

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	植物における細胞質スプライシングの <i>in vitro</i> 再構成系の確立				
研究テーマ (欧文) AZ	In vitro reconstitution of plant cytoplasmic splicing				
研究氏 代表名 者	カナ CC	姓)イワタ	名)ユウジ	研究期間 B	2013 ~ 2014 年
	漢字 CB	岩田	雄二	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	Iwata	Yuji	研究機関名	大阪府立大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・助教				
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめて下さい。)	<p>従来から知られている核で起こる pre-mRNA スプライシングに加えて、細胞質で起こるスプライシング(細胞質スプライシング)が真核生物で広く保存されていることが近年明らかになってきた。細胞質スプライシングは小胞体に局在する RNase 活性を持つストレスセンサー分子 IRE1 による mRNA 切断と RNA リガーゼによる mRNA 連結反応からなり、スプライシングを受けた mRNA から活性型転写因子が翻訳され、分子シャペロン等をコードする遺伝子の転写が誘導される。高等植物においては転写因子 bZIP60 をコードする mRNA が細胞質スプライシングにより活性化され、正常な発達や熱ストレス応答などに重要であることが明らかにされている。本研究ではシロイヌナズナの精製 IRE1、RLG1 タンパク質と bZIP60 RNA を用いて細胞質スプライシングの <i>in vitro</i> 再構成系を確立し、その分子メカニズムを詳細に解析することを目的として研究を行った。</p> <p>シロイヌナズナゲノムにコードされる 2 つの IRE1 (IRE1A と IRE1B) の RNase ドメインを含む細胞質ドメインと、RNA リガーゼである RLG1 をクローニングし、大腸菌異種発現システムを用いて精製タンパク質を調製した。まず IRE1 を、T7 RNA Polymerase を用いた <i>in vitro</i> 転写システムにより調製した bZIP60 RNA と反応させたところ、IRE1A、IRE1B 共に bZIP60 RNA を切断する活性があることを見出した。23 塩基長のイントロンも検出されたことから、予想された二つの箇所で bZIP60 RNA が切断されていると考えられた。実際、予想切断箇所に塩基置換を導入することにより切断は起こらなくなったことから、IRE1 による特異的な切断が起こっていることが確かめられた。次に、IRE1 により切断された bZIP60 断片と精製 RLG1 を反応させたところ、新たな RNA が生成された。RT-PCR により cDNA を増幅・クローニング後、サンガーシーケンスを行ったところ、イントロンが除かれた bZIP60 RNA が生成していることが分かった。以上のことから、シロイヌナズナの細胞質スプライシングは精製 IRE1、RLG1 タンパク質、bZIP60 RNA により再構成できることが示された。本システムは植物の細胞質スプライシングの詳細な分子機構の解明に大きく役立つことが期待される。</p>				
キーワード FA	細胞質スプライシング	植物	Ribonuclease	RNA Ligase	

(以下は記入しないで下さい。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Cytoplasmic splicing is a mechanism conserved in eukaryotic cells that plays important roles in many physiological events. In the plant *Arabidopsis thaliana*, mRNA encoding the transcription factor bZIP60 is spliced by the endoplasmic reticulum (ER) transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 and the RNA ligase RLG1. To understand the molecular mechanism of cytoplasmic splicing in plants, we purified the cytoplasmic domain containing ribonuclease domain of IRE1 (cIRE1) and RLG1 expressed using bacterial expression system and tested their effect on bZIP60 RNA *in vitro*. We also prepared a partial bZIP60 RNA fragment containing two stem-loop structure necessary for cytoplasmic splicing using *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase. We found that purified cIRE1 cleaves bZIP60 RNA at positions that generate an intron of 23 nucleotide in length, consistent with our *in vivo* observation. We also found that mutations at the cleavage sites in bZIP60 RNA abolish the cleavage by cIRE1. We further demonstrated that purified RLG1 is able to join two fragments of cIRE1-cleaved bZIP60 RNA and generate the spliced form of bZIP60 RNA. This study is a first step to dissect the detailed molecular mechanism of cytoplasmic splicing in plants.