

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02950

研究課題名(和文)植物の細胞質スプライシングにおいて生じる「新たな読み枠」の機能

研究課題名(英文)Function of the new open reading frame appeared by cytoplasmic splicing in plants

研究代表者

小泉 望 (Koizumi, Nozomu)

大阪公立大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20252835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの細胞質ストレス応答では細胞質スプライシングにより膜貫通ドメインを持つbZIP60uがbZIP60sに変換され細胞体から核へ移行し転写因子として働く。bZIP60sは59アミノ酸をコードする読み枠を獲得し、この配列をORF2と呼ぶ。ZIP60sはORF2を持たないbZIP60 Cよりも顕著に高い転写活性化能を示した。ORF2のC末のNLSが実際に機能することをGFPの蛍光観察で確認した。NLS決失させると転写活性化能は低下したが、bZIP60 Cよりは高い値を示した。bZIP60sの活性化能の増強はタンパク質量には依存しないことが示され、タンパク質相互作用に寄与すると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物は多くの転写因子を持つが、その活性化機構は多様である。細胞質ストレス応答におけるbZIP型転写因子の活性化は細胞質スプライシングを介する非常にユニークなメカニズムによって起こる。特に興味深いのは酵母、ヒト、シロイヌナズナでは細胞質スプライシングで活性化される点では共通しているが、タンパク質の構造変化が大きく異なる点である。私たちはシロイヌナズナbZIP60の活性化に伴って新たな読み枠(ORF2)が生じることを明らかにしてきたが、その機能については全く不明であった。本研究ではORF2が転写活性化に非常に重要であることを明らかとするとともに、そのメカニズムについて多くの知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In the Arabidopsis ER stress response, cytoplasmic splicing converts bZIP60u to bZIP60s. bZIP60u contains a TMD and bZIP60s loses it, thereby bZIP60s translocates from the ER to the nucleus and acts as a transcription factor. In addition, bZIP60s acquires new ORF called ORF2. bZIP60s showed much higher transcriptional activity of BiP3 promoter than bZIP60 lacking ORF2. This result indicated that ORF2 has functions to enhance transcriptional activity of bZIP60s. This research aimed to clarify function of ORF2. We found that the NLS like sequence at the C-terminus of ORF2 and showed it to be a functional NLS using GFP. However, transcriptional activity bZIP60s lacking C-terminal NLS was lower than that of intact bZIP60s, the activity was still higher than that of bZIP60 lacking ORF2, indicating alternative mechanism. The enhanced activation capacity of bZIP60s was not dependent on the amount of protein. Thus, alternative mechanism may contribute to the activation capacity of bZIP60s.

研究分野：農学

キーワード：細胞質ストレス応答 シロイヌナズナ 転写因子 細胞質スプライシング

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な生物的、非生物学的あるいは発生過程における要因により小胞体でのタンパク質のフォールディングに支障がおこることがある。この状態に対処するために BiP に代表される小胞体シャペロンなどの遺伝子が誘導される現象を小胞体ストレス応答と呼ぶ<sup>1)</sup>。小胞体ストレス応答は酵母、哺乳動物、植物などの真核生物で広く保存されている。小胞体に局在するセンサータンパク質である IRE1 を介した細胞質スプライシングによって bZIP 型の転写因子が活性化されるシグナル伝達機構が真核生物で広く保存されている。つまり、IRE1 はその C 末端側にある RNase 活性により bZIP 型転写因子の mRNA の 2 つのステムループ構造を認識し切断する。その後、tRNA ligase により結合された mRNA は新しい読み枠を獲得し、当初とは異なるタンパク質が発現する<sup>2)</sup>。酵母では HAC1 mRNA、ヒトでは XBP1 mRNA が IRE1 の標的であり HAC1 と HBP1 タンパク質ではそれぞれ 8 及び 115 アミノ酸大きいタンパク質が生成する。モデル植物シロイヌナズナでは IRE1 の標的は bZIP60 mRNA であり、細胞質スプライシングの結果 295 アミノ酸からなる bZIP60u は、258 アミノ酸からなる bZIP60s に変換される。bZIP60u は膜貫通ドメインを持ち、非ストレス下では小胞体膜に局在する。bZIP60s では膜貫通ドメインが失われるので、小胞体から核へ移行し転写因子として働く。bZIP60s は膜貫通ドメインを失うことに加えて 59 アミノ酸からなる新規の読み枠を獲得する。この読み枠がコードするアミノ酸配列を ORF2 と呼ぶ。本研究開始当初 ORF2 の機能は不明であった。

### 2. 研究の目的

ORF2 が bZIP60 の転写活性化に関与するかどうかを確かめ、もし関与するならどのようなメカニズムによるのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物材料

bZIP60 の遺伝子破壊株は以前の研究で利用した T-DNA タグライン<sup>3)</sup> を利用した。

#### (2) プロトプラストを用いたデュアルルシフェラーゼアッセイ

長さの異なる bZIP60 エフェクターは全て N 末に FLAG タグを付加し、CaMV35S プロモーターの制御下で発現させるように作成した。レポーターとして BiP3 プロモーターあるいはカルネキシンプロモーターの下流にルシフェラーゼを連結したコンストラクトを使用した。また、MYB58 による COAMT プロモーターおよび NST3 による MYB46 プロモーターの活性化に対する ORF2 の影響を調べるために MYB58 および NST3 の C 末に ORF2 を連結したコンストラクトを作成した。ルシフェラーゼアッセイは過去の論文に記載した方法<sup>4)</sup> に則り行った。

#### (3) GFP を用いた局在観察

ORF2 の C 末端領域には核局在シグナル (NLS) と思われるアミノ酸が存在する。そこで NLS の核局在への影響を調べるため GFP と ORF2 の融合タンパク質を発現するプラスミドを作成した。また NLS を欠失した ORF2 ΔNLS2 を作出した。これらのプラスミドをシロイヌナズナ緑葉由来のプロトプラスで一過性発現させ共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を観察した。

### 4. 研究成果

(1) ORF2 は bZIP60 の転写活性化能に関与する。

(2) ORF2 は他の転写因子の活性化能には影響しない。

(3) ORF2 は核局在に関わる。

(4) ORF2 の核局在シグナルは転写活性化能に部分的に関与する。

(5) ORF2 は bZIP60 のタンパク質量には関与しない。

#### (6) まとめ

小胞体ストレス応答における細胞質スプライシングの結果、転写因子 bZIP60 に 59 アミノ酸からなる ORF2 が新たに付加される。ORF2 は bZIP60 の転写活性化に影響する。しかし、ORF2 は他の 2 つの転写因子には影響しない。ORF2 の C 末には核局在化シグナルがあると予測される。このシグナルが実際に機能するかどうかを GFP との融合タンパク質による実験により調べた。この配列を失失させることが転写活性化能に与える影響も調べた。また ORF2 がタンパク質の翻訳あるいは分解に関与するも可能性を考慮して、タンパク質量への影響について調べた。立体構造予測 (図 1) では、ORF2 は天然変性タンパク質と予想され、タン

パク質相互作用に寄与することが考えられた。例えばやはり小胞体ストレス応答に関わる転写因子 bZIP28 と bZIP60 の相互作用が報告されており、こうした相互作用への関りなどが想定される。あるいは bZIP60 の分子内相互作用の可能性なども考えられ、ORF2 と相互作用するタンパク質の単離、同定が望まれる。

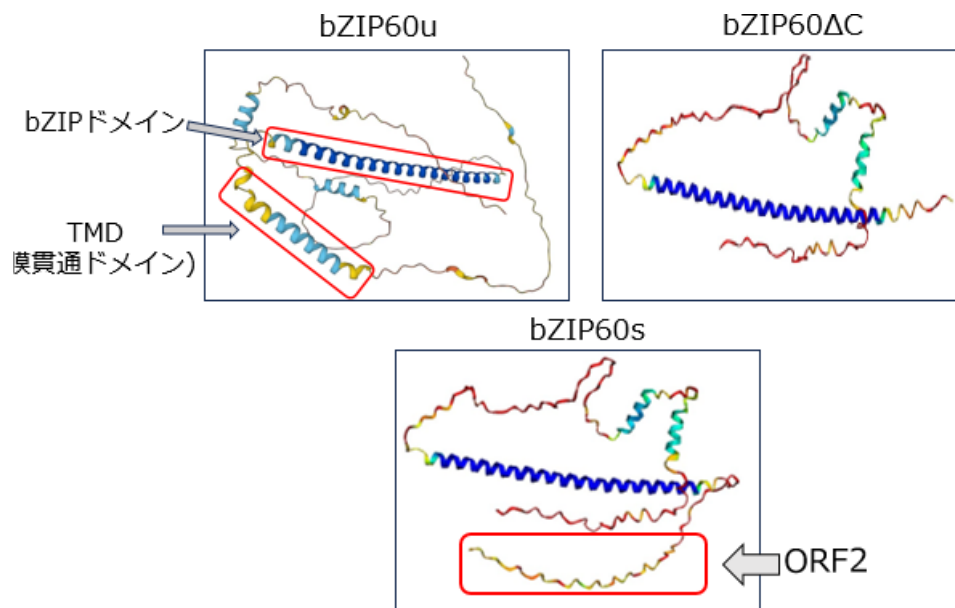


図1 Alpha Fold2 による ZIP60 タンパク質の立体構造予測

<引用文献>

1. Walter, P. and Ron. D. (2011) *Science* 334, 1081-1086
2. Iwata, Y. and Koizumi, N (2012) *Trends Plant Sci.* 17, 720-727
3. Nagashima *et al.* (2011) *Sci. Rep.* 1, 29
4. Iwata, Y. and Koizumi, N (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 5280-5285

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeda Sho, Togawa Taisuke, Mishiba Kei-ichiro, Yamato Katsuyuki T., Iwata Yuji, Koizumi Nozomu	4. 巻 39
2. 論文標題 IRE1-mediated cytoplasmic splicing and regulated IRE1-dependent decay of mRNA in the liverwort &lt;i>Marchantia polymorpha&/i>;	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 303 ~ 310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.22.0704a	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 -

1. 著者名 Nakamura Masato, Nozaki Mamoru, Iwata Yuji, Koizumi Nozomu, Sato Yasushi	4. 巻 39
2. 論文標題 THESEUS1 is involved in tunicamycin-induced root growth inhibition, ectopic lignin deposition, and cell wall damage-induced unfolded protein response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 129 ~ 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.1224a	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 成田 裕貴, 岡田 龍之介, 松盛 巧, 山田 黎, 岩田 雄二, 小泉 望
2. 発表標題 変異型種子貯蔵タンパク質を発現するシロイヌナズナの作出と解析
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溝口 裕之, 辻 雄貴, 坂上 友祐, 舟引 萌香, 岩田 雄二, 小泉 望
2. 発表標題 小胞体ストレス応答によって転写因子bZIP60に生じるORF2の機能解析
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小泉 望
2. 発表標題 植物の小胞体ストレス応答の分子機構の解明と植物バイオテクノロジーの社会実装のための学術的貢献
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------