

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07450

研究課題名(和文)小胞体膜上でのmRNA分解

研究課題名(英文) Degradation of mRNA on the membrane of endoplasmic reticulum

研究代表者

小泉 望 (Koizumi, Nozomu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20252835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：基部陸上植物のゼニゴケにおいて小胞体ストレス応答は保存されており、IRE1を介した細胞質スプライシング、RIDDともゼニゴケでもシロイヌナズナと同様に観察されることを示した。IRE1による細胞質スプライシングで活性化されるbZIP60に新たに出現するアミノ酸配列(ORF2)が小胞体シャペロンBiP3プロモーターの転写活性を10倍近く上昇させることを明らかとした。変異型種子貯蔵タンパク質を発現するシロイヌナズナを作成した。この植物の種子では種子貯蔵タンパク質の蓄積が減少し、通常発現が見られないBiP3の発現が認められた。つまり小胞体ストレス応答が種子で恒常的に起こる植物が作出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物では小胞体ストレス応答の分子機構、生理的役割について不明な点が少なくない。真核生物で最も古いストレスセンサーであるIRE1が介在する小胞体ストレス応答の分子メカニズムがシロイヌナズナと同様、基部陸上であるゼニゴケでも見られることを明らかにした。植物の小胞体ストレス応答の分子メカニズムの理解が進むと考えられる。

変異型の種子貯蔵タンパク質12Sアルブミンを発現するシロイヌナズナを作成したところ種子において小胞体ストレス応答が観察された。IRE1遺伝子破壊株でこの変異型12Sアルブミンを発現するシロイヌナズナを作成することで小胞体ストレス応答の生理的役割の理解が進むと期待できる。

研究成果の概要(英文)：It was shown that the ER stress response occurs in a basal land plant, liverwort. Both of IRE1-mediated cytoplasmic splicing and RIDD were observed as well as in Arabidopsis. It was revealed that an amino acid sequence (ORF2) appeared in bZIP60 after cytoplasmic splicing by IRE1 increases the transcriptional activity of the ER chaperone BiP3 promoter by about ten-fold. Arabidopsis expressing a mutated seed storage protein was produced. In the seeds of this plant, the accumulation of seed storage protein was reduced, and BiP3 expression, which was not normally expressed in seeds, was observed. In other words, we succeeded to produce a plant in which the ER stress response constitutively occurs in seeds.

研究分野：応用細胞分子生物学

キーワード：小胞体ストレス応答 細胞質スプライシング 小胞体シャペロン RNA分解 シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体膜上で翻訳されるタンパク質(以下「分泌性タンパク質」)は小胞体内腔で正しくフォールディングされる必要がある。フォールディングに異常が起これるとその回避のために小胞体シヤペロンの誘導と小胞体へのタンパク質の流入量の減少が起こる。この細胞応答は小胞体ストレス応答と呼ばれ真核生物で広く保存されている。小胞体ストレスは分泌性タンパク質のフォールディングを阻害する要因(ストレス)の総称で実験室では糖鎖合成阻害剤ツニカマイシンなどにより惹起される。

脊椎動物では小胞体膜に局在する3つのタンパク質(IRE1、PERK、ATF6)が、高等植物ではIRE1とbZIP28の2つが小胞体ストレス応答のセンサータンパク質である。ATF6(動物)、bZIP28(植物)はタンパク質レベルの切断を受けて核へ移行し転写因子としてUPR関連遺伝子を誘導する。PERKは主として翻訳抑制に働く。植物にはPERKは無い。

IRE1は真核生物で最も保存されたストレスセンサーで、N末端より、小胞体内腔のセンサードメイン、膜貫通ドメイン(TMD)、細胞質のキナーゼドメイン、RNaseドメインから構成される。IRE1は小胞体ストレスに応じてRNase活性による細胞質スプライシングを介してbZIP型転写因子(出芽酵母ではHAC1、動物ではXBP1)を活性化する。実施者らはシロイヌナズナからIRE1とその標的であるbZIP60を単離するとともに、スプライシングの完結にtRNAリガーゼが関わることを報告してきた。bZIP60は細胞質スプライシングを介して活性型となり、BiPなどのUPR関連遺伝子の転写を誘導する。

シロイヌナズナのIRE1はbZIP60の細胞質スプライシングに加え、約6,000の分泌性タンパク質遺伝子のmRNAの分解に関わることも実施者らは報告した。このmRNA分解はRIDD(Regulated IRE1-Dependent Decay)と呼ばれる。つまりIRE1はbZIP60の活性化によるフォールディング能力の増強に加えてRIDDによるmRNA分解を介して小胞体への分泌性タンパク質の流入の抑制に働き小胞体ストレスを軽減すると考えられた。bZIP60遺伝子破壊株がTmに対して感受性を示さないのに対して、IRE1遺伝子破壊株はTmに対して感受性を示すことから小胞体ストレスにおけるRIDDの重要性が示唆された。植物にはPERKが無い分、RIDDがタンパク質の小胞体への流入の抑制に働いている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

シロイヌナズナの細胞質スプライシングのうちIRE1が関わる「細胞質スプライシング」と「RIDD」という2つの異なる『小胞体膜上でのmRNA分解』のメカニズムと生理的役割を解明することを目的とした。具体的には以下の項目について検討をおこなった。

### (1) 基部陸上植物ゼニゴケにおける小胞体ストレス応答の保存性

IRE1による細胞質スプライシングとRIDDのどちらが進化的に古いメカニズムであるかは未だ諸説ある。出芽酵母では細胞質スプライシングが見られるがRIDDは起こらない。一方、分裂酵母では細胞質スプライシングが観察されずRIDDが見られる。そこで基部陸上植物のモデルであるゼニゴケを材料にIRE1とbZIP60のホモログを探索し、ゲノム編集により遺伝子破壊を行った後、遺伝子破壊株の表現型を調べることにした。

### (2) シロイヌナズナのbZIP60の細胞質スプライシングにより生じる新規ORFの機能解析

小胞体ストレスが起こるとIRE1によるbZIP60 mRNAの23塩基の細胞質スプライシングの結果、bZIP60には新たな読み枠から翻訳される39アミノ酸のペプチド配列(ORF2と呼ぶ)が付加される。シロイヌナズナのbZIP60遺伝子破壊株から調整したプロトプラストを用いた一過的レポーターアッセイによりORF2の転写活性化への影響を明らかとすることを目的とした。

### (3) IRE1の欠損が細胞自律的小胞体ストレスに与える影響

IRE1欠損シロイヌナズナは小胞体ストレス応答を惹起する薬剤であるツニカマイシンに対して感受性を示す。しかし、ツニカマイシン処理は自然条件下では起こらない。塩ストレスや高温ストレスが小胞体ストレスを誘導するという説もあるが、申請者らの実験条件では再現できていない。また、トウモロコシの*floury-2 (fl-2)*変異体では種子貯蔵タンパク質zeinのシグナルペプチドの切断箇所に変異が入ったことでタンパク質のプロセッシングに異常が起こり、小胞体ストレス応答が恒常的に起こっている。そこで、種子貯蔵タンパク質に変異を持つシロイヌナズナを作成し、IRE1欠損が種子の発達等に与える影響を調べる。

### (4) RIDDにおけるIRE1によるmRNAの切断配列の同定

IRE1は細胞質スプライシングにおいてはbZIP60のmRNAを2か所で切断し、その配列特異性もかなり明らかとなっている。しかし、RIDDにおける切断箇所の配列は、酵母、動物でも必ずしも明らかでないが植物においては定かでない。IRE1が細胞質スプライシングとRIDDをどのように使い分けているかを理解するにはRIDDによる切断配列の同定が必要である。そこで、2つのアプローチによりRIDDによる分泌性タンパク質のmRNAの切断配列の同定を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 基部陸上植物ゼニゴケにおける小胞体ストレス応答の保存性

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の遺伝子データベースに対してシロイヌナズナの細胞質ストレス応答関連遺伝子ホモログの探索を行った。BiP に代表される小胞体ストレス応答関連遺伝子に加えて IRE1 ホモログ (MpIRE1) が検出された。また単なるホモロジーサーチでは検出されなかったが bZIP60 と同様、mRNA が 2 つのステムループ構造を取ると予想される bZIP 型転写因子として MpbZIP7 を検出した。CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により MpIRE1 と MpbZIP7 を破壊したゼニゴケを作成し、その解析を行った。

#### (2) シロイヌナズナの bZIP60 の細胞質スプライシングにより生じる新規 ORF の機能解析

bZIP60 全長 (bZIP60u) 細胞質スプライシングを受けた bZIP60 (bZIP60s) 全長 bZIP60 の膜貫通領域以降を失った bZIP60 C をエフェクターと、bZIP60 によって強く制御される BiP3 のプロモーターにルシフェラーゼ (Luc) を連結したコンストラクトをレポーターとして bZIP60 遺伝子破壊株から調整したプロトプラストを用いた一過的発現とルシフェラーゼ活性の測定を行った。

#### (3) IRE1 の欠損が細胞自律的小胞体ストレスに与える影響

シロイヌナズナの CRC (12S globulin の 1 つ) のシグナルペプチドが切れない変異型 CRC (mCRC) を CRC 遺伝子破壊株で発現させた。コントロールとして野生型 CRC (つまり変異の無い CRC) を CRC 遺伝子破壊株で発現させた。これらの植物と IRE1 遺伝子破壊株を交配し IRE1 が欠損した状態で mCRC を発現させた場合に起こることを調べることにした。また、IRE1 遺伝子破壊株で mCRC を発現させることも行った。

#### (4) RIDD における IRE1 による mRNA の切断配列の同定

分裂酵母およびヒト培養細胞を用いて RIDD の標的配列が報告されているが必ずしもコンセンサスが得られているとは言えない。本研究シロイヌナズナで RIDD の標的になることを確認しているシグナルペプチドを付加した GFP (ssGFP) の配列に見られる酵母、ヒトの配列を全て破壊した ssGFP を発現するシロイヌナズナを作成し、小胞体ストレス応答における mRNA 分解を観察した。また、別のアプローチとして IRE1 により分解された mRNA の末端が通常の RNase による分解とは異なり、2'3' サイクリックリン酸で、市販の T4 RNA リガーゼではライゲーション反応が起こらないが tRNA リガーゼではライゲーション反応が起こることを利用して mRNA にリンカーを付加して PCR を行い次世代シーケンサーによる解析を試みることにした。

### 4. 研究成果

#### (1) 基部陸上植物ゼニゴケにおける小胞体ストレス応答の保存性

ゼニゴケには 1 つの MpBiP、MpIRE1 遺伝子が存在した。bZIP は 15 存在したが、bZIP60 と同様に膜貫通領域を持つものとして MpbZIP7 が検出された。MpbZIP7 はツニカマイシンにより細胞質スプライシングを受けることが明らかとなった。MpIRE1 と MpbZIP7 をゲノム編集で破壊したところ MpBiP のツニカマイシンによる誘導が抑制された (図 1)。

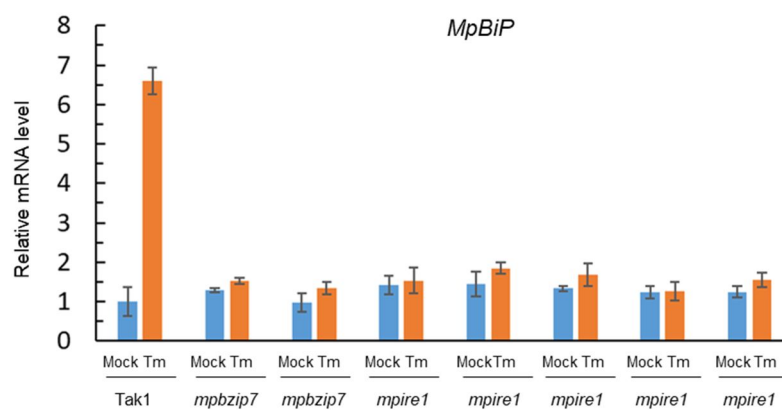


図 1 MpbiP17 および MpIRE1 遺伝子破壊株における MpBiP のツニカマイシン (Tm) による誘導

即ち、基本的にはシロイヌナズナで見られるように MpIRE1 により MpbZIP7 が細胞質スプライシングを受けて MpBiP の転写誘導に働くと考えられた (図 1)。

また、MpIRE1 および MpbZIP7 の遺伝子破壊株をツニカマイシン存在下の培地で生育させたところ、野生型と比べて MpIRE1 破壊株は明らかに生育が阻害された (図 2)。

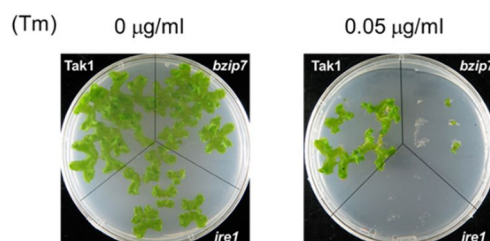


図 2 MpIRE1 と MpbZIP7 遺伝子破壊株のツニカマイシン感受性

bZIP60 破壊株も生育が阻害されたが MpIRE1 破壊株よりも阻害の程度は小さかった (図 2)。

以上のことから基部陸上植物であるゼニゴケにおいても転写因子の細胞質スプライシングによる活性化制御機構が存在することが明らかになるとともに、転写因子によるシャペロンの誘導以外にも細胞をストレスから守るメカニズムがあることが明らかとなった。複数の分泌性タンパク質の mRNA が野生型、MpbZIP7 の破壊株ではツニカマイシン処理で減少するのに対し MpIRE1 破壊株では減少しないことから RIDD も起こると考えられた。図 2 に示す MpIRE1 破壊株の感受性は RIDD 欠損の結果と推測された。つまり細胞質スプライシング、RIDD とともに本質的にはゼニゴケでもシロイナズナと同様に保存されていると考えられた。

## (2) シロイナズナの bZIP60 の細胞質スプライシングにより生じる新規 ORF の機能解析

bZIP60u、bZIP60s、bZIP60 C をエフェクターとし、BiP3 プロモーターに連結したルシフェラーゼをレポーターとして、ルシフェラーゼ活性を測定した。図 3 に示すように ORF2 があることで相対的なルシフェラーゼ活性が約 8 倍に上昇することが分かった。さらに ORF2 の長さを変えてルシフェラーゼ活性に与える影響を調べたところ、ORF2 (219-258) を (219-243) まで短くしても活性に殆ど影響は見られなかったが、(219-227) まで決失した場合は、

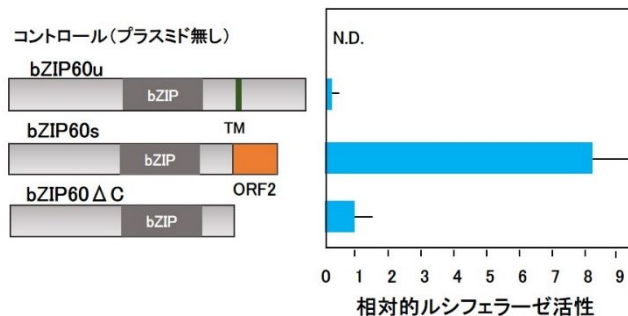


図 3 ルシフェラーゼを使ったレポーターアッセイ

C と同程度まで活性が減少した。つまり bZIP60s に見られる ORF2 には転写活性化能を上昇させる機能があり、特に bZIP60s の 227 - 243aa の間に重要な働きをするアミノ酸が存在すると考えられた。今後は、この配列を詳細に調べるとともにこの配列を制御するメカニズムの解析を行う。

## (3) IRE1 の欠損が細胞自律的小胞体ストレスに与える影響

変異型 CRC (mCRC) をシロイナズナの CRC 遺伝子破壊株で発現させた (mCRC/crc)。コントロールとして野生型 CRC (つまり変異の無い CRC) を CRC 遺伝子破壊株で発現させた (CRC/crc)。mCRC/crc の種子では CRC (正確には mCRC) の発現量がタンパク質レベルで減少しており、BiP3 の発現が増加していた。つまり小胞体ストレス応答が自律的に起こっていることが示唆された。CRC タンパク質の減少が RIDD、ERAD あるいは ER-phagy によるものかは今後の検討課題である。種子の色や形状が実体顕微鏡レベルで異常が見られ、SEM、TEM でも異常が見られた。また mCRC/crc は種子の発芽が遅れることも明らかとなった。これは種子貯蔵タンパク質が減少したことにより発芽時に必要な物質の供給が遅れたからであると考えられた。また IRE1 遺伝子破壊株で mCRC を発現させた場合、鞘の形成、種子の結実に阻害が見られた。mCRC の発現が小胞体ストレス応答を誘導すると考えられたことから IRE1 遺伝子破壊株の CRC 遺伝子を破壊したうえで mCRC を発現させた植物を作出し、種子を中心に詳細な解析を行うことでツニカマイシン処理などによらない小胞体ストレス応答の役割を明らかにしていきたい。

## (4) RIDD における IRE1 による mRNA の切断配列の同定

シグナルペプチドを付加した GFP (ssGFP) の配列に見られる RIDD の標的と考えられる配列を全て破壊した ssGFP を発現するシロイナズナでは DTT (ツニカマイシンと同様に小胞体ストレス応答を誘導する) 処理により、ssGFP mRNA の分解が見られなかった。つまり、破壊した配列に RIDD の標的配列があると考えられた。さらに破壊した配列を部分的に回復させて、ssGFP mRNA の分解を調べ、標的配列を探索した結果、CUGCUG あるいは CCGCCG が候補配列であるという予備的結果を得たが、他の遺伝子に関しても解析を行い、裏付けを得る必要がある。

他の方法としてシロイナズナの tRNA リガーゼを調整し、IRE1 により切断された mRNA の末端にリンカーを付加し、PCR を行い、増副産物を次世代シーケンサーで解析することを念頭に実験をおこなった。予備実験として、網羅的に mRNA を解析するのではなく、すでに RIDD の標的であることが分かっている PRX34 の検出を行った。しかし、PCR で PRX34 以外の遺伝子も増幅され、PRX34 の切断位置も同一では無かった。今後、反応条件を検討し特異性の高い実験系を構築する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Iwata Yuji, Iida Tsukasa, Matsunami Toshihiro, Yamada Yu, Mishiba Kei-ichiro, Ogawa Takumi, Kurata Tetsuya, Koizumi Nozomu	4. 巻 23
2. 論文標題 Constitutive BiP protein accumulation in Arabidopsis mutants defective in a gene encoding chloroplast-resident stearyl-acyl carrier protein desaturase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 456 ~ 465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1111/gtc.12585">https://doi.org/10.1111/gtc.12585</a>	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 -
1. 著者名 Ozgur Rengin, Uzilday Baris, Iwata Yuji, Koizumi Nozomu, Turkan Ismail	4. 巻 69
2. 論文標題 Interplay between the unfolded protein response and reactive oxygen species: a dynamic duo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 3333 ~ 3345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1093/jxb/ery040">https://doi.org/10.1093/jxb/ery040</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tabara Kazuki, Iwata Yuji, Koizumi Nozomu	4. 巻 1691
2. 論文標題 The Unfolded Protein Response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Endoplasmic Reticulum, Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 223 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7389-7_17">https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7389-7_17</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 岩田雄二、小泉望	4. 巻 56
2. 論文標題 植物における膜結合型転写因子の活性化機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 732 - 737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Iwata Yuji, Yagi Fumika, Saito Sae, Mishiba Kei-ichiro, Koizumi Nozomu	4. 巻 34
2. 論文標題 Inositol-requiring enzyme 1 affects meristematic division in roots under moderate salt stress in Arabidopsis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 159 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.0615a">https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.0615a</a>	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 -

1. 著者名 Iwata Yuji, Nishino Tsuneyo, Koizumi Nozomu	4. 巻 34
2. 論文標題 Overexpression of the endoplasmic reticulum stress-inducible geneTIN1causes abnormal pollen surface morphology in Arabidopsis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.0823b">https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.0823b</a>	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 -

1. 著者名 Tabara Kazuki, Iwata Yuji, Koizumi Nozomu	4. 巻 1691
2. 論文標題 The Unfolded Protein Response	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 223 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7389-7_17	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Rikako, Mishiba Kei-ichiro, Koizumi Nozomu, Iwata Yuji	4. 巻 12
2. 論文標題 Deficiency in the double-stranded RNA binding protein HYPONASTIC LEAVES1 increases sensitivity to the endoplasmic reticulum stress inducer tunicamycin in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1186/s13104-019-4623-3">https://doi.org/10.1186/s13104-019-4623-3</a>	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 -

1. 著者名 Mishiba Kei-ichiro, Iwata Yuji, Mochizuki Tomofumi, Matsumura Atsushi, Nishioka Nanami, Hirata Rikako, Koizumi Nozomu	4. 巻 2
2. 論文標題 Unfolded protein-independent IRE1 activation contributes to multifaceted developmental processes in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900459	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 竹田翔, 十川太輔, 西浜竜一, 三柴啓一郎, 大和勝幸, 河内孝之, 岩田雄二, 小泉望
2. 発表標題 ゼニゴケ小胞体ストレスセンサーIRE1の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田原一喜, 三柴啓一郎, 小泉望, 岩田雄二
2. 発表標題 形質転換シロイヌナズナによる細胞レベルでの細胞質スプライシングの検出
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田原一喜, 三柴啓一郎, 小泉望, 岩田雄二
2. 発表標題 形質転換シロイヌナズナによる細胞レベルでの細胞質スプライシングの検出
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuki Tabara, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi, Yuji Iwata
2. 発表標題 Detection of cytoplasmic splicing by BiFC-based reporter in Arabidopsis
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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