

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18370016  
 研究課題名（和文） 植物細胞の脱分化と分裂再開に関わる RNA ダイナミズムの分子遺伝学的解析  
 研究課題名（英文） Molecular genetic analysis of RNA dynamism involved in dedifferentiation and reactivation of proliferation of plant cells  
 研究代表者  
 杉山 宗隆（SUGIYAMA MUNETAKA）  
 東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
 研究者番号：50202130

研究成果の概要：カルス形成に関し特異な表現型を示すシロイヌナズナの条件的突然変異体を広く調査し、責任遺伝子の同定と解析を通して、プレ mRNA スプライシングや rRNA 前駆体プロセッシングの破綻に特別に敏感な事象が植物細胞の脱分化・分裂再開の特定段階に関与することを示した。とくにスプライシングを介して細胞増殖能を規定すると考えられる核内低分子 RNA (snRNA) の蓄積量については、転写活性化因子 SRD2 の発現に依存してダイナミックに変動することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子・生理

キーワード：全能性, 脱分化

## 1. 研究開始当初の背景

植物の高い再生能力、また柔軟な生存戦略を支える基盤には、細胞分裂と細胞分化の可逆的な調節がある。すなわち、分裂を停止し成熟・分化した細胞が、状況に応じて再び分裂を始め、新たな組織や器官を形成できるよう、細胞分裂と細胞分化が融通無碍に調節されている。多くの細胞は、分裂組織を離れ、成熟・分化するに伴って増殖能を失う。このような細胞が分裂を再開する過程は、脱分化して増殖能を獲得する段階と、細胞周期が実

際に始動する段階とに区分される。両段階とも植物ホルモン、とくにオーキシンとサイトカイニンの制御下にある。

こうしたことから、植物細胞の脱分化・分裂再開は、分化全能性発現の最初の鍵として、また植物ホルモンによる細胞増殖制御の顕著な例として、古くから注目されてきた。しかし、それにもかかわらず、この現象に正面から取り組んだ解析的研究は少なく、わずかに葉肉プロトプラスト培養系におけるクロマチン変化についてある程度まとまった報

告がなされている程度であった。

私たちは植物の器官再生の分子遺伝学的解剖のために、モデル植物シロイヌナズナを材料に、様々な突然変異体（主に温度感受性変異体）を単離して解析を進めてきた。単離した変異体の中には、カルス形成初期の脱分化・分裂再開過程、あるいはその植物ホルモン応答に特異な異常を示すものが含まれており、本研究開始時点ではそれらを用いて脱分化における増殖能獲得を遺伝学的に識別することに成功していた。また、チミジンの類似体であるプロモデオキシウリジン

(BrdU) が、この増殖能獲得に作用するという現象も見出し、さらにこの作用に対する耐性変異体も単離していた。各変異体の責任遺伝子を同定したところ、興味深いことに、多くはプレ mRNA スプライシングなど、基本的な RNA 関連事象への関与が窺われるものであった。とくに増殖能獲得に働く *SRD2* 遺伝子については、独立型 snRNA 遺伝子の転写を活性化することを突き止めており、snRNA 蓄積量が増殖能の規定要因の一つであることが明らかになりつつあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、カルス形成開始に異常を示すシロイヌナズナの突然変異体の多くが、基本的な RNA 関連事象に関与すると思われる遺伝子に欠陥をもつことに着目し、RNA ダイナミズムの面から、脱分化と細胞分裂再活性化の分子機構に迫ることを目的とした。このために、まず脱分化から細胞分裂再開に至るカルス形成初期過程において、rRNA プロセッシングやプレ mRNA スプライシングなど、RNA ダイナミズムの様相を記述し、これらに対して突然変異および BrdU 処理がどのような影響を及ぼすかを調査して、各変異体の責任遺伝子の一次機能と BrdU の作用機作を推定することとした。また、これらの遺伝子の植物ホルモン応答を検討して、植物ホルモンによる脱分化誘導、細胞分裂活性化の分子機序を RNA ダイナミズムとの関連の中で明らかにすることも狙った。

## 3. 研究の方法

主として脱分化ないし細胞分裂再活性化に特徴的な欠陥をもつシロイヌナズナの温度感受性変異体 (*srd2*, *rid1*, *rid2*) を材料に、表現型と責任遺伝子の解析、抑圧変異体の単離・解析などにより、脱分化・分裂再開過程と RNA ダイナミズムとの関連を分子遺伝学的に探った。脱分化・分裂再開の実験系には、植物ホルモン(合成オーキシンの 2,4-D とサイトカイニンの組み合わせ)で誘導される胚軸外植片からのカルス形成を用い、RNA ダイナミズムは、snRNA 蓄積量とそのパターン、選択的スプライシングのパターン、

rRNA プロセッシング中間体の蓄積などを調べることで把握した。また、BrdU が脱分化における増殖能獲得に作用することから、BrdU 耐性変異体 (*bro1*, *bro2*) の解析を通して、BrdU 作用の標的となる分子事象を推定した。

## 4. 研究成果

(1) 脱分化の細胞増殖能獲得段階に関し強い温度感受性を示す突然変異体 *srd2* の責任遺伝子 *SRD2* は snRNA 転写活性化因子をコードし、胚軸脱分化過程における細胞増殖能獲得段階に働く。胚軸外植片における *SRD2* の発現について調べ、切り口近傍での傷害応答と思われる発現と、植物ホルモンに依存した中心柱での発現から構成されること、このうち後者が脱分化と関係することを確認した。胚軸脱分化に関わる発現調節域については、*SRD2* 遺伝子のプロモーター解析により、75 bp の範囲に絞り込み、この調節域が芽生えにおける組織特異的発現にも関与することを明らかにした。さらに *SRD2* の発現と snRNA 蓄積レベルが植物の発生過程で大きく変動することを示し、その生理的意義を指摘した。

(2) *srd2* と同じく増殖能獲得に関し強い温度感受性を示す *rid1* の責任遺伝子 *RID1* をポジショナルクローニングにより確定し、プレ mRNA スプライシングへの関与が推定される DEAH 型 RNA ヘリカーゼをコードしていることを突き止めた。*srd2* の解析結果と考え合わせ、snRNA 蓄積の増大とそれに依存したスプライシング活性の上昇が増殖能獲得の主要因を構成するという仮説を提示した。このほか、*RID1* の発現パターンが *SRD2* や *CDKA;1* (A クラスサイクリン依存性キナーゼをコード) の発現パターンと類似していることを示し、これらを一括して制御する分子機構の存在を推測した。

(3) *rid2* は、胚軸外植片のカルス形成開始が強い温度感受性を示す一方、根外植片のカルス形成の温度感受性が部分的、局所的となる点に特徴がある変異体で、責任遺伝子 *RID2* はメチルトランスフェラーゼ様タンパク質をコードする。*rid2* の詳細な表現型解析により、カルス形成過程で *RID2* が細胞増殖能の獲得、再開した細胞分裂の活性化・安定化の少なくとも 2 点に作用することを示した。また、*rid2* 変異によって脱分化が阻害された細胞において、核小体キャビティーの拡大と細胞の歪な肥大を観察した。rRNA プロセッシング中間体の解析からは、脱分化の際に rRNA 生合成が盛んになること、*RID2* が rRNA プロセッシングに関与することがわかった。さらに GFP 融合 *RID2* の解析により、*RID2* タンパク質が核に局在し、とくに核小体に集積していることを明らかにした。これらの結果から、

核小体でのRID2による何らかのメチル化反応がrRNAプロセッシングに必要であること、rRNAプロセッシングの破綻に特別に敏感な事象が脱分化時の増殖能獲得と細胞分裂の活性化・安定化に関与することが示唆された。なお、RID2と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子(*BUD23*)が出芽酵母に存在し、この遺伝子を破壊すると増殖遅延などが引き起こされることが知られていたが、相補能検定の結果はRID2と*BUD23*の機能的同一性に関して否定的であった。

(4) 制限温度下でのカルス形成を指標に*rid2*抑圧変異体を単離した(*sriw1*と命名)。*sriw1*の精密染色体マッピングとゲノム塩基配列の解析を行い、機能未知のNACドメインタンパク質ANAC082の遺伝子に抑圧の原因と思われる塩基置換を見出した。*sriw1*ではrRNAプロセッシングの異常は回復していなかったことから、ANAC082がRID2の下流、増殖能・増殖活性制御の現場に近いところで働いている可能性が窺われた。

(5) 遺伝子発現に関する*SRD2*、*RID1*、*RID2*の関係を、それぞれの変異体を用いて調べた結果、これらに上下関係は認められず、脱分化に際して各遺伝子の発現が並行して上昇することがわかった。

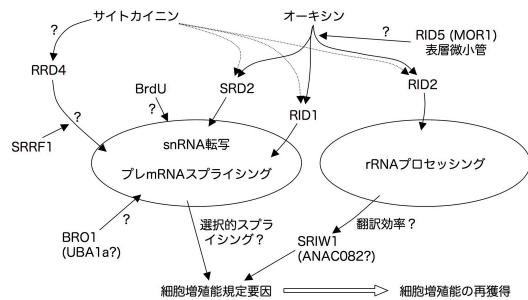
(6) *srd2*変異と*rid1*変異が、いくつかのSRタンパク質mRNAの選択的スプライシングに影響することを見出し、スプライシング活性の低下が遺伝子発現の質的变化をもたらす可能性を示した。さらに*srd2*変異体と*rid1*変異体を材料に、胚軸外植片の脱分化・増殖再開過程での遺伝子発現変化について、スプライシングパターンも検出可能なタイリングアレイによる解析を行い、今後の解析の基礎となる包括的な転写データを取得した。

(7) BrdUのカルス形成に対する作用を詳しく調べた結果、脱分化過程における増殖能獲得段階でBrdUに曝露されると細胞分裂再開直後に分裂が停止することがわかった。このときBrdUがSRタンパク質遺伝子mRNAのスプライシングパターンを変化させたことから、脱分化におけるBrdUの作用点が*srd2*変異や*rid1*変異と同様にスプライシングに関与することが示唆された。

(8) BrdU耐性変異体*bro1*および*bro2*は、それぞれUBP1結合タンパク質のUBA1aをコードする遺伝子、チミジンキナーゼをコードする遺伝子に、BrdU耐性の原因と思われる点変異を有する。これらの遺伝子にT-DNAが挿入された変異体を手し、胚軸脱分化や芽生えの成長に対するBrdUの影響を調べた結果、いずれもBrdU耐性を示すことがわかった。チミジンキナーゼはBrdUをリン酸化し核酸合成系に導くので、これについては予想通りであったが、UBA1aはmRNAのスプライシング効率などに関与することが指摘されて

おり、この結果はBrdU作用点とスプライシングとの関係を暗示するものと考えられた。(9) 新たに2株のBrdU耐性変異体*bro3*と*bro4*を単離し、染色体マッピングによって新規遺伝子座の変異であることを確認した。フルオロデオキシウリジン(FdU)に対する交差耐性もつかどうかを、*bro1*、*bro2*と合わせて解析し、比較した。その結果、FdU耐性のある*bro2*、*bro4*とFdU耐性のない*bro1*、*bro3*の2グループに区分できた。

(10) 得られた結果をまとめ、本研究ではほとんど取り扱わなかった温度感受性変異体*rid5*(脱分化に必要なオーキシン濃度が制限温度下で高くなる、責任遺伝子RID5は微小管結合タンパク質MOR1をコード)と*rrd4*(脱分化がサイトカイニン依存的な温度感受性を示す、責任遺伝子RRD4はG-patchドメインをもつRNA結合タンパク質をコード、抑圧変異体として*srrf1*を単離している)の知見も加味して、脱分化過程での増殖能獲得に関わる経路の概略図を描いた。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 玉置裕章, 小西美稲子, 大門靖史, 相田光宏, 田坂昌生, 杉山宗隆:  
“Identification of novel meristem factors involved in shoot regeneration through the analysis of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis*”, *The Plant Journal*, 57, 1027-1039, 2009, 査読有り
- ② 大谷美沙都, 出村拓, 杉山宗隆:  
“Differential requirement for the function of SRD2, an snRNA transcription activator, in various stages of plant development”, *Plant Molecular Biology*, 66, 303-314, 2008, 査読有り
- ③ 杉山宗隆, 今村建朗: “Dose-, time-, and tissue-dependent effects of 5-bromo-2'-deoxyuridine on the *in-vitro* organogenesis of *Arabidopsis thaliana*”,

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87, 17-25, 2006, 査読有り

[学会発表] (計 35 件)

- ① 大谷美沙都, 杉山宗隆: “植物の発生における snRNA 転写のダイナミズム～シロイヌナズナ *SRD2* 遺伝子の解析を通して～”, 第 50 回日本植物生理学会, 2009 年 3 月 21 日～24 日, 名古屋
- ② 大林祝, 杉山宗隆: “rRNA プロセッシングに関わるシロイヌナズナの新規核小体因子 RID2 の解析”, 第 50 回日本植物生理学会, 2009 年 3 月 21 日～24 日, 名古屋
- ③ 今村建朗, 杉山宗隆: “シロイヌナズナのプロモデオキシウリジン耐性関連遺伝子の解析”, 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20 日～22 日, 札幌
- ④ 春山誠, 大谷美沙都, 杉山宗隆: “シロイヌナズナの snRNA 転写活性化因子をコードする遺伝子 *SRD2* の発現制御に関する解析”, 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20 日～22 日, 札幌
- ⑤ 大谷美沙都, 出村拓, 杉山宗隆: “脱分化と分裂組織新形成に関わるシロイヌナズナ *RIDI* 遺伝子の解析”, BMB 2007, 2007 年 12 月 11 日～15 日, 横浜
- ⑥ 大林祝, 杉山宗隆: “シロイヌナズナの温度感受性突然変異体 *rid2* を用いた脱分化・細胞増殖再活性化過程の解析”, BMB 2007, 2007 年 12 月 11 日～15 日, 横浜
- ⑦ 杉山宗隆, 大谷美沙都: “植物の細胞増殖制御における snRNA 転写調節の意味”, 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006 年 12 月 6 日～8 日, 名古屋
- ⑧ 大谷美沙都, 出村拓, 杉山宗隆: “Developmental significance of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in Arabidopsis”, RNA 2006 Izu, 2006 年 12 月 3 日～7 日, 伊豆の国

[図書] (計 1 件)

- ① 東京大学生命科学教科書編集委員会: “理系総合のための生命科学”, 羊土社, 2007 年, 334 ページ (pp. 269～282 を杉山宗隆が担当)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.bg.s.u-tokyo.ac.jp/koishikawa/research/sugi-lab/sugi-1.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 宗隆 (SUGIYAMA MUNETAKA)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号: 50202130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし