

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380206

研究課題名(和文)植物における膜結合型転写因子による遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Studies of gene expression regulated by membrane bound transcription factors in plants

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(系)・教授

研究者番号：20252835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの小胞体膜結合型転写因子bZIP60が小胞体膜に存在するIRE1による細胞質スプライシングにより活性化されることを明らかとした。つまりスプライシングによりタンパク質の読み枠がずれた結果、翻訳された膜貫通ドメインを持たないタンパク質が核へ移行しBiPに代表される下流の小胞体ストレス応答関連遺伝子の転写を誘導すると考えられた。さらにIRE1は小胞体で合成される大部分のタンパク質のmRNAを分解することも明らかとした。一方、bZIP28の切断にこれまで関与が予想されていたプロテアーゼS1Pが関与しないことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We tried to clarify the activation mechanism of two membrane-bound transcription factors of Arabidopsis, bZIP60 and bZIP28; both of them are involved in the ER stress response. We also tried to identify the substrate of cytoplasmic splicing catalyzed by IRE1, a sensor molecule of the ER stress response. Transcriptomes analysis using microarray and, IRE1 and bZIP60 knockouts indicated that bZIP60 locates in downstream of IRE1 signaling. Taken together additional biochemical experiments, we concluded that newly synthesized bZIP60 protein loses its transmembrane domain due to the frame shift caused by cytoplasmic splicing and then translocates to the nucleus where it activates the expression of the ER stress related genes. This finding answered two of our questions, activation mechanism of bZIP60 and target of IRE1. Another membrane bound transcription factor bZIP28 was found not to be regulated by a protease S1P, even though it has been considered to regulate the activation of bZIP28.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：小胞体ストレス 転写因子 シロイヌナズナ 細胞質スプライシング

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子発現制御において中心的な役割を果たす転写因子の多くはそれ自身が転写レベルや翻訳後レベルでの制御を受け、その一部は MTF (Membrane-bound Transcription Factor) と呼ばれ細胞膜や小胞体膜に膜貫通領域を介して結合している。MTF の多くは様々な刺激に応答して膜に局在する RIP プロテアーゼにより、タンパク質レベルで切断を受け、核へ移行して標的遺伝子を活性化すると考えられていた。モデル植物シロイヌナズナの約 26,000 の遺伝子のうち 2,000 近くが転写因子をコードし、その 10% 程度が MTF であると予測されていた。しかし、植物における MTF の活性化機構は殆ど明らかで無かった。そうした中、代表者らは小胞体ストレス応答と呼ばれる細胞応答において働く 2 つの MTF (bZIP60 及び bZIP28) を同定していた。

(2) 一方、小胞体ストレス応答の中心的なセンサータンパク質である IRE1 を代表者らはシロイヌナズナから 2 コピー同定、単離していた。しかしそれぞれの IRE1 遺伝子を破壊した植物は殆ど表現型を示さず、他の生物で IRE1 による細胞質スプライシングにより制御される遺伝子も不明であった。

2. 研究の目的

上述のように、bZIP60 と bZIP28 の活性化様式は明らかとなっていなかった。小胞体ストレス応答で細胞質スプライシングを触媒することで中心的な役割を果たすセンサータンパク質 IRE1 が標的とする mRNA がコードするタンパク質も不明であった。また小胞体ストレス応答の研究ではツニカマイシンを代表とする小胞体内でのタンパク質のフォールディング阻害剤が良く使われるが、これら人工的な薬剤が自然条件を反映しているとは考えにくい。そこで、研究の目的を以下の 4 つとした。

(1) bZIP60 の活性化機構の解明

これまでに S1P、S2P が bZIP60 の活性化に関与していないことは明らかとしていた。そこで他のプロテアーゼの関与を調べる。

(2) bZIP28 の活性化機構の解明

動物の小胞体ストレス応答に関わる MTF である ATF6 とのアナロジーから bZIP28 は S1P と S2P というゴルジ体に局在するプロテアーゼにより切断され、活性化されると考えられていたが、その真偽は不明であった。そこで、bZIP28 の切断が S1P、S2P によるかどうかを明確にする。

(3) IRE1 の標的の同定

IRE1 は酵母では HAC1、動物では ATF6 と呼ばれる bZIP 型転写因子の mRNA の細胞質スプライシングを触媒する。その結果これらの転写因子はアミノ酸の変化により活性化することが知られていた。しかし、植物の

IRE1 の標的は明らかでは無かったので、その同定をおこなうこととした。

(4) 小胞体ストレスとなる刺激の探索

小胞体ストレス応答はツニカマイシンなどの薬剤で惹起することが多いが、小胞体ストレス応答を誘導するより生理的な刺激の探索をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子破壊株の利用

シロイヌナズナの IRE1 (IRE1A および IRE1B)、S1P、S2P、bZIP60、bZIP28 の遺伝子破壊株をストックセンターから取り寄せ、ホモ系統を作出し、ツニカマイシン感受性の調査、定量的 PCR (qPCR)、マイクロアレイなどに随時利用した。

(2) qPCR およびマイクロアレイ解析

qPCR は定法に従っておこなった。マイクロアレイ解析は RNA を抽出までを研究代表者の研究グループで実施し、その後の解析は連携研究者の嶋田幸久教授との共同研究でおこなった。

(3) 抗体作成とウエスタンブロット

bZIP60 と bZIP28 の活性化の検出はウエスタンブロットにておこなった。bZIP60 の抗体は作成済みであったが、bZIP28 については本研究で作成、精製をおこなった。

4. 研究成果

(1) IRE1-bZIP60 経路の発見

研究開始時には IRE1 の標的は未定であり、bZIP60 の活性化機構も不明であった。また、他の生物とのアナロジーを考慮すれば IRE1 は小胞体ストレス応答に関わると考えられたが、少なくとも IRE1 の一重変異体は小胞体ストレスに対する表現型を示さなかった。そこで本研究では 2 つの IRE1 遺伝子を二重に破壊した二重遺伝子破壊株 (以下、二重破壊株) を作成したところ、二重破壊株はツニカマイシンに対して感受性を示した (図 1)。

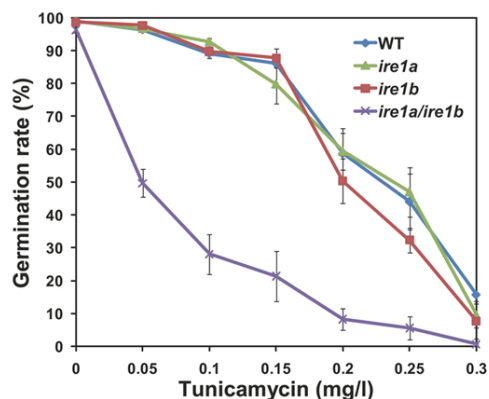


図 1 二重破壊株 (ire1a/ire1b) のツニカマイシンへの感受性

この結果は、IRE1A と IRE1B の機能が重複していることを示すとともに IRE1 が植物（シロイヌナズナ）においても小胞体ストレス応答に関わることをしめすものであった。

続いて二重遺伝子破壊株の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより調べたところ、bZIP60 破壊株のそれと非常によく一致した。このことは bZIP60 が IRE1 の下流で働くことを強く示唆するものであった。そこで bZIP60 の mRNA の構造を詳細に調べたところ、図 2 に示すようにシロイヌナズナ bZIP60 の mRNA にヒト XBP1、酵母 HAC 1 と良く似た 2 つのステムループ構造が見られた。

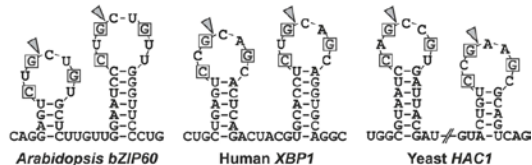


図 2 IRE1 の標的となる転写因子 mRNA に見られるステムループ構造

以上の結果から bZIP60 は IRE1 による細胞質スプライシングにより制御されると考えられた。実際に、IRE1 二重破壊では野生型や一重破壊株では見られる活性型 bZIP60 タンパク質が消失する。この現象は細胞質スプライシングにより bZIP60 のフレームシフトが起こり、その結果分子量の小さなタンパク質が翻訳されることで説明できる。さらに、フレームシフトの結果新しくできた bZIP60 タンパク質は膜貫通ドメインを失う。つまり bZIP60 は細胞質スプライシングにより、膜貫通ドメインを消失し、小胞体膜から核へと移行し、転写因子として機能すると考えられた。図 3 にこのモデルの模式図を示す。

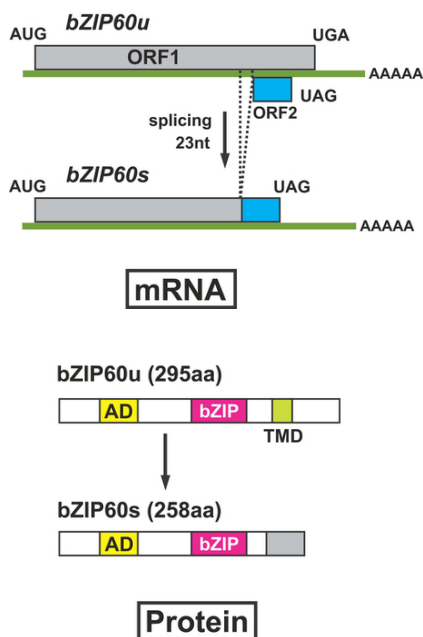


図 3 細胞質スプライシングによる bZIP60 の活性化機構 (bZIP60s が核へ移行可能)

以上の研究成果により研究目的 (1) の bZIP60 の活性化機構の解明と (3) IRE1 の標的の同定が同時に達成された。

この結果は、長年植物で不明とされてきた IRE1 による細胞質スプライシングのメカニズムを明らかとした点で非常に重要な成果であると考えている。尚、研究代表者らがこの成果を論文発表 (論文⑥) する 2 ヶ月前に米国の他のグループが PNAS 誌 (引用文献①) にほぼ同様の論文を発表した。

### (2) IRE1 依存的な広範囲な mRNA の分解

(1) で実施したマイクロアレイの結果を解析する段階で小胞体ストレス応答により多くの mRNA が減少することが認められた。しかし、それらは IRE1 の二重破壊株では殆ど変化しない。つまり、IRE1 が小胞体ストレス依存的に広範囲に mRNA を分解していると考えられた。これらの mRNA の殆どがシグナルペプチド、膜貫通ドメイン等をコードしており小胞体で合成されるタンパク質の mRNA であると考えられた。

同様の結果が線虫、哺乳動物でも最近になり報告されており、IRE1 は細胞質スプライシングに加えこうした RNA 分解 (Regulated IRE1 Dependent Decay of RNA: RIDD) の機能を持つことが明らかとなっている。当初、我々は RIDD の解析を目的とはしていなかったが、IRE1 の機能解析をおこなううちに RIDD の機能の発見に至り、PNAS 誌に報告することができた (論文②)。

尚、図 1 で見られた IRE1 二重破壊株のツニカマイシンへの感受性は bZIP60 破壊株では見られない。従って、この感受性は RIDD に由来すると考えられる。RIDD は小胞体で合成されるタンパク質の mRNA を分解することで小胞体へのタンパク質の流入量を減らし小胞体への負荷の低減に寄与していると考えられるが生理的意義については他生物も含め不明な点が多く、今後の研究課題の 1 つである。

### (3) bZIP28 の切断への S1P、S2P の関与

植物 (シロイヌナズナ) において S1P および S2P が bZIP28 の切断に関わることを明確に示した報告は無かった。そこで bZIP28 抗体を作成、精製しウエスタン解析をおこなった。その結果、bZIP28 遺伝子破壊では明確に消失するシグナルが検出され、bZIP28 タンパク質を検出できたと結論付けた。このシグナルはツニカマイシン処理で分子量が小さくなることからタンパク質レベルで切断されていることも確認された。

この抗体を用いて S1P および S2P あるいはこれら 2 つの遺伝子の二重破壊株を用いて bZIP28 の検出を行ったところ、S2P 破壊株では bZIP28 の切断に異常が見られたが、S1P 破壊株では野生型と同様の挙動を示した。また二重破壊株では S2P 破壊株と同様の結果が観察された。つまり S2P は bZIP28 の切断に

関与しているが S1P は関与していないと考えられた。さらに S2P 破壊株では小胞体ストレス関連遺伝子の誘導が抑制され、ツニカマイシンに対する感受性も増加したのに対し、S1P 破壊株では野生型との違いは見られなかったことから、この考えが裏付けられた。

これまで動物の ATF6 が S1P、S2P で切断されることから ATF6 同様小胞体膜に局在する bZIP28 も S1P、S2P による制御を受けるとされてきたが、本研究の成果により bZIP28 の活性化機構について見なおす必要が生じてきた。また、我々の結果は、S2P が bZIP28 の切断に関与することを示すものではあるが、S2P だけでは説明できない。従って、S2P に加えて bZIP28 の切断に関わるプロテアーゼの探索が必要である。この成果については論文投稿準備中である。

#### (4) サリチル酸による小胞体ストレス応答の活性化

サリチル酸処理により、小胞体ストレス応答関連遺伝子が誘導されることが研究代表者のグループを含む複数のグループにより報告されていた。しかし、小胞体ストレス応答の情報伝達の関わり等に関して、必ずしも統一した見解は得られていなかった。我々は世界で唯一 IRE1-bZIP60 経路および bZIP28 の活性化を検出できる。そこで、この利点を利用してサリチル酸処理時に IRE1-bZIP60 経路と bZIP28 の活性化が起こることを明らかとした (論文①)。しかし、サリチル酸処理による小胞体ストレス応答関連遺伝子の誘導は弱く、誘導される遺伝子も部分的にしか一致しない。また、サリチル酸がツニカマイシンのようにタンパク質のフォールディングを阻害するとは考えにくい。つまり、サリチル酸が小胞体ストレス応答の情報伝達系を活性化することは明らかとなったが、それに至るメカニズムおよび生理的意義の解析が今後の課題である。

#### <引用文献>

① Deng, Y. *et al.* (2013) Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 7247-7252.

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 Nagashima, Y., Iwata, Y., Ashida, M., Mishiba, K.-I., and Koizumi, N. (2014). Exogenous salicylic acid activates two signaling arms of the unfolded protein response in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 55, 1772-1778. (査読有)  
DOI: 10.1093/pcp/pcu108

② Mishiba, K.-I., Nagashima, Y., Suzuki, E., Hayashi, N., Ogata Y., Shimada, Y., and Koizumi, N. (2013). Defects in IRE1 enhance cell death and fail to degrade mRNAs encoding secretory pathway proteins in the Arabidopsis unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 5713-5718. (査読有)  
DOI: 10.1073/pnas.1219047110

③ 小泉 望、長島幸広 (2013) 生物間における細胞質スプライシングの保存性と多様性. *生化学* 85(6), 1095-1099 (査読有)  
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/07/85-12-10.pdf>

④ Iwata, Y., and Koizumi, N. (2012) Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends in Plant Science*, 17(12), 720-727 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.tplants.2012.06.014

⑤ Iwata, Y., Nishino, T., Iwano, M., Takayama, S., and Koizumi, N. (2012). Role of the plant-specific endoplasmic reticulum stress-inducible gene TIN1 in the formation of pollen surface structure in Arabidopsis thaliana. *Plant Biotechnology*, 29, 51-56. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.tplants.2012.06.014

⑥ Nagashima Y, Mishiba KI, Suzuki E, Shimada Y, Iwata Y, Koizumi N (2011) Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Scientific Reports* 1:29 (査読有)  
DOI: 10.1038/srep00029

⑦ Tanaka, Y., Nakamura, S., Kawamukai, M., Koizumi, N., & Nakagawa, T. (2011). Development of series of gateway binary vectors possessing a tunicamycin resistance gene as a marker for transformation of Arabidopsis thaliana. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75, 804-807. (査読有)  
DOI: 10.1271/bbb.110063

⑧ 小泉 望、岩田雄二 (2011) 植物における小胞体の品質管理 病原菌認識機構の解析から見えてきたもの. *化学と生物* 49, 88-91 (査読有)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/49/2/49\\_2\\_88/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/49/2/49_2_88/_pdf)

[学会発表] (計 2 1 件) (招待講演を含む)

① “Molecular mechanism of proteolytic activation of bZIP28, an Arabidopsis membrane-bound transcription factor involved in the unfolded protein response” Makao Ashida, Yuji Iwata, Kei-ichiro Mishiba and Nozomu

Koizumi. (日本植物生理学会・第 56 回年会) 2015 年 3 月 17 日 東京農業大学 (東京)

②“Ligation of bZIP60 mRNA cleaved by IRE1 in Arabidopsis” Yukihiro Nagashima, Yuji Iwata, Kei-ichiro Mishiba and Nozomu Koizumi. (日本植物生理学会・第 56 回年会) 2015 年 3 月 16 日 東京農業大学 (東京)

③「IRE1 による細胞質スプライシングの生化学的解析」長島幸広、岩田雄二、小泉望、三柴啓一郎 (日本植物細胞分子生物学会・第 32 回大会・シンポジウム) 2014 年 8 月 32 日 いわて県民情報交流センター (盛岡)

④「小胞体ストレスセンサーIRE1 に依存的な mRNA 分解の解析」三柴啓一郎、長島幸広、鈴木英司、林のりこ、尾形善之、嶋田幸久、小泉望 (日本植物細胞分子生物学会・第 31 回大会・シンポジウム) 2013 年 9 月 10 日 北海道大学 (札幌)

⑤“IRE1-dependent decay of mRNAs in the Arabidopsis unfolded protein response” Kei-ichiro Mishiba, Yukihiro Nagashima, Eiji Suzuki, Noriko Hayashi, Yoshiyuki Ogata, Yukihisa Shimada and Nozomu Koizumi. (The 6th International Workshop on Plant Membrane Biology) 2013 年 3 月 29 日 倉敷市芸会館 (倉敷)

⑥“Salicylic acid induces UPR genes through IRE1/bZIP60 pathway in Arabidopsis” Yukihiro Nagashima, Tsukasa Iida, Kei-ichiro Mishiba and Nozomu Koizumi (The 6th International Workshop on Plant Membrane Biology) 2013 年 3 月 29 日 倉敷市芸会館 (倉敷)

⑦「シロイヌナズナの細胞体ストレス応答において細胞体で合成されるタンパク質の mRNA が IRE1 により分解される」三柴啓一郎、長島幸広、鈴木英司、林のりこ、尾形善之、嶋田幸久、小泉望 (日本植物生理学会・第 54 回年会) 2013 年 3 月 21 日 岡山大学 (岡山)

⑧「サリチル酸による IRE1/bZIP60 経路を介した細胞体ストレス応答関連遺伝子の誘導」長島幸広、飯田幸、三柴啓一郎、小泉望 (日本植物生理学会・第 54 回年会) 2013 年 3 月 23 日 岡山大学 (岡山)

⑨「細胞体ストレスを指標としたシロイヌナズナ変異体の単離」飯田幸、大西陽向、三柴啓一郎、倉田哲也、小泉望 (日本植物生理学会・第 54 回年会) 2013 年 3 月 23 日 岡山大学 (岡山)

⑩「プラスチドにおける脂質合成と細胞体ストレス応答」飯田幸、大西陽向、三柴啓一

郎、倉田哲也、小泉望 (日本植物脂質科学研究会・第 25 回植物脂質シンポジウム) 2012 年 12 月 1 日 甲南大学 (神戸)

⑪“Characterization of Arabidopsis mutants for the unfolded protein response” Kei-ichiro Mishiba, Yukihiro Nagashima, Eiji Suzuki, Noriko Hayashi, Yoshiyuki Ogata, Yukihisa Shimada and Nozomu Koizumi (10th International Congress on Plant Molecular Biology) 2012 年 10 月 24 日 国際コンベンションセンター (韓国済州島)

⑫“IRE1-bZIP60 Pathway Induces UPR genes by Salicylic Acid (SA) in Arabidopsis” Yukihiro Nagashima, Kei-ichiro Mishiba and Nozomu Koizumi (10th International Congress on Plant Molecular Biology) 2012 年 10 月 23 日 国際コンベンションセンター (韓国済州島)

⑬“Salicylic acid induces genes for the unfolded protein response depending on IRE1 and bZIP60 in Arabidopsis” Yukihiro Nagashima, Kei-ichiro Mishiba and Nozomu Koizumi (XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions) 2012 年 7 月 31 日 京都国際会館 (京都)

⑭「細胞体シャペロンを恒常的に発現するシロイヌナズナ変異体の単離」飯田幸、大西陽向、三柴啓一郎、小泉望 (日本植物細胞分子生物学会・第 30 回大会・シンポジウム) 2012 年 8 月 4 日 奈良先端科学技術大学院大学 (生駒)

⑮「サリチル酸による細胞体ストレス応答関連遺伝子の誘導に IRE1-bZIP60 経路が関わる」長島幸広、三柴啓一郎、小泉望 (日本植物細胞分子生物学会・第 30 回大会・シンポジウム) 2012 年 8 月 4 日 奈良先端科学技術大学院大学 (生駒)

⑯“The IRE1-bZIP signaling pathway in Arabidopsis unfolded protein response” Nozomu Koizumi (GNU Plant Science Symposium 2012) 2012 年 5 月 ギョンサン国立大学 (韓国ジンジュ市)

⑰「シロイヌナズナの細胞体ストレス応答における IRE1-bZIP60 経路の解析」長島幸広、三柴啓一郎、鈴木英司、嶋田幸久、岩田雄二、小泉望 (日本植物生理学会・第 53 回年会) 2012 年 3 月 16 日 京都産業大学 (京都)

⑱「細胞質スプライシングにより制御されるシロイヌナズナの転写因子 bZIP60」小泉望 (京都植物バイオテク談話会・第 21 回植物バイオテクシンポジウム「植物における遺伝子制御と形態形成・生理応答の新展開」) 2011 年 12 月 8 日 京都産業大学 (京都)

⑱ 「シロイヌナズナ IRE1 による小胞体局在型転写因子 bZIP60 の制御機構の解明」 長島幸広、三柴啓一郎、鈴木英司、嶋田幸久、岩田雄二、小泉望 (日本植物細胞分子生物学会・第 29 回大会・シンポジウム) 2011 年 9 月 6 日 九州大学 (福岡)

⑳ 「植物における小胞体ストレス応答の分子機構」小泉望 (農芸化学関西支部第 470 回講演会・ミニシンポジウム) 2011 年 7 月 大阪府立大学 (大阪堺市)

21) "Arabidopsis IRE1 catalyses cytoplasmic splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor" Yukihiro Nagashima, Kei-ichiro Mishiba, Eiji Suzuki, Yukihiisa Shimada, Yuji Iwata, and Nozomu Koizumi (International Plant RNA workshop) 2011 年 6 月 21 日 理化学研究所 (神奈川・鶴見)

[図書] (計 1 件)

① Iwata, Y., Lee, M.H., Koizumi, N. (2011) Analysis of a transcription factor using transient assay in Arabidopsis protoplasts. in Yuan, Ling; Perry, Sharyn E. (Eds.) Methods in Molecular Biology, vol. 754, pp107-117, Humana Press

[その他]

ホームページ等

<http://www.plant.osakafu-u.ac.jp/~mishiba/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

ナシ

### (3) 連携研究者

嶋田 幸久 (SHIMADA Yukihiisa)

横浜市立大学・木原生物学研究所・教授  
研究者番号：30300875