

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291064

研究課題名(和文) フィトクロムによる選択的スプライシング制御の分子機構と生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism and physiological significance of alternative splicing regulation by phytochrome

研究代表者

松下 智直 (Matsushita, Tomonao)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20464399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の主要な光受容体フィトクロムは、PIFと呼ばれる転写因子群を介した転写制御により光シグナルを伝達すると考えられている。しかしながら我々は本研究の結果、フィトクロムが転写制御に加え、それとほぼ同じ規模で、シロイヌナズナゲノムの6.9%にも及ぶ遺伝子に対して選択的スプライシング制御を行うことを明らかにした。さらに、光シグナル伝達のネガティブレギュレーターであるSPA3について、その選択的スプライシングパターンがフィトクロムシグナル依存的に変化し、そのことが生理学的に光形態形成の促進に寄与することを実証した。

研究成果の概要(英文)：At present, it is widely believed that phytochrome regulates the transcription of light-responsive genes by modulating the activity of several transcription factors. However, we performed mRNA-seq analysis and revealed that phytochrome controls not only transcription, but also alternative splicing, to approximately the same degree at the genomic level in Arabidopsis. Moreover, we experimentally showed that phytochrome-induced alternative splicing changes of SPA3, the negative regulator of light signaling, physiologically contributed to promoting light responses of plants. From these results, we demonstrated that phytochrome directly and simultaneously regulates two different aspects of gene expression, namely transcription and alternative splicing to mediate light responses in plants.

研究分野：植物光生理学

キーワード：フィトクロム 光受容体 植物 シグナル伝達 光応答

1. 研究開始当初の背景

フィトクロムの蛋白質は、光受容に働く N 末端領域と、キナーゼドメインを持つ C 末端領域の、2つの領域から成る。フィトクロムは従来、その C 末端領域内のキナーゼ活性により下流因子へシグナルを伝達すると考えられていた。そしてその考えに基づき、フィトクロムのシグナル伝達機構を解明する目的で、フィトクロムの C 末端領域と直接相互作用する因子が精力的に同定されてきた (Ni ら 1998 年、Choi ら 1999 年、Fankhauser ら 1999 年、Ryu ら 2005 年など)。その結果、PIF と呼ばれる bHLH 型の転写因子群がフィトクロムの C 末端領域に相互作用することが明らかとなり (Ni ら 1998 年)、それ以降現在に至るまで、PIF を介した転写制御による光シグナル伝達の分子機構解明が、国内外におけるフィトクロム研究の専ら課題となっている。

このような背景のなか我々は、フィトクロムの最も主要な分子種である phyB が、C 末端領域からではなく N 末端領域からシグナルを発信することを証明した (Matsushita ら 2003 年)。

この発見により従来の「常識」が覆され、phyB のシグナル伝達機構を一から見直す必要が生じたため、我々は phyB の下流経路の見直しを図る目的で、大規模な変異体スクリーニングによる順遺伝学的解析を徹底的に行った。そしてその結果、新奇スプライシング制御因子 RRC1 が phyB の光シグナル伝達に必要であり、phyB が RRC1 を介して、いくつかの遺伝子の選択的スプライシングを光依存的に制御することを明らかにした (Shikata ら 2012 年)。

RRC1 はスプライソソームを構成すると考えられる新奇の SR 蛋白質であり、一般に SR 蛋白質は、N 末端側に RNA 結合に働く RRM ドメインを、C 末端側に、アルギニンとセリン残基に富み、主にスプライシング因子間の相互作用に働く RS ドメインを有している。そして様々なシグナルに応じて RS ドメインが可逆的にリン酸化を受けることにより、RS ドメインを介した相互作用因子との結合能などが変化し、その結果シグナル依存的な選択的スプライシング制御に働くことが知られている (Stamm 2008 年)。

また我々はこれまでに、RRC1 自身の蛋白質蓄積量は phyB シグナルの有無によって変化しないこと (Shikata ら 2012 年)、そして、phyB による選択的スプライシング制御と光シグナル伝達の両方に、RRC1 の RS ドメインが必要であること (Shikata ら 2012 年) を明らかにしており、phyB からの光シグナルが RRC1 の RS ドメインを介して伝達されることが示唆される。

これらを考え合わせると、phyB からのシグナルにより RRC1 の RS ドメインのリン酸化状態が変化し、その結果、RRC1 を含むスプライソソームの構成因子の組成が変化すること

で、標的遺伝子の選択的スプライシングパターンが変化し、光生理応答が引き起こされるという可能性が想定される。

2. 研究の目的

植物の主要な光受容体であるフィトクロム B (phyB) は、PIF と呼ばれる転写因子群を介して標的遺伝子の転写制御を行うことで、植物の光応答を引き起こすと考えられている。しかし我々は最近、シロイヌナズナを用いた大規模な変異体スクリーニングを行い、その結果、新奇スプライシング制御因子 RRC1 が phyB の光シグナル伝達に必要であり、phyB が RRC1 を介して、いくつかの遺伝子の選択的スプライシングを光依存的に制御することを明らかにした。そこで本研究では、phyB による RRC1 を介した選択的スプライシング制御の分子機構を明らかにし、またその標的遺伝子の網羅的同定と機能解析を行うことで、光シグナル伝達において phyB が転写制御に加えて選択的スプライシング制御を行うことの生理学的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず phyB シグナル依存的に RRC1 の RS ドメインのリン酸化状態が変化することを示し、そのリン酸化部位を潰した変異型 RRC1 を *rrc1* 欠損株に導入した形質転換植物を作製し、phyB による選択的スプライシング制御や光生理応答を調べる (実験(1))。また phyB シグナル依存的に RRC1 の RS ドメインに結合もしくは乖離する因子を生化学的手法により同定し、それら因子の機能欠損株や過剰発現体において、実験(1)と同様に phyB シグナル伝達を調べる (実験(2))。さらに、mRNA-seq 解析を行い、phyB による RRC1 を介した選択的スプライシング制御の標的遺伝子をシロイヌナズナにおいて網羅的に同定する。そして特定の標的遺伝子について、その機能欠損株に各スプライスバリエーションの cDNA を個別に導入した形質転換植物を作製し、それらの光応答を詳細に比較する (実験(3))。

4. 研究成果

植物の主要な光受容体であるフィトクロムは、PIF と呼ばれる転写因子群を介して標的遺伝子の転写制御を行うことで、植物の光応答を引き起こすと考えられている。しかし我々は最近、フィトクロムの下流因子として新奇スプライシング因子 RRC1 を順遺伝学的に同定したことをきっかけに、フィトクロムが RRC1 を介してゲノムワイドに選択的スプライシング制御を行うことで光シグナルを伝達するのではないかと可能性が示唆された。

そこで、その可能性を検証する目的で、次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq を行い、フィトクロムシグナル依存的にスプライシ

ングパターンを変化させる遺伝子をゲノムワイドに解析した。その結果、フィトクロムが転写制御に加え、それとほぼ同じ規模で、シロイヌナズナゲノムの 6.9%にも及ぶ遺伝子に対して選択的スプライシング制御を行うことを明らかにした。また、Gene Ontology 解析により、フィトクロムによる転写制御を受ける遺伝子が主に転写因子をコードする遺伝子であるのに対して、フィトクロムによる選択的スプライシング制御を受ける主な遺伝子はスプライシング関連遺伝子であることが明らかとなった。

さらに、光シグナル伝達のネガティブレギュレーターである SPA3 について、その選択的スプライシングパターンがフィトクロムシグナル依存的に変化し、そのことが生理学的に光形態形成の促進に寄与することを実証した。我々は以上の結果から、フィトクロムが、遺伝子発現の異なるステップである転写と選択的スプライシングを、直接かつ同時に制御することで、植物の光応答を引き起こすことを実証し、植物の光情報利用における新奇機構を世界に先駆けて発見した。

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 6 件)

Ishishita K, Suetsugu N, Hirose Y, Higa T, Doi M, Wada M, Matsushita T, Gotoh E
“Functional characterization of blue-light-induced responses and PHOTOTROPIN 1 gene in *Welwitschia mirabilis*”

JPlant Res. (査読あり) 129: 175-187 (2016)

Li N, Teranishi M, Yamaguchi H, Matsushita T, Watahiki MK, Tsuge T, Li SS, and Hidema J

“UV-B-Induced CPD Photolyase Gene Expression is Regulated by UVR8-Dependent and -Independent Pathways in *Arabidopsis*”

Plant Cell Physiol. (査読あり) 56: 2014-2023 (2015)

Tanaka W, Ohmori Y, Ushijima T, Matsusaka H, Matsushita T, Kumamaru T, Kawano S, and Hirano HY

“Axillary Meristem Formation in Rice Requires the WUSCHEL Ortholog TILLERS ABSENT1”

Plant Cell (査読あり) 27: 1173-1184 (2015)

Shikata H, Hanada K, Ushijima T, Nakashima M, Suzuki Y, and Matsushita T

“Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*”

Proc Natl Acad Sci USA (査読あり) 111: 18781-18786 (2014)

Ando E, Ohnishi M, Wang Y, Matsushita

T, Watanabe A, Hayashi Y, Fujii M, Ma JF, Inoue S, and Kinoshita T

“*TWIN SISTER OF FT*, *GIGANTEA*, and *CONSTANS* have a positive but indirect effect on blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*”

Plant Physiol. (査読あり) 162: 1529-1538 (2013)

Kuroyanagi M, Katayama T, Imai T, Yamamoto Y, Chisada S, Yoshiura Y, Ushijima T, Matsushita T, Fujita M, Nozawa A, Suzuki Y, Kikuchi K, and Okamoto H

“New approach for fish breeding by chemical mutagenesis: establishment of TILLING method in fugu (*Takifugu rubripes*) with ENU mutagenesis”

BMC Genomics (査読あり) 14: 786 (2013)

[学会発表](計 12 件)

松下智直

「植物の光情報受容体フィトクロムの細胞内シグナル伝達機構の解析」

日本シダ学会・関連集会(新潟、2015年9月)

松下智直

「植物の「目」の基礎研究から偶然発見した植物の生産性を高めるバイオテクノロジー」

日本生物工学会市民フォーラム(飯塚、2015年10月)

Tomonao Matsushita

“Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*”

The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing (Tokyo, Japan, March 2015)

Tomonao Matsushita

“Light-dependent dual regulation of gene expression by phytochrome”

2015 International Symposium on Plant Sciences & the Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists (Daejeon, Korea, November 2015)

Tomonao Matsushita

“Molecular mechanism of phytochrome signal transduction in higher plants”

7th Asia and Oceania Conference on Photobiology (Taipei, Taiwan, November 2015)

松下智直

「植物の光受容体フィトクロムによる遺伝子発現の多段階制御」

第7回トランスポーター研究会九州部会シンポジウム(北九州、2014年11月)

Tomonao Matsushita

“Phytochrome controls alternative splicing in *Arabidopsis*”

Academia Sinica Institutional Seminar (Taipei, Taiwan, February 2014)

Tomonao Matsushita

“Light-dependent regulation of gene expression by phytochrome”
Symposium “The cutting edge of photoreponse mechanisms: photoreceptor and signaling mechanism”,
The 78th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan (Tokyo, Japan, September 2014)

Tomonao Matsushita

“Phytochrome directly regulates various aspects of gene expression”
Symposium “Light in life: photo-biology of animals, plants, microorganisms and optogenetics”,
The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Sapporo, Japan, September 2014)

Tomonao Matsushita

“Phytochrome B regulates alternative splicing in Arabidopsis”
International Symposium on Plant Photobiology 2013 (Edinburgh, United Kingdom, June 2013)

Tomonao Matsushita

“Phytochrome regulates alternative splicing in Arabidopsis”
Korean Society of Photoscience, Plant Photobiology Colloquium 2013 (KAIST, Daejeon, Korea, November 2013)

Tomonao Matsushita

“Phytochrome regulates alternative splicing in Arabidopsis”
The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology (Sydney, Australia, November 2013)

〔図書〕(計1件)

松下智直 高校生物解説書 植物編 (講談社)

3.1.2 「光応答」の章を執筆担当

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下智直 (MATSUSHITA TOMONAO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20464399