

研 究 報 告 書

「ショ糖過剰ストレス耐性に関わる転写と mRNA 分解の協調制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 千葉 由佳子

1. 研究のねらい

ショ糖は光合成で合成された糖が転流する際の主要な形態であり、植物の生育およびバイオマスに影響を与える重要なファクターである。ショ糖には植物にとって代謝産物としてばかりではなく、シグナル伝達物質としての役割もある。そのため植物体内でのショ糖の量は厳密に調節されており、そこには様々な遺伝子発現制御が関わっていると考えられる。従来の遺伝子発現に関する研究は、mRNA 合成の段階である転写制御に集中して行われ、多くの知見が蓄積されてきた。しかしながら、ここ数年の RNA 研究のめざましい進展により、ノンコーディング RNA や小分子 RNA が発見され、転写後調節の重要性が見直されてきている。mRNA のポリ A 鎖長は、転写後調節の主要な段階である「mRNA の分解」および「翻訳」の両方に影響を与え得る重要な要素である。私はこれまでの研究から、シロイヌナズナのポリ A 鎖分解酵素である AtCCR4 の変異株が、ショ糖過剰耐性、バイオマスの増加および老化の促進を示すことを見出した。これらの表現型は、ポリ A 鎖長の制御を介した転写後調節が、ショ糖代謝および成長制御に関わっている可能性を示唆する。本研究では *atccr4* 変異株が示すショ糖過剰耐性に焦点を絞り、ポリ A 鎖長の制御を介した転写後調節がショ糖代謝にどのような役割を持つのかを明らかにすることを目指す。また、変異株が示すバイオマス増加という形質は、二酸化炭素資源化の観点から興味深いものであり、その要因も明らかにしたい。本研究の最終目的は、mRNA 分解の最初の段階を担うポリ A 鎖分解酵素 AtCCR4 に着目して、その植物生理学上の役割を理解することである。これによって植物のショ糖代謝および成長制御に AtCCR4 によるポリ A 鎖長制御を介した転写後調節がどのように関わっているのかを明らかにすることができる。将来的には、これまで蓄積されてきた転写制御の知見と合わせて、ショ糖代謝および成長制御に関わる遺伝子発現制御を包括的に理解することが、二酸化炭素の資源化に適した植物を作成するための重要な基盤となることを期待する。

2. 研究成果

(1) 概要

シロイヌナズナの AtCCR4 は、酵母における主要なポリ A 分解酵素のオルソログとして単離された。AtCCR4 は 7 つの遺伝子ファミリーを形成しており、中でも酵母の CCR4 に最も似たアミノ酸配列をもつ AtCCR4a と AtCCR4b に着目して研究を進めた。これらのタンパク質は、ポリ A 分解酵素に必須なアミノ酸残基をすべて保存していたが、その機能と植物生理学上の役割は何もわかっていない。本研究では、まず AtCCR4 が本当にポリ A 分解酵素として働きうるのかという点を、細胞内局在性を詳細に調べることにより明らかにすることを目指す。複数のアプローチにより、AtCCR4 が他の多くの mRNA 分解酵素と同様に、細胞質内の Processing

body とよばれる特殊な顆粒状の凝集体に含まれることを明らかにした。一方で植物生理学上の役割を理解するために、*atccr4* 二重変異株を用いた逆遺伝学的解析を進めた。この二重変異株は(1)ショ糖過剰耐性、(2)バイオマスの増加および(3)老化の促進など様々な表現型を示す。ショ糖過剰耐性に着目して研究を進めた結果、二重変異株ではショ糖の含有量が有意に減っており、一方でデンプンの構成要素のひとつであるアミロースが増えていることが明らかとなった。AtCCR4 はポリ A 分解酵素であり、何らかの標的遺伝子を持つと考えられる。解析の結果、アミロースの増加に関連した AtCCR4 の標的遺伝子は、アミロース合成酵素である *Granule Bound Starch Synthase 1* であることを明らかにした。これらの結果は、植物のショ糖およびデンプン代謝にポリ A 鎖長制御を介した転写後調節が関わっていることを示唆する最初の報告となる。

(2) 詳細

真核生物に広く保存されたポリ A 分解酵素である CCR4 は、シロイヌナズナにおいて 2 つの遺伝子 AtCCR4a および AtCCR4b にコードされている。*atccr4* 二重変異株の解析を進めたところ、ショ糖過剰耐性、バイオマスの増加および老化の促進などの多様な表現型を示すことが明らかとなった。このことから、AtCCR4 は植物の生育にとって重要な役割をもつポリ A 分解酵素であると考えられる。

研究テーマ 1 「ポリ A 分解酵素 AtCCR4 の機能解析」

■ AtCCR4 の細胞内局在性

mRNA 分解に関わる多くの酵素は細胞質内の Processing body (P-body) と呼ばれる顆粒状の凝集体を形成することから、P-body は mRNA の分解の場であると考えられている。そこでシロイヌナズナの一過的発現系を用いて、AtCCR4 の細胞内局在性を調べた。mRNA 分解において 5' 側のキャップ構造の除去に関わる酵素である AtDCP1 と AtDCP2 は既に P-body へ局在することが示されている (Iwasaki *et al.*, 2007, *FEBS Lett.*, 29, 2455-2459)。そこで AtDCP1-CFP および AtDCP2-mCherry 融合タンパク質をコントロールとして用い、AtCCR4a-GFP および AtCCR4b-GFP 融合タンパク質と共発現させることにより、AtCCR4a および AtCCR4b が P-body へ局在す

ることを明らかにした(図 1)。P-body への局在性はタバコ葉を用いた Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法によっても確認されている。この方法はふたつのタンパク質の相互作用とその場所を検出する方法である。N 末端と C 末端側に分断された GFP (NGFP と CGFP) をそれぞれのタンパク質に融合させ、それらを共発現させると、ふたつのタンパク質が相互作用するときのみ GFP の蛍光が観察できる。AtCCR4a-NGFP を AtDCP1-CGFP あるいは AtDCP2-CGFP と共発現させたときに、細胞質内に

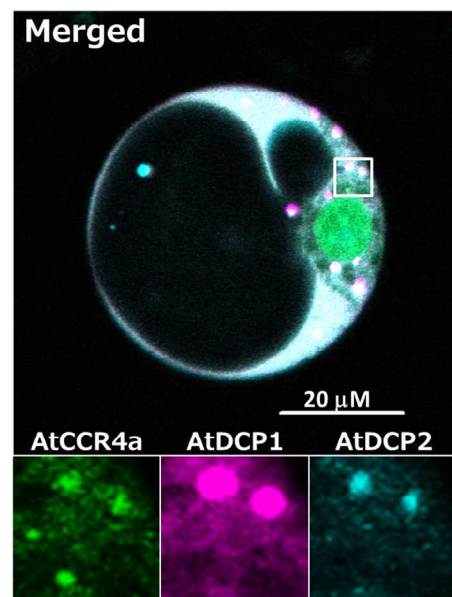


図 1. AtCCR4a の細胞内局在性
(AtCCR4b も同様の結果が得られた)

Processing bodyと思われる顆粒状の凝集体が観察された。同様の結果はAtCCR4bでも観測され、AtCCR4a および AtCCR4b が Processing body に局在するだけでなく、AtDCP1 と AtDCP2 と相互作用していることが示された。また、P-body はストレス時に生じる Stress granule と似た形態を示すことから、Stress granule のマーカーである AtelF3b-mCherry との共発現させることによって、AtCCR4a および AtCCR4b が局在する場合は Stress granule ではないことを示した。これらの結果は、AtCCR4a と AtCCR4b が P-body において mRNA 分解に関与することを強く支持している。

研究テーマ2 「*atccr4* 変異株に見られるショ糖過剰耐性に関する研究」

atccr4 二重変異株はショ糖過剰培地において引き起こされる生育障害に耐性を示す(図2)。その要因を知るべく植物体内の糖の含有量を *atccr4* 二重変異株とコントロール株で比較したところ、二重変異株ではショ糖が有意に減少しており、これがショ糖過剰耐性の要因である可能性が示された。興味深いことに、ブドウ糖の含有量には差が見られなかった。ショ糖が特異的に減少している一方で、葉におけるデンプン量が増加している傾向がヨウ素デンプン反応によって検出された。さらに詳細に調べると、二重変異株ではデンプンの構成要素のひとつであるアミロースの蓄積がコントロール株より有意に増加していることが明らかとなった。アミロースの合成には Granule Bound Starch Synthase 1(GBSS1)という酵素が主要な役割を担うことから、この酵素遺伝子の発現をショ糖過剰ストレス有無の条件で生育させたコントロール株と *atccr4* 二重変異株で比較したところ、培地のショ糖条件に関わらず *atccr4* 二重変異株で増加していた。さらに、GBSS1 mRNA のポリ A 鎖の長さを LM-PAT assay という手法により *atccr4* 二重変異株とコントロール株で比較した。その結果、培地のショ糖条件に関わらず *atccr4* 二重変異株で GBSS1 mRNA のポリ A 鎖が長くなっていることが明らかとなった(図3)。これらの結果から、GBSS1 遺伝子が AtCCR4 の標的遺伝子のひとつであることが示された。この一連の研究により、AtCCR4 がシロイヌナズナにおいてポリ A 分解酵素として働いていること、さらには AtCCR4 によるポリ A 鎖長の制御がショ糖およびデンプンの代謝制御に関わっていることを明らかにし、Plant and Cell Physiology 誌に発表した (Suzuki *et al.*, 2015, *Plant Cell. Physiol.*, 56: 863-874)。

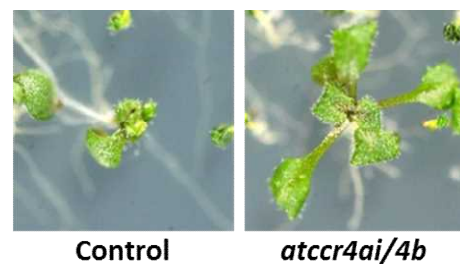


図2. *atCCR4* 二重変異株のショ糖過剰耐性
二重変異株 *atccr4ai/4b* は 250mM のショ糖を含む培地上でも子葉を展開できる。

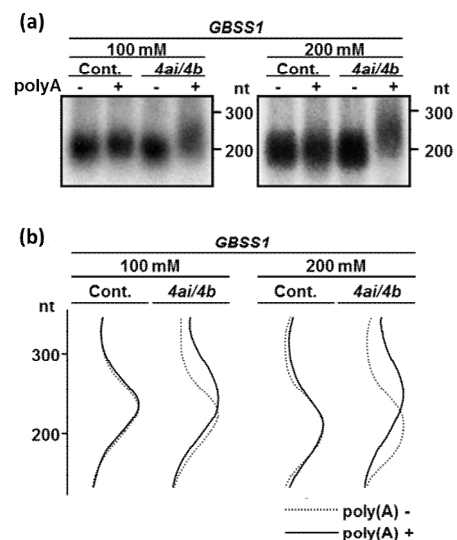


図3. GBSS1 は二重変異株で長いポリ A 鎖をもつ

(a) polyA プラスとマイナスのレーンのバンドサイズの差がポリ A 鎖長を示す。(b) (a) のバンドパターンをスキャンしたものを示す。

3. 今後の展開

■ 包括的な網羅的解析による AtCCR4 の標的遺伝子の単離と解析

atccr4 二重変異株の解析から AtCCR4 が植物の成長制御において多様な役割をもつことが示唆されている。AtCCR4 の役割を理解するためには、その標的遺伝子の単離が不可欠であるが、シヨ糖過剰耐性やバイオマスの増加に関連する標的遺伝子はまだ見つかっていない。これまでの研究経過をふりかえると、表現型をもとにした個別の遺伝子解析で標的遺伝子に到達することは容易ではないと思

われる。そこで、今後はより直接的なアプローチとしてポリ A 鎖長を網羅的に測定する方法(ポリ A プロファイリング)を確立し、*atccr4* 二重変異株とコントロール株におけるポリ A 鎖長の違いを明らかにすることで標的遺伝子の単離を目指す。また、ポリ A 鎖長の調節が mRNA の分解ばかりではなく翻訳にも影響を与え得ることを考慮して、RNA-seq およびリボソームプロファイリングというふたつの網羅的解析を同時に進めることによって、mRNA レベルおよび翻訳効率が *atccr4* 変異株でどのように変化するか調べる。この包括的な解析によって、*atccr4* 変異株が示す様々な表現型の標的遺伝子が単離され、その制御の生理学的な意味が理解できることが期待される(図 4)。

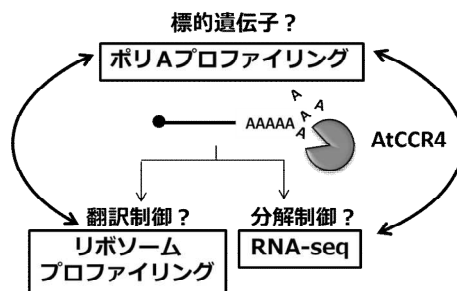


図 4. 包括的な網羅的解析の概念図

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

■ 研究目的の達成状況

シロイヌナズナのポリ A 分解酵素 AtCCR4 の解析を通して、植物の成長制御に関連した遺伝子発現制御にポリ A 鎖長制御を介した転写後調節がどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした研究を進めてきた。そのような中、デンプン代謝に関連した AtCCR4 の標的遺伝子を同定できたことは評価できる。ただし、*atccr4* 二重変異株が示す形質の中で、二酸化炭素の資源化にとって有用と思われる「シヨ糖過剰耐性」および「バイオマスの増加」に関しては、その生理学的な要因がそれぞれシヨ糖含有量の低下とエンドサイクルの亢進にあることを明らかにできるにとどまった。今後はこれらの形質に関わる標的遺伝子の探索が重要になってくる。全般を通して、ポリ A 鎖長を介した転写後調節に関する最初の論文を発表できたこと、および予期しなかった *atccr4* 二重変異株の新しい形質を見出すことができたことなど、今後の研究の足場となる知見を数多く得られたことは評価に値すると考える。

■ 研究の進め方

独立した研究室を立ち上げて 5 年目というところで、さきがけ研究を開始することになり、RNA 研究に必須の機器の導入や研究補助員の雇用などにより、研究室をより効率的に運営することができた。

■ 研究成果の科学技術および社会・経済への波及効果

本研究は二酸化炭素の資源化に有用と思われる形質をもつ *atccr4* 二重変異株を分子レベルで理解するという基礎研究を通して、植物に有用な形質をもたらす新しいアプローチを構築するための基盤となる知見を得ることを目指している。研究はまだ半ばであるが、ポリA鎖長制御を介した転写後調節が植物の成長制御のいろいろな側面で働いていることが示唆されたことは、今後、この研究を続けることで転写制御を中心とした遺伝子発現制御の研究分野に新たなコンセプトをもたらすと考える。また、転写制御の知見と合わせて総合的に遺伝子発現制御を理解すれば、二酸化炭素資源化に向けてより効率よく植物を改変できるかもしれない。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

千葉氏は、本研究でポリA分解酵素の機能を明らかにし、本酵素の利用によって、二酸化炭素資源化につながる方策を考案することを目指した。その結果、標的遺伝子を明らかにするなど、一定の成果が出ている。しかし、当初目的である、ショ糖過剰耐性やバイオマスの相加に関連する標的遺伝子は未発見であるのは残念である。そのなかで、AtCCR4 が概日時計と関わりがあることはきわめて興味深いと思われる。時計遺伝子の広範な作用に、本研究の成果がどのようにかかわってくるか、注目してみたい。そのためには、その方面の研究者との共同研究なども積極的に進め、本研究成果を発展させる研究に挑戦して欲しい。その延長上に、二酸化炭素資源化に貢献できる研究成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Suzuki, Y., Arae, T., Green, P. J., Yamaguchi, J., Chiba, Y.* AtCCR4a and AtCCR4b are involved in determining the poly(A) length of *Granule-bound starch synthase 1* transcript and modulating sucrose and starch metabolism in *Arabidopsis thaliana*. (2015) *Plant Cell Physiol.*, 56: 863-874.
2. Chiba, Y.*, Mineta, K., Hirai, Y. M., Suzuki, Y., Kanaya, S., Takahashi, H., Onouchi, H., Yamaguchi, J., and Naito, S. Changes in mRNA stability associated with cold stress in *Arabidopsis* cells. (2013) *Plant Cell Physiol.*, 54: 180-194.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

■ 国内学会

1. 鈴木 悠也, Pamela J. Green, 山口 淳二, 千葉 由佳子, 脱アデニル化酵素 AtCCR4 はシ



ヨ糖代謝を負に制御する, 第 54 回日本植物生理学会年会, 平成 25 年 3 月 21 日~23 日,
(口頭発表)

2. 鈴木 悠也, 平井 優美, Pamela J. Green, 山口 淳二, 千葉 由佳子, **植物の糖代謝に關与する脱アデニル化酵素 AtCCR4 の解析**, 第 15 回日本 RNA 学会年会, 平成 25 年 7 月 24~26 日, 愛媛県県民文化センター, 松本 (ポスター発表)
3. 鈴木 悠也, 以西 史織, 荒江 星拓, 峯田 克彦, 平井 優美, 山口 淳二, Pamela J. Green, 内藤 哲, 千葉 由佳子, **環境変化に適応するための mRNA 分解制御**, 第 55 回日本植物生理学会年会, 平成 26 年 3 月 18 日~20 日, 富山大学, 富山 (口頭発表)
4. 鈴木 悠也, 平井 優美, Pamela J. Green, 山口 淳二, 千葉 由佳子, **Arabidopsis deadenylases, AtCCR4a and AtCCR4b play an important role in determining the poly(A) length of CCA1 and TOC1 transcripts.** 第 56 回日本植物生理学会年会, 平成 27 年 3 月 16 日~18 日, 東京農業大学・東京 (口頭発表)
5. 鈴木 悠也, 平井 優美, Pamela J. Green, 山口 淳二, 千葉 由佳子, **AtCCR4 による概日時計遺伝子のポリ A 鎖長制御の意義**, 第 17 回日本 RNA 学会年会, 平成 27 年 7 月 15 日~17 日, ライフオーツ札幌, 札幌 (口頭発表)

■ 国際学会

1. Yuya Suzuki, Masami Y. Hirai, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba, **Poly(A) specific ribonucleases, AtCCR4s are important for the starch metabolism.** The 24rd International Conference on Arabidopsis Research, June 24–28, Sydney Convention and Exhibition Centre, Sydney, Australia. (Poster presentation)
2. Yuya Suzuki, Masami Y. Hirai, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba, **Involvement of Arabidopsis Deadenylases, AtCCR4a and AtCCR4b in Sugar Metabolism,** Post-transcriptional Gene Regulation in Plants, July 25–26, 2013, Rhode Island Convention Center, Providence, USA (Oral presentation)
3. Yukako Chiba, **Control of mRNA Degradation Associated with Stress Responses in Arabidopsis,** July 29, 2013, Delaware Biotechnology Institute, Delaware, USA, (Oral presentation)
4. Yuya Suzuki, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba, **AtCCR4s degrade the poly(A) tail of GBSS1 mRNA which is responsible for amylose synthesis.** Post-transcriptional Gene Expression Regulation in Plants. June 30–July2, 2014, Collegium Biologicum UAM, Poznan (Poster presentation)

■ **学会・分科会・研究会などの立ち上げ**

2013年に植物のRNA研究に携わる研究者によるネットワーク (Researcher's Network for Plant RNA in Japan; <https://www.sci.hokudai.ac.jp/~yukako/RNA/index.html>) を立ち上げた。ホームページにおける研究者間の情報交換や定例のシンポジウムの開催を行っている。

■ **共同研究**

AtCCR4 による概日時計遺伝子の発現調節に関する研究において、2015年度よりアメリカ Dartmouth 大学の Dr. McClung と共同研究を進めている。