

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19770037
研究課題名（和文） 選択的スプライシングによる植物の環境ストレス応答機構
研究課題名（英文） Alternative splicing mechanisms of higher plants in response to environmental stresses
研究代表者 吉村 和也（YOSHIMURA KAZUYA） 中部大学・応用生物学部・講師 研究者番号：90379561

研究成果の概要：

植物における環境ストレス応答性の選択的スプライシング制御機構を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナにおけるストレス応答性SRタンパク質、*atSR30*および*atSR45a*の機能解析を試みた。*atSR30*および*atSR45a*の発現は強光に対して迅速に誘導された。また、それら自身の選択的スプライシング効率は強光により変化していた。酵母two-hybrid法およびBiFC法による解析の結果、*atSR45a*は5' および3' スプライス部位で機能するU1-70KおよびU2AF^{35b}や、スプライソソーム形成後期に5' スプライス部位で機能するPRP38と相互作用することが明らかになった。これらのことから、*atSR30*および*atSR45a*は強光を含めた環境ストレスに応答した選択的スプライシング効率の制御に深く関与することが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物, 選択的スプライシング, SR タンパク質, 転写後調節, ストレス応答, シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

現在まで、植物の分野では遺伝子の発現制御に関する研究は転写調節が主流であり、様々な遺伝子の種々の条件下における発現制御機構が詳細に明らかにされてきている。一方近年、動物/植物/微生物ゲノム情報から、転写後調節による遺伝子発現機構の重要

性が指摘されてきている。すなわち、ほとんどの生物種では約半数もの遺伝子が、転写後調節機構の一つである選択的スプライシングによって単一の遺伝子から多種類のタンパク質アイソザイムを生成していると見積もられている。

移動の自由のない植物は他の生物と比較

して独自のストレス応答/防御機構を発達させている。最近、植物において選択的スプライシングによる発現制御を受けると報告されている遺伝子の多くは、環境ストレスに対する耐性や防御応答に関与するものであることが見いだされている。この事実は、植物におけるストレス応答性の選択的スプライシング制御機構の存在を強く示唆するものである。従って、我々は植物の環境ストレス応答機構だけでなく、生物の遺伝子発現制御機構の多様性を明らかにするためにも、本研究課題“選択的スプライシングによる植物の環境ストレス応答機構”を解明しなければならないと考えた。

2. 研究の目的

これまでに動物や昆虫において、スプライシング制御因子の一つであるセリン/アルギニンリッチタンパク質(SRタンパク質)が、多くの遺伝子の選択的スプライシングの制御に主要な役割を果たすことが示されている。最近我々は、高等植物のシロイヌナズナには20種類のSRタンパク質ホモログが存在しており、それらの中の6種類(atSR45a, atSR30, atRS40, atSR34a, atRSZ22, atRSZ21a, atRSZ32:ドメイン構造と分子量から命名)が種々の環境ストレス条件(強光、乾燥、低温、活性酸素発生剤パラコート)に対して高い発現応答性(発現誘導もしくは発現抑制)を示すことを見いだした。このことから、これらのSRタンパク質が植物特有の選択的スプライシングによるストレス応答性の遺伝子発現機構の制御に機能していることが強く示唆された。そこで本研究では、選択的スプライシングによる植物の環境ストレス応答を明らかにすることを目的として、環境ストレスに対して発現応答性を示すSRタンパク質、atSR30およびatSR45aに焦点を絞り、それらの機能解析を試みた。

3. 研究の方法

atSR45aおよびatSR30の発現および選択的スプライシング効率の組織および生育時期特異性は半定量的RT-PCRにより行った。

強光応答性SRタンパク質、atSR45aの細胞内局在性はGFP融合タンパク質をタバコプロトプラストに一過的発現させることにより解析した。

atSR45aおよびatSR30の発現のストレス応答性を解析するために、播種2週間後のシロイヌナズナに強光(100-800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 6h)、パラコート(10 μM , 3 days)、塩(250 mM NaCl, 3 days)、低温(4 $^{\circ}\text{C}$, 3 days)処理を行った。

atSR45aのスプライシング因子との相互作用解析は酵母two-hybrid法およびBiFC(bimolecular fluorescence complementation)法により解析した。

4. 研究成果

1. シロイヌナズナSRタンパク質の種々のストレスに対する発現応答

種々の環境ストレス条件に対して発現応答性を示したSRタンパク質の中で、強光に対して顕著な発現応答性を示したatSR30およびatSR45aに注目し、それらのストレス応答性を詳細に解析した(Tanabe et al., 2007)。

その結果、atSR30およびatSR45aの発現は強光処理に対して迅速に誘導されること、またその発現強度は光強度に依存することが明らかになった(図1)。さらに、atSR30はパラコートおよび塩処理によっても迅速に誘導された。一方、atSR30およびatSR45aの発現は低温処理により抑制された。

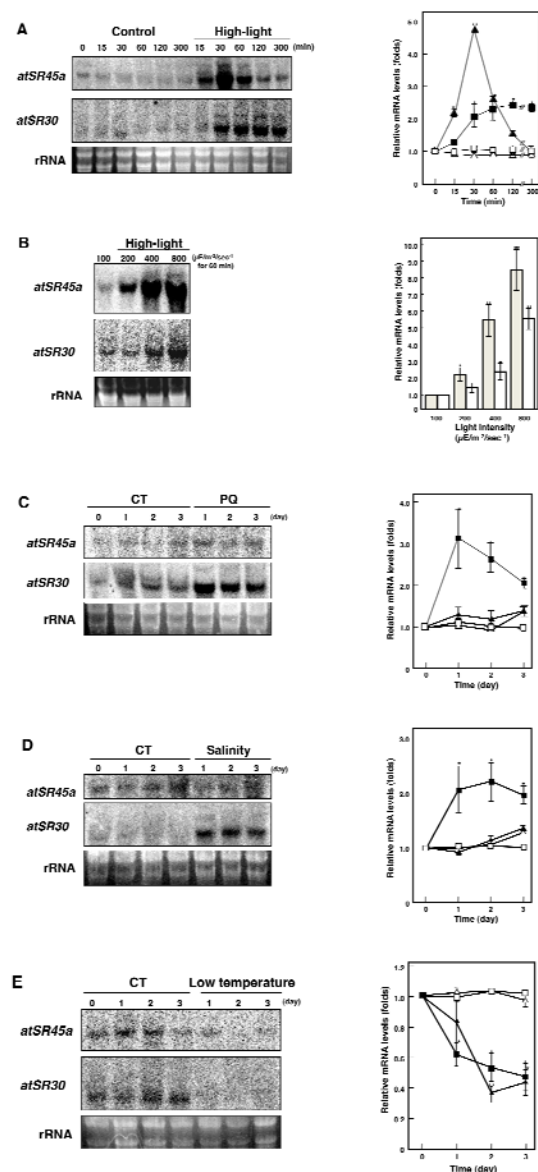


図1 シロイヌナズナSRタンパク質の種々のストレスに対する発現応答

A. 強光(400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 300 min)、B. 強光

(100–800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 60 min)、C. パラコート(10 μM , 3 days), D. 塩処理(250 mM NaCl, 3 days), E. 低温(4°C, 3 days) 三角およびグレーバーは *atSR45a* の発現レベル、四角および白バーは *atSR30* の発現レベルを示す。

2. 強光応答性 SR タンパク質、atSR45a の分子特性

強光に対して発現誘導性を示した atSR30 は動物の選択的スプライシング制御因子 ASF/SF2 の植物オソログであり、これまでにその分子特性が明らかにされている。一方、atSR45a はこれまでに未解析の新規の植物 SR タンパク質であった。そこで、atSR45a が植物特有のストレス応答性選択的スプライシングの制御に深く関与していると考え、本因子の分子特性の解析を行った。*atSR45a* は選択的スプライシング、すなわち2つの転写開始点、およびエキソン5のスキップもしくはその周辺のイントロンの保持により少なくとも6種類の成熟型 mRNA (atSR45a-1a~e、および-2) を生成していた(図2)。これら成熟型 mRNA のうち、atSR45a-1b、atSR45a-1c、atSR45a-1d、および atSR45a-1e は C 末端側の SR ドメイン、もしくは RNA 認識モチーフの一部を欠いたタンパク質をコードしていた。一方、atSR45a-1a および atSR45a-2 は N 末端および C 末端側の2つの SR ドメインおよび1つの RNA 認識モチーフをコードしており、ショウジョウバエの性決定遺伝子、*Doublesex* の選択的スプライシングの制御因子である transformer-2-like proteins と高い相同性(それぞれ 55.7 および 55.4%) を示した。

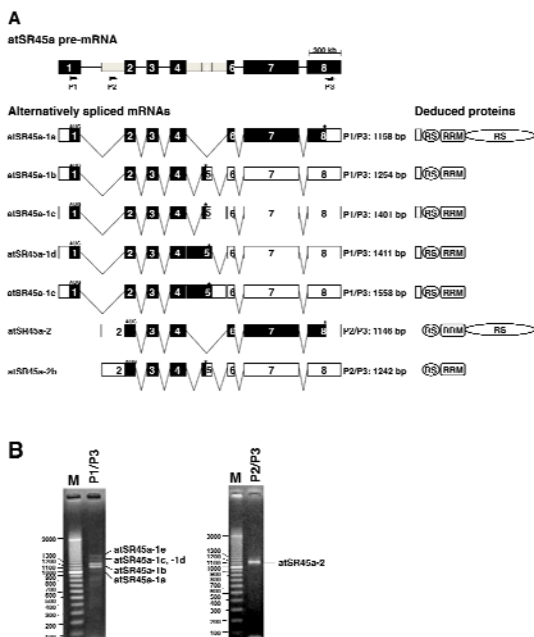


図2 atSR45a の選択的スプライシング様式

A. atSR45a 前駆体 mRNA と選択的スプライシング産物の構造。Black box: 構成的エキソン、Gray box: 選択的エキソン、white box: 非翻訳領域

B. RT-PCR 解析による atSR45a 選択的スプライシング産物の検出

3. 強光応答性 SR タンパク質、atSR45a の細胞内局在性

推定ドメイン構造から SR タンパク質として機能的と考えられた atSR45a-1a および atSR45a-2 の細胞内局在性を GFP を用いて解析した。両タンパク質の N 末端に green fluorescence protein(GFP) を融合させた GFP-SR45a-1a および GFP-SR45a-2 をタバコプロトプラストに一過性発現させたところ、両融合タンパク質共に核の指標である DAPI と蛍光が一致した(図3)。このことから atSR45a-1a および atSR45a-2 タンパク質は核局在であり、スプライシング因子として機能している可能性が高いと考えられた。

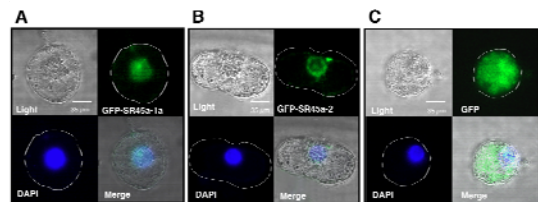


図3 atSR45a タンパク質のタバコ BY-2 細胞における細胞内局在性

A GFP-atSR45a-1a 融合タンパク質、B GFP-atSR45a-2 融合タンパク質、C pGWB6 ベクターコントロール

4. 強光応答性 SR タンパク質、atSR45a の発現制御

atSR45a の発現および選択的スプライシング効率のストレス応答性を半定量的 PCR により解析した。検討した。強光(400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 1 h)、パラコート(10 μM , 24 h)、塩(250 mM NaCl, 24 h)、低温(4°C, 24 h)、乾燥(30 min) 処理した播種後2週齢のシロイヌナズナ葉から total RNA を抽出し半定量的 PCR により解析した。その結果、強光処理によって atSR45a-1a および atSR45a-2 mRNA の発現が特異的に誘導された(図4)。一方、atSR30 mRNA1 および 3 の発現は強光により増加し、atSR30 mRNA4 は強光、パラコートおよび塩処理により減少した。これらのことから、atSR45a および atSR30 の選択的スプライシングはストレスに応答して制御されていることが明らかになった。

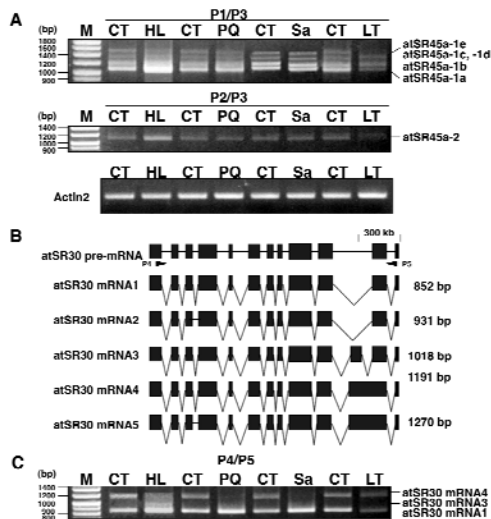


図4 *atSR45a* の発現および選択的スプライシング効率のストレス応答性

半定量的 RT-PCR 解析による HL: 強光 (400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 60 min)、PQ: パラコート (10 μM , 1 day), S: 塩 (250 mM NaCl, 1 day), LT: 低温 (4 $^{\circ}\text{C}$, 1 day), D: 乾燥 (30 min) 処理下での発現解析

5. 強光応答性 SR タンパク質、*atSR45a* のスプライソソーム形成に果たす役割

atSR45a タンパク質のスプライソソーム内における機能を明らかにするために、酵母 two-hybrid 法を用いて *atSR45a* と相互作用を示すスプライシング因子の探索を行った。その結果、機能的と考えられる *atSR45a-1a* および *atSR45a-2* は *atSR45a*, *atSR45*, *atSCL28*, *U1-70K*, *U2AF^{35b}*, および PRP38-like protein と相互作用することが明らかになった。また、その相互作用に必要なドメインの同定を試みた結果、C 末端側の RS ドメインを欠損させた場合、すべてのスプライシング因子との結合において、 β -ガラクトシダーゼ活性の極端な低下が認められた (図 5)。また、*atSR45a-2* と共に発現させた酵母において、最も高い β -ガラクトシダーゼ活性が得られた。これらの結果から、*atSR45a* の C 末端 RS ドメインは他のスプライシング因子との相互作用のために必須であり、*atSR45a-2* 特有の N 末端ドメインはそれらの相互作用を促進する効果を有することが示された。

次に、*in vivo* でのそれらの相互作用を検討するために、BiFC (bimolecular fluorescence complementation) 法を用いて解析した。その結果、*atSR45a* といずれの組み合わせにおいても、YFP 蛍光が核の指標となる *U1-70K* と一致したことから、これらタンパク質間の相互作用は核で生じていることが示された (図 6)。

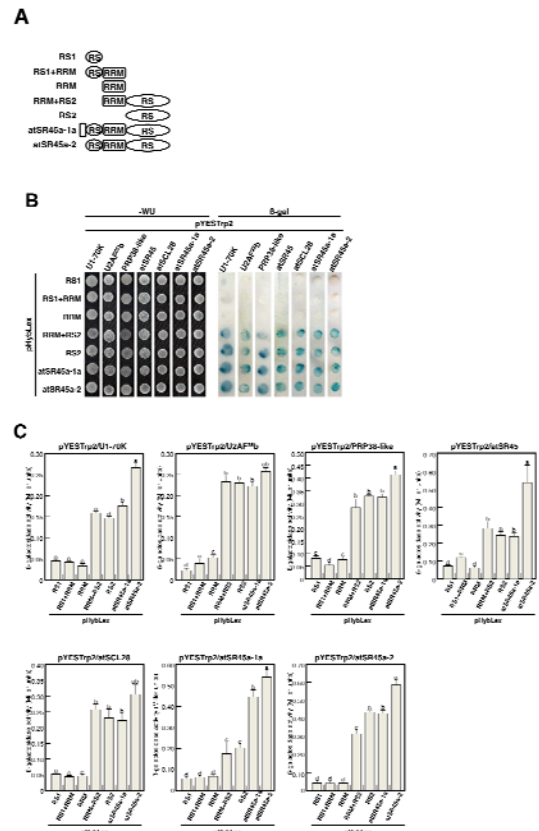


図5 酵母 two-hybrid 法によるスプライシング因子との相互作用に必要な *atSR45a* のドメインの同定

A. 解析に用いた *atSR45a* の各ドメイン

B. フィルターアッセイによる *atSR45a* タンパク質とスプライシング因子との相互作用解析

C. β -galactosidase 活性

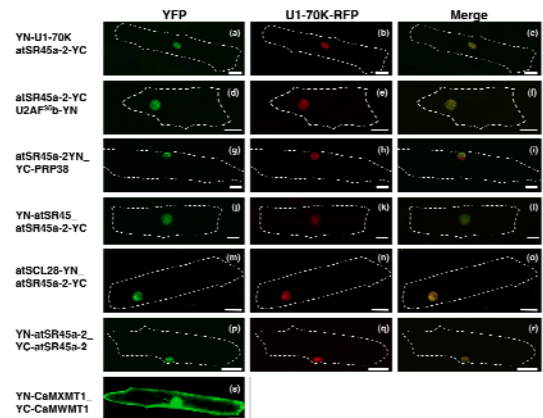


図6 BiFC 法による *atSR45a* とスプライシング因子との *in vivo* 相互作用解析

YN-U1-70K, *atSR45a*-YC, および U1-70K-RFP (a, b, および c), *U2AF^{35b}*-YN, *atSR45a*-YC, および U1-70K-RFP (d, e, および f), YC-PRP38, *atSR45a*-YC, および U1-70K-RFP (g, h, および i), YN-*atSR45*, *atSR45a*-YC, および U1-70K-RFP (j, k, および l), *atSCL28*-YN,

atSR45a-YC、および U1-70K-RFP (m, n, および o)、YN-atSR45a、YC-atSR45a、および U1-70K-RFP (p, q, および r)、YN-CaMXMT1 および YC-CaMWM1 (s)

以上より、atSR45a は様々なスプライシング因子との相互作用を介して、スプライシングの制御因子として機能していることが示唆された(図 10) (Tanabe et al., *Plant Mol. Physiol.* In press)。

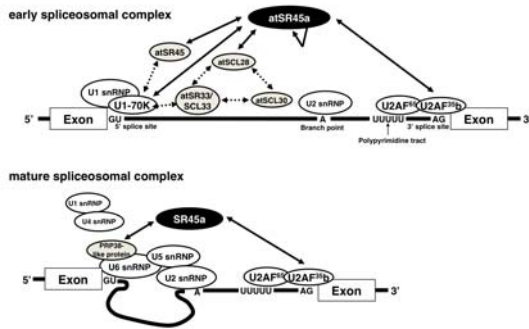


図 10 スプライソソーム形成における atSR45a、snRNP、およびその他スプライシング因子との相互作用モデル

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)

① Tanabe, N., Kimura, A., Yoshimura, K., Shigeoka, S. Plant-specific SR-related protein atSR45a interacts with spliceosomal proteins in plant nucleus. *Plant Mol. Biol.* in press

② Tanabe, T., Kimura, A., Yoshimura, K., Shigeoka, S. (2008) Identification of interacting factors with a high-light responsible SR protein, atSR45a, involved in the regulation of alternative splicing in *Arabidopsis*. *Photosynthesis. Energy from the Sun*, 1347-1350

③ 田部記章、吉村和也、重岡 成 選択的スプライシングを介した植物の環境ストレス応答/耐性機構 -セリン/アルギニンリッチ (SR) タンパク質の関与- (2008) *化学と生物* 46, 224-226

④ Tanabe, N., Yoshimura, K., Kimura, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S. (2007) Differential expression of alternatively spliced mRNAs of *Arabidopsis* SR protein

homologues, atSR30 and atSR45a, in response to environmental stress. *Plant Cell Physiol.* 48, 1036-1049.

[学会発表] (計 11 件)

① 田部記章、森達也、木村彩子、吉村和也、重岡 成 2009年3月29日 強光応答性SRタンパク質atSR45aのスプライソソーム形成に果たす役割 農芸化学学会 2009 年度大会 (福岡)

② 田部記章、吉村和也、木村彩子、森 達也、重岡 成 2009年3月22日 選択的スプライシング制御機構におけるストレス応答性SRタンパク質atSR30 およびatSR45aの機能解析 第50回日本植物生理学会年会 (名古屋)

③ 田部記章、吉村和也、木村彩子、重岡 成 2008年12月9日 強光応答性SRタンパク質atSR45aのpre-mRNAスプライシングにおける役割 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)

④ 田部記章、吉村和也、木村彩子、重岡 成 2008年11月15日 植物SRタンパク質、atSR30 およびatSR45aによる強光応答性選択的スプライシング制御 第23回 ユーグレナ研究会 (奈良)

⑤ 田部記章、浦野由佳、吉村和也、重岡 成 2008年3月27日 グルタレドキシンatGRXS13 の選択的スプライシング産物の生理機能の解析 農芸化学学会 2008 名古屋大会 (名古屋)

⑥ 木村彩子、高橋香織、田部記章、吉村和也、重岡 成 2008年3月27日 強光ストレス応答性SRタンパク質、atSR30、atSR45aによる選択的スプライシング制御機構の解析 農芸化学学会 2008 名古屋大会 (名古屋)

⑦ 田部記章、木村彩子、高橋香織、吉村和也、重岡 成 2008年3月21日 強光応答性SRタンパク質atSR45aのスプライソソーム形成における役割 第49回日本植物生理学会年会 (札幌)

⑧ 田部記章、木村彩子、吉村和也、重岡 成 2007年12月12日 強光応答性SRタンパク質atSR45aによる選択的スプライシング制御機構の解析 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜)

⑨ 田部記章、木村彩子、高橋香織、吉村和也、重岡 成 2007年9月22日 強光応答性スプライシング制御因子atSR45aの相互作用因子の同定 日本農芸化学会 関西支部中部

支部合同大会（愛知）

⑩ 吉村和也、田部記章、木村彩子、重岡 成
2007年9月2日 選択的スプライシングによる植物の環境ストレス応答 日本進化学会
第9回京都大会（京都）シンポジウム

⑪ Tanabe, N., Kimura, A., Yoshimura, K.,
Shigeoka, S. 2007年7月22日
Identification of interacting factors
with a high-light responsible SR protein,
atSR45a, involved in the regulation of
alternative splicing in Arabidopsis. 14th
Photosynthesis Congress (22nd to 27th July
2007, at the SECC in Glasgow UK)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 和也 (YOSHIMURA KAZUYA)
中部大学・応用生物学部・講師
研究者番号：90379561