

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07441

研究課題名(和文)小胞体ストレス可視化植物を用いたタンパク質管理機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the protein quality and quantity control system in plants using a fluorescent reporter

研究代表者

林 晋平 (HAYASHI, Shimpei)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：40781323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス応答と呼ばれる細胞内のタンパク質管理機構を理解するため、この応答の活性化を蛍光観察で判別できるシロイヌナズナを作製し、植物においてこれまで困難であった関連する変異体の探索を実現させた。変異体集団の中から蛍光パターンに異常のある個体を探し、野生株がストレスを感じない条件でストレス応答が活性化してしまう変異体や、ストレス応答の抑制が効きにくい変異体の分離に成功した。得られた変異体の特徴づけと原因遺伝子探索をさらに進め、未知の機構を解明することで、植物にタンパク質を効率的に生産させる技術等の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) stress responses control the protein quality and quantity. To shed light on the unknown mechanism of the control system in plants, we generated transgenic Arabidopsis plants in which fluorescence proteins are induced by ER stress response. To identify novel factors involved in the control system, we mutagenized the transgenic plants and screened mutants. We successfully isolated many unique mutants that exhibited altered fluorescence pattern. Since these mutants are important clues for understanding how plant cells managing risks involved in protein production, we are carrying out the characterization of these mutant plants and mapping of the responsible genes. These data will lead to the development of a sophisticated protein production system using plants in the future.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：小胞体 ストレス タンパク質 植物 変異体

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞にタンパク質を効率的に生産させるには、小胞体ストレス応答と呼ばれるタンパク質管理機構を理解する必要がある。未知の機構を解明するには、この応答が変化した変異体を探し、その原因となる遺伝子を解析する順遺伝学的アプローチの研究が有効である。しかし、植物では小胞体ストレス応答に関わる明瞭な表現型がなく、変異体を探すことが困難であった。

2. 研究の目的

植物で例のない小胞体ストレス応答が変化した変異体の探索を行ない、その解析を通じて植物のタンパク質管理機構を分子レベルで理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス応答に関わる表現型を人工的に付与したシロイヌナズナ形質転換体を作成した。この形質転換体は、ツニカマイシン等の薬剤により小胞体ストレス応答が活性化すると、赤色蛍光タンパク質を合成するように設計されており、蛍光観察により非破壊的に応答の活性化した細胞がわかる(図1)。

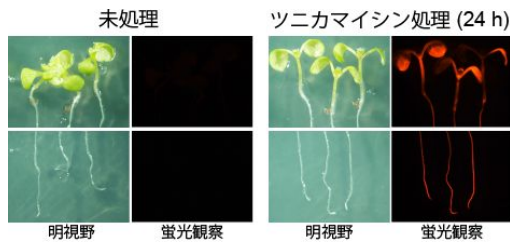


図1 シロイヌナズナ形質転換体

(2) この形質転換体の種子をメタンスルホン酸エチルで処理して突然変異を誘導し、生育・自殖させて次世代の種子(M2種子)を獲得した。種子収穫は、約2千個体のM1植物を96グループに分割し、グループごとにまとめて行なった(異なるグループから得た変異体は異なるものと判断できるため)。

(3) 野生株では小胞体ストレス応答が活性化されない条件下でM2種子(各グループ約500粒)を発芽、生育させ、蛍光観察により蛍光を発する個体を探索した(図2)。

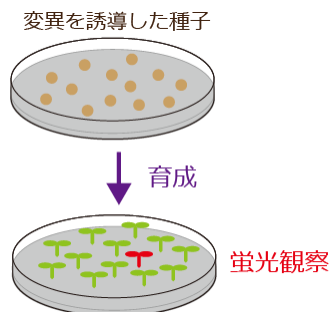


図2 変異体の探索

(4) 表現型の遺伝性評価および関係のない変異の除去のため、獲得した変異体を自殖させた後代、変異誘導前の親株と戻し交配させた後代を得て蛍光や生育を観察した。

(5) 注目する変異体について原因遺伝子のマッピングを行なうため、異なる生態型の株と交配し、得られた種子をさらに生育させて得た自殖種子(F2種子)を収穫した。

(6) マッピング用のF2種子を播き、生育させて蛍光観察を行ない、親株と同様の蛍光パターンを示す個体を選抜し、葉からゲノムDNAを抽出した。

(7) PCRにより、染色体に点在する多型を検出し、親株の生態型特有の多型が集中する(目的の表現型と連鎖する)染色体領域を探した。

(8) 変異原処理により生じた変異を把握するため、注目する変異体について、次世代シーケンス解析を行なった。

(9) 蛍光観察に頼らない表現型の簡易評価を可能にするため、小胞体ストレス応答の活性化により蓄積する内生タンパク質BiP3の抗体作製を試みた。

4. 研究成果

(1) 変異原処理を施す前の世代(M0世代)では、数千個体を調べても蛍光を発するものはなかったが、変異処理を施したM2世代では、蛍光を発する個体がほとんどのグループ(約500個体ずつ調査)ごとに複数出現した。全身、地上部のみ、根のみ、維管束のみ、根毛のみで蛍光を発する変異体が多く得られた(図3)。このことから、様々な組織で発現する多数の遺伝子が、変異により小胞体ストレスを引き起こすリスクをはらんでいることがわかった。これらの変異体では、小胞体ストレスまたはその応答の抑制に関わる因子に異常が生じている可能性や、変異を起こしたタンパク質が不良化してストレスを直接引き起こしている可能性が考えられる。

(2) 分離した変異体について、自殖または戻し交配を試みた結果、強い蛍光を発した変異体は生育不良または不稔により種子を得られないものが多かった。特に、根毛特異的に強い蛍光が検出された個体は全て(4系統)が不稔であった。根毛と花粉管は先端成長を示す特殊な細胞で、急速な細胞伸長に必要な物質を輸送するために健全な小胞体機能が不可欠であると考えられる。両細胞は働く遺伝子も似ているため、変異体では小胞体ストレスまたはその応答により花粉管伸長に異常が生じ不稔となった可能性が考えられる。

このことから、小胞体ストレスまたはその応答を引き起こす変異が自然界で生じても後代に伝わり難いことが示唆された。後代の種子が得られた系統の中には、表現型が複数の原因遺伝子によることが戻し交配後の分離比から判断されるものや、表現型が不安定なものが多く、原因遺伝子探索を容易に進められる有望な候補が残らなかった。この原因の一つとして、最初の変異体探索では、蛍光が極めて強く明瞭な変異体を中心に選抜していたことが考えられるため、いくらか弱い表現型の変異体を分離し直した。現在、戻し交配を進め、目的の表現型をもたらす変異の遺伝性評価を進めている。



図3 得られた変異体の例

(3) 小胞体ストレス応答を理解する上で、活性化した応答がどのように終息するのかを知ることも重要な課題となっている。そこで、当初の計画に加えて、小胞体ストレス応答を抑制する作用をもつサリチル酸を与えた場合の蛍光パターンが通常と異なる変異体の探索も実施した。その結果、サリチル酸存在下でも応答が抑制され難い変異体の分離に成功した。変異原処理を施していない M0 世代は、ツニカマイシン処理により誘導される蛍光がサリチル酸により抑制されるが、この変異体ではこの抑制効果が低下していた(図4)。蛍光のみならず、内生の小胞体ストレス応答性遺伝子(*BiP3*等)の誘導においても同様の現象が認められた。

(4) 応答が抑制され難い変異体を異なる生態型の株と交配して得られた F2 世代を用いて PCR による連鎖解析を実施した結果、目的

の表現型は第一染色体と最も連鎖することが示された。次世代シーケンス解析により変異体の全ゲノム配列を調べた結果、この領域内に存在する複数の変異が同定された。戻し交配の効果は十分ではなく、表現型と関係のない変異がまだ多く混じっているため、現在、候補を絞るためにさらなる連鎖解析に取り組んでいる。蛍光を指標として変異体を選抜すると、目的の原因遺伝子のみならず、蛍光タンパク質遺伝子が挿入された遺伝子座も表現型と連鎖する。これが連鎖解析の精度を低下させるため、蛍光観察に頼らない表現型評価法が必要になった。このような方法として、植物体の一部からタンパク質を抽出し、内生の小胞体ストレス応答性遺伝子産物を認識する抗体でイムノプロットを行なうのが簡便である。この方法に利用できる抗体を作製するため、BiP3 タンパク質の一部を構成するペプチドでウサギを免疫し、血清を得た。

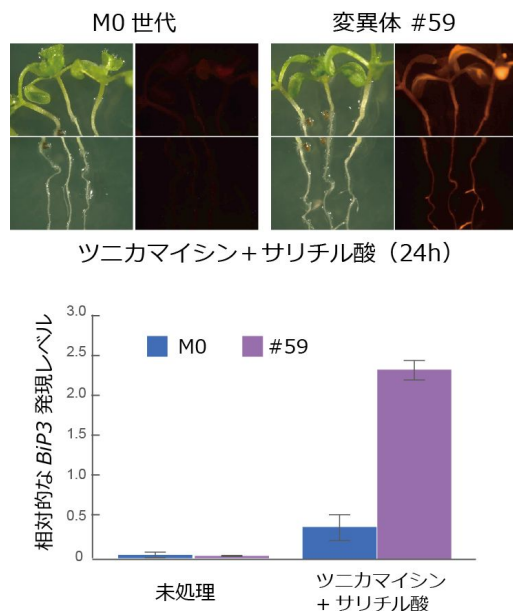


図4 ストレス応答が抑制され難い変異体

(5) 本研究課題では、小胞体ストレス応答に関わる表現型を人工的に付与することで関連する変異体の探索を可能にし、これまでに報告のない様々な変異体を得ることに成功した。期間内での原因遺伝子の同定と機能解明には至らなかったものの、これまでに整えた方法や材料を用いて研究を進めることで目的を達成し、この分野における新しい成果の獲得が期待される。また、小胞体ストレス応答を可視化する手段を改変することで、異なる種類の変異体の分離も期待できる。本研究課題で使用したシロイヌナズナ形質転換体は、小胞体ストレス応答の活性化でDsRED2という蛍光タンパク質が作られるように設計されている。DsRED2はタンパク質の寿命が比較的長く、弱い応答でも蛍光タンパク質が多く蓄積し検出可能になるという利点がある。一方で、タンパク質が発色団を形成するのに時間がかかるという欠点がある。DsRED2

の代わりに発色団形成の速い蛍光タンパク質を用いることで、短時間の応答の活性化を観察することが可能になる。このような異なるタイプのレポーターシステムも構築し、新たな変異体探索の準備も行なっている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

林 晋平 (HAYASHI, Shimpei)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：40781323