

学 位 論 文 題 名

Regulation of leaf organ size by the
Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit

(シロイヌナズナ19S プロテアソームサブユニット RPT2a による
葉器官サイズ制御)

学位論文内容の要旨

細胞は生物の最小基本単位であり、生物個体の大きさや形は細胞の数とサイズによって決定されている。植物は細胞の数を決定した後、細胞サイズを分裂直後の大きさから数千倍にまで増幅させる能力を有しており、このような特殊な機構を自らの形態形成に積極的に利用している。こうした細胞サイズを決定する機構の一つがエンドリデュプリケーションとよばれる細胞質分裂を伴わない DNA 複製である。エンドリデュプリケーションによって DNA 量が増大するにつれ、細胞は巨大化する。こうした現象は古くから知られていたが、エンドリデュプリケーションを制御する分子機構は長らく不明であった。こうした状況下で、私は、26S プロテアソームによる能動的タンパク質分解が、エンドリデュプリケーションを負に制御し、細胞サイズ制御に機能することを明らかにした。

1. 26S プロテアソームを介した細胞サイズ制御の解析

26S プロテアソームは、60 以上ものサブユニットから構成される巨大な複合型プロテアーゼである。26S プロテアソームを介した能動的分解系は、真核生物に広く保存され、細胞周期をはじめ、ストレス応答や器官形成など様々な生命現象に関与している。26S プロテアソームは、タンパク質分解活性をもつ 20S CP と、標的タンパク質の選択や 20S CP の活性調節を行う 19S RP からなる。19S RP は、6 種類の ATPase 活性をもつ RPT タンパク質群と 12 種類の ATPase 活性を持たない RPN タンパク質群からなる。そして、これらサブユニットはそれぞれが固有の機能を持つことが報告されている。

私は、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて 19S RP を構成するサブユニット RPT2 の逆遺伝学的な解析を行った。シロイヌナズナ RPT2 遺伝子は、AtRPT2a と AtRPT2b の二つのパラログ分子からなる。これら遺伝子のノックアウト変異体を観察したところ、*rpt2a* 変異体のみが葉器官の巨大化を示した。*rpt2a* 変異体でみられた器官の巨大化は、エンドリデュプリケーションの過剰促進による細胞サイズの増大に起因してい

た。さらに、発現解析の結果、*rpt2a* 変異体でみられたエンドリデュプリケーションの過剰促進は、G1/S 期特異的遺伝子の発現上昇が要因であることが示唆された。

一方、*rpt2b* 変異体は葉器官の巨大化を示さない、また相補実験を行ったところ、RPT2b タンパク質は *rpt2a* 変異体を相補できなかった。この結果から、RPT2a と RPT2b は機能分化していることが示唆された。

以上の結果から、①RPT2 を構成因子にもつプロテアソーム (19S^{RPT2a}) は、エンドリデュプリケーションを負に制御し、細胞サイズを制御していること、②植物プロテアソームサブユニットはパラログ間で多様性をもつこと、を明らかとした。

2. 26S プロテアソームを介した遺伝子サイレンシング機能の解析

DNA メチル化は、塩基配列を変化させることなく遺伝子発現を制御する機構であり、トランスポゾンの抑制や、胚発生に必須な機構である。私は、新たに 26S プロテアソームが DNA メチル化を介した遺伝子サイレンシングに関与することを明らかにした。

rpt2a 変異体を用いて、構成的発現プロモーターである 35S プロモーターにルシフェラーゼを融合した形質転換体(35S::LUC)を作成し、解析を行った。35S::LUC 導入 *rpt2a* 変異体では、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下した。そして、この活性低下は、ルシフェラーゼ遺伝子の mRNA 量が減少したことが原因であった。さらに、bisulfite sequencing 法によるメチル化レベルの解析から、ルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制は、*rpt2a* 変異体において 35S プロモーターが過剰なメチル化を受けたことに起因することを明らかとした。

植物における DNA メチル化は、維持型と、*de novo*型と呼ばれる新規メチル化の 2 種類の様式によって制御される。*de novo*型メチル化は、RNA 依存性 DNA メチル化(RdDM)経路と呼ばれる、small RNA 依存的なメチル化によって生じる。

遺伝学的解析から、*rpt2a* 変異体でみられた過剰な DNA メチル化は、RdDM 経路を介して生じることを明らかとした。一方、パラログ分子である *rpt2b* 欠損変異体では遺伝子サイレンシングを示さない。これらの結果から、19S^{RPT2a} プロテアソームは、RdDM 経路を介した DNA メチル化を負に制御することを明らかとした。本研究によって、26S プロテアソームと遺伝子サイレンシングとの関与が初めて示された。

本研究によって、植物プロテアソームの多様性ならびにプロテアソームサブユニットの新規機能が明らかとなった。また、細胞サイズと DNA メチル化の関連性についても明らかとした。本研究を基に、細胞サイズ制御の全容解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二
副 査 教 授 山 本 興太朗
副 査 准教授 藤 田 知 道
副 査 准教授 綿 引 雅 昭

学 位 論 文 題 名

Regulation of leaf organ size by the Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit

(シロイヌナズナ19S プロテアソームサブユニット RPT2a による
葉器官サイズ制御)

細胞は生物の最小基本単位であり、生物個体の大きさや形は細胞の数とサイズによって決定されている。植物は細胞の数を決定した後、細胞サイズを分裂直後の大きさから数千倍にまで増幅させる能力を有しており、このような特殊な機構を自らの形態形成に積極的に利用している。こうした細胞サイズを決定する機構の一つがエンドリデュプリケーションとよばれる細胞質分裂を伴わない DNA 複製である。エンドリデュプリケーションによって DNA 量が増大するにつれ、細胞は巨大化する。こうした現象は古くから知られていたが、エンドリデュプリケーションを制御する分子機構は長らく不明であった。こうした状況下で、私は、26S プロテアソームによる能動的タンパク質分解が、エンドリデュプリケーションを負に制御し、細胞サイズ制御に機能することを明らかとした。

1. 26S プロテアソームを介した細胞サイズ制御の解析

26S プロテアソームは、60 以上ものサブユニットから構成される巨大な複合型プロテアーゼである。26S プロテアソームを介した能動的分解系は、真核生物に広く保存され、細胞周期をはじめ、ストレス応答や器官形成など様々な生命現象に関与している。26S プロテアソームは、タンパク質分解活性をもつ 20S CP と、標的タンパク質の選択や 20S CP の活性調節を行う 19S RP からなる。19S RP は、6 種類の ATPase 活性をもつ RPT タンパク質群と 12 種類の ATPase 活性を持たない RPN タンパク質群からなる。そして、これらサブユニットはそれぞれが固有の機能を持つことが報告されている。

私は、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて 19S RP を構成するサブユニット RPT2 の逆遺伝学的な解析を行った。シロイヌナズナ RPT2 遺伝子は、AtRPT2a と AtRPT2b の二つのパラログ分子からなる。これら遺伝子のノックアウト変異体を観察したところ、*rpt2a* 変異体のみが葉器官の巨大化を示した。*rpt2a* 変異体でみられた器官の巨大化は、エンドリデュプリケーションの過剰促進による細胞サイズの増大に起因していた。さらに、発現解析の結果、*rpt2a* 変異体でみられたエンドリデュプリケーションの過剰促進は、G1/S 期特異的遺伝子の発現上昇が要因であることが示唆された。

一方、*rpt2b* 変異体は葉器官の巨大化を示さない、また相補実験を行ったところ、RPT2b タンパク質は *rpt2a* 変異体を相補できなかった。この結果から、RPT2a と RPT2b は機能分化していることが示唆された。

以上の結果から、①RPT2 を構成因子にもつプロテアソーム (19S^{RPT2a}) は、エンドリデュプリケーションを負に制御し、細胞サイズを制御していること、②植物プロテアソームサブユニットはパラログ間で多様性をもつこと、を明らかとした。

2. 26S プロテアソームを介した遺伝子サイレンシング機能の解析

DNA メチル化は、塩基配列を変化させることなく遺伝子発現を制御する機構であり、トランスポソンの抑制や、胚発生に必須な機構である。私は、新たに 26S プロテアソームが DNA メチル化を介した遺伝子サイレンシングに関与することを明らかにした。

rpt2a 変異体を用いて、構成的発現プロモーターである 35S プロモーターにルシフェラーゼを融合した形質転換体(35S::LUC)を作成し、解析を行った。35S::LUC 導入 *rpt2a* 変異体では、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下した。そして、この活性低下は、ルシフェラーゼ遺伝子の mRNA 量が減少したことが原因であった。さらに、bisulfite sequencing 法によるメチル化レベルの解析から、ルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制は、*rpt2a* 変異体において 35S プロモーターが過剰なメチル化を受けたことに起因することを明らかにした。

植物における DNA メチル化は、維持型と、*de novo*型と呼ばれる新規メチル化の 2 種類の様式によって制御される。*de novo*型メチル化は、RNA 依存性 DNA メチル化 (RdDM) 経路と呼ばれる、small RNA 依存的なメチル化によって生じる。

遺伝学的解析から、*rpt2a* 変異体でみられた過剰な DNA メチル化は、RdDM 経路を介して生じることを明らかとした。一方、パラログ分子である *rpt2b* 欠損変異体では遺伝子サイレンシングを示さない。これらの結果から、19S^{RPT2a}プロテアソームは、RdDM 経路を介した DNA メチル化を負に制御することを明らかとした。本研究によって、26S プロテアソームと遺伝子サイレンシングとの関与が初めて示された。

これを要するに、著者は、植物プロテアソームの多様性ならびにプロテアソームサブユニットの新規機能が明らかとした。また、細胞サイズと DNA メチル化の関連性についても明らかとした。これらは、植物プロテアソームの機能性に関する新知見を得たものであり、今後の細胞生物学ならびに植物科学研究に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。