

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370015

研究課題名（和文） 植物細胞の脱分化過程における増殖能再獲得の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms underlying reacquisition of proliferation competence during dedifferentiation 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（和文）：胚軸の脱分化に関して強い温度感受性を示すシロイヌナズナの突然変異体を用いた分子遺伝学的解析により、プレ mRNA スプライシング因子および rRNA 生合成因子のレベルが植物細胞の増殖能を規定しており、脱分化過程での増殖能再獲得にはこれらの因子の増大が必要であること、この増殖制御に NAC 転写因子による増殖抑制が関与すること、細胞増殖に要求されるプレ mRNA スプライシング能力はサイトカイニン濃度に応じて変化することが示された。

研究成果の概要（英文）：The molecular genetic analysis of Arabidopsis mutants temperature-sensitive for hypocotyl dedifferentiation has shown that the levels of pre-mRNA splicing and rRNA biosynthesis factors limit the competence of plant cell proliferation, whose reacquisition during dedifferentiation involves increase of these factors, that this control of cell proliferation is mediated by the suppression of proliferation by a specific NAC transcription factor, and that the capacity of pre-mRNA splicing required for cell proliferation varies dependently on cytokinin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：脱分化、細胞増殖能、プレ mRNA スプライシング、rRNA 生合成、NAC 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

植物は高度で複雑な多細胞体制を発達させているが、一方で高い再生能力を有し、相当に重篤な発生の攪乱にも柔軟に対応できる。その基盤となっているのは、細胞分裂と細胞分化の可逆的な調節である。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際には、脱分化して増殖能を獲得する段階を経る必要がある。組織培養では一般に、この段階は植物ホルモン、とくにオーキシンとサイトカイニンによって制御される。ここで植物ホルモ

ンの刺激がどのように増殖能を励起するかは、植物の発生を理解する上でも、きわめて重要な問題と考えられる。しかし、従来の脱分化研究では増殖能の獲得とその後に起きる細胞分裂活性化の区別すら必ずしも意識されておらず、分裂再開の前段階に関する分子レベルの知見と言え、ほとんどクロマチン脱凝縮に限られていた。

私たちは、本研究開始時まで、シロイヌナズナのカルス形成に関わる温度感受性突然変異体 *srd2*、*rid1*、*rid2*、*rrd4* などを糸口に、脱分化とその植物ホルモンによる制御に関与すると思われる遺伝子の同定を進めていた。これらの変異体は、胚軸のカルス形成開始が強い温度感受性を示す一方、根のカルス形成はあまり影響を受けないという特徴を共有し、この表現型より、各変異は胚軸の脱分化過程には含まれ、根の脱分化過程には含まれない、細胞増殖能の再獲得を妨げると考えられた。責任遺伝子については、*SRD2* は snRNA 転写活性化因子、*RID1* は DEAH ボックス RNA ヘリカーゼ、*RID2* はメチルトランスフェラーゼ様タンパク質、*RRD4* は G パッチドメインタンパク質をコードしていることがわかっていて、このうちタンパク質の機能が実証できていたのは *SRD2* と *RID2* で、前者は主としてスプライソソーム snRNA の生産に、後者はプレ rRNA プロセッシングにはたらくことが明らかになっていて、*RID1* と *RRD4* については、配列情報からプレ mRNA スプライシングに関与する可能性が推定されていた。

このほか、チミジン類似体のプロモデオキシウリジン (BrdU) が脱分化時の増殖能再獲得に影響することを見出し、BrdU 耐性変異体 *bro1* の解析からこの BrdU 作用に関わる遺伝子の候補もとらえつつあった。興味深いことに、この候補遺伝子がコードするタンパク質 UBA1a については、かつて RNA 結合能とプレ mRNA スプライシング活性への影響が報告されていた。

以上のように、私たちが分子遺伝学的に同定した (同定しつつあった)、細胞増殖能再獲得にはたらく因子は、そのほとんどがプレ mRNA スプライシングや rRNA プロセッシング、つまり基本的な RNA プロセッシングとの関係が窺われるものであり、脱分化における RNA プロセッシングの重要性を強く示唆していた。さらに *rid2* の抑圧変異として見出した *sriw1* が *rid2* だけでなく *rid1* や *srd2* のカルス形成の温度感受性も抑圧することを発見し、*SRIW1* が NAC 転写因子 ANAC082 をコードする遺伝子であったことから、ANAC082 が RNA

プロセッシングと脱分化過程での細胞増殖能再獲得とを結びつける共通の鍵となっている可能性も浮上していた。

## 2. 研究の目的

植物細胞の多くは分裂組織から離脱した後、分化して増殖能を失う。このような細胞は、脱分化により増殖能を再獲得して初めて細胞分裂を再開できる。私たちは、シロイヌナズナのカルス化に関わるいくつかの突然変異体とその抑圧変異体の解析から、プレ mRNA スプライシングや rRNA プロセッシングといった基本的な RNA プロセッシングのレベルの増大が、NAC 転写因子 ANAC082 による増殖制御を介して、この増殖能の再獲得をもたらしている、と考えるに至った。本研究では、これを踏まえ、ANAC082 の機能と発現に注目しつつ、RNA プロセッシングに依存した増殖能の制御を追究することで、脱分化の分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

シロイヌナズナの RNA プロセッシングに関わる (と考えられる) 温度感受性変異体 *srd2*、*rid1*、*rid2*、*rrd4* と BrdU 耐性変異体 *bro1*、*rid2* 抑圧変異体 *sriw1* の分子遺伝学的解析を起点に、脱分化過程で細胞増殖能が再獲得される機構を追究することを基本方針とし、研究計画は次の 3 つを柱とした。第一に、各変異体の責任遺伝子の一次機能および BrdU の作用機作を推定し、分子レベルでの検証を行って、個々の RNA プロセッシング事象と関係づけること。第二には、これらの遺伝子の発現や機能に対する植物ホルモンの作用を検討して、植物ホルモンによる RNA プロセッシング活性の調節を明らかにすること。第三に、RNA プロセッシングに依存して増殖能の制御に働く主要因子を特定すること。この増殖能因子としては、*sriw1* の解析から鍵を握る役割が示唆されていた ANAC082 にとくに注目し、これを中心に解析を進めた。

## 4. 研究成果

*SRD2* は snRNA 転写活性化因子をコードしており、*srd2* 変異体ではスプライソソーム snRNA の蓄積量が減少することもわかっていて、*srd2* と *rid1* は、胚軸からのカルス形成の温度感受性に限らず、表現型上の特徴がよく一致しており、*SRD2* と *RID1* は同じ素過程に作用することが推定された。*RID1* は出芽酵母の Prp22 に類似した配列をもつ DEAH ボックス RNA ヘリカーゼをコードしており、Prp22 の機能から類推して、プレ mRNA スプ

ライシングの最終段階（切り出されたイントロンの遊離）にはたらくと考えられたが、Prp22 の一部のドメインが RID1 には存在しないなど、無視できない違いもあった。実際に出芽酵母の *prp22* 変異体に *RID1* を導入して発現させる実験では、増殖が相補されず、Prp22 と *RID1* の機能が同一でないことが示された。一方、*rid1* 変異体の細胞に、イントロン保有レポーター遺伝子を導入し、レポーター遺伝子転写物からのイントロン除去効率を調べたところ、温度依存的な除去効率の低下が認められ、*RID1* がスプライシングに関与することが示された。また、スプライシングバリエーションが知られている転写物について、スプライシングパターンを野生型と *rid1* 変異体と比較した結果、*rid1* 変異がイントロンの除去だけでなく、スプライス部位の認識にも影響することがわかった。*RID1*-YFP キメラタンパク質が主に核小体に局在していたことも考え合わせ、*RID1* は snRNP 生成を通してプレ mRNA スプライシングに関わると推論した。これらの知見より、*SRD2* と *RID1* に共通するはたらきが、スプライシングであることも確認された。

カルス形成の起源となる組織は、根でも胚軸でも中心柱である。中心柱における *SRD2* の発現は根と胚軸で大きく異なり、変異体のカルス形成開始の温度感受性から示された細胞増殖能の差と対応していることがわかってきた。つまり、増殖能が高く保たれている根の中心柱では *SRD2* の発現が高く保たれているのに対し、増殖能を失っている胚軸の中心柱では発現が低い。また、胚軸断片をカルス誘導培地で培養すると、植物ホルモン（主としてオーキシン）と傷害にตอบสนองし、細胞分裂の活性化に先立って、中心柱で発現が上昇する。*RID1* の発現を調べた結果、*RID1* も *SRD2* 同様に、細胞増殖能とよく対応した発現パターンを示すことが確認された。この結果から、複数のプレ mRNA スプライシング因子のレベルが協調的に変動して、増殖能が調節されていることが示唆された。*SRD2* に関してはプロモーター解析も行い、植物ホルモン応答を含む基本的な発現制御に必要なシス領域を、75 bp にまで絞り込んだ。

胚軸の脱分化に伴う *SRD2* と *RID1* の発現上昇は、ともにプレ mRNA スプライシング能力を高めることで、細胞増殖能の再獲得に寄与していると考えられたので、スプライシングと増殖能をつなぐ分子ネットワークを探る一環として、胚軸脱分化過程での転写物の変動とそれに対する *srd2* 変異および *rid1*

変異の影響について、タイリングアレイによる網羅的解析を行った。その結果、どちらの変異の影響も受ける、共通の下流分子としていくつかの転写因子を見出したほか、*rid1* 変異の影響下で特異的に現れる新しい転写ユニットを多数同定することができた。

*RRD4* は、真核生物に広く保存された G パッチドメインタンパク質をコードしている。近年動物の *RRD4* ホモログの機能解析が進み、スプライシングへの関与が明らかになってきた。そこで、スプライシングパターンへの *rrd4* 変異の影響を調べたところ、*RRD4* もスプライシングに関与することが示唆された。*rrd4* の脱分化の温度感受性がサイトカニン濃度に依存することが以前にわかっていたので、*srd2* と *rid1* についてもサイトカニン濃度依存性を調べた。その結果、この性質がスプライシング関連変異体に共通して見られることが判明した。これより、細胞増殖に必要なスプライシング能力のレベルが、サイトカニン濃度によって変化することが示された。

*rid2* はプレ rRNA プロセッシングに欠陥をもち、rRNA 前駆体の蓄積と核小体の著しい拡大を特徴とする。*rid2* の表現型には一部独特の面もあるが、根のカルス形成開始に比べて胚軸のカルス形成開始がはるかに強い温度感受性を示すという点では、*srd2*、*rid1*、*rrd4* と似ている。同様の温度感受性の差は、RNA ヘリカーゼ 10 の欠陥により温度依存的なプレ rRNA プロセッシング不全を示す変異体 *east2-1*（名古屋大・町田研究室で *as2* エンハンサーとして単離された変異体）でも認められた。*RID2* の発現パターンは、細胞増殖能を保持している根の中心柱で高く、増殖能を失っている胚軸中心柱では低いなど、*SRD2* や *RID1* と同じく、細胞増殖能と対応していた。さらに rRNA 生合成の指標として、RNA ポリメラーゼ I のレポーターの発現を調べたところ、*RID2* の発現パターンと概ね一致した。これらの結果から、rRNA の生合成のレベルが全体として、増殖能の制限要因の一つであることが示された。

*sriw1* 変異については、NAC 転写因子 ANAC082 のアミノ酸置換であることはわかっていたものの、それが機能欠損タイプかどうかは不明であった。そこで、新たに ANAC082 の機能を完全に欠くと思われるナンセンス変異について調べたところ、これも *rid2* 抑圧能をもつことが確認された。この結果、ANAC082 が *rid2* 変異の影響下で細胞増殖を阻害する役割を担っていることがわかった。*sriw1* 変異の導入により、*east2-1*、*srd2*、

*rid1* でも、カルス形成の温度感受性が軽減された。これらより、ANAC082 が関与する機構がプレ mRNA スプライシング因子および rRNA 生合成因子の過不足を感知して細胞増殖を負に制御しており、この機構の存在が細胞増殖能を規定している、と推定された。意外なことに、*rrd4* に対してのみ *sriw1* は抑圧効果を示さず、増殖能制御に ANAC082 が関わらない経路も存在することが示唆された。図 1 に、これらの ANAC082 依存経路、非依存経路とプレ mRNA スプライシングおよび rRNA 生合成との関係を模式的に表す。

*brd1* が RNA 結合タンパク質 UBA1a の遺伝子に BrdU 耐性の原因と思われる変異をもつことなどから、BrdU の作用と RNA との関係について検討した。その結果、カルス誘導時に BrdU を投与すると、かなりの割合が RNA に取り込まれることがわかった。従来 BrdU の生理的影響はすべて DNA に取り込まれた結果と考えられていたが、RNA 機能に干渉する可能性を含め見直しが必要であると思われる。

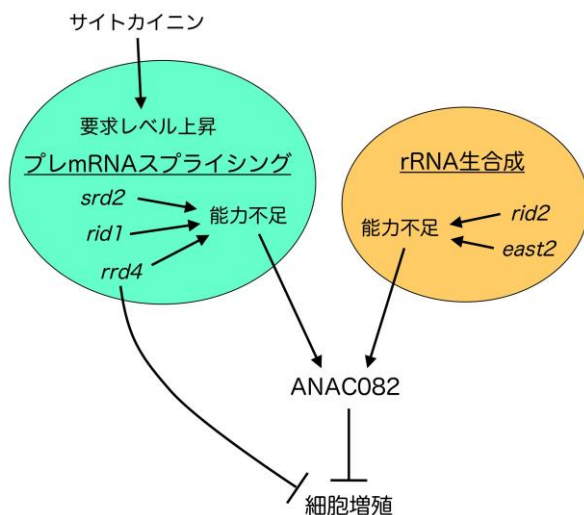


図1 基本的 RNA プロセッシングのレベルによる細胞増殖能の制限と ANAC082 の関与

### 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 7 件)

- ① Misato Ohtani, Taku Demura, Munetaka Sugiyama (2013) *Arabidopsis* ROOT INITIATION DEFECTIVE 1, a DEAH-box RNA helicase involved in pre-mRNA splicing, is essential for plant development. *The Plant Cell* 25. 印刷中, 査読有り  
DOI: 10.1105/tpc.113.111922
- ② Iwai Ohbayashi, Mineko Konishi, Kazuo

Ebine, Munetaka Sugiyama (2011) Genetic identification of *Arabidopsis* RID2 as an essential factor involved in pre-rRNA processing. *The Plant Journal* 67: 49-60. 査読有り

DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04574.x

[学会発表] (計 4 4 件)

- ① Iwai Ohbayashi, Yoko Matsumura, Misato Ohtani, Hitoshi Onouchi, Yasunori Machida, Munetaka Sugiyama “Cell proliferation control depending on the capacity of essential RNA processing is mediated by a NAC transcription factor in *Arabidopsis*” 23rd International Conference on Arabidopsis Research, Vienna, Austria (July 3-7, 2012)
- ② Munetaka Sugiyama, Iwai Ohbayashi, Misato Ohtani “Differential requirement for the supply of essential RNAs, such as snRNAs and rRNAs, in various aspects of plant development” XVIII International Botanical Congress, Melbourne, Australia (July 23-30, 2011)

[その他]

ホームページ等

<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

大谷 美沙都 (OHTANI MISATO)  
理化学研究所・バイオマス工学研究プログラム・研究員  
研究者番号：60435633