

## 論文内容の要旨

論文題目 Studies on regulatory mechanisms of cell proliferation competence in *Arabidopsis thaliana*  
(シロイヌナズナにおける細胞増殖能の制御機構に関する研究)

氏名 大谷 美沙都

多細胞生物の正常な発生や形態形成には、時間的・空間的な細胞増殖の制御が不可欠である。この細胞増殖の制御は、細胞周期の進行と停止によるだけでなく、非増殖状態も含めた多段階で行われると考えられる。すなわち、増殖していない細胞には、増殖準備に関していくつかの異なる段階があり、これらの段階間の移行にも様々な制御が働いていることが想定される。とくに細胞増殖能の獲得、喪失は重要な制御点になり得る。植物では、発生や分化の柔軟性が増殖能の可逆的な制御と関連していると考えられ、こうしたことから増殖能制御の機構は非常に興味深い。

シロイヌナズナの *srd2* (*shoot redifferentiation defective 2*) は、根の脱分化、カルスの成長などはほぼ正常である一方、胚軸の脱分化、新たな分裂組織形成に関しては強い温度感受性を示すという、特徴的な表現型をもつ突然変異体である。*srd2* 変異が胚軸の脱分化に影響し、根の脱分化には影響しないことについては、根と胚軸での細胞増殖能の違いと増殖能獲得への SRD2 の関与を仮定する説明がなされてきた。つまり、根が比較的高い増殖能を保持しているのに対し、胚軸は増殖能を失っており、脱分化の過程で増殖能を再獲得するのに SRD2 機能を要求するという仮説である。脱分化だけでなく分裂組織形成にも高い増殖能が必要であるとすれば、*srd2* の表現型はすべて増殖能励起の欠陥によると考えることもできる。

こうしたことから私は、*srd2* が植物の細胞増殖能の制御機構や分子の実体、ひいては分化の柔軟性に関しても重要な手がかりを与えると考え、この変異体の解析に取り組んできた。修士課程では、SRD2 がヒトの SNAP50 と高い相同性を示すタンパク質をコードすることを明らかにした。SNAP50 が snRNA 転写に必要な因子として見出された SNAPc のサブユニットであることから、SRD2 も snRNA 転写活性化に働いていると類推された。また、この推測を支持するいくつかの予備的な結果も得た。博士課程では、この研究をさらに発展させて SRD2 の分子機能解析を進め、SRD2 による細胞増殖能の制御機構の解明を目指した。

## 結果と考察

### 1: SRD2 の snRNA 転写活性化機能の検証

U2.3 snRNA 遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ (LUC) コード配列を配置したレポーター遺伝子 (*U2.3::LUC*) を作製し、これを野生型と *srd2* のカルスに導入し、許容温度と制限温度での LUC 発現を比較した。その結果、*srd2* カルスでは LUC 発現が温度感受性を示すことが分かった (図 1)。また、このとき野生型 SRD2 cDNA を同時に導入すると、LUC 発現の高温感受性が緩和した。さらに snRNA の遺伝子のプロモーター中に同定されていたシス因子、USE に塩基置換を施した変異型レポーター遺伝子を用いた実験では、LUC 発現が低下するとともに *srd2* 変異の影響を受けなくなることも明らか

かになった (図 1)。以上の結果より、SRD2 が snRNA 転写活性化因子であることが証明されるとともに、その標的が USE であることが示唆された。

## 2: 胚軸脱分化過程における snRNA 量の変動と SRD2 の役割

胚軸外植片における *SRD2* mRNA の発現解析から、*SRD2* 発現がオーキシンに応答して増大すること、サイトカイニン添加でさらに発現量が上昇することが明らかとなった (図 2A)。この *SRD2* 発現を誘導するホルモン条件は、細胞増殖の再開を引き起こす条件と一致していた。またこのとき、snRNA 量は *SRD2* 発現とよく対応する形で増大していた (図 2B)。胚軸脱分化過程における蓄積量変動と *srd2* 変異の影響を、いくつかの snRNA 分子種について比較検討した結果、*srd2* 変異は、遺伝子のプロモーター領域に USE をもつタイプの snRNA 量の増大を選択的に抑制し、とくに制限温度下では蓄積量を減少させることが分かった (図 2C)。さらに U2.3 snRNA 遺伝子プロモーターと *uidA* 遺伝子からなるキメラ遺伝子 (*U2.3::GUS*) を導入した形質転換体を用いて、胚軸脱分化過程における GUS 活性変動を調べたところ、*srd2* 変異が GUS 活性上昇を強く阻害することが示された (図 2D)。これらの結果から、植物ホルモンによって誘導された SRD2 が USE に働いて snRNA 転写を活性化することが、胚軸の脱分化を成立させる要件になっていると考えられた。

## 3: 細胞増殖能の器官間差と snRNA レベルの関連

*srd2* 変異体の表現型から、根は胚軸よりも高い細胞増殖能を保持していると考えられる。SRD2 が snRNA 転写活性化因子であったことから、この増殖能を規定するものは snRNA であり、根では snRNA レベルが相対的に高いと推測された。RNA ゲルブロット解析を行ったところ、実際に根は胚軸よりも多量の snRNA を含むことが確認された (図 3A)。また、*U2.3::GUS* 形質転換植物体において、胚軸では見られない高い GUS 発現が根の中心柱領域に検出された (図 3B-E)。これらの結果により、器官による細胞増殖能の違いと snRNA レベルとの対応関係が裏付けられた。

## 4: 分裂組織形成過程における snRNA 量の変動と SRD2 の役割

*srd2* 変異体の表現型は、SRD2 が分裂組織形成においても重要な機能を果たしていることを示している。分裂組織形成時の snRNA の動態を調べるため、側根形成過程を対象に、抗 TMG 抗体 (TMG; trimethylguanosine, snRNA に付与されるキャップ構造) を用いた免疫組織学的解析を行った。この結果、野生型ではごく初期の段階から側根原基の細胞の核に多量の snRNA が検出された。snRNA 量は原基形成の間を通して高いレベルに保たれたが、その後一旦大きく減少し、側根が伸長し始める段階になって再び増大した (図 4A)。これに対して、制限温度下で培養した *srd2* 変異体では原基形成後の snRNA 量の再上昇が明瞭には見られなかった (図 4B)。このような原基は分裂組織を確立できないまま成長を続け、異常な形状となった。この結果により、正常な分裂組織形成に SRD2 による snRNA 転写活性化が必須であることが示唆された。

カルスからのシュート再生過程においても、*srd2* 変異が制限温度下で snRNA 蓄積量を減少させることが確認され、*srd2* 変異体のシュート再生の温度感受性と snRNA 蓄積量の低下とが関連づけられた。なお、シュート再生過程初期における茎頂分裂組織 (SAM) 形成関連遺伝子の発現パターンには、*srd2* 変異はとくに影響しなかった。

## 5: SRD2 ノックアウト変異体の表現型解析

SRD2 の生理的役割についてさらに情報を得るため、*SRD2* 遺伝子座に T-DNA 挿入をもつ 2 つの系統の表現型解析を行った (図 5)。いずれの系統でも T-DNA 挿入に関するホモ接合体は見出されず (表 1)、SRD2 機能の完全欠損が胚致死あるいは配偶体致死をもたらすことが示された。また、*SRD2/srd2-2* 個体と野生型との交配実験の結果から、*srd2-2* 変異が雌雄両方の配偶体に影響することが分かった (表 1)。*SRD2/srd2-2* 個体では、しばしば花粉管の到達していない胚珠や、胚発生の起こっていない胚珠が観察された (図 6)。これらのことから、SRD2 による snRNA 転写活性化が生殖や初期発生にも重要であることが示唆された。

## 6: *srd2* と類似した表現型を示す *rid1* 変異体の解析

snRNA には多くの分子種があり、mRNA 前駆体スプライシングに関与するものや、rRNA の成熟・修飾を担うものが含まれる。SRD2 による転写活性化を受けると考えられる snRNA はこの両群に跨っており、どちらの snRNA 機能が脱分化や分裂組織形成で鍵となっているのかは、*SRD2* の解析からは分からなかった。この点について手掛かりを得るため、当研究室で単離された *rid1* (*root initiation defective1*) の解析を行った。*rid1* は *srd2* 同様、脱分化と分裂組織形成に関して特徴的な温度感受性を示す変異体である (図 7)。*rid1* 変異の存在箇所を精密染色体マッピングで絞り込み、当該領域の塩基配列の比較解析を行って、*rid1* 変異体ゲノムの DEAH 型 RNA ヘリカーゼ遺伝子、At1g26370 内に塩基置換を発見した (図 8)。At1g26370 は、mRNA 前駆体スプライシングに働くこととされる DDX8 (ヒト) や Prp22 (酵母) ととくに相関性が高く、スプライシング

反応への関与が予想される。これにより、スプライシングの脱分化と分裂組織形成における重要性が示唆された。

## まとめと展望

本研究では、シロイヌナズナの温度感受性突然変異体 *srd2* を糸口に、細胞増殖能の制御機構に迫った。全ての結果を総合すると、植物の細胞増殖能を規定するのは snRNA レベルと、おそらくはそれによって制限される mRNA 前駆体スプライシング活性であり、SRD2 は snRNA 転写活性化を通して増殖能発起に働いている、とまとめられる。この細胞増殖能は、脱分化に伴って増大するだけでなく、通常の発生過程でも大きく変動し、とくにその一部は分裂組織形成に深く関わっている。snRNA 転写制御という観点からは、本研究は snRNA の転写活性のダイナミズムとその生理的な意義を初めて示したと言える。今後はスプライシング活性も含めた包括的な解析により、植物の発生の基礎要因について一層理解が深まることが期待される。

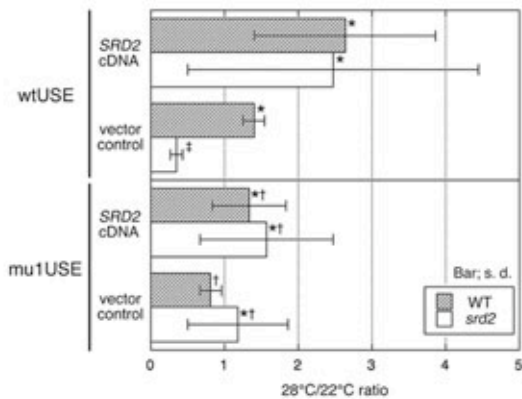


図 1. U2.3 snRNA プロモーター活性に対する *srd2* 変異の影響

野生型 (WT) および *srd2* の胚軸由来カルスを 22°C、RIM で 1 日間培養し、不定根原基を誘導した。この外植片に野生型 USE (wtUSE) または変異型 USE (mu1USE, mu2USE) をもつ U2.3::LUC をレポーターとして導入し、22°C または 28°C で 1 日間培養後 LUC アッセイを行った。このとき 35S::SRD2 をエフェクターとして導入し、その対照にはベクターのみを導入した。なお、LUC 活性は同時に導入した 35S::GUS に由来する GUS 活性で標準化した。mu1USE では LUC 活性が大きく低下し、mu2USE では活性が検出できなかった。得た値から 28°C/22°C の比を算出し、その平均値を示した。シンボルが異なる値同士は、統計的に有意な差がある (Mann-Whitney U test;  $P < 0.05$ )。wtUSE、エフェクターなしの場合に *srd2* で LUC 活性の温度感受性が見られたが、35S::SRD2 を同時導入するとこの温度感受性が解除された。これに対して、mu1USE ではこうした *srd2* 変異による温度感受性が検出されなかった。

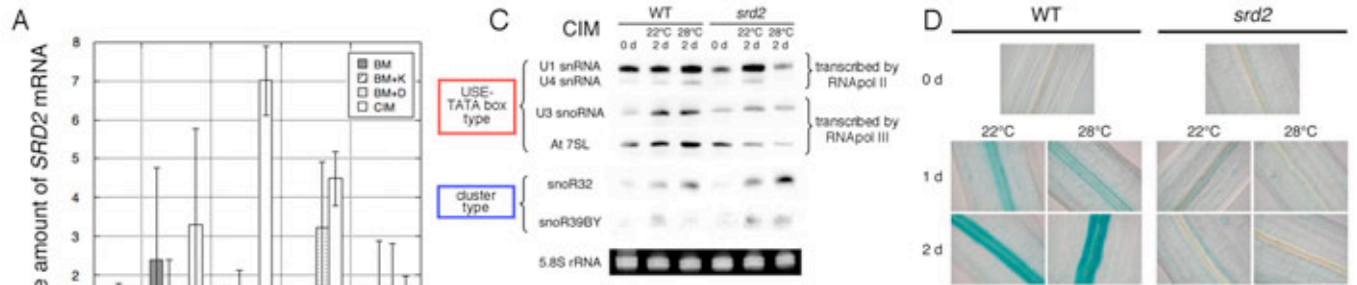


図 2. 胚軸脱分化過程における SRD2 mRNA および snRNA 蓄積量の変動

(A) 植物ホルモン組成の異なる様々な培地に置床し 22°C で培養した野生型胚軸外植片から全 RNA を調製し、これを鋳型に定量的 RT-PCR 解析を行って、SRD2 mRNA 量を算出した (18S rRNA で標準化)。用いた培地は、ホルモン無添加の BM、0.1 mg/l kinetin を含む BM+K、0.5 mg/l 2,4-D を含む BM+D、0.1 mg/l kinetin と 0.5 mg/l 2,4-D を含む CIM の 4 種類。SRD2 mRNA は CIM 培養によって一過的に発現し、発現量は 24 時間目に最大となった。また SRD2 発現は BM+D でも誘導されたが、発現レベルは CIM の場合よりも低かった。(B) (A) と同様の条件下で培養した野生型胚軸外植片の全 RNA を用いて RNA ゲルブロット解析を行い、U2 snRNA 蓄積量の変動を調べた。下段はローディングコントロールの rRNA。U2 snRNA 蓄積量は CIM 培養によって増大した。また、BM+D で培養した場合にもある程度の増大が見られた。(C) 22°C または 28°C で 2 日間、CIM で培養した野生型 (WT) と *srd2* の胚軸外植片から全 RNA を調製し、RNA ゲルブロット解析を行って、snRNA 分子種ごとに蓄積量変動を調べた。5.8S rRNA はローディングコントロール。28°C で培養した *srd2* では、プロモーターに USE-TATA ボックスをもつ snRNA の蓄積量増大が抑えられた。一方、クラスターとしてコードされている snRNA には、*srd2* 変異の影響は見られなかった。(D) U2.3::GUS 形質転換体の胚軸を CIM に置床して 22°C または 28°C で培養し、GUS 活性を調べた。野生型 (WT) では GUS 活性が CIM 培養によって上昇するが、*srd2* ではこうした上昇が抑えられた。スケールバー: 100  $\mu$ m。

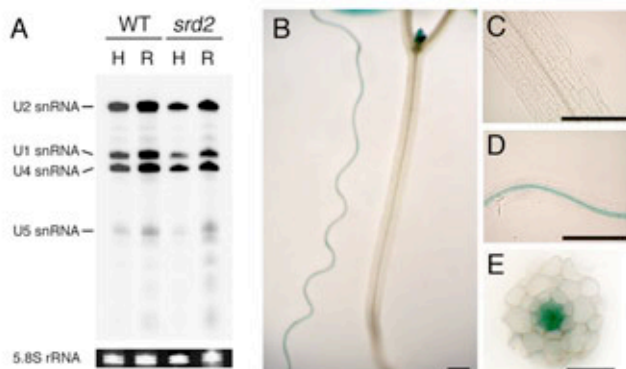


図 3. 胚軸と根の snRNA レベルの比較

(A) 22°C で育てた播種後 12 日目の野生型 (WT) および *srd2* の芽生えの胚軸 (H) と根 (R) から全 RNA を抽出し、抗 TMG 抗体を用いた RNA ゲルブロット解析を行い、snRNA を検出した。5.8S rRNA はローディングコントロール。野生型、*srd2* ともに胚軸よりも根の snRNA 蓄積量の方が多かった。(B-E) U2.3::GUS 形質転換体の播種後 12 日目の芽生えにおける GUS 活性。(C) は胚軸、(D) は根の拡大図。さらに根の横断面を (E) に示す。胚軸では GUS 活性が検出されなかったが、根では内鞘を含む中心柱領域に強い GUS 活性が見られた。スケールバー: 500  $\mu$ m (B-D)、50  $\mu$ m (E)。

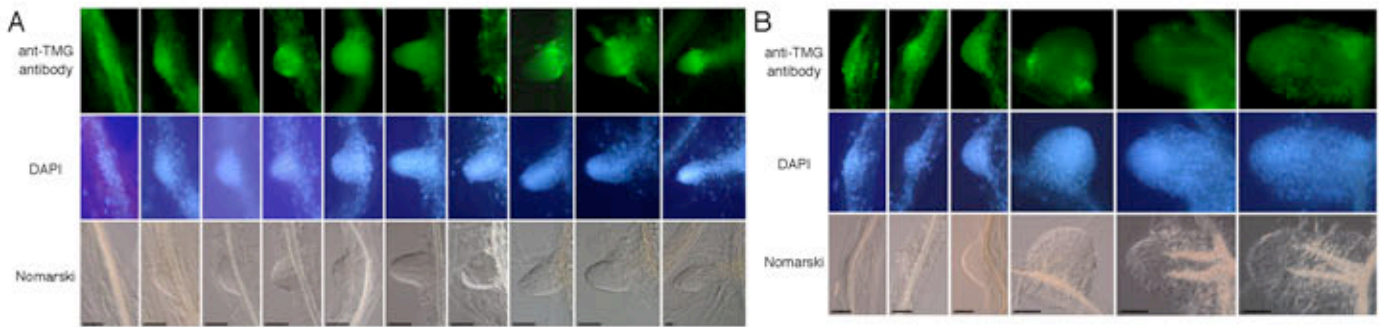


図 4. 側根形成過程における snRNA 蓄積量の変動

野生型 (A) および *srd2* (B) の主根断片を RIM に置床し、22°C (A) または 28°C (B) で培養して、側根形成を誘導した。6 日後または 12 日後に回収し、抗 TMG 抗体を用いて、様々な段階の側根原基における snRNA 蓄積を免疫組織学的に検出した。上段は snRNA 蓄積のパターンを示す免疫顕微鏡像、中段は DAPI 染色による蛍光像、下段はノマルスキー微分干渉顕微鏡像である。野生型では snRNA 蓄積量は側根原基形成後に一旦大きく下がり (A; 左から 7 枚目のパネル)、側根伸長が始まる頃に再び上昇してきた。28°C で形成された *srd2* 側根原基では、こうした snRNA 蓄積の再上昇が不明瞭であった。

スケールバー: 50  $\mu$ m。

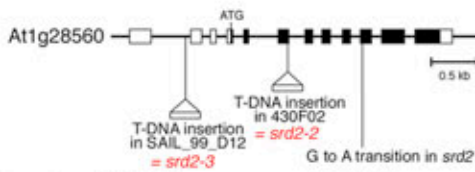


図 5. *SRD2* 遺伝子座への T-DNA 挿入位置

GABI-Kat Line 430F02 と SAIL\_99\_D12 における T-DNA 挿入位置。前者は *SRD2* 遺伝子 (At1g28560) の第 6 エキソンに、後者は第 1 イントロンに、それぞれ T-DNA が挿入されている。これらの変異アリルを *srd2-2*、*srd2-3* と名付けた。

表 1. *SRD2* 遺伝子座に T-DNA 挿入をもつ変異系統の自殖次世代および交雑第一代における遺伝子型の分離比

	Number of progenies with the specified genotype		
	<i>SRD2/SRD2</i>	<i>SRD2/srd2-2</i>	<i>srd2-2/srd2-2</i>
Selfed progenies of <i>SRD2/srd2-2</i>	82	86	0
<i>SRD2/srd2-2</i> (F) × <i>SRD2/SRD2</i> (M)	71	25	0
<i>SRD2/SRD2</i> (F) × <i>SRD2/srd2-2</i> (M)	53	38	0
	Number of progenies with the specified genotype		
	<i>SRD2/SRD2</i>	<i>SRD2/srd2-3</i>	<i>srd2-3/srd2-3</i>
Selfed progenies of <i>SRD2/srd2-3</i>	56	122	0

F, female parent; M, male parent.

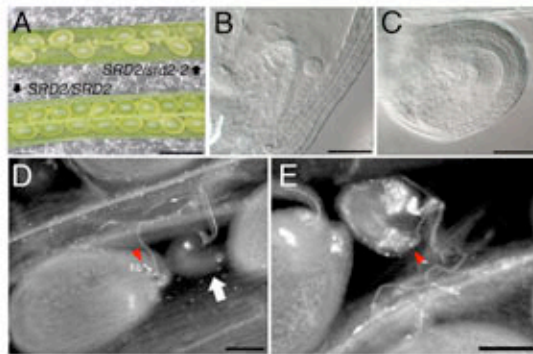


図 6. *srd2-2* 変異による生殖と初期発生の異常

(A) *SRD2/srd2-2* 個体 (上) と *SRD2/SRD2* 個体 (下) の長角果。前者では多くの萎縮した胚珠が観察される。(B, C) *SRD2/srd2-2* 個体の同一長角果内の、正常に発生している胚 (B) と胚発生が観察されない胚珠 (C)。(D, E) アニリンブルー染色により、*SRD2/srd2-2* 個体の子房内部の花粉管を観察した。花粉管の到達が見られない胚珠 (D; 白い矢印) や、花粉管は到達しているものの胚発生が起こらずに萎縮してしまった胚珠 (E) が確認された。赤い三角形は胚珠孔に到達している花粉管を示す。スケールバー: 1 mm (A), 50  $\mu$ m (B, C), 100  $\mu$ m (D, E)。

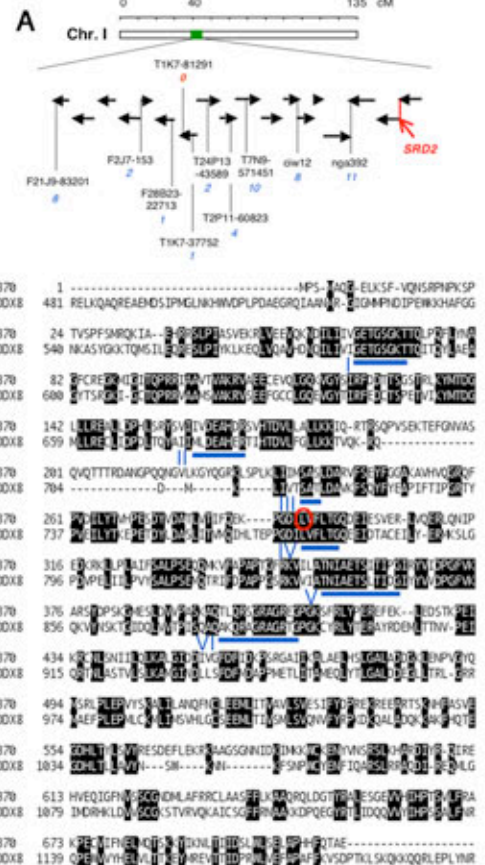


図 8. *rid1* 変異のマッピングと *RID1* 候補遺伝子

(A) *rid1* 変異の染色体マッピング。マーカー名の下にある数字は組換え染色体数を示す。(B) *RID1* 候補遺伝子 (At1g26370) のコードする推定アミノ酸配列とヒト DDX8 との比較。RNA ヘリカーゼに保存されているモチーフを青い下線で示した。*rid1* では赤丸で示したロイシンがフェニルアラニンに置換している。

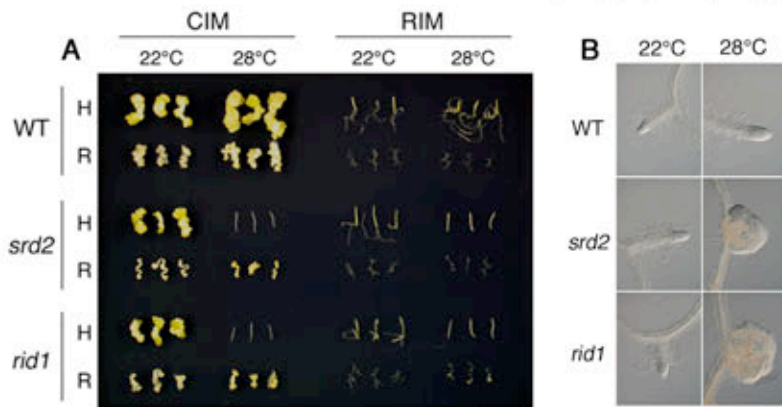


図 7. *rid1* 変異体の表現型

(A) 野生型 (WT)、*srd2*、*rid1* の胚軸 (H) および根 (R) の断片を、CIM および RIM に置床し、22°C または 28°C で 24 日間培養した。どちらの変異体も胚軸外挿片からのカルス形成と不定根形成については強い温度感受性を示すが、根外挿片からのカルス形成は温度感受性を示さなかった。側根の発達においても、両変異体に共通した温度感受性が見られた。(B) 野生型 (WT)、*srd2*、*rid1* の主根断片を RIM で 14 日間、22°C または 28°C で培養した。どちらの変異体の側根原基も、28°C では正常な根端分裂組織を確立できず、瘤状の細胞塊として成長した。スケールバー: 1 cm (A), 200  $\mu$ m (B)。