

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on mechanisms controlling cell division in the initial stage of lateral root formation with temperature-sensitive mutants of Arabidopsis

(シロイヌナズナ温度感受性変異体を用いた側根形成初期における細胞分裂域制御機構の研究)

氏名 大塚 蔵嵩

序論

私たちが普段目にする植物の複雑で多様な形態は、胚発生が完了した後に次々と器官が作り足されることで構築されている。この植物の器官新形成の代表例に、主根からの側根形成がある。側根は主根内鞘の限られた領域の細胞（原生木部に接した内鞘細胞列の縦2個、横3個の細胞）が大小2種類の非対称な娘細胞を生じる垂層分裂（**formative cell division**）を開始し、次に並層分裂を行って側根原基の元となる細胞集団を形成する。この最初期の段階での細胞分裂制御は側根の大きさと形態を決める上で特に重要であるが、どのように制御されているかはよく分かっていない。

この問題を追究するために3つのシロイヌナズナの温度感受性変異体 *root redifferentiation defective 1* (*rrd1*)、*rrd2*、*root initiation defective 4* (*rid4*) に着目した。これらの変異体は細胞増殖全般に不完全な温度感受性を示す一方、制限温度（28°C）下でしばしば幅の広い帯状の異常側根（帯化根）を生じる（図1）という特異な性質を共有している。そこで本研究では、側根形成初期の細胞増殖制御機構に関する新たな知見を得ることを目的として、この帯化根形成の分子遺伝学的解析を行った。

結果と考察

1: 温度依存的に帯化根を形成する変異体 *rrd1*、*rrd2*、*rid4* の表現型解析

本研究では帯化根形成の詳細な解析を行うために、半同調的側根形成誘導系（半同調系）を用いた。この系では、側根原基のほとんどできていない、ごく若い芽生えの主根断片をオーキシンで処理することにより新たな側根を誘導するため、側根形成初発段階の解析をすることができる。

半同調系での温度シフト実験や側根原基の細胞構成の定量的解析から、どの変異体でも側根原基形成のごく早い段階で分裂域が拡大し、この分裂域を保持したまま原基が発達していく結果、帯化根が形成されることが示された。さらに側根原基最初期の分子マーカーとして *PUCHI::GFP:PUCHI* を用いた観察を行い、側根原基の分裂域拡大は内鞘細胞の非対称垂層分裂の過剰に起因することを突き止めた（図2）。これにより、各変異体の責任遺伝子 *RRD1*、*RRD2*、*RID4* は、内鞘細胞の垂層分裂を終結させる制御に関与することが明らかになった。

帯化根の発達過程では、初期に拡大した原基の中で組織の放射パターンが構築されることになる。そのため、帯化根の組織構成は、形態形成の場が広がったときにどのようにパターンが応答するか、という問題に関し、貴重な情報を与えると考えられた。そこで、組織特異的に発現するレポーター遺伝子を用いた解析などにより組織構成を調べたところ、表皮、皮層、内皮は帯化根でも1層に保たれていたが、それより内側の中心柱では帯化に伴って細胞列が増えているということが分かった（図3）。これらの結果から、中心に近い細胞層に比べ、外側の細胞層の方が場の大きさの変化に影響されにくい、つまりより堅牢な性質を持っていることが窺われた。これは、根の放射パターンを生成するシステムについて、一つの基本特性を捉えたものと言える。

2: *RRD1*、*RRD2*、*RID4* の遺伝学的・分子生物学的解析

ポジショナルクローニングから *RRD1* は poly(A)-specific ribonuclease (PARN) 様タンパク質をコードし、*RRD2* と *RID4* はどちらも E/E+サブクラスに属する pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質をコードしていることが判明した (*RID4* の同定は先行研究による)。*RRD1::RRD1:GFP* をレポーターとして *RRD1* の発現を調べたところ、地下部では根端分裂組織と側根原基で発現が見られ、*RRD1* タンパク質がミトコンドリアに局在していることも判明した。*RID4* についても同様の結果が得られた（図4）。さらに各変異体の責任遺伝子の間にどのような関係があるかを調べるため、二重変異体の作出を試みた。どの組み合わせの二重変異体も（許容温度の 22°C でも）胚発生に異常を示し、合成致死となった。これより3つの遺伝子は機能的に密接に関連していることが示唆された。

植物は非常に多くの PPR タンパク質を持っているが、その一部については解析が進んでおり、RNA の配列を認識して結合し、他の因子をリクルートする機能をもつことが示唆されている。また、PARN は mRNA の poly(A)鎖の分解に働くと一般に考えられている。これらのことから、PPR タンパク質の *RRD2* と *RID4* が細胞分裂に関わる遺伝子の mRNA を認識し、PARN 様タンパク質の *RRD1* を呼び込み RNA 分解を促すことで、分裂域を制御しているのではないかと考えた。この作業仮説によれば、各変異体では標的の mRNA が増大していると想定されるので、マイクロアレイ解析から標的 RNA の探索を行うことにした。側根原基形成初期の RNA プロファイルを野生型と *rrd1* 変異体とで比較したところ、顕著に増大していたのは全てミトコンドリアゲノムにコードされる呼吸鎖関連の遺伝子の転写物で、これらは *rrd2* と *rid4* でも（程度に差はあるものの）同様に発現が増大していた。

このマイクロアレイ実験では poly(A)鎖のある転写産物の量を解析したが、植物のミトコンドリア転写産物には通常 poly(A)鎖が無く、poly(A)化されると分解を受けると考えられている。マイクロアレイ解析で増大が認められた転写物について詳しく調べたところ、変異体では poly(A)化された転写産物が分解されずに蓄積していることが示唆された (図 5)。

これまでの結果から各変異が RNA 代謝を通してミトコンドリアの呼吸鎖に影響し、このことが側根の帯化の原因になっている可能性が考えられた。これを調べるために、野生型の外植片に呼吸鎖複合体の阻害剤 (rotenone、antimycin A、oligomycin) を与えて側根を誘導したところ、細胞分裂域の拡大による側根の帯化が見られた (図 6)。ここで用いた呼吸鎖阻害剤 3 種がそれぞれ異なる作用点をもつこと、また呼吸鎖に含まれないミトコンドリア酵素 alternative oxidase の阻害剤 (salicylhydroxamic acid) を与えた場合や DNA 合成阻害剤 (aphidicolin) で細胞増殖を部分的に抑えた場合には帯化根が観察されなかったことから、呼吸鎖の活性こそが内鞘細胞の垂層分裂の終結制御に重要であると結論した。

まとめと展望

本研究により、*RRD1*、*RRD2*、*RID4* の 3 つの遺伝子が協調してミトコンドリアの新規 RNA 代謝経路に関与し、呼吸鎖の活性を介して側根形成初期の細胞分裂域の限定化に働いていることが示唆された (図 7)。ミトコンドリアの呼吸鎖は細胞の活動に必須であるが、その活性の変動が形態形成の基盤となる細胞分裂の制御において、特定の役割を担っている事例はほとんど知られておらず、本研究で得られた知見はミトコンドリアと形態形成の関係を知る重要な手がかりを提供すると期待される。今後の研究では、呼吸鎖の活性がどのようにして細胞分裂を調節しているかが大きな課題である。また、ミトコンドリア転写産物の分解がどのような分子メカニズムで起きているのかを明らかにすることも、重要であると考えている。

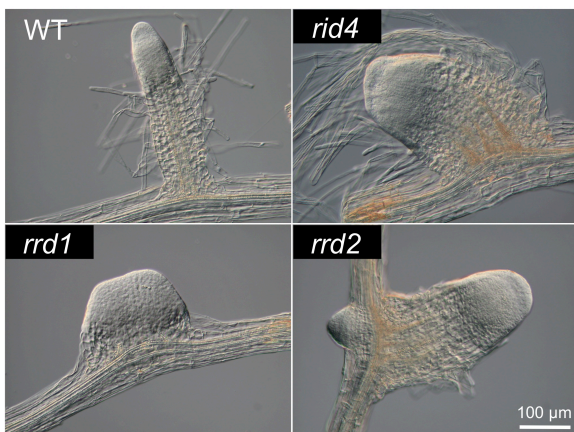


図 1. 制限温度下で形成される帯化根

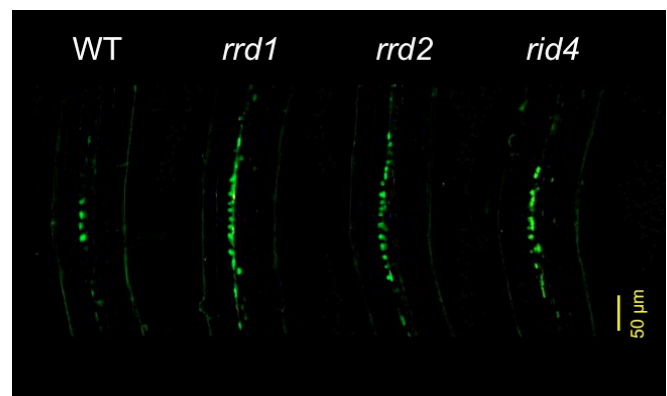


図 2. 内鞘細胞の垂層分裂に対する各変異の影響

内鞘細胞の最初の不等分裂から発現する *PUCHI::GFP:PUCHI* を分子マーカーに用いて、制限温度下で培養した各変異体外植片における垂層分裂の様子を観察した。変異体では蛍光シグナルを示す核の数が増えており、垂層分裂が過剰に起きていることが分かった。

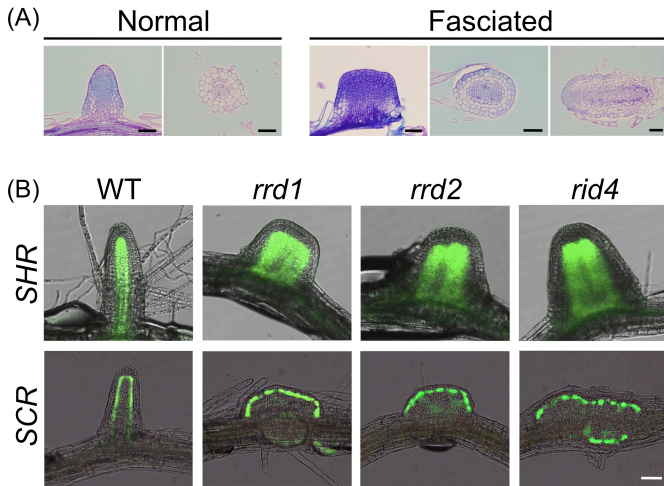


図 3. 帯化根と正常根の組織構成の比較

(A) 野生型で形成された普通の側根 (Normal) と *rid4* で形成された帯化根 (Fasciated) の縦断および横断切片の顕微鏡写真。Bar は 50 μ m。

(B) 野生型の側根と各変異体で形成された帯化根における組織特異的レポーター遺伝子の発現パターン。中心柱で発現する *SHR::GFP* の発現領域が帯化根で拡大しているのに対し、内皮～内皮/皮層始原細胞～静止中心で発現する *SCR::GFP* の発現領域は帯化根でも正常根と変わらず一層に限定されていた。また、*SCR::GFP* 発現領域の外側にある細胞層の数も、帯化根と正常根で同じであった。Bar は 50 μ m。

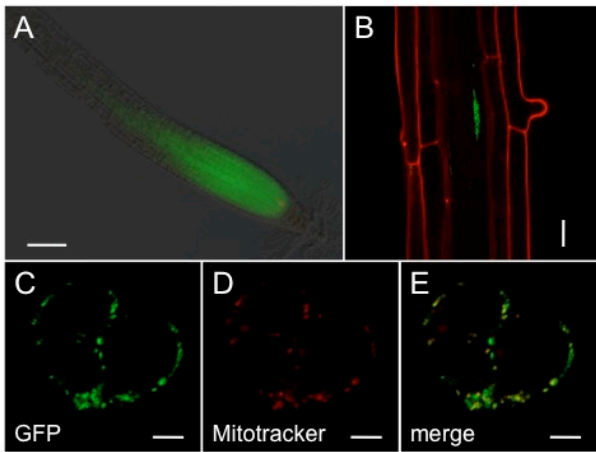


図 4. *RID4::GFP* の発現部位と *RID4::GFP* の局在パターン
RID4::GFP は根端分裂組織 (A) と側根原基 (B) で発現しており、原基では形成最初から発現が見られた。*RID4::GFP* を発現しているプロトプラストで *RID4::GFP* の蛍光シグナル (C) を観察すると、大部分はミトコンドリア標識剤 Mitotracker (D) のシグナルと重なった (E)。Bar は (A) が 50 μ m, (B) が 20 μ m, (C) から (E) が 5 μ m。

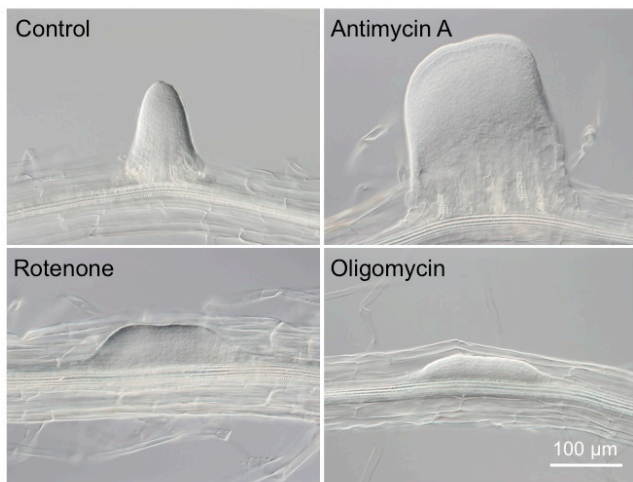


図 6. 側根形成に対する呼吸鎖阻害剤の影響

ミトコンドリア呼吸鎖複合体の阻害剤 (rotenone、antimycin A、oligomycin) の存在下で側根を誘導すると、帯化根が形成された。

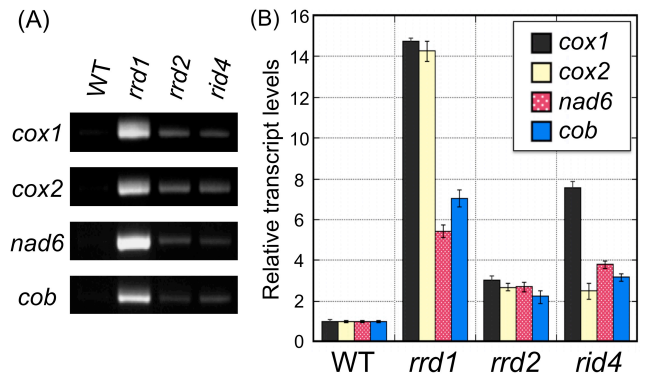


図 5. 各変異体での poly(A)化されたミトコンドリア転写産物の増加

(A) 制限温度下で側根を誘導した変異体と野生型から調製した RNA を用いて poly(A) test assay を行い、ミトコンドリアコードの 4 つの遺伝子 (*cox1*、*cox2*、*nad6*、*cob*) について、poly(A)化された転写産物の蓄積量が変異体で増えていることを確認した。

(B) Oligo(dT)プライマーで逆転写し、poly(A)化された転写産物の量を定量的 RT-PCR で確認した。

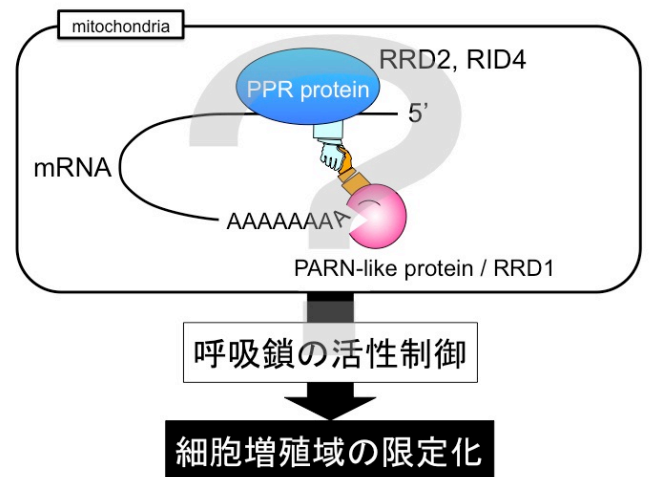


図 7. RRD1、RRD2、RID4 の分子機能に関する作業仮説