

平成30年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2017

課題番号：16H04808

研究課題名(和文) フィトクロムによる選択的スプライシング制御の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of alternative splicing regulation by phytochrome

研究代表者

松下 智直 (MATSUSHITA, Tomonao)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：20464399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子の1つであるグリセリン酸キナーゼ遺伝子が、フィトクロムシグナル依存的に転写開始点も変化させることを偶然見いだした。そしてTSS-seq解析を行い、転写開始点の位置と発現量をシロイヌナズナにおいて網羅的に解析した結果、フィトクロムが、従来から知られる転写量の制御に加えて、さらに別の2,000を超える遺伝子に対して、転写開始点の制御をも行うことを見いだした。そして多くの遺伝子において、この転写開始点の変化が、その直後の選択的スプライシングパターンの変化を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Biological complexity relies on the diversity of the proteome, which can be increased beyond the number of genes. With alternative transcription start site (TSS), mRNAs are transcribed from different TSSs within a gene locus. Alternative TSS selection, evident in various organs, tissues, and cancer cells, can affect translational efficiency or stability of mRNA or alter the N-terminal lengths of the encoded proteins. However, the impact of this mechanism on the proteome and whether it is ubiquitously involved in normal organismal responses remain unclear. In this study, we show that the plant photoreceptor phytochrome induces genome-wide changes in alternative TSS selection in *Arabidopsis thaliana*. Through this mechanism, protein isoforms with different N-termini are produced that display light-dependent differences in localization.

研究分野：植物光生理学

キーワード：フィトクロム 植物 光受容体 光応答 光シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

フィトクロムの蛋白質は、光受容に働く N 末端領域と、キナーゼドメインを持つ C 末端領域の、2つの領域から成る。フィトクロムは従来、その C 末端領域内のキナーゼ活性により下流因子へシグナルを伝達し、植物の様々な光応答を引き起こすと考えられていた。そしてその考えに基づき、フィトクロムのシグナル伝達機構を解明する目的で、フィトクロムの C 末端領域と直接相互作用する因子が精力的に同定されてきた (Ni ら 1998 年、Ryu ら 2005 年など)。その結果、PIF と呼ばれる bHLH 型の転写因子群がフィトクロムの C 末端領域に相互作用することが明らかとなり (Ni ら 1998 年) それ以降現在に至るまで、PIF を介した転写制御による光シグナル伝達の分子機構解明が、国内外におけるフィトクロム研究の専ら課題となっている。

このような背景のなか我々は、フィトクロムの最も主要な分子種であるフィトクロム B (phyB) が、C 末端領域からではなく N 末端領域からシグナルを発信することを証明した (**Matsushita ら 2003 年**)。

この発見により従来の「常識」が覆され、フィトクロムのシグナル伝達機構を一から見直す必要が生じたため、我々はフィトクロムの下流経路の見直しを図る目的で、大規模な変異体スクリーニングによる順遺伝学的解析を徹底的に行った。そしてその結果、新奇スプライシング制御因子 RRC1 がフィトクロムのシグナル伝達に必要であることを発見した (**Shikata ら 2012 年**)。

RRC1 の同定をきっかけとして、我々はシロイヌナズナにおいて mRNA-seq 解析を行い、その結果、フィトクロムが N 末端領域からのシグナル伝達により、PIF を介した転写制御に加えて、それとほぼ同じ規模で、しかし基本的には異なる標的遺伝子に対して、選択的スプライシング制御も行うことを明らかにした (**Shikata ら 2014 年**)。さらに、フィトクロムのシグナルによって標的遺伝子の選択的スプライシングパターンが変化することが、実際に生理学的に植物の光応答に寄与することを実証した (**Shikata ら 2014 年**)。

しかしながら、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の分子機構、さらには、RRC1 がどのような分子機構でフィトクロムによる選択的スプライシング制御に関わるのかについては、未だ不明である。

2. 研究の目的

植物の主要な光受容体であるフィトクロムは、PIF と呼ばれる転写因子群を介して標的遺伝子の転写制御を行うことで、植物の光応答を引き起こすと考えられている。しかし我々は最近、フィトクロムの下流因子として新奇スプライシング因子 RRC1 を順遺伝学的に同定したことをきっかけに、フィトクロムが転写制御に加え、それとほぼ同じ規模で

選択的スプライシング制御も行うことで、植物の光応答を引き起こすことを明らかにした。そこで本研究では、現在不明である、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の分子機構解明を目的として、RRC1 が当該制御にどのように関与するのかを明らかにし、さらに当該制御に関わる新奇因子の同定を試みる。

3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナを用いて、以下の研究項目(1)~(3)を行い、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の分子機構解明を目指す。まず、RRC1 / RRIP が当該制御にいかに関与するのかを解析する(研究項目(1))。そして、当該制御に関わる RRC1 / RRIP 以外の新奇スプライシング因子を同定するために、2つの戦略で研究を進める。1つは、活性型全長フィトクロム分子に結合するスプライシング因子を網羅的に同定するという、上流からのアプローチである(研究項目(2))。もう一つは、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子に濃縮されるシス配列を解析し、その配列に結合するスプライシング因子を同定するという、下流からのアプローチである(研究項目(3))。

4. 研究成果

我々は本研究期間中に、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子の1つであるグリセリン酸キナーゼ遺伝子が、フィトクロムシグナル依存的に転写開始点も変化させることを偶然見いだした。そして TSS-seq 解析を行い、転写開始点の位置と発現量をシロイヌナズナにおいて網羅的に解析した結果、フィトクロムが、従来から知られる転写量の制御に加えて、さらに別の 2,000 を超える遺伝子に対して、その転写量 (mRNA の総量) を一定に保ったまま、転写開始点を変化させ、その結果、400 以上ものタンパク質の細胞内局在が、フィトクロムシグナルに応じて変化することを見いだした (Ushijima et al., *Cell* 2017)。そして多くの遺伝子において、この転写開始点の変化が、その直後の選択的スプライシングパターンの変化を引き起こすことが明らかとなった。つまり、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の大部分が、転写開始点制御によって説明できることが判明した。

< 引用文献 >

Matsushita T, Mochizuki N, and Nagatani A. Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* 424: 571-574 (2003)

Shikata H, Shibata M, Ushijima T, Nakashima M, Kong SG, Matsuoka K, Lin C, and Matsushita T. The RS domain of

Arabidopsis splicing factor RRC1 is required for phytochrome B signal transduction. *Plant J.* 70: 727-738 (2012)

Shikata H, Hanada K, Ushijima T, Nakashima M, Suzuki Y, and Matsushita T. Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 18781-18786 (2014)

Ushijima T, Hanada K, Gotoh E, Yamori W, Kodama Y, Tanaka H, Kusano M, Fukushima A, Tokizawa M, Yamamoto YY, Tada Y, Suzuki Y, and Matsushita T. Light controls protein localization through phytochrome-mediated alternative promoter selection. *Cell* 171: 1316-1325 (2017)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Gotoh E, Suetsugu N, Higa T, Matsushita T, Tsukaya H, and Wada M. Palisade cell shape affects the light-induced chloroplast movements and leaf photosynthesis. *Sci Rep.* 8: 1472 (2018)
DOI: 10.1038/s41598-018-19896-9

Ushijima T, Hanada K, Gotoh E, Yamori W, Kodama Y, Tanaka H, Kusano M, Fukushima A, Tokizawa M, Yamamoto YY, Tada Y, Suzuki Y, and Matsushita T. Light controls protein localization through phytochrome-mediated alternative promoter selection. *Cell* 171: 1316-1325 (2017)
DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.018

Oota M, Gotoh E, Endo M, Ishida T, Matsushita T, and Sawa S. Negative phototaxis in *M. incognita*. *Int. J. Biol.* 9: 12-16 (2017)
DOI: <https://doi.org/10.5539/ijb.v9n3p51>

Ishishita K, Suetsugu N, Hirose Y, Higa T, Doi M, Wada M, Matsushita T, and Gotoh E. Functional characterization of blue-light-induced responses and PHOTOTROPIN 1 gene in *Welwitschia mirabilis*. *J. Plant Res.* 129: 175-187 (2016)
DOI: 10.1007/s10265-016-0790-7

[学会発表](計 5 件)

Tomonao Matsushita, Light controls

protein localization through phytochrome-mediated alternative promoter selection. International Symposium on Plant Photobiology 2018 (Matsue, Japan, January 2018)

Tomonao Matsushita, Light controls protein localization through phytochrome-mediated selection of transcription start sites. 8th Asia and Oceania Conference on Photobiology (Seoul, Korea, November 2017)

Tomonao Matsushita, Phytochrome globally modulates protein localization in *Arabidopsis*. Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (Taipei, Taiwan, November 2017)

Tomonao Matsushita, Phytochrome globally modulates protein subcellular localization in *Arabidopsis*. The 58th Annual Meeting of The Japanese Society of Plant Physiologists (Kagoshima, Japan, March 2017)

Tomonao Matsushita, Light-dependent control of gene expression by phytochrome. 2016 Plant Science Annual Meeting and Symposium, Taiwan Society of Plant Biologists (Taichung, Taiwan, November 2016)

[図書](計 0 件)

該当無し

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

該当無し

取得状況(計 0 件)

該当無し

[その他]

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 智直 (MATSUSHITA, Tomonao)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 20464399

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者
該当無し