

平成30年11月30日

若手研究者海外挑戦プログラム報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

受付番号 201880053

氏名 長谷川陽子

(氏名は必ず自署すること)

若手研究者海外挑戦プログラムによる派遣を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記記載の内容については相違ありません。

記

1. 派遣先: 都市名 ボルドー (国名 フランス)
2. 研究課題名 (和文): 植物栄養応答におけるユビキチンシグナルを介したタンパク質輸送システムの解明
3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 23 日 ~ 平成 30 年 10 月 31 日 (192 日間)
4. 受入機関名・部局名: フランス国立科学研究センター (CNRS)・生体膜研究室 (LBM)
5. 派遣先で従事した研究内容と研究状況 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

植物にとって、炭素が多く窒素が少ない条件はストレスとなり、これは CN ストレスと呼ばれている。私は派遣先において、植物の CN ストレス応答の分子背景にある膜交通制御の実態を解明するための解析を行った。私の所属する研究室では、植物の CN ストレス応答制御因子としてユビキチンリガーゼ ATL31 を同定し、報告してきた。引き続き私たちの解析によって、この ATL31 が、膜交通の制御因子である SNARE タンパク質 SYP61 の細胞内局在性を変化させることで、植物の CN ストレス応答を制御している可能性が示唆された。膜交通とは、小胞を介した物質輸送のことである。つまり、ATL31 と SYP61 によって制御される小胞における積荷こそが、ATL31 による植物の CN 応答制御の実態であると考えられる。私は、この積荷を網羅的に同定するための解析を派遣先において行った。

材料としては、野生型および *atl31* の変異体背景で GFP タグを付加した SYP61 を発現する植物を用い、それぞれ 4 リピート分のサンプルを作製した。また、ネガティブコントロールとして、GFP のみを発現する植物体についても 1 リピートのサンプルを作製した。手順としては、3-4 日間低温暗所で処理した滅菌した種子を 8 日間液体培養し、1 日 CN ストレスおよびコントロール処理を施した後、スクロースグラジエントによる密度勾配遠心を用いて膜構造を精製し、さらに GFP タグで免疫沈降を行うことで、SYP61 と ATL31 によって制御される輸送小胞を単離した。半年間かけて準備したこれらのサンプルは、現在プロテオミクスを行う為の専門機関に送り、その結果を待っている段階である。この解析の合間に、ライブイメージングを用いた膜輸送の解析や、免疫染色などの実験技術も新たに教わり、実施した。

6. 研究成果発表等の見通し及び今後の研究計画の方向性 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

本研究の主眼であるプロテオミクスの結果については、現在委託先において解析中である。この解析では、野生型と *at131* の変異体それぞれに対して CN ストレス処理およびコントロール処理を行い、合計 4 条件のサンプルを用意した。解析結果が得られたら、まずはこれら 4 条件のサンプルの結果を比較解析し、それによって、CN ストレスに応じて ATL31 と SYP61 によって輸送を制御される積荷の候補を同定する。同定された積荷の候補因子について、まずはイメージングを用いた解析を行い、ATL31 および SYP61 の有無や、CN ストレスに応じた細胞内局在性を調べることで、CN ストレスにおいて ATL31 と SYP61 が制御する積荷であることを確かめる。さらに変異体を用いた生理学的解析によって、CN ストレス応答への寄与を検証する。これらの解析によって、CN ストレスにおいて ATL31 と SYP61 が制御する積荷であることを確かめた上で、その結果を論文として発表する。

渡航前までの解析によって、ATL31 が SYP61 をユビキチン化することも確かめている。このことから、ATL31 によるユビキチン化が SYP61 の制御に重要な役割を果たす可能性が考えられるが、それを検証するためには SYP61 のユビキチン化サイトの同定が必要となる。今回の渡航先における MS 解析では、ユビキチン化修飾サイトも検出できるので、野生型背景と *at131* 変異体背景の植物体での SYP61 のユビキチン化の結果を比較することで、ATL31 によってユビキチン化される SYP61 のサイトを同定することがきる。同定されたユビキチン化サイトに変異を入れた SYP61 を用いて、細胞内局在性を調べるためのイメージング、SYP61 の機能に重要なタンパク質複合体形成への寄与を調べる生化学的解析、そして CN ストレス応答への寄与を調べる生理学的解析などを行い、SYP61 のユビキチン化の生理学的意義をさらに詳しく調べていく予定である。

7. 本プログラムに採用されたことで得られたこと (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

本プログラムによる留学によって、輸送小胞の分画プロテオミクスの実験の他、免疫染色や、細胞膜染色試薬を用いて膜輸送を追跡するイメージング解析など、所属している研究室にはなかった実験技術を修得し、持ち帰ることができた。

実験技術を学び、解析を行えただけでなく、そこで多くの研究者たちと知り合えたことも大きな収穫だった。研究には国境はなく、世界中の優れた研究者たちが新しい技術を用いて日々新しい現象を発見しており、国を超えた研究者との交流が重要であることは言うまでもない。しかし、それを自ら実行する機会はこれまであまり訪れなかった。今回、本プログラムに採用されたことで、フランス国立研究センター (CNRS) に半年間滞在し、多くの研究者と交流を深めることができた。いくつかの研究室からは、博士課程修了後ポスドクをしに来ないかと声をかけてもらうこともできた。同じ研究室に通い、同じ環境で実験して、その結果についてディスカッションをする中で得た信頼は、今後研究を進める中で大きな利益になるだろうと思う。本プログラムの助成の元で留学したことは、留学生として見ず知らずの研究室にお世話になる上でとても有益だったと思う。また、渡航中に学会に参加する機会にも恵まれ、同分野における各国の研究者たちの前で自分の研究について発表し、多くの優れた研究者たちと交流することができた。博士課程のこの時期に、海外において人々と交流して研究を行えたことは、非常に意義深く、実り多いものであった。

見知らぬ土地で暮らしたことで、今まで知らなかった価値観や世界観を得ることもできた。日本の中でも地域や研究室ごとに異なる「文化」が存在するが、それ以上に全く違う風土に触れたことで、視野が大きく広がったと感じる。この先、多様な背景を持つ人たちと協力して何かを成し遂げようとするときに、今回の経験が必ず役に立つと思う。

ここで得られた実験技術や人脈を活かして、これから活発に研究を進めていこうと思う。