

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07441

研究課題名(和文) 葉緑体 in vitro RNAスプライシング系を用いたスプライシング反応の解析

研究課題名(英文) Analyses of chloroplast splicing reactions using our in vitro splicing system.

研究代表者

杉浦 昌弘 (Sugiura, Masahiro)

名古屋大学・遺伝子実験施設・特別教授

研究者番号：80027044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タバコ植物の葉緑体ゲノムは、110余種の遺伝子を持つ。このうち、12種のタンパク質をコードする遺伝子はイントロンと呼ばれる「余分な配列」を含む。この葉緑体のatpF遺伝子のイントロンの2次構造モデルを作図し、エキソン結合部位(EBS1とEBS2)を探索した。推定したEBS1とEBS2につき、変異を導入し、我々が葉の抽出液から作った、この余分な配列を除く(スプライスと呼ばれる)系で調べた。その結果、推定したEBS1、EBS2が正しいことを示した。EBS2は、この効率を高めることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人や動物など地球上の全ての生物は、酸素を吸って炭酸ガスを吐き出す。一方、植物は太陽光エネルギーを使って、吐き出された炭酸ガスと水から、炭水化物を合成する。これは葉緑体の中で行われている「光合成」と言われる現象で、我々はこれによって食糧と綺麗な空気を得られ生きながらえている。我々は、この「光合成」と言う現象を正しく理解し、この地球上で光合成が正常に持続する様に、正しい知識を持って我々の置かれた環境を保全していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：The chloroplast genome in tobacco plants contains about 110 genes. Among them, 12 protein-coding genes possess introns. A secondary structure model of the intron in the atpF gene was constructed and its exon-binding sites (EBS1 and EBS2) were searched. Splicing activities of their mutated EBSs were measured using our in vitro system. Our result indicated that estimated EBSs were found to be correct and that EBS2 enhanced splicing activities.

研究分野：生物学

キーワード：タバコ葉緑体 イントロン RNAスプライシング 2次構造モデル in vitro系

1. 研究開始当初の背景

(1) 顕花植物の葉緑体ゲノムは、環状の約 15 万塩基対の 2 本鎖 DNA で、110 余種の遺伝子を持つ。このうち、12 種のタンパク質の遺伝子と 6 種の tRNA 遺伝子はイントロンを含む。菌類のミトコンドリアのイントロンを基にした Michel らの分類によれば、葉緑体のイントロンは、1 種を除き全てグループ II 型とされている。

(2) 菌類のグループ II イントロンは、高温と高塩濃度の非生理的条件下でセルフスプライシングと、自身がコードする逆転写酵素で宿主 DNA に転位する能力を持つ。しかし、葉緑体のイントロンはセルフスプライシングも転位もしない。セルフスプライシングは、非生理的条件（高濃度の塩類、高温など）で起きる。従って、菌類のミトコンドリアで得られた知見を、そのまま葉緑体イントロンに当てはめるのは問題である。

(3) 葉緑体では、複雑で時間の掛かる遺伝学的手法を使って、いくつかのタンパク質の関与が報告されているが、詳細なスプライシング機構の解析はできないまま、研究が止まっていた。そこで、我々は、植物の葉から葉緑体を取り出し、活性のある抽出液を得て、無細胞系 (*in vitro* 系とも言う) の開発を進めた。真核生物の核ゲノムの遺伝子由来する RNA を対象とするスプライシング過程は、遺伝学的手法の使えないヒト HeLa 細胞の *in vitro* 系を中心にほぼ完全に解明されているが、葉緑体では、かなり異なっていると考えられていた。

2. 研究の目的

葉緑体ゲノムのタンパク質をコードする遺伝子のうち、イントロンを持つ遺伝子は 12 種ある。その中の代表的な数種のものにつき、開発した *in vitro* 系を使って、それらのスプライシングの過程を詳細に解明する。

3. 研究の方法

(1) 実験材料として、純系の栽培タバコを選んだ。栽培が容易で、大きな葉ができるので多量の葉緑体が容易に得られることと、「日本たばこ産業」からタバコ栽培の許可を受ければ、保障された純系の種子を無料で提供してもらえるからである。植物育成室で栽培したタバコから、常法に従って葉緑体を調製する。*in vitro* スプライシング系は、もと研究員の長谷川桂子氏が、すでに作成されていた翻訳系や RNA エディティング系などを参考にして、数年かけて開発に成功していたので、その手法を踏襲する。次に、数種の遺伝子からそれぞれ常法に従って pre-mRNA を作成する。これらを組み合わせて、*in vitro* でスプライシング過程を解析する。

(2) 次に、タバコの H⁺-ATP アーゼのサブユニット CF1 アルファをコードする *atpF* と チトクローム *b/f* 複合体のサブユニット IV をコードする *petD* のイントロンの 2 次構造モデルを作成する。菌類のグループ II イントロンの 2 次構造モデルを元に、ホウレンソウ、エンドウ、シロイヌナズナ、イネとも比較しながら進めた。

(3) 下図のように、5' エキシソンの 3' 末側 (イントロン結合部位, IBS1 と IBS2) と相補性の高い配列 (エキソン結合部位, EBS1 と EBS2) を探す。これらの配列を 1 塩基ずつ変異させ、*in vitro* 系でスプライシングの正確性を検証する。これにより、スプライス部位を識別するイントロン領域を同定する。この結果をもとに、葉緑体イントロンの新しい 2 次構造モデルを提唱する。

4. 研究成果

(1) 無細胞系 (*in vitro*) の再現性の検証。複数の実験者によって、長谷川氏の方法により葉緑体から活性のある抽出液が得られたので、再現性が高いことを示している。そこで、タバコ葉緑体の *petD* のグループ II B 様イントロン (742 nt) と *atpF* のグループ IIA 様イントロン (695

nt) の二種を使用して、スプライス部位を識別するイントロンとエキソンの配列を同定した。予想通りの結果を得たので、我々の *in vitro* 系が使用出来ることを示した。

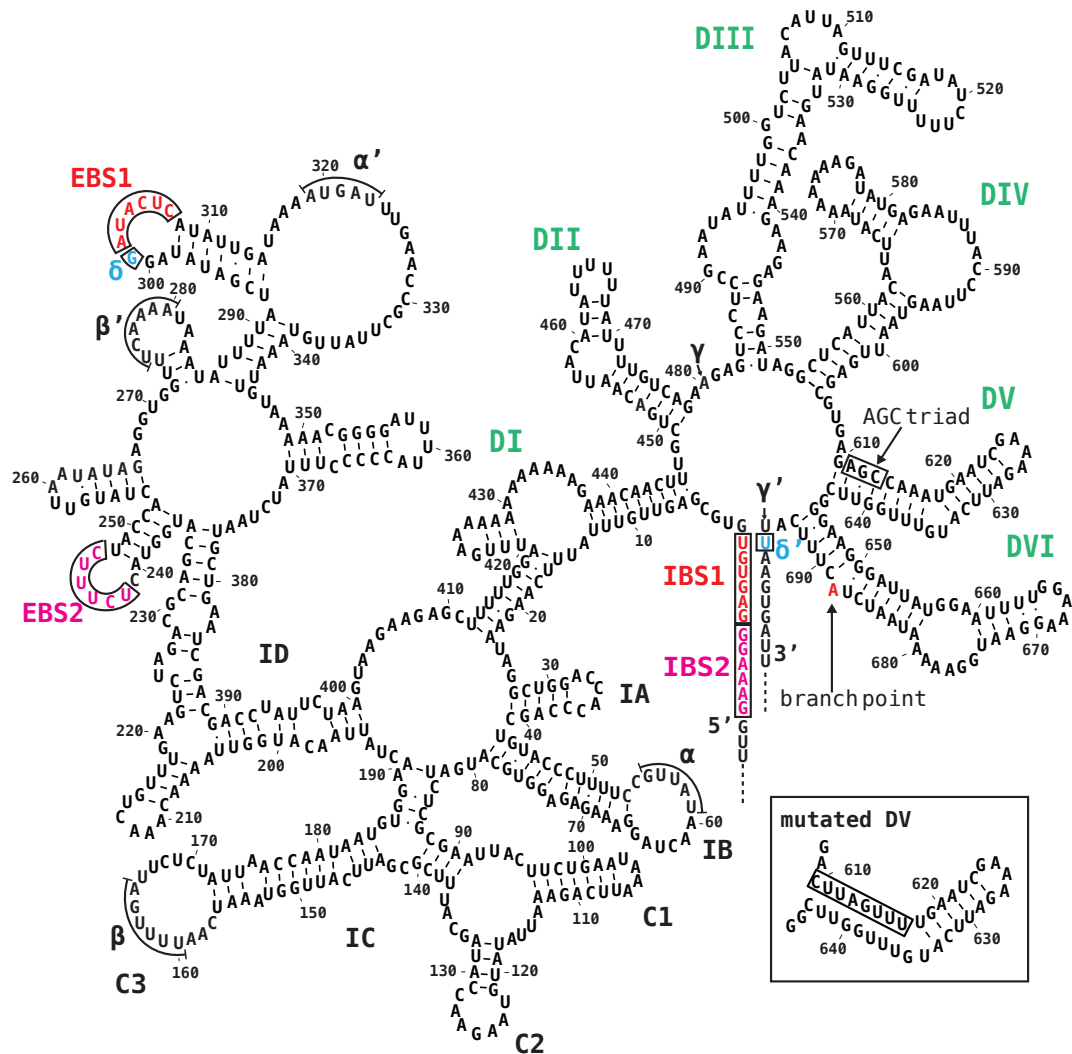


図. タバコ *atpF* イントロンの2次構造

(2) タバコ葉緑体の *atpF* のグループIIA様イントロン(695 nt)のスプライス部位を識別するイントロンとエキソンの配列を同定。この遺伝子のイントロンのドメイン I に存在するエキソン結合配列(EBS1)は、5' エキシソンの3' 末端のイントロン結合配列(IFS1)と結合すると推定されていた。推定したEBS1に2種類の変異を導入し、*in vitro* スプライシング系で調べた。その結果、全くスプライスが起きないので、このEBS1とIFS1の結合は必須であることを示した。しかし、EBS2に変異を導入した場合はスプライシングを少し阻害するだけであった。従って、EBS2-IFS2結合は、スプライシングの効率を高めるが、必須では無いことを示した。*in vitro* 系でスプライスされたmRNAを抽出して、それぞれの塩基配列を調べたところ、正しい位置でイントロンが除去され、両エキソンが結合されていることを明らかにしたので、我々の *in vitro* 系は葉緑体内の反応を正しく反映していると考えられる。

(3) 3' エキシソンのガンマー位置の塩基(U)の働きを、変異を導入して調べた。Uを、A, C, Gに変えてもスプライスされ、mRNAを抽出してそれぞれ塩基配列を調べたところ、いずれも正しい位置でイントロンが除去されていた。以上の事から、葉緑体のスプライシング過程は、菌類のグループIIイントロンのセルフスプライシングと少し異なる事を示した。これらの成果は、2021年に *Plant and Cell Physiology* 誌に発表した。

(4) 上の2次構造図に示す様に、イントロンはDIからDVIの6個のドメインよりなる。DIIから

DVI の機能を調べるため、それぞれ部分的に欠失させた。その結果、DII、DIII と DIV は、ほぼ不要で、特に DIV は半分ほど欠失した方が活性が少し上る事があった。DV は必須で、少しだけ欠失させても活性を失った。DVI は一部欠失しても活性があった。(これらの成果は、論文として発表予定)。

(5) トランス-スプライスするリボソームタンパク質 S12 の解析。

上記の、*atpF* と *petD* のイントロンは、一本の RNA 鎖であるが、イントロンが途中で切れているものがある。タバコには、一種あり、リボソームタンパク質 S12 遺伝子 *rps12* のイントロンである。前方を 5' *rps12*、後方を 3' *rps12* と呼ぶ。これらの 2 種のイントロン断片がスプライスするには、両者が正確に接近することが必須である。そのためにそれぞれに相補的な配列が存在する必要がある。ドメイン III かドメイン IV で相補的に結合しているらしい事が考えられる。まず、5' *rps12* と 3' *rps12* の 2 次構造モデルを作成した。ついで、各々の必要な mRNA を合成した。さらにその二つのイントロンを結合させて一本の mRNA にしたものも作成した。ついで、葉緑体抽出液内の 5' *rps12* mRNA を調べたところ、成熟 *rps12* mRNA が多く蓄積していることがわかった。そのため、外から加えた外来 mRNA 基質と区別するため、両端に異なる人工配列を加えた。これらを用いて、反応をこれから調査する。現在進行中の研究課題である。

(6) 以上で、今回の我々の *in vitro* 系で、本格的に葉緑体でのスプライシングの詳細な反応過程解析が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keiko Inaba-Hasegawa, Ayumi Ohmura, Masayo Nomura, Masahiro Sugiura	4. 巻 62
2. 論文標題 Development of an In Vitro Chloroplast Splicing System: Sequences Required for Correct pre-mRNA Splicing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1311, 1320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab095	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
研究協力者	稲葉（長谷川） 桂子 (Inaba-Hasegawa Keiko)	岐阜大学・大学院医学系研究科・研究員 (13701)	
研究協力者	大村 亜有美 (Ohmura Ayumi)	名古屋大学・遺伝子実験施設・技術員 (13901)	
研究協力者	野村 昌代 (Nomura Masayo)	名古屋大学・遺伝子実験施設・技術補佐員 (13901)	

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