

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380063

研究課題名（和文）新規核内 mRNP による遺伝子発現制御機構

研究課題名（英文）Mechanisms of gene regulation mediated by a novel nuclear mRNP

研究代表者

今井 亮三 (RYOZO IMAI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・寒地作物研究領域・上席研究員

研究者番号：90291913

研究成果の概要（和文）：

低温ショックドメインタンパク質 AtCSP3 と核内で複合体を形成する核型ポリ A 結合タンパク質 PABN1 の機能解析を行った。PABN1 は CSP3 と核スペckルで相互作用し、低温、乾燥、塩などのストレス耐性の獲得に働いていることが明らかとなった。また、それ以外にも花成や花茎の分枝の制御にも関わることを示された。また、SPL4 が新たにこの複合体に含まれることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Nuclear polyA-binding protein, PABN1, was characterized in this study. PABN1 interacted with the cold shock domain protein, AtCSP3, within nuclear speckles and regulates freezing, drought and salt stress tolerance. The mRNP may also contain SPL4, a regulator of flowering time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：mRNA, ポリ A 結合タンパク質, シロイヌナズナ, ストレス耐性

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現は、DNA→mRNA→機能タンパク質という情報の流れの中で、階層的な制御を受ける。核内で転写された mRNA 前駆体が様々な修飾を受け、細胞質へ移送されて翻訳にいたる過程においても、キャップ化、スプライシング、poly-A 付加、核膜透過、翻訳マスキング、特異的分解等様々な制御ステップ

が働くと考えられる。mRNA 前駆体には、転写開始と同時に RNA 結合タンパク質が結合し、リボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体が形成される (図 1)。それ以降は、翻訳までの各ステップにおいてそれぞれ特異的な RNA 結合タンパク質からなる RNP が形成され、転写後遺伝子発現制御の根幹をなすと考えられている。

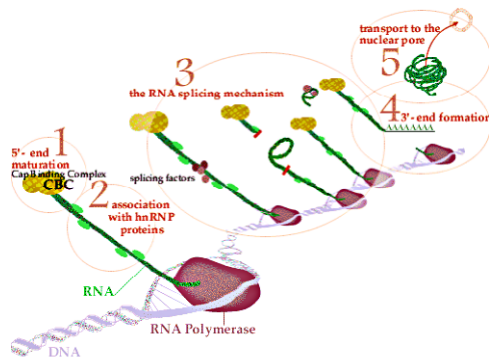


図1 核内におけるmRNA生成に関与するRNP

我々は、植物が耐凍性を獲得する低温馴化過程において、高度に蓄積する低温ショックドメイン (CSD) タンパク質をコムギより見出し、その機能に関して、先駆的研究を行ってきた。その過程で、植物のCSDタンパク質は原核生物の低温ショックタンパク質と構造的、機能的に保存されており、RNAの2本鎖構造を1本鎖に巻き戻す (RNAシャペロン) 活性を共有することを証明した。また、シロイヌナズナの低温ショックドメインタンパク質であるAtCSP3の欠損変異株 (*atcsp3-2*) においては、耐凍性が著しく低下すること、AtCSP3の過剰発現体は野生株より耐凍性が向上することを明らかにした。更に、変異株を用いたトランスクリプトーム解析から、ストレス耐性に関与するいくつかの遺伝子の発現がAtCSP3により制御されていることを明らかにした。これらの研究から、AtCSP3が植物の耐凍性獲得において重要な働きを持つことが明らかとなった。AtCSP3による耐凍性制御機構を探るため、酵母Two-hybrid法により相互作用タンパク質のスクリーニングを行ったところ、核局在型poly (A)結合タンパク質 (PABN1) が候補となった。これらの相互作用が*in vitro*においても確認され、核内においてmRNPとして複合体を形成していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、AtCSP3, PABN1 を構成要素とする新規核内 mRNP の機能解明を目指しており、目標は次の3点に絞られる

(1) 細胞内における AtCSP3-PABN1 複合体を検出、PABN1 の polyA 結合性、発現の特徴等からその生化学的機能を明らかにする。

(2) PABN1 の3) PABN1 のノックアウト変異体および過剰発現体を用いて表現型解析を行い、PABN1 の機能を解析する。

(3) PABN1 と AtCSP3 を含む mRNP の新

たな構成要素を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) タンパク質間相互作用の解析
PABN1 と AtCSP3 相互作用の細胞内局在性については、二分子蛍光相補性解析 (BiFC) により行った。AtCSP3-nYFP, PABN1-cYFP 融合遺伝子を同時にタマネギ表皮細胞に導入し、YFPの再構成により、相互作用を検出した。核スペックルマーカーとしては SRp34-RFP を用いた。

(2) polyA 結合性解析
組換え PABN1 を精製し、polyA-agarose, polyC-agarose (シグマ) に対して結合性を調べた。ゲルへの結合は PABN1 抗体を用いて検出した。

(3) 発現解析
PABN1 の発現解析は RT-PCR 法により特異的プライマーを用いて検出した。タンパク質の蓄積は、ウサギ抗 PABN1 抗体をもちいたウエスタンブロット解析により行った。

(4) 変異体及び形質転換体の解析
pabn1 変異体は ABRC シロイヌナズナストックセンターより入手し、T-DNA 挿入補も固体を分離して使用した。PABN1 過剰発現体は、PABN1 を pBI121 組み込んだコンストラクトをアグロバクテリウムを介して形質転換し、作出した。

(5) ストレス耐性試験
凍結耐性は、幼苗をマイナス 2°C で凍結させ、プログラムフリーザーを用いて、-1°C/時間の冷却温度で指定温度まで冷却した後、4°C で解凍し、10 日後の生存を調査した。塩ストレス耐性は MS 培地上で生育させた発芽 7 日目の幼苗を、120mM または 200 mM の NaCl を含有する MS 培地に移植して、10 日後の植物体を比較した。乾燥耐性は 7 日間の給水停止後、再給水させ、生存率を求めた。

(6) ツーハイブリッドスクリーニング
PABN1 と複合体を形成するタンパク質を同定するため、PABN1 をベイトとし、CloneMiner cDNA library construction kit を用いて作製したシロイヌナズナ幼苗 cDNA library と共に出芽酵母 EGY48 株に導入し、His⁺生育性および β-galactosidase 活性を指標にしてスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) PABNs と AtCSP3 の相互作用の細胞内局在性

酵母ツーハイブリッド法により AtCSP3 相互作用タンパク質として単離された AtPABN1 について、細胞内における相互作用を BiFC 法により明らかにした。図 2A に示す原理により、両遺伝子を共発現させた細胞において、相互作用により機能的な YFP タンパク質が再構成され、その蛍光シグナルにより相互作用が細胞内のどの部位で起こるのかが明らかにすることができる。図 2B に示す通り、AtCSP3 と PABN1 の相互作用は核内においてスペックル様の構造体において観察された。

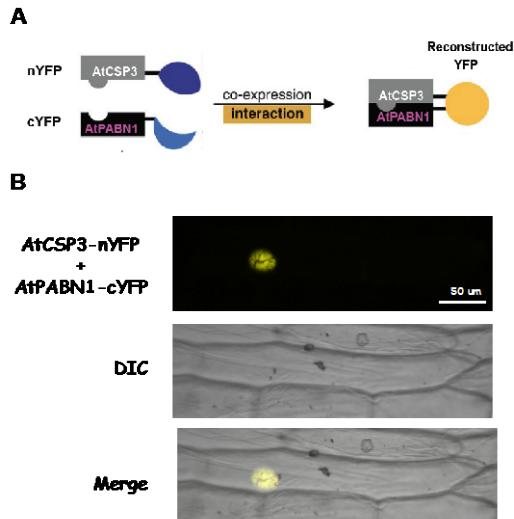


図2. BiFC法によるPABN1とAtCSP3の相互作用の検出

次に、この構造体が核内スペックルであることを確認するため、核スペックルマーカーである SRp34-RFP を用いて、

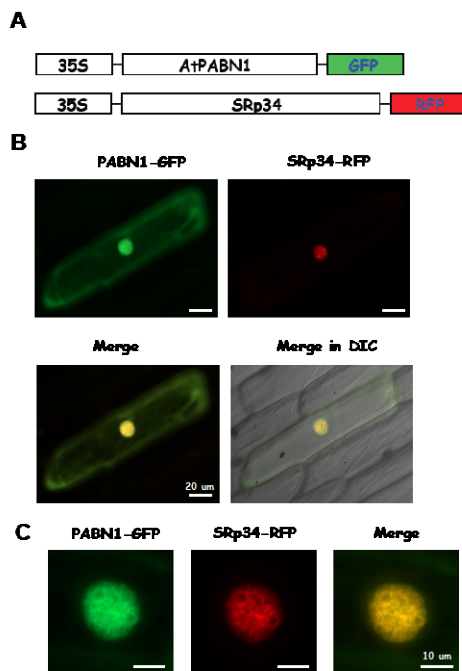


図3. PABN1は核スペックルに局在する

PABN1-GFP との共発現を行った。その結果、両者の局在性が一致したことから、PABN1 が核スペックルに局在し、そこで AtCSP3 と相互作用していることが示唆された (図 3)。

(2) PABN1 のポリ A 鎖結合性

次に、PABN1 が poly A 鎖に結合するか否かについてビーズを用いて検討した。PABN1 を GST 融合タンパク質として大腸菌中に発現させ、精製した。精製タンパク質を用いて、polyA, polyC ビーズへの結合活性を調べた。図 4 に示すとおり、polyA ビーズに対しては結合したが、polyC ビーズに対しては結合しなかった。また、コンペチターである polyA の共存によりビーズへの結合は消失した。以上の結果から、PABN1 はポリ A 特異的結合性を持つと考えられた。

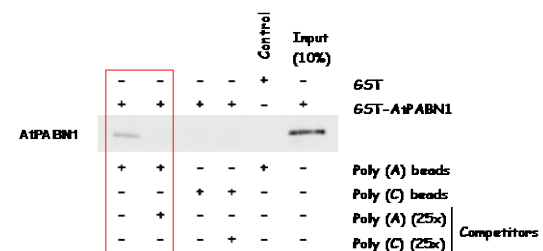


図4. PABN1とPolyA、ビーズとの結合性

(3) PABN1 のストレスに応答性

AtCSP3 は低温、乾燥、塩ストレスにより誘導され、これらのストレスの耐性獲得に働いている。そこで、PABN1 のこれらのストレスに対する応答を検討した。図 5 に示すとおり、PABN1 の発現は、低温、乾燥、塩ストレスにより誘導された。また ABA 処理によっても発現誘導された。この結果から、PABN1 の機能として、これらのストレス応答への関与が示唆された。

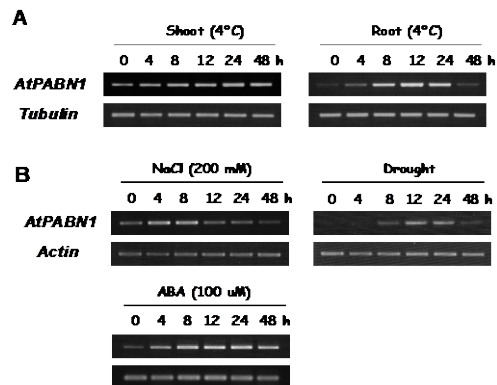


図5. PABN1の低温(A)、塩、乾燥、ABA(B)に応答した発現

また、発現の組織特異性についても検討した。図 6 に示すとおり、PABN1 の発現は、

若いステージの花組織において強く発現しており (図 6 A), タンパク質レベルにおいてもそれらの組織で蓄積が見られた (図 6 B). また, promoter-GUS 遺伝子の発現解析から, 幼苗においては茎頂と根端に発現が見出された (データ省略).

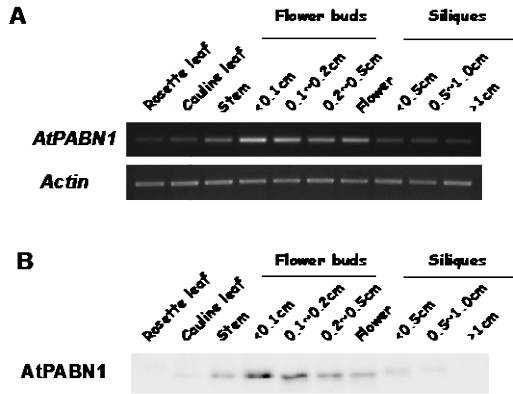


図6. *PABN1*の地上部各組織における発現

(4) *pabn1* 変異体のストレス耐性
PABN1 の塩, 乾燥耐性における機能を明らかにするため, *pabn1* 変異体を用いて, ストレス耐性を調べた. 本変異体では第二エクソン内に T-DNA が挿入されており, 発現が完全にノックアウトされていた (図 7A). 低温馴化後の植物体を用いた耐凍性試験では, -12°C の凍結温度において生存率の違いが現れ, 変異体で耐凍性の低下が示された (図 7C). また, 120 mM NaCl を含む培地での生存率を比較したところ, 変異体において顕著な感受性が観察された (図 7D). また, 乾燥ストレス耐性についても, 変異体における耐性の低下が観察された (データ省略). これらの結果から *PABN1* はストレス耐性に関与しており耐性を正に調節している可能性が示唆された.

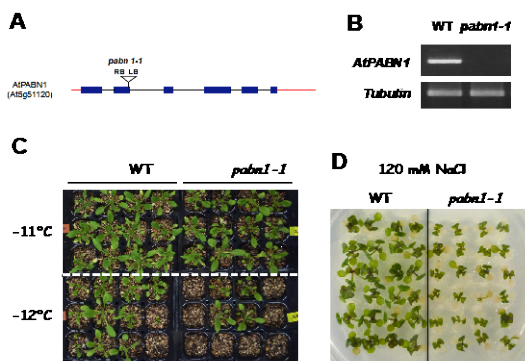


図7. *pabn1*ノックアウト変異体の耐凍性および耐塩性
 A. 変異体のT-DNA挿入部位. B. 遺伝子の発現解析.
 C. 耐凍性試験. D. 耐塩性試験.

(5) *PABN1* 過剰発現体のストレス耐性

上述の可能性を更に検討するため, *PABN1* の過剰発現体 (*PABN1ox*) を作出した. 過剰発現体4系統のうち発現の高い3系統 (図 8 AB) を用いて, ストレス耐性を解析した. 1-19 系統の耐凍性においては, -14°C における生存率が野生株に比べて向上していた (図 8C). 200 mM の塩ストレスにおいては, 過剰発現体 (1-19) において顕著な塩耐性の向上が観察された (図 8D). また, 乾燥耐性についても供試3系統において, 耐性の大幅な向上が観察された (図 8E).

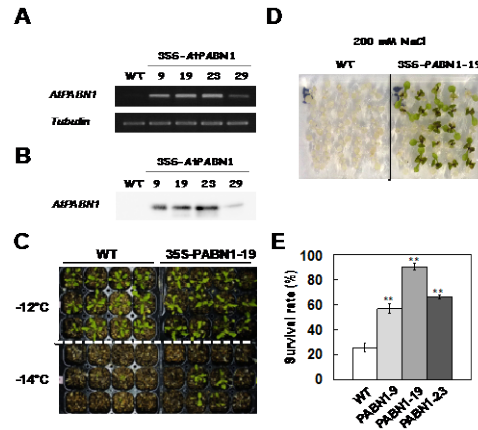


図8. *PABN1* 過剰発現株におけるストレス耐性. (A) RT-PCRによる発現解析. (B) ウェスタン解析. 過剰発現体の耐凍性 (C), 耐塩性 (D), 乾燥耐性 (E).

(6) *PABN1* 過剰発現体が示す形態学的の変化

PABN1ox は栄養増殖ステージでは目立った表現型を示さなかったが, 生殖生長期になると, 変化が見られた. まず, 花芽分化が長日短日両条件下において花成が早まること示された (図 9AB). また, 花茎の分枝にも異常が見られ, 過剰発現体では花茎数が異常に増殖した (図 9C). その結果として, 個体当たりの長角果数が顕著に増加し, 種子収量が 1.5 倍に増加した (図 9C). このような特長はシロイヌナズナのストリゴラクトン (*max*) 変異体の表現型と酷似していた. そこで, SL 生合成遺伝子の発現を調べた. *MAX1* 遺伝子の発現は野生株,

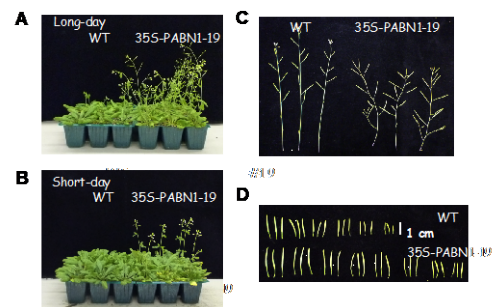


図9. *PABN1* 過剰発現株の形態学的変化. 長日 (A), 短日 (B) 条件での花成の促進. 花茎の異常分枝 (C). 長角果数 (収量性) の増加 (D).

PABN1ox 間で殆ど変化なかったが、MAX4 の発現が PABN1ox 株で大きく上昇していた。MAX4 は SL によりフィードバック制御を受けるが、MAX1 は受けないことから、PABN1ox では SL の生合成ではなく、シグナル伝達機構に欠損を生じている可能性が考えられた。

これらの結果から、PABN1 の過剰発現により、ストレス耐性と収量性の両方が大きく改善されることが明らかとなった。

(7) PABN1 相互作用タンパク質
 また、PABN1 と複合体を形成するタンパク質を酵母ツーハイブリッド法によりスクリーニングしたところ、複数の相互作用因子が同定された。この中で Squamosa promoter binding protein-like 4 (SPL4) に着目した。SPL4 は AtCSP3 との相互作用因子としても同定されており、AtCSP3-PABN1-SPL4 からなる mRNP 複合体の形成が示唆された。今後はこの SPL4 の機能解析と複合体としての様な調節を受けるのかを明らかにすることが必要である。

(8) PABN1 の機能モデル
 本研究の成果から、PABN1 の機能に関しては図 10 に示したモデルが考えられる。AtCSP3 と PABN1 は核内のスペックルにおいて相互作用する。ストレス耐性は両遺伝子の過剰発現体で共通に観察された。一方、花成の促進枝分かれの異常は PABN1 過剰発現体でのみ観察された。従って、ストレス耐性においては CSP3 との相互作用が重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

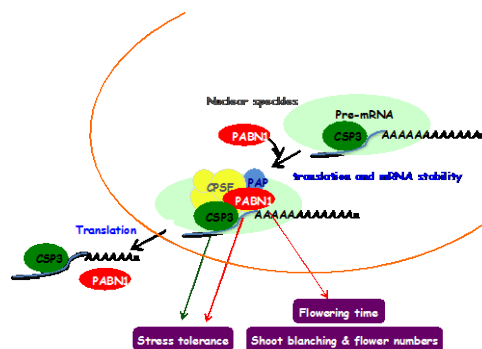


図10. 核内におけるPABN1の機能モデル

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 3 件)

① Kim, M.-H., Sonoda, Y., Sasaki, K., Kaminaka,

H., Imai, R. (2013) Interactome analysis reveals versatile functions of Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm. *Cell Stress and Chaperones*, 18(4):517-525. doi: 10.1007/s12192-012-0398-3.

② Sasaki, K., Kim, M.-H., Imai, R. (2013) Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 2 is a negative regulator of cold acclimation. *New Phytologist*, 198(1):95-102. doi: 10.1111/nph.12118.

③ Sasaki K and Imai R (2011) Pleiotropic roles of cold shock domain proteins in plants. *Frontier in Plant Sci.* 2, 116.

[学会発表] (計 6 件)

① Kim, M.H., Sonoda, Y., Sasaki, K., Imai, R. (2012) Functional analysis of nuclear poly (A) binding protein 1 (PABN1) that interacts with CSP3 in Arabidopsis. Plant and Microbe Adaptations to Cold 2012, Sapporo, Japan. 2012.6.25.

② Imai, R., Kim, M.H., Sasaki, K., Tabata, D. (2011) RNA chaperones regulate stress responses and development in plants. (Invited talk) International Plant RNA Workshop, June, Yokohama, Japan, 2011.6.19.

[図書] (計 1 件)

① Imai, R., Kim, M.H., Sasaki, K., Sato, S., Sonoda, Y. (2013) Cold shock domain proteins in Arabidopsis: functions in stress tolerance and development. In Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World. eds. Imai, R., Yoshida, M., Matsumoto, N., Springer, New York, USA. in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 高い種子収量性を有する環境ストレス耐性植物及びその作製方法

発明者: 今井亮三, 金明姫, 柳楽洋三, 田岡直明

権利者: 独) 農業・食品産業技術総合研究機構, 株) カネカ

種類: 国内特許

番号: 特願 2012-52018

出願年月日: 2012. 3. 8

国内外の別: 国内

6. 研究組織研究

代表者

(1) 今井 亮三 (IMAI RYOZO)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・寒地作物研

究領域・上席研究員
研究者番号：90291913