

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06714

研究課題名(和文)植物におけるリボソームストレスの感知とその情報伝達機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of ribosome stress response in plants: mechanisms of stress sensing and signalling system

研究代表者

堀口 吾朗 (Horiguchi, Gorou)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：70342847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳を担うリボソームの生合成は非常に複雑で、その生合成エラーは避けることができない。このような細胞の生存を脅かすエラーに適切に対処する仕組み、すなわちリボソームストレス応答は、動物細胞で詳細に解析されているが、植物では解析が始まったばかりである。本研究ではシロイヌナズナを用い、RING fingerタンパク質SZK2がRPL12を基質とするE3 ubiquitin ligaseであり、リボソームストレス応答の正の制御因子であること、およびSZK2と相互作用するリボソームストレス応答の負の制御因子などを見出した。また異常型リボソームタンパク質の存在がリボソームストレスを誘導していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物のストレス応答のマスター因子であるp53のホモログは植物には存在しない。そのため、植物のリボソームストレス応答の実体はほとんど不明であった。本研究ではRING fingerタンパク質であるSZK2がRPL12を基質とするE3 ubiquitin ligaseであり、リボソームストレス応答の正の制御因子として働くことを示した。また、これらの周囲で働くと考えられる多数の因子の同定にも成功した。これらの成果は、植物独自のリボソームストレス応答機構の存在を証明するとともに、植物のストレス応答研究に新たな展開をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The ribosome is the most complex ribonucleoprotein particle in cells. Due to its complexity, its biogenesis is error-prone and may lead to cytotoxicity. To appropriately handle this potential risk, ribosome stress response plays an important role in animal cells yet a corresponding mechanism in plants has just been emerging. In this study, we investigated ribosome stress response in Arabidopsis thaliana and found that the RING finger protein SZK2 promotes ribosome stress response. We found that SZK2 is a functional E3 ubiquitin ligase and ubiquitinates and destabilizes RPL12. Furthermore we identified SZK2 interactors that act as negative regulators of ribosome stress response. In addition, a C-terminally truncated RPL4D strongly localizes in the nucleolus and can induce ribosome stress response.

研究分野：植物発生学

キーワード：シロイヌナズナ リボソーム リボソームストレス応答 NAC型転写因子 E3 ubiquitin ligase

1. 研究開始当初の背景

リボソームは細胞内で最も複雑な RNA-タンパク質複合体であり、翻訳を実行する因子として全ての生物にとって必要不可欠な役割を持つ。その生合成は極めて複雑であり、生合成エラーがしばしば起きる。これを放置すると、誤翻訳等により細胞の恒常性が損なわれると考えられる。動物では、細胞質型リボソーム生合成異常は p53 を活性化し細胞周期や細胞死を導くことで、がん化が抑制される。このような応答をリボソームストレス応答と呼ぶ。一方、植物ではその存在がごく最近になって示されたばかりであり、詳細はほとんど不明であった。

本研究グループでは、シロイヌナズナの細胞質型リボソームタンパク質欠損変異 *rpl4d* が葉の向軸側の運命促進因子を欠損する *asymmetric leaves2 (as2)* の表現型を促進し、棒状化した葉を形成することを見出していた。これをリボソームストレス応答の形態的な指標として利用し、抑圧変異株スクリーニングを行うことで、NAC 型転写因子 (SZK1, SZK3, SZK4, SRIW1)、RING finger タンパク質 (SZK2)、RPL12A, B, C などリボソームストレス応答の正の制御因子として見出していた。4 種の NAC 型転写因子遺伝子は *rpl4d* 変異によって発現上昇し、その発現上昇には SZK2 と RPL12 が必要であることから、SZK2 および RPL12B がリボソームストレス応答の比較的初期過程で働くことが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、植物独自のリボソームストレスの感知・応答機構の分子実態を解明することを大きな目的とした。具体的には、SZK2 と RPL12 のリボソームストレス応答における役割の生化学的解析、SZK2 がリボソームストレスによって活性化される条件の検討、新規リボソームストレス応答関連因子の同定を行なった。

3. 研究の方法

(1) SZK2 と RPL12 の役割を明らかにするため、SZK2 の E3 ubiquitin ligase 活性を *in vitro* ubiquitination assay 等によって解析した。また、SZK2 と RPL12B が相互作用することから、RPL12B が基質となるかを解析した。

(2) SZK2 の作用機構について手がかりを得るため、SZK2-GFP を発現する植物を用いて IP-MS 解析を行い、相互作用因子候補をリストアップした。次いで、それらを *as2 rpl4d* および *as2 rpl4d szk2* 背景で CRISPR/Cas9 法により変異導入し、リボソームストレスにおける役割を検討した。網羅的 yeast two-hybrid 解析のデータベース上の SZK2 相互作用因子についても同様の遺伝学的解析を行なった。

(3) 次世代シーケンシング解析によってこれまでに単離した *as2 rpl4d* および *as2 rpl4d szk2* のサブプレッサー変異株の変異部位を抽出し、原因遺伝子を特定した。

(4) *rpl4d-3* は 1 塩基欠失によるフレームシフトを生じ、C 末端側が欠失した異常なタンパク質をコードする。*rpl4d-3* mRNA は nonsense mediated mRNA decay (NMD) によって大部分が分解されるものの、*RPL4D* の発現レベルは非常に高いため、残存する *rpl4d-3* mRNA から合成される *rpl4d-3* タンパク質がリボソームストレスの引き金となる可能性が排除できない。そこで、*rpl4d-3* cDNA を過剰発現させた系統を作成し、それらのリボソームストレス応答を解析した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* ubiquitination assay によって SZK2 は自己ユビキチン化活性を持つこと、および RPL12B をユビキチン化させることが明らかになった。また *Nicotiana benthamiana* で GFP 標識した RPL12B を発現させると SZK2 依存的に不安定化することから、SZK2 は RPL12B を基質とする E3 ubiquitin ligase であることが明らかになった。また、点変異を導入することで ubiquitin ligase 活性を消失した SZK2 を *as2 rpl4d szk2* で発現させても、表現型を相補できないこと、および RING ドメインの保存されたシステインにアミノ酸置換を持つ *szk2* アリルが *as2 rpl4d* の表現型を抑圧できることから、SZK2 のユビキチン化活性がリボソームストレス応答に必要であることも示された。一方、SZK2 と RPL12B はリボソームストレス応答の正の制御因子であるため、RPL12B のユビキチン化による分解のリボソームストレス応答における意義を解明することが今後の重要課題である。

(2) SZK2-GFP の IP-MS 解析によって見出されたタンパク質、およびデータベース (<https://thebiogrid.org/>) 上の SKZ2 相互作用因子について、*as2 rpl4d*, *as2 rpl4d szk2* の背景で変異導入を行った結果、*as2 rpl4d szk2* の表現型を抑制するもののみが得られた。これらはリボソーム生合成因子、プロテアソーム、核輸送タンパク質、翻訳因子、足場タンパク質等に分類されるものであった。SKZ2-GFP は野生型背景で発現させており、ユビキチン化によって相互作用因子が分解されることを防ぐために、ubiquitin ligase 活性を持たないものを用いている。これらの因子は、遺伝学的には SZK2 と相互作用することによってリボソームストレスを負に制御していることが示唆される。従って、これらが SZK2 の基質となるかを解析することや、リボ

ソームストレス下での SZK2 相互作用因子の探索が今後必要である。

(3) *as2 rpl4d* のサプレッサーからは miRNA 耐性変異を持つ *phabulosa-D (phv-D)* と *altered meristem program1 (amp1)* が見出された。これらは葉の向軸側運命を決定する class III HD-ZIP 遺伝子の働きを強める。そのため、*as2 rpl4d* で強まっていた背軸化能が緩和されたことで葉の扁平性が回復したものと考えられる。また、細胞周期を制御する DREAM complex の構成因子も見出された。*as2 rpl4d* の背軸化した葉は極めて小さいため細胞周期の停止が起きている可能性が考えられる。DREAM complex 関連因子の変異により細胞周期の停止が解除されることで葉の形態が扁平に回復する可能性が示唆される。

as2 rpl4d のサプレッサー変異株からはさらに、SZK1, 3, 4, SRIW1 とは異なる NAC 型転写因子のアミノ酸置換変異が見出されたが、この遺伝子を CRISPR/Cas9 法で *as2 rpl4d szk2* 背景で破壊すると、葉が背軸化した。つまり、SZK1 などとは異なりリボソームストレス応答の負の制御因子であることが示唆されたため、GENBU1 (GMB1) と名付けた。興味深いことに、GMB1 のホモログ GMB2 もまたリボソームストレス応答の負の制御因子であり、両者は *as2 rpl4d szk2* のサプレッサーから見出されたヒストン脱メチル化酵素(GMB3)と相互作用すること、RPL12B と GMB2 が相互作用することも判明した。この結果から、SZK2-RPL12 モジュールの下流でヒストン修飾の変化がリボソームストレス応答に必要な可能性が示唆される。SZK2 がこれらのヒストン修飾関連因子を基質とするかに興味を持たれる。

一方、*as2 rpl4d szk2* のサプレッサー変異株からはリボソーム生合成因子の一種 *APUM23* が見出された。*apum23* は *as2* のエンハンサー変異としての報告があるため、*rpl4d* と *apum23* によってより強力にリボソームストレス応答がかかった可能性が示唆される。この場合、SZK2 非依存的にリボソームストレス応答を引き起こす経路の存在が示唆される。あるいは、*APUM23* がリボソームストレス応答の負の制御因子である可能性も残る。この場合、*APUM23* のリボソーム生合成因子としての機能と情報伝達因子としての機能を切り分ける必要がある。

(4) *rpl4d-3* cDNA を過剰発現する形質転換体 (*pRPL4D::rpl4d-3*, *pRPL4D::rpl4d-3-GFP*) を作成したところ、*rpl4d-3* のように葉の先端部が尖る表現型を示した。一方、*rpl4d-3* とは異なり、葉の細胞増殖が強く抑制された。*as2-1* 背景では *as2 rpl4d-3* よりも弱いものの、葉の背軸化が観察された。これらの植物では *SZK1* の発現上昇が認められた。また、*RPL4D-GFP* は主に細胞質に存在するのに対し、*rpl4d-3-GFP* は核小体に存在することから、*rpl4d-3-GFP* がリボソーム生合成を攪乱し、リボソームストレス応答を誘導する可能性が示唆された。

(5) この研究で得られた種々の遺伝子の発現をプラスチドリボソームの合成に欠損を持つ *rfc3* において解析したところ、*SZK1*, *SZK3*, *SZK4* の発現が顕著に増加していることが明らかになった。この結果は、*SZK1* をはじめとしたリボソームストレス応答因子が、プラスチドリボソームの生合成異常にも応答する可能性を示唆する。この可能性については 22 年度から採択された基盤 C において解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagashima Yumi, Ohshiro Katsutomo, Iwase Akiyasu, Nakata Miyuki T., Maekawa Shugo, Horiguchi Gorou	4. 巻 9
2. 論文標題 The bRPS6-Family Protein RFC3 Prevents Interference by the Splicing Factor CFM3b during Plastid rRNA Biogenesis in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 328 ~ 328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants9030328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀口吾朗、長嶋友美、前川修吾、中田未友希、塚谷裕一
2. 発表標題 シロイヌナズナrfc3変異における側根形成異常にはリボソームストレス応答因子SZK1が関与する
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川修吾、五十嵐幹太、深田かなえ、高原正裕、西村奎亮、塚谷裕一、堀口吾朗
2. 発表標題 リボソームストレスシグナル伝達の鍵因子RING型ユビキチンリガーゼSZK2とリボソームタンパク質RPL12Bの関係
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川修吾、五十嵐幹太、深田かなえ、高原正裕、西村奎亮、塚谷裕一、堀口吾朗
2. 発表標題 Destabilization of RPL12B by ubiquitin ligase SZK2-mediated ubiquitination is required for ribosome stress response
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長嶋友美、大城克友、岩瀬晃康、中村菜理、中田未友希、前川修吾、堀口吾朗
2. 発表標題 プラスチックタンパク質RFC3欠損変異体の主根伸長阻害の解析
3. 学会等名 日本植物形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川修吾、五十嵐幹太、深田かなえ、高原正裕、塚谷裕一、堀口吾朗
2. 発表標題 植物リボソームストレスのシグナル伝達因子SZK2とRPL12Bの相互作用の意義
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長嶋友美、大城克友、岩瀬晃康、中村菜理、中田未友希、前川修吾、堀口吾朗
2. 発表標題 RFC3とスプライシング因子SPRT2/CFM3bによるプラスチックリボソーム生合成および側根形成制御
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長嶋友美、前川修吾、中田未友希、塚谷裕一、堀口吾朗
2. 発表標題 プラスチックおよび細胞質リボソームの生合成異常によって引き起こされるストレス応答経路の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川修吾、五十嵐幹太、深田かなえ、高原正裕、西村奎亮、塚谷裕一、堀口吾朗
2. 発表標題 リボソームストレスシグナル伝達の鍵因子RING型ユビキチンリガーゼSZK2とリボソームタンパク質RPL12Bの役割
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高柳なつ、荒江星拓、高橋洋和、清水隆之、堀口吾朗、相田光宏、深城英弘、増田建、大谷美沙都
2. 発表標題 植物プラスチックストレスはpre-mRNAスプライシング制御を介して側根形態に反映される
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高柳なつ、荒江星拓、高橋洋和、清水隆之、堀口吾朗、相田光宏、深城英弘、増田建、大谷美沙都
2. 発表標題 プラスチックシグナル依存的な側根形成制御におけるpre-mRNAスプライシングの役割
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前川修吾、西川幾音、堀口吾朗
2. 発表標題 シロイヌナズナIMPDHとリボソームストレスの関係
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長嶋友美、藤井佑郁、伊藤早紀、大城克友、大林祝、杉山宗隆、塚谷裕一、堀口吾朗
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるプラスチド型および細胞質型リボソームストレス応答経路の比較解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

立教大学理学部生命理学科 植物分子発生学研究室ホームページ https://sites.google.com/rikkyo.ac.jp/rikkyo-horiguchi-lab/home
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古賀 皓之 (Koga Hiroyuki) (30783865)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教 (12601)	
研究分担者	前川 修吾 (Maekawa Shugo) (80711209)	立教大学・理学部・助教 (32686)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------