

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 10 年度博士課程 進学

氏 名 小口慶子

指導教官 高橋秀夫

論文題目 高等植物におけるテロメラーゼの解析

真核生物の染色体末端に存在するテロメア繰り返し配列は細胞分裂の度に短縮し、限界の長さに達した時点で細胞は分裂の寿命を迎える。しかし、ヒトの生殖細胞や癌細胞にみられるように、テロメア配列を伸長付加するテロメラーゼが発現した場合には分裂を繰り返してもテロメア DNA は短縮せず、細胞は無限に増殖を続けることが可能になる。細胞の老化や不死化、癌化に密接な関連を持つテロメラーゼには、生物学及び医学の分野において大きな関心が持たれている。

植物は動物と異なり、形態形成を行いながら生長し、生殖細胞系列も胚発生時ではなく生長の過程で形成される。数 1000 年以上も生長を続けている屋久杉の様な種が存在する様に、長期にわたり分裂能力を維持する必要がある植物の分裂組織において、テロメアの維持は不可欠であり、厳密な制御機構の存在が予測される。また、植物は茎や葉などの分化した組織からも簡単な操作により脱分化させ、再び個体を再生できるという特異な性質を持つ。この脱分化の際にテロメラーゼ活性も同時に発現するこ

とが知られており、その活性制御機構は動物細胞との差異を考慮する上で興味深い。植物におけるテロメラーゼに関する解析は動物や酵母にくらべ遅れており、テロメア伸長に関する機能の明確な遺伝子も単離されていなかった。こうした背景から、植物の分裂増殖に関する特異性に焦点をあて、テロメラーゼが果たす役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

本研究においてはモデル植物として繁用される双子葉植物のシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 及び単子葉植物のイネ *Oryza sativa* を材料とした。当研究室において、シロイヌナズナの培養細胞において高いテロメラーゼ活性が見いだされており、材料として適当であると考えられた。

(1) シロイヌナズナとイネにおける *TERT* 相同遺伝子の単離

テロメラーゼの作用機構は、一種の逆転写酵素である *TERT* (telomerase reverse transcriptase) が内在する RNA を鋳型にして行う伸長付加反応である。いずれの遺伝子も高等植物においては単離されていなかったため、シロイヌナズナの *TERT* 遺伝子を取得して解析を進めることにした。ヒトの *TERT* の配列をもとに、データベース上で相同遺伝子を検索した結果、シロイヌナズナ genomic BAC end sequence において約 600 bp の極めて相同性の高い配列を見いだした。この配列を利用して特異的なプローブを作製し、シロイヌナズナの培養細胞から調整した cDNA ライブラリーに対してスクリーニングを行った結果、1124 アミノ酸の蛋白質をコードする *orf* が得られ、*AtTERT* と命名した。高等植物において *TERT* 遺伝子が単離されたのは初めてのことである。*AtTERT* の配列をもとに、さらに検索を行った結果、イネ *Oryza sativa* の genomic BAC end sequence においても極めて相同性の高い約 500bp の配列を見いだした。イネの培養細胞から調節された cDNA ライブラリーに対してスクリーニングを行い、最長 1260 アミノ酸をコードする *orf* を得て、*OsTERT* と命名した。

AtTERT の分子量 131kDa、pI 9.9、*OsTERT* の分子量は 143 kDa、pI 9.6 であり、この値は既知の *TERT* と同様なものであった。また、*AtTERT*、*OsTERT* は他の *TERT*

同様、逆転写酵素に保存されている全てのモチーフと、TERT ファミリーに特異的に見いだされる T モチーフを保存していた。既知の TERT のアミノ酸配列をもとに系統樹を作製したところ、酵母、原生動物、高等真核生物の3つのグループに分類され、*AtTERT* 及び *OsTERT* が系統的にヒトとマウスの TERT に近縁であることが示された。

ヒトとマウスの TERT には Akt kinase によるリン酸化サイトが見いだされており、リン酸化による制御を受けている可能性が示唆されている。*OsTERT* にはこの保存領域が存在するが、*AtTERT* には見いだされなかった。また、得られた *OsTERT* のクローンを複数個解析したところ、N 末端の長さが異なるものが存在した。

AtTERT 遺伝子に特異的なプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、シロイヌナズナの *AtTERT* は他の TERT 遺伝子同様シングルコピーであることが示された。

(2) TERT 遺伝子の発現とテロメラーゼ活性

ヒトやマウスではテロメラーゼ活性が主に TERT 遺伝子の転写量に依存することが報告されている。そこで、シロイヌナズナの各組織を用い、TRAP 法によりテロメラーゼ活性を測定すると共に、RT-PCR 法により *AtTERT* 遺伝子の転写産物を定量した。その結果、細胞分裂が活発な培養細胞と茎頂分裂組織では、比較的高いテロメラーゼ活性と *AtTERT* 遺伝子の転写産物が検出された。また、分化した組織であるロゼット葉からはテロメラーゼ活性は検出されず、当該転写産物も見い出されなかった。以上の結果から、各分化過程におけるシロイヌナズナのテロメラーゼ活性は、主に *AtTERT* の転写制御により調節されていることが示唆された。

AtTERT 遺伝子は植物の分裂組織においてのみ発現していると考えられたため、*in situ* ハイブリダイゼーションのレベルで分裂組織における発現局在の解析を行った。その結果、茎長分裂組織の中でも特に表層部位にシグナルが見られ、分裂組織特異的な発現であることが裏付けられた。

イネの各組織を用いた解析からも、シロイヌナズナ同様、分裂組織を含む部位において高いテロメラーゼ活性が観察された。一方で *OsTERT* 遺伝子の転写産物は少なくとも5種類のもので存在し、単なる発現量による転写制御機構ではなく、スプライシングによる調節機構も考えられる。

まとめ

本研究において、シロイヌナズナの *AtTERT*、イネの *OsTERT* 遺伝子を単離し、植物におけるテロメア維持機構が多くの高等真核生物と同じ TERT によることが示された。植物においては *TERT* 相同遺伝子としてだけでなく、テロメア維持機構に関連する機能既知な分子として唯一のものである。*AtTERT*、*OsTERT* ともに RTモチーフと Tモチーフを保存しており、分子量、等電点ともに既知の TERT と良く似たものであった。アミノ酸レベルでヒトやマウスと高い相同性を示し、系統樹においては高等真核生物として一つのクラスターを形成した。また、*AtTERT* 遺伝子は植物の分裂組織においてのみ発現し、テロメラーゼの局在性と一致していることが確認された。*OsTERT* 遺伝子は単なる転写レベルでの発現制御だけでなく、スプライシングやリン酸化による調節機構の存在も考えられ、このことが双子葉植物と単子葉植物の違いである可能性は興味深い。

Oguchi, K., Liu, H., Tamura, K. and Takahashi, H. (1999) Molecular cloning and characterization of *AtTERT*, a telomerase reverse transcriptase homolog in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS lett.* 457, 465-469