

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291057

研究課題名(和文)植物の器官原基形成初期過程における細胞分裂の制限機構と基本RNA代謝の役割

研究課題名(英文) Roles of fundamental RNA metabolisms in regulatory mechanisms restricting cell division at initial stages of plant organogenesis

研究代表者

杉山 宗隆 (SUGIYAMA, Munetaka)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50202130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物の器官原基形成初期過程における細胞分裂の制限機構に関して、シロイヌナズナの温度感受性突然変異体などを用いた解析を行い、次の知見を得た。側根原基の起源となる内鞘細胞の垂層非対称分裂は、ミトコンドリアが関与する制限を受ける。この制限はミトコンドリアmRNAの代謝異常と高温に対して、特徴的な脆弱性を示す。ミトコンドリアmRNAの代謝異常では、ポリA付加が鍵である。シュート再生時の不定芽原基構築に際しては、CUC-STM経路の抑制的調節と連動して細胞分裂が制限される。リボソームRNA合成の不全は、転写因子のANAC082を介してストレス応答反応を引き起こし、その一環としてこの調節の破綻を招く。

研究成果の概要(英文)：Restriction of cell division at the early stage of plant organogenesis has been studied mostly with temperature-sensitive mutants of Arabidopsis, which has provided the following findings. At the initiation of lateral root primordium development, anticlinal, asymmetric division of pericycle cells is restricted to a few rounds by a mitochondrion-related mechanism. This control is particularly vulnerable to defects of mitochondrial mRNA metabolism and high temperatures. Polyadenylation is a key event in the mitochondrial mRNA defects. When adventitious bud primordia are built during shoot regeneration, cell division is restricted along with repressive control of the CUC-STM pathway. Impairments of ribosomal biosynthesis disrupt these regulations, via the transcription factor ANAC082, as a stress response.

研究分野：植物生理学

キーワード：温度感受性突然変異体 細胞分裂 シロイヌナズナ シュート再生 側根原基 ミトコンドリア リボソームRNA RNA代謝

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物を構成する器官の一つ一つは、それぞれ体のごく限られた領域を元に形成される。一通りできあがった母体の上に新たに器官の原基が形成される場合には、まずこうした器官原基の土台となる領域が局所的な細胞分裂によって生み出される。土台の大きさは必然的に器官の大きさを左右するため、土台形成時の細胞分裂の制御は器官の構築にとってはきわめて重要である。

植物の側根形成は、母体の局所的な細胞分裂で始まる器官新形成の好例である。側根形成では、内鞘細胞の垂層非対称分裂の繰り返しによって生じた小さな細胞の集団が原基の土台となる。この非対称分裂については、その開始の制御を中心に、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析が行われており、非対称分裂開始に關与するオーキシン情報伝達系や転写調節因子、非対称分裂開始の抑制的制御に働く受容体型キナーゼなどが報告されている。しかし、側根原基の大きさを決める上で重要な非対称分裂の回数に関しては、どのような調節がなされているのか、全く分かっていなかった。私たちは、28°C 程度の中高温条件下で帯化した側根を形成するシロイヌナズナの温度感受性突然変異体を 3 種 (*rrd1*、*rrd2*、*rid4*: temperature-dependent fasciation にちなみ TDF 変異体と総称) 単離し、半同調的な側根形成を誘導できる組織培養系を用いて表現型を詳しく調べ、これら TDF 変異体では内鞘細胞の垂層非対称分裂が正しく終結せず、非対称分裂回数が増えた結果、側根原基の土台部分が拡がって側根の帯化に至ることを見出した。また、各 TDF 変異体の責任遺伝子を同定して、*RRD1* が主にミトコンドリアに局在するポリ A 特異的リボヌクレアーゼ (PARN) 様タンパク質、*RRD2* と *RID4* がペンタトリコペプチドリピート (PPR) タンパク質をコードしていることを突き止めた。さらにどの TDF 変異もミトコンドリアの呼吸鎖関連遺伝子の mRNA の異常なポリアデニル化を引き起こすこと、呼吸阻害剤の処理により側根の帯化が起きる、つまり TDF 変異体のフェノコピーが得られることも明らかにした。これらより、呼吸鎖関連遺伝子 mRNA のポリ A 依存的な代謝とそれによって支えられる高い呼吸活性が、側根原基形成に際して細胞分裂を制限し原基基礎部分の大きさを決めている可能性が示された。

シュートの再生過程では、不定芽のシュート頂分裂組織 (SAM) の元となる密な細胞の集団、言わば不定芽の原基がはじめにつくられる。シロイヌナズナのカルスからのシュート再生の場合、この不定芽原基はカルス表面の一部における局所的な細胞分裂の活性化に由来する。私たちは、シュート再生が温度感受性を示すシロイヌナズナの変異体の中から、中高温条件下で不定芽原基が異常に拡

大し SAM を構築できない *rid3* を見出し、その分子遺伝学的解析と表現型解析を行った。シュート再生の解析の結果からは、*RID3* が CUC・STM 経路の遺伝子の発現領域を制限することで、活発な細胞分裂をある範囲に抑え込んでいることが示唆された。ポジショナルクローニングにより、*RID3* は動植物に共通する WD40 リピートタンパク質をコードする遺伝子として同定された。*RID3* によく似たタンパク質には機能の分かっているものがなかったが、ホモロジー解析を丁寧に行った結果、リボソーム RNA (rRNA) 生合成への關与が報告されていた出芽酵母 IPI3 と *RID3* がオルソログの關係にあることが判明した。さらに *rid3* 変異体で温度依存的な rRNA 前駆体の異常な蓄積が認められたことから、*RID3* がプレ rRNA プロセッシングにはたらくことが実験的にも確認された。これらの知見の総合により、不定芽原基の形成時には、rRNA 生合成のレベルの高さが細胞分裂を抑制的に制御し、原基の大きさを調節している可能性が浮上した。

2. 研究の目的

本研究では、植物器官の新形成に際して、細胞分裂を制限し器官原基の大きさを調節する分子機構を、基本 RNA 代謝の役割に注目して解明することを目的とし、この目的を達成するために、次の 2 つの課題を設定した。課題 1: 側根原基形成初発段階における非対称細胞分裂の終結制御とこれに關与するミトコンドリアのポリ A 依存的 mRNA 代謝の解析。課題 2: シュート再生過程において不定芽原基の形成に關わる細胞分裂の抑制的制御と rRNA 生合成との關係の解析。

(1) 課題 1 では、ミトコンドリア mRNA のポリ A 依存的な分解がどのように内鞘細胞の非対称分裂の終結を制御し、その回数を制限しているのかを明らかにすることを目指した。この制御は呼吸活性の調節を介している可能性が考えられたので、mRNA のポリ A 依存的分解と呼吸活性との關係、呼吸活性と不等分裂制御の關係の 2 つに分けて、それぞれの分子的つながりを突き止めることを一つの目標とした。また、このポリ A 依存的 mRNA 分解が、PARN 様タンパク質の *RRD1* と PPR タンパク質の *RRD2* および *RID4* が關与するものであれば、それまでに植物のミトコンドリアで報告されているポリヌクレオチドフォスフォリラーゼ (PNPase) による分解とは、明らかにタイプが異なるので、この点に注目してミトコンドリア mRNA 代謝の新機構を解明することも、本課題のもう一つの重要目標とした。

(2) 課題 2 では、シュート再生過程で不定芽原基が形成される際に rRNA 生合成レベルの変動がどのように細胞分裂域を抑え込むかを、*rid3* などの rRNA 生合成変異体を利用し

て追究した。当研究室における先行研究の結果は、この細胞分裂の制限において CUC・STM 経路の遺伝子発現の抑制が鍵を握っていることを示唆していた。また一方で当研究室では、NAC 型転写因子の一つ ANAC082 の機能欠損がりボソーム関連変異体の表現型を抑圧することを見出していた。これらを踏まえ、rRNA 生合成、リボソーム機能、ANAC082、CUC・STM 経路、細胞分裂の 5 つを互いに結びつけることで、rRNA 生合成レベルによる細胞分裂制御の分子システムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 課題 1 に関しては、以下の方法で研究を実施した。

TDF 変異体から、ミトコンドリア mRNA を単離し、CR-RT-PCR 解析(自己環状化の後に末端部を増幅してクローン化し、各クローンについて塩基配列を解析する方法)を行って、ポリ A 付加の状態に着目して mRNA の代謝動態に対する TDF 変異の影響を調べ、TDF タンパク質のミトコンドリア mRNA 転写後制御における役割を推定した。本研究を企画した時点では、PPR タンパク質の RRD2 と RID4 が PARN 様タンパク質の RRD1 とともに、ポリ A 分解に作用する可能性を考えていたが、その後集積してきた PPR タンパク質の情報から、PPR タンパク質の中でも RRD2 と RID4 が属する PLS 型のグループは mRNA の編集に特化していることが分かってきたので、ポリ A 状態の解析は *rrd1* を優先し、*rrd2* と *rid4* については、それまでに知られていたミトコンドリア mRNA の編集部位の塩基配列解析を行い、部位ごとに編集への影響を調べることにした。

ミトコンドリア局在性ポリ A 付加酵素 AGS1 の機能欠損変異 *ags1-1* を各 TDF 変異体に導入し、中高温条件における不定根の形成・成長を指標に温度感受性を定量的に評価して、TDF 変異の影響がポリ A 付加に依存するかどうかを検討し、ミトコンドリア mRNA 転写後制御の相互関係を推定した。

組換え RRD1 タンパク質を調製して、ポリ分解活性を調べ、RRD1 単独でポリ A 分解能をもつかどうかを検討した。

TDF 変異体のミトコンドリアを単離して、ミトコンドリアのタンパク質機能や mRNA 代謝活性を生化学的に解析することを試みた。

側根原基形成時に、TDF 変異はミトコンドリア mRNA の代謝異常を引き起こし、それが呼吸の不全を介して、内鞘細胞の非対称分に立ち、側根原基形成過程での呼吸活性の変動を測定することを試みた。

TDF 変異から呼吸不全まで、また呼吸不全から細胞分裂制御の破綻までの分子経路

を分子遺伝学的に解析することを計画した。その第一歩として、TDF 抑圧変異体(TDF 変異の表現型への影響が緩和される変異体)および呼吸阻害剤低感受性変異体(呼吸阻害剤で処理しても帯化が見られない変異体)の単離を試みた。

(2) 課題 2 に関しては、以下の方法で研究を実施した。

本研究以前にシュート再生に関わる解析を行っていた rRNA 生合成関連変異体は *rid3* のみであったので、他の rRNA 生合成関連変異体 2 種、*rid2* (当研究室で単離したメチルトランスフェラーゼ遺伝子の温度感受性変異体)および *rh10* (名古屋大学町田研究室で *as2* 昂進変異体として単離された RNA ヘリカーゼの変異体)について、シュート再生の表現型を調べるとともに、シュート再生過程における *CUC1*、*STM* などの発現を定量的 RT-PCR などによって調べ、rRNA 生合成不全が共通して引き起こす事象を確認した。

ANAC082 の機能欠損変異は、もともとは *rid2* の抑圧変異 *sriw1* として見出したもので、抑圧効果の解析は *rid2* の、それもカルス形成を中心としていた。この *sriw1* 変異の効果を、*rid3*、*rh10* も加え、シュート再生過程に着目して調べて、rRNA 生合成不全がシュート再生にもたらす影響と ANAC082 との関係を検討した。

定性的には ANAC082 の発現が *rid2* 変異によって上昇することが分かっていたので、この発現上昇が rRNA 生合成不全に共通して見られるのかどうか、どの程度の発現上昇があるかを、*rid3* 変異体を材料に加えて定量的 RT-PCR により検討した。

sriw1 単独変異体の表現型を、とくに核小体ストレスを誘導することが知られている薬剤への感受性を中心に調べ、その結果から ANAC082 のストレス応答仲介因子としての役割を推定した。

4. 研究成果

(1) 課題 1 に関しては、次の成果が得られた(番号は研究方法の項目に対応)。

cox1 の mRNA について CR-RT-PCR 解析を行い、野生型ではポリ A テールをもつ mRNA がほとんどないのに対し、*rrd1* 変異体では約半数の mRNA がポリ A テールを有し、その長さは最長で 20 ヌクレオチド程度であること、*rrd1* と野生型とでポリ A テールの有無以外に mRNA 末端構造の違いはないことを明らかにした。この結果から、ミトコンドリア mRNA 代謝における RRD1 の役割が、ポリ A の特異的分解にあることが示された。また、ミトコンドリア mRNA で知られていた編集部位のほぼ全てについて、*rrd2* および *rid4* と野生型との間で、塩基配列の比較解析を行ったところ、*rid4* 変異体においては *atp4*

mRNA の 1 ヶ所、*rpl5* mRNA の 2 ヶ所、*rps3* mRNA の 1 ヶ所、*rps4* mRNA の 2 ヶ所の計 6 ヶ所で編集が起きなくなっていた (*rrd2* 変異体ではまだ明瞭な編集不全を見出しておらず、従来知られていなかった部位での編集に RRD2 が関わっていることも想定して、解析を続行している)。これより、RID4 は他の PLS 型 PPR タンパク質と同様に、特定の mRNA 編集にはたらくことが示された。ミトコンドリア mRNA のポリアデニル化は *rrd1* 変異体だけでなく *rrd2* と *rid4* でも見られたことから、(少なくとも *rid4* では)mRNA の編集不全がポリアデニル化を引き起こす要因となっていることが考えられた。

ミトコンドリア mRNA のポリアデニル化活性を低下させる *ags1-1* 変異の導入により、*rrd1*、*rrd2* とともに不定根形成・成長の温度感受性が著しく緩和された。*rid4* においても、弱い変異アレルの *rid4-2* を用いることで、*ags1-1* による温度感受性の緩和が認められた。また、*ags1-1* の効果はヘテロ接合でも部分的には見られ、半優性であった。これらの結果より、どの TDF 変異体においても、AGS1 によるミトコンドリア mRNA のポリアデニル化とその程度が、温度感受性の鍵となっていることが示された。とくに *rrd2* と *rid4* の実験結果からは、mRNA 編集の不全がポリ A 付加状態の変更を介して発生・成長に影響する、という意外な経路が示唆された。

組換え RRD1 タンパク質は、どのような発現系においても、発現量が低い上に不溶化しやすく、調製するのがきわめて困難であったが、最終的に C 端に Asp を 9 残基追加して可溶性を改善することで、微量ながら調製できた。蛍光標識ポリ A⁺ RNA を基質として、この組換え RRD1 タンパク質のポリ A 分解活性を調べた。陽性対照には、RRD1 と同様の方法で調製した組換えヒト PARN タンパク質を用いた。実験の結果、ヒト PARN では高いポリ A 分解活性が見られたが、RRD1 には全くポリ A 分解活性が検出されなかった。これより、RRD1 は単独ではポリ A 分解能をもたず、ポリ A の分解に他の補助因子を必要とすることが示唆された。

野生型および *rrd1* 変異体から、液体培養細胞を誘導し、ミトコンドリアを単離する実験系を確立した。*rrd1* の液体培養細胞の増殖を標準温度と中高温で野生型と比較したところ、温度感受性を示したことから、RRD1 がこの培養細胞でもはたらいていることが分かった。培養細胞から単離したミトコンドリアを材料に、タンパク質複合体のブルーネイティブ PAGE による予備的分析を行い、良好な分離パターンを得た。これらの結果から、この培養細胞を使った実験系がミトコンドリアの生化学的解析に有用であることが確認された。

酸素濃度イメージングシステム Visisens を用いて、側根原基形成時の呼吸活性を測定

することを試みた。側根形成を誘導した根の断片と誘導していない根の断片を少量の液体とともに封じ、根断片周辺の液体の酸素濃度が低下する速度を比較測定することで、側根原基形成に伴うと思われる呼吸活性の増大を捉えることができた。しかし、側根原基そのものの呼吸活性を調べるには、空間分解能が不十分であった。空間分解能の改善のために、液体中での酸素の拡散による“ぼけ”を補正することを考え、補正プログラムの構築に着手したが、まだ完成していない。

TDF 抑圧変異体単離の手始めとして、*rrd2* を EMS で処理して突然変異を誘発し、その後代に対し、中高温条件での芽生えの成長を指標としたスクリーニングを行った。一次、二次のスクリーニングを経て、*rrd2* 抑圧変異体候補を 8 株得た。呼吸阻害剤低感受性変異体の選抜に当たっては、まず呼吸阻害剤処理による側根帯化の誘導率を十分に高める必要があった。処理条件を検討した結果、呼吸阻害剤と温度が側根帯化に関して相乗効果をもつことが分かり、この発見をもとに、中高温で呼吸阻害剤を投与したときに帯化側根が生じるかどうかを基準とするスクリーニング系を確立した。また、条件検討の過程で、34°C 程度の高高温では、呼吸阻害剤や TDF 変異によらず、温度の影響のみで内鞘細胞の非対称分裂が過剰となることを見出した。

(2) 課題 2 に関しては、次の成果が得られた (番号は研究方法の項目に対応)。

rid2 変異体の胚軸外植片から様々な温度でシュート再生を誘導して、外植片の形態、*CUC1* や *STM* の遺伝子発現を調べ、野生型および *rid3* と比較した結果、*rid2* においても、*rid3* と同様に、プレ rRNA プロセッシングの異常が見られる中高温条件で、*CUC1* と *STM* の発現の著しい増大、不定芽原基形成時の細胞分裂の脱抑制が起きることが分かった。*CUC1* については、レポーター遺伝子を用いた空間的発現パターンの解析もを行い、*CUC1* 発現域の拡大と細胞分裂の脱抑制が密接に関連していることも示した。*rh10* 変異体に関しては、RNA ゲルプロット解析により rRNA 前駆体の蓄積を調べ、温度依存的なプレ rRNA プロセッシングの不調を確認した上で、シュート再生過程における *CUC1*、*STM* の発現量を測定し、中高温条件での発現増大を確認した。これらの結果より、シュート再生過程で本来 CUC-STM 経路の遺伝子発現と細胞分裂を適度に制限して不定芽原基形成を実現する抑制的制御機構が、rRNA 生合成の不全によって一般に破綻することが明らかになった。

rid2、*rid3*、*rh10* の各変異体に *ANAC082* の機能欠損変異 *sriw1* を導入し、様々な温度でシュート再生を誘導して、*sriw1* 変異の影響を調べた。その結果、いずれの変異体でもシュート再生の温度感受性が *sriw1* 変異によ

って緩和され、中高温条件でも正常な不定芽原基を形成できるようになることが分かり、rRNA 生合成不全と不定芽原基形成時の細胞分裂制御の破綻とを結ぶ経路で、ANAC082 が必須の仲介因子となっていることが示された。

rid2 と *rid3* における ANAC082 の発現レベルは、標準温度の 22°C では野生型の 1.5 倍前後であり、中高温の 28°C に曝露すると、この差が 2 倍前後に拡大した。ANAC082 発現の増大は、rRNA 生合成の不全の程度と概ね対応していた。これより、rRNA 生合成不全が ANAC082 の発現を高めることが示された。

通常の発生過程には、rRNA 生合成のレベルの高さに応じて細胞分裂を抑制的に制御する仕組みが組み込まれており、それを ANAC082 が仲介しているとするれば、*sriw1* 単独変異体には何らかの発生異常（例えば、シュート再生過程で不定芽原基形成時の細胞分裂が低下するなど）が見られるはずである。しかし、*sriw1* 単独変異体は、シュート再生を含め、調べた限りの発生形質に関し、とくに異常を示さなかった。一方、動物で rRNA 生合成に干渉し核小体ストレスの原因となることが知られているアクチノマイシン D、5-フルオロウラシル、カンプトテシンについて、胚軸片からのカルス形成に与える影響を野生型と *sriw1* とで比較した結果、*sriw1* の感受性がやや低いことが判明した。さらにリボソームの翻訳機能を阻害するシクロヘキシミドとピューロマイシンに対する感受性も、*sriw1* の方が野生型よりやや弱かった。これらの結果から、ANAC082 の役割は、リボソームの生合成や機能の不調が起きたときに、ある種のストレス応答を発動することであると推定された。

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6件)

Munetaka Sugiyama (2015) Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *Journal of Plant Research* 128: 349-359. DOI: 10.1007/s10265-015-0706-y 査読有り

Naoki Shinohara, Iwai Ohbayashi, Munetaka Sugiyama (2014) Involvement of rRNA biosynthesis in the regulation of *CUC1* gene expression and pre-meristematic cell mound formation during shoot regeneration. *Frontiers in Plant Science* 5: Article 159. DOI: 10.3389/fpls.2014.00159 査読有り

Munetaka Sugiyama (2014) Molecular genetic analysis of organogenesis in vitro with temperature-sensitive mutants. *Plant*

Biotechnology Reports 8: 29-35. DOI: 10.1007/s11816-013-0292-1 査読有り

[学会発表](計16件)

間宮章仁, 大塚蔵嵩, 山本荷葉子, 八木祐介, 中村崇裕, 野崎守, 佐藤康, 上田貴志, 蜂谷卓士, 野口航, 平山隆志, 杉山宗隆: シロイヌナズナの側根原基形成における非対称細胞分裂の終結制御とミトコンドリア機能および温度との関係. BMB2015, 2015年12月1日~4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

大林祝, 篠原直貴, 林忠逸, 玉置裕章, 松村葉子, 町田泰則, 杉山宗隆: シロイヌナズナのシュート再生に対する rRNA 生合成関連変異の影響. 日本植物学会第79回大会, 2015年9月6日~8日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bg.s.u-tokyo.ac.jp/common/research/sugi-lab/index.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