

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 6 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450010

研究課題名(和文) IRE1の欠損による種子大型化の原因解明

研究課題名(英文) An investigation of the cause of seed enlargement due to the loss of IRE1

研究代表者

三柴 啓一郎 (Mishiba, Kei-ichiro)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70390888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、シロイヌナズナ ire1 変異体 (ire1a/ire1b 二重変異体) 種子の大型化が、プロテインボディの増加によるものであることが示された。さらに、ire1 変異体に FLAG タグ配列を付加した IRE1A/B 遺伝子と、それらの変異型遺伝子を導入し解析した結果、種子サイズの変異にはセンサードメインを伴わない IRE1 の活性化が関係していることが推定された。この活性化は小胞体ストレス応答とは異なり、小胞体膜の脂肪酸組成の変化によるものである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study shows that the enlargement of seeds of Arabidopsis ire1 mutant (ire1a and ire1b double mutant) is caused by an increase the amount of protein bodies. Furthermore, we introduced wild type or mutated FLAG-tagged IRE1A/B genes into ire1 mutant and analyzed the transgenic plants. From these results, activation of IRE1 without sensor domain may be involved in the seed size mutation. This unusual IRE1 activation may be due to a change in the fatty acid composition of the ER membrane, unlike the ER stress response.

研究分野：植物分子育種

キーワード：小胞体ストレス応答 シロイヌナズナ 種子 IRE1

1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌タンパク質やゴルジ体、小胞体、細胞膜等を構成するタンパク質を合成する細胞小器官であり、小胞体内で合成されたタンパク質の折りたたみや切断、ジスルフィド結合、糖鎖の付加などが行われる。環境ストレス等により、小胞体内で正しく折りたたまれなかった不良タンパク質が蓄積する状態は、小胞体ストレスと呼ばれている。細胞は小胞体ストレスを感知して、小胞体シャペロンの誘導など、ストレスを緩和するための生体防御応答を活性化させることが知られており、小胞体ストレス応答、あるいは unfolded stress response (UPR) と呼ばれている。IRE1 は小胞体膜に局在する小胞体ストレスのセンサータンパク質であり、真核生物に広く保存されている。IRE1 は酵母や動物細胞では転写因子を細胞質スプライシングにより活性化することが知られていたが、植物細胞における IRE1 のターゲットは長らく不明であった。研究代表者らのグループは、シロイヌナズナの IRE1 が bZIP60 転写因子の mRNA を細胞質スプライシングすることにより、bZIP60 が核に移行して小胞体シャペロン等の UPR 遺伝子の発現を誘導することを明らかにした (Nagashima et al., 2011)。この研究により、IRE1-bZIP60 経路が植物の UPR に重要な役割を持つことが示された (図)。研究代表者らはさらに、IRE1 が小胞体で翻訳されるタンパク質 (シグナル配列を持つタンパク質や膜タンパク質) をコードする mRNA を分解する働きを持つことと、小胞体ストレスで誘導される細胞死を抑制する役割を持つことを発見した (Mishiba et al., 2013)。IRE1 による mRNA 分解は動物細胞でも見出され Regulated IRE1 Dependent Decay (RIDD) と呼ばれているが、どの程度の範囲で mRNA が分解されているかは不明であった。研究代表者はマイクロアレイ解析により、小胞体で翻訳される mRNA 分子種 (全遺伝子の約 1/3 と推定される) の少なくとも半数以上は RIDD のターゲットとして分解されることを推定している。しかし、RIDD のターゲットとなる mRNA の共通点や、RIDD が細胞死に及ぼす

影響などは未解明である。

また、研究代表者らは *ire1* 変異体 (*ire1a/ire1b* 二重変異体) の種子が野生型と比較して大型化していることを見出した。動物細胞では最近 RIDD が生体内、特に分泌組織の恒常性維持に重要な役割を持つことを示唆する研究が報告されたが、植物においても RIDD が種子の貯蔵組織において、何らかの役割を持っている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナ *ire1* 変異体種子の大型化が、IRE1 のどのような機能の欠損によって生じているのかを明らかにすることを目的としている。ここで、*bzip60* 変異体の種子では大型化がみられないことから、*ire1* 変異体種子の大型化は IRE1-bZIP60 経路以外の IRE1 の機能が関与していることが推定される。研究代表者は植物の IRE1 において RIDD による mRNA 分解が生ずることを示したが、この働きが種子大型化に関与している可能性が考えられた。一方、近年の動物細胞の研究で、小胞体膜のリン脂質中の飽和脂肪酸の増加により IRE1 がセンサードメイン非依存的に (つまり UPR とは無関係に) 活性化することが示されたが、この現象の生理的意義は不明であった。シロイヌナズナは、種子発達中に多量の油脂 (トリアシルグリセロール) を小胞体膜で合成するため、ここで膜の状態が変化し、IRE1 が種子発達中に活性化する可能性が考えられた。このような IRE1 の分子機能と種子サイズ変異の因果関係を解明するために、本研究では *ire1* 変異体と野生型や *bzip60* 変異体、さらには遺伝子組換え植物を用いて、以下を明らかにすることを目的とした。

種子の発達過程における、小胞体で翻訳される mRNA の発現変動を明らかにする。*ire1* 変異体と野生型における種子貯蔵組織の細胞小器官、特にプロテインボディ (タンパク質蓄積型液胞) に着目して光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察し、種子サイズの変異に貢献した細胞内構造物の同定を行う。種子発達過程での IRE1 活性化の分子機構について、*ire1* 変異体に FLAG タグを付加した IRE1 遺伝子を再導入した組換え植物を解析することにより明らかにする。

3. 研究の方法

種子発達過程における小胞体で翻訳される mRNA の発現解析

シロイヌナズナ *ire1* 変異体、*bzip60* 変異体、及び野生型における異なる発達ステージの莢 (長角果) をサンプリングし、莢から種子 (受精後の胚珠) を摘出した。200 以上の種子をマイクロチューブに回収して全 RNA を単離した。得られた RNA より cDNA を合成し、リアルタイム PCR (qPCR) に供試した。mRNA 発現量を確認する遺伝子は、小胞体で

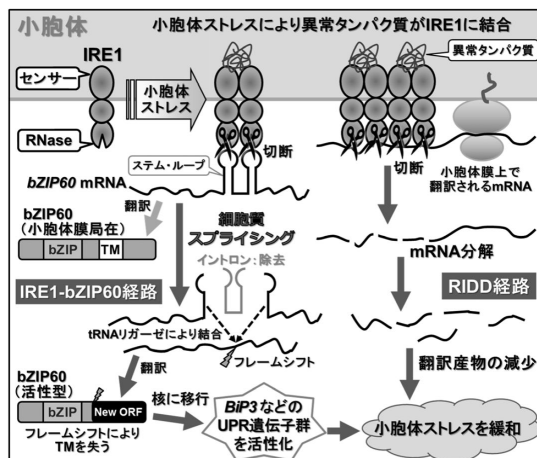


図 研究代表者らが明らかにした植物 IRE1 の分子機構

翻訳され（翻訳産物がシグナル配列や膜貫通領域を持つもの）、種子で発現量が増加する 2S アルブミンなどの種子貯蔵タンパク質遺伝子や、オレオシンなどのオイルボディ形成に関与する遺伝子を選定した。これら遺伝子の種子発達過程における mRNA 発現量の増減を野生型と変異体で比較した。

種子組織中の細胞内構造解析

上述の変異体と野生型の種子を固定し、包埋した後に切片を作製して光学顕微鏡で組織構造を観察した。さらに、ウルトラミクロトームで超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡(TEM)で細胞内の微細構造を観察した。TEM による観察は、望月知史博士(大阪府立大学)の協力の下で行った。

種子に含まれる脂肪酸やタンパク質の解析

種子中に含まれる脂肪酸組成について、ガスクロマトグラフ(GC)を用いて解析した。GC を用いた解析は、松村篤博士(大阪府立大学)の協力の下で行った。また、種子貯蔵タンパク質の蓄積を SDS-PAGE により解析した。

IRE1 活性化の解析

IRE1 の活性化を確認するための実験材料として、*ire1* 変異体に FLAG タグ配列を付加した *IRE1A* 及び *IRE1B* 遺伝子の導入を試みた。さらに、これら遺伝子のキナーゼや RNase ドメインに変異を導入した改変遺伝子や、内腔側ドメインを削除した変異遺伝子も作製して導入を試みた。プロモーターは内在のものを用い、アグロバクテリウムを用いた floral-dip 法によりシロイヌナズナに導入した。除草剤抵抗性マーカー遺伝子を用いて遺伝子導入個体を選抜し、次世代の分離比で導入された T-DNA のコピー数を推定した。

獲得した組換え体の外来 IRE1 タンパク質の発現を、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。また IRE1 の活性化を調査するために、Phos-tag を用いた IRE1 のリン酸解析を試みた。植物体への小胞体ストレス処理は、糖鎖合成阻害剤であるツニカマイシン、もしくは還元剤である DTT を培地に添加して行った。RIDD が生じていることを確認するために、RIDD のターゲットであることが判明している *PR-4* 遺伝子の発現を、ノザン解析や qPCR 解析により調査した。また IRE1-bZIP60 経路の活性化の有無については、その下流で働く *BiP3* 遺伝子の発現上昇を指標とした。

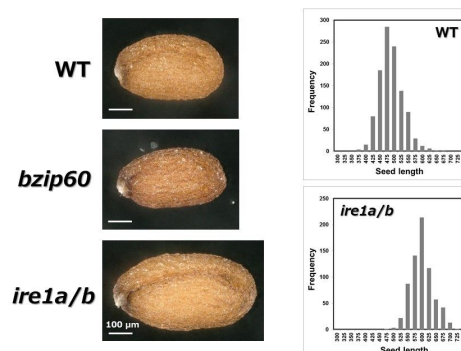
グリセロール処理による IRE1 活性化の解析

小胞体膜の脂質不飽和化が IRE1 を活性化させる可能性について検証するために、シロイヌナズナ植物体へのグリセロール処理を試みた。シロイヌナズナ幼植物体を MS 培地で培養し、グリセロールを培地に添加して 3 日間培養した後に解析を行った。植物組織中

の脂質不飽和化は、GC により解析した。また植物組織より全 RNA を抽出し、*PR-4* 遺伝子や *BiP3* 遺伝子の発現を調査した。

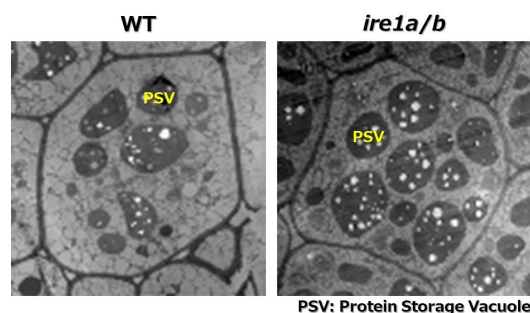
4. 研究成果

本研究ではまず、シロイヌナズナ *ire1* 変異体種子のサイズを、野生型(WT)や *bzip60* 変異体種子と比較した(図)。その結果、*ire1* 変異体の種子は、野生型や *bzip60* 変異体と比較して有意に大型化していることが示された。次に、*ire1* 変異体、*bzip60* 変異体、及び野生型の受精後の莢より様々なステージの胚珠を摘出して RNA を抽出し、qPCR により種子発達過程での種子貯蔵タンパク質遺伝子の mRNA 発現量を調査した。その結果、一部の種子貯蔵タンパク質遺伝子の mRNA 発現量が *ire1* 変異体で増加している傾向が認められたが、ステージによる発現量の変動が顕著に認められたため、この結果が RIDD によるものであるかについてはより詳細な解析が必要であると考えられた。



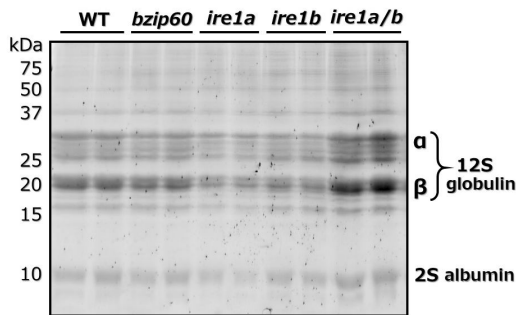
Enlargement of seeds in *ire1a/b* mutant

さらに、*ire1* 変異体と野生型の種子組織について、透過型電子顕微鏡(TEM)で細胞内の微細構造を観察した。その結果、野生型と比較して *ire1* 変異体では、細胞中のプロテインボディ(PSV)が占める割合に差異が認められた(図)。



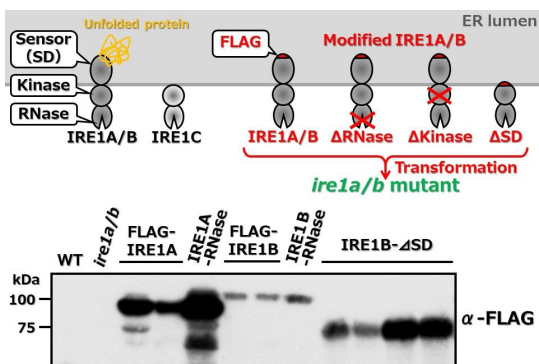
High accumulation of PSV in *ire1a/b* seed cells

この *ire1* 変異体におけるプロテインボディの増加を検証するため、種子中に含まれる種子貯蔵タンパク質の含量を SDS-PAGE により確認した。種子 1 粒あたりの種子貯蔵タンパク質に相当するバンドの比較から、*ire1* 変異体種子では *bzip60* 変異体や野生型種子よりも明らかに種子貯蔵タンパク質の含量が増加していることが確認された(図)。



Increasing amount of seed storage proteins in *ire1a/b* seeds

シロイヌナズナにおける IRE1 の活性化を解析するための実験材料として、*ire1* 変異体に FLAG タグ配列を付加した *IRE1* 遺伝子の導入を試みた。野生型の *IRE1A/B* 遺伝子に加えて、それらの RNase 活性や kinase 活性をそれぞれ欠損させた RNase と Kinase、さらに IRE1B のセンサードメイン(内腔側ドメイン)を欠損させた SD を作製し、*ire1* 変異体へ導入した。得られた組換え体について、抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロッティングにより導入遺伝子産物の発現を確認した(図)。

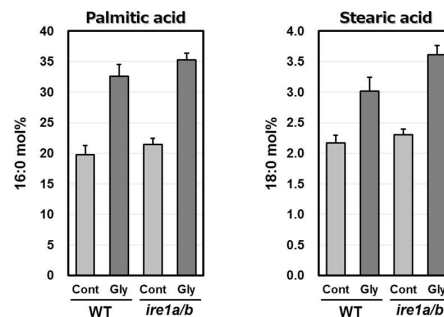


Transformation of modified IRE1 into *ire1a/b* mutant

野生型の *IRE1A/B* 遺伝子を導入した組換え体では、タンパク質の糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシンの処理により *BiP3* 遺伝子の発現誘導や *PR-4* 遺伝子の RIDD による分解が観察され、導入遺伝子が *ire1* 変異を相補することを確認した。さらに Phos-tag を用いたウエスタンブロッティングにより、小胞体ストレス時に IRE1 のリン酸化が生じることを見出した。一方、RNase や Kinase、SD では、小胞体ストレス処理による *BiP3* 発現誘導 (*IRE1-bZIP60* 経路の活性化) や RIDD が生じないことが示された。

本研究ではさらに、小胞体膜の飽和脂肪酸の増加による、センサードメイン非依存的な IRE1 活性化について検証した。グリセロール処理により植物組織の脂肪酸組成を変化させた報告に基づいて、シロイヌナズナ植物体にグリセロール処理を試みたところ、飽和脂肪酸が増加することを確認した(図)。

そこでグリセロール処理による *PR-4* mRNA 発現を野生型と *ire1* 変異体と比較した。その結果、グリセロール処理を行った植物体



Increasing saturated FA by glycerol treatment

では、*PR-4* の mRNA 発現において野生型と *ire1* 変異体で差異が認められたことから、飽和脂肪酸の増加により RIDD が生じている可能性が示唆された。さらに、IRE1B や SD を導入した系統でも、野生型と同様の *PR-4* 発現が認められたことから、飽和脂肪酸の増加においてはセンサードメインを介さずに RIDD が起きている可能性が示唆された。興味深いことに、SD を導入した系統では、大型化した種子サイズが野生型のサイズにまで回復したのが見出された。このことから種子サイズの変異には、センサードメインを伴わない IRE1 活性化が関係していることが推定された。シロイヌナズナには *IRE1A/B* 遺伝子の他に、センサードメインを持たない *IRE1C* 遺伝子が存在することが知られている。しかしながらこの遺伝子の欠損変異体は表現型が観察されず、その機能は不明である。本研究の結果、IRE1B の内腔側ドメインを欠損した SD では小胞体膜脂質の飽和化によって活性化される可能性が示唆された。このことから、IRE1C についても同様の活性化機構を持つ可能性があると思われる。

本研究により、*ire1* 変異体における種子の大型化は、IRE1 のセンサードメインを介さない活性化機構が関与していることが示唆された。つまりセンサードメインを欠いた SD を導入した組換え体では、小胞体ストレス応答は相補されないが、グリセロール処理に対しては *PR-4* の発現が野生型と同様のパターンを示したため、RIDD が生じている可能性が示唆された(図)。

Summary

| Seed size | Tunicamycin | | Glycerol |
|----------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>BiP3</i> | <i>PR-4</i> | <i>PR-4</i> |
| WT | ○ | ○ | ○ |
| <i>ire1a/b</i> | × | × | × |
| FLAG-IRE1B | ○ | ○ | ○ |
| IRE1A/B-ΔRNase | × | × | × |
| IRE1B-ΔSD | × | × | ○ |

Cytosplasmic splicing RIDD RIDD?
Unfolded protein response Lipid-dependent regulation?

この活性化機構は小胞体ストレス非依存的に、おそらく小胞体膜脂質の飽和化により

活性化されることが推定され、今後は作出した組換え植物を用いてより詳細な解析を行っていく予定である。

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5件)

Yuji Iwata, Makoto Ashida, Chisa Hasegawa, Kazuki Tabara, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi (2017) Activation of the Arabidopsis membrane-bound transcription factor bZIP28 is mediated by site-2 protease, but not site-1 protease. *Plant Journal*, 印刷中、査読有、DOI: 10.1111/tj.13572

Yuji Iwata, Noriko Hayashi, Kazuki Tabara, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi (2016) Tunicamycin-induced inhibition of protein secretion into culture medium of Arabidopsis T87 suspension cells through mRNA degradation on the endoplasmic reticulum. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80(6)、1168-1171、査読有、DOI: 10.1080/09168451.2016.1151340

Yukihiro Nagashima, Yuji Iwata, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi (2016) Arabidopsis tRNA ligase completes the cytoplasmic splicing of *bZIP60* mRNA in the unfolded protein response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 470(4)、941-946、査読有、DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.145

Yukihiro Nagashima, Yuji Iwata, Makoto Ashida, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi (2014) Exogenous salicylic acid activates two signaling arms of the unfolded protein response in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* 55(10)、1772-1778、査読有、DOI: 10.1093/pcp/pcu108

Kei-ichiro Mishiba, Yukihiro Nagashima, Noriko Hayashi, Nozomu Koizumi (2014) DNA fragmentation analysis. *Bio-protocol* 4(15)、e1203、査読無、DOI: 10.21769/BioProtoc.1203

[学会発表](計4件)

田原一喜、三柴啓一郎、小泉望、岩田雄二、細胞質スプライシングをモニターする形質転換シロイヌナズナの作出と解析、日本植物細胞分子生物学会・第33回大会、2015年8月10日、東京大学

Makao Ashida, Yuji Iwata, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi、Molecular mechanism of proteolytic activation of bZIP28, an Arabidopsis membrane-bound transcription factor involved in the unfolded protein response、日本植物生理学会・第56回年会、2015年3月17日、東京農業大学 Yukihiro Nagashima, Yuji Iwata, Kei-ichiro

Mishiba, Nozomu Koizumi、Ligation of bZIP60 mRNA cleaved by IRE1 in Arabidopsis、日本植物生理学会・第56回年会、2015年3月16日、東京農業大学 長島幸広、岩田雄二、三柴啓一郎、小泉望、IRE1による細胞質スプライシングの生化学的解析、日本植物細胞分子生物学会・第32回大会、2014年8月32日 いわて県民情報交流センター

[その他]

ホームページ等

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/pmb/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三柴 啓一郎 (MISHIBA, Kei-ichiro)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70390888