

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650090

研究課題名(和文)電子顕微鏡を用いた植物RNA顆粒の同定と探索

研究課題名(英文)Identification of plant RNA granules with electron microscopy

研究代表者

濱田 隆宏 (HAMADA, Takahiro)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：20452534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNA顆粒とはmRNAの輸送、翻訳抑制、分解、低分子RNAの機能発現などの転写後制御を行う構造物であり、RNAとタンパク質からなる細胞質の超巨大複合体である。本研究では植物の細胞質RNA顆粒であるストレス顆粒とP-bodyの免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、RNA顆粒はおおよそ100から300 nm程度の直径であり、顆粒内部には繊維状構造が確認された。また顆粒内部では電子顕微鏡で容易に観察できるリボソーム顆粒が排除されていることを明らかにした。本研究は未知であった植物RNA顆粒の形態を明らかにし、今後の植物RNA顆粒研究の礎を提供した。

研究成果の概要(英文)：RNA granules, which composed of various RNAs and proteins, are cytoplasmic granules to participate in post-transcriptional regulations including mRNA transport, translation repression, RNA degradation, small RNA functions and so on. We focused on representative RNA granules, stress granules and P-bodies, and investigated the morphologies of RNA granules by electron microscopy. Our analyses revealed that RNA granules are about from 100 to 300 nm in diameter and have a filamentous pattern in granules. In addition, we also found that ribosomes are not observed in RNA granules. Our research figured out the morphology of RNA granules in plant cells and provided a base for future plant RNA granules researches.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：RNA顆粒 ストレス顆粒 P-body シロイヌナズナ 植物

1. 研究開始当初の背景

RNA 顆粒は RNA とタンパク質から構成される細胞質の超巨大複合体であり、真核生物において mRNA の輸送、翻訳抑制、分解、低分子 RNA の機能発現など様々な役割を果たしている。植物において、これら RNA 顆粒の構成因子の欠失変異体の多くは致死となり、発生や成長、分化に必須であることが知られている。これらの植物 RNA 顆粒の存在は確実であるにも関わらず、研究開始当初は電子顕微鏡で同定・観察された例がなかった。

2. 研究の目的

本研究ではストレス顆粒や Processing body (P-body) に代表される植物の RNA 顆粒が電子顕微鏡でどのように観察をされるかを免疫電子顕微鏡観察 (免疫電顕) により明らかにする。本研究により電子顕微鏡観察で正体不明とされていた構造を RNA 顆粒であると断言でき、植物の形態・構造分野への貢献を目的とする。また植物 RNA 顆粒研究を発展させるための、研究基盤を確立することも目的としている。

3. 研究の方法

本研究ではストレス顆粒マーカーとして、翻訳開始因子でありストレス顆粒構成因子として我々が同定した eIF4A2 を採用し、GFP を融合させた eIF4A2-GFP を発現させた植物体を実験に用いた。また Processing body (P-body) マーカーとして P-body 構成因子である DCP1 を採用し、GFP を融合させた DCP1-GFP を発現させた植物体 (Motomura et al. 2012 RNA Biol. 9:644-652) を実験に用いた。

サンプルの固定は生きた状態に最も近いと言われる電顕の固定法である高圧凍結固定法を用いた。植物個体からメリステム領域を含む胚軸部分を切り出し、高圧凍結装置 EM PACT (Leica Microsystems) で凍結固定した。凍結後すぐに、 -80°C に冷やした凍結置換液 (0.25% グルタルアルデヒド / 0.1% 酢酸ウラン in アセトン) にサンプルを入れ、 -80°C で 72 時間凍結置換を行った。その後、約 2 日間かけて 4°C まで温度上昇させた後、サンプルをアセトンで洗い、メタノールで置換した。続いて LR White 樹脂で置換し (メタノール : LRW = 3:1, 1:1, 1:3, 100%LRW x 2 回)、ビームカプセルに包埋して、紫外線で 72 時間重合した。樹脂包埋したサンプルから厚さ 60-80nm の超薄切片をウルトラミクロトーム EM UC7 (Leica Microsystems) で作製し、ホルムバール支持膜を張ったニッケルグリッドに載せた。免疫染色には抗 GFP 抗体 (Invitrogen A11122) と金コロイド付き抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) を用い、4% 酢酸ウランで電子染色後に透過電子顕微鏡 JEM-1400 (JEOL) で観察した。

4. 研究成果

コンフォーカル顕微鏡による蛍光観察により、ストレス顆粒は通常の生育条件 (22°C) では細胞質 RNA 顆粒を形成せず、高温条件 (37°C) で顆粒を形成することが知られている。また長時間の高温処理を続けると、ストレス顆粒が高温処理時間依存的に大きくなることが知られている。また P-body はコンフォーカル顕微鏡による蛍光観察により、通

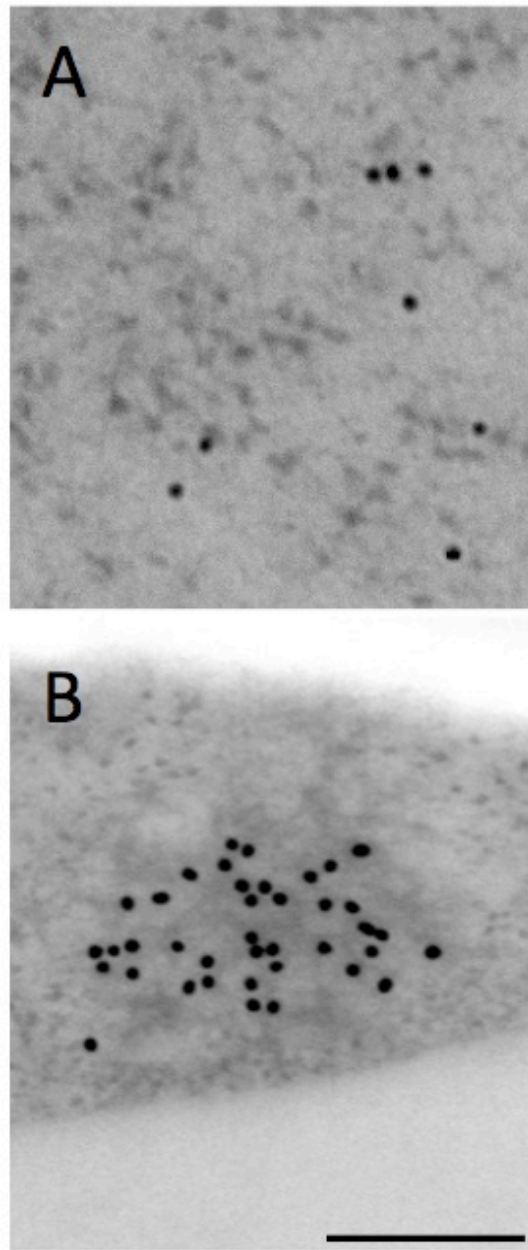


図1 ストレス顆粒マーカー (eIF4A2-GFP) による免疫電子顕微鏡写真

金コロイド標識が eIF4A2-GFP の局在を示している。A, 22°C における eIF4A2-GFP の局在、B, $38^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 時間の高温処理後の eIF4A2-GFP の局在、スケールバーは 200 nm

常の生育条件でも細胞質 RNA 顆粒を形成しており、37°Cでは顆粒の数と大きさが増加することが知られている (Motomura et al. 2015 Plant Cell Physiol. 56:107-115)。そこで我々は 22°Cのサンプル、37°C・15 分の高温処理サンプル、37°C・60 分の高温処理サンプルを用意し、実験を行った。

免疫電顕観察において、22°Cで処理した植物体において、ストレス顆粒マーカーである eIF4A2-GFP の局在を示す金コロイドは細胞質全体に拡散して分布し、特定の構造に局在しなかった (図 1 A)。一方、37°Cで処理した植物体では、eIF4A2-GFP の局在を示す金コロイドの大半は、繊維状構造を持つ顆粒構造に局在した (図 1 B)。この顆粒構造を囲むような膜構造は観察されなかった。またリボソーム顆粒が顆粒内では見られないことが明らかとなった。

一方、22°Cで顆粒を形成している P-body では、22°Cでも 38°Cでも繊維状構造の顆粒に局在しており、その構造はストレス顆粒と同様に膜には囲まれておらず、リボソーム顆粒が顆粒内では見られなかった (22°C : 図 2 A、38°C : 図 2 B)。

次に我々はストレス顆粒と P-body の顆粒サイズ測定を行った。その結果、ストレス顆粒は 38°C・15 分の高温ストレス処理で直径約 200 nm の顆粒サイズになり、38°C・60 分では約 300 nm に増大することを明らかにした。P-body の顆粒サイズは、22°Cでは直径約 130 nm、38°C・15 分の高温ストレス処理では約 170 nm、38°C・60 分の高温ストレス処理では約 180 nm であった。これまでに RNA 顆粒サイズの増大はコンフォーカル顕微鏡による蛍光観察で確認されていたが、実際にどのくらいのサイズ変化が起きているかは同定されていなかった。本研究により、平常時と高温ストレス時の RNA 顆粒サイズが同定できたことにより、今後の RNA 顆粒の蛍光観察では RNA 顆粒が 200 nm 程度の小さな構造物であることに留意して研究を行うことが可能である。

そこで本研究では RNA 顆粒が 200 nm 程度の小さな構造物であることに留意し、異なる RNA 顆粒であるストレス顆粒、P-body、AGO1 顆粒の局在比較解析を行った。実験には高感度のコンフォーカル顕微鏡観察が可能なスピニングディスク型コンフォーカル顕微鏡を用いた。その結果、これら 3 者の極少量のシグナルはほぼ全ての顆粒で観察されたが、その存在比は大きく違った。また免疫電顕観察で RNA 顆粒にはリボソーム顆粒が観察されないことを明らかにしたが、更なる詳細な観察により、リボソームが排除されているにも関わらず金コロイドでラベルされない領域がある RNA 顆粒も存在することを確認した。

これらの結果より、ストレス顆粒、P-body、AGO1 顆粒は高温ストレス時には同一の顆粒として存在するが、各顆粒は混じり合っているのではなく隣り合って存在する可能性が高いと考えられる。

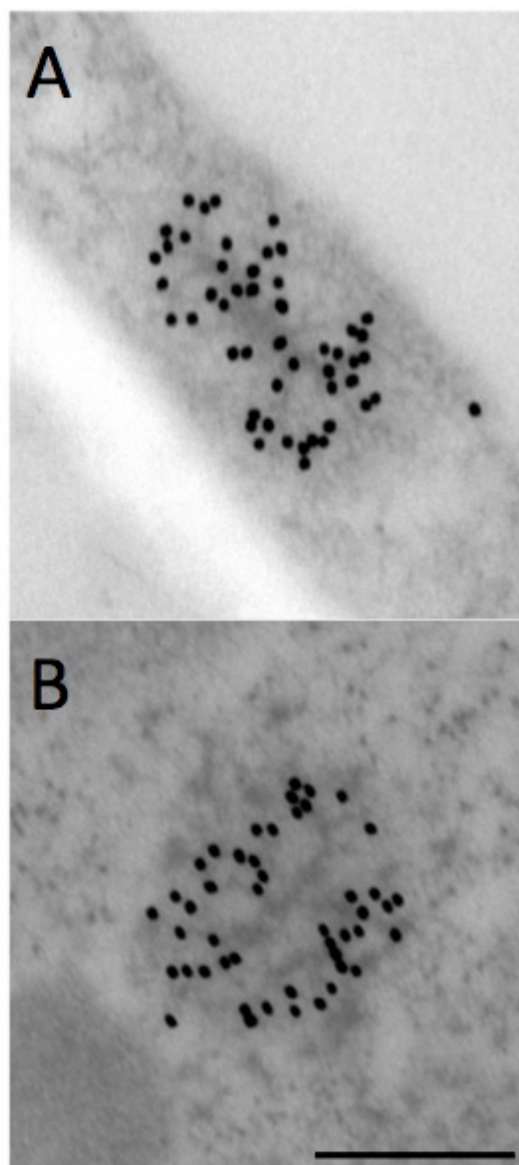


図 2 P-body顆粒マーカー (DCP1-GFP)による免疫電子顕微鏡写真

金コロイド標識がDCP1-GFPの局在を示している。A, 22°CにおけるDCP1-GFPの局在、B, 38°C・1時間の高温処理後のDCP1-GFPの局在、スケールバーは200 nm

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)

[学会発表] (計5件)

- ① 矢光真子、福澤麻里奈、佐藤繭子、亀井保博、柳川由紀、西村いくこ、豊岡公德、渡邊雄一郎、濱田隆宏「シロイヌナズナにおけるストレス顆粒形成機構の解析」第5回植物RNA ワークショップ 2016年1月8日～9日「東京大学(東京都目黒区)」
- ② 濱田隆宏、渡邊雄一郎「植物におけるRNA顆粒ダイナミクス」
BMB2015: 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会 2015年12月1日～4日「神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)」
- ③ Takahiro Hamada「Relationships between components of cytoplasmic RNA granules and small RNA metabolism」日本植物学会第79回大会 2015年9月16日～18日「新潟朱鷺メッセ(新潟県新潟市)」
- ④ 福澤麻里奈、佐藤繭子、元村一基、柳川由紀、西村いくこ、豊岡公德、渡邊雄一郎、濱田隆宏「シロイヌナズナにおけるストレス顆粒形成機構の解析」第56回日本植物生理学会年会 2015年3月16日～18日「東京農業大学(東京都世田谷区)」
- ⑤ 濱田隆宏「植物のRNA顆粒を介した温度変化応答」第9回NIBBバイオイメージングフォーラム 2015年1月26日～27日「基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 隆宏 (HAMADA, Takahiro)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号: 20452534

(2) 連携研究者

渡邊 雄一郎 (WATANABE, Yuichiro)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号: 60183125

豊岡 公德 (TOYOOKA, Kiminori)
理化学研究所・環境資源科学研究センター
・ 上級研究員
研究者番号: 10360596