

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06724

研究課題名(和文)サーモスペルミンによる植物遺伝子翻訳促進機構の解明

研究課題名(英文)Study on the mechanism of thermospermine-enhanced mRNA translation in plants

研究代表者

高橋 卓 (Takahashi, Taku)

岡山大学・自然科学学域・教授

研究者番号：20271710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのサーモスペルミン非感受性変異株*its*の解析をすすめ、*its1*、*its3*、*its7*、*its11*がそれぞれRNAメチル化酵素、RNAスプライシング関連タンパク、RNA結合タンパク、RNAシュードウリジン化酵素をコードする遺伝子に変異を持っていることを突き止めた。以上の結果から、サーモスペルミンの作用にRNA修飾が深く関わるということが強く示唆される状況に至った。

サーモスペルミン欠損変異*ac15*に対する抑圧変異株*sac503*についても原因遺伝子を特定し、サーモスペルミンが翻訳促進する標的遺伝子*SAC51*のuORFに塩基置換を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリアミンはあらゆる生き物をもつ低分子塩基性化合物で、多様な生理活性を持つ。シロイヌナズナの解析から、オーキシンによる維管束分化の誘導をポリアミンの1つであるサーモスペルミンが抑えるという機能を明らかにしたが、その作用機構は不明である。本研究では、サーモスペルミン非感受性変異株*its*を単離し、*its1*、*its3*、*its7*、*its11*がそれぞれRNAメチル化酵素、RNAスプライシング関連タンパク、RNA結合タンパク、RNAシュードウリジン化酵素をコードする遺伝子に変異を持つことを突き止め、サーモスペルミンの作用にRNA修飾が深く関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Four mutants of *Arabidopsis* that are insensitive to high concentrations of thermospermine were isolated and named *its1*, *3*, *7*, and *11*. Genetic experiments revealed that the genes responsible for *its1*, *3*, *7*, and *11*, encode an RNA methyl transferase, an RNA splicing-related enzyme, an RNA-binding protein, and a pseudo-uridine synthase, respectively. These results suggest the involvement of RNA processing or modification in the action of thermospermine. Furthermore, *SAC51*, a target of thermospermine-enhanced mRNA translation, was identified as the gene responsible for the *sac503* mutation that suppresses the phenotype of a thermospermine-deficient mutant, *ac15*.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：シロイヌナズナ ポリアミン サーモスペルミン 維管束 mRNA翻訳

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポリアミンはあらゆる生き物がもつ低分子塩基性化合物で、多様な生理活性を持つ。本研究者らは、シロイヌナズナにおける一連のポリアミン合成酵素の遺伝子欠損変異株を用いた解析から、スペルミジンは植物の生育に必須であること、スペルミンはストレス応答や病原抵抗反応の信号伝達に関わることを明らかにした。

一方、維管束木部の過剰な分化により茎の伸長阻害を示す、シロイヌナズナの矮性変異株 *acl5* の解析から、*ACL5* 遺伝子がサーモスペルミン合成酵素をコードし、変異株にサーモスペルミンを与えると茎の伸長が回復することを証明した。また、*acl5* 変異の表現型を亢進する物質としてオーキシン誘導体を同定し、オーキシンによる維管束分化の誘導をサーモスペルミンが抑えるという拮抗作用を明らかにした。加えて、*acl5* 変異株からサーモスペルミンなしで茎の伸長が回復したサプレッサー変異株 *sac* を単離し、原因遺伝子を同定してきた。その1つ *sac51-d* の原因遺伝子は転写因子をコードしていたが、変異は mRNA の 5'リーダ領域にある短い読み枠(uORF)に見出され、これが転写因子の翻訳効率を増加させて、茎の伸長回復をもたらしていることを突き止めた。さらに *SAC51* 遺伝子ファミリーの解析から、特に *SAC51* と *SACL1* の2つがサーモスペルミン応答の中心的役割を担っていることを突き止めた。ポリアミンが概して細胞内で RNA と相互作用する性質から、サーモスペルミンは *SAC51*, *SACL1* mRNA の 5'リーダ領域、あるいはリボソーム RNA に結合して、uORF の翻訳抑制効果を打ち消す働きを持つと予想された。

以上、植物においてサーモスペルミンに特定 mRNA の翻訳を促進する働きがあることが明らかになったが、その詳細な分子機構の解明が待たれる状況にあった。

### 2. 研究の目的

本研究では、サーモスペルミンの作用機構解明を目指し、シロイヌナズナのサーモスペルミン非感受性変異株の解析、原因遺伝子の同定から、サーモスペルミンの取り込み、細胞間輸送、mRNA 翻訳促進機構の詳細に迫る。

植物のポリアミン、特にサーモスペルミンの研究は、*acl5* 変異の解析から著しく進展し、サーモスペルミンが木部分化の抑制に働く成長調節物質であることを世界に先駆けて示した本研究者らがほぼ独走状態にある。本研究の進展によりサーモスペルミンと RNA の相互作用の実態がより明確になれば、受容体タンパク質を介して働く、既知の植物ホルモンとは作用の分子機構が全く異なることから、植物における生理活性物質に関する新たなパラダイム構築、ユニークな研究展開が期待される。また、サーモスペルミンによる mRNA 翻訳の促進現象は本研究者らがシロイヌナズナで報告したのみで、好熱菌や下等藻類ではサーモスペルミンの存在は確かながら、具体的な標的は同定されていない。したがって、サーモスペルミンの作用機構の詳細解明は、既知の植物ホルモンにはない生物種を越えた機能性、汎用性のある生理活性物質の実証につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

3年計画として、以下の3課題を並行してすすめた。

#### 1) シロイヌナズナのサーモスペルミン非感受性変異株の解析

準備状況として、高濃度のサーモスペルミンに耐性を示すシロイヌナズナの変異株 (*its1* ~ *its11* と命名)が得られているが、それらの原因遺伝子を同定し、サーモスペルミンの細胞内への取り込み、細胞間輸送、特定 mRNA の翻訳促進の各分子機構に関わる因子を明らかにする。

初年度は、マッピングによる各遺伝子座の染色体上の位置の限定、形態的な表現型観察、ポリアミン合成および分解関連の遺伝子の発現解析など、変異株の特徴付けを行う。2年目以降に次世代シーケンサによるゲノム配列の決定から原因遺伝子の特定、相補実験、タンパク質の機能解析を行う。

#### 2) サーモスペルミンに応答する uORF の解析

シロイヌナズナにおいて、サーモスペルミンが翻訳促進する mRNA は *SAC51*, *SACL1*

に限られる。同じファミリーで 5' uORF が保存されていても応答性が異なる原因を究明するため、異なる植物に由来する *SAC51* ファミリー遺伝子の 5' uORF 領域の応答性を詳しく調べ、サーモスペルミンに応答する mRNA 配列あるいは uORF ペプチド配列の特徴を明らかにする。

初年度は、シダ植物を含む維管束植物に保存された *SAC51* ファミリー遺伝子の 5' uORF の配列情報を元に、DNA が得られるできるだけ多様な植物の 5' 領域をクローン化し、35S プロモーターで発現する 5' uORF-GUS レポーターの構築と遺伝子導入植物の作出をすすめる。2年目は、順次、GUS 活性測定によりサーモスペルミン応答性を検証する。

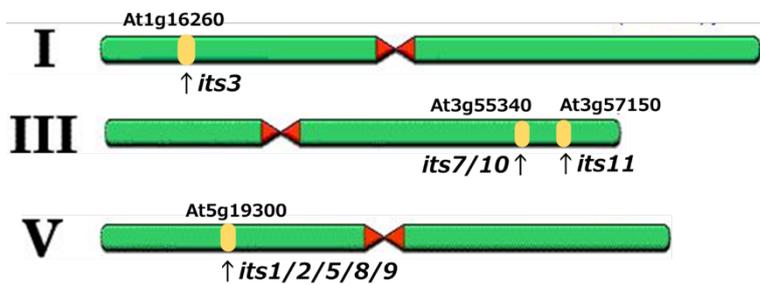
### 3) シロイヌナズナの *acl5* サプレッサー変異株の解析その他

これまでの研究は、サーモスペルミン欠損変異 *acl5* の矮性表現型をサーモスペルミン無しで回復させる、サプレッサー変異(*sac51* ~ *sac59*)から展開してきたが、さらに未解析の変異株から原因遺伝子を同定し、*SAC51* mRNA の翻訳促進における機能を明らかにする。

初年度は上記 1), 2) に注力するが、未解析の *sac501* ~ *504* についてマッピングから原因遺伝子同定をすすめる。また、サーモスペルミンの標的 *SACL1* の欠損変異が得られていないことから、ゲノム編集株の作出を行う。この編集株については、*sac51* との二重変異を作出し、表現型を *acl5* 変異と比べることによって、サーモスペルミンの標的が *SAC51*, *SACL1* の他に存在するか、確証を得て早期の論文公表を目指す。

## 4. 研究成果

シロイヌナズナのサーモスペルミン非感受性変異株(*its1-its11* と命名)について、マッピングによる各変異遺伝子座の染色体上の位置の限定、表現型観察を主にすすめた。新たに作成した多型マーカーを使った染色体マッピングと次世代シーケンサーを利用した解析により原因遺伝子の同定を行った結果、11 の候補株は 2 つの対立遺伝子変異 *its1-1*, *its1-2* と 3 つの独立な変異 *its3*, *its7*, *its11* に統合され、変異遺伝子は *its1*, *its3*, *its7*, *its11* の 4 つに絞られた(右および下図)。



非感受性変異の座乗染色体地図



非感受性変異の芽生え (左から野生型, *its1-1*, *its1-2*, *its3*, *its7*, *its11*)

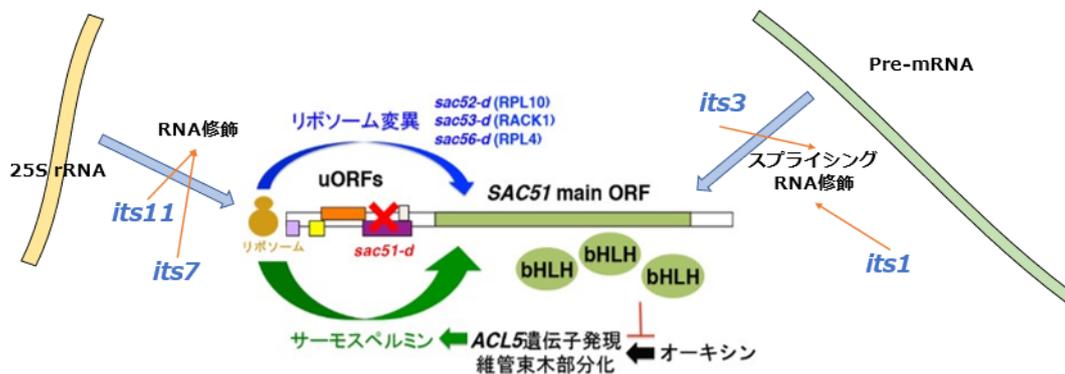
*ITS1* は RNA メチル基転移酵素をコードするヒトの *SPOUT1* 遺伝子のホモログで、*its1-1*, *its1-2* はそれぞれ一塩基置換によるミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異であった。また、T-DNA 挿入変異もサーモスペルミン非感受性を示すことが確認された。

*ITS11* は rRNA シュードウリジン化酵素をコードする *CBF5* で、*its11* 変異は、一塩基置換によるミスセンス突然変異であった。機能欠損変異株 *cbf5* は致死であることが報告されているが、*its11/cbf5* ヘテロ接合体はサーモスペルミン非感受性を示し、対立遺伝子であることが確かめられた。Col 野生株と *its11* 変異株から抽出した全 RNA に CMC 処理を行い、シュードウリジン塩基での逆転写伸長反応を阻害したところ、25S rRNA の既知のシュードウリジン化塩基を含む領域の逆転写量が *its11* 変異株の RNA では増加し、シュードウリジン化の減少が起きていることが示唆された。

*ITS7* はフラグモプラスト相互作用因子として見つかったタンパク質をコードする *PHIP1* 遺伝子と予想された。*its7* は一塩基置換によるナンセンス突然変異であった。データベース解析の結果、*PHIP1* は核小体局在性の RNA 結合タンパク質であると推定された。

*ITS3* は mRNA スプライソーム解離因子のホモログである *STIPL1* 遺伝子と予想された。*its3* は一塩基置換によるミスセンス突然変異であった。

本研究で単離された変異株は、すべて核に局在する RNA 修飾に関連するタンパク質をコードする遺伝子の変異が原因であり、サーモスペルミンの翻訳調節の標的である *SAC51* ファミリーの mRNA 翻訳が影響を受けている可能性があるという手がかりが得られた（下図）。



以上の結果から、サーモスペルミンの作用に RNA 修飾が深く関わるということが強く示唆される状況に至った。

シロイヌナズナの *acl5* 抑圧変異株の解析についても、*sac502*, *sac503*, *sac504* のマッピングが進み、*sac503* については *SAC51* の uORF に塩基置換を見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yariuchi Yusaku, Okamoto Takashi, Noutoshi Yoshiteru, Takahashi Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 Responses of Polyamine-Metabolic Genes to Polyamines and Plant Stress Hormones in Arabidopsis Seedlings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3283 ~ 3283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123283	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 高橋卓・本瀬宏康	4. 巻 59
2. 論文標題 植物ポリアミンの代謝と機能	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 『化学と生物』 日本農芸化学会誌 (2021) 6月号	6. 最初と最後の頁 290-297
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 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 Takamura Hiroyoshi, Motose Hiroyasu, Otsu Taichi, Shinohara Shiori, Kouno Ryugo, Kadota Isao, Takahashi Taku	4. 巻 2020
2. 論文標題 Chemical Synthesis and Biological Effect on Xylem Formation of Xylemin and Its Analogues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 2745 ~ 2753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.202000322	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 Tanaka Takahiro, Nishii Yuichi, Matsuo Hirotoshi, Takahashi Taku	4. 巻 9
2. 論文標題 Easy-to-Use InDel Markers for Genetic Mapping between Col-0 and Ler-0 Accessions of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 779 ~ 779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9060779	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 Takahashi Taku	4. 巻 9
2. 論文標題 Plant Polyamines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 511 ~ 511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9040511	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 Ishitsuka S, Yamamoto M, Miyamoto M, Kuwashiro Y, Imai A, Motose H, Takahashi T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Complexity and Conservation of Thermospermine-Responsive uORFs of SAC51 Family Genes in Angiosperms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00564	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 Shinohara S, Okamoto T, Motose H, Takahashi T.	4. 巻 100
2. 論文標題 Salt hypersensitivity is associated with excessive xylem development in a thermospermine-deficient mutant of Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant J.	6. 最初と最後の頁 374-383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14448	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 Miyamoto M, Shimao S, Tong W, Motose H, Takahashi T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of Thermospermine on the Growth and Expression of Polyamine-Related Genes in Rice Seedlings.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 E269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants8080269	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋卓・田中貴啓・岡本崇・本瀬宏康
2. 発表標題 サーモスペルミン非感受性を示すシロイヌナズナの変異株の単離と解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会（松江）2021年3月14日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山大輝・田中貴啓・高橋卓
2. 発表標題 シロイヌナズナ芽生えを用いた維管束分化における植物ホルモンとサーモスペルミンの相互作用の解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（東京）2021年9月16日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井裕一・高橋卓
2. 発表標題 シロイヌナズナのサーモスペルミン欠損変異ac15を抑圧するsac503変異の遺伝子同定
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（東京）2021年9月16日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋卓・田中貴啓・岡本崇・本瀬宏康
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるサーモスペルミン非感受性変異の原因遺伝子の単離
3. 学会等名 第12回日本ボリアミン学会年会（東京）2021年12月18日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井裕一・高橋卓
2. 発表標題 シロイヌナズナのサーモスペルミン欠損変異に対する新奇抑圧変異の原因遺伝子同定
3. 学会等名 第12回日本ポリアミン学会年会（東京）2021年12月18日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾拓俊・田中貴啓・本瀬宏康・高橋卓
2. 発表標題 オーキシシンによるサーモスペルミン合成酵素遺伝子の発現制御
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第11回年会（東京）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本みなほ・本瀬宏康・高橋卓
2. 発表標題 植物における外的なサーモスペルミンの作用の保存性
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第11回年会（東京）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本みなほ・田中貴啓・松尾拓俊・岡本崇・本瀬宏康・高橋卓
2. 発表標題 外的なサーモスペルミンに対する植物の応答機構の解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（大阪）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中貴啓・本瀬宏康・高橋卓
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるサーモスペルミン非感受性変異体の単離と遺伝子解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中貴啓・本瀬宏康・高橋卓
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるサーモスペルミン非感受性変異体の単離と解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会（仙台）2019年9月16日
4. 発表年 2019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
研究協力者	本瀬 宏康  (Motose Hiroyasu)		
研究協力者	岡本 崇  (Okamoto Takashi)		

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