

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07115

研究課題名(和文) 静止中心特異的なリボソーム量制御機構の存在とその機能の解明

研究課題名(英文) Quiescent center-specific regulation of ribosome levels and elucidation of its developmental function

研究代表者

堀口 吾朗 (HORIGUCHI, Gorou)

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：70342847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の根端分裂組織の中心部に存在する静止中心は、細胞増殖活性が極めて低く保たれている。そのためには、リボソームの蓄積量も低く保たれる必要があると考えられる。本研究では、リボソームタンパク質とGFPの融合タンパク質を用いて、少なくとも幾つかのリボソームタンパク質が静止中心特異的に低蓄積になること、サイトカイニンやブラシノステロイドはそれを打破することを見出した。また、このようなリボソームタンパク質量の制御には、静止中心でのリボソーム合成の抑制と根端分裂組織全体で余剰のリボソームタンパク質を排除する二重の仕組みが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Quiescent center (QC) resides in the center of a root apical meristem and has a very low mitotic activity. To establish this quiescence, the amount of ribosomes is assumed to be maintained at a low level. In this study, overexpression of ribosomal protein fused with GFP revealed that at least several distinct ribosomal proteins are maintained at a low level in the QC cells. This regulation is counteracted by the exogenous application of brassinosteroids or cytokinins. In addition, such quantitative regulation of ribosomal proteins requires two mechanisms: one of them suppresses ribosome production in the QC cells and the other eliminates ribosomal proteins produced in excess in entire root apical meristem.

研究分野：植物発生学

キーワード：シロイヌナズナ 根端分裂組織 静止中心 リボソームタンパク質 RPL4D ブラシノステロイド

### 1. 研究開始当初の背景

植物の根端分裂組織は根の細胞の供給源として働く。その中央部には、分裂活性が非常に低い静止中心が存在し、それに直接接する細胞が幹細胞として働く。幹細胞が分裂してできる片方の細胞が transit amplifying (TA) cell として活発な細胞分裂を行い、組織形成を進める。静止中心は、その周囲の細胞を幹細胞として維持する役割だけでなく、幹細胞がストレスによって細胞死を起こした場合には、新たな幹細胞を生み出すリザーブとしての働きも持つ。したがって、静止中心の細胞増殖活性制御機構を明らかにすることは、根端分裂組織がいかに制御されているかを理解するうえで、重要な位置を占める。

根の静止中心が非常に低い細胞増殖活性を示すことは 1960 年代から知られているが、その制御機構は 2000 年代になって、シロイヌナズナの突然変異株を用いて明らかになり始めた。これらの解析は細胞周期の制御やそれに対する各種の植物ホルモンの効果に焦点が置かれている。

細胞増殖には細胞周期制御が中心的な役割を果たすことが明らかになりつつある一方、これと同時に細胞はそのサイズを倍加させなければならない。この細胞成長の大部分を占めるのはリボソームの新規合成であるが、リボソーム量の制御と静止中心の不活性な細胞増殖との関係については、ほとんど解析例がない。1960~90 年代にかけて、静止中心ではリボソーム生合成の場である核小体のサイズが小さいこと、rRNA の蓄積量が少ないことが数例報告されているのみである。根端分裂組織内で、静止中心、幹細胞、TA 細胞の増殖制御機構を理解するには、リボソーム量の制御機構を明らかにすることが必要不可欠であると考えられるが、この点は従来の解析から見落とされてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、静止中心におけるリボソーム量の制御機構を明らかにするため、その構成因子であるリボソームタンパク質に注目した。幾つかのリボソームタンパク質を GFP で標識し、その根端分裂組織における蓄積パターンを明らかにすること、また、その蓄積量の制御に関わる因子を見いだすこと、リボソーム量の蓄積量を制御する機構の一端を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究を始める前に確立されていた  $p35S::RPL4D-GFP/rpl4d$  系統では、根端分裂組織で全体的に強い GFP 蛍光を示すが、静止中心では、それが非常に弱いことが明らかになっていた。このことから、RPL4D が静止中心では低蓄積になるような制御を受けていることが示唆される。そこで、この制御に、転写レベル、転写後レベルの制御が関わっているか否かを解析するために、 $pRPL4D::GUS$ 、

$p35S::3xGFP$ 、 $p35S::RPL4D-GFP$  の根端分裂組織における発現パターンを解析した。

(2) RPL4D-GFP が低蓄積になる現象を制御する要因を明らかにするため、 $p35S::RPL4D-GFP$  系統を各種ホルモンや薬剤で処理し、RPL4D-GFP の蓄積パターンに変化が生じるかを観察した。

(3) 上記の実験からは必ずしも具体的な因子の特定に至らない可能性がある。そこで、野生型に  $pWOX5::RPL4D-GFP$  および  $pWOX5::GUS$  を導入し、静止中心で特異的に RPL4D-GFP の蓄積が観察できる系統を用意した。この系統では  $pWOX5$  の活性それ自体を GUS で観察できるようにした。この系統に突然変異処理を施し、静止中心で GFP 蛍光が強くなる系統の探索を行った。

(4) 以上の方法は、RPL4D-GFP の動態を解析しており、RPL4D-GFP のみが特殊な制御を受けているのか、RP 全般に静止中心では低蓄積になるのかを明らかにすることはできない。そこで、以下の実験を行った。シロイヌナズナの数種のリボソームタンパク (RP) 質欠損変異株を用意し、それに野生型の RP と GFP の融合タンパク質をコードする遺伝子を過剰発現させる系統を作成した。これらの系統が RP 欠損に伴う形態的変異 (葉の形状変化や根の伸長不良) を相補するかを確認した。相補が確認された系統について、根端分裂組織の RP-GFP の蓄積パターンを観察した。

(5) また、RP が静止中心で低蓄積になる要因について、リボソームに組み込まれず、余った RP が分解されている可能性が示唆された。リボソーム生合成自体が静止中心で不活性であるかを検討するため、リボソーム生合成関連遺伝子 *OLIGOCELLULA2 (OLI2)*、*G-PATCH DOMAIN PROTEIN1 (GDP1)* について

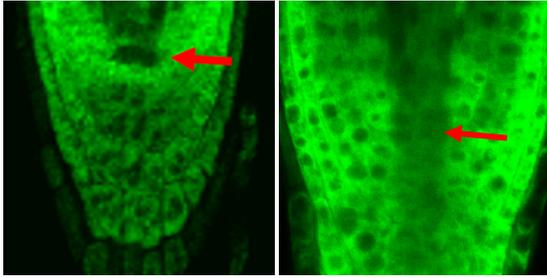
$pOLI2::GFP-OLI2/oli2$  と

$pGDP1::GDP1-GFP/gdp1$  を作成し、根端分裂組織における GFP 蛍光のパターンを解析した。

### 4. 研究成果

(1)  $p35S::RPL4D-GFP$  は根端分裂組織の大部分で非常に強い蛍光を示す。ところが、静止中心では GFP 蛍光が極めて弱い。一方、 $p35S::3xGFP$  は静止中心でもその周囲と同様に GFP 蛍光が観察された。このことは、*RPL4D-GFP* 遺伝子が静止中心内で転写された後のステップで発現抑制を受けていることを示す。また、 $pRPL4D::GUS$  は静止中心でも発現しており、細胞種特異的な遺伝子発現データベースの解析からは、*RPL4D* やそれ以外の RP 遺伝子の mRNA もやはり静止中心で高レベルで蓄積することが明らかになった。そのため、内在性の *RPL4D* 遺伝子も転写後レベルで発現抑制を受けることが示唆された。

(2) RPL4D-GFP を低蓄積にする制御経路について検討したところ、植物ホルモンの brassinosteroid およびサイトカイニン処理によって、静止中心で RPL4D-GFP の蛍光強度が高まることが明らかになった(下図)。



brassinosteroid 未処理(左)、処理済み(右)の RPL4D-GFP 系統の根端分裂組織。矢印は静止中心の位置を示す。

従って、通常の生育条件下では、静止中心においてこれらのホルモンの情報伝達系の抑制的な制御が重要である可能性が示唆された。これらのホルモンは静止中心において細胞分裂を誘導することがすでに知られている。静止中心の細胞増殖活性制御において、これらのホルモンが細胞周期を動かした結果、リボソーム合成が進むのか、その逆か、あるいは両者が独立に制御されるのかを解析することが今後重要である。

また、ショ糖はリボソーム合成を促進することが知られている。そこで、濃度の異なるショ糖を含む培地で p35S::RPL4D-GFP を生育させ、観察した。その結果、低濃度のショ糖を含む培地では RPL4D-GFP の蛍光が根端分裂組織全体で強まることが明らかになった。この結果は、低濃度のショ糖を含む培地ではリボソーム合成が不活発であるため、内在性の RPL4 と RPL4D-GFP がリボソームに取り込まれる際の競合が弱くなったと考えれば説明できる。逆に、高濃度のショ糖存在下では RPL4D-GFP がリボソームに取り込まれ遊離状態になる割合が高まり、それらが積極的に分解を受ける可能性が示唆される。すなわち、根端分裂組織全体で余剰の遊離 RP を積極的に排除する機構の存在が示唆される。

(3) pWOX5::RPL4D-GFP/pWOX5::GUS 系統に突然変異を誘発し、RPL4D-GFP の蛍光強度が高まる突然変異株を複数得た。これらのうち、pWOX5::GUS のシグナルも強くなった系統は、pWOX5 のプロモーター活性に影響を与える変異株であるので除外した。それ以外の系統は、RPL4D-GFP の蓄積量の制御に関わる候補として今後貴重な材料となることが期待される。

(4) RPL4D はリボソームの 60S サブユニットの構成因子である。これ以外の RP もまた RPL4D と同様の制御を受けるのか否かを明らかにするために、40S および RPL4D 以外の 60S サブユニットの構成因子の欠損変異株を多数揃えた。それらに順次、p35S::RP-GFP を導入したところ、変異を相補できる系統が得られた。これらの系統でも、根端分裂組織の GFP

蛍光は全般的に非常に強いにもかかわらず、静止中心ではそれが非常に低く保たれていた。従って、少なくとも 40S および 60S サブユニットの複数の構成因子が静止中心では低蓄積になるように制御を受けることが明らかになった。

(5) pOLI2::GFP-OLI2/oli2, pGDP1::

GDP1-GDP1/gdp1 系統は、それぞれの変異株の表現型を相補した。これらの系統の根端分裂組織では、GFP-OLI2, GDP1-GFP は根端分裂組織の細胞で強く発現し、細胞内では核小体に局在していた。ところが、静止中心やそれを取り巻く幹細胞では GFP 蛍光が非常に低レベルになっていた。これらの結果から、静止中心ではリボソーム合成そのものが不活発である可能性が示唆された。これと(2)の結果を合わせると、静止中心ではリボソーム合成が周囲の細胞に比べ不活発で、余剰の RP ができる割合が高く、それらが積極的に排除されるので、静止中心特異的に RP が低蓄積になる可能性が示唆された。本研究が行われる前までは、リボソームタンパク質量の制御機構は植物ではほとんど知られておらず、その発生における役割はまったく不明であった。今回の研究によって、根端分裂組織内において空間的に精密なリボソームタンパク質量の制御機構が存在することが明らかになった。今後、この制御に関わる遺伝子やタンパク質を特定し、それらの機能を解明することで、根端分裂組織の形成と維持の仕組みについて新たな知見が得られるものと期待される。

## 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2件)

Kojima, K., Tamura, J., Chiba, H., Fu kada, K., Tsukaya, H. Horiguchi, G. Two nucleolar proteins, GDP1 and OLI2, function as ribosome biogenesis factors and are preferentially involved in promotion of leaf cell proliferation without strongly affecting leaf adaxial-abaxial patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* (2018), 8, 2240. doi: doi.org/10.3389/fpls.2017.02240, 査読有

堀口 吾朗, リボソームの生合成と植物の発生, *生物科学*, 2017 年, 68 巻, 232-239, [http://www.ruralnet.or.jp/seibutsu/068\\_04.htm](http://www.ruralnet.or.jp/seibutsu/068_04.htm), 査読有

[学会発表](計7件)

Horiguchi, G., Ohbayashi, I., Sugiyama, M., Tsukaya, H. A quartet of NAC transcription factor genes is

upregulated in response to abnormal ribosomal proteins and enhances leaf abaxialization in *asymmetric leaves2*. 第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年  
Horiguchi, G., Tsukaya, H. How mutations in ribosome-related genes affect leaf adaxial-abaxial patterning in *Arabidopsis thaliana*. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2017

堀口 吾朗、大林 祝、杉山 宗隆、塚谷 裕一、シロイヌナズナにおける *as2 rp14d* の葉の背軸化には 4 つの NAC 型転写因子遺伝子が関わる、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年

Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Nakata, M., Tsukaya, H. Mutations in ribosomal protein genes induce the expression of NAC transcription factor gene, *SUZAKU1*, and promote leaf abaxialization in *asymmetric leaves2*. The 27<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research, 2016

Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Takahara, M., Nakata, M., Tsukaya, H. Leaf abaxialization in *rp14 as2* mutants requires aberrant *rp14* transcript accumulation, a RING finger protein gene *SZK2*, and upregulation of a NAC transcription factor gene *SZK1*. 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年  
深田 かなえ、塚谷 裕一、堀口 吾朗、リボソーム生合成関連因子 GDP1 と OLI2 が葉の発生に果たす役割の解析、日本植物学会第 80 回大会、2016 年

Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Nakata, M., Tsukaya, H. *SUZAKU1*, a NAC-domain transcription factor gene promotes leaf abaxialization in response to *as2*-enhancer mutations in *Arabidopsis thaliana*. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.rikkyo.ac.jp/web/horiguchi/plant/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀口 吾朗 (HORIGUCHI, Gorou)

立教大学・理学部生命理学科・准教授

研究者番号：7 0 3 4 2 8 4 7