

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21288

研究課題名(和文)新規RNAリガーゼを用いた新たなRNA断片の網羅的解析法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a method to analyze RNA cleavage fragments by using tRNA ligase

研究代表者

岩田 雄二 (Iwata, Yuji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：80704965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナtRNAリガーゼを用いて、植物の小胞体膜上RNaseであるIRE1により生成される2',3'環状リン酸基を3'末端にもつRNA断片の同定を目的として研究を遂行した。GFPをコードするRNAをモデルに実験を行い、植物IRE1のin vitroにおける標的RNAの塩基配列を明らかにした。また、GFPを誘導発現する形質転換シロイヌナズナを用いてin vivoでのIRE1の標的RNAの塩基配列を試みた結果、IRE1が標的とするmRNA切断部位の候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた成果は、これまで未知だった植物IRE1によるRegulated IRE1 dependent decay (RIDD)の標的となる塩基配列の解明や、小胞体膜上におけるRNA分解制御の全容解明へ向けて大きな前進となる。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to clone RNA fragments with 2',3'-cyclic phosphate at 3' end generated by plant IRE1, an endoplasmic reticulum membrane-localized kinase/ribonuclease, using Arabidopsis tRNA ligase. By using recombinant Arabidopsis IRE1B, we cloned and sequenced IRE1B-cleaved several RNA fragments and identified features of RNA sequences targeted by IRE1B. We also generated transgenic Arabidopsis plants that can be used to identify target RNA sequences by IRE1 in vivo.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：tRNAリガーゼ 2',3'環状リン酸基

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内における RNA 量の厳密な制御は、恒常性維持、正常な発達や分化、環境ストレス応答など様々な局面において重要である。mRNA 量は転写量と分解量の差し引きにより決定されるため、クロマチン構造や転写因子などを介した転写レベルにおける制御のみならず、RNA 分解における RNA 量の制御も非常に重要である。

真核生物では細胞のさまざまな場所で RNA 分解が起こる。私たちは、小胞体膜上における mRNA 切断・分解に着目して研究を行っている。小胞体膜上では、小胞体膜タンパク質キナーゼ / RNase である Inositol requiring enzyme 1 (IRE1) が、bZIP 型転写因子をコードする mRNA の細胞質スプライシングによる活性化と、分泌タンパク質をコードする mRNA の分解 (Regulated IRE1-dependent decay; RIDD) という二つのメカニズムにより RNA レベルでの遺伝子発現制御を行う。IRE1 は真核生物に高度に保存された RNase であり、小胞体ストレスにおいて中心的な役割を果たすほか、その他の多様な生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。植物において IRE1 は小胞体ストレスにより活性化される他、熱ストレス応答や花粉や根の発達などに重要な役割を果たすと考えられている。細胞質スプライシングにおいては、mRNA 上に存在する二つのステムループのループ部分で IRE1 による切断が起こることが明らかになっているが、植物 RIDD のメカニズムに関する知見は乏しく、IRE 1 による標的 RNA の切断部位も明らかでない。

切断により生じる RNA 断片の末端構造は RNase により異なる。例えば、低分子 RNA の生成や機能に関わる RNase である Dicer や Argonaute などにより切断された RNA は 5' 末端にモノリン酸基、3' 末端に水酸基をもつ。これらの RNA 切断断片の同定には、5' 末端にモノリン酸基をもつ RNA 断片にアダプターオリゴを T4 RNA リガーゼを用いて連結するプロトコルが広く用いられている。一方、IRE1 により切断された RNA は 5' 末端に水酸基、3' 末端に 2', 3' 環状リン酸基をもつため、T4 RNA リガーゼを用いたアダプターオリゴの連結はできない。出芽酵母やシロイヌナズナの tRNA リガーゼは tRNA スプライシングにおける 3' 末端の 2', 3' 環状リン酸基と 5' 末端の水酸基の連結に作用することが明らかになっている。シロイヌナズナの tRNA リガーゼを 2', 3' 環状リン酸基を 3' 末端にもつ RNA 断片へのアダプターオリゴの連結に用いるプロトコルは過去に報告がなされているが、汎用化されたプロトコルは確立されていない。

2. 研究の目的

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) tRNA リガーゼとその他の複数の生物の tRNA リガーゼを調製し、活性測定を行い、活性の高い tRNA リガーゼの選抜を目的とした。また、GFP mRNA をモデルとして植物 IRE1 の標的 RNA の塩基配列の同定をもう一つの目的とした。具体的には、*in vitro* で GFP RNA と組換えシロイヌナズナ IRE1B タンパク質を反応させ、リンカーオリゴを tRNA リガーゼにより連結し、クローニングした後に塩基配列を解析することで、IRE1 の基質特異性を調べた。また、分泌型 GFP をコードする GFP mRNA を誘導発現するシロイヌナズナを作製し、IRE1 活性化により切断された GFP mRNA 断片を tRNA リガーゼを用いて同様の解析を行い IRE1 標的配列の同定を試みた。

3. 研究の方法

複数の生物の tRNA リガーゼをコードする遺伝子を、RT-PCR による増幅とクローニング、もしくは大腸菌用にコドン最適化した塩基配列を遺伝子合成することにより取得した。ヒスタグ、Strep-tag II タグ、SUMO タグを N 末端に付加した大腸菌発現ベクターに組み込み、BL21 株やその派生株を用いて発現を試みた。可溶性画分に発現がみられたコンストラクトに関して、アフィニティーカラムを用いて精製した。シロイヌナズナ Col-0 株の IRE1B 遺伝子も同様のコンストラクトを用いて大腸菌で発現・精製をおこなった。組換え IRE1B タンパク質を *in vitro* 転写により調製した GFP RNA と反応させた後、リンカーオリゴと tRNA リガーゼを反応させ、RT-PCR に供した。得られた DNA 断片をクローニング、シーケンス解析に供し、IRE1B による RNA 切断部位の解析を行なった。

分泌型 GFP をコードする mRNA (SP-GFP) をデキサメタゾン (DEX) 誘導系により発現するコンストラクトを作製し、シロイヌナズナ Col-0 と *ire1ab* 変異株にフローラルディップにより導入した。ピアラフォス耐性を示す個体から T3 ラインを作成し解析に用いた。DEX を含む 1/2MS 寒天プレートにシロイヌナズナ実生を移植することで DEX 処理とした。DEX 処理した植物から RNA を抽出し、*in vitro* 転写により調製した GFP RNA の時と同様に RNA 切断部位の解析を行なった。

4. 研究成果

複数の生物の tRNA リガーゼをコードする遺伝子を RT-PCR による増幅・クローニング、もしくは大腸菌発現用にコドン最適化した塩基配列遺伝子合成により取得し、発現ベクターを作成しスモールスケールでの大腸菌発現を試みた。その結果、イネ (*Oryza sativa*) の tRNA リガーゼを発現させた場合、可溶性画分にシグナルが検出されたため、ラージスケールでの発現させ、アフニティーカラムを用いて精製した。先行研究により既に精製していたシロイヌナズナ tRNA リガーゼと活性の比較を行った結果、結果にばらつきはあったものの、イネの tRNA リガーゼの活性はシロイヌナズナよりも低い傾向にあった。そのため、以降の実験ではシロイヌナズナ tRNA リガーゼを用いることとした。

In vitro 転写により調製した GFP RNA を組換え IRE1B タンパク質と反応させ、3. 研究の方法に示した方法に従い、組換え IRE1B による GFP RNA の切断部位の塩基配列の解析を行なった。その結果、図 1 に示すように、GFP RNA の広い領域で IRE1 による切断が起こっていることが示された。切断部位の塩基配列を調べた結果、切断部位の 5' 側と 3' 側が共にシトシンである傾向が見られた。

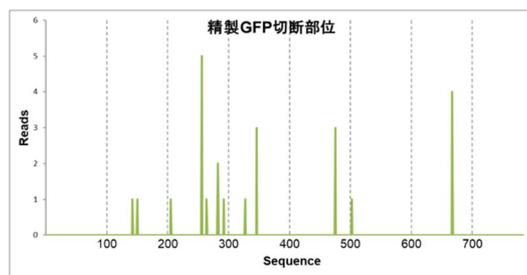


図 1. 組換え AtIRE1B タンパク質による GFP RNA の切断部位。横軸は GFP RNA の 5' 末端からの塩基数、縦軸は得られたシーケンスの数を示す。

次に、SP-GFP を DEX 誘導発現するシロイヌナズナを作製した。Col-0 バックグラウンドの T3 ラインが複数得られ、以降の解析に用いた。まず、SP-GFP mRNA が DEX 処理に反応して数時間で顕著に蓄積すること、小胞体ストレス誘導剤であるジチオスレイトール (DTT) 処理により DEX 処理による SP-GFP mRNA 蓄積量が大きく減少することを確認した。この mRNA 蓄積量の減少は、シグナル配列を付加していない GFP の場合には見られなかった。また、*ire1ab* 変異体に SP-GFP を導入した植物は T2 ラインが複数得られ、DTT 処理による GFP mRNA の減少は見られなかった。以上のことから、DTT 処理により IRE1 が活性化され SP-GFP mRNA が分解されることが確かめられた。

そこで、この植物に DTT 処理を行い全 RNA を抽出し、in vitro 転写により調製した GFP RNA の解析と同様の手法で、GFP mRNA 切断部位の同定を試みた。その結果、GFP とリンカーオリゴの融合した配列が複数得られたことから、tRNA リガーゼによる連結反応は植物から抽出した RNA を用いても機能していることが考えられた。ところが、得られた塩基配列は in vitro におけるものとは相違がみられた。植物を用いた実験では IRE1 以外の RNase による GFP 切断断片も含まれていることが原因の一つであると考えられる。今後は、作製中の SP-GFP を *ire1ab* 変異体バックグラウンドで発現する T3 植物を用いて IRE1 以外の RNase による GFP 切断断片を排除する、全 RNA を用いる代わりに 5' キャップをもつ RNA を精製して連結反応を行うことで特異性を上げる、などの対策が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------