

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770055

研究課題名(和文)

強光ストレス応答性SRタンパク質による協調的な選択的スプライシング制御機構の解明

研究課題名(英文)

Analysis of alternative splicing mechanisms coordinately regulated by high-light responsive SR proteins

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(和文)：

我々はこれまでに、シロイヌナズナのSRタンパク質、atSR45a および atSR30 は強光により発現誘導されること、および他のスプライシング因子との相互作用を介してスプライソソーム形成に機能することを見いだした。このことから、両タンパク質は強光に応答した選択的スプライシングの制御に関与すると考えられる。そこで本研究では、強光応答性SRタンパク質、atSR45a および atSR30 により選択的スプライシング効率が制御される遺伝子をタイリングアレイ法により同定した。さらに、atSR30 および atSR45a の各ドメインが細胞内局在性に果たす役割について解析した。

研究成果の概要(英文)：

We have demonstrated that *Arabidopsis* SR proteins, atSR45a and atSR30 participates in a spliceosomal assembly through other splicing factors and its expression is markedly induced by high-light stress. These facts suggest that atSR45a and atSR30 are involved in the regulation of high-light stress responsive-alternative splicing events. Here, we identified genes of which alternative splicing efficiencies are regulated by atSR45a and atSR30, by a whole genome tiling array technology, and demonstrated the involvement of the domains in atSR30 and atSR45a in subcellular and subnuclear distribution using a series of structural domain-deleted mutants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：環境応答、選択的スプライシング、植物、SRタンパク質、環境ストレス

1. 研究開始当初の背景

SRタンパク質は、セリンアルギニンリッチド

メイン(SR)およびRNA認識モチーフ(RRM)を有するタンパク質ファミリーであり、選択的

スプライシングの最も重要な制御因子である。すなわち、SRタンパク質が他のスプライシング因子と相互作用することでスプライシングの場であるスプライセオソーム複合体が形成される。植物にはSRタンパク質相同遺伝子が非常に多数(ヒト11種に対してシロイヌナズナ20種:名称中の数字は分子量に由来)存在する。これまでに我々を含めた複数の研究グループが、シロイヌナズナやイネにおけるSRタンパク質について研究を行っており、相互作用因子やドメインの重要性などそれらの分子特性に関する知見が蓄積されつつある。しかし、未だそれらにより実際に選択的スプライシング効率を制御される遺伝子(標的遺伝子)はほとんど明らかにされていないため、個々の生理的役割は不明なままであった。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は、(1)シロイヌナズナに存在する20種類のSRタンパク質相同遺伝子の中で、植物特有のドメイン構造を有する”*atSR45a*”と、動物の主要な選択的スプライシング制御因子ASF/SF2のホモログである”*atSR30*”の発現量が強光照射下で顕著に増加すること、(2)*atSR45a*は、スプライシングの基本構成因子であり5’および3’スプライス部位認識に機能するU1-70KおよびU2AF<sup>35b</sup>と*in vivo*で相互作用することを見いだした。これらの結果から、植物は強光ストレス応答/防御関連遺伝子の選択的スプライシング制御のために、動物ASF/SF2ホモログである*atSR30*を利用すると同時に、植物特有の*atSR45a*も進化過程で発達させていると考えられる。そこで本研究では、「タイリングアレイ法による*atSR45a*および*atSR30*の標的遺伝子の同定」および「*atSR45a*および*atSR30*の各ドメインが細胞内局在性に果たす役割の解析」を試みた。

## 3. 研究の方法

播種後2週間栽培した野生株(WT)、*atSR45a*および*atSR30*の遺伝子破壊株(*KO-sr45a*および*KO-sr30*)に強光ストレス(800  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 1 h)を付与した。植物体からRNAを抽出し、全トランスクリプトーム解析が可能であるタイリングアレイ解析に供し、野生株と比較して遺伝子破壊株で発現量に変化のある遺伝子領域を同定した。さらに、タイリングアレイ解析の結果の検証は、RT-PCRにより行った。

*atSR45a*および*atSR30*の細胞内局在性の解析は、全長および各ドメインを欠損した*atSR30*もしくは*atSR45a*とRFPとの融合タンパク質を、パーティクルガンによりタマネギ表皮細胞に一過的に発現させることで行った。

## 4. 研究成果

タイリングアレイ解析の結果、強光ストレス下(800  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 1 h)において*KO-sr45a*株では、227箇所のコーディング領域の発現量が野生株と比較して有意に変化していた。それら領域の近傍には代謝(28.2%)やシグナル伝達(10.6%)、タンパク質ターンオーバー(9.3%)、転写因子(6.6%)、生育発達(6.2%)、輸送(4.8%)およびRNA結合因子(3.5%)に関連する遺伝子群が含まれていた(図1)。半定量的RT-PCRによる検証の結果、強光ストレス下における選択的スプライシング効率および転写レベルの変化が、各々10個および5個の遺伝子において認められた(図2)。また、それらの強光ストレス下での選択的スプライシング効率の変化は、*atSR45a*の発現誘導のタイミングと一致していた(data not shown)。さらに、選択的スプライシング産物のシーケンス解析の結果から(図3)、*atSR45a*はイントロンリテンション型のスプライシングエンハンサーとして機能していることが示唆された。

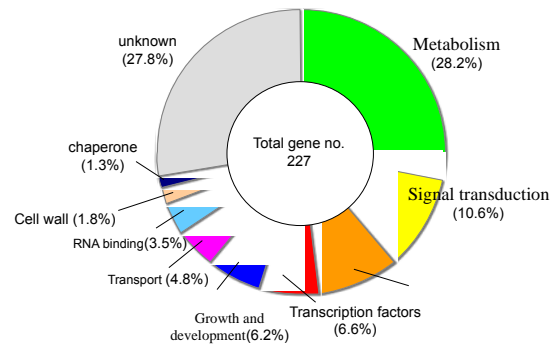


図1. 強光条件下で*atSR45a*の遺伝子破壊により発現量に変化したゲノム領域に位置する遺伝子の機能分類

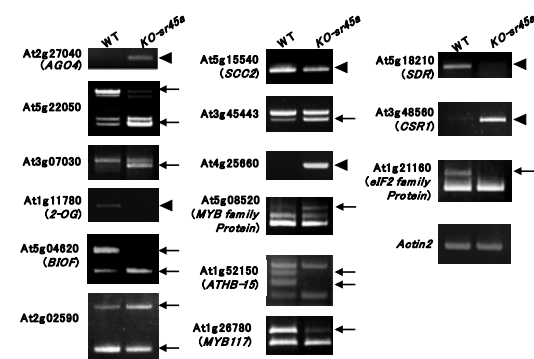


図2. 半定量的RT-PCRによるタイリングアレイの結果の検証-1

タイリングアレイにより同定された遺伝子の強光ストレス下(800  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 1 h)における発現量および選択的スプライシングパターンを

RT-PCR により解析した。

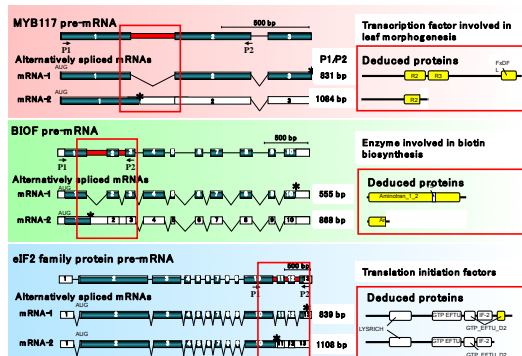


図 3. atSR45a により制御される遺伝子のスプライシング産物のシーケンス解析  
atSR45a により制御される遺伝子、選択的スプライシング産物、生成するタンパク質のドメイン構造

一方、*KO-sr30* 株では野生株と比較して 230 ヶ所のコーディング領域が有意に変化していた ( $P < 0.01$ )。それらの領域にはタンパク質ターンオーバー (21%)、転写因子 (15%)、シグナル伝達 (30%) に関連する遺伝子が多数存在した (図 4)。半定量的 RT-PCR による検証の結果、強光ストレス下における選択的スプライシング効率もしくは転写レベルの変化が 22 個の遺伝子において認められた (図 5)。シーケンス解析の結果 (図 6)、atSR30 はカセットエクソン型および選択的 3', 5' スプライス部位型選択的スプライシングの制御因子として機能していると考えられた。

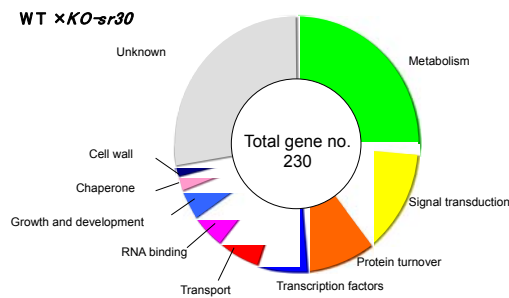


図 4. 強光条件下で atSR30 の遺伝子破壊により発現量に変化したゲノム領域に位置する遺伝子の機能分類

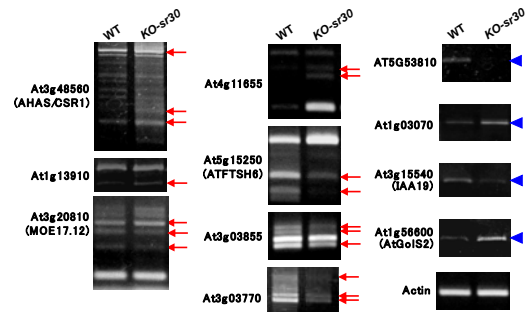


図 5. 半定量的 RT-PCR によるタイリングアレイの結果の検証-1  
タイリングアレイにより同定された遺伝子の強光ストレス下 ( $800 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 1 h) における発現量および選択的スプライシングパターンを RT-PCR により解析した。

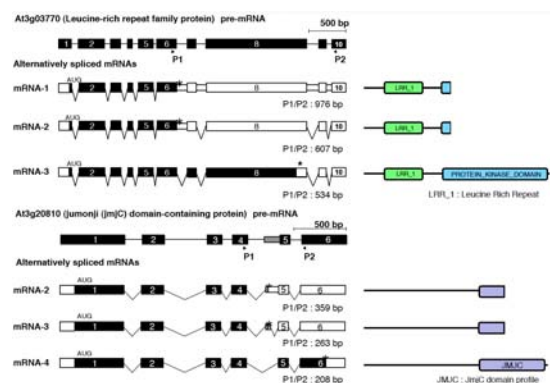


図 6. atSR30 により制御される遺伝子のスプライシング産物のシーケンス解析  
atSR30 により制御される遺伝子、選択的スプライシング産物、生成するタンパク質のドメイン構造

atSR30 は動物の主要な選択的スプライシング制御因子 ASF/SF2 と同様に、2 つの RNA 結合モチーフ (RRM1/RRM2) と RS ドメイン (C-RS) からなる。一方、atSR45a は N 末端側にも RS ドメイン (N-RS) を有する植物特有のドメイン構造からなる。そこで本研究では、atSR30 および atSR45a の各ドメインが細胞内局在性に果たす役割について解析した。パーティクルガンにより、全長および各ドメインを欠損した atSR30 もしくは atSR45a と RFP との融合タンパク質をタマネギ表皮細胞に一過的に発現させた。その結果、atSR30 のスプライシングの場である核スペckルへの局在化には、C 末端側の RS ドメインを必要とすることが明らかになった (図 7)。また、atSR45a の核スペckル局在化には N 末端側および C 末端 RS ドメインの両方が機能することが示された (図 8)。

これまでに、SR タンパク質の局在化には RS ドメインのリン酸化/脱リン酸化が関わって

いることが知られている。そこで、リン酸化阻害剤が atSR30 および atSR45a の細胞内局在性に及ぼす影響を検討した。その結果、atSR30 の細胞内局在性はリン酸化阻害剤、スタウロスポリン処理により阻害された (data not shown)。一方、atSR45a の局在に変化は認められなかった。これらの結果から、atSR30 の細胞局在性は他の SR タンパク質と同様に C-RS のリン酸化状態により制御されているが、atSR45a は独自の制御機構が存在することが示唆された。

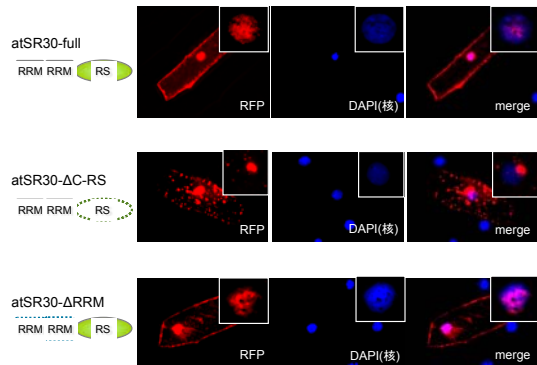


図 7. atSR30 の全長およびドメイン欠損変異体の細胞内局在性  
atSR30 の全長およびドメイン欠損配列を蛍光タンパク質、TagRFP と融合させ、タマネギ表皮細胞にパーティクルガンにより一過的に発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。

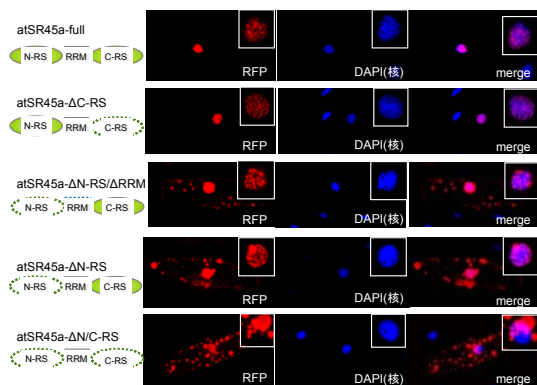


図 8. atSR45a の全長およびドメイン欠損変異体の細胞内局在性  
atSR45a の全長およびドメイン欠損配列を蛍光タンパク質、TagRFP と融合させ、タマネギ表皮細胞にパーティクルガンにより一過的に発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。

##### 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 9 件)

1. Maruta, T., Inoue, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., Shigeoka, S. Arabidopsis NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. *Plant Sci.* in press, 査読有
2. Akashi, K., Yoshida, K., Kuwano, M., Kajikawa, M., Yoshimura, K., Hoshiyasu, S., Inagaki, N., Yokota, A. Dynamic changes in the leaf proteome of a C<sub>3</sub> xerophyte, *Citrullus lanatus* (wild watermelon), in response to water deficit. *Planta* in press, 査読有
3. Ishikawa, K.\*, Yoshimura, K.\*, Ogawa, T., Shigeoka, S. Distinct regulation of Arabidopsis ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolases, AtNUDX6 and 7, in biotic and abiotic stress responses. *Plant Signaling & Behavior* 5, 695-697, 2010 \*These authors contributed equally to this work., 査読有
4. Ishikawa, K.\*, Yoshimura, K.\*, Harada, K., Fukusaki, E., Ogawa, O., Tamoi, M., Shigeoka, S. AtNUDX6, an ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase in *Arabidopsis*, positively regulates NPR1-dependent salicylic acid signaling. *Plant Physiology* 152, 2000-2012, 2010 \*These authors contributed equally to this work., 査読有
5. Maruta, T., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., Shigeoka, S. Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual Role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant Cell Physiology* 51, 190-200, 2010, 査読有
6. 吉村和也, 石川和也, 重岡 成 高等植物におけるNudix hydrolaseファミリーの多様な生理機能 -ヌクレオシド 2-リン酸類縁体の代謝を介した細胞応答制御- *化学と生物* 48, 305-308, 2010, 査読無
7. Ishikawa, K., Ogawa, T., Hirotsue, E., Nakayama, Y., Harada, K., Fukusaki, E.,

- Yoshimura, K., Shigeoka, S. Modulation of the poly(ADP-ribosyl)ation reaction via the Arabidopsis ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase, AtNUDX7, is involved in the response to oxidative stress. *Plant Physiology* 151, 741-754, 2009, 査読有
8. Tanabe, N., Kimura, A., Yoshimura, K., Shigeoka, S. Plant-specific SR-related protein atSR45a interacts with spliceosomal proteins in plant nucleus. *Plant Molecular Biology* 70, 241-252, 2009, 査読有
9. Ogawa, T., Ishikawa, K., Harada, K., Fukusaki, E., Yoshimura, K., Shigeoka, S. Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, AtNUDX2, confers enhanced tolerance to oxidative stress on *Arabidopsis* plants. *Plant Journal* 57, 289-301, 2009, 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
1. 森達也、吉村和也、小池佳之、田部記章、丸田隆典、重岡成 2011 年 3 月 26 日 強光応答性選択的スプライシング制御因子 atSR30 および atSR45a の核局在化の解析 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都)
2. 横山国大、森達也、田部記章、丸田隆典、佐藤信雄、高橋広夫、重岡成、吉村和也 2011 年 3 月 20 日 シロイヌナズナ ASF/SF2 様タンパク質、atSR30 による強光ストレスに応答した選択的スプライシングの制御 第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台)
3. 森達也、田部記章、丸田隆典、横山国大、佐藤信雄、高橋広夫、吉村和也、重岡成 2011 年 3 月 20 日 強光応答性 SR タンパク質 atSR45a の選択的スプライシング制御に果たす役割 第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台)
4. 横山国大、石川裕基、森達也、田部記章、丸田隆典、佐藤信雄、高橋広夫、吉村和也、重岡成 2010 年 12 月 8 日 シロイヌナズナ ASF/SF2 様 SR タンパク質、atSR30 による強光ストレスに応答した選択的スプライシング制御機構の解析 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 (横浜)
5. 森達也、田部記章、丸田隆典、横山国大、佐藤信雄、高橋広夫、吉村和也、重岡成 2010 年 12 月 8 日 タイリングアレイを用いた強光応答性 SR タンパク質、atSR45a により選択的スプライシング効率が制御される遺伝子の同定 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 (横浜)
6. 森達也、田部記章、丸田隆典、吉村和也、重岡成 2010 年 12 月 8 日 強光応答性 SR タンパク質、atSR30 および atSR45a の核局在化に関与する機能ドメインの解析 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 (横浜)
7. Yoshimura, K., Mori, T., Yokoyama, K., Maruta, T., Tanabe, N., Shigeoka, S. 2010 年 6 月 7 日 Identification of alternative splicing events of genes regulated by *Arabidopsis* serine/arginine proteins, atSR45a and atSR30, in response to high-light stress using a tiling microarray. *21st International Conference on Arabidopsis Research*, 2010, at Yokohama, Japan
8. 森達也、森雅揮、横山国大、田部記章、丸田隆典、佐藤信雄、高橋広夫、吉村和也、重岡成 2010 年 3 月 28 日 タイリングアレイを用いた強光応答性シロイヌナズナ SR タンパク質、atSR45a の選択的スプライシング制御機構の解析 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京)
9. 横山国大、石川裕基、吉村和也、森達也、田部記章、丸田隆典、佐藤信雄、高橋広夫、重岡成 2010 年 3 月 19 日 強光ストレス応答性 SR タンパク質、atSR30 による選択的スプライシング制御機構の解析 第 51 回日本植物生理学会年会 (熊本)
10. 森達也、田部記章、丸田隆典、吉村和也、重岡成 2009 年 12 月 11 日 植物の選択的スプライシング制御因子 atSR30 および atSR45a による強光ストレス応答 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜)
- [図書] (計 1 件)
1. 吉村和也 *ビタミン総合事典* 5-2-3 植物におけるパントテン酸の生合成 p272-275 日本ビタミン学会 編集 朝倉書店, 2010

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