

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24年 5月18日現在

機関番号：32686

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770045

研究課題名（和文）リボソーム遺伝子を介した葉の背腹性制御の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the regulation of abaxial-adaxial polarity in leaf via r-protein genes.

研究代表者

小島 幸治（KOJIMA KOUJI）

立教大学・理学部・研究員

研究者番号：80457382

研究成果の概要（和文）：葉の形態形成に対して重要な可能性を持つリボソームの機能に着目し、分子遺伝学および生化学的アプローチから研究に取り組んだ。その結果、葉の向背軸制御において、リボソームによる特異的遺伝子発現制御機構の存在を示唆する知見が得られ、葉の背軸側および表皮におけるリボソーム遺伝子の組織特異的な役割が明らかになった。このようにリボソームの機能を通じた解析から葉の向背軸制御の解明に迫る成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：The ribosome plays a critical role in leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. But how the ribosome regulates specific gene expression is not known. In order to assess whether a r-protein gene contributes to the activation or the repression of genes, engineered-*RPL4D* genes were constructed and introduced into *as2 rpl4d* double mutant which leaf-polarity was significantly lost. And, the effects of the region-specific expression of *RPL4D* on the establishment of an abaxial-adaxial polarity were determined. In this project, it was revealed that the action of ribosome in the abaxial and/or the epidermal region play roles in the formation of a leaf polarity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：植物、生体分子、発現制御、発生分化

1. 研究開始当初の背景

葉の発生は茎頂分裂組織の周辺部に葉原基が形成されることで開始される。葉原基内では細胞増殖活性が一過的に顕著に高まっており、葉器官へと分化する細胞が供給される。それらの細胞が基部先端軸、および中心-辺縁部軸、向背軸に沿ったパターン形成により配置され、扁平な形態を持つ葉を作り上げる。現在までに、葉の形態形成に重要なパターン形成を制御する機構は、シロイヌナズナ等のモデル植物を用いた遺伝学的な解析から、転写因子や small RNA の機能を中心に明らかにされてきた。例えば、表側（向軸側）で働く *PHB*、*PHV*、

REV は、*miR165/166* によって裏側（背軸側）での発現が抑制される (Bao et al. 2004. *Dev. Cell*、Grigg et al. 2005. *Nature*)。一方、裏側で働く *ARF3*、*ARF4* は、*tasiR-ARF* によって表側での発現が抑制される (Hunter et al. 2006. *Development*)。ASYMMETRIC LEAVES1 (*AS1*) および ASYMMETRIC LEAVES2 (*AS2*) は、MYB ドメインおよび AS/LOB ドメインをそれぞれ有するタンパク質をコードし、やはり背腹性の制御に関わっている (Semarti et al. 2001. *Development*、Xu et al. 2003. *Development*、Iwakawa et al. 2007. *Plant J.*)。しかしながら、背腹性制御に寄与する転写因子によって制御される下流因

子の実体や、それらが葉の発生に果たす役割は不明である。

近年の知見から、リボソーム関連因子が葉の形態形成と密接な関わりを持つことを示唆する予備的知見が得られている。その発端の一つとなったのは、葉の細胞増殖を正に制御する転写アクチベーターである *ANGUSTIFOLIA* (*AN3*) の発見である (Horiguchi et al. 2005. *Plant J.*)。 *an3* 変異株では、葉の細胞数が野生株の約 1/3 に減少する。その後の解析から、 *an3* 変異株ではリボソーム生合成関連遺伝子の発現が低下することや、 *as2* 背景における *an3* 変異により葉の背軸化が促進することが判明した (堀口ら 未発表)。また、 *as2* はリボソーム関連遺伝子の突然変異と組み合わせることで葉の背軸化を強く促進した (Horiguchi et al. 2011. *Plant J.*、Pinon et al. 2008. *Development*、Yao et al. 2008. *Development*)。これらの結果から、背腹性制御において *AS2* とリボソーム遺伝子の間の相互作用が存在することが推定された。

さらに興味深いことに、すでに入手されている約 40 種の葉が菱形に尖るという特徴を持つリボソーム関連変異株候補について *as2* の変異を組み合わせ、 *as2* が示す背軸化の促進効果を解析し分類が行われた (Horiguchi et al. 2011. *Plant J.*)。その結果、一部のリボソーム変異株の中には *as2* の背軸化の促進効果が観察されないものがあった。一方で、 *rps6a* や *rpl4d* は *as2* の背軸化の表現型を劇的に促進した (Horiguchi et al. 2011. *Plant J.*)。これらの結果は、 *r-protein* 遺伝子の中には、向軸化制御における独自の(特有の)役割を持つものがあることを示唆するものであった。

以上で述べてきた表現型は、リボソームの不足による成長不良のためとは考えにくい。また、リボソーム関連因子は従来考えられていたよりも、積極的に特異的な遺伝子発現制御に関わることが示唆される。

2. 研究の目的

近年、申請者らの研究グループやその他の独立した研究グループの報告から、葉の形態形成のプログラムを適切に進行するためにリボソームの生合成が大いに寄与している可能性が高まってきた。そこで、本研究では、リボソーム遺伝子の背腹性制御に果たす役割や、リボソームによる特異的遺伝子発現機構の実体を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *r-protein* 遺伝子の変異がリボソーム生合成やリボソームの機能に与える影響

すでに入手されている *r-protein* 変異株とリボソーム生合成に関与する *OLIGOCELLULAR2*

変異株 *oli2* および *G-PATCH DOMAIN PROTEIN1* 変異株 *gdp1* から Total RNA を調製し、RT-PCR と RNA gel blot 解析により成熟型 rRNA および未成熟型 rRNA の蓄積量を野生型と比較し、リボソーム RNA (rRNA) の成熟過程を解析した。

r-protein (*RPL5*, *RPL5A*, *RPL5B*, *RPL4*, *RPL4A*, *RPL4D*, *RPS6*, *RPS6A*, *RPS6B*) およびリボソーム生合成に関与するタンパク質 (*OLI2*, *GDP1*) のペプチド抗体の作成をおこなった。そして、リボソーム変異株においてポリソーム分画を行い、プロファイルを生野生株の結果と比較し、ポリソーム形成の有無を観察し翻訳機能が正常かどうか確かめた。また、回収したフリーのサブユニットおよびポリソーム画分の *r-protein* 組成をパラログの違いも含めて、ウェスタン解析により確かめた。

as2 rpl4d 二重変異株の背軸化の原因が向背軸遺伝子の翻訳阻害が影響しているか確かめるために、ポリソーム画分から mRNA を抽出し、RT-PCR 解析により向背軸遺伝子の転写産物の存在量を野生型と *rpl4d*, *as2*, *as2 rpl4d* 二重変異株で比較した。

(2) 葉の向軸側および背軸側における *r-protein* の機能

r-protein 遺伝子は向軸化に重要な役割を持つが、向軸側因子の発現促進または背軸側因子の発現抑制のいずれかに重要なかは不明である。*r-protein* 遺伝子が葉の表側と裏側のどちらで重要な機能を果たしているか(図 1) について理解を得ることを目的として、*r-protein* 遺伝子が向背軸特異的に発現する株を作成した。

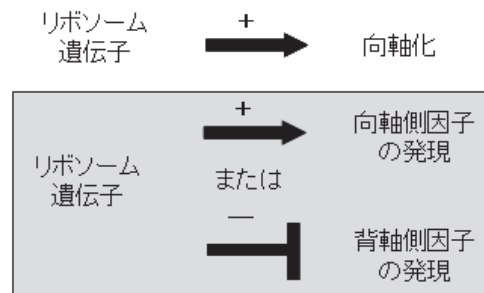


図1 リボソーム遺伝子による葉の向軸化制御
リボソーム遺伝子の葉の表裏における推定機能を枠内に示した。

r-protein 遺伝子 *RPL4D* に対して、裏側の発現に限定させるための *tasiR-ARF* の標的配列、または表側の発現に限定させるための *miR165/166* の標的配列を接続した遺伝子を構築し、*RPL4D* 遺伝子と *AS2* の欠損した二重変異株 (*as2 rpl4d*) に対して導入した。

作成した株それぞれについて、導入した *r-protein* 遺伝子の発現を確認し、部位特異的な発現により背軸化した葉の表現型を相補できるかどうか解析した。

(3) 葉の表皮および葉肉細胞における r-protein の機能

項目(2)の研究を踏まえて、さらに r-protein 遺伝子が葉の形態形成に果たす機能領域を同定することを目的として、表皮または葉肉細胞における r-protein 遺伝子の機能に着目した。葉の表側を構成する表皮は、オーキシンシグナル伝達の場合であるとともに、表皮の構築が葉の形態形成に重要な役割を果たしている。また、葉の内側を構成する葉肉細胞において向背軸の境界面の形成と維持が行われており、これらが境界面に沿った細胞の平面成長、すなわち、葉の扁平な形態の形成に重要な役割を果たしている。そこで、リボソーム遺伝子 *RPL4D* の葉の表皮または葉肉細胞における発現が、*as2 rpl4d* 二重変異株の表現型回復に効果を示すかどうか検証した。

4. 研究成果

(1) 概要

初年度は、主に葉の形態形成制御における r-protein 遺伝子の役割についての理解を更に深めることを目的とした実験を行った。また、解析に必要な変異株の作成、および r-protein に対する抗体の作成を行った。シロイヌナズナの地上部を用い、ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム分画を行う系を立ち上げた。二年度目は、主に前年度までに作成された各種変異株の解析を行った。リボソーム自身の機能制御と葉の背腹性制御因子の発現との相関を検証した。

(2) r-protein 遺伝子の変異がリボソーム生合成やリボソームの機能に与える影響

r-protein 遺伝子変異株においてリボソーム生合成が正常かどうか調べた結果、成熟型 rRNA の蓄積量は野生型と同レベルであった。また、野生株と同様に r-protein 変異株においてもポリソーム形成能があり、翻訳活性に与える影響は少ないことが確かめられた(図2)。

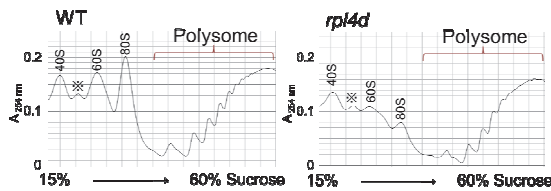


図2 リボソーム変異株においてもポリソームを形成する

もし、細胞内に十分量のリボソームが蓄積しているにも関わらず、形態異常が現れるならば、r-protein 遺伝子の変異の影響は全体的ではなく、ある特定の遺伝子発現に対して限定的に影響を与えている可能性が示唆される。そこで、ポリソーム RNA の解析結果、r-protein 遺伝子変異株では向背軸遺伝子の翻

訳レベルの低下がみられた。したがって、葉の背軸化の要因は向背軸遺伝子の発現レベルの均衡の乱れから生じた葉の極性制御の異常であることが可能性の一つとして考えられた。

(3) 葉の向軸側および背軸側における r-protein の機能

軽微な向軸側の欠損を示す *asymmetric leaves1 (as1)/as2* 変異株の背軸化の表現型を劇的に促進した r-protein 遺伝子変異株 *rpl4d* に着目し、*RPL4D* に対して、裏側の発現に限定させるための *tasiR-ARF* の標的配列、または表側の発現に限定させるための *miR165/166* の標的配列を接続した遺伝子を構築した(図3)。

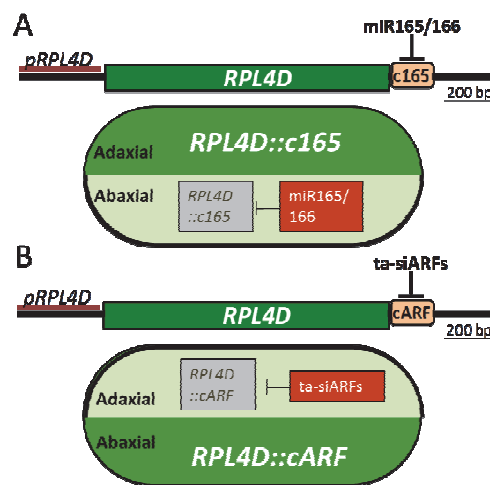


図3 向軸(adaxial)または背軸(abaxial)に限定した *RPL4D* 発現株の構築図。A. 背軸側(abaxial)において miR165/166 を介して抑制制御を受ける。B. 向軸側(adaxial)において tasiARF を介して抑制制御を受ける。

これらの改変 *RPL4D* が背軸化した *as2 rpl4d* 二重変異株の葉の表現型を相補できるかどうか解析を行った。播種 28 日後の葉形を観察し、*as2* 型、トランペット型、フィラメント型に分類し、表現型の相補の程度を評価した。

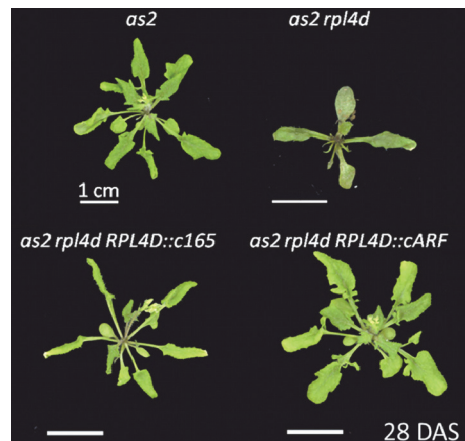


図4 *RPL4D::cARF* の発現は *as2 rpl4d* 二重変異株の表現型回復に効果を示した

その結果、*as2 rpl4d RPL4D::cARF* は背軸化した葉の表現型を相補し、すべて *as2* 型の葉を発生した。一方、*RPL4D::c165* の発現により表現型が弱くなりトランペット型や *as2* 型の葉の発生頻度が、それぞれ 25%、50%と高くなったが、*as2 rpl4d* の表現型を完全に回復させることが出来なかった(図 4)。これらの解析結果から、葉の向背軸制御にはリボソーム遺伝子の背軸側における発現がより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(4) 葉の表皮および葉肉細胞における r-protein の機能

項目(3)における葉の向軸・背軸に限定した遺伝子発現による相補実験の研究を踏まえて、さらに r-protein 遺伝子の葉の表皮または葉肉細胞における発現が *as2 rpl4d* 二重変異株の表現型回復に効果を示すかどうか検証した。その結果、リボソーム遺伝子の表皮における機能が葉の向背軸制御に対して重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(5) 総括

葉の形態形成に対して重要な可能性を持つリボソームの機能に着目し、分子遺伝学および生化学的アプローチから研究に取り組んだ。その結果、葉の向背軸制御を特徴づけるものとして、リボソームによる特異的遺伝子発現制御機構の存在を示唆する知見が得られ、葉の背軸側および表皮におけるリボソーム遺伝子の組織特異的な役割が明らかになった。このようにリボソームの機能を通じた解析から葉の向背軸制御の解明に迫る成果が得られた。

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 3 件)

① 江島加余子、川原田友子、井上修平、小島幸治、西山佳孝

A change in the sensitivity of elongation factor G to oxidation protects photosystem II from photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803、*FEBS Letters*、査読有、586 巻、2012 年、pp.778-783.

② 堀口吾朗、Mollá-Morales A、Pérez-Pérez JM、小島幸治、Robles P、Ponce MR、Micol JL、塚谷裕一。

Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development、*The Plant Journal*、査読有、65 巻、2011 年、pp. 724-736.

③ 堀内真由美、中村絹、小島幸治、西山佳孝、畠山和佳子、久堀徹、日原由香子
The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria、*Biochemical Journal*、査読有、431 巻、2010 年、pp.135-140.

〔学会発表〕(計 5 件)

① 永野 孝典、小島 幸治、林 秀則、金森 崇、宮城 智子、上田 卓也、西山 佳孝 大腸菌翻訳因子 EF-G のレドックス制御機構

日本生化学会 第 84 回大会
2011 年 9 月 21 日 (水) ~24 日 (土)
国立京都国際会館 (京都府・京都)

② 門脇 太朗、堀内 真由美、中村 絹、小島 幸治、西山 佳孝、原 怜、畠山 和佳子、野亦 次郎、久堀 徹、日原 由香子

Synechocystis sp. PCC6803 における転写因子 PedR のチオレドキシシン標的システイン残基の同定

日本植物学会 第 75 回大会
2011 年 9 月 18 日 東京大学 (東京都・駒場)

③ 小島幸治、塚谷裕一、堀口吾朗
リボソームタンパク質遺伝子 *RPL4D* の葉の向背軸制御における機能

日本植物学会 第 75 回大会
2011 年 9 月 18 日 東京大学 (東京都・駒場)

④ 小島幸治、塚谷裕一、堀口吾朗
RPL4D の部位特異的発現が *as2 rpl4d* の葉の背腹性異常の抑制に及ぼす効果

第 52 回日本植物生理学会年会
2011 年 3 月 21 日 東北大学 (宮城県・仙台)

⑤ 小島幸治、田村洵也、塚谷裕一、堀口吾朗
シロイヌナズナ G-patch domain protein 1 のリボソーム生合成における役割

植物学会 第 74 回大会、
2010 年 9 月 10 日 中部大学 (愛知県・春日井)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小島 幸治 (KOJIMA KOUJI)

立教大学・理学部・研究員

研究者番号：8 0 4 5 7 3 8 2