

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770046

研究課題名(和文) 環境ストレス応答性選択的スプライシングを介した遺伝子発現制御ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory network of gene expression via environmental stress-responsive alternative splicing

研究代表者

吉村 和也 (YOSHIMURA, Kazuya)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：90379561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：植物が特異的に進化させてきたと考えられる、ストレスに応答した選択的スプライシングによる遺伝子発現制御ネットワークを明らかにすることを目的として、シロイヌナズナのセリンアルギニンリッチ(SR)タンパク質、atSR45aとatSR30のスプライシング制御の分子機構、それらにより選択的スプライシング効率が制御される転写因子の生理的意義、および新規選択的スプライシング制御因子の機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：To reveal the plant-specific regulatory network of gene expression via environmental stress-responsive alternative splicing, it was analyzed that molecular mechanisms of splicing machinery regulated by atSR45a and atSR30, the serine/arginine-rich (SR) proteins in Arabidopsis, physiological roles of transcription factors whose alternative splicing efficiencies were regulated by atSR45a and atSR30, and functional analysis of novel factors for the regulation of alternative splicing efficiency in response to stresses.

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

近年、種々の生物のゲノム情報が明らかになるにつれ、選択的スプライシングを含めた転写後調節機構による遺伝子発現制御の重要性が指摘されてきている。興味深いことに、植物では多くの環境ストレス応答/防御関連遺伝子が選択的スプライシングにより複数の転写産物を生成していることから、植物は環境ストレスに対抗する手段の一つとして同機構を独自に発達させていると考えられる。

SR タンパク質は、アルギニンセリンリッチドメイン(RS)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、スプライセオソーム複合体の形成を介してスプライシング制御に関わる重要な因子である。現在までに、それら植物 SR タンパク質の相互作用因子などの分子特性に関する知見が蓄積されつつあるが、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)は未だ不明であるため、個々の SR タンパク質の生理的重要性は明確ではない。

2. 研究の目的

これまでに我々は、シロイヌナズナの 20 種類の SR タンパク質の中で、atSR45a および atSR30 が、環境ストレス応答のために直接的に種々の遺伝子の選択的スプライシング制御に働くだけでなく、転写因子の構造変化に起因する機能調節を介して、多様な遺伝子発現制御ネットワークを形成している可能性を見出した。

そこで本研究では、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の強光下での選択的スプライシング様式(ドメイン構造の変化)およびスプライシング産物の生理機能の解析、細胞内局在性の解析、および atSR30 のスプライソーム形成に関わる相互作用因子について解析を行った。また、その解析過程で新たに見出した、新規選択的スプライシング制御因子の機能解析も行った。

3. 研究の方法

タイリングアレイ解析により同定された 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の候補について、強光下での選択的スプライシング効率の変化の検証、および選択的スプライシング産物の構造を解析した。具体的には、強光ストレス(800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 1 時間)を付与した播種後 2 週間栽培した野生株(WT) *atSR30* の遺伝子破壊株(*KO-sr30*)から RNA を抽出し、RT-PCR およびシーケンス解析を行った。

atSR45a および atSR30 の細胞内局在性の解析は、RFP および CFP 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。

atSR30 によるスプライシング制御機構を

明らかにするために、酵母 two-hybrid system により atSR30 を bait、シロイヌナズナ cDNA ライブラリーを prey として用いて、相互作用因子をスクリーニングした。

新規選択的スプライシング制御因子として同定された、シロイヌナズナ hnRNPA1-1~6、NOVA1 および FOX1-1~3 のストレス応答性を明らかにするために、播種後 2 週間栽培したシロイヌナズナ野生株に強光(800 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$, 0~3 時間) 熱(37 $^{\circ}\text{C}$, 0~3 時間) 塩(200 mM NaCl, 0~3 時間) および乾燥(0~6 時間) ストレスを暴露し、Real-Time PCR 法によりそれらの発現レベルを解析した。

4. 研究成果

タイリングアレイ解析により選抜された候補標的遺伝子の選択的スプライシング効率の変化を検証するために、半定量的 RT-PCR 解析を行った。その結果、AT1G52890 (NAC transcription factor) では、強光ストレス下において野生株で検出されなかった選択的スプライシング産物が、*KO-sr30* 株では新たに出現していた。そこで、atSR30 と NAC transcription factor の発現レベルの強光ストレス下での経時的な変化の関連性について検証した。野生株において、強光照射 1 時間後までに atSR30 の 5 つの選択的スプライシング産物(mRNA1~5)のうち成熟型 mRNA と推定される mRNA1 の発現量が増加し、2 時間後まで維持されていることを確認した。それに対して、NAC transcription factor では野生株において高分子(mRNA-3) および低分子(mRNA-1)のスプライシング産物の発現レベルが強光照射後にそれぞれ減少および維持されていたが、*KO-sr30* 株ではそれぞれ増加および減少していた(図 1)。

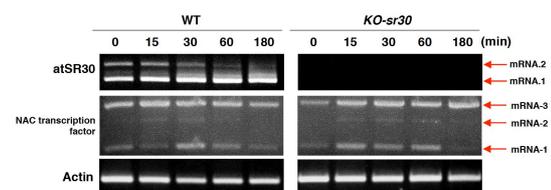


図 1. 半定量的 RT-PCR によるタイリングアレイの結果の検証

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。

次に、これら atSR30 により選択的スプライシング効率が変化する NAC transcription factor のスプライシング産物の機能を明らかにするために、シーケンス解析を行った。その結果、強光ストレス条件下で増加する低分子の選択的スプライシング産物は成熟型タンパク質をコードしており、高分子の選択的スプライシング産物は 1 番イントロンを保持

していた(図2)。このことから、atSR30はイントロンリテンション型選択的スプライシングの制御に機能していると推測された。また、イントロンを含む選択的スプライシング産物は翻訳途中で終止コドンが出現し、推定される機能ドメインを一部欠失したタンパク質を生成している可能性が考えられた。以上より、atSR30は選択的スプライシングを介して強光下で機能不全型のNAC transcription factorの生成に関与していると考えられた。

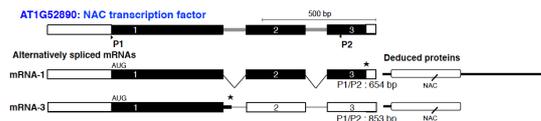


図2. atSR30により制御される遺伝子のスプライシング産物のシーケンス解析
遺伝子と選択的スプライシング産物の構造、およびコードされるタンパク質のドメイン構造を示す。

atSR45aおよびatSR30はどちらも強光ストレスにตอบสนองした選択的スプライシングの制御に関与するため、両者は共役してその制御に機能していると推定される。そこで、RFPおよびYFPとの融合タンパク質を用いて、atSR45aおよびatSR30の核内での局在性を解析した。パーティクルガンによりタマネギ表皮細胞に上記コンストラクトを一過的に発現させた結果、両者共に核内でスペクル構造を形成していた(図3)。また、それらの核内での局在部位は完全に一致していた。このことから、両者は同一の遺伝子の選択的スプライシングの制御に共役して関与している可能性が考えられた。

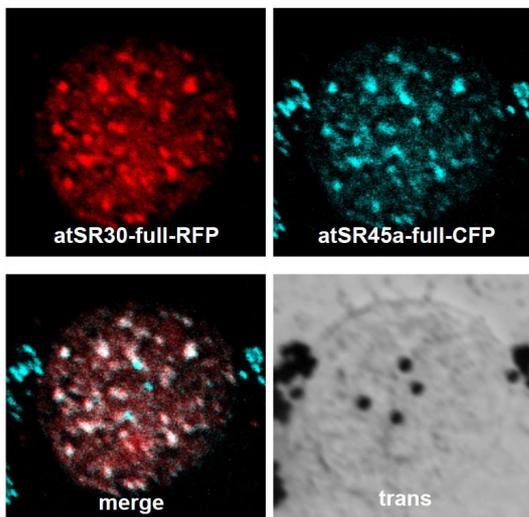


図3. atSR45aおよびatSR30の核内局在性
atSR45aとRFPおよびatSR30とCFPとの融合タンパク質をタマネギ表皮細胞にパーティクルガンにより一過的に発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。

選択的スプライシング制御機構におけるatSR30の役割を明らかにするために、Two-Hybrid法を用いて相互作用因子の同定を試みた。酵母の選抜培地での生育試験の結果、非常に多様なタンパク質との相互作用が認められた(表1)。-ガラクトシターゼ活性測定の結果、特にUnknown protein(AT2G33420)、PR-5(AT1G75040)、CCCH-type family protein(AT2G02160)、atSR45(AT1G16610)において強いガラクトシターゼ活性が認められた。これらの結果から、atSR30とatSR45aは他の因子との複雑な相互作用を介して、スプライソソーム形成に関与していると考えられた(図4)。そこで現在、それら相互作用候補因子の遺伝子破壊株を取得し、機能解析を試みている。

表1. atSR30 相互作用候補遺伝子

遺伝子名	AGIコード	個数
atSCL30	At3g55460	9
ATPase activators	At5g58100	1
ribosomal protein S9 family protein	At3g49080	1
unknown protein	At2g33420	1
pathogenesis-related gene 5 (PR-5)	At1g75040	1
methyl-cpg-binding domain 7 (MBD7)	At5g59800	1
SWN	At4g02020	1
CCCH-type family protein	At2g02160	2
atRSZp22	At4g31580	1
30s ribosomal protein S5	At2g33800	1
ribosomal protein S13/S15	At3g60770	1
embryo defective 2386	At1g02780	1
telomere repeat-binding protein	At5g59430	1
kinase interacting (KIP1-like) family protein	At1g03470	1
ATPase (ISW2)	At3g06400	1
60s ribosomal protein L23aA	At2g39460	1
thaumatin-like protein	At1g75040	1
atSR45	At1g16610	1
nucleic acid binding protein	At4g35785	71

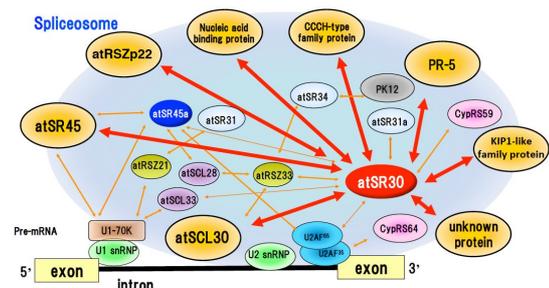


図4. atSR45aおよびatSR30による複雑な相互作用ネットワーク

環境ストレスにตอบสนองした選択的スプライシング制御機構を明らかにすることを目的として、新規選択的スプライシング制御因子として同定された、シロイヌナズナhnRNA1-1~6、NOVA1およびFOX1-1~3のストレス応答性を解析した(図5)。その結果、hnRNA1-6およびFOX1-2は強光、hnRNA1-1、1-2および1-6は熱、hnRNA1-2、1-4、1-6、FOX1-2は塩、そしてFOX1-1、1-2の発現は乾燥ストレスによって増加した(図6)。したがって、それらはそれぞれのストレス条件に特異的な選択的スプライシング制御に機能する可能性が示唆された。そこで現在、それら新規因子の遺伝子破壊株を取得し、機

能解析を試みている。

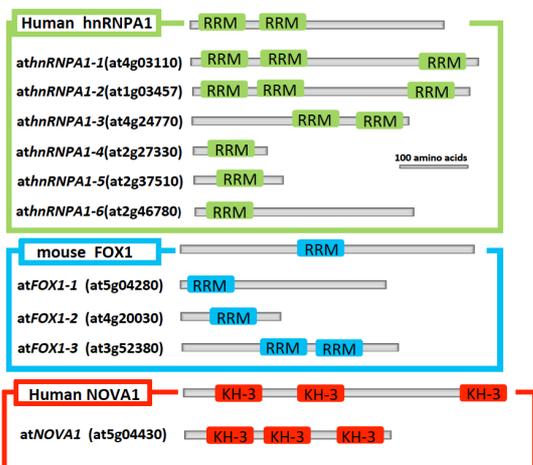


図 5. 新規選択的スプライシング制御因子のドメイン構造

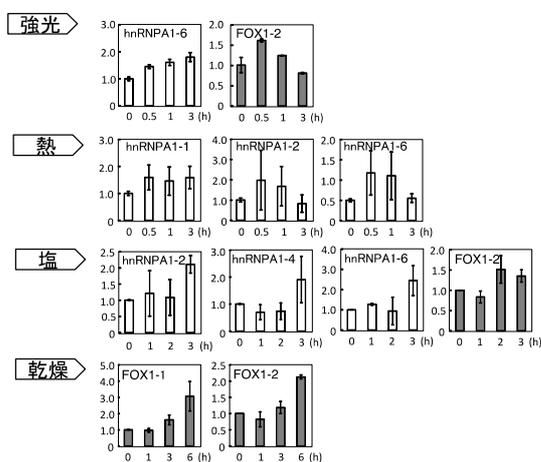


図 6. hnRNP1、NOVA および FOX1 のストレス応答

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)

Yoshimura, K., Nakane, T., Kume, S., Shiomi, Y., Maruta, T., Ishikawa, T., Shigeoka, S. (2014) Transient expression analysis reveals importance of *VTC2* expression level in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in Arabidopsis. *BioScience, Biotechnology, and Biochemistry* in press, 査読有

吉村和也, 伊藤大輔, 丸田隆典, 重岡 成

Nudix hydrolase ファミリーによるビタミン補酵素型の代謝制御 ビタミン, 査読無, 87, 2013, 1-12

URL:<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cr9vitam/2013/008701/001&name=0001-0012j&UserI>

D=163.51.106.144

Ahmed Gaber, 尾形知哉, 丸田隆典, 吉村和也, 田茂井政宏, 重岡 成 (2013) シロイヌナズナグルタチオンペルオキシダーゼ 8 の核および細胞質での酸化傷害の抑制への関与 *ビタミン* 87, 271-273, 査読有

URL:http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AN00207833/ISS0000490327_ja.html

Ito, D., Kato, T., Maruta, T., Tamoi, M., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. (2012)

Enzymatic and molecular characterization of Arabidopsis ppGpp pyrophosphohydrolase, AtNUDX26.

BioScience, Biotechnology, and Biochemistry 76, 120523-120526, 査読有

DOI:10.1271/bbb.120523

Mori, T., Yoshimura, K., Nosaka, R., Sakuyama, H., Koike, Y., Tanabe, N., Maruta, T., Tamoi, M., and Shigeoka, S. (2012)

Subcellular and subnuclear distribution of high-light responsive serine/arginine-rich proteins, atSR45a and atSR30, in *Arabidopsis thaliana*.

BioScience, Biotechnology, and Biochemistry 76, 120425-120431

*These authors contributed equally to this work., 査読有

DOI: 10.1271/bbb.120425

Maruta, T., Inoue, T., Noshi, M., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. (2012)

Cytosolic ascorbate peroxidase 1 protects organelles against oxidative stress by wounding- and jasmonate-induced H₂O₂ in Arabidopsis plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 1901-1907, 査読有

DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.08.003

Gaber, A., Ogata, T., Maruta, T., Yoshimura, K., Tamoi, M., and Shigeoka, S. (2012)

The involvement of Arabidopsis glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damages in nucleus and cytosol. *Plant and Cell Physiology* 53, 1596-1606, 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pcs100

Maruta, T., Yoshimoto, T., Ito, D., Ogawa, T., Tamoi, M., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. (2012)

An Arabidopsis FAD pyrophosphohydrolase, AtNUDX23, is involved in the flavin homeostasis. (2012) *Plant and Cell Physiology* 53, 1106-1116, 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pcs054

Maruta, T., Noshi, M., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. (2012)

H₂O₂-triggered retrograde signaling

DOI: 10.1093/pcp/pcs054

Maruta, T., Noshi, M., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. (2012)

H₂O₂-triggered retrograde signaling

from chloroplasts to nucleus plays a specific role in the response to stress. (2012), *Journal of Biological Chemistry* 287, 11717-11729, 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M111.292847

[学会発表](計 34 件)

村本亘平、高田梨沙、小川貴央、重岡成、吉村和也 2014 年 3 月 29 日 細胞内 NADH レベルの変化を介したストレス応答制御 日本農芸化学会 2014 年度大会 明治大学 (東京)

近藤真美、大北由佳、丸田隆典、石川孝博、重岡成、吉村和也 2014 年 3 月 29 日 VTC2 によるアスコルビン酸生成制御の組織特異性 日本農芸化学会 2014 年度大会 明治大学 (東京)

田中裕之、吉村和也、小川貴央、田部記章、丸田隆典、田茂井政宏、重岡成 2014 年 3 月 29 日 シロイヌナズナ GDP-D-Mannose 加水分解酵素 (AtNUDX9) の機能解析 日本農芸化学会 2014 年度大会 明治大学 (東京)

高田梨沙、小川貴央、村本亘平、吉村和也、田茂井政宏、重岡成 2014 年 3 月 18 日 一過的発現系を用いたシロイヌナズナ ADP-リボース/NADH 加水分解酵素 (AtNUDX6, 7) が生物的/非生物的ストレス応答に及ぼす影響の解析 日本植物生理学会 2014 年度大会 富山大学 (富山)

丸田隆典、吉田幸史、小川貴央、田茂井政宏、吉村和也、重岡成 2014 年 3 月 18 日 葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) はストレス/ホルモン応答のバランス制御に参与する 日本植物生理学会 2014 年度大会 富山大学 (富山)

大和開、問田英里、野志昌弘、野坂亮太、田茂井政宏、吉村和也、高木優、丸田隆典、澤嘉弘、石川孝博、重岡成 2013 年 12 月 5 日 ホメオドメインロイシンジッパー転写因子のレドックスシグナリングへの関与 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸国際会議場 (兵庫)

村本亘平、奥田雅宣、小川貴央、重岡成、吉村和也 2013 年 12 月 3 日 Nudix hydrolase (AtNUDX6 および 7) による細胞内 NADH 代謝を介した遺伝子発現制御 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸国際会議場 (兵庫)

大和開、問田英里、野志昌弘、野坂亮太、田茂井政宏、吉村和也、高木優、丸田隆典、澤嘉弘、石川孝博、重岡成 2013 年 9 月 6 日 ホメオドメインロイシンジッパー (HAT1) 転写因子を介したストレス応答機構 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区合同大会 県立広島大学 (広島)

徳田優希、川出野絵、小林美里、村井篤嗣、

吉村和也、堀尾文彦 2013 年 5 月 17 日 ODS ラットのアスコルビン酸欠乏初期における肝臓の酸化ストレス状態とその防御系の変動 日本ビタミン学会 第 65 回大会 一橋大学 (東京)

問田英里、野志昌弘、松田峻、野坂亮太、田茂井政宏、吉村和也、高木優、大和開、丸田隆典、澤嘉弘、石川孝博、重岡成 2013 年 5 月 18 日 葉緑体由来の酸化的シグナリングに参与する転写因子群の機能解析 日本ビタミン学会 第 65 回大会 一橋大学 (東京)

奥田雅宣、野田北斗、吉村和也、重岡成 2013 年 5 月 17 日 Nudix hydrolase による NADH 代謝を介した生物的/非生物的ストレス応答機構の解析 日本ビタミン学会 第 65 回大会 一橋大学 (東京)

村本亘平、重岡成、吉村和也 2013 年 5 月 17 日 細胞内 NADH 代謝が生物学的および非生物的ストレス応答に果たす役割 日本ビタミン学会 第 65 回大会 一橋大学 (東京)

吉田幸史、辻村昌希、三島真優、問田英里、丸田隆典、田茂井政宏、吉村和也、重岡成 2013 年 5 月 17 日 ストレスおよびホルモン応答の制御における葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) の生理学的意義 日本ビタミン学会 第 65 回大会 一橋大学 (東京)

中根友乃、塩見祐貴、丸田隆典、石川孝博、重岡成、吉村和也 2013 年 3 月 25 日 シロイヌナズナ VTC2 によるアスコルビン酸生成の明暗応答制御 日本農芸化学会 2013 年度大会 東北大学 (宮城)

奥田雅宣、田茂井政宏、吉村和也、重岡成 2013 年 3 月 25 日 AtNUDX6 および 7 による NADH 代謝を介した生物的/非生物的ストレス応答関連遺伝子の発現制御 日本農芸化学会 2013 年度大会 東北大学 (宮城)

辻村昌希、吉田幸史、問田英里、池本圭輔、丸田隆典、田茂井政宏、吉村和也、重岡成 2013 年 3 月 22 日 葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) による NADPH ステータス変化を介したストレス/ホルモン応答の制御 日本農芸化学会 2013 年度大会 東北大学 (宮城)

吉村和也、丸田隆典、重岡成 2013 年 3 月 21 日 FAD 加水分解酵素による植物フラビン代謝の制御機構 第 54 回日本植物生理学会 年会 岡山大学 (岡山) シンポジウム

中根友乃、平田剛士、丸田隆典、石川孝博、重岡成、吉村和也 2012 年 12 月 11 日 GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ (VTC2) によるアスコルビン酸生成の明暗応答の制御 第 35 回日本分子生物学会福岡国際会議場 (福岡)

桑聖奈、平田剛士、丸田隆典、石川孝博、重岡成、吉村和也 2012 年 6 月 22 日 エストロゲン誘導発現系によるアスコルビ

ン酸合成制御機構の解析 日本ビタミン
学会第 64 回大会 長良川国際会議場（岐
阜）

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・准教授
研究者番号：90379561