

研究終了報告書

「植物におけるフィチン酸依存的な mRNA 核外輸送活性制御機構の解明」

研究期間: 2021 年 10 月～ 2024 年 3 月

研究者: 高木 大輔

1. 研究のねらい

細胞核内部で転写された mRNA は、核膜孔を通過して細胞質へ輸送されることでアミノ酸への翻訳過程に移行する。mRNA の核外輸送において、フィチン酸はヒトを含む動物や酵母、糸状菌などの真菌類において酵素の補因子として機能し、mRNA の核外輸送の活性化や、エピジェネティクス制御に関わるヒストン脱アセチル化、mRNA 編集酵素の活性制御など、重要な生理学的機能を持つことが発見されてきたが、植物において遺伝子発現制御に係るフィチン酸の生理学的機能は十分に理解できていない。

研究代表者は、これまでの研究によってイネ葉身のフィチン酸濃度の増加に伴って、葉身の総 mRNA 濃度が増加することを発見し、さらに動物で mRNA の核外輸送に関わると報告されているタンパク質と類似性のあるイネのタンパク質をコードする遺伝子の発現量が、同条件下で低下する事を見出した。この萌芽的な研究成果から、植物細胞における mRNA の核外輸送活性に対するフィチン酸依存的なフィードバック制御機構があることを発想した。本研究課題では、フィチン酸に依存する mRNA の核外輸送活性制御機構を分子レベルで明らかにし、植物の RNA 代謝においてフィチン酸が持つ新規生理学的意義を解明することを目的とする。

本研究の遂行によって、植物における遺伝子発現制御因子としてのフィチン酸の新しい価値を見いだす。さらに、mRNA の核外輸送活性制御に係る分子機構を解明し、核膜孔を介した mRNA の時空間的制御によってタンパク質翻訳の On-Off 制御を可能とする全く新しいバイオテクノロジーを開発するための基盤を形成する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、陸上植物のリン酸獲得量の増加に伴って観測される葉身のフィチン酸と mRNA の量的な相関関係を明らかにすることで、真核生物における mRNA の核外輸送活性制御機構と当該制御に関わるフィチン酸の全く新しい生理学的役割を解明することを目的とした。

研究代表者の先行研究 (Takagi et al., 2020 *Plant Cell Environ.*) に基づいて、無機リン酸 (Pi) の施肥量を変えた水耕栽培条件でイネを栽培し、葉身におけるフィチン酸量を変動させた。その結果、葉身のフィチン酸量の増加に伴って、ポリ A テールを持つ mRNA が核に局在することが明らかになった。この結果は、「mRNA の核外輸送が抑制される」という、最も重要な本 ACT-X 研究における仮説の立証に成功したことを示唆する。また、定量的に mRNA の核内蓄積量を評価できるオリジナルパラメータ (mRNA encapsulation in the nucleus) を作成した。その結果、葉身にフィチン酸が蓄積した際に観測された mRNA 濃度の増加が、mRNA の核内における集積に起因する可能性を定量的に示すことに成功した。

mRNA が核内に蓄積する場合、細胞質におけるタンパク質への翻訳過程が進行しないことが想定される。この可能性を検証するために、葉身における総 RNA 濃度とタンパク質濃度の

相関関係を解析した。その結果、リン酸の施肥量によって葉身のフィチン酸濃度を変動させた場合には、総 RNA 濃度とタンパク質濃度の間には負の相関関係を見出すことに成功した。一方で、窒素の施肥量を変動させることで葉のタンパク質濃度を変えた場合には、総 RNA 濃度をタンパク質濃度の間に正の相関関係が確認された。

葉において mRNA の核外輸送が抑制される分子メカニズムを明らかにするために、フィチン酸蓄積条件とコントロール条件下で生育させたイネ生葉由来の mRNA とイネ培養細胞由来の mRNA を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、コントロール条件と比較してフィチン酸蓄積条件で発現量が有意に変動し、且つ両実験材料に共通した挙動を示す遺伝子を合計で 29 個明らかにすることができた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「*in vivo* におけるフィチン酸依存的な mRNA 輸送活性のフィードバック能力の数値化」

イネ(品種:ノヒカリ)を低リン酸条件、通常リン酸条件、3 倍量リン酸条件、5 倍量高リン酸条件の水耕栽培条件下において栽培を行った。mRNA の poly A テールを認識する *in situ* ハイブリダイゼーション用の蛍光プローブを用いて、細胞内における mRNA の局在箇所、および核内における mRNA の蓄積量を共焦点レーザー顕微鏡によって観察を行った。その結果、低リン酸条件下では、poly A テールを含む mRNA がほとんど検出されなかったのに対して、リン酸施肥量を増加させると核を示す球状のシグナルが細胞質などのバックグラウンドの蛍光強度に対して増加することが確認された。この結果は、高リン酸条件下で生育させたイネ生葉内の mRNA が核内に高度に集積されていることを示唆している。

in situ ハイブリダイゼーションによって得られた核内 poly A テールの蓄積が、mRNA の核外への輸送活性が低下したことに起因するかどうかを明らかにするために、mRNA 濃度の増加が確認されたイネの葉身を細断し、転写阻害剤であるアクチノマイシン D を含む溶液に浸した。アクチノマイシン D 溶液内でのインキュベーション時間を 5 分、10 分、30 分、60 分と振り分け、その後、FAA 固定液により固定操作を行った。当該サンプルを、poly A テールを含む *in situ* ハイブリダイゼーションの解析に供した。しかし、インキュベーション時間に応じた poly A テールに由来する蛍光シグナルの経時的な変化は確認されなかった。これにより、転写活性を抑制してからの蛍光シグナル減衰による mRNA の核外輸送活性の速度的評価は行うことができなかった。

フィチン酸の蓄積する条件下において mRNA の核外輸送活性が受ける影響を定量的に明らかにするために、*in situ* ハイブリダイゼーションによる poly A テールの蛍光強度から、細胞内における mRNA の蓄積量を解析した。具体的には、核を横断する面における蛍光シグナル強度を数値データとして抽出し、ベースラインに相当する細胞質由来の蛍光シグナル値とピークに由来する核由来の蛍光値を獲得し、下記の計算式によって研究代表者オリジナルの mRNA の核内蓄積量を示すパラメータを算出した。

$$mRNA \text{ encapsulation in the nucleus} = \frac{\text{蛍光値(核由来)} - \text{蛍光値(細胞質由来)}}{\text{蛍光値(細胞質由来)}}$$

この解析の結果、フィチン酸の蓄積する条件下では mRNA が核内に集積している事実を定量的に示すことに成功し、mRNA の核外輸送活性が当該条件下では低下する可能性を示した。

研究テーマ B 「フィチン酸で mRNA の核外輸送制御を受ける遺伝子群の解明と、その共通構造の決定」

イネを通常リン酸条件と 5 倍量高リン酸条件の水耕栽培条件下において栽培し、葉から抽出した総 RNA を RNA-seq 解析に供した。その結果、通常リン酸条件と比較して 5 倍量高リン酸条件において、統計学的に有意に発現量が増加した遺伝子を 2302 遺伝子と有意に発現量が低下した遺伝子を 971 遺伝子明らかにすることができた。

また、根圏のリン酸量の変動が Mg^{2+} 等の金属イオンの吸収量にも影響を与えるため、リン酸施肥量に応じた mRNA 蓄積量の変動はフィチン酸以外の因子も影響を与える可能性がある。これを克服する為に、野生型イネから作成した培養細胞においてもリン酸付与量を通常リン酸濃度条件と高リン酸濃度条件変えることで細胞質のフィチン酸濃度を変化させ RNA-seq 解析を実施した。その結果、高リン酸濃度条件において統計学的に有意に発現量が増加した遺伝子を 144 遺伝子と有意に発現量が低下した遺伝子を 1131 遺伝子明らかにすることができた。

研究テーマ C 「フィチン酸依存的な mRNA 核外輸送のフィードバック制御因子の同定」

突然変異処理を行った M2 世代イネを 5 倍量高リン酸条件で生育させ、葉身の総 mRNA 濃度を定量した。しかしながら、当初の予定であった葉身の mRNA 濃度が増加しない変異体の単離には、至らなかった。

一方で、研究テーマ B で獲得したイネ葉身とイネの培養細胞の RNA-seq データから、両実験サンプルにおいて共通して、フィチン酸蓄積条件下で発現量が低下する遺伝子を 23 種類、発現量が増加する遺伝子を 6 種類単離することができた。これら遺伝子をフィチン酸依存的な mRNA 核外輸送のフィードバック制御因子の候補とした。

研究テーマ D 「イネを用いた Pi 施肥量に依存した細胞内 RNA 濃度変化に対するタンパク質翻訳活性評価」

mRNA が核内に蓄積する場合、細胞質におけるタンパク質への翻訳過程が進行しないことが想定される。この可能性を検証するために、葉身における総 RNA 濃度とタンパク質濃度の相関関係を解析した。その結果、リン酸の施肥量によって葉身のフィチン酸濃度を変動させた条件下では、総 RNA 濃度とタンパク質濃度の間に負の相関関係を見出すことに成功した。一方で、窒素の施肥量を変動させることで葉のタンパク質濃度を変えた場合には、葉身におけるタンパク質量が増加することが知られている。この知見をもとに、水耕栽培における窒素の施肥濃度を変化させてイネを栽培し、葉身の総 RNA 濃度とタンパク質濃度の関係を解析した。その結果、総 RNA 濃度をタンパク質濃度の間に正の相関関係が確認された。この結果から、リン酸の施肥量によって葉身の総 RNA 濃度が増加した場合には、通常のセントラルドグマにおける mRNA の転写から翻訳の過程において、未知の律速段階が生じている可能性が示唆された。また、当該生理現象は、イネの培養細胞を異なるリン酸濃度および窒素濃度で培養した場合にも観察されることを見出している。研究代表者の高リン酸施肥条件下における mRNA の

核内蓄積応答を基盤に考察すると、これらの結果は、mRNA の細胞質への輸送が抑制されることによって翻訳の過程が進行しにくい状況になっていることを示唆しているものと考えている。

3. 今後の展開

本 ACT-X 研究の遂行によって、植物がリン酸の施肥量に応じて mRNA を核内に集積させる事実を明らかにすることに成功し、さらに当該生理応答がタンパク質の翻訳活性に影響する可能性を示すことができた。また、mRNA の核外輸送が抑制される条件下において、発現量が変わる遺伝子を見出すこともできた。現在は、それらのイネ遺伝子と相同性を持つシロイヌナズナ遺伝子の遺伝子破壊株を取得しており、それらの遺伝子の破壊が mRNA の核外輸送活性に与える影響を解析している。本 ACT-X 研究で得られた研究成果と、それに続く研究の遂行によって、学術論文による知見の公表を継続的に進めていき、将来的には本研究課題の最大の目的である mRNA の核外輸送活性制御因子を同定したい。一方で、フィチン酸自体が、mRNA の核外輸送活性を制御する化合物であるかどうかを決定するには至らなかった。しかしながら、研究代表者は本研究期間中においてイネのフィチン酸合成関連遺伝子の過剰発現株や遺伝子破壊株の作成に成功している。今後は、これらの遺伝子組換え株を用いて、フィチン酸が直接的な mRNA の核外輸送活性の制御因子であるかどうかについても検討を続けていく。

これらの研究活動を通じて、植物分野における mRNA の核外輸送活性制御機構というセントラルドグマの過程における核膜孔を介した物理的な翻訳制御という学問分野を継続的に開拓していきたいと考えている。そして、その知見を使用することで、これまでの転写活性に依存した遺伝子発現制御とは全く異なる真核生物のタンパク質翻訳制御技術の開発につなげ、有用物質や有用酵素の産生技術に関わるバイオテクノロジー創出に貢献したい。

4. 自己評価

本研究では、mRNA 核外輸送活性に対するフィチン酸依存的なフィードバック制御機構を分子レベルで明らかにし、植物の RNA 代謝においてフィチン酸が担う新規生理学的意義の解明を目的とした。ACT-X の研究開始時には、葉身の mRNA 濃度が増加するという予備的な実験結果しか持ち合わせていなかったが、ACT-X「環境とバイオテクノロジー」領域の援助を受けたことによって、「mRNA の核外輸送が抑制される」という研究代表者の最も重要な仮説の検証に成功したと考えている。また、mRNA の核外輸送活性に与える影響を定量的に解析するという期間内目標に関しても、画像を用いた独自の評価方法を提案できたことから、概ね目標に沿った成果を得ることができたと考えている。

一方で、mRNA の核外輸送活性の制御にフィチン酸がどのように関与するかという具体的な因果関係は明示するに至っていない。しかしながら、アドバイザーの先生方や他の ACT-X 研究者とのディスカッションを通じて、両者の関係を証明するまでのアイデアを多数得ることができており、今後それらを地道に検証することによって、フィチン酸と mRNA の核外輸送との間の因果関係について学術的に公表したいと考えている。

当該研究活動により得られる成果は、ACT-X 研究提案当初から創案している mRNA の核外輸送における On-Off 制御システムを構築し、遺伝子の発現量を変化させることなく *in vivo*

のタンパク質量を操作できる新しいバイオテクノロジーの開発に貢献できると考えている。

ACT-X 期間中には、多くの同世代の若手研究者とコミュニケーションをとる機会に恵まれていたことで有機的に他分野の実験方法に関する知見が融合し、当初研究代表者の考案した研究計画が発展的かつ加速的に進行したと考えている。具体的には、イネの培養細胞を使用することや、細胞核自体を単離する手法、さらにはタンパク質の翻訳活性の解析手法など、これまでの研究代表者の分野だけでは得られなかった技術と発想の獲得ができたことは非常に有意義であった。また、相互の得意分野を生かした共同研究も開始できており、長期的なスパンにおいて今後一層の研究成果が生まれることが期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. ***Daisuke Takagi** and Saya Tani. Impact of growth light environment on oxygen sensitivity in rice: Pseudo-first-order response of photosystem I photoinhibition to O₂ partial pressure. *Physiologia Plantarum* (2023) 175, e14009, DOI: <https://doi.org/10.1111/ppl.14009> (* Corresponding author)

陸上植物における光合成電子伝達の駆動は、光化学系 I における活性酸素種の生成の危険性を伴う。しかしながら、光化学系 I における活性酸素種の生成について速度論的に解析した研究は乏しかった。本論文ではイネの生葉を用いて、光合成駆動時の光化学系 I における活性酸素生成速度をモデル式によって近似し、活性酸素生成速度を決定する因子の同定に成功した。

2. ***Daisuke Takagi**, Kentaro Ifuku, Wataru Yamori, Masaru Kono, Tomokazu Ushijima, Amane Makino. Light-harvesting activity is targeted by photosystem I photoinhibition in rice plants irrespective of photosystem I photoinhibitory treatments. *Authorea* (2022) DOI: 10.22541/au.166935692.25627459/v1. (* Corresponding author)

陸上植物は、生育する光環境に応じて葉緑体チラコイド膜上の存在する光化学系 II の集光性タンパク質量を制御する機能を有する。一方で、光化学系 I における集光性タンパク質量は、その量が生育する光環境に応じて変動するかどうかについては明確な知見が未だ存在していない。本論文では、イネの生葉を用いて非侵襲的に光化学系 I における集光性タンパク質量を推定する手法を開発し、光化学系 I の集光性色素タンパク質量も生育光強度に応じて制御されることを明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(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)

1. **高木大輔** 高リン酸施肥に対するイネ生葉の mRNA 核外輸送活性抑制応答 近畿植物学会 第 12 回講演会 2023 年 12 月 2 日

2. 高木大輔 イネ生葉において高リン酸施肥時に観測される mRNA 核内内包応答 日本
土壌肥料学会 2023 年度愛媛大会 2023 年 9 月 12 日

3. Daisuke Takagi How does photosystem I modulate its robustness to photoinhibition in
terrestrial plants?—The light acclimation response in PSI-LHCI in terrestrial plants—
Symposium of light harvesting processes: new developments in biophysics, biochemistry and
nanotechnology in University of Leeds 2023 年 8 月 17 日(招待講演)

4. 高木大輔 植物の細胞核における mRNA の内包応答 なぜ mRNA を核外に出したく
ないのか? ACT-X 合同セミナー 2023 年 5 月 12 日(招待講演)

5. Daisuke Takagi Does a large amount of mineral nutrients secure crop production? –
Molecular mechanisms of manganese toxicity in crop plants—International Symposium on
Sustainable crop production and biosciences 2023 年 2 月 22 日 (招待講演)

6. *Daisuke Takagi. Manganese toxicity and tolerance in photosynthetic organisms and
breeding strategy for improving manganese tolerance in crop plants: Physiological and omics
approach perspectives In M.A. Hossain, A.K.M. Zakir Hossain, S. Bourgerie, M. Fujita (Editor),
O.P. Dhankher (Eds.), Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: A Biological, Omics,
and Genetic Engineering Approach. (Chapter 7) Hoboken, NJ: Wiley. (Aug. 2023)