

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06月01日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570041
 研究課題名（和文） mRNA代謝制御因子SAP130の植物形態形成における制御機構
 研究課題名（英文） Regulatory mechanism of SAP130 mRNA processing factor in plant morphogenesis
 研究代表者
 柘植 知彦（TSUGE TOMOHIKO）
 京都大学・化学研究所・助教
 研究者番号：50291076

研究成果の概要（和文）：スプライソソームを構成する SAP130 の機能に着目して、植物形態形成の分子メカニズムを解析した。SAP130 発現抑制植物は特定時期の花粉形態形成に異常を示した。その時期が SAP130 のプロモーター活性の高い時期と一致することから、SAP130 は花粉形成に不可欠であると判明した。さらに SAP130 のターゲットには選択性がある可能性が示唆された。一方 SAP130 と結合する CSN1 の部分相補変異植物にも、同様の花粉形態形成異常があることが解り、SAP130 と CSN が協調的に制御する分子機構が存在すると考えている。

研究成果の概要（英文）：We aim to reveal the molecular function of SAP130 in plant morphogenesis. In Arabidopsis, the promoter activity of *SAP130* was detected at a specific stage of pollen development. Coincidentally, pollen from *AtSAP130* RNAi plants showed low viability and developmental defects at this stage. We then analyzed plants partially complementing *csn1* mutant with *CSN1*, to find that they also exhibited pollen developmental defect in similar manners. Here we hypothesize that CSN and SAP130 coordinately regulate mechanisms required for pollen development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：RNA 代謝制御、タンパク質分解制御、植物形態形成、花粉形成、スプライソソーム、COP9 シグナロソーム、遺伝子発現、転写

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、環境に応答する形態形成制御として、光情報伝達下流で働く転写因子群がタンパク質分解を介して制御されるメカニズムを解明してきた。この制御機構は CSN (COP9 シグナロソーム) とよばれる動植物に保存される核内タンパク質複合体に依存し、CSN の機能欠損変異体が致死形質を示す

ことから、その機能が生存に不可欠であることが判明した。

一方我々は、スプライソソーム前駆体を形成する SF3b の構成因子である SAP130 が、CSN と直接結合することを見出し、その機能解析を進めてきた。生化学的解析の結果、ヒトの SAP130 は複数の CRL 型 E3 の NEDD8/Rub1 修飾を受けた Cul サブユニット

トと結合して、ポリユビキチン化活性を調節することが判明し、この結合は CSN と CAND1 で競争的に調節されることを明らかにした。

(2) しかし、SAP130 が担う生体内の機能は依然不明であるため、シロイヌナズナを用いて研究を進めた。その結果、シロイヌナズナには *SAP130* 遺伝子が 2 コピーあり、相同なタンパク質をコードすることが判明した。これら遺伝子の mRNA は、調べられた全器官に様に蓄積しており、両遺伝子が生体内で相補的機能を果たす可能性が示された。一方、逆遺伝学的手法を用いて各遺伝子の機能欠損変異体を探索した結果、それぞれの遺伝子発現が減少した機能欠損変異体を得ることができなかった。

そこで、RNAi 法を用いて *SAP130* の機能抑制変異体を作製して解析した結果、植物地上部の矮小化と種子形成の異常が複数の独立ラインで認められた。また、*SAP130* のプロモーター活性を解析すると、根の一部と花粉に高い活性が認められた。本課題では、これら個体レベルの最新結果を基盤とし、これまで未知であった *SAP130* の機能の解明を目指した。

2. 研究の目的

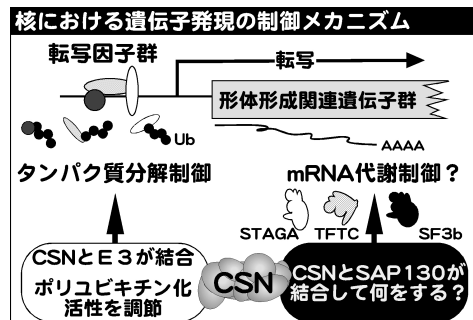
SAP130 は、SF3a や U2 snRNP とともにスプライソソームの前駆体を形成する SF3b 構成因子であるほか、STAGA や TF3C などの遺伝子転写制御に関わるタンパク質複合体でも同定されている(研究の方法・図参照)。さらに *SAP130* が CRL 型 E3 や CSN と結合することを我々は示している。しかし、これらの複合体における *SAP130* の分子機能や、複合体間の動態は解っていない。一方、ユビキチン・プロテアソーム系タンパク質分解に関わる因子群が、遺伝子転写調節に関わる報告があるが、その分子機構は不明である。我々は、*SAP130* が核の中の『mRNA 代謝制御』と『タンパク質分解制御』とをつなぐ鍵因子であると考えて研究を進めている。本研究では、*SAP130* が正常な植物形態形成に不可欠であることを踏まえ、*SAP130* が担う制御機構とその制御ターゲットとなる遺伝子群を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

本課題では、正常な植物形態形成に *SAP130* 機能が不可欠であることを踏まえ、*SAP130* の発現量・発現場所・タンパク質構造を改変した形質転換植物と、*SAP130* のスプライシング機能・結合ターゲット・核内動態を解析する生化学的機能解析とを組み合わせ、植物形態形成で *SAP130* が担う制御機構とその制御ターゲットとなる遺伝子群

を明らかにする。

さらに、*SAP130* が複数の複合体と、必要に応じて結合して(下図)、機能『モード』を使い分けていると考え、*SAP130* の機能分担メカニズムの解明を目指す。以下の 3 点に焦点を絞った研究を進める。



(1) *SAP130* の *in planta* 機能解析：形質転換植物の詳細解析と *SAP130* の動態

シロイヌナズナに 2 コピーある *SAP130* 遺伝子は重複した機能をもつと考えられる。各 *SAP130* 遺伝子のプロモーターの活性解析の結果、ともに根と花の器官の特定の部位で高い活性を示したので、この部位に集中して発生的手法、形態学的手法、解剖学的手法を用いた解析を計画する。一方、RNAi 法を用いた植物を解析した結果、植物地上部の矮小化および種子形成に異常な表現型を示すので、解剖学的な解析を通じてその原因の特定を進めている。特にプロモーター活性解析の結果を考慮し、花粉の形態形成などを詳細に解析して種子形成の異常との相関を解明する。また、*SAP130* に蛍光標識をつけたタンパク質を発現するコンストラクトを構築して、その動態とその機能『モード』における制御機構を解析する。

(2) *SAP130* 制御の分子メカニズム：mRNA 代謝制御とタンパク質分解制御

SAP130 制御系の分子メカニズムを明らかにするために、前記プロモーター活性や機能欠損変異体の異常形質の場所と時期の特定結果を踏まえ、ターゲットとなりうる遺伝子群を選定し、*sap130* 機能抑制植物、*sap130* 機能欠損誘導植物、*SAP130* 過剰発現植物などの間でそれらの発現解析を行なう。この時、mRNA 代謝やタンパク質のポリユビキチン化解析を組み合わせる。また、CSN1 と *SAP130* が直接結合するので、CSN の発現レベルが異なる変異体や形質転換植物と組み合わせる解析を計画する。

(3) *SAP130* 制御機構における CSN の役割：*SAP130*-CSN1 結合部位の詳細なマッピング

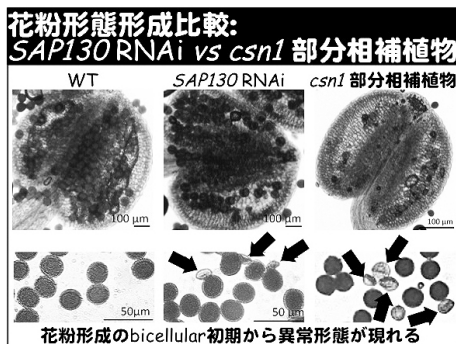
SAP130 は、DDB1、CPSF160 と高い相同性を示す。DDB1 は既に、7 枚の翼をもつ 3 つのプロペラから構成されることが判明し

ているので、この構造を参考にして SAP130 の部分タンパク質を発現するコンストラクトを構築し、SAP130-CSN1 結合部位の決定を生化学的に進める。また、理化学研究所バイオ解析チームと共同研究のもと、両タンパク質の結晶構造解析を進める計画である。SAP130 と CSN1 の結合に特異的に関わるアミノ酸を同定し、植物個体でそのアミノ酸に権威をもつタンパク質を発現させる。

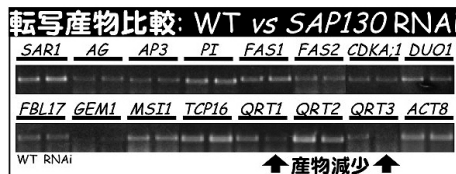
SAP130-CSN1 結合に特異的な変異をもつ植物の解析は、SAP130 機能のうち CSN を介して制御される SAP130 機能の『モード』の解明につながる。同様の手法を SAP130 結合タンパク質に順次適応し、SAP130 の機能とその使い分け方の全貌を解明する。

4. 研究成果

(1) SAP130 そのものの機能を解明する目的で、植物を材料にその機能を詳細に解析した。その結果、シロイヌナズナに 2 コピー存在する *SAP130* 遺伝子の各 mRNA が全器官で蓄積し、そのプロモーター活性は特に花粉、タペトと一部雌性配偶体において高いことが判明した。また、*SAP130* 発現抑制植物は花粉形成が異常となり、不稔形質を示した(下図)。



(2) 花粉形態形成における SAP130 の機能モードの解明を目指して、*SAP130* 発現抑制植物における形質異常時期を解剖学的に解析した結果、microspore 形成後 bicellular 形成までの時期に形態学的異常が認められた。この時期の形態形成に機能をもつと考えられる遺伝子群を解析した結果、*QRT1* と *QRT3* の転写産物が *SAP130* 発現抑制植物で野生型植物に比べて低いことが判明した(下図)。



(3) SAP130 と結合する CSN1 の部分相補変異植物が、不稔形質を示すものがあることが前年度判明したので、その原因を詳細に解析

した。まず、CSN1 の部分相補変異植物の花粉は生存率、発芽率がともに低いことが判明した。つぎに、この植物では花粉形態形成の microspore 期から bicellular 期への移行期に形態形成異常があることが明らかとなった。これらの花粉における異常は、形態的にも異常が発生する時期的にも SAP130 発現抑制植物のそれと一致する(左図)。これらの結果から SAP130 と CSN1 とが協調的に制御する共通メカニズムが存在すると考えている。

(4) CSN が担うタンパク質分解制御機構の解析を進め、その脱 NEDD8 化活性には CSN6 の MPN ドメインの寄与はなく、CSN5 の MPN ドメインが担うことを動物、植物、酵母の各モデル生物の比較を通じて解明した。

(5) 花粉から全 mRNA を抽出して定量的に転写産物量を解析する系を確立したので、これを用いて SAP130 のターゲット候補因子群の解析を進めている。また SAP130 と CSN1 とを安定して産生する *in vitro* 系を確立し、その結合部位が CSN1 の coiled-coil よりさらに N 末端の領域にあることを初めて見出した。これらの知見をもとに、SAP130-CSN1 結合部位の詳細な決定を目指した共同研究が進行中である。

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 8 件)

- ① Franciosini A, Lombardi B, Iafrate S, Pecce V, Mele G, Lupacchini L, Kondou Y, Gusmaroli G, Aki S, Tsuge T, Deng XW, Matsui M, Vittorioso P, Costantino P, Serino G. The *Arabidopsis* COP9 SIGNALOSOME INTERACTING F-BOX KELCH 1 protein forms an SCF ubiquitin ligase and regulates hypocotyl elongation. *Mol Plant*, in press. 査読有
DOI: 10.1093/mp/sst045
- ② Pick E, Golan A, Zimmler JZ, Guo L, Sharabi Y, Tsuge T, Wei N. (2012) The minimal deneddylase core of the COP9 signalosome excludes the Csn6 MPN domain. *PLoS ONE*, 7: e43980. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0043980
- ③ Aki S, Nakai H, Aoyama T, Oka A, Tsuge T. (2011) *AtSAP130/AtSF3b-3* function is required for reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 52: 1330-1339. 査読有
DOI: 10.1093/pcp/pcr077
- ④ Tsuge T, Menon S, Tong Y, Wei N.

- (2011) CSN1 inhibits c-Jun phosphorylation and down-regulates ectopic expression of JNK1. *Protein Cell*, 2: 423-432. 査読有
DOI: 10.1007/s13238-011-1043-0
- ⑤ Luo Y, Qin G, Zhang J, Liang Y, Song Y, Zhao M, Tsuge T, Aoyama T, Liu J, Gu H, Qu LJ. (2011) D-myoinositol-3-phosphate plays an essential role in auxin-regulated embryogenesis by affecting phosphatidylinositol-mediated endomembrane function in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23:1352-1372. 査読有
DOI: 10.1105/tpc.111.083337
- ⑥ She KC, Kusano H, Koizumi K, Yamakawa H, Hakata M, Imamura T, Fukuda M, Naito N, Tsurumaki Y, Yaeshima M, Tsuge T, Matsumoto K, Kudoh M, Itoh E, Kikuchi S, Kishimoto N, Yazaki J, Ando T, Yano M, Aoyama T, Sasaki T, Satoh H, Shimada H. (2010) A novel factor FLOURY ENDOSPERM2 is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *Plant Cell*, 22: 3280-3294. 査読有
DOI: 10.1105/tpc.109.070821
- ⑦ Cho KH, Jo A, Tsuge T, Kim JC, Kim R, Yoon HS, Kim GT. (2010) Comparative analysis of local green tea in Korea by STS-RFLP. *J Life Sci*, 20: 1415-1419. 査読有
DOI: 10.5352/JLS.2010.20.9.1415
- ⑧ Cho KH, Lee EJ, Tsuge T, Jo A, Kim JC, Cheong GW, Yoon HS, Kim GT. (2010) Comparative genomic analysis of Korean and Japanese green tea trees by using molecular markers. *Can J Plant Sci*, 90: 293-298. 査読有
<http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/CJPS09065>
- [学会発表] (計 2 3 件)
- ① 安喜史織、張俊、後藤翔、中井秀人、岡穆宏、青山卓史、瞿礼嘉、*柘植知彦、COP9 シグナロソームとスプライソソーム構成因子群は植物形態形成に重要な役割を担う、第 54 回日本植物生理学会年会、2013.03.21-23、岡山大学、岡山県岡山市
- ② *後藤翔、青山卓史、柘植知彦、COP9 シグナロソームと結合する Prp43 RNA ヘリカーゼの機能解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013.03.21-23、岡山大学、岡山県岡山市
- ③ *中井秀人、安喜史織、HEYL Alexander、青山卓史、柘植知彦、COP9 シグナロソームと相互作用する Trihelix protein の機能解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013.03.21-23、岡山大学、岡山県岡山市
- ④ *Tsuge T, Understanding CSN through CSN1 and its binding partners. Invited lecture at “Symposium on Plant Biology and Agrobiotechnology”, 2012.10.17, Peking University, Beijing PRC.
- ⑤ Aki S, Nakai H, Goto K, Oka A, Aoyama T, *Tsuge T. COP9 signalosome and its interacting protein SAP130 are important for pollen development in *Arabidopsis*. ZOMES-VII “Ubiquitin family proteins and their cognate PCI complexes”, 2012.09.18-21, Munich GERMANY.
- ⑥ *Goto K, Aoyama T, Tsuge T. Characterization of a spliceosomal RNA helicase interacting with CSN1 in *Arabidopsis*. ZOMES-VII “Ubiquitin family proteins and their cognate PCI complexes”, 2012.09.18-21, Munich GERMANY.
- ⑦ Anzai N, Ohashi Y, Tsuge T, *Aoyama T. Involvement of phospholipid signaling in root hair development. Plant development and environmental interactions - 3rd EMBO conference on plant molecular biology, 2012.05.27-30, Matera ITALY.
- ⑧ Aki S, Nakai H, Aoyama T, Oka A, *Tsuge T. COP9 signalosome, the master regulator of photomorphogenesis, and its interacting protein SAP130 are important for pollen development in *Arabidopsis*. The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2012.03.19-21, Todaiji Culture Center, Nara NARA.
- ⑨ *Nakai H, Aki S, Heyl A, Aoyama T, Tsuge T. Functional analysis of a trihelix protein interacting with COP9 signalosome. The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2012.03.19-21, Todaiji Culture Center, Nara NARA.
- ⑩ 安喜史織、中井秀人、岡穆宏、青山卓史、*柘植知彦、COP9 シグナロソームとその結合因子の SAP130 は花粉形成において重要な役割を担う、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.03.16-18、京都産業大学、京都府京都市
- ⑪ *中井秀人、安喜史織、HEYL Alexander、青山卓史、柘植知彦、COP9 シグナロソームと相互作用する Trihelix protein の

- 機能解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.03.16-18、京都産業大学、京都府京都市
- ⑫ *和田悠貴香、安田敬子、柘植知彦、青山卓史、リン酸欠乏に応答した根毛伸長における *PIP5K* の機能、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.03.16-18、京都産業大学、京都府京都市
- ⑬ *Aki S, Nakai H, Aoyama T, Oka A, Tsuge T. *AtSAP130/AtSF3b-3* function is required for pollen development in *Arabidopsis thaliana*. International Plant RNA Workshop 2011, 2011.06.20-21, RIKEN Yokohama Institute, Yokohama KANAGAWA.
- ⑭ *安喜史織、中井秀人、岡穆宏、青山卓史、柘植知彦、COP9 シグナロソーム結合因子 SAP130 はシロイヌナズナの花形成において重要な役割を担う、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.03.20-22、東北大学川内北キャンパス、宮城県仙台市
- ⑮ *中井秀人、安喜史織、HEYL Alexander、青山卓史、柘植知彦、COP9 シグナロソームと相互作用する Trihelix protein の機能解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.03.20-22、東北大学川内北キャンパス、宮城県仙台市
- ⑯ *安齋尚子、大橋洋平、谷口雅俊、柘植知彦、青山卓史、シロイヌナズナ・ホスホリパーゼ *Dz1* 遺伝子の遺伝学的解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.03.20-22、東北大学川内北キャンパス、宮城県仙台市
- ⑰ *和田悠貴香、草野博彰、安田敬子、柘植知彦、青山卓史、環境刺激に応答した *PIK5K* 遺伝子の機能、第 23 回植物脂質シンポジウム、2010.11.26-27、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ、京都府宇治市
- ⑱ *安齋尚子、大橋洋平、谷口雅俊、柘植知彦、青山卓史、シロイヌナズナ・ホスホリパーゼ *Dz1* 遺伝子の遺伝学的解析、第 23 回植物脂質シンポジウム、2010.11.26-27、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ、京都府宇治市
- ⑲ *Aki S, Nakai H, Oka A, Tsuge T. CSN1 interacting protein SAP130 is important for pollen development in *Arabidopsis*. ZOMES-VI (The Sixth International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome and eIF3: Expanding the PCI family beyond proteasome CSN and cIF3 complexes), 2010.10.04-07, Safed ISRAEL.
- ⑳ *Serino G, Lombardi B, Iafrate S, Franciosini A, Mele G, Heyl A, Tsuge T, Aki S, Kondou Y, Matsui M, Costantino P. *Arabidopsis* F-box proteins PIC2a and b form SCF ubiquitin ligases which interact with the COP9 signalosome and regulate light response. ZOMES-VI (The Sixth International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome and eIF3: Expanding the PCI family beyond proteasome CSN and cIF3 complexes), 2010.10.04-07, Safed ISRAEL.
- ㉑ *Wada Y, Kusano H, Yasuda K, Tsuge T, Aoyama T. Functions of *PIP5K* genes in the root hair elongation responsive to environmental stimuli. 19th International Symposium on Plant Lipids, 2010.07.11-16, Cairns AUSTRALIA.
- ㉒ *Kusano H, Testerink C, Vermeer JEM, Tsuge T, Shimada H, Oka A, Munnik T, Aoyama T. The *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate 5-kinase PIPK3 At2g26420 is a key regulator of root hair tip growth. The 21st International Conference on *Arabidopsis* Research, 2010.06.06-10, Pacifico Yokohama, Yokohama KANAGAWA.
- ㉓ Taniguchi YY, Taniguchi M, Tsuge T, Oka A, *Aoyama T. Involvement of *Arabidopsis thaliana* phospholipase *Dz2* in root hydrotropism through the suppression of root gravitropism. The 21st International Conference on *Arabidopsis* Research, 2010.06.06-10, Pacifico Yokohama, Yokohama KANAGAWA.
- [図書] (計 2 件)
- ① 安喜史織、柘植知彦 (2011) 第 1 章 光受容体と光情報伝達、「最新 植物生理化学」(長谷川宏司・広瀬克利編、大学教育出版 岡山) pp. 23-50.
- ② 柘植知彦 (2010) 第 1 章 葉は緑色なのに、花の色はなぜいろいろあるのですか?、第 6 章 秋になると紅葉がおこるのはなぜ?、「『ふしぎ』を科学しよう 命はどのようにして生まれたの?」(池内了監修、かもがわ出版 京都) pp. 8-11, pp. 31.
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
- ホームページ等
<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~molbio/index>

html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柘植 知彦 (TSUGE TOMOHIKO)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：50291076

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

安喜 史織 (AKI SHIORI)

京都大学・化学研究所・研究員

中井 秀人 (NAKAI HIDETO)

京都大学・理学研究科・大学院生

後藤 翔 (GOTO KAKERU)

京都大学・理学研究科・大学院生

堂前 直 (DOHMAE NAOSHI)

理化学研究所・バイオ解析チーム・チーム

リーダー

宮武 秀行 (MIYATAKE HIDEYUKI)

理化学研究所・バイオ解析チーム・研究員