

トピックス

植物の葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの 選択的スプライシング制御機構の解明に向けて

Toward elucidating the mechanisms that regulate the alternative splicing events producing chloroplastic ascorbate peroxidase isoforms in plants

植物の葉緑体は光合成を行う場であるとともに、主要な活性酸素種 (ROS) の発生源でもある。光合成明反応の光化学系装置や暗反応 (CO₂ 固定) に関わる酵素のいくつかは低濃度の ROS により容易に酸化/失活する。そのため、アスコルビン酸を電子供与体として、ROS の一種である過酸化水素 (H₂O₂) を無毒化する反応を触媒する酵素、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) を中心とした ROS 代謝系が発達している。すなわち、光合成電子伝達系において H₂O の酸化により生じた電子の一部は O₂ を還元し、スーパーオキシドラジカル (O₂⁻) が発生する。O₂⁻ はチラコイド膜に局在するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) により O₂ と H₂O₂ に不均化され、続いてチラコイド膜結合型 APX (tAPX) により H₂O₂ は H₂O へと無毒化される。また、チラコイド膜から逃れた O₂⁻ はストロマに局在する SOD およびストロマ型 APX (sAPX) により H₂O へと無毒化される¹⁾⁻⁵⁾。このように、葉緑体内ではチラコイド膜上とストロマで、ROS に対する二重の防御システムが構成されている。また、APX の反応により生成する酸化型アスコルビン酸はアスコルビン酸還元酵素群などにより、H₂O 由来の電子を用いて再還元される。これら一連の反応により、H₂O から生じた電子は H₂O へと戻ることになり、電子の収支はゼロである。したがって、これらの代謝経路は Water-Water サイクルと呼ばれ、余剰還元力の安全な消去にも働いている¹⁾。すなわち、葉緑体内における高濃度 (mM オーダー) のアスコルビン酸および tAPX と sAPX の存在が光合成の健全性維持や、適切な ROS シグナルの発信を通じた環境ストレス応答の根幹である。

これまでに、ホウレンソウにおいて葉緑体型 APX アイソフォームはひとつの遺伝子 (APXII) にコードされ、選択的スプライシング (AS) によって合計 4 種類の成熟型 mRNA 産物、すなわち sAPX をコードする

sAPX-I, sAPX-II, および sAPX-III mRNA と tAPX をコードする tAPX-I mRNA を生成していることが明らかになっている (図 1)³⁾⁶⁾。一般的に、AS は前駆体 mRNA 上に存在するシス配列に、トランス因子が特異的に結合することによって制御される⁷⁾⁸⁾。APXII 遺伝子の AS においても、イントロン 12 の 3' 側に存在する AT リッチな配列である splicing regulatory element (SRE) と名付けたシス配列の存在が明らかになった。つまり、この SRE にトランス因子が結合することで、イントロン 11 よりもイントロン 12 の AS 効率が上昇し、tAPX-I mRNA の生成量が増加する³⁾。

近年の大規模 DNA シークエンス技術の発達により、多様な生物種における AS 産物の存在が明らかになっているが、植物の AS は他生物種と比べてかなりの相違があり、様々な環境に応答するために AS を独自に進化させ、利用してきていると考えられている⁹⁾⁻¹¹⁾。しかし、その相違のため、動物での研究結果を単純に植物に反映できず、逆遺伝学的な手法が難しい。さらに、植物では *in vitro* でのスプライシング解析系が確立されていない。そのため、植物特有のトランス因子についてはほとんど明らかになっておらず、APXII 遺伝子の SRE に結合して AS 制御に関わるトランス因子も不明なままであった。そのような状況下で最近筆者らのグループは、独自に工夫した遺伝学的スクリーニング手法を確立し、葉緑体型 APX の AS 制御因子の同定を試みたので紹介したい¹²⁾。

データベース解析の結果、ホウレンソウ葉緑体型 APXII 遺伝子と同様の AS 機構はカボチャ、アイヌランタ、タバコ、ダイズなどの多様な真正双子葉植物にも認められた。一方、バナナ、トウモロコシ、セイヨウアブラナ、ジャガイモなどに加え、モデル植物として利用され、遺伝子情報や実験系が豊富なイネ、シロイヌナズナ、トマトは葉緑体型 APX アイソフォー

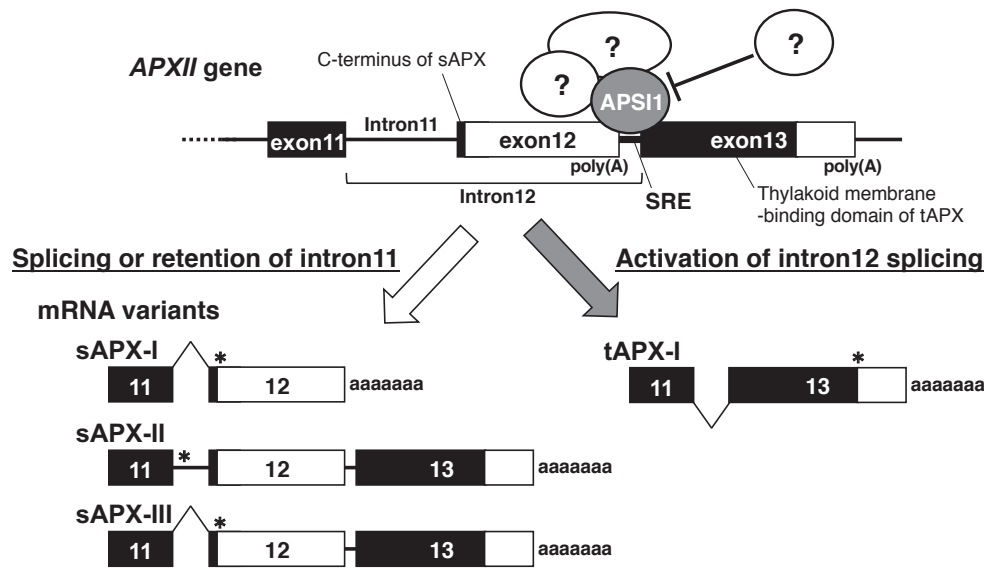


図1 APXII 遺伝子の AS 機構と APSII による AS 制御のモデル

ホウレンソウの葉緑体型 *APXII* 遺伝子の 3' 末端領域(エキソン 11-13)の構造と AS により生成する成熟型 mRNA の構造を示す。葉緑体型 *APXII* 遺伝子のイントロン 1~10 は構成的にスプライシングされるが、イントロン 11 もしくは 12 の AS とエキソン 12 もしくは 13 末端の選択的ポリアダニル化により、3 種類の sAPX およびチラコイド膜結合ドメインを翻訳領域とする 1 種類の tAPX mRNA が生成する。APSI が SRE 配列に結合することで、イントロン 12 の AS 効率が促進し、tAPX-I mRNA の生成量が増加する。四角：エキソン，線：イントロン，*：終止コドン，poly(A)：ポリ A シグナル，白：非翻訳領域。

ムを個別の遺伝子領域から生成していた。しかし、恒常のプロモーターの下流にホウレンソウ *APXII* 遺伝子の AS 領域であるエキソン 11 から 13 を連結した遺伝子をシロイヌナズナに形質転換したところ、ホウレンソウと同じように 4 種類全ての成熟型 mRNA の生成が確認できた¹²⁾。この結果は、SRE を介した AS 機構が植物間で広く保存されていることを示唆しており、シロイヌナズナが葉緑体型 APX の AS 機構の解析に利用できることを意味していた。

そこで、ホタルルシフェラーゼをコードする *Fluc* cDNA を分断する形でホウレンソウ *APXII* 遺伝子のイントロン 11 から SRE までを挿入したキメラ遺伝子を構築し、シロイヌナズナに形質転換した (*APXII-Fluc* 株)。本遺伝子から生成する前駆体 mRNA はホウレンソウ *APXII* 遺伝子と同様に AS され、3 種類の成熟型 mRNA (sAPX-II, sAPX-III および tAPX-I 型) を生成するが、それらの中で tAPX-I 型に AS された mRNA のみが、完全長の *Fluc* タンパク質をコードしている。すなわち、本株では tAPX-I 型の AS 効率をルシフェラーゼの発光量として非破壊的にモニタリングすることができる。そこで、*APXII-Fluc* 株をエチルメタンホルン酸処理することで変異株を作製し、ルシフェラーゼ

発光量を指標にスクリーニングを行った¹²⁾。その結果、約 20,000 株の M2 株から発光抑制株を 9 株 (*apsi1*, 3~9) 単離した。*APXII-Fluc* 株と戻し交配した F2 株の表現型から、*apsi1* 株は単一の劣性変異を有していることが示唆された。次世代シーケンス解析の結果、*apsi1* 株では第 5 染色体の 17 Mbp 付近に多数の変異が検出され、そのうちひとつの遺伝子 (*APSI1*) のエキソン 1 末端付近に、ナンセンス変異の原因となる C から T への置換が認められた。*apsi1* 株に未変異の *APSI1* 遺伝子を導入した結果、表現型が回復した。そこで、ホウレンソウ *APXII* 遺伝子のエキソン 11 から 13 を導入したシロイヌナズナ野生株 (WT/*APXII*) および *APSI1* 遺伝子破壊株 (KO-*apsi1/APXII* 株) における各 AS 産物量を解析した。その結果、KO-*apsi1/APXII* 株では WT/*APXII* 株よりも tAPX-I mRNA 量が低下していた。一方で、*APSI1* を過剰発現するシロイヌナズナ株に *APXII* 遺伝子を導入した (*APSI1ox/APXII* 株) 結果、tAPX-I mRNA 量が増加していた。これらの結果から、*APSI1* 遺伝子の変異が *apsi1* 株の表現型の原因であり、*APSI1* は tAPX-I mRNA 生成のためのイントロン 12 の AS の促進因子であることが明らかになった (図 1)¹²⁾。

APSI1 は Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding (OB)-

fold protein をコードしている。これまでに、OB-fold protein に含まれる OB-fold ドメインはタンパク質間およびタンパク質と DNA または RNA との相互作用に関与すること、および本ドメインを含むタンパク質はスーパーファミリーを構成し、DNA の複製および修復、転写、翻訳、低温ストレス応答、またはテロメアの維持などに関与することが報告されている¹³⁾¹⁴⁾。また最近、本ドメインを有する RNA ヘリカーゼ A がウイルスの RNA スプライシングの制御に関与していることが報告された¹⁵⁾¹⁶⁾。したがって、APSI1 は APXII 遺伝子の AS 制御に直接関与している可能性がある。

上述のように、APXII 遺伝子の AS は SRE によって制御されており、そこに特異的に結合する核タンパク質の存在が示唆されている³⁾。そこで、APSI1 組換えタンパク質と SRE 配列を含む合成 RNA を用いて、*in vitro* でのゲルシフトアッセイを行った¹²⁾。その結果、APSI1 は SRE と特異的に複合体を形成したが、変異した SRE とは結合しなかった。これらのことから、APSI1 は SRE に配列特異的に結合することが明らかになった(図 1)。

APSI1 が APXII 遺伝子の AS 制御に関与している場合、他のスプライシング因子と共に核に局在すると考えられる。そこで、APSI1 と GFP との融合タンパク質を発現させたシロイヌナズナを用いて、細胞内局在性を解析した¹²⁾。その結果、融合タンパク質由来の蛍光シグナルは核内に、特に核小体様の領域に強く検出された。これまでに、RNA や DNA の代謝に関わる複数の因子が核小体に局在することが明らかになっている¹⁷⁾¹⁹⁾。また、核小体は様々な酵素が核内で機能する必要が生じるまでの貯蔵場所であると報告されている²⁰⁾。これらのことから、APSI1 の核内局在性は AS 制御機構の要求にตอบสนองして変化している可能性があると考えられた。

ここまでの実験に用いたシロイヌナズナは sAPX と tAPX を個別の遺伝子領域から生成するため、APXII 遺伝子の AS 制御における APSI1 本来の役割を明らかにすることができない。そこで以降では、ホウレンソウと同様に葉緑体型 APX を AS によって生成するモデル植物のタバコを実験材料に用いた。データベース検索の結果、タバコには APSI1 と相同性の高い 2 つの遺伝子 (*NtAPSI1-1*, *NtAPSI1-2*) が認められた¹²⁾。タバコは複二倍体であるため、両者は遺伝子重複により生じたと考えられた。そこで、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によって、*NtAPSI1-1* および *NtAPSI1-2* を同時に機能欠損させたタバコ株を作出し、内在性の APXII 遺伝子の AS に及ぼす影響を解析した¹²⁾。その結果、野生株と比較してゲノム編集株では tAPX-I mRNA 量が

減少していた。以上より、APSI1 は植物界に広く分布しており、葉緑体型 APX 遺伝子の SRE を介した AS の制御因子のひとつであることが明らかになった。

これまでに、ホウレンソウおよびタバコにおける APXII 遺伝子の AS は組織特異的に制御されることが報告されている³⁾。すなわち、チラコイド膜がないアミロプラストを有する根ではイントロン 12 より 11 のスプライシングが優先され、sAPX (sAPX-I ~ III) mRNA が生成するが、葉では SRE にトランス因子が結合することで、イントロン 12 の AS 効率が促進し、tAPX-I mRNA の生成効率が上がる。しかし、APSI1 の発現量はシロイヌナズナやタバコの葉と根において同程度であり、tAPX-I mRNA の AS 効率の変化と一致しなかった¹²⁾。これらの結果から、APSI1 は APXII 遺伝子の AS の組織特異的な制御に関与しないことが示された。また、シロイヌナズナやタバコにおいて、APSI1 遺伝子を完全に破壊しても tAPX-I mRNA の生成が完全に抑制されなかった¹²⁾。これらの結果は、APSI1 が APXII 遺伝子の AS 制御における決定的な因子ではないことを示唆している。すなわち、葉での APXII 遺伝子の AS 効率の維持には APSI1 が必要であるが、APSI1 以外にも tAPX-I mRNA 生成の AS 効率促進に働く因子の存在が示唆され、根では APSI1 の作用を競合的に阻害する因子が存在すると考えられた(図 1)。これらの結果は植物の AS 制御の複雑性を暗示するものである。今後、APSI1 のシロイヌナズナやタバコの他の遺伝子の AS への役割や、*apsi1* 株以外の変異株の原因遺伝子の機能を明らかにすることにより、APXII 遺伝子の AS 制御メカニズムの全容のみならず、植物界における AS 制御機構の普遍性や進化過程を明らかにすることができると思われる。

Key words : vitamin C, ascorbic acid, ascorbate peroxidase, alternative splicing, oligonucleotide/oligosaccharide-binding-fold protein

Department of Food and Nutritional Science, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan

Kanako Suzuki, Kazuya Yoshimura

中部大学応用生物学部食品栄養科学科

鈴木 花奈子, 吉村 和也

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2022.9.30 受付)

文 献

- 1) Asada K (1999) THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 601–639
- 2) Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* **53**, 1305–1319
- 3) Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2002) Identification of a cis element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *J Biol Chem* **277**, 40623–40632
- 4) Maruta T, Sawa Y, Shigeoka S, Ishikawa T (2016) Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiol* **57**, 1377–1386
- 5) Kameoka T, Okayasu T, Kikuraku K, Ogawa T, Sawa Y, Yamamoto H, Ishikawa T, Maruta T (2021) Cooperation of chloroplast ascorbate peroxidases and proton gradient regulation 5 is critical for protecting Arabidopsis plants from photo-oxidative stress. *Plant J* **107**, 876–892
- 6) Yoshimura K, Yabuta Y, Tamoi M, Ishikawa T, Shigeoka S (1999) Alternatively spliced mRNA variants of chloroplast ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach leaves. *Biochem J* **338**, 41–48
- 7) Reddy AS, Shad Ali G (2011) Plant serine/arginine-rich proteins: roles in precursor messenger RNA splicing, plant development, and stress responses. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 875–889
- 8) Li J, Li G, Qi Y, Lu Y, Wang H, Shi K, Li D, Shi J, Stovall DB, Sui G (2021) SRSF5 regulates alternative splicing of DMTF1 pre-mRNA through modulating SF1 binding. *RNA Biol* **18**, 318–336
- 9) Laloum T, Mart_in G, Duque P (2018) Alternative splicing control of abiotic stress responses. *Trends Plant Sci* **23**, 140–150
- 10) Chaudhary S, Khokhar W, Jabre I, Reddy ASN, Byrne LJ, Wilson CM, Syed NH (2019) Alternative splicing and protein diversity: plants versus animals. *Front Plant Sci* **10**, 708
- 11) Punzo P, Grillo S, Batelli G (2020) Alternative splicing in plant abiotic stress responses. *Biochem Soc Trans* **48**, 2117–2126
- 12) Yamada M, Suzuki K, Tanabe N, Suzuki T, Nishizawa-Yokoi A, Shigeoka S, Yoshimura K (2022) An oligonucleotide/oligosaccharide-binding-fold protein enhances the alternative splicing event producing thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase in *Nicotiana tabacum*. *G3 (Bethesda)* **12**, jkac169
- 13) Theobald DL, Mitton-Fry RM, Wuttke DS (2003) Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 115–133
- 14) Amir M, Mohammad T, Dohare R, Islam A, Ahmad F, Imtaiyaz Hassan M (2020) Structure, function and therapeutic implications of OB-fold proteins: lesson from past to present. *Brief Funct Genomics* **19**, 377–389
- 15) Xing L, Niu M, Kleiman L (2014) Role of the OB-fold of RNA helicase A in the synthesis of HIV-1 RNA. *Biochim Biophys Acta* **1839**, 1069–1078
- 16) Shi R-Z, Pan Y-Q, Xing L (2021) RNA Helicase A regulates the replication of RNA viruses. *Viruses* **13**, 361
- 17) Vascotto C, Fantini D, Romanello M, Cesaratto L, Deganuto M, Leonardi A, Radicella JP, Kelley MR, D'Ambrosio C, Scaloni A, Quadrifoglio F, Tell G (2009) APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process. *Mol Cell Biol* **29**, 1834–1854
- 18) Jobert L, Skjeldam HK, Dalhus B, Galashevskaya A, Vågbo CB, Bjørås M, Nilsen H (2013) The human base excision repair enzyme SMUG1 directly interacts with DKC1 and contributes to RNA quality control. *Mol Cell* **49**, 339–345
- 19) Iarovaia OV, Minina EP, Sheval EV, Onichtchouk D, Dokudovskaya S, Razin SV, Vassetzky YS (2019) Nucleolus: a central hub for nuclear functions. *Trends Cell Biol* **29**, 647–659
- 20) Lirussi L, Antoniali G, Vascotto C, D'Ambrosio C, Poletto M, Romanello M, Marasco D, Leone M, Quadrifoglio F, Bhakat KK, Scaloni A, Tell G (2012) Nucleolar accumulation of APE1 depends on charged lysine residues that undergo acetylation upon genotoxic stress and modulate its BER activity in cells. *Mol Biol Cell* **23**, 4079–4096