

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 長島 幸広

学位授与の日付 平成27年3月31日

論文名 シロイヌナズナの小胞体ストレス応答における細胞質スプライシングに関する研究

論文審査委員 主査 小泉 望
副査 青木 考
副査 太田 大策

論文要旨

序章

小胞体は真核生物に広く存在する細胞内小器官で分泌タンパク質や膜タンパク質などの小胞輸送により細胞内を移動するタンパク質の合成の場である。これらのタンパク質は翻訳後、小胞体内腔で、シャペロン等の働きにより正しくフォールディングされる。タンパク質のフォールディングが妨げられると、その回避のために小胞体シャペロンに代表される遺伝子が協調的に誘導される。この現象は小胞体ストレス応答と呼ばれる。小胞体ストレスは小胞体内でのタンパク質のフォールディングを阻害し、小胞体ストレス応答を引き起こす刺激の総称である。

小胞体ストレス応答の信号伝達において、生物間でもっとも保存されているタンパク質が **IRE1** である。**IRE1** は小胞体膜に局在する I 型膜タンパク質で小胞体内腔のセンサードメインによりタンパク質のフォールディング異常を感知し、細胞質側にあるキナーゼ活性を介してリボヌクレアーゼドメインを活性化し、特定の遺伝子の **mRNA** を 2 ヶ所で切断する。**IRE1** の標的となる **mRNA** は、酵母では **HAC1**、動物では **XBP1** と呼ばれる、いずれも **bZIP** 型転写因子をコードする。**IRE1** による切断の結果生じた 2 分子の **RNA** が連結されることでスプライシングが起こる。この反応は通常のスプライシングと区別され、細胞質スプライシングと呼ばれる。細胞質スプライシングの結果、**HAC1** では終始コドンの消失により、**XBP1** ではフレームシフトにより、翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列が変わり、いずれの場合も小胞体ストレスで誘導される遺伝子群の転写の活性化に至る。

これまでに植物の **IRE1** ホモログは同定されていたが、小胞体ストレス応答への関与を明

確に示す結果は無く、細胞質スプライシングにおける標的分子も明らかにされていなかった。一方、小胞体内腔でのタンパク質のフォールディングを阻害するツニカマシン (**Tm**) により転写誘導され、小胞体ストレス応答を制御する転写因子として **bZIP60** が同定されていた。しかし、**bZIP60** は小胞体膜に局在すると考えられ、核に移行し活性化する機構は不明であった。本研究では、主としてモデル植物シロイヌナズナの細胞質スプライシングにおける細胞質スプライシングの分子機構の解明をおこなった。

第一章 IRE1 による細胞質スプライシングを介した転写因子 **bZIP60** の活性化

シロイヌナズナのゲノムには 2 個の **IRE1** 遺伝子 (**IRE1A**, **IRE1B**) がある。**IRE1A**, **IRE1B** それぞれの遺伝子破壊株の **Tm** に対する感受性は野生型と変わらない。しかし、両変異体の交配により得られた **IRE1** 二重破壊株の **Tm** 存在下での発芽率は有意に低下した。そこで **IRE1** と小胞体ストレス応答との関連を調べるため、野生型と **IRE1** 二重破壊株の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に比較した。その結果、野生型で **Tm** により発現誘導される遺伝子の多くの誘導が **IRE1** 二重破壊株では低下していた。さらに、これらの遺伝子の多くが過去の解析から明らかとなっていた **bZIP60** 破壊株で発現誘導が低下する遺伝子と一致した。そのため、**IRE1** と **bZIP60** が同じ信号伝達経路にあると考え、**IRE1** 二重破壊株における **bZIP60** の挙動を調べたところ **IRE1** 二重破壊株において **Tm** による **bZIP60** mRNA の増加が確認された。次に、イムノブロットにより **bZIP60** タンパク質を調べたところ、野生型では **Tm** 処理により生じる分子量の小さな活性型タンパク質が **IRE1** 二重破壊株では検出されなかった。従って、**IRE1** 依存的に **bZIP60** はタンパク質の分子量が変わることで活性化されると考えられた。**HAC1** および **XBP1** の mRNA のスプライシング部位には 2 つのステムループ構造と保存された塩基が見られる。RNA の構造予測プログラムより解析した結果、**bZIP60** mRNA の配列に類似した 2 次構造および配列が検出された。

以上を総合して考えると **IRE1** を介した 23 塩基の細胞質スプライシングにより生じた mRNA から低分子の活性型 **bZIP60** が生じると予測された。データベース検索の結果、シロイヌナズナ以外の複数の植物の **bZIP60** ホモログにおいてもスプライシングで生じると予想される配列が見つかった。実際に、**Tm** 処理を施したシロイヌナズナから RT-PCR により予測される配列を持つ増幅産物が検出された。つまり、シロイヌナズナの細胞質スプライシングでは **IRE1** が細胞質スプライシングを介して **bZIP60** を活性化すること、**bZIP60** は **HAC1**、**XBP1** とは異なり、フレームシフトにより膜貫通ドメインを失うことで核へ移行することで活性化されることを明らかとした。

第二章 **bZIP60** mRNA の細胞質スプライシングにおける RNA リガーゼの同定

シロイヌナズナにおいて **IRE1** が **bZIP60** の細胞質スプライシングに関わることが明らかとなったので、**IRE1** の RNase 活性により切断される **bZIP60** mRNA の連結にかかわる RNA リガーゼの同定をおこなうこととした。酵母 **HAC1** の細胞質スプライシングの連結反応は tRNA リガーゼ (**Trl1/Rlg1**) により触媒される。シロイヌナズナの tRNA リガーゼ **AtRNL1** は酵母 **Trl1/Rlg1** との相同性は殆ど見られないが同様のドメイン構造を持つことから、**AtRNL1** の **bZIP60** の細胞質スプライシングへの関与について検討した。

AtRNL1 は tRNA の成熟に不可欠と考えられる。実際、**AtRNL1** の遺伝子破壊株のヘテロ接合体を自家受粉させ、後代の遺伝子型を調べたがホモ接合体が得られず、**AtRNL1** の欠損は致死になると考えられた。そこで Flag タグを連結した **AtRNL1** を **AtRNL1** 破壊株に導入し、**AtRNL1** タンパク質を検出可能とした。この植物を用いて細胞分画をおこなったところ、**AtRNL1** タンパク質の一部がミクロソーム画分で検出された。つまり **AtRNL1** の一部は細胞質スプライシングが起こると考えられる小胞体膜上近くに局在していると考えられた。

続いて **AtRNL1** による切断された **bZIP60** RNA の連結活性を調べた。大腸菌で発現、精

製した **IRE1** の細胞質ドメインと試験管内で作成した切断箇所周辺の **bZIP60 RNA** 断片を反応させたところ、の切断が見られた。さらに大腸菌で発現、精製した **AtRNL1** タンパク質と切断された **bZIP60 RNA** を反応させたところ、連結産物が検出された。以上より、**AtRNL1** が **bZIP60** の細胞質スプライシングにおける連結反応を触媒することを明らかとした。

第三章 サリチル酸による小胞体ストレス応答シグナル伝達経路の活性化

サリチル酸は植物の病害応答などで中心的な役割を果たす。サリチル酸による小胞体ストレス応答関連遺伝子の誘導が報告されていたが、小胞体ストレス応答の経路を介さずサリチル酸経路の制御因子 **NPR1** を介して誘導されるとされていた。一方、サリチル酸による **bZIP60** の細胞質スプライシングが報告されていた。これらを踏まえサリチル酸と小胞体ストレス応答の関連を調べた。

サリチル酸処理により野生株では活性型 **bZIP60 mRNA** が生じたが、**IRE1** 二重破壊株では活性型は検出されなかった。**bZIP60** に強く制御される **BiP3** や **SAR1** の発現もサリチル酸処理で誘導されたが、**IRE1** 二重破壊株、**bZIP60** 破壊株では誘導されなかった。**bZIP60** の活性化、これらの遺伝子の発現は **NPR1** 変異体において野生型と変わらなかった。小胞体ストレス応答は **bZIP60** に加え、タンパク質レベルの切断で活性化される転写因子 **bZIP28** によっても制御される。サリチル酸処理によって **bZIP28** の活性化もみられた。つまり、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 **NPR1** を開さないこと、サリチル酸処理により **IRE1** に依存した **bZIP60** の活性化に加え **bZIP28** の活性化が起こることを明らかとした。

総括

シロイヌナズナの細胞質スプライシングを介して **IRE1** が細胞質スプライシングを介して **bZIP60** の活性化を制御すること、**tRNA** リガーゼが細胞質スプライシングにおける **RNA** の連結を触媒することを明らかとした。これらはこれまで不明であった植物の小胞体ストレス応答の分子機構を明らかにするとともに、植物の細胞質スプライシングの分子機構が酵母や動物と保存性がある一方で特に **bZIP** 型転写因子の活性化機構が大きく異なることを示したものである。さらに、サリチル酸が小胞体ストレス応答関連遺伝子を誘導するとともに小胞体ストレス応答の分子装置を活性化することを明らかとした。

審査結果の要旨

植物細胞の小胞体は種子貯蔵タンパク質や貯蔵脂質などの人間社会にとっても重要な生体分子の合成の場である。小胞体で合成されるタンパク質の円滑な輸送、機能発現には小胞体内での正しいフォールディングが必須で、支障が起こるとその是正の

ために BiP (Binding Protein) に代表される小胞体分子シャペロンが協調的に転写レベルで誘導される。この細胞応答は小胞体ストレス応答と呼ばれ真核生物に広く保存されているが、その生理機能の重要性は多くの生物で不明である。本研究では植物における小胞体ストレス応答の生理機能の理解につなげるため、モデル植物シロイヌナズナを用いて小胞体膜に局在し細胞質側にリボヌクレアーゼ活性を持つ Inositol Required Enzyme 1 (IRE1) を介した細胞質スプライシングを中心とした小胞体ストレス応答の分子機構の解明に取り組んだ。尚、小胞体ストレス応答の誘導には主として小胞体でのタンパク質糖鎖合成阻害剤ツニカマイシンを用いた。

第1章では、転写因子 **bZIP60** と IRE1 が介する細胞質スプライシングの関係に着目した。**bZIP60** は N 末側に転写活性化ドメインを有する膜結合型の転写因子で、小胞体ストレス応答時に活性型と考えられる低分子のタンパク質が核へ移行する。しかし、低分子の活性型タンパク質が生じる機構は不明であった。一方、シロイヌナズナには 2 コピーの IRE1 遺伝子があり、それぞれの遺伝子破壊株明確な表現型を示さないが、IRE1 二重破壊株のツニカマイシン存在下での発芽率は大きく低下した。加えてマイクロアレイ解析より二重破壊株では野生型でツニカマイシンにより誘導される遺伝子の多くの誘導率が低下した。これらの誘導率が低下する遺伝子の多くが、以前の研究でおこなわれた **bZIP60** 破壊株において発現誘導率が低下する遺伝子と一致した。従って、IRE1 と **bZIP60** は同じ信号伝達経路にあると推定した。二重破壊株ではツニカマイシン処理により **bZIP60** の転写産物の誘導が大きく変化しない一方で、活性型と予想される分子量の小さなタンパク質が消失した。さらに酵母、動物の IRE1 による細胞質スプライシングの標的 mRNA に保存されている 2 次構造と配列と類似した構造が **bZIP60** mRNA 上に検出された。従って **bZIP60** が細胞質スプライシングにより制御されると予測され、続いておこなった RT-PCR により、この予測が確認された。つまり、IRE1 を介した 23 塩基の細胞質スプライシングにより、フレームシフトが起こることによって **bZIP60** の膜貫通ドメインが消失する。その結果、活性化ドメインを有する低分子の **bZIP60** が小胞体膜から核へ移行し、転写因子として機能すると考えられた。

第2章では、IRE1 により切断された **bZIP60** mRNA の連結を触媒する RNA リガーゼとして tRNA リガーゼ (AtRNL1) に着目した。Flag タグを付加した AtRNL1 を発現する植物を作出し、細胞分画、Flag 抗体によるウェスタン解析により AtRNL1 タンパク質の一部が小胞体膜近くに局在することを示した。続いて大腸菌で発現、精製した IRE1 の細胞質ドメインと試験管内で作成した切断箇所を含む **bZIP60** RNA 断片を反応させると予想される箇所での RNA の切断が見られた。さらに大腸菌で発現、精製した AtRNL1 タンパク質と切断された **bZIP60** RNA を反応させたところ、予想される反応産物が検出された。以上より、AtRNL1 が小胞体膜上で **bZIP60** の細胞質スプライシングにおける連結反応を触媒する可能性を示した。

第3章では、植物の病害応答などに関わるサリチル酸 (SA) と IRE1 による bZIP60 の細胞質スプライシングの活性化の関連を調べた。SA 処理により野生株では bZIP60 のスプライシングが観察され、bZIP60 に強く制御される BiP3 の転写誘導も見られた。しかし、IRE1 二重破壊株では ZIP60 の細胞質スプライシングや BiP3 の転写誘導の活性化は見られなかった。また、タンパク質レベルでの切断により小胞体ストレス応答を制御する転写因子 bZIP28 も SA により切断された。つまり、サリチル酸と小胞体ストレス応答の信号伝達経路のクロストークの可能性を示した。

本研究では、シロイヌナズナを用いて植物における IRE1 を介した小胞体ストレス応答の情報伝達の分子機構を明らかにするとともに、その病害応答への関与の可能性を示した。長らく予想されていた植物の小胞体ストレス応答における細胞質スプライシングの実態を発見したことは植物生理学、分子生物学の観点から高く評価できる。また本研究で明らかとした分子機構はイネなどの実用作物でも広く保存されていることが明らかとなり、応用研究への発展も期待できる。したがって、最終試験の成績とあわせて博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。