

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440133

研究課題名(和文)mRNA代謝制御因子群が担う植物形態形成の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of mRNA processing factors in plant morphogenesis

研究代表者

柘植 知彦(TSUGE, Tomohiko)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：50291076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナSF3b複合体構成因子7つの内、6つが複数の遺伝子がコードしていることが判明した。これらの遺伝子機能を解析する逆遺伝学的アプローチを進めた結果、SAP130AとBに加え、新たにSAP14bAとBも花粉形成に不可欠であることを見出した。またSAP49AとBが胚発生において不可欠であることを明らかにして、SF3bのサブユニットごとに、標的遺伝子の選択性に関わる貢献度が異なることを示した。さらにSAP130と結合するCSN1に注目し、csn1部分相補植物が、花粉形成過程に異常を示すことを発見した。CSN1とSAP130とが協調的に調節する花粉形態形成過程があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Six out of seven SF3b subunits in Sf3b were duplicated in Arabidopsis thaliana. Through attempts to analyze the function of each subunit, SAP130A and B, SAP14bA and B were found to be both essential for pollen development. On the other hand, SAP49A and B were found to be essential for embryogenesis. This lead us to hypothesize that, different subunits contribute to determining preferences for different sets of target genes. In addition, we discovered that csn1 partial complementary plants display pollen deformity very similar to that of SAP130 RNAi plants, This suggests a common molecular mechanism coordinately governed by CSN1 and SAP130, to regulate genes involved in pollen development.

研究分野：植物分子生物学

 キーワード：植物形態形成 遺伝子発現制御 mRNA代謝制御 スプライソソーム タンパク質相互作用 転写制御 R  
 NAプロセッシング COP9シグナロソーム

### 1. 研究開始当初の背景

植物には生育場所を移動する能力が無い代わりに、多様な形態形成プログラムを生育環境に応じて制御するメカニズムが備わっている。これらの環境応答は、核内の遺伝子発現の制御を介して行なわれる。

これまでに我々は、環境に応答する形態形成制御系として、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分子機構を解明してきた。この分解制御系は CSN (COP9 シグナロソーム) とよばれる保存性が高い核内タンパク質複合体の CSN5 サブユニットのイソペプチダーゼ活性に依存するが、CSN の各サブユニットの機能もまた重要であることが判明していた。

一方、SAP130 や Prp43 などの mRNA 代謝関与因子が CSN1 サブユニットを介して CSN と結合することを見出していた。SAP130 は、スプライソソームを形成する SF3b の構成因子である。SAP130 が、ヒトでは複数の E3 コピキチンリガーゼと結合してポリコピキチン化活性を調節すること、植物では花粉をモデルに用いて配偶子形態形成に重要な機能を担うことを報告してきた。特に花粉形成では QRT1 と QRT3 の正常な転写に SAP130 機能が特異的に必要であることを示した。

### 2. 研究の目的

本研究では、植物の mRNA 代謝制御機構に着目し、植物形態形成における遺伝子発現制御メカニズムを理解することを目的とした。

まず、pre-mRNA のスプライシングに必須である SF3b 複合体の全構成因子を植物で同定し、研究基盤整備を目指した。すでに SF3b 構成因子 SAP130 (SPLICEOSOME ASSOCIATED PROTEIN 130) が花粉形成に不可欠であることを報告したが、SAP49 が胚発生において不可欠である可能性を見出した。そこで、SAP130 と SAP49 の機能解析をモデルに、普遍性が高い制御を行なう mRNA 代謝制御因子群が、いかにして特定の遺伝子転写を制御するのか、その分子機構の解明を目指した。

また、SF3b の解体に重要な Prp43RNA ヘリカーゼの機能解析を行ない、植物における mRNA 代謝制御機構の理解を目指した。

SAP130 と Prp43 はタンパク質分解を制御する CSN と結合するので、mRNA 代謝への CSN 機能の関与を解析した。

### 3. 研究の方法

植物の mRNA 代謝制御機構に着目し、植物形態形成における遺伝子発現制御メカニズムを、次の方針のもとで解析した。

まず、植物の SF3b を単離してその構成因子を検討した。

同時に、すでに進行している SF3b 構成因子である SAP130 および SAP49 の機能解析を進めた。SAP130 は花粉形成、SAP49 は胚発

生で特異的な機能を果たす予備知見があったので、その分子機構の解明を目指した。また、スプライソソームの解体とリボソームの生合成に関与し、前記 SAP130 とともに CSN と結合することが判明している Prp43RNA ヘリカーゼの機能解析を進めた。これらの解析を通じて、一見普遍性が高い mRNA 代謝制御因子群が、どのように特異的な遺伝子の転写を制御するのか、その分子メカニズムの理解を目指した。

### 4. 研究成果

本研究では、植物の mRNA 代謝に着目して、植物形態形成における遺伝子発現制御メカニズムの理解を目指した。

まず、スプライシングに必須である SF3b 複合体の全構成因子を植物で研究するために、酵母とヒトの構成因子を参照し、シロイヌナズナにおける相同因子群を同定した。その結果、7 つのうち 6 つのサブユニットは複数の遺伝子がコードしていることが判明した。

つぎに、これらの遺伝子機能を順次解析する逆遺伝学的アプローチと、SF3b タンパク質複合体構成因子の同定する生化学的アプローチを進めた。

この成果は、国内外の学会、招待講演、国際雑誌論文などに発表した。以下成果の一部を列記する。

1) 植物 SF3b 構成因子の AtSAP130A と AtSAP130B とが花粉形成に不可欠であることを報告したが、新たに SAP14b が花粉形成に不可欠であることを見出した。機能欠損植物の発生学的解析の結果、特定の時期から形態異常がみられることを確認した。興味深いことにこの時期は、SAP130 機能欠損植物のそれとよく似ていた。このことから、SAP130 と SAP14b とが協調して担う、花粉形態形成過程があるものと考えて、解析を続けている。

2) AtSAP49 は胚発生において不可欠であり、機能欠損植物が球状型胚以降の発生に異常を示すことを明らかにした。前記結果と合わせて考えると、SF3b のサブユニットごとに、標的遺伝子の選択性に関わる貢献度が異なると考えられ、このプレファレンスの制御機構の解析を進めている。

3) 植物粗抽出物を用いた生化学的解析を進め、植物 SF3b 構成因子の同定と動態の解析を進めた結果、候補因子を得た。現在その詳細解析を進めている

4) さらに SAP130 と結合する CSN1 に注目し、csn 1 変異体に CSN1 遺伝子を発現する部分相補植物が、花粉形成過程に異常を示すことを発見した。解析の結果、花粉形態形成異常が現れる時期や表現型が SAP130RNAi

植物のそれとよく似ていることから、CSN1とSAP130が協調的に調節する花粉形態形成過程があることを検討している。

#### 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][査読有](計8件)

- 1- Koeduka T, Kajiyama M, Suzuki H, Furuta T, Tsuge T, Matsui K. (2016) Benzenoid biosynthesis in the flowers of *Eriobotrya japonica*: molecular cloning and functional characterization of p-methoxybenzoic acid carboxylmethyltransferase. **Planta**. 2016 May4. [Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s00425-016-2542-2
- 2- Wu Z, Zhu D, Lin X, Miao J, Gu L, Deng X, Yang Q, Sun K, Zhu D, Cao X, Tsuge T, Dean C, Aoyama T, Gu H, Qu L J. (2016) RNA binding proteins RZ-1B and RZ-1C play critical roles in regulating pre-mRNA splicing and gene expression during development in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 28: 55-73. doi: 10.1105/tpc.15.00949
- 3- Li N, Teranishi M, Yamaguchi H, Matsushita T, Watahiki M K, Tsuge T, Li S S, Hidema J. (2015) UV-B-Induced CPD photolyase gene expression is regulated by UVR8-dependent and-independent pathways in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiol**, 56: 2014-2023. doi: 10.1093/pcp/pcv121
- 4- Lin Q, Ohashi Y, Kato M, Tsuge T, Gu H, Qu L J, Aoyama T. (2015) GLABRA2 directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. **Plant Cell**, 27: 2894-2906. doi: 10.1105/tpc.15.00607
- 5- Wada Y, Kusano H, Tsuge T, Aoyama T. (2015) Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase genes respond to phosphate deficiency for root hair elongation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J**, 81: 426-437. doi: 10.1111/tpj.12741
- 6- Zhu D, Wu Z, Cao G, Li J, Wei J, Tsuge T, Gu H, Aoyama T, Qu L J. (2014) TRANSLUCENT GREEN, an ERF family transcription factor, controls water balance in *Arabidopsis* by activating the expression of aquaporin genes. **Mol Plant**, 7: 601-615. doi: 10.1093/mp/sst152
- 7- Li R, Li J, Li S, Qin G, Novák O, Pěncík A, Ljung K, Aoyama T, Liu J, Murphy A, Gu H, Tsuge T, Qu L J. (2014) *ADP1* affects plant architecture by regulating local auxin biosynthesis. **PLoS Genet**, 10:e1003954. doi: 10.1371/journal.pgen.1003954
- 8- Franciosini A, Lombardi B, Iafrate S, Pecce V, Mele G, Lupacchini L, Kondou Y, Gusmaroli G, Aki S, Tsuge T, Deng X W, Matsui M, Vittorioso P, Costantino P, Serino G. (2013) The *Arabidopsis* COP9 SIGNALOSOME INTERACTING F-BOX KELCH1 protein forms an SCF ubiquitin ligase and regulates hypocotyl elongation. **Mol Plant**, 6: 1616-1629. doi: 10.1093/mp/sst045

[学会発表](計33件)

- 1- 島村亮太\*、谷口(山本)幸美、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史、シロイヌナズナ PLD $\zeta$ 2 の細胞生物学的機能、第57回日本植物生理学会年会、2016.03.18-20、岩手大学上田キャンパス、岩手県盛岡市(ポスター発表)
- 2- 巨真智子\*、Blanc-Mathieu Romain、藤真理子、柘植知彦、緒方博之、青山卓史、植物細胞形態形成におけるPIP5K 遺伝子の機能重複性と制御的役割、第57回日本植物生理学会年会、2016.03.18-20、岩手大学上田キャンパス、岩手県盛岡市(ポスター発表)
- 3- 張曉娟\*、青山卓史、柘植知彦、シロイヌナズナにおけるCSN相互作用因子CPSF6の機能解析、第57回日本植物生理学会年会、2016.03.18-20、岩手大学上田キャンパス、岩手県盛岡市(口頭発表)
- 4- Tomohiko TSUGE\*, COP9 signalosome: Understanding its role as a modulator linking proteolysis to RNA processing. Invited lecture at "New era of pre-mRNA splicing world – satellite meeting", 2016.03.14-15, Hotel Nikko Nara, Nara JAPAN.
- 5- 黒田凌\*、後藤翔、野元美佳、青山卓史、多田安臣、古本強、松下智直、柘

- 植知彦、COP/DET/FUS を介した選択的スプライシングの制御系の解析に向けて、第5回植物RNA研究者ネットワークシンポジウム、2016.01.08-09、東京大学駒場キャンパス 21 KOMCEE、東京都目黒区（ポスター発表）
- 6- Xiaojuan ZHANG\*, Takashi AOYAMA, Tsuyoshi FURUMOTO, Tom TSUGE, Functional analyses of a CSN interacting protein, CPSF6, in *Arabidopsis thaliana*, 第5回植物RNA研究者ネットワークシンポジウム、2016.01.08-09、東京大学駒場キャンパス 21 KOMCEE、東京都目黒区（ポスター発表）
- 7- Anna FRANCIOSINI, Simone BUTERA, Niccolò MOLESSO, Isabelle BONOMO, Alessandra BOCCACCINI, Tomohiko TSUGE, Maura CARDARELLI, Paola VITTORIOSO, Paolo COSTANTINO, Giovanna SERINO. CULLIN neddylation is regulated during seed development in *Arabidopsis thaliana*. The 26th International Conference on Arabidopsis Research, 2015.07.05-09. Palais des Congrès de Paris, Paris FRANCE. <poster>
- 8- Valentina CECCHETTI, Patrizia BRUNETTI, Roberta GHELLI, Nadia NAPOLI, Angelo de PAOLIS, Tomohiko TSUGE, Paolo COSTANTINO, Maura CARDARELLI \*. The role of ARF8 and ARF6 in stamen filament elongation and anther dehiscence in *Arabidopsis*. Proceedings of the Workshop on Molecular Mechanisms controlling Flower Development, 2015.06.07-11, Girona, SPAIN. <poster>
- 9- 加藤真理子\*、柘植知彦、前島正義、青山卓史、シロイヌナズナ根毛におけるCa<sup>2+</sup>結合タンパク質PCaP2とホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸の細胞内動態、第56回日本植物生理学会年会、2015.03.16-18、東京農業大学、東京都世田谷区（ポスター発表）
- 10- 齊藤涼\*、和田悠貴香、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史、PIP5K3と他のタイプB PIP5K遺伝子との機能重複に関する解析、第56回日本植物生理学会年会、2015.03.16-18、東京農業大学、東京都世田谷区（ポスター発表）
- 11- 島村亮太\*、谷口（山本）幸美、谷口雅俊、加藤真理子、柘植知彦、林謙一郎、青山卓史、側方根幹におけるPLD2の役割、第56回日本植物生理学会年会、2015.03.16-18、東京農業大学、東京都世田谷区（ポスター発表）
- 12- Nan LI\*, Mika TERANISHI, Tomonao MATSUSHITA, Tomohiko TSUGE, Masaaki WATAHIKI, Jun HIDEAMA, Gene expression of CPD photolyase is primarily mediated by UVR8- and cryptochrome-dependent pathways in de-etiolated *Arabidopsis* seedlings, 第56回日本植物生理学会年会、2015.03.16-18、東京農業大学、東京都世田谷区（口頭発表）
- 13- 後藤翔\*、野元美佳、多田安臣、古本強、青山卓史、柘植知彦、COP9シグナロソーム結合因子AtPrp43の機能解析、第56回日本植物生理学会年会、2015.03.16-18、東京農業大学、東京都世田谷区（ポスター発表）
- 14- Xiaojuan ZHANG\*, Tsuyoshi FURUMOTO, Takashi AOYAMA, Tomohiko TSUGE, Functional analyses of CPSF6 in *Arabidopsis thaliana*, 第56回日本植物生理学会年会、2015.03.16-18、東京農業大学、東京都世田谷区（口頭発表）
- 15- Kakeru GOTO\*, Mika NOMOTO, Yasuomi TADA, Takashi AOYAMA, Tsuyoshi FURUMOTO, Tomohiko TSUGE. Functional characterization of COP9 signalosome interacting factor AtPrp43. The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2015.03.13-15, AIST Tokyo Waterfront Annex, Koto-ku TOKYO. <poster>
- 16- 安喜史織、張俊、後藤翔、中井秀人、青山卓史、瞿礼嘉、柘植知彦\*、スプライソソーム構成因子群とCOP9シグナロソームが植物形態形成に担う役割を考える、第4回植物RNA研究者ネットワークシンポジウムRNAから植物を考える-植物を支えるRNA機能-、2015.01.19-20、京都大学理学部セミナーハウス、京都府京都市（口頭発表）
- 17- 後藤翔\*、野元美佳、多田安臣、古本強、青山卓史、柘植知彦、COP9シグナロソーム結合因子AtPrp43の機能解析、第4回植物RNA研究者ネットワークシンポジウムRNAから植物を考える-植物を支えるRNA機能-、2015.01.19-20、京都大学理学部セミ

- ナーハウス、京都府京都市(ポスター発表)
- 18- Xiaojuan ZHANG\*, Tsuyoshi FURUMOTO, Takashi AOYAMA, Tomohiko TSUGE, Functional analyses of CPSF6 in *Arabidopsis thaliana*. 第4回植物RNA研究者ネットワークシンポジウム RNA から植物を考える -植物を支える RNA 機能-, 2015.01.19-20、京都大学理学部セミナーハウス、京都府京都市(ポスター発表)
- 19- 加藤真理子\*、柘植知彦、前島正義、青山卓史、根毛伸長時におけるシロイヌナズナ Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質 PCaP2 とホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸の細胞内動態、第27回植物脂質シンポジウム、2014.11.28-29、静岡市山岳交流センター、静岡県静岡市(ポスター発表)
- 20- 和田悠貴香、草野博彰、巨真智子、齊藤涼、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史\*、シロイヌナズナの根毛伸長における PIP5K 遺伝子の役割、第27回植物脂質シンポジウム、2014.11.28-29、静岡市山岳交流センター、静岡県静岡市(口頭発表)
- 21- 島村亮太\*、谷口(山本)幸美、谷口雅俊、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史、シロイヌナズナの側方根幹における PLD 2-PA シグナルの役割、第27回植物脂質シンポジウム、2014.11.28-29、静岡市山岳交流センター、静岡県静岡市(ポスター発表)
- 22- Valentina CECCHETTI, Patrizia BRUNETTI, Roberta GHELLI, Angelo DE PAOLIS, Tomohiko TSUGE, Paolo COSTANTINO, Maura CARDARELLI\*. The role of ARF8 and ARF6 in late stamen development in *Arabidopsis*. EMBO Conference -Interdisciplinary plant development-, 2014.09.21-24, Sainsbury Laboratory University of Cambridge, Cambridge UNITED KINGDOM. <poster>
- 23- Anna FRANCIOSINI, Kaiqi DU, Nahil MATARI, Laila MOUBAYIDIN, Sabrina SABATINI, Tomohiko TSUGE, Maura CARDARELLI, Paolo COSTANTINO, Pablo JENIK, Giovanna SERINO\*. Bulk CULLIN-RING E3 ubiquitin ligase (CRL) de-neddylation is required for post-germinative development in *Arabidopsis thaliana*. EMBO Practical course on Ubiquitin and SUMO, 2014.09.1-8, Alghero, ITALY. <poster >
- 24- Anna FRANCIOSINI, Kaiqi DU, Nahil MATARI, Laila MOUBAYIDIN, Sabrina SABATINI, Tomohiko TSUGE, Maura CARDARELLI, Paolo COSTANTINO, Pablo JENIK, Giovanna SERINO\*. Bulk CULLIN-RING E3 ubiquitin ligase (CRL) de-neddylation is required for post-germinative development in *Arabidopsis thaliana*. EMBO Conference on Interdisciplinary plant development, 2014.09.21-24. Cambridge, UK. <poster>
- 25- 張俊、安喜史織\*、後藤翔、中井秀人、青山卓史、瞿礼嘉、柘植知彦\*、スブライソソーム構成因子群とCSNは植物形態形成に重要な働きを担う、第55回日本植物生理学会年会、2014.03.18-20、富山大学、富山県富山市(口頭発表)
- 26- 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55回日本植物生理学会年会、2014.03.18-20、富山大学、富山県富山市(口頭発表)
- 27- 後藤翔\*、青山卓史、柘植知彦、AtPrp43 RNA ヘリカーゼの機能解析、第55回日本植物生理学会年会、2014.03.18-20、富山大学、富山県富山市(口頭発表)
- 28- 島村亮太、安齋尚子、加藤真理子、谷口雅俊、大橋洋平、柘植知彦、青山卓史\*、シロイヌナズナ PLDzeta1 による細胞内情報伝達、第55回日本植物生理学会年会、2014.03.18-20、富山大学、富山県富山市(口頭発表)
- 29- Kakeru GOTO\*, Takashi AOYAMA, Tomohiko TSUGE. Characterization of the CSN interacting factor, AtPrp43 RNA helicase. Institute for Chemical Research International Symposium 2014 -The Science and Technology of Smart Materials-, 2014.03.10-12, Obaku Plaza Kyoto University, Uji KYOTO. <poster>
- 30- Hideto NAKAI\*, Shiori AKI, Alexander HEYL, Takashi AOYAMA, Tomohiko TSUGE. Functional analysis of a trihelix transcription factor interacting with COP9 signalosome. Institute for Chemical Research

International Symposium 2014  
-The Science and Technology of  
Smart Materials-, 2014.03.10-12,  
Obaku Plaza Kyoto University, Uji  
KYOTO. <poster>

- 31- 安喜史織、張俊、後藤翔、中井秀人、  
青山卓史、瞿礼嘉、柘植知彦\*、スプ  
ライソソーム構成因子群と COP9 シ  
グナロソームは植物形態形成に重要  
な役割を担う、第3回植物 RNA 研究  
者ネットワークシンポジウム RNA  
から植物を考える -植物を支える  
RNA 機能-、2013.11.22-23、北海道  
大学、北海道札幌市

- 32- Tomohiko TSUGE\*, Understanding  
CSN mediated regulation through  
its binding partners: linking  
proteolysis to RNA processing.  
Invited lecture at “The 6th Asia &  
Oceania Conference on  
Photobiology”, 2013.11.10-13,  
Novotel Sydney Central, Sydney  
AUSTRALIA.

- 33- Tomohiko TSUGE\*, COP9  
signalosome: Understanding its  
role as a modulator linking  
proteolysis to RNA processing.  
Invited lecture at “The 3rd  
International Symposium on  
Integrative Plant Biology”,  
2013.07.05, Lijiang, PRC.

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

〔図書〕(計件)

- 1- 柘植知彦 (2016) No92. 光シグナル  
伝達と COP タンパク質、「光と生命の  
事典」(日本光生物学協会光と生命の  
辞典編集委員会編、朝倉書店東京) pp.  
184-185.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホ - ム ペ - ジ :  
<http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/sites/>

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・准教授

研究者番号: 50291076