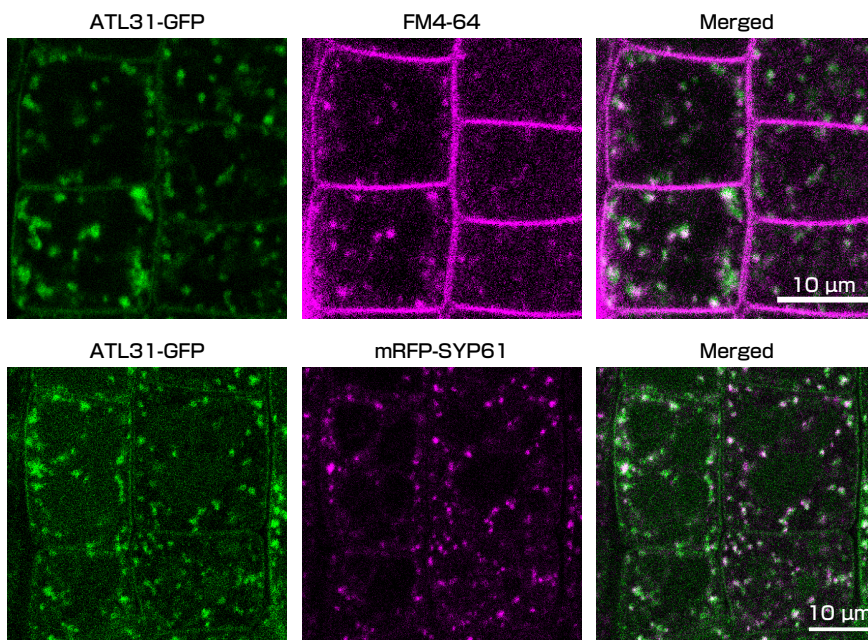


図1. ATL31-GFPを発現したシロイヌナズナの根端表皮細胞の共焦点画像

上段：FM4-64とATL31-GFPの共局在
2- μ M FM4-64で2分間染色し、16分後に観察を行った。

下段：ATL31-GFPとmRFP-SYP61の共局在

ATL31-GFPは、細胞内の顆粒状構造においてエンドサイトーシストレーサーFM4-64やTGN/EE局在型SNAREタンパク質SYP61と共局在を示した。

顕微鏡：
共焦点レーザー顕微鏡システムA1 R HD25
対物レンズ：CFI プランアポクロマート
Lambda 60X Oil (NA 1.40, W.D. 0.13)
解像度：1024×1024画素（クロープ画像）

ATL31-GFP

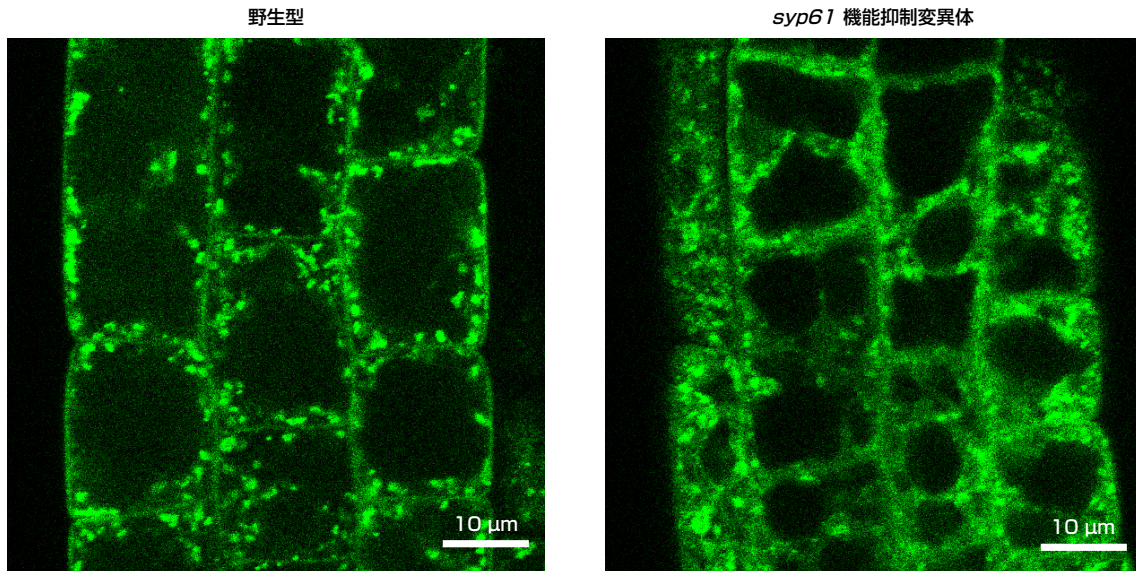


図2.シロイヌナズナの野生型および*syp61*機能抑制変異体の根端表皮細胞の共焦点画像

(左)ATL31-GFPを発現させた野生型

(右)ATL31-GFPを発現させた*syp61*機能抑制変異体

*syp61*機能抑制変異体において、ATL31-GFPの細胞内局在に異常が観察された。

顕微鏡：共焦点レーザー顕微鏡システムA1 R HD25

対物レンズ：CFI プランアポクロマート Lambda 60X Oil (NA 1.40, W.D. 0.13)

解像度：1024×1024画素 (クロップ画像)

結果と考察

ATL31-GFPを発現する形質転換シロイヌナズナ植物体を作成し、共焦点レーザー顕微鏡システムを用いてATL31の細胞内局在解析を行った。その結果、ATL31は細胞膜と細胞内の顆粒状構造に局在しており、この細胞内の顆粒状構造はエンドサイトーシスのトレーサーであるFM4-64と共局在を示すことが明らかになった(図1)。

植物においてはトランスゴルジ網(TGN)が初期エンドソーム(EE)として機能することが知られている。そこで、TGN/EEに局在するSNAREタンパク質SYP61とATL31-GFPの共局在解析を行ったところ、ATL31は確かにTGN/EEに局在することが示された(図1)。

更に、生化学的な解析からATL31はSYP61と相互作用することが明らかとなった。SNAREタンパク質は輸送小胞と標的のオルガネラとの融合を媒介する膜交通制御因子である。そこで、*syp61*機能抑制変異体におけるATL31の細胞内局在を調べた。その結果、ATL31のほとんどは細胞質中に拡散しており、異常な局在パターンを示した(図2)。また、生理学的な解析から*syp61*機能抑制変異体はC/Nストレスに高感受性を示した。野生型ではATL31の過剰発現によってC/Nストレスへの耐性が向上するが、*syp61*機能抑制変異体ではATL31過剰発現によるC/Nストレス耐性の向上は見られなかった。

以上の結果から、TGN/EE局在型のSNAREタンパク質SYP61は、E3ユビキチンリガーゼATL31の正常な局在制御を介して植物のC/Nストレス耐性に貢献することが明らかになった。この研究成果は、不安定な栄養環境においても安定した収量を得られる作物の作出のための礎となる。

このように、共焦点レーザー顕微鏡は微小構造の局在を捉えるのに適している。今回、GaAsP検出器を用いることで細胞質中に拡散した微弱なシグナルもS/Nよく検出することができ、変異体における細胞内局在異常を明確に示すことができた。

参考文献

Hasegawa Y, Reyes TH, Uemura T, Baral A, Fujimaki A, Luo Y, Morita Y, Saeki Y, Maekawa S, Yasuda S, Mukuta K, Fukao Y, Tanaka K, Nakano A, Takagi J, Bhalerao RP, Yamaguchi J, Sato T (2022) The TGN/EE SNARE protein SYP61 and the ubiquitin ligase ATL31 cooperatively regulate plant responses to carbon/nitrogen conditions in Arabidopsis.

The Plant Cell, Volume 34, Issue 4, Pages 1354–1374

<https://doi.org/10.1093/plcell/koac014>

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

生細胞への光毒性が低く光退色の少ない高速・高解像度・広視野の共焦点イメージングをサポート。

- ・高速：最速毎秒720フレーム
(レゾナント 2048 × 16画素)
- ・高解像度：最高8K (ガルバノ)/
2K (レゾナント)
- ・高スループット：視野数25mmの
超広視野



CFI プランアポクロマートLambda D 60X Oil

像の平坦性が高く、視野数25mmの広視野の端まで均一な明るさと高画質を実現。405nmからの色収差を補正しているため、高品質な多色イメージングが可能。

- ・NA：1.42
- ・W.D.：0.15
- ・PFSに対応

