

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570060

研究課題名(和文)リボソームによる植物発生制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of ribosome-mediated developmental mechanisms in plants

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：扁平な葉が形成されるには、葉の向背軸が正しく確立される必要がある。この向背軸制御が乱れ、著しく葉が裏側化したas2 rpl4dのサプレッサー変異株の単離、表現型解析および原因遺伝子の同定を中心とした実験により以下のことを明らかにした。まず、as2 rpl4dの葉の裏側化は、NAC型転写因子遺伝子のSUZAKU1 (SZK1)のmRNAレベルの上昇を必要とする。このSZK1の発現量の増加は、RPL4D mRNAの減少によって誘導されるが、それに加え、構造異常を持ったRPL4Dの存在が必要である。また、RING fingerタンパク質のSZK2とRPL12BもSZK1の誘導に必要である。

研究成果の概要(英文)：Development of flat leaf structure is dependent on the appropriate adaxial-abaxial patterning. as2 rpl4d mutant has a leaf polarity defect in which leaves are strongly abaxialized. Isolation of suppressor mutants for as2 rpl4d, their phenotypic characterizations, and cloning of their responsible genes revealed following mechanisms. Strong leaf abaxialization is induced by upregulation of a NAC transcription factor gene, SUZAKU1 (SZK1). This upregulation is mediated by reduced mRNA level of RPL4D yet the abaxialization phenotype requires the presence of aberrant RPL4D protein. The SZK1 induction is also dependent on a RING finger protein, SZK2, and a ribosomal protein RPL12B.

研究分野：植物発生学

キーワード：リボソーム AS2 RPL4D NAC転写因子 RING finger protein プロテオスタシス

1. 研究開始当初の背景

翻訳は転写と並ぶ遺伝子発現の重要な過程である。ゲノム解析からは、約 30%の遺伝子について、本体の open reading frame(ORF)の上流にある upstream ORF (uORF)が存在することわかっている。これを介した翻訳制御の例は数少ないが、ある種の突然変異株においては、uORF に生じた変異によって本来の翻訳制御に異常をきたした結果、発生異常をもたらす例が知られている。また、リボソームタンパク質の欠損によって様々な発生異常が生じることが報告されている。これらの結果から、リボソームによる翻訳制御を介した発生制御機構の存在が示唆されている。

興味深いことに、転写制御因子の一種の欠損変異株 *asymmetric leaves2 (as2)* とリボソームタンパク質の欠損変異株との 2 重変異株では、向背軸性に異常を持った葉が形成される。これらの葉は裏側の性質を強く持つことで棒状になり、葉の平面成長ができなくなる。どのリボソームタンパク質が変異するかによって、この向背軸性の異常の強さは異なる。一方、リボソームタンパク質の欠損変異株はしばしば、葉の細胞増殖を抑制する表現型を示し、これもリボソームタンパク質の変異の種類によって表現型強度が変化する。葉の細胞増殖の異常の強さと、細胞増殖の抑制の強さには概ね相関関係が見られるが、*rps28b* 変異株では細胞増殖に強い欠損が見られるにもかかわらず、向背軸性の異常はごく弱い。逆に、*rpl4d* 変異株では細胞増殖の抑制効果はほとんど認められないが、向背軸性については極めて強い異常を生じる。これらの知見から、細胞増殖や向背軸性制御において特に重要なリボソームタンパク質があり、それらによって制御される遺伝子の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、*rpl4d*、*rps28b* 変異株に注目し、これらの変異によって影響を受ける向背軸性制御遺伝子や、細胞増殖制御遺伝子を見いだすこと、それらの遺伝子が翻訳制御を受けるのかを明らかにすること、リボソームのどのような異常が表現型異常に結びつくのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

種々のリボソームタンパク質が細胞増殖や向背軸性制御関与する程度をより俯瞰的に明らかにするため、リボソームタンパク質の T-DNA 挿入変異株を入手し、その単独変異株あるいは *as2* との 2 重変異株の表現型を解析する。

rps28 ファミリーの細胞増殖への貢献度を明らかにするため *rps28a*、*rps28b*、*rps28c* の間で多重変異株を作出し、その表現型を解析する。

リボソームタンパク質欠損変異株において、どのような構造異常が生じるかを検討するため、*rpl4d* の各種アリルを用い変異型

mRNA の構造を RACE-PCR 法によって決定する。その情報をもとに、変異型 *RPL4D* を過剰発現させる系統と RNAi によって *RPL4D* そのものの発現量を減少させる系統を作出し、表現型の相違を解析する。

向背軸性制御遺伝子を見出すために *as2 rpl4d* に対して変異原処理を行い、サプレッサー変異株を単離する。それらの原因遺伝子を特定し、機能解析を進める。

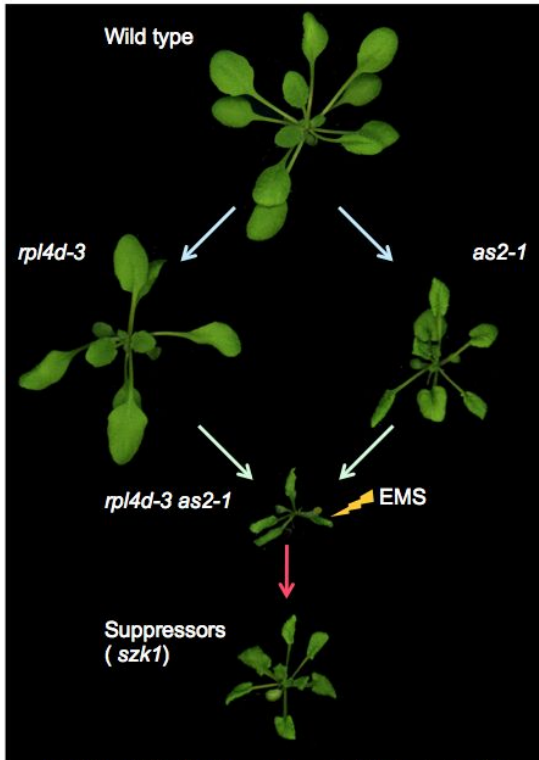
4. 研究成果

まず、80 種類あるリボソームタンパク質の欠損がどの程度、向背軸性や細胞増殖の異常を示すのかを検討した。約 40 種の遺伝子について解析を終え、*rpl4d* や *rps28b* のように特定の表現型に対して強い効果を持つような変異は見出されなかった。したがって、*RPL4D* や *RPS28B* は向背軸性制御、細胞増殖制御に対し、特有の機能を持つ可能性がより強くなった。

RPS28 ファミリーのメンバー *RPS28A*、*RPS28B*、*RPS28C* の機能を明らかにするため、これらが欠損した多重変異株を作成した。*rps28a*、*rps28c* は単独変異株では *rps28b* よりも表現型が弱く、*rps28b* にさらにこれらの変異を導入していくと、細胞増殖の異常や *as2* 背景における向背軸性異常が強まっていた。この時、細胞増殖の方が向背軸性の異常よりも顕著な影響を受ける点については変化がなかった。また、3 重変異株についてはホモ系統が得られておらず、致死になるかのせいが考えられる。これらの結果から、*RPS28* ファミリーは全体として冗長的な働きを持ちつつ、細胞増殖により強い貢献を果たしていることが示唆された。

rpl4d が向背軸性異常をもたらす要因をリボソーム側から明らかにするため、*rpl4d* のアリル 3 種を用いて RACE-PCR を行い、それぞれの変異型 mRNA の構造と、蓄積量を解析した。その結果、変異型 mRNA 量は野生型の正常型 *RPL4D* mRNA レベルの 1/10 程度に減少していること、これらは、C 末端側が欠損した異常な構造を持つ ORF あるいは、ストップコドンが消失していることが明らかになった。*RPL4D* mRNA の量的な減少と異常型 mRNA から翻訳される異常な *RPL4D* タンパク質のどちらが、向背軸性に影響を及ぼすのかを解析したところ、RNAi による *RPL4D* mRNA の減少は向背軸性異常をほとんど誘導しないが、*rpl4d-3* に見られる異常型 cDNA を発現させた場合には強い向背軸性異常が生じることが明らかになった。この結果は異常な *RPL4D* を取り込んだリボソームが翻訳に対し何らかの攪乱効果を持つことを示唆している。

rpl4d as2 でどのような遺伝子が向背軸性異常の誘導に関与するのかを明らかにするため、サプレッサースクリーニングと原因遺伝子の同定を行った(次項、図)。その結果、NAC 型転写因子(*SUZAKU1*、*SZK1* と命名)、ヒストン脱メチル化酵素(*REF6*)、RING finger タンパク質(*SZK2* と命名)、*RPL12B*、および class



*rpl4d as2*のサブプレッサースクリーニング

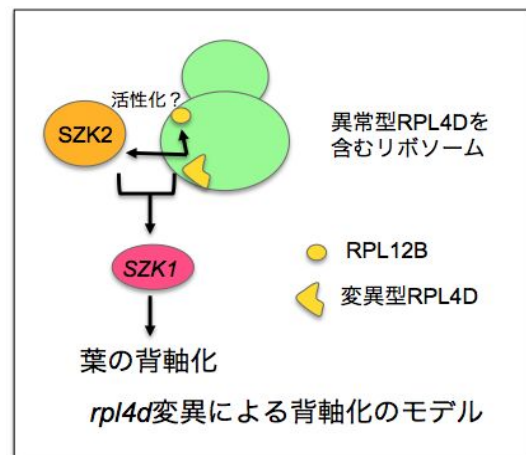
III HD-ZIP に属する REV を同定した。REV は miR165/166 によって転写後抑制を受けていることが知られるが、今回得られたアリルは過去に miR165/166 耐性をもたらすことが報告された REV の機能獲得型変異と全く同じであった(文献、)。*as2 rpl4d* 変異株では葉が背軸化しているため、REV の機能獲得変異によって向背軸のバランスが回復したものと考えられる。そこで、*as2 rpl4d* に葉の裏側を促進する因子である ARF3 の機能欠損変異を導入したところ、葉の向背軸性異常が回復した。従って、*as2 rpl4d* では、向背軸性制御因子の機能のバランスが背軸側に傾くことで葉が背軸化していると考えられる。

一方、NAC 型転写因子の SZK1 は *rpl4d* 変異やその他のリボソームタンパク質欠損変異、*as2* のエンハンサー変異である proteasome 欠損変異や Elongator 複合体の欠損変異によって、その発現量が大きく増加することが明らかになった。また in situ hybridization の結果からは、SZK1 は発生初期の葉の向軸側で発現することが明らかになった。従って、リボソームタンパク質などの異常が引き金となり、SZK1 が葉の表側で誘導され、これが葉の向軸側因子の機能を抑制するか、背軸側因子の機能を促進する(あるいはその両方)ものと考えられる。

REF6, SZK2 と RPL12B の欠損は、*as2 rpl4d* における SZK1 の発現上昇を打ち消す効果があった。REF6 はヒストン H3K27me3 を脱メチル化する酵素であることがすでに報告されており、SKZ1 は *ref6* において H3K27me3 レベルが上昇している可能性が ChIP-seq 解析から報告されている(文献)。SZK1 はまた、プロテアソームサブユニット遺伝子を標的とする転写因子の RPX の標的の1つであり、また、

小胞体ストレスのマスター因子である bZIP60 の標的でもあることが知られている(文献、)。そこで、*as2 rpl4d rpx* を作成した結果、SZK1 の発現レベルはある程度低下したものの、向背軸性は異常なままであった。また、*rpl4d* において小胞体ストレスが生じている可能性を考慮し *bZIP60* の発現レベルを解析したが、野生型と比べて差は認められず、また、*as2 rpl4d bzip60* においても向背軸性異常は回復しなかった。一方、SZK1 は uORF を持つことから、nonsense-mediated mRNA decay(NMD)の標的となることが考えられた。NMD に必要な UPF1, UPF3 の機能欠損変異株と *as2* の2重変異株を作成した。すると SZK1 の発現は上昇していたが、向背軸性異常は誘導されなかった。ただし、興味深いことに、RPL4D の RNAi でも SZK1 の発現上昇が起こるものの、向背軸性の異常は強めないことから、NMD の関与は現時点では排除できない。

以上の結果から、少なくとも RPL4D の発現レベルの低下が SZK1 の発現誘導の1つの経路になっているが、それだけでは向背軸性異常は起こらないことが考えられる。その発現誘導には既知の転写因子の関与は認められなかったが、REF6が必要であることから、転写レベルでの制御の可能性は排除できない。一方、SZK1 の発現上昇には RING finger タンパク質の SZK2 が必要であること、RING finger タンパク質は特異的なタンパク質分解に関わる E3 ubiquitin ligase である場合が多いこと、さらに SZK1 の発現誘導には RPL12B が必要であること、向背軸性の異常には異常型 RPL4D の存在が必要であることから、リボソーム周辺での何らかのタンパク質の安定性の制御が SZK1 の誘導に関与するものと考えられる(下図)。



この研究の開始当初に考えていた uORF などを含む特定の mRNA がリボソームの異常によって発現異常を示した結果、発生異常が生じるという考え方は、今回の結果からは必ずしも当てはまらない可能性が強まった。むしろ、リボソームの構造異常が SZK2 や SK1 を介して、向背軸制御遺伝子の機能バランスを崩すことで、葉を強く背軸化する新たな可能性が浮上した。また、SZK1 は proteasome や Elongator 複合体の欠損変異がもたらす向背

軸性異常をも抑圧できる。Elongator 複合体は tRNA のアンチコドンの wobble 塩基の修飾にも関わり、その異常は誤翻訳に結びつく可能性がある。したがって、このような背腹性異常はタンパク質の恒常性 (プロテオスタシス) の異常に应答した反応であるとも考えられる。今後は、この点も含めリボソームから *SZK1* の誘導に至る経路の解明が重要な課題であると考えられる。

<引用文献>

- Zhong, R., and Ye, Z.-H. *amphivasal vascular bundle1*, a gain-of-function mutation of the *IFL1/REV* gene, is associated with alterations in the polarity of leaves, stems, and carpels. *Plant Cell Physiol.*, (2004), 45, 369-385.
- Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F., Bowman, J.L. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr. Biol.*, (2003) 13, 1768-1774.
- Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Jenuwein, T., Cao, X. *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nature Genet.*, (2011) 43, 715-719.
- Nguyen, H.M., Schippers, J.H.M., Gõni-Ramos, O., Christoph, M.P., Dortay, H., van der Hooft, R.A.L., Mueller-Roeber, B. An upstream regulator of the 26S proteasome modulates organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, (2013) 74, 25-36.
- Sun, L., Yang, Z.-T., Song, Z.T., Wang, M.J., Sun, L., Lu, S.-J., Liu, J.-X. The plant-specific transcription factor gene *ANAC103* is induced by bZIP60 through a new *cis*-regulatory element to modulate the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Plant J.*, (2013), 76, 274-286.

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 11 件)

- Hisanaga, T., Ferjani, A., Horiguchi, G., Ishikawa, N., Fujikura, U., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Ishida, T., Sugimoto, K., Tsukaya, H. The ATM-dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in the *fas1* mutation during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiol.*, 162, 2013, 831-841. DOI:10.1104/pp.113.216796. 査読有り
- Tsukaya, H., Byrne, M.E., Horiguchi,

- G., Sugiyama, M., Van Lijsebettens, M., Lenhard, M. How do 'Housekeeping' genes control organogenesis? -unexpected new findings on the role of housekeeping genes in cell and organ differentiation. *J. Plant Res.*, 126, 2013, 3-15. DOI: 10.1007/s10265-012-0518-2. 査読有り
- Horiguchi, G., Van Lijsebettens, M., Candela, H., Micol, J.L., Tsukaya, H. Ribosome and translation in plant development control. *Plant Sci.*, 2012, 24-34. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.04.008. 査読有り
- Nakagawa, A., Takahashi, H., Kojima, S., Sato, N., Ohga, K., Cha, B.Y., Woo, J.T., Nagai, K., Horiguchi, G., Tsukaya, H., Machida, Y., Machida, C. Berberine enhances defects in the establishment of leaf polarity in *asymmetric leaves1* and *asymmetric leaves2* of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 2012, 569-581. DOI:10.1007/s11103-012-9929-7. 査読有り

[学会発表](計 17 件)

- 井上幹人、中田未友希、塚谷裕一、堀口吾朗 リボソームタンパク質変異体で過剰発現する *SZK1* の解析 日本植物学会 2014 年 9 月 12 日~2014 年 9 月 14 日 明治大学 (神奈川県川崎市)
- 増田英典、塚谷裕一、堀口吾朗 リボソームタンパク質 RPL4 の質と量が葉の向背軸性に及ぼす効果の解析 日本植物学会 2014 年 9 月 12 日~2014 年 9 月 14 日 明治大学 (神奈川県川崎市)
- 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. 25th International Conference on *Arabidopsis* Research, 2014 年 7 月 28 日~2014 年 8 月 1 日. Vancouver (Canada)
- 堀口吾朗、中田未友希、塚谷裕一 リボソームタンパク質 RPL4D の GFP 標識とその機能性についての解析 日本植物生理学会 2014 年 3 月 18 日~2014 年 3 月 20 日 富山大学 (富山県富山市)
- Horiguchi, G., Shimada, H., Watanabe, T., Tsukaya, H. Mutations in a NAC-domain transcription factor gene, *SUZAKU1*, suppress leaf abaxialization caused by the defects of ribosomal proteins. FASEB conference: Mechanisms in Plant Development. 2013 年 8 月 11 日~2013 年 8 月 16 日. Vermont

(USA)

島田浩貴、渡辺達矢、大林 祝、杉山宗隆、塚谷裕一、堀口吾朗 *rp14d as2* の葉が背軸化する表現型を抑圧する *szk1-D* 変異株の解析 日本植物学会 2012年9月15日～2012年9月17日 兵庫県立大学(兵庫県姫路市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔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：70342847

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：