

論文内容の要旨

論文題目

“Molecular genetic analysis of a cell proliferation control mechanism involving RID2, a novel nucleolar factor, in *Arabidopsis thaliana*”

(シロイヌナズナの新規核小体因子 RID2 の関与する細胞増殖制御機構の分子遺伝学的解析)

大林 祝

序論

植物細胞は分化した後も分化全能性を保持しており、容易にこれを発現する。この柔軟な分化の様態は、植物細胞を特徴づける性質と考えられる。発表者は、分化全能性発現の初発段階である脱分化・細胞増殖再活性化に着目し、その分子機構から植物細胞の分化のあり方を理解することを目的として研究を行ってきた。修士課程においては、シロイヌナズナの組織培養系を用い、カルス形成初期過程に強い温度感受性を示す突然変異体 *root initiation defective 2* (*rid2*) について解析した。その結果、*rid2* 変異体が rRNA プロセッシング中間体を異常に蓄積していることなどが明らかになり、脱分化を含む細胞増殖制御における rRNA 生合成の重要性が示唆された。また、RID2 関連因子を遺伝学的にとらえるため、*rid2* の抑圧変異体を探索して単因子劣性の 1 系統を単離し、*suppressor of rid two 1* (*sriw1*) と名付けた。博士課程では、RID2 の機能についてさらに解析を進めるとともに、*sriw1* の分子遺伝学的解析を行い、RID2 の関与する細胞増殖制御の分子機構について新知見を得た。

第 1 章 細胞増殖制御機構における RID2 の関与する核小体機能

1. 核小体と RID2 の関係

rid2 変異体で観察される特徴的な表現型の一つに、核の肥大がある。制限温度下で胚軸断片をカルス誘導培地で培養した際にはとくに顕著で、カルス形成のもととなるべき中心柱の細胞が分裂せずに異常に膨潤し、そのような細胞の核の大きさは通常の数十倍にもなる。このとき目立つのは核小体と思われる構造である(図 1 A)。そこで、H/ACA snoRNP の NHP2

に GFP を融合したタンパク質を発現させ、これを核小体マーカーとして詳しく調べた。その結果、*rid2* 変異体で核小体が巨大化することが確認された (図 1 B)。

rid2 変異体の責任遺伝子 *RID2* は、S-adenosylmethionine (SAM) 結合モチーフと核移行シグナル (NLS) をもったメチルトランスフェラーゼ様の因子をコードしている (図 1 C)。NLS から *RID2* は核タンパク質であると推測されたが、GFP 融合 *RID2* タンパク質を発現させた細胞の蛍光観察により、*RID2* は核の中でもとくに核小体に多いことがわかった (図 1 D)。

2. rRNA 生合成の組織間差と変動

rid2 変異体の組織培養を制限温度下で行うと、胚軸中心柱の脱分化 (細胞増殖能獲得) はほぼ完全に阻害されるが、根の中心柱における細胞増殖再開は阻害されない。また、*rid2* の芽生えの制限温度曝露では、成長全般が抑制されるが、主根の発達・成長にとくに重篤な異常が見られる。一方で *rid2* 変異は rRNA のプロセッシングに強く影響することから、rRNA 生合成のレベルと *rid2* 変異感受性との関係が窺われた。この関係を検証するため、rRNA 生合成の組織間差と変動を調べた。rRNA 転写において主要な役割を担う RNA ポリメラーゼ I の発現を *NRPA2p::GUS* レポーターで検出し、これを rRNA 生合成の指標とした。図 2 に示したように、芽生えでは GUS 活性は根端分裂組織で最も高く、茎頂や根の中心柱でも高い活性が見られた。胚軸中心柱では GUS 活性が認められなかったが、胚軸断片をカルス誘導培地で培養すると、細胞増殖に先立って中心柱で GUS が発現した。この結果から、rRNA 生合成のレベルが組織によって大きく異なること、rRNA の生合成が盛んな部位と *rid2* 変異の強く影響する部位がほぼ一致すること、胚軸の脱分化に際して rRNA 生合成が高まることが示唆された。

3. リボソーム生合成に対する *rid2* 変異の影響

rid2 変異体は多量の rRNA プロセッシング中間体を蓄積していることから、成熟リボソームが減少している可能性が考えられた。そこで、リボソーム生合成への *rid2* 変異の影響について、ポリソーム解析を行い検討した。その結果、*rid2* 変異体では、60S リボソームに対する 80S リボソームの量比 (80S/60S) が、温度依存的に大きく低下することがわかった (図 3)。これらより、制限温度で育てた *rid2* 変異体では、rRNA プロセッシングの不調と関連してリボソーム生合成が滞り、成熟リボソームの量的不足が生じて細胞増殖に様々な影響が現れるものと推察された。

第 2 章 転写因子 ANAC082 の細胞増殖に対する負の制御

1. *SRIWI* 遺伝子の同定と解析

sriw1 変異は、*rid2* 変異体に見られるカルス形成 (図 6 A)、不定根形成、芽生えの主根伸長などの温度感受性を抑圧する。制限温度下での不定根形成を指標形質とした精密染色体マッピングにより、*sriw1* 変異は第 5 染色体の約 25 cM の位置、約 100 kbp の範囲に位置づけられた。この範囲の塩基配列解析を行った結果、NAC 型転写因子 (ANAC082) をコードする At5g09330 に 1 塩基の置換が見出された (図 4 A)。野生型の At5g09330 を含むゲノム断片を *sriw1 rid2* 二重変異体に導入したところ、*rid2* 単独変異体と同様に不定根形成が温度感受性を示すようになったため、At5g09330 が *sriw1* 変異体の責任遺伝子 *SRIWI* であると結論した。

ANAC082 については、出芽酵母を用いたトランスアクチベーションアッセイを行い、この転写因子が転写活性化能をもつことを確認した (図 4 B)。また、GFP 融合 ANAC082 の観察から、ANAC082 が核に局在することも確認した。

SRIWI の発現は、GUS レポーターを用いて調べた。その結果、強い GUS 活性は芽生えの茎

頂、根端、側根原基、培養組織片における発達中のカルスなどで見られ、*SRIW1* が細胞増殖と関連するような発現パターンを示すことがわかった (図 4 C~F)。この発現パターンは、*RID2* の発現パターンとも概ね一致していた。なお、*rid2* 変異体では、*SRIW1* の発現レベルが野生型に比べて著しく高くなっていた。

2. *rid2* 変異体の rRNA プロセッシング異常に対する *sriw1* 変異の影響

rid2 変異体の rRNA プロセッシング不全が *sriw1* 変異によって軽減されている可能性を考え、これについて検討を行った。RNA ゲルブロット解析の結果、*sriw1 rid2* においても *rid2* と同程度のプロセッシング中間体の異常蓄積が認められた (図 5)。これより、*sriw1* 変異は、rRNA プロセッシングの回復によらずに、*rid2* 変異体の細胞増殖に関わる温度感受性を抑圧することが判明した。

3. *srd2* および *rid1* の温度感受性に対する *sriw1* の抑圧効果

rid2 以外の温度感受性変異体についても、*sriw1* 変異による表現型の抑圧を受けるかどうかを検討してみた。調べた変異体は、脱分化とシュート再生が強い温度感受性を示す *shoot redifferentiation defective 2* (*srd2*) と *rid1*、細胞増殖の維持が温度感受性を示す *root primordium defective 1* (*rpdl*) の 3 種類である。責任遺伝子 *SRD2*、*RID1*、*RPD1* はそれぞれ、snRNA 転写活性化因子、プレ mRNA スプライシングへの関与が考えられる RNA ヘリカーゼ、植物特有の機能未知タンパク質をコードしている。これらの変異体に *sriw1* 変異を導入したところ、*srd2* と *rid1* では、芽生えの成長、カルス形成 (図 6 A)、不定根形成、側根形成、シュート再生 (図 6 B) のいずれについても、不完全ながら温度感受性の抑圧が認められた。しかし、*rpdl* については、*sriw1* の抑圧効果がほとんど見られなかった。

総括

rid2 変異体の表現型から、脱分化や細胞増殖のいくつかの局面において、*RID2* 遺伝子が重要なはたらきをもつことが示されていたが、本研究により、このはたらきが核小体での rRNA/リボソームの生合成を介したものであり、rRNA 生合成のダイナミックな変動が細胞増殖の制御に関わっていることが、新たにわかってきた。また、NAC 型転写因子 ANAC082 の遺伝子に起こった劣性変異 *sriw1* が、rRNA 生合成の回復を伴わずに、*rid2* の表現型を抑圧することが明らかになった。このことは、rRNA (リボソーム) の生合成と脱分化や細胞増殖とを結びつける経路に *SRIW1* (ANAC082) が組み込まれていることを示唆する。さらに *SRIW1* 遺伝子の発現パターンを考慮すると、図 7 に示したような仮説を考えることができる。すなわち、rRNA/リボソームの生合成の需要と供給のバランスが取れている状態では *SRIW1* の発現レベルは低い、細胞増殖が盛んなときや脱分化のときなどのように rRNA の要求性が高かったり、*rid2* 変異体のように rRNA 生合成に異常があったりすると、rRNA の需給の逼迫を受けて *SRIW1* の発現が上昇し、増大した *SRIW1* (ANAC082) が細胞増殖を負に制御する。興味深いことに、*sriw1* 変異は、プレ mRNA スプライシング関連の変異体 *srd2* と *rid1* に対しても、脱分化や細胞増殖の温度感受性を抑圧する効果を示した。*SRIW1* (ANAC082) が rRNA/リボソーム生合成や snRNA/スプライソソームなど、遺伝子発現の基盤となる能力をチェックして、その高さに応じて細胞増殖を調整している可能性も考えられる。

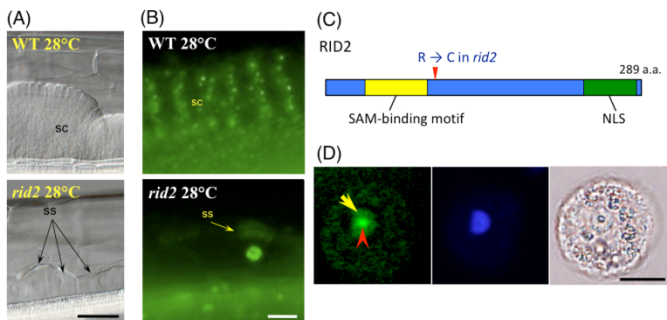


図1 核小体とRID2の関係

(A) カルス誘導培地で5日間、28°Cで培養した野生型 (WT) および *rid2* の胚軸外植片の DIC 観察像。sc : stele-derived callus, ss : swollen stele cells, Bar = 50 μm。
 (B) 核小体マーカー遺伝子 (*35S::NHP2::GFP*) を導入した野生型 (WT) および *rid2* の胚軸外植片の蛍光顕微鏡像。外植片はカルス誘導培地で5日間、28°Cで培養した。Bar = 50 μm。
 (C) RID2 タンパク質の構造。
 (D) RID2:GFP の細胞内局在。左からプロトプラストにおける GFP 蛍光、DAPI 蛍光、明視野像を示す。黄色い矢印は核、赤い矢印は核小体を表す。Bar = 10 μm。

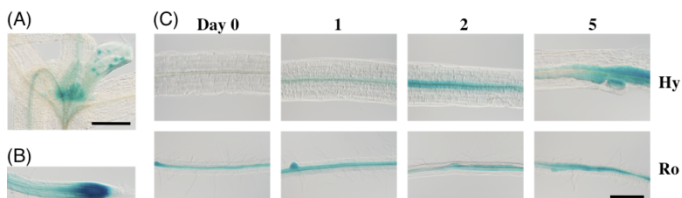


図2 RNA ポリメラーゼ I 遺伝子の発現パターン

(A, B) 播種後 12 日目の芽生えにおける *NRPA2p::GUS* の茎頂 (A) および根端 (B) での発現パターン。Bars = 200 μm。
 (C) カルス誘導培地、22°C で培養した外植片における *NRPA2p::GUS* の発現の変動。Hy: 胚軸外植片、Ro: 根外植片。Bar = 200 μm。

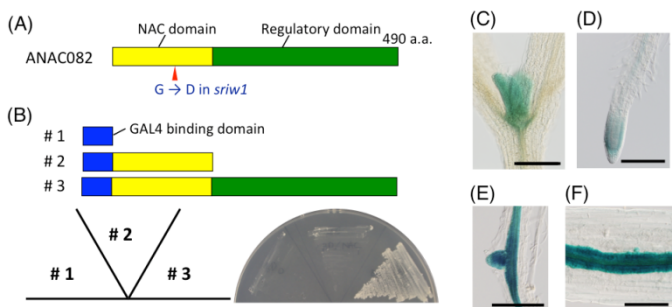


図4 SRIWI 遺伝子の解析

(A) *SRIWI* 遺伝子産物 (ANAC082) の構造。
 (B) 出芽酵母のトランスアクチベーションアッセイ系による ANAC082 の転写能の解析。#1~#3 に示すようなキメラタンパク質遺伝子を出芽酵母に導入した。酵母細胞の増殖は、キメラタンパク質に転写活性化能あることを表している。
 (C-F) 芽生えの茎頂 (C)、根端 (D)、側根原基 (E)、胚軸から誘導したカルス (F) での *SRIWIp::GUS* の発現パターン。Bars = 200 μm。

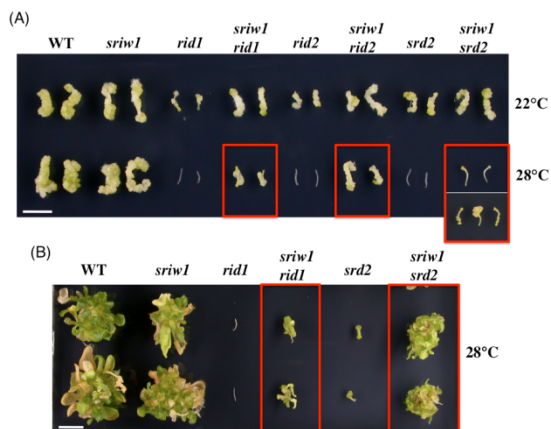


図6 *sriw1* の抑圧効果

(A) カルス形成における *sriw1* 変異の抑圧効果。野生型 (WT) と各変異体の胚軸断片をカルス誘導培地に置床し、22°C または 28°C で 21 日間培養した。Bar = 1 cm。
 (B) シュート再生における *sriw1* 変異の抑圧効果。胚軸断片をカルス誘導培地に置床し、22°C で 4 日間培養した後、シュート誘導培地に移植して 28°C で 30 日間培養した。Bar = 1 cm。

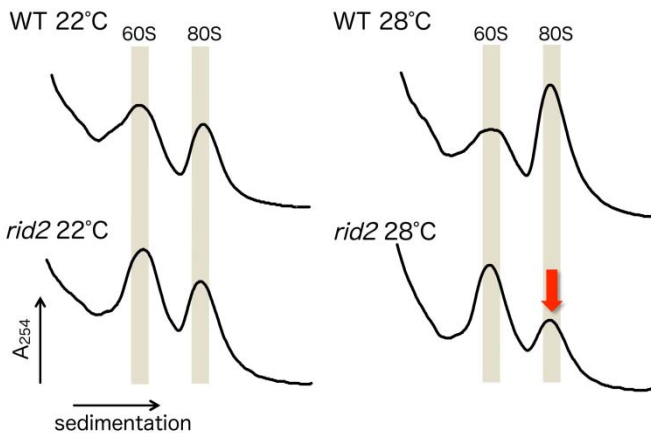


図3 リボソーム生成に対する *rid2* 変異の影響

ポリソーム解析による 60S、80S リボソーム量の比較。ポリソームの検出には 254 nm の吸収波長を用いた。図に示した温度で 12 日間育てた野生型 (WT)、*rid2* 芽生えの抽出物を用いて解析した。

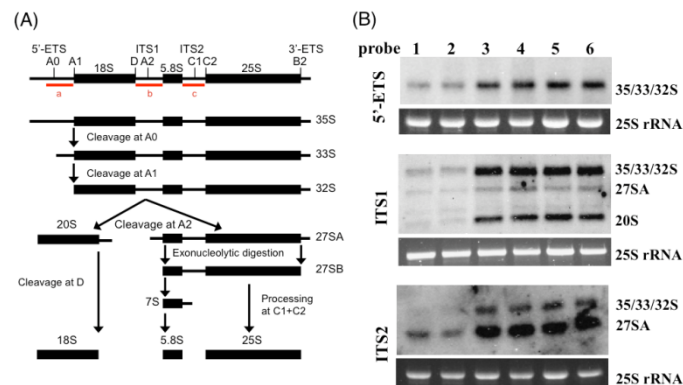


図5 rRNA プロセッシングに対する *rid2* 変異と *sriw1* 変異の影響

(A) 出芽酵母における rRNA プロセッシング経路の模式図。RNA ポリメラーゼ I によって転写された 35S プレ rRNA が様々な修飾と段階的なプロセッシングを受け、18S、5.8S、25S の rRNA に成熟する。
 (B) rRNA プロセッシング中間体の RNA ゲルブロット解析。播種後 12 日目の芽生えから抽出した RNA を材料とし、検出には(A)に示したスベーパー領域に特異的なプローブ a、b、c を用いた。レーン 1: 22°C で育てた野生型 (WT)、2: 28°C で育てた WT、3: 22°C で育てた *rid2*、4: 28°C で育てた *rid2*、5: 22°C で育てた *sriw1 rid2*、6: 28°C で育てた *sriw1 rid2*。

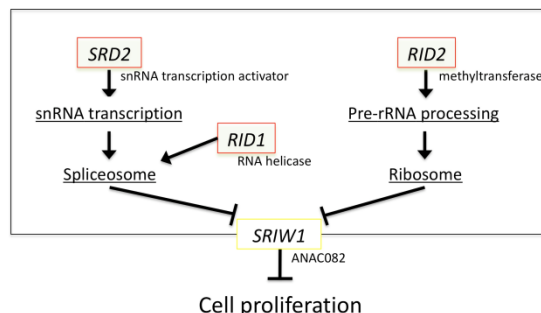


図7 RID2 と SRIWI の関与する細胞増殖制御機構のモデル