

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14701

研究課題名(和文) イネ種子貯蔵タンパク質mRNAの標的輸送に必要なRNA結合タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of RNA binding proteins involved in mRNA transport in rice endosperm

研究代表者

福田 真子 (FUKUDA, MASAKO)

九州大学・農学研究院・特任助教

研究者番号：30750385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロラミンmRNAの核から小胞体への輸送に関するRNA結合タンパク質(RBP)-A, I, J, K, Qの同座変異体をTilling法で計14系統選抜した。すべてのrbp変異体において、プロラミンの蓄積が減少していた。RBP-A, RBP-J及びRBP-Qは核及びプロラミン顆粒(PB-ER)に局在した。rbp-a, rbp-i, rbp-q変異種子では、PB-ERが小型化していた。RBP-A, RBP-I及びRBP-Qは、プロラミンのPB-ERへの蓄積に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、各RNA結合タンパク質(RBP)変異体種子において、プロラミン蓄積の減少、及びプロラミン顆粒の小型化が認められたことから、プロラミンの正常な蓄積には、小胞体からの輸送蓄積系(翻訳後制御)だけでなく、各RBPを介したプロラミンmRNAの核から小胞体(ER-PB)への輸送(転写後制御)が必要であることが示唆された。RBPが貯蔵タンパク質の輸送・蓄積に関与するという知見は得られていたが、更に確かなものとなった。

研究成果の概要(英文)：1) A total of 14 allelic mutants of RNA binding protein (RBP)-A, I, J, K, and Q involved in the transport of prolamins mRNA from the nucleus to the endoplasmic reticulum were selected by the Tilling method. 2) Accumulation of prolamins was reduced in all rbp mutants. 3) RBP-A, RBP-J and RBP-Q were localized in the nucleus and prolamins granules (PB-ER). 4) In the rbp-a, rbp-i, and rbp-q mutant seeds, the PB-ER were downsized. These results suggest that RBP-A, RBP-I and RBP-Q are involved in the accumulation of prolamins in PB-ER.

研究分野：細胞生物学

キーワード：イネ種子 貯蔵タンパク質 グルテリン プロラミン RNA結合タンパク質 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンは、小胞体上で合成され、そのまま小胞体内に蓄積され、Protein Body (PB)-I を形成する。一方、グルテリンは、同様に小胞体上で前駆体として合成され、直ちに小胞体から排出され、ゴルジ体を経由して液胞へ輸送され、PB-II を形成する。

mRNA の特定小胞体領域への標的輸送は高度に保存されたメカニズムである (Eliscovich et al. 2013)。イネ登熟種子の胚乳細胞内において、グルテリン mRNA はそれぞれ嚢状小胞体(cis-ER)膜上に、一方、プロラミン mRNA は PB-I を包む小胞体 (PB-ER) に局在する(Choi et al. 2000)

プロラミン及びグルテリンの mRNA は、特定小胞体領域への標的輸送に必要な特異的な RNA 配列 (zipcode) を 3'末端の非翻訳領域に持つことが明らかにされた(Hamada et al. 2003)。グルテリン mRNA の zipcode には 1 種類の RBP しか結合しないが(Doroshenk et al. 2014)、プロラミン mRNA の zipcode には 16 種類の RBP が結合することが分かった(Crofts et al. 2010)。更に、これらの RBP に対する特異抗体を用いた共免疫沈降法等の解析から、プロラミン zipcode には 5 種類の RBP(RBP-A, RBP-I, RBP-J, RBP-K, RBP-Q)から構成される 3 種類の異なる RBP 複合体の存在が示された(Yang et al. 2014)。各複合体は RBP-J と RBP-K、それに加えて RBP-A または RBP-I を含んでいることが分かった。プロラミン mRNA の zipcode に結合する RBP がグルテリン mRNA よりも多く存在することは、プロラミン mRNA の標的輸送が複雑なメカニズムによって制御されていると考えられる。

【参考文献】

- Eliscovich et al. (2013) J. Biol. Chem. 288: 20361-20368
- Choi et al. (2000) Nature 407: 765-767
- Hamada et al. (2003) Plant Cell 15: 2265-2272
- Doroshenk et al. (2014) Plant Mol. Biol. 85: 381-394
- Crofts et al. (2010) Planta 231: 1261-1276
- Yang et al. (2014) Plant Physiol. 164: 1271-1282

2. 研究の目的

2 種類のタンパク質の異なる細胞小器官への蓄積は、小胞体からの輸送蓄積系の違いだけでなく、両 mRNA の異なる小胞体領域への局在の違いによって引き起こされると考えられているが、どのようなメカニズムで制御されているのか詳細は不明である。本研究では、プロラミン及びグルテリン mRNA の特定小胞体領域への標的輸送に関与している RNA 結合タンパク質(RNA Binding Protein: RBP)に焦点を当て、RBP の変異が mRNA の標的輸送と貯蔵タンパク質の蓄積部位にどのような影響を与えるのかを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

- (1)プロラミン mRNA の PB-ER 上への局在に関する RNA 結合タンパク質の機能を明らかにするために、プロラミン mRNA の PB-ER への標的輸送に関与すると考えられる 5 種類の RBP(RBP-A, RBP-I, RBP-J, RBP-K, RBP-Q)変異体を選抜した。
- (2)選抜された各 BPP 変異種子を SDS-PAGE に供し、各貯蔵タンパク質の蓄積に変化があるかを調査した。
- (3)イネ胚乳細胞内における、5 種の RBP (RBP-A, I, J, K, Q) の局在を明らかにするために、RFP 遺伝子を付加させた各 RBP 遺伝子を野生型「キタアケ」に導入させた形質転換体イネを作製し、RBP の局在を共焦点レーザー顕微鏡で調査した。
- (4)RBP の変異が貯蔵タンパク質の蓄積への影響を明らかにするために、各 RBP 変異種子における、貯蔵タンパク質プロラミン及びグルテリンの局在を蛍光及び電子顕微鏡により解析した。

4. 研究成果

- (1)Tilling 法により各 RBP 変異体を選抜した結果、これまでに RBP-A が 5 系統, RBP-I が 20 系統, RBP-J が 2 系統, RBP-K が 6 系統, RBP-Q が 2 系統選抜された。
- (2)各 RBP の同座変異体 2~5 系統を選抜し、同変異体完熟種子の貯蔵タンパク質の蓄積変を調査した。尚、F2 種子より分離してきたノーマルタイプの種子をコントロールとした。その結果、すべての変異系統において、13kDa 及び 14 kDa、もしくは 14 kDa のみのプロラミン分子の蓄積が減少していた。更に、RBP (RBP-A, I, J, K, Q) 変異体種子における各 RBP タンパク質の発現量を調査した結果、2 系統の rbp-i 変異体(P163L, G160D)において RBP-I タンパク質量が減少していたものの、他は野生型とほぼ同等であった。

(3) RBP を付加させた各 RBP 形質転換体イネの登熟種子を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。その結果、RFP-RBP-A, RFP-RBP-J 及び RFP-RBP-Q は核及びプロラミン蓄積部位である、

Protein Body (PB)-ER 膜に局在が認められた。

(4) 各 RBP 変異体種子における貯蔵タンパク質の局在を蛍光顕微鏡により調査した。その結果、rbp-i (P163L,G160D,S176F)、rbp-q(G318S)変異種子においてプロラミン顆粒が野生型と比較して小型化していた。rbp-a(T43I,P444S)変異種子でも、プロラミン顆粒が小型化し、野生型で観られる球形を示さず、構造内部がもろくなり脆弱化していた。

プロラミン顆粒(PBI)が特に小型化していた変異体 2 系統の PBI を電子顕微鏡により詳細に調べた。その結果、rbp-i(S176F)変異種子では、小型化した PBI 内に野生型で認められる年輪構造(システイン残基に富むプロラミン分子の凝集により生じる)が観察されなかった。これらの結果は、RBP-I、RBP-Q 及び RBP-A によるプロラミン mRNA の小胞体(PB-ER)への輸送はプロラミン分子の PB-ER 内蓄積に関与することを示唆している。

また、rbp-q(G318S)変異種子の電子顕微鏡解析の結果、野生型 PBI が存在せず、プロラミンはでこぼこ状の球形の顆粒に存在し、同顆粒は小胞体内に多量に存在していた。興味深いことに、同顆粒が集合した領域内及び同顆粒内にグルテリン抗体で標識される部位が存在した。このことから、小胞体内にグルテリン前駆体も留まっていることが考えられる。従って、RBP-Q はプロラミンの蓄積のみならず、グルテリンの輸送・蓄積においても関与していると考えられる。

今後、*in situ* RT-PCR を立ち上げ、各 RBP 変異体のグルテリン及びプロラミン mRNA の局在を調査する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Li Tian, Kelly A. Doroshenk, Laining Zhang, Masako Fukuda, Haruhiko Washida, Toshihiro Kumamaru, Thomas Okita	4. 巻 32
2. 論文標題 Zipcode RNA-Binding Proteins and Membrane Trafficking Proteins Cooperate to Transport Glutelin mRNAs in Rice Endosperm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2566-2581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1105/tpc.20.00111	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 該当する
1. 著者名 Chou HL, Tian L, Washida H, Fukuda M, Kumamaru T, Okita TW	4. 巻 284
2. 論文標題 The rice storage protein mRNAs as a model system for RNA localization in higher plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 203-211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2019.04.014	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 該当する
1. 著者名 Chou HL, Tian L, Fukuda M, Kumamaru T, Okita TW	4. 巻 60
2. 論文標題 The Role of RNA-Binding Protein OsTudor-SN in Post-Transcriptional Regulation of Seed Storage Proteins and Endosperm Development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2193-2205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcz113.	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 該当する
1. 著者名 Tian L, Chou HL, Fukuda M, Kumamaru T, Okita TW.	4. 巻 182
2. 論文標題 mRNA Localization in Plant Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 97-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.19.00972.	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 該当する

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	ワシントン州立大学	Institute of Biological Chemistry	