

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380188

研究課題名（和文）植物の小胞体タンパク質品質管理機構の分子メカニズムに関する研究

研究課題名（英文）Study of molecular mechanism of the ER quality control in plants

研究代表者

小泉 望（KOIZUMI NOZOMU）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20252835

研究成果の概要（和文）：

小胞体と呼ばれる細胞内区画でタンパク質の立体構造に異常が生じると、その情報が核へと伝わり立体構造形成を助けるシャペロンを動員するために遺伝子の活性化が起こる。この小胞体から核への情報伝達経路に小胞体膜上にあるセンサータンパク質 IRE1 による細胞質スプライシングが関与することを植物で初めて見出した。細胞質スプライシングの結果、膜に結合している転写因子 bZIP60 が活性型となり核へ移行して標的遺伝子の活性化に関わると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

If proteins with abnormal structures accumulate in the intracellular compartment called the endoplasmic reticulum (ER), such condition is transmitted to the nucleus causing activation of genes for chaperones that assist the correct folding of proteins. We found that a sensor protein IRE1 localizing on the ER membrane is involved in cytoplasmic splicing as the first report of cytoplasmic splicing in plants. It was considered that a membrane bound transcription factor bZIP60 was converted to active form losing its transmembrane domain by the splicing and translocated to the nucleus activating target genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	8,700,000	2,610,000	11,310,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス、シロイヌナズナ、転写因子、スプライシング、シャペロン

1. 研究開始当初の背景

植物をバイオ医薬品などの有用タンパク質の生産に用いる試みはモレキュラー・ファーマリングあるいは Plant Made Pharmaceuticals (PMP) と呼ばれ、植物バイオテクノロジーの新しい潮流の 1 つである。モレキュラー・ファーマリングにおいて目的とするタンパク質の合成の場に小胞体を選ぶ場合、転写、翻訳レベルを向上させても目的のタンパク質が

期待通りに蓄積しない例が少なくなく、ボトルネックの 1 つとなっている。同様の現象は動物細胞で外来タンパク質を過剰発現させようという場合にも見られ、その要因として正しい構造を形成したタンパク質のみを分泌系に送るための「小胞体のタンパク質品質管理機構」が破綻することが挙げられる。

真核生物は品質管理機構の破綻を回避するために「小胞体ストレス応答」と呼ばれる

システムを持つ。具体的には不良タンパク質が蓄積すると、シャペロン遺伝子の発現誘導を介したフォールディング能力の増強や小胞体関連タンパク質分解と呼ばれる不良タンパク質の細胞質への逆輸送とプロテアソームでの分解が起こる。

ヒトを始めとする動物では、様々な疾患との密接な関係などから、小胞体ストレス応答の分子機構が国内外で盛んに研究され、興味深い発見が相次いでいた。特に細胞が小胞体内の不良タンパク質の蓄積を感知し、シャペロン遺伝子の誘導やタンパク質分解機構を活性化させる情報伝達機構について多くの知見が報告され、著名な教科書である「細胞の分子生物学」の第5版に、この分子機構が初めて紹介された。酵母では小胞体膜に局在する IRE1 と呼ばれる受容体型タンパク質キナーゼが RNase ドメインを持ち、小胞体ストレス応答時には転写因子 *HAC1* mRNA のスプライシングを触媒する。その結果、活性型 HAC1 タンパク質が合成され、小胞体ストレス応答で誘導される遺伝子の転写を活性化する。動物でも IRE1 が *XBPI* mRNA の細胞質スプライシングを触媒するとともに、タンパク質レベルでの切断により活性化される膜結合型転写因子 ATF6 も標的遺伝子の発現誘導に関与する。このように研究開始当初から過去 10 年余りにおいて、酵母、動物でこの研究領域が非常に進展していた。

一方で、植物における小胞体ストレス応答の分子機構に関する知見は限られていた。研究代表者らがシロイヌナズナ、イネから酵母、動物のストレスセンサーである IRE1 ホモログを単離するとともに、シロイヌナズナの膜結合型転写因子 bZIP60 が小胞体ストレス応答に関わることを報告し、米国のグループがやはり膜結合型転写因子である bZIP28 が小胞体ストレス応答に関わると報告していたが、動物等と比べると、多くの点が不明であった。

2. 研究の目的

背景において述べたように植物における小胞体ストレス応答の分子機構に関わる遺伝子やその機能については不明の点が多く残されていた。また植物の小胞体ストレス応答の生理的な重要性についても殆ど知見がなかった。

特に IRE1 は酵母における小胞体ストレス応答の唯一のセンサーであることから、そのホモログは植物でも何らかの機能を果たすことが予想はされたが、具体的な関与については不明であった。

一方、bZIP60 は膜結合ドメインを持つことから、動物の ATF6 と同様に小胞体膜に局在すると考えられた。実際、小胞体ストレス非存在下では bZIP60 は小胞体膜に局在し、小

胞体ストレスに応じて、切断型と考えられる低分子量のタンパク質が検出された。動物の ATF6 は小胞体からゴルジ体へ運ばれた後、S1P、S2P と呼ばれるプロテアーゼで 2 段階の切断を受けて、N 末側が核へ移行し転写因子として機能する。シロイヌナズナにも S1P、S2P ホモログが存在するが、これらの遺伝子破壊株においても低分子量の活性型 bZIP60 が検出されたことから、bZIP60 の活性化に S1P、S2P が関与しないことが示唆され、bZIP60 の活性化機構は不明であった。また bZIP60 の遺伝子破壊株においても複数の遺伝子が小胞体ストレスにより誘導されることから、bZIP60 以外の転写因子の存在が示唆された。

そこで、本研究では、(1) IRE1 の標的遺伝子の同定、(2) bZIP60 の活性化機構の解明、(3) bZIP60 以外の転写因子の同定と解析、を研究目的の中心とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの遺伝子破壊株の利用：
野生型シロイヌナズナに加え bZIP60、bZIP28、S1P、S2P、IRE1A、IRE1B 遺伝子に T-DNA が挿入された遺伝子破壊株を、必要に応じて交配し、二重変異体を作成して実験に用いた。

(2) 小胞体ストレス処理：
無菌発芽させ液体培地中で 10~14 日間生育させてシロイヌナズナの芽生えに糖鎖合成阻害剤ツニカマイシンを最終濃度 5mg/L とするように加え、適当な期間培養した後、サンプリングを行った。

(3) bZIP60 タンパク質の検出：
大腸菌で発現させた bZIP60 により抗体を作成し、ウエスタン法でタンパク質を検出した。

(4) 遺伝子発現の検出：
必要に応じ定量的 PCR、ノザンプロット法、マイクロアレイにより転写産物を検出した。

(5) 細胞質スプライシングの検出：
耐熱性逆転写酵素を用いた RT-PCR により行った。

4. 研究成果

(1) IRE1 二重変異体はツニカマイシンに対する感受性が亢進する：

シロイヌナズナに存在する 2 つの IRE1 ホモログ、IRE1A と IRE1B の二重遺伝子破壊変異体（以下、二重変異体）を交配により作出した。ツニカマイシンを含んだ培地において発芽率を調べたところ、この二重変異体は、野生型あるいは一重変異体と比べて明らかに高い感受性を示した。このことから、シロイヌナズナの IRE1 ホモログが小胞体ストレス応答に関与するするとともに 2 つの遺伝子の機能が冗長であることが明らかとなった。

(2) IRE1 と bZIP60 の標的遺伝子の多くが重複する：

ツニカマイシン処理有無の野生型と IRE1 二

重変異体を用いて、マイクロアレイ解析を行った。ツニカマイシン処理で誘導される遺伝子の多くの誘導が IRE1 二重変異体では抑制されていた。さらに、これらの遺伝子の多くは研究代表者らが bZIP60 変異体を使って以前に行ったマイクロアレイ解析において誘導が抑制されていた遺伝子と重複していた。つまり、IRE1 と bZIP60 が同じ情報伝達系で機能していることが示唆された。

(3) IRE1 二重変異体では活性化型 bZIP60 が検出されない：

ツニカマイシン処理を施した IRE1 二重変異体からタンパク質を抽出し、ウェスタン法により活性化型 bZIP60 の検出を行ったところ、野生型あるいは一重変異体では見られる低分子量の活性化型と考えられる bZIP60 が見られなかった。この結果から IRE1 が bZIP60 の活性化を制御していることが示唆された。

(4) bZIP60 mRNA は特徴的なステムループ構造を取る：

bZIP60 mRNA の二次構造予測を行ったところ、HAC1 や XBP1 のスプライシングで保存されている 2 つのステムループ構造が見られた。さらに興味深いことに、両者のスプライシングで保存されている塩基がシロイヌナズナの bZIP0 およびデータベース上の他の植物の bZIP60 ホモログにも完全に保存されていた。このことから bZIP60 mRNA が IRE1 によるスプライシングを受けることが示唆された (図 1 参照)。

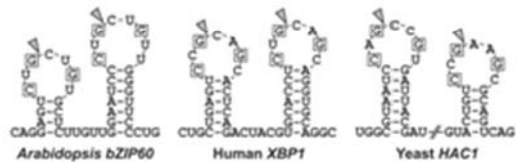


図 1 保存されたステムループ構造

(5) bZIP60 mRNA は IRE1 依存的にスプライシングを受ける：

in silico の解析から bZIP60 mRNA が 23 塩基のスプライシングを受けることが示唆されたため、このスプライシングを検出するプライマーセットを設計し、ツニカマイシン処理を施した植物から調整した RNA を鋳型に RT-PCR を行ったところ、目的のサイズの増幅産物が見られた。さらにこの cDNA 断片をクローニングしてシーケンスしたところ予想した通りの配列を示した。このスプライシングはツニカマイシン処理に依存するとともに IRE1 の二重変異体では検出されなかった。以上のことから、bZIP60 mRNA は IRE1 依存的にスプライシングを受けることが示された。

(6) スプライシングされた bZIP60 mRNA から活性化型タンパク質が翻訳される：

スプライシングを受ける前の bZIP60 mRNA からは 295 アミノ酸からなるタンパク質が翻訳

されると考えられ、スプライシングにより生じた mRNA からは 258 アミノ酸からなるタンパク質が生じると考えられた。人工的に膜結合ドメイン以降を欠落させた活性化型 bZIP60 は 216 アミノ酸からなる。この大きさの違いは 23 塩基のスプライシングの結果フレームシフトにより新しい ORF が生じた結果と考えられた。つまり活性化型の低分子の bZIP60 はタンパク質分解により生じるのではなく、IRE1 によるスプライシングの結果生じることと考えられた (図 2 参照)。

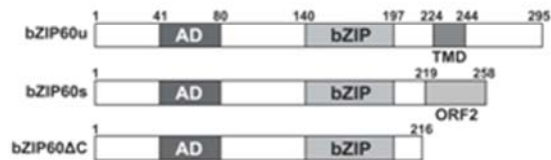


図 2 種々の bZIP60 の構造

bZIP60u：全長型由来

bZIP60s：スプライシング型由来

bZIP60 ΔC：人工的に作成した活性化型

(7) bZIP28 は小胞体ストレス応答に関与する：

小胞体ストレス応答に関わる bZIP60 以外の転写因子の候補として、膜結合型転写因子 bZIP28 が報告されていた。また、その活性化には動物の ATF6 と同様に S1P、S2P が関与することも示唆されていた。そこで、bZIP28、S1P、S2P の遺伝子破壊株にツニカマイシン処理を施し、小胞体ストレスで誘導される遺伝子の発現誘導を定量的 PCR で調べたところ、野生型と比べてツニカマイシン処理後 2 時間ではその誘導が若干抑制されていた。誘導抑制が各変異体で同様であったことから bZIP28 は S1P、S2P によって制御されると考えられた。しかし、これらの変異体で観察された誘導抑制は bZIP60 変異体や IRE1 二重変異体で見られた顕著な抑制ではなく、S1P、S2P によって制御される bZIP28 の小胞体ストレス応答への関与は大きくないと考えられた。

(8) 結論：

シロイヌナズナの細胞質ストレス応答においては、IRE1 が bZIP60 mRNA を切断し、その結果、活性化型の bZIP60 タンパク質が合成されることが明らかとなった。つまり本研究で掲げた目的(1)、(2)を同時に達成することができた。IRE1 による bZIP60 のスプライシングは核内のスプライソソームで起こるスプライシングとは異なる細胞質スプライシングである。細胞質スプライシングの検出は植物では初めての例である。bZIP60 は HAC1、XBP1 と同様に IRE1 により制御されるが、HAC1、XBP1 の場合はスプライシングの結果、活性化ドメインを持った分子量の大きな転写因子が合成されるのに対して、bZIP60 の場合はス

ブラッシングにより分子量が減少する。また活性化される前の bZIP60 はすでに活性化ドメインを持っており、活性化は小胞体膜から核への移行が可能になることによって達成される。つまり、植物の IRE1 による制御には酵母、動物と共通している部分がある一方で、植物独自の機構があることが明らかとなった。この成果は、植物の小胞体ストレス応答の分子機構の解明における大きな前進である。目的(3)に関しては、bZIP28 が SIP、S2P により制御され、IRE1-bZIP60 とは独立して、小胞体ストレス応答に有る程度関与することを明らかとした。しかし、小胞体ストレス応答を制御する他の転写因子の存在が強く示唆され、新たな研究課題となった。

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 13 件)

- ① 小泉 望、岩田雄二 (2011) 植物における小胞体の品質管理-病原菌認識機構の解析から見えてきたもの-, 化学と生物 49: 88-91. 査読有
- ② Tanaka, Y., Nakamura, S., Kawamukai, M., Koizumi, N., & Nakagawa, T. (2011) Development of series of gateway binary vectors possessing a tunicamycin resistance gene as a marker for transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (in press)*. 査読有
- ③ Iwata, Y., Nishino T., Takayama S., & Koizumi, N. (2010) Characterization of a plant-specific gene Induced by endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74: 2087-2091. 査読有
- ④ Iwata, Y., Sakiyama, M., Lee M.H., & Koizumi, N. (2010) Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* to tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress. *Plant Biotechnology*, 27:161-171. 査読有
- ⑤ Iwata, Y., Yoneda, M., Yanagawa, Y., & Koizumi, N. (2009). Characteristics of the nuclear form of the Arabidopsis transcription factor AtbZIP60 during the endoplasmic reticulum stress response. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 865-869. 査読有
- ⑥ Iwata, Y., Fedoroff, N. V., & Koizumi, N. (2009). The Arabidopsis membrane-bound transcription factor AtbZIP60 is a novel plant-specific

- endoplasmic reticulum stress transducer. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 514-516. 査読有
- ⑦ Koizumi, N., & Iwata, Y. (2008). Construction of a binary vector for transformation of *Arabidopsis thaliana* with a new selection marker. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72, 3041-3043. 査読有
 - ⑧ Iwata, Y., Fedoroff, N. V., & Koizumi, N. (2008). Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell*, 20, 3107-3121. 査読有
 - ⑨ Tateda, C., Ozaki, R., Onodera, Y., Takahashi, Y., Yamaguchi, K., Berberich, T., Koizumi N., & Kusano T. (2008). NtbZIP60, an endoplasmic reticulum-localized transcription factor, plays a role in the defense response against bacterial pathogens in tobacco. *Journal of Plant Research*, 121, 603-611. 査読有
 - ⑩ Tajima, H., Iwata, Y., Iwano, M., Takayama, S., & Koizumi, N. (2008). Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374, 242-247. 査読有
 - ⑪ Iwata, Y., Yamada, T., & Koizumi, N. (2008). Transcriptional regulation of an Arabidopsis gene encoding a CCT domain-containing protein during endoplasmic reticulum stress. *Plant Biotechnology*, 25, 397-402. 査読有
 - ⑫ Tajima, H., Iwata, Y., & Koizumi, N. (2008). Endoplasmic reticulum stress response and regulated intramembrane proteolysis in plants. *Plant Biotechnology*, 25, 271-278. 査読有
 - ⑬ Akaboshi, M., Hashimoto, H., Ishida, H., Saijo, S., Koizumi, N., et al. (2008). The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *Journal of Molecular Biology*, 377, 246-257. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 田中優史、中村真也、真野昌二、大西真人、川向誠、佐藤豊、石黒澄衛、小泉望、中川剛。ピアラフォス、ツニカマイシン選択が可能植物形質転換用Gatewayバイナリーベクターシリーズの開発, 日本農芸化学

- 会2011年度大会, 2011年3月26日, 京都
- ② 長島幸広, 李美賢, 小泉望, シロイヌナズナ膜結合型転写因子 bZIP60 の Fumonisin B1 による活性化, 日本植物生理学会, 2011年3月20日, 仙台(宮城)
- ③ 小泉望. The ER Stress Response in Arabidopsis, Molecular Farming: Promises and Challenges (Korean Society for Molecular Farming Research), 2011年1月18日, 韓国ソウル
- ④ 小泉望. Membrane-bound Transcription Factors involved in the Arabidopsis ER stress response, BMB2010(第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同大会), 2010年12月8日, 神戸
- ⑤ 李美賢, 崎山雅代, 長島幸広, 小泉望. シロイヌナズナ膜結合型転写因子の Fumonisin B1 による活性化, 日本農芸化学関西支部大会, 2010年10月3日, 奈良
- ⑥ Mi-Hyun Lee, Masayo Sakiyama, Yukihiro Nagashima and Nozomu Koizumi. An Arabidopsis transcription factor AtbZIP60 involved in the unfolded protein response also regulates genes induced by fumonisin B1, 国際シンポジウム: タンパク質の社会, 2010年9月13日, 奈良
- ⑦ 李美賢, 崎山雅代, 長島幸広, 小泉望. シロイヌナズナの膜結合型転写因子 bZIP60 による PDR12 の制御, 日本植物細胞分子生物学会, 2010年9月3日, 仙台
- ⑧ Mi-Hyun Lee, Yuji Iwata, & Nozomu Koizumi. A membrane-bound transcription factor mediates two independent signaling pathways, 第21回国際シロイヌナズナ研究会議, 2010年6月8日, 横浜
- ⑨ Nozomu Koizumi. Membrane-bound transcription factor in Arabidopsis mediates two independent signaling, Crop Functional Genomics 2010 (Korean Society for Plant Biotechnology) 2010年4月16日, 韓国済州島
- ⑩ 李美賢, 小泉望. 小胞体ストレス応答を制御する転写因子のプログラム細胞死への関与, 日本植物細胞分子生物学会, 2010年7月30日, 湘南(神奈川)
- ⑪ Nozomu Koizumi, Hiromi Tajima, Nina V Fedoroff & Yuji Iwata. Regulation of the Arabidopsis ER stress response by membrane-bound bZIP transcription factors, Plant Biology 2009, 2009年7月20日, 米国ホノルル
- ⑫ 小泉望, 田嶋紘美, 岩田雄二. シロイヌナズナの膜局在型転写因子, 日本植物生理学

- 会, 2009年3月23日, 名古屋
- ⑬ 西野恒代, 李美賢, 岩田雄二, 岩野恵, 高山誠司, 小泉望. 小胞体ストレス応答遺伝子の花粉特異的発現, 日本植物細胞分子生物学会, 平成2008年9月2日, 吹田(大阪)

〔図書〕(計1件)

- ① Iwata, Y., Lee, M.H. & Koizumi, N.: Analysis of a transcription factor using transient assay in Arabidopsis protoplasts, in *Plant Transcription Factors*, Vol. 754. (eds. L. Yuan & S.E. Perry). Humana Press (2011) in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉望 (KOIZUMI NOZOMU)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 20252835