

博士論文（要約）

植物の高温応答時に働く RNA 分解酵素 DCP1 と DCP2 の解析

(Analysis of DCP1 and DCP2 under heat stress in *Arabidopsis thaliana*)

元村 一基

Kazuki Motomura

略語

CHX	Cycloheximide, シクロヘキシミド
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Col-0	Columbia-0
DDW	Double distilled water
DEG	Differentially expressed gene
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DTT	Dithiothreitol
ES	Enrichment score
FDR	False Discovery Rate
G3GFP	G3 green fluorescent protein
GO	Gene ontology
HSF	Heat shock factor
HSP	Heat shock protein
LB	Luria-Bertani
NIP5;1	NOD26-Like intrinsic protein 5;1
mRNA	Messenger RNA
P-body	Processing body
PBS	Phosphate buffered saline
qPCR	Quantitative PCR
RFP	red fluorescent protein
RISC	RNA induced silencing complex
SDS	Sodium dodecyl sulfate
T-DNA	Transfer DNA
3'UTR	3' untranslated region

第 I 章

温度応答時の DCP1 と DCP2 の挙動解析

序論

I.1.i 植物における遺伝子発現上昇を介した温度変化適応機構

近年、世界中で温暖化などの影響で気候変動による農作物の被害が拡大していることから、環境変化に適応し生育できる作物の作出が試みられている (Battisti and Naylor 2009, Bitar and Gerard 2013, Grover et al. 2013)。そのため植物の環境応答機構を理解することは植物研究分野において重要な課題の一つである。

これまでモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)をはじめとした植物の遺伝子の機能解析が進み、植物の環境適応における分子機構が解明されてきている。移動という手段を持たない植物は、遺伝子発現を迅速に変化させることで環境変化に対応(環境応答)している。例えば高温ではタンパク質の変性などによる機能喪失が生育障害の原因の一つとなる。そこで植物は Heat shock factor (HSF) A1 を始めとした転写因子を素早く発現させ、Heat shock protein (HSP) と呼ばれる「タンパク質の変性を防ぐ」酵素を作って高温に適応することが知られている (Wang et al. 2004, Yoshida et al. 2011)。また低温では ICE1 を始めとした転写因子を発現させて細胞膜を流動性の高い物質に再構築して凍結を防ぐ (Thomashow 1999, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006)。このように植物は多くの遺伝子発現を変動させて特定の環境に強い細胞内状態を作ることによって環境応答していると考えられている。

I.1.ii 植物の環境変化で起こる mRNA 分解

植物は環境変化に応じて上記のような転写上昇だけでなく、転写後レベルでも遺伝子発現調節を行っていると考えられている。例えばシロイヌナズナに浸透圧、傷害、紫外線、酸化などの環境変化を与え、マイクロアレイ解析を行ったところ、

計 9000 種類の mRNA が少なくとも一種類の環境変化後に減少していた (Narsai et al. 2007)。このように植物が環境応答する際には特定の mRNA を分解することが分かってきているが、その分子機構は不明である。

I.1.iii 脱 cap 酵素 DCP

DCP1 と DCP2 は複合体を作り、mRNA の 5'末端の cap 構造を除去する“脱 cap 反応”を行うことで mRNA 分解を促す、酵母、動物、植物に保存された酵素である(図 1A)(Coller and Parker 2004, Parker and Sheth 2007)。Dcp1p と Dcp2p は RNA 分解が異常となる酵母の変異体から同定され、この 2 つの酵素が相互作用していること、そして Dcp2p が脱 cap 反応の活性中心であることが確かめられた(Beelman et al. 1996, Coller and Parker 2004)。脱 cap された RNA はエキソヌクレアーゼである Xrn1p により即座に分解されることから、脱 cap 反応は RNA 分解のターニングポイントであると考えられている (Sheth and Parker 2003)。酵母では他にも幾つかの RNA 分解に関与するタンパク質が発見されている。Dcp1p、Dcp2p を含むそれらの mRNA 分解タンパク質は細胞質で顆粒状に局在しており、その顆粒は Processing body (P-body) と呼ばれている (図 1A) (Sheth and Parker 2003)。

動物では酵母と異なり Dcp1p と Dcp2p は直接相互作用せず、他のタンパク質を介して大きな複合体を作っていると考えられている (Franks and Lykke-Andersen 2008)。また、動物では酵母以上に多くの RNA 制御に関するタンパク質が P-body に局在することが分かっており、多細胞生物の P-body が様々な生理機能に関与することが示唆されている (Parker and Sheth 2007)。

I.1.iv RNA 顆粒 Processing body (P-body)

一般的に Dcp1p や DCP2p が局在する細胞質顆粒が P-body と呼ばれているが、その明確な定義は決められていない。しかし P-body は mRNA 分解タンパク質が

P-body に局在することに加え、幾つかの知見から P-body は mRNA を足場とした RNA とタンパク質の複合体、RNA 顆粒” であると考えられている。例えば、P-body を含む酵母抽出物に RNaseA を処理すると P-body が消失する (Teixeira et al. 2005)。また、酵母で翻訳されない mRNA を強制的に過剰発現させると P-body の大きさや数が増加することも分かっている (Teixeira et al. 2005)。

また、以下の知見から、P-body に含まれる RNA は翻訳されていないと考えられている。例えば翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド (mRNA をリボソーム上に固定する作用をもつ) を処理すると、酵母の P-body が消失する (Sheth and Parker 2003, Cougot et al. 2004, Ferraiuolo et al. 2005, Teixeira et al. 2005)。一方、酵母や動物で環境変化や薬剤処理などで翻訳が抑制されると、P-body が大きくなる (Kedersha et al. 2005, Teixeira et al. 2005, Jud et al. 2008)。また、eIF4E を除き、翻訳開始因子やリボソームは酵母の P-body に含まれていないと考えられている (Brenques et al. 2005, Ferraiuolo et al. 2005, Teixeira et al. 2005)。

P-body に mRNA 分解タンパク質が局在することから、P-body は mRNA 分解の場であると考えられている。また、mRNA の分解中間体が酵母 P-body に蓄積している (Sheth and Parker 2003)。更に Xrn1p の機能を欠損させると P-body が大きくなることから、P-body で mRNA 分解が起きているという仮説が支持されている (Parker and Sheth 2007)。

このように様々な状況的証拠から P-body の機能や役割が論じられているが、まだ不明な点も多く残っている。例えば酵母の P-body は大きさにバラつきが多く、顆粒ごとに局在するタンパク質に違いがあることも示唆されている (Parker and Sheth 2007)。また、動物の P-body には細胞質中を動き回る粒とほとんど動かない粒が存在するが、その機能的差異は分かっていない (Erickson and Lykke-Andersen 2011)。また、酵母の P-body に取り込まれた mRNA の一部が再びリボソームに取り込まれて翻訳されるという報告もあり、まだまだ P-body の役割に関しては不明な点が多い (Arribere et al. 2011)。

I.1.v 植物の DCP と P-body 研究

酵母や動物のホモログとして、シロイヌナズナで植物の DCP1 と DCP2 が同定された (Xu et al. 2006, Iwasaki et al. 2007)。シロイヌナズナでも酵母と同様に DCP2 が脱 cap 反応の活性をもち (Xu et al. 2006, Iwasaki et al. 2007)、DCP1 は脱 cap 反応の活性化因子と考えられた (図 1B) (Xu et al. 2006)。細胞質で顆粒状に局在することから、植物の DCP1 と DCP2 が酵母や動物と同様の機能と役割を持つと考えられてきた (Xu et al. 2006, Iwasaki et al. 2007)。また、シロイヌナズナの *dcp1*、*dcp2* それぞれの null 変異体は実生致死性の表現型を示す (Xu et al. 2006, Iwasaki et al. 2007)。

植物が低酸素や高温に晒されると DCP1 顆粒数が増加することから、植物でも P-body が環境応答に関与することが示唆されてきた (Weber et al. 2008, Pomeranz et al. 2010)。しかし過去の研究では CaMV35S のような恒常的発現プロモーターを用いて DCP1 や DCP2 を発現させており、これらの植物が時に生殖生長期に表現型の異常を示すことが報告されている (Xu et al. 2006, Goeres et al. 2007, Iwasaki et al. 2007)。また、我々の研究室での先行研究で、タバコ葉を用いた一過的発現実験で DCP1 と DCP2 が顆粒状に共局在したという結果を除き (Iwasaki et al. 2007)、DCP1 と DCP2 を植物細胞内で同時に見る試みはなされていない。このように植物ではまだ DCP1 と DCP2 の挙動に関して不明な点が多い。

I.1.vi 研究目的

本研究の目標はモデル植物であるシロイヌナズナを用いて mRNA 分解を介した植物の環境応答機構を明らかにし、新しい側面から理解することを目的としている。第一章では mRNA を介した遺伝子発現制御を行う場所と考えられている、細胞質顆粒 P-body に着目した。代表的な P-body マーカーである DCP1 と DCP2 を可視化した植物に高温処理、または低温処理を施し、顕微鏡観察を行った。また、DCP1 と DCP2 が同時に可視化できる植物も作出して同様に顕微鏡観察した。

そして、過剰発現体を用いて温度変化への耐性に対する DCP1 と DCP2 の重要性を調べた。

本研究では高温として 40℃ という温度を用いた。シロイヌナズナにとって 40℃ は 1-2 時間程度では生育に大きな影響は無いが、長時間（10 時間以上）では生育阻害を引き起こし、場合により死んでしまう温度である（Yeh et al. 2012）。

結果

1.2.i *dcp1-1*、*dcp2-1* 変異体が生ずる致死表現型

DCP1 の変異体 *dcp1-1* と DCP2 の変異体 *dcp2-1* (Iwasaki et al. 2007, Motomura et al. 2012)を用いて、まずこれらの表現型を観察することから始めた。

ヘテロ接合体から収穫した種子を MS 寒天培地に播種すると、ほぼ全ての種子が発芽するにもかかわらず、発芽 6 日目でおおよそ 4 個体に 1 個体の割合で異常な形態を示す個体が出現した。正常な形態を示す個体をジェノタイピングしても変異ホモ接合体が選抜できないことから、異常な形態を示すものが変異ホモ接合体であることが予想された。

これらの変異ホモ接合体は発芽間もない段階から形態異常を示し、発生が進まずにそのまま死んでしまう致死表現型を示す。同じ時期に播種した野生型と比較すると植物の発生速度や段階に著しい違いがあった (図 2A)。

1.2.ii DCP1、DCP2 を可視化するための植物の作出

DCP1 及び DCP2 が植物細胞内においてどのように局在しているかを調べるために、*dcp1-1* と *dcp2-1* をそれぞれ DCP1 または DCP2 遺伝子コンストラクトにより相補した植物体を作製することにした。その際それぞれのネイティブプロモーターと下流の DCP1 もしくは DCP2 ゲノム配列の C 末側に GFP 配列をつないだ融合タンパク質を発現するコンストラクトを用いた。これらの相補植物体は致死性が回復した (図 2A)(Motomura et al. 2012)。*dcp1-1*、*dcp2-1* 変異が相補できたと考えられ、それぞれを DCP1-GFP 植物、DCP2-GFP 植物と呼ぶことにした。

1.2.iii DCP1-GFP、DCP2-GFP の異なる細胞内局在パターン

まず DCP1-GFP を蛍光顕微鏡を用いて観察した。様々な組織で蛍光が見られたが、根端や茎頂分裂組織など細胞分裂が活発な組織の細胞で特に顆粒が多く観測された (図 2B)。根の伸長領域において、多くの顆粒は細胞膜付近にとどまっていたが、一部の顆粒は素早く様々な方向に動いていた。一方で根端では細胞が小さいためか、顆粒の動きは殆ど見られなかった。

次に DCP2-GFP 植物を観察すると細胞質全体に GFP が広がっており、DCP1-GFP 植物と異なり明確な顆粒はほとんど認められなかった (図 2B, Root tip)。また、DCP2-GFP 由来の蛍光自体は根端分裂組織や茎頂分裂組織において強く観測され、DCP1 の発現パターンと一致した (図 2B)。葉などでは時おり細長い顆粒状の蛍光が観察されたが、葉緑体由来の自家蛍光であった (図 2B, Leaf)。

以上の結果より、DCP1 と DCP2 は細胞分裂が盛んな組織において多く発現していると予想された。一方で DCP1 と DCP2 は常に共局在して機能していると考えられていたが、以上の観察結果から異なる細胞内局在パターンをしていることが示唆された。

1.2.iv 高温処理による DCP2-GFP の顆粒形成

次にこれらの植物に高温処理を施して、その後の DCP1 と DCP2 の挙動を観察した。1.2.iii の結果より、顆粒が極端に多い根端よりも伸長領域の方が (図 2B, Root) また葉緑体の持つ自家蛍光が多い葉よりも根の方が個々の顆粒構造が観察しやすかった。そこで以下の実験では、根の伸長領域で一連の顆粒観察を行った。予備的な実験結果では、高温では 90 分前後で DCP1 顆粒が最もよく観察できた (Le Thi Nhat Quy, 本学理学系研究科 2012 年度修士論文)。この結果を踏まえ、以下の高温処理では 40 90 分という条件を用いて DCP1 と DCP2 の局在を観察した。以下、この章の「高温処理」は断りのない場合、40 90 分を指す。

高温処理した DCP1-GFP 植物 (40) では、未処理植物 (22) と比較し

てより大きな DCP1-GFP 顆粒数が観察された (図 3A)。高温処理により統計的に有意では無いものの、顆粒数が増加傾向にあった (図 3B)。この顆粒を大きさ別に分けたところ、より大きな顆粒が増加していることが分かった (図 3E)。

同様に DCP2-GFP 植物に高温処理すると、はっきりした顆粒構造が観察できた (図 3C)。このとき DCP2-GFP 顆粒数は未処理植物と比較して有意に増加した (図 3D)。DCP1-GFP 植物と比較して顆粒数の増加は顕著であり、同時に細胞質中全体に散在している GFP の蛍光は減少して見えた (図 3C)。当研究室の先行研究でも地上部 (葉の表皮細胞) において同様に高温処理によって DCP1-GFP、DCP2-GFP 顆粒数の増加が見られている (Le Thi Nhat Quy 修士論文)。

過去の論文では過剰発現した DCP2 が多くの顆粒を形成すると報告されていた (Xu et al. 2006, Goeres et al. 2007)が、本研究では DCP2 ネイティブプロモーターを用いて変異体を相補したことで、より自然な状態に近い DCP2 の局在を観察できていると考えている。

1.2.v 高温処理時の DCP1 と DCP2 の共局在観察

シロイヌナズナでは DCP1 と DCP2 を同時に可視化する実験は報告されていない。高温処理時による DCP1 と DCP2 の局在変化の意義を知るために、DCP1 と DCP2 を同時に可視化できる形質転換植物を作出した。

1.2.v.a 高温処理を引き金とした DCP2-RFP の DCP1-GFP 顆粒への集合

DCP2 ネイティブプロモーターと DCP2 の C 末端に tagRFP 配列をつないだ融合タンパク質を発現するコンストラクトを DCP1-GFP 植物に形質転換し、DCP1-GFP と DCP2-tagRFP が同時に可視化できる植物を作出した。この植物を DCP1-GFP/DCP2-RFP 植物と呼ぶ。また、この DCP2-tagRFP コンストラクトが *dcp2-1* の表現型を相補することも別途確認している。

植物の生育に適切な温度 (22) において、わずかな DCP2-RFP 蛍光シグ

ナルが DCP1-GFP 蛍光と共局在していた（図 4A、矢印）。しかし大部分の DCP2-RFP は細胞質全体に拡散していた（図 4A）。DCP1-GFP 単独の顆粒、DCP2-RFP 単独の顆粒、DCP1-GFP と DCP2-RFP が共局在した顆粒に分けた際の 3 種類の顆粒数の比を解析したところ、DCP1-GFP と DCP2-RFP が共局在した顆粒は全体の 17.9%にとどまり、DCP1 単独の顆粒が 80%以上をしめた（図 4C）。この植物に高温処理をしたところ、DCP1-GFP 顆粒と同程度の大きさの DCP2-GFP 顆粒が観察できるようになった（図 4B）。高温処理後についても同様に 3 種類の顆粒数の比を解析したところ、DCP1-GFP と DCP2-RFP が共局在した顆粒の割合は 68.9%に増加した（図 4C）。更に明確な DCP2-RFP 単独の顆粒も 13.2%存在した（図 4C）。

この結果より、DCP2 が高温処理により元々存在していた DCP1 顆粒に集合することが示唆された。その可能性を確かめるため、DCP1-GFP/DCP2-RFP 植物を高温に晒した直後から顆粒の経時変化を観察した。高温処理前は DCP2-RFP のほとんどが細胞質に拡散していた（図 4D, 0min）のが、高温処理を施すと時間の経過と共に DCP2-RFP 蛍光が DCP1-GFP 顆粒に重なって強くなっていく様子が観察できた。40 分に晒して 40 分後には、はっきりとした DCP2-RFP 顆粒が DCP1 顆粒と共局在した（図 4D, 40min）。また、DCP1-GFP 顆粒は 40 分に晒した直後は細胞質中を動き回っていたが（図 4D, 0min）時間が経つにつれほとんど動かなくなった（図 4D, 20-40min）。

I.2.v.b 高温時の DCP2-GFP と DCP1-RFP の共局在

局在性が蛍光タンパク質によって変わるという可能性を排除するため、以下の別の形質転換植物を作出した。まず DCP1 ネイティブプロモーターによって DCP1 の C 末端に tagRFP 配列をつないだ融合タンパク質を発現するコンストラクトを *dcp1-1* 植物に形質転換した。次にその植物と DCP2-GFP 植物を交配することで DCP1-tagRFP と DCP2-GFP が同時に可視化できる植物を作出し、この植物を

DCP1-RFP/DCP2-GFP 植物と呼ぶことにした。また、この DCP1-tagRFP コンストラクトが *dcp1-1* の表現型を相補することも確認した。

22 では 85% の DCP1-RFP 顆粒は DCP2-GFP と別に存在していたが(図 5A と C)高温処理により全顆粒中の 53.1% が DCP1-RFP と DCP2-GFP の共局在顆粒となった(図 5B と C)。この結果は DCP1-GFP/DCP2-RFP 植物での高温処理による共局在顆粒増加傾向と一致する(図 4C)。

以上の結果より、通常時は細胞質中に拡散している DCP2 が、高温処理により DCP1 顆粒の元に集合して DCP2 顆粒を形成することが明らかになった。

1.2.vi シクロヘキシミド (CHX) 処理による DCP1 顆粒と DCP2 顆粒の形成阻害

翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) は mRNA をリボソーム上に固定する作用をもち、P-body など mRNA を足場にした細胞質顆粒を減少させることが知られている (Ferraiuolo et al. 2005, Franks and Lykke-Andersen 2007, Swetloff et al. 2009)。そこで、DCP1 または DCP2 を可視化した植物に CHX を処理し、顆粒形成に影響を与えるかを調べた。まず 22 のままで DCP1-GFP 植物に CHX を処理し 3 時間後に観察した。その結果通常の温度で DCP1-GFP 顆粒数が CHX 処理を施すと大きく減少することが明らかとなった(図 6A, C)。また、CHX 処理した植物に高温処理をしても顆粒数は増加せず、高温処理による顆粒数増加が阻害された(図 6B, C)。

DCP2-GFP は元々 22 であまり顆粒構造が見られないためか、CHX 処理前後で大きな顆粒数の変化は見られなかった(図 6D, F)。しかし CHX 処理した植物では、高温処理してもほとんど顆粒数増加が見られず、CHX 処理をしない場合に比べて有意に顆粒数が減少した(図 6E, F)。

以上の結果より、高温処理により形成される DCP1 顆粒と DCP2 顆粒は、酵母の P-body などと同様に mRNA を足場にした複合体であり、翻訳とも関連して

いることが示唆された。

I.2.vii 低温処理時の DCP2 の細胞質への拡散

これまで植物では低温時での DCP1 や DCP2 の挙動は報告されていない。そこで本研究では新たな環境変化として低温処理を行い、その後の DCP1 と DCP2 の挙動を観察した。予備実験の結果で、低温（4℃）にさらすと 20 時間前後で DCP1 顆粒数が最もよく観察できた（Le Thi Nhat Quy 修士論文）。この結果を踏まえ、低温処理では 4℃ 20 時間という条件で DCP1 と DCP2 の局在を観察した。以下、低温処理は 4℃ 20 時間を指す。

低温処理した DCP1-GFP 植物（4℃）では、未処理植物（22℃）と比較して多くの DCP1-GFP 顆粒数が観察できた（図 7A）。顆粒数を数えると、低温処理により有意に顆粒数が増加していた（図 7B）。一方、DCP2-GFP 植物に低温処理（4℃）しても、ほとんど顆粒は見られなかった（図 7C）。顆粒数を数えたところ、22℃の植物と比べ、有意に DCP2-GFP 顆粒が減少した（図 7D）。ちなみに地上部（葉の表皮細胞）においても低温処理により DCP1-GFP 顆粒が増加する一方、DCP2-GFP 顆粒は増加しないことが確認されている（Le Thi Nhat Quy 修論）。

これらの結果から、DCP2 は高温処理と低温処理に対して異なる応答を示すことが示唆された。

I.2.viii 低温処理時の DCP1 と DCP2 の共局在率減少

低温処理において DCP1 顆粒数が減少したが、その際に DCP2 と共局在するかどうかを観察した。最初に DCP1-GFP/DCP2-RFP 植物を観察した。22℃では DCP1-GFP 顆粒と共局在する DCP2-RFP 顆粒が確認できた（図 8A、矢印）。しかし低温処理により DCP2-RFP 顆粒はほとんど観察できなくなった（図 8B）。顆粒数比を解析したところ、22℃では DCP1 と DCP2 の共局在顆粒が 25.1%であったのに対し、低温処理した植物では 10.9%に減少した（図 8C）。DCP1-RFP/DCP2-GFP

植物においても同様に低温処理によって DCP1 と DCP2 が共局在する顆粒が減少することが確かめられた (図 8D-F)。

1.2.ix 高温、低温処理時の DCP1、DCP2 タンパク質の蓄積量

これまでの観察結果から高温、または低温処理によって DCP1 と DCP2 の顆粒数が増減することが明らかとなった。この現象の原因として 1) DCP1、DCP2 のタンパク質の蓄積量が増減したために顆粒数が増減した、2) 温度処理前から既存のタンパク質が集合、離散することによって顆粒数が増減した、という 2 つの可能性が考えられる。どちらの現象が起きているのか確かめるために、高温または低温処理した際の DCP1、DCP2 のタンパク質の蓄積量をウエスタンブロッティングにより調べた。

観察時と同様の条件で DCP1-GFP 植物体を高温処理し、タンパク質を抽出して DCP1 を検出した。この結果、DCP1 のタンパク質の総量に大きな変化は見られなかった(図 9A)。同様に DCP2-GFP 植物体に高温処理をしても、処理前後において DCP2 タンパク質の量に大きな増減は無かった (図 9B)。

このとき、DCP1 をウエスタンブロッティングで検出すると 2 本のバンドが見られた。先行研究により DCP1 は 2 本のバンドとして検出されることが分かっている。泳動度の遅いバンドはリン酸化型 DCP1、速いバンドは非リン酸化型 DCP1 であることが報告されている (Le Thi Nhat Quy 修論) (Xu and Chua 2012)。リン酸化状態の違いに着目すると、高温処理により上のリン酸化型 DCP1 の割合が増加する傾向にあった (図 9A)。また、40 から 22 に植物を戻す (高温解除) とリン酸化型 DCP1 の割合が減少し、非リン酸化型 DCP1 の割合が増加する傾向にあった (図 9A)。

一方、低温処理した際、さらに 4 から 22 に戻した際、どちらにおいても DCP1 タンパク質、DCP2 タンパク質の総量の変化は見られなかった(図 9C、D)。ただし DCP1 は低温処理により下の非リン酸化型 DCP1 バンドの割合が増加する

傾向にあった（図 9C）。

以上の結果から高温、または低温処理前後で DCP1、DCP2 のタンパク質総量はあまり変化しないことが分かった。これらの結果は観察実験で見られた顆粒の増減がタンパク質の増減によるものではなく、既存の DCP1 と DCP2 が離散集合することによって起こることを示唆している。

考察

I.3.i 高温処理時の DCP1/2 body 形成

これまで他生物での知見から、植物においても DCP1 と DCP2 は常に複合体を形成し顆粒を作ると考えられていた(Franks and Lykke-Andersen 2008, Xu and Chua 2011)。しかし本実験結果から、シロイヌナズナの適切な生育条件である 22℃ では DCP2 の多くは細胞質に拡散しており、DCP1 は顆粒状に局在するといったそれぞれ異なる局在パターンを示した。また、高温処理した際には DCP2 顆粒の形成が促進された(図 3C)。共局在に関する解析によって、高温処理により DCP2 が DCP1 顆粒に集合していく様子が観察できた(図 4)。

これまで多くの生物種において、DCP1 と DCP2 は同等に P-body マーカーとして使用されてきたことから、本論文でも DCP1、または DCP2 を含む細胞質顆粒を P-body と定義する(Parker and Sheth 2007, Xu and Chua 2011)。その上で本考察では、便宜上顆粒の構成要素の違いから DCP1 body、DCP2 body、DCP1/2 body と区別して呼ぶことにする。

図 12 は本研究より導かれた DCP1/2 body 形成の過程をしめすモデル図である。22℃ において、DCP1 の多くは DCP1 body を形成している。一方で DCP2 は一部 DCP1 body に含まれるものを除き、大部分が細胞質中に拡散している(図 12 左)。植物が 40℃ に晒されると、DCP2 は DCP1 body に集合し、DCP1/2 body を形成する。DCP1 もまた互いに集合して、新たな DCP1 body を形成する(図 12 右)。

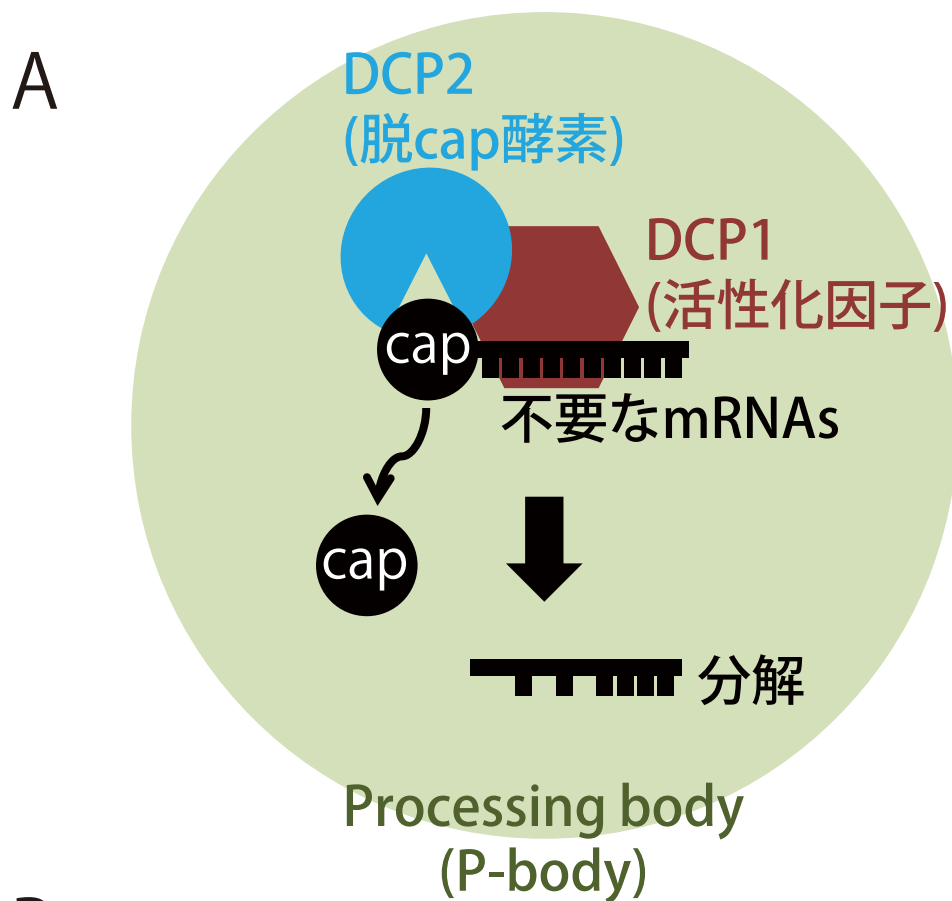
I.3.ii 低温処理時の DCP1 body 形成

植物を低温処理したところ、DCP1 顆粒は増加したが、DCP2 顆粒は減少した(図

7)。このように DCP1 と DCP2 が環境変化をうけて、全く逆の挙動を示すという報告は動物を含めても例がない。低温処理により形成された DCP1 body の生物学的意義は不明であるが、脱 cap 活性を持つ DCP2 は拡散したままであることから、mRNA 分解とは別の役割を持つ可能性が高い。低温時に一時的な mRNA の翻訳抑制をしつつ、通常の温度で利用する mRNA を分解せず保管することで、正常な温度に戻った際に素早く必要なタンパク質を翻訳する「mRNA 格納場所」として働くのかもしれない。酵母ではグルコース飢餓条件で P-body に含まれる mRNA は翻訳が抑制されており、ストレスが無くなったあとに一部の mRNA が翻訳を再開するという報告がある(Brengues et al. 2005, Arribere et al. 2011)。シロイヌナズナが低温に晒された際に mRNA の安定性が増すという報告があることから(Chiba et al. 2013)、DCP1 body が mRNA を格納するという可能性が十分に考えられる。

第 I 章 図

図 1 ~ 1 2



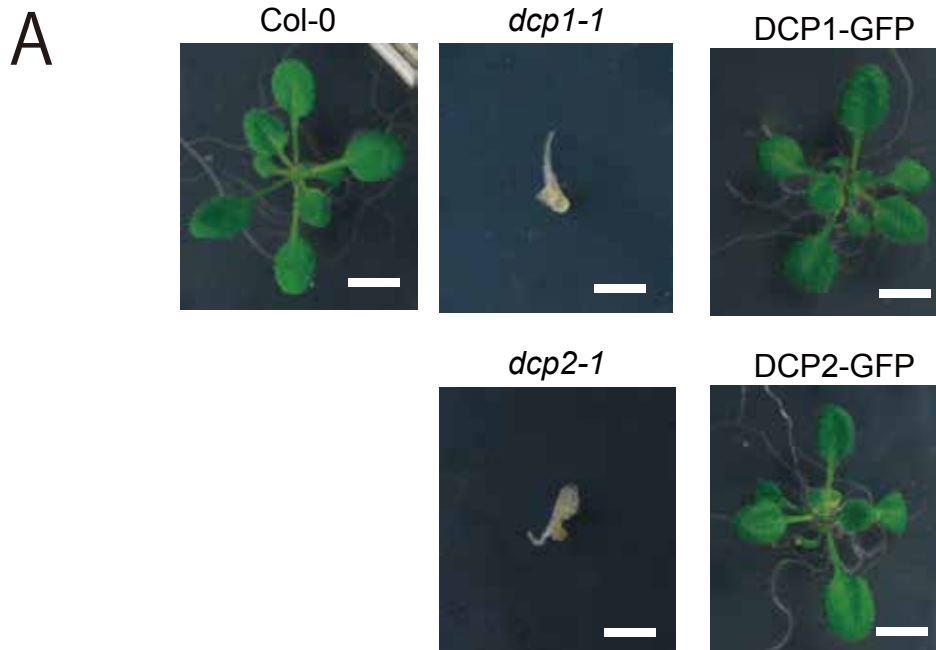
B

タンパク質	分子量	機能
 DCP1	40 K	脱cap反応活性化因子
 DCP2	42 K	脱cap反応活性中心

図 1. 真核生物における脱 cap を介した mRNA 分解モデル

(A) 脱 cap 酵素 DCP2 は活性化因子である DCP1 と共に複合体を形成して mRNA に結合し、5'cap 構造を除きその mRNA の分解を促す。DCP1 と DCP2 は細胞質中で Processing body (P-body) と呼ばれる細胞質顆粒に局在する。

(B) DCP1 と DCP2 それぞれの分子量と機能。



Motomura et al, (2012) RNA biol. を改変

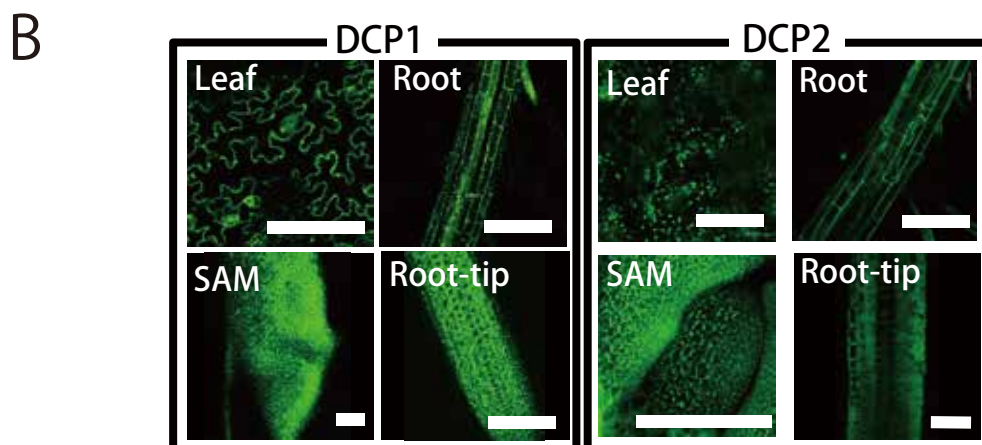


図 2. *dcp1*、*dcp2* 変異体とその相補植物体の表現型、その組織別蛍光画像

(A) $P_{DCP1}::DCP1-GFP$ と $P_{DCP2}::DCP2-GFP$ でそれぞれ *dcp1-1*, *dcp2-1* を相補した植物の表現型。全ての植物は発芽後 15 日目。形態異常を示す *dcp1-1*、*dcp2-1* に比べ、これらの変異体を相補した *dcp1-1/P_{DCP1}::DCP1-GFP* (以下 DCP1-GFP 植物)、*dcp2-1/P_{DCP2}::DCP2-GFP* (以下 DCP2-GFP 植物) は野生型 Col-0 と同様に正常に発生した。Scale bars= 1 cm。

(B) 葉の表皮組織 (Leaf)、根の伸長領域 (Root)、茎頂分裂組織 (SAM)、根端 (Root-tip) における DCP1-GFP, DCP2-GFP の蛍光写真。DCP1、DCP2 どちらにおいても全ての組織で蛍光が観察され、分裂組織である茎頂分裂組織、根端細胞でより強い蛍光が見られた。Scale bars= 100 μm 。

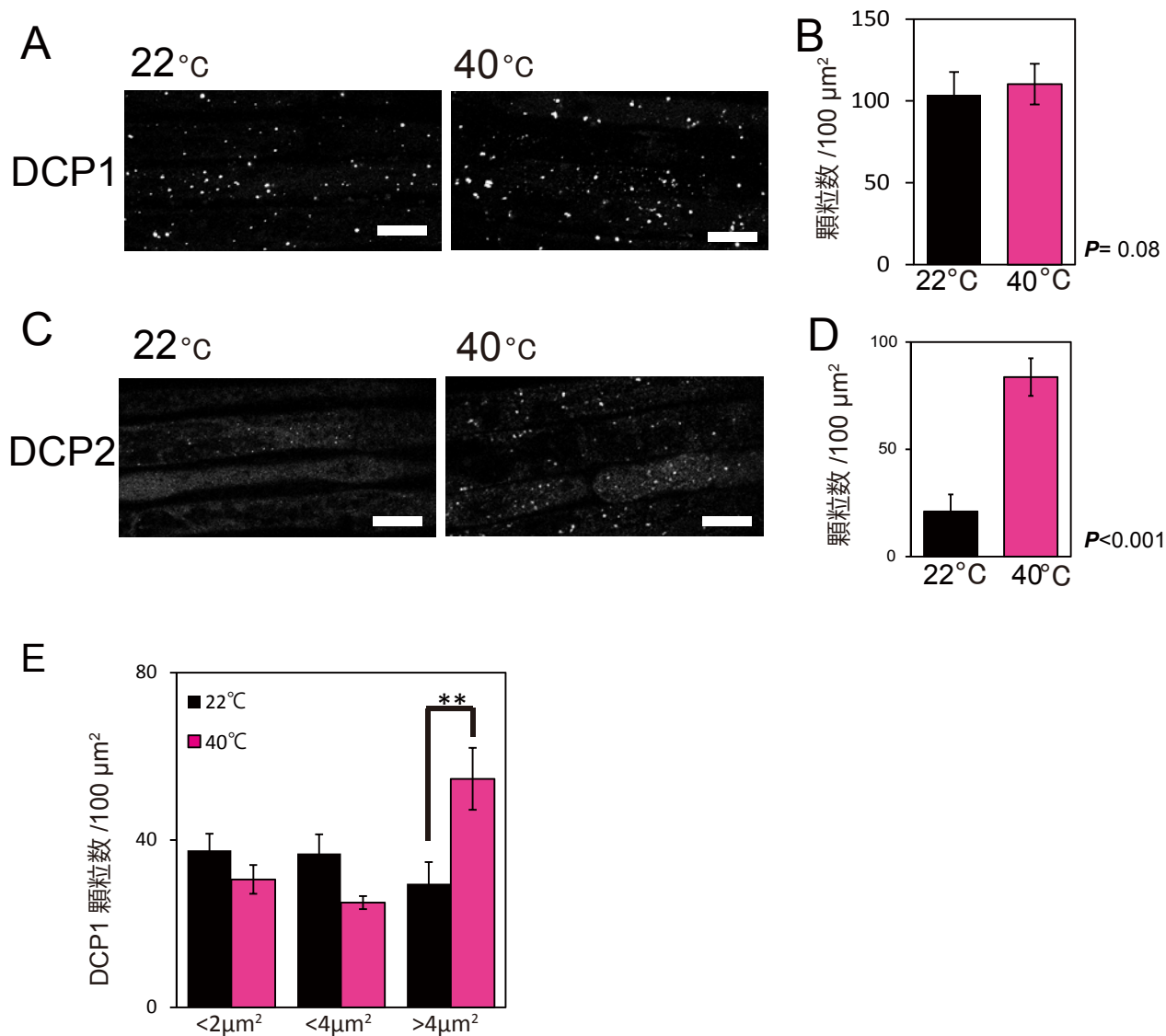


図 3. 高温処理した際の DCP1-GFP, DCP2-GFP の顆粒数変化

(A) 22°C(左) と 40°C(右) における DCP1 の局在。

(B) 22°Cと 40°Cそれぞれの温度における DCP1 顆粒数。(n=36)

(C) 22°C(左) と 40°C(右) における DCP2 の局在。

(D) 22°Cと 40°Cそれぞれの温度における DCP2 顆粒数。(n=17)

(E) 22°Cと 40°Cそれぞれの温度における DCP1 顆粒数 (B) を大きさ別に分けたもの。

DCP1, DCP2 共に短時間 (90 分) の高温処理により大きな集合体を作った。

根の伸長領域表皮細胞で全ての観察を行った。Scale bars= 20 μm 。

** $P<0.01$ 。

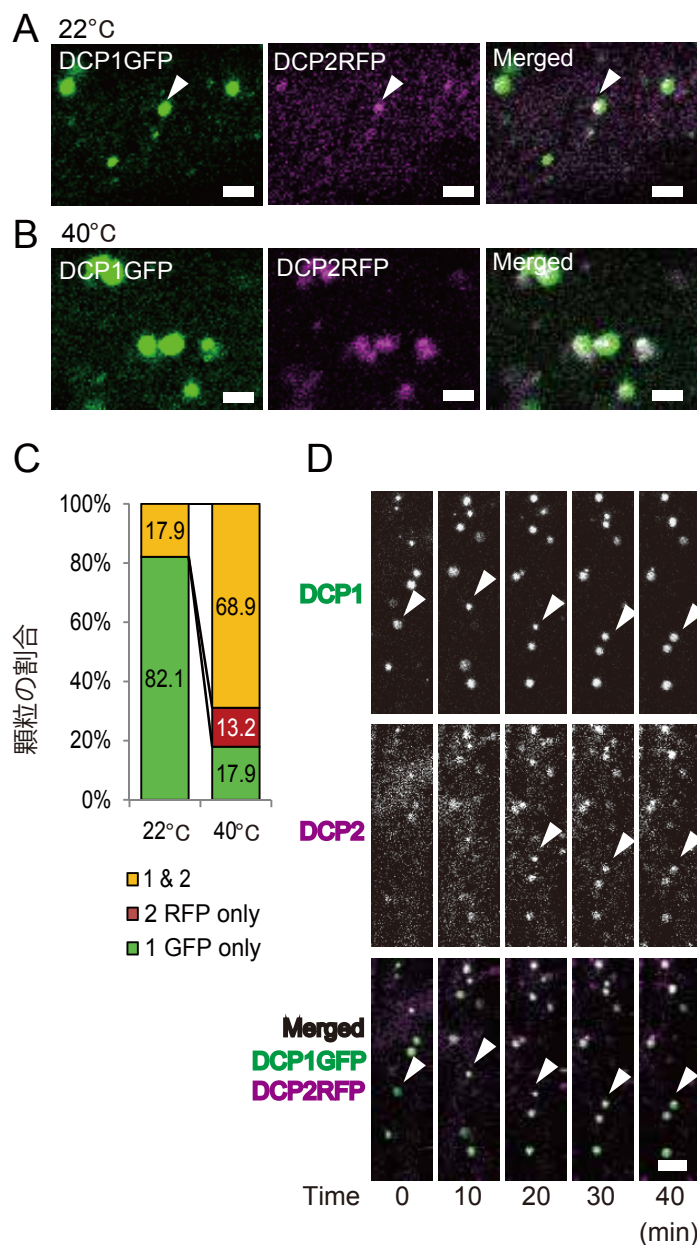


図 4. 高温処理した際の DCP1-GFP/DCP2-RFP 共局在

(A) 22°Cにおける DCP1-GFP (緑) と DCP2-RFP (赤紫) の局在。Merged 中の白い部分が共局在を示す。矢印は共局在している顆粒を示す。Scale bars= 2 μ m。 (B) 40°Cにおける DCP1-GFP (緑) と DCP2-RFP (赤紫) の局在。Scale bars= 2 μ m。 (C) DCP1-GFP と DCP2-RFP それぞれの顆粒の共局在の割合。それぞれ 22°Cでは 832 個 (12 個体)、40°Cでは 1311 個 (23 個体) の顆粒から算出した。

(D) 高温に晒した植物内における DCP1-GFP と DCP2-RFP タイムラプス解析。DCP1-GFP (緑) と DCP2-RFP (赤紫)。矢印は共局在顆粒を示す。22°Cで育てられた植物体を Time=0 から 40 分間 40°Cに晒した。

高温処理により時間経過と共に DCP2 が DCP1 顆粒に集まっていく様子が観察できた。

Scale bars= 5 μ m。

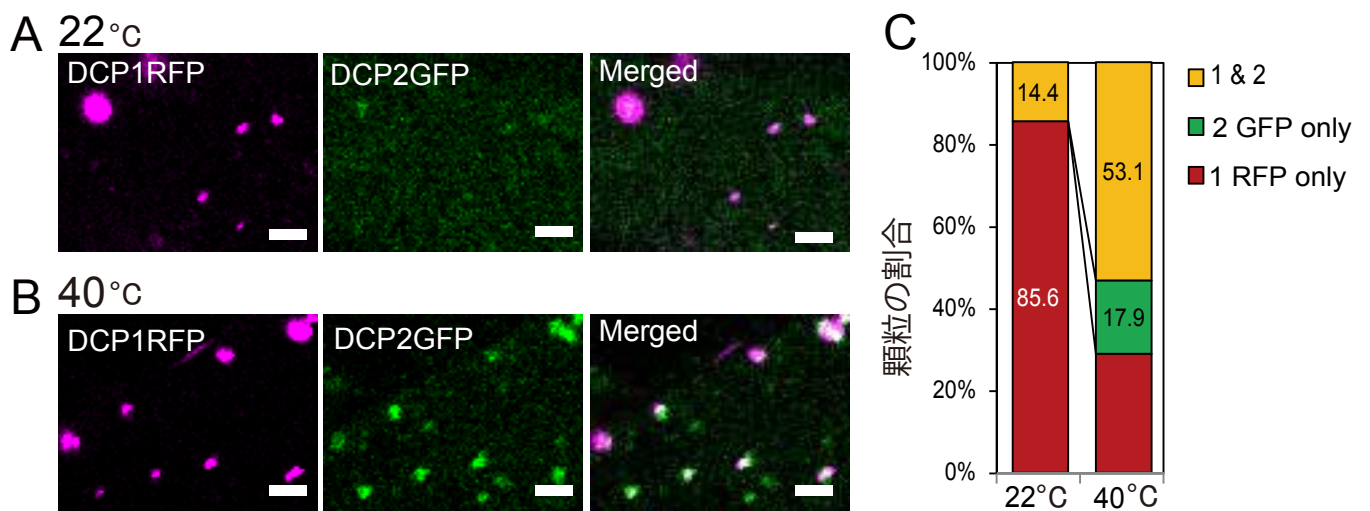


図 5. 高温処理した際の DCP1-RFP/DCP2-GFP 共局在

(A) 22°Cにおける DCP1-RFP(赤紫) と DCP2-GFP (緑) の局在。Scale bars= 2 μ m。

(B) 40°Cにおける DCP1-RFP(赤紫) と DCP2-GFP (緑) の局在。Scale bars= 2 μ m。

(C) DCP1-RFP と DCP2-GFP それぞれの顆粒の共局在の割合。それぞれ 22°Cでは 1076 個(18 個体)、40°Cでは 508 個 (11 個体) の顆粒から算出した。

図 4 と同様に高温処理により DCP2 は DCP1 顆粒の元に集合した。

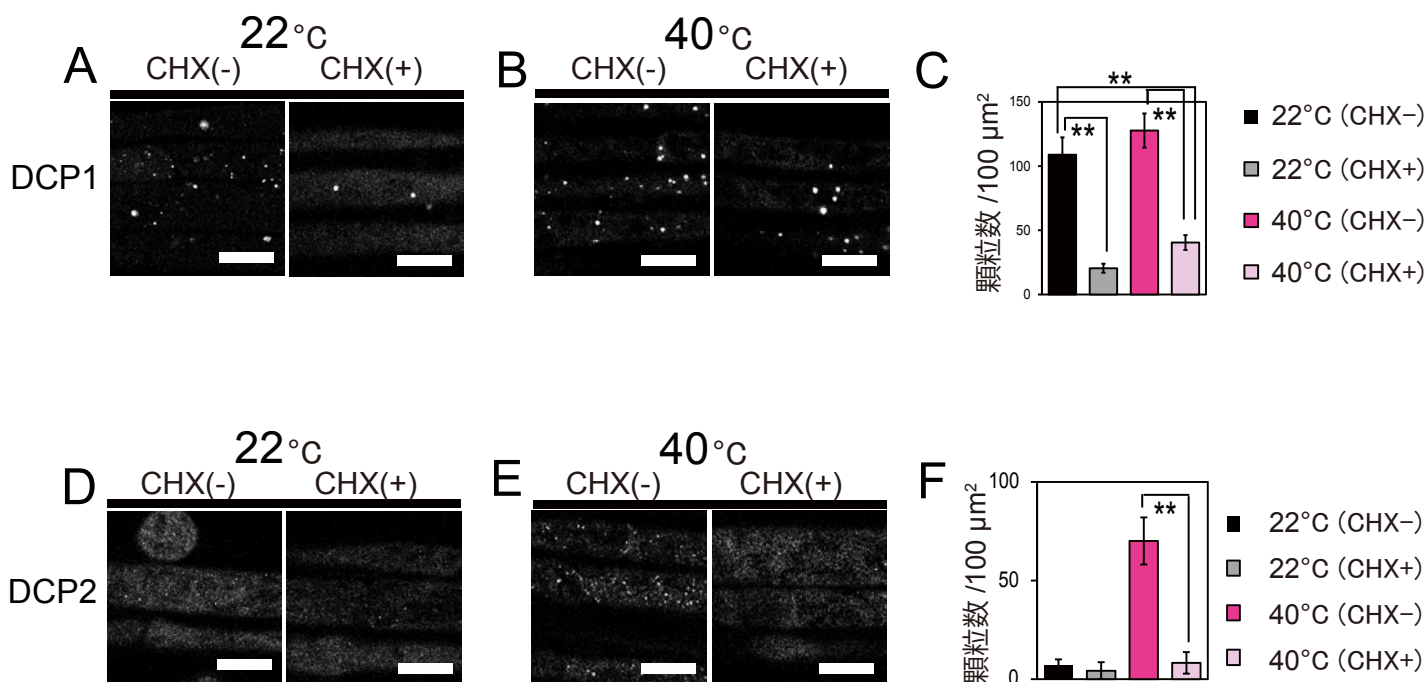


図 6. シクロヘキシミド (CHX) による DCP1 と DCP2 顆粒形成への影響

(A) 22°Cにおける CHX 無し (左) または CHX あり (右) の際の DCP1 の局在。

(B) 40°Cにおける CHX 無し (左) または CHX あり (右) の際の DCP1 の局在。

(C) CHX 無し、ありそれぞれの DCP1 顆粒数。(n=19)

(D) 22°Cにおける CHX 無し (左) または CHX あり (右) の際の DCP2 の局在。

(E) 40°Cにおける CHX 無し (左) または CHX あり (右) の際の DCP2 の局在。

(F) CHX 無し、ありそれぞれの DCP2 顆粒数。(n=9)

CHX 処理により DCP1、DCP2 共に顆粒形成が阻害された。

Scale bars= 20 μm 。 ** $P < 0.01$ 。

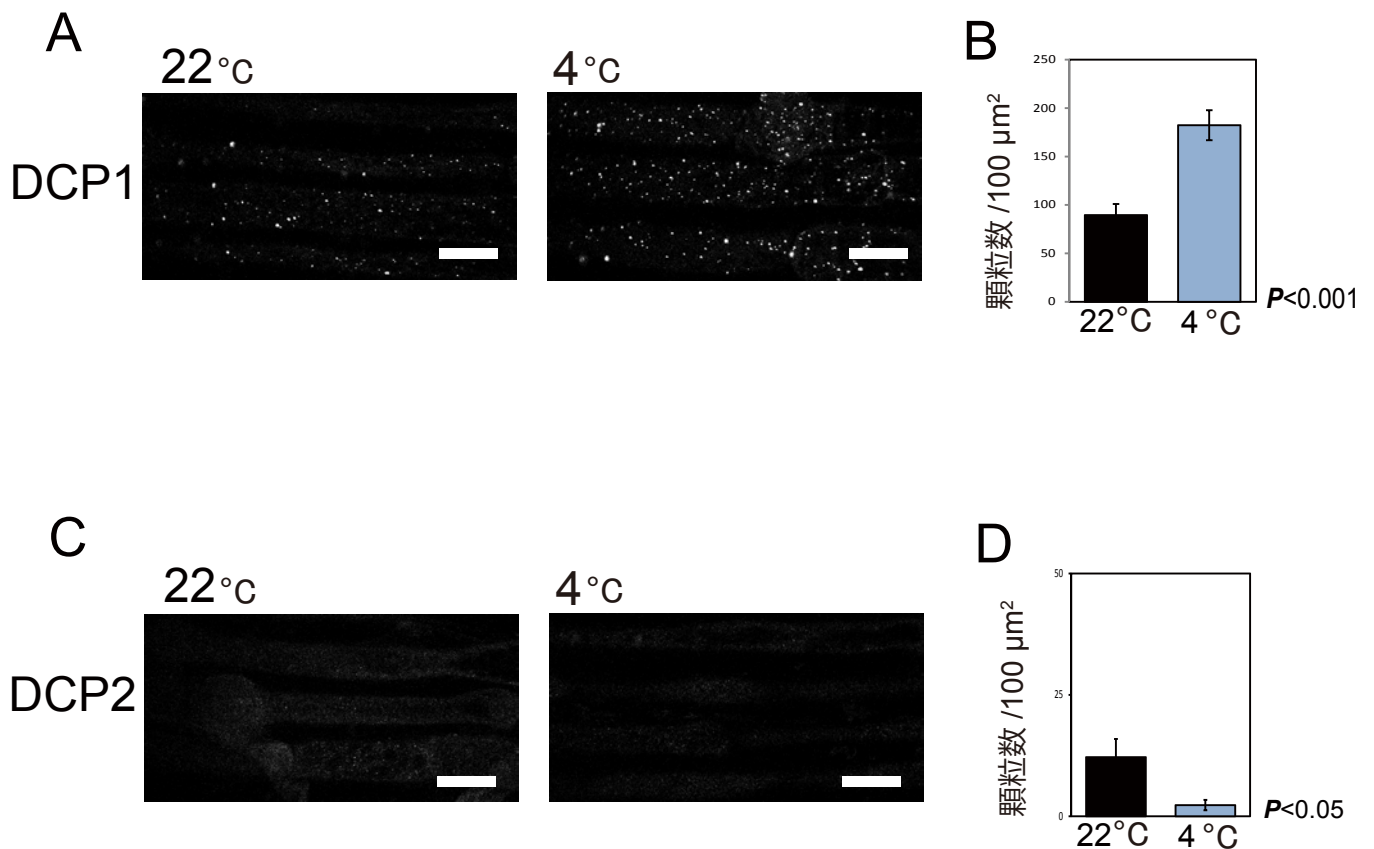


図 7. 低温処理した際の DCP1-GFP, DCP2-GFP 顆粒数変化

(A) 22°C(左) と 4°C(右) における DCP1 の局在。

(B) 22°Cと 4°Cそれぞれの温度における DCP1 顆粒数。(n=14)

(C) 22°C(左) と 4°C(右) における DCP2 の局在。

(D) 22°Cと 4°Cそれぞれの温度における DCP2 顆粒数。(n=24)

低温処理で DCP1 顆粒が増加した一方、DCP2 顆粒はほとんど見られなくなった。

Scale bars= 20 μm 。

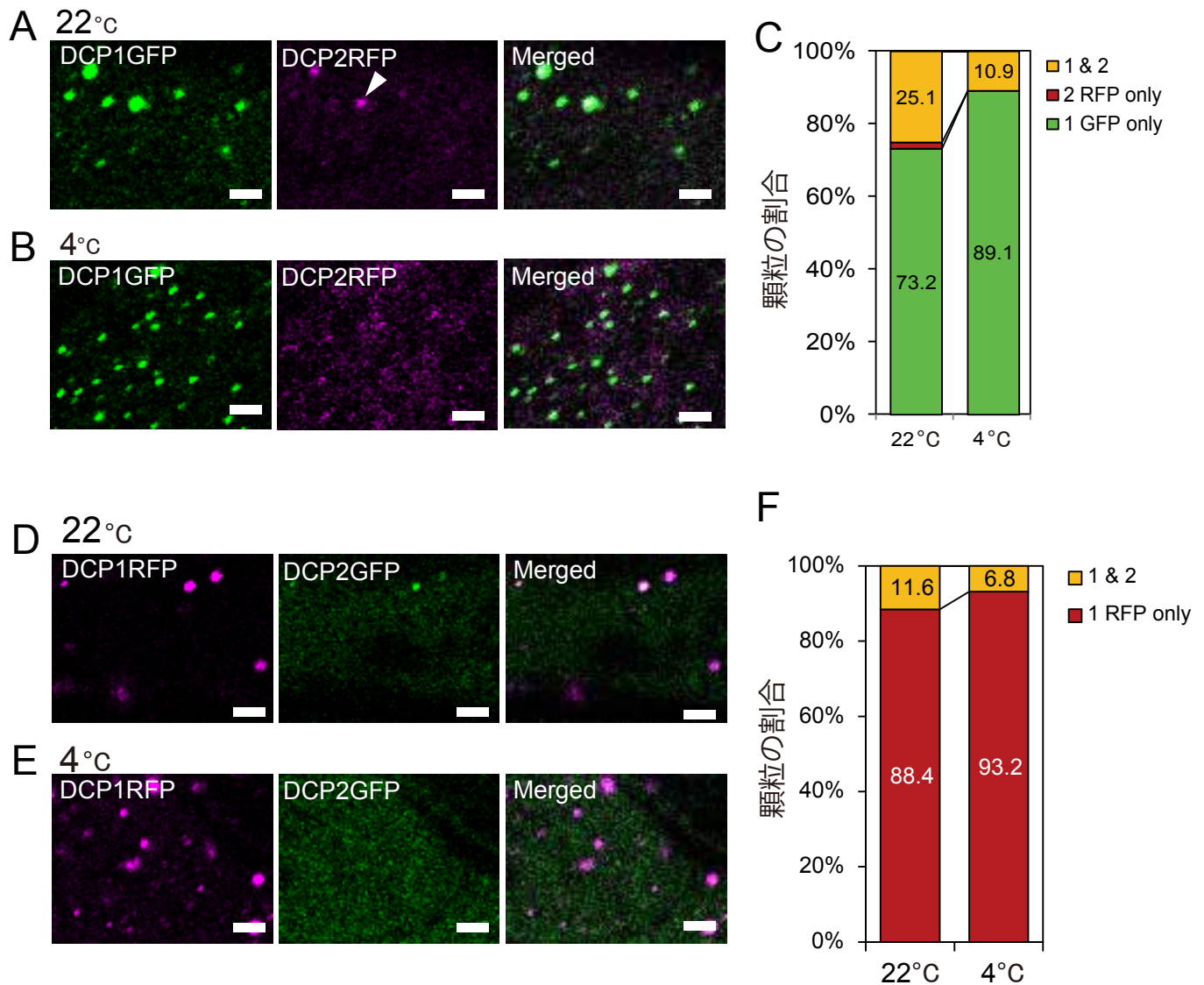


図 8. 低温処理した際の DCP1 と DCP2 共局在

(A)-(C) DCP1-GFP/DCP2-RFP の解析結果。

(A) 22°Cにおける DCP1-GFP (緑) と DCP2-RFP (赤紫) の局在。

(B) 4°Cにおける DCP1-GFP (緑) と DCP2-RFP (赤紫) の局在。

(C) DCP1-GFP と DCP2-RFP それぞれの顆粒の共局在の割合。それぞれ 22°Cでは 2074 個(18 個体)、4°Cでは 1087 個 (13 個体) の顆粒から算出した。

(D)-(F) DCP1-RFP/DCP2-GFP の解析結果。

(D) 22°Cにおける DCP1-RFP (赤紫) と DCP2-GFP (緑) の局在。

(E) 4°Cにおける DCP1-RFP (赤紫) と DCP2-GFP (緑) の局在。

(F) DCP1-RFP と DCP2-GFP それぞれの顆粒の共局在の割合。それぞれ 22°Cでは 674 個 (10 個体)、4°Cでは 1762 個 (13 個体) の顆粒から算出した。

低温処理により DCP1 顆粒が増加し、DCP2 顆粒が減少した結果、DCP1 のみが存在する顆粒の割合が増加した。

Scale bars= 2 μm。

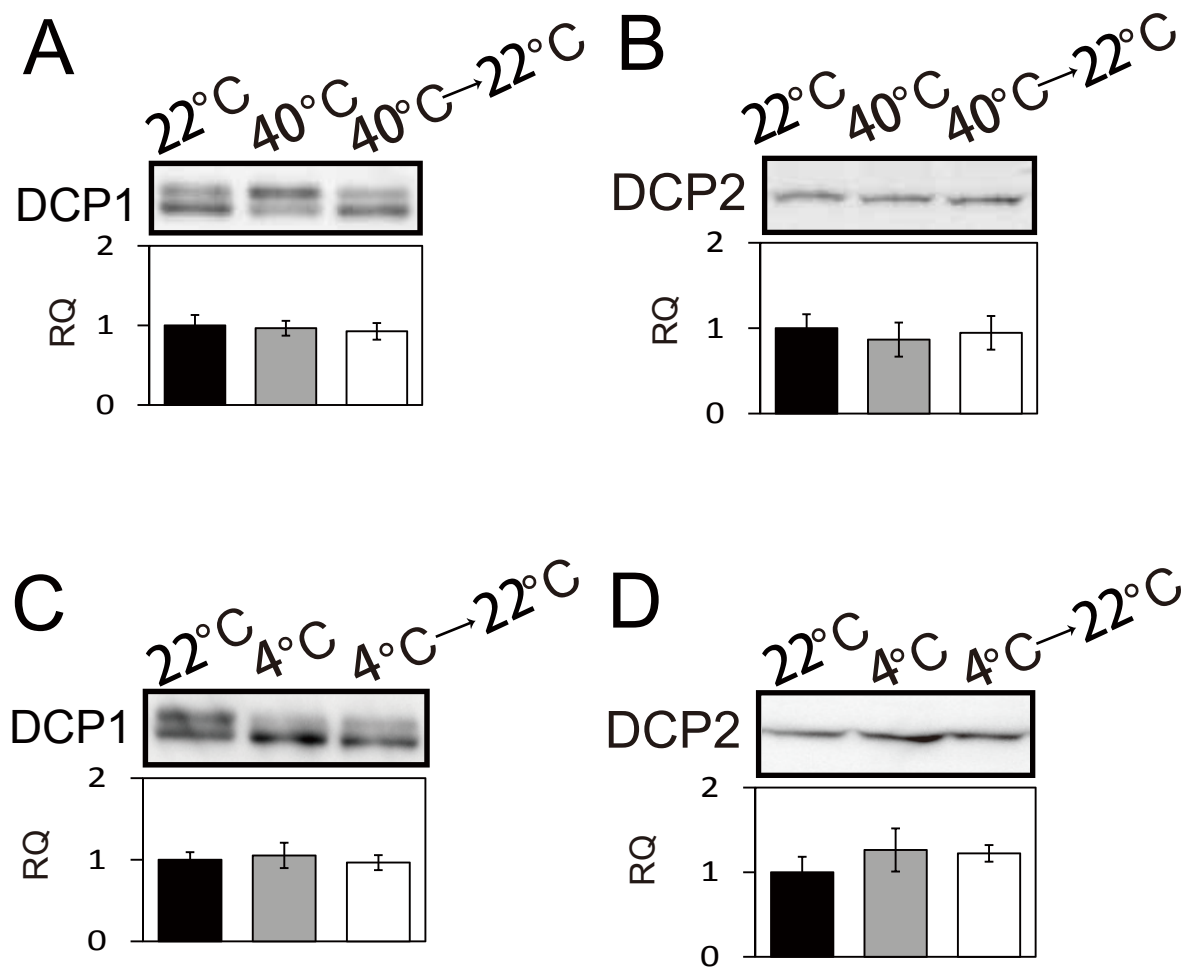


図 9. 高温または低温処理した際の DCP1 と DCP2 のウエスタンブロット解析

(A) 22°C(左レーン)、40°C(中レーン)、40°Cから 22°Cに戻した植物(右レーン)における DCP1 タンパク質の蓄積量。(B) 22°C(左レーン)、40°C(中レーン)、40°Cから 22°Cに戻した植物(右レーン)における DCP2 タンパク質の蓄積量。(C) 22°C(左レーン)、4°C(中レーン)、4°Cから 22°Cに戻した植物(右レーン)における DCP1 タンパク質の蓄積量。(D) 22°C(左レーン)、4°C(中レーン)、4°Cから 22°Cに戻した植物(右レーン)における DCP2 タンパク質の蓄積量。DCP1 量は 2 本の DCP1 バンドを合わせて定量した。RQ は相対量を表す。高温、低温処理どちらにおいても DCP1 と DCP2 タンパク質総量に大きな変化は見られなかった。

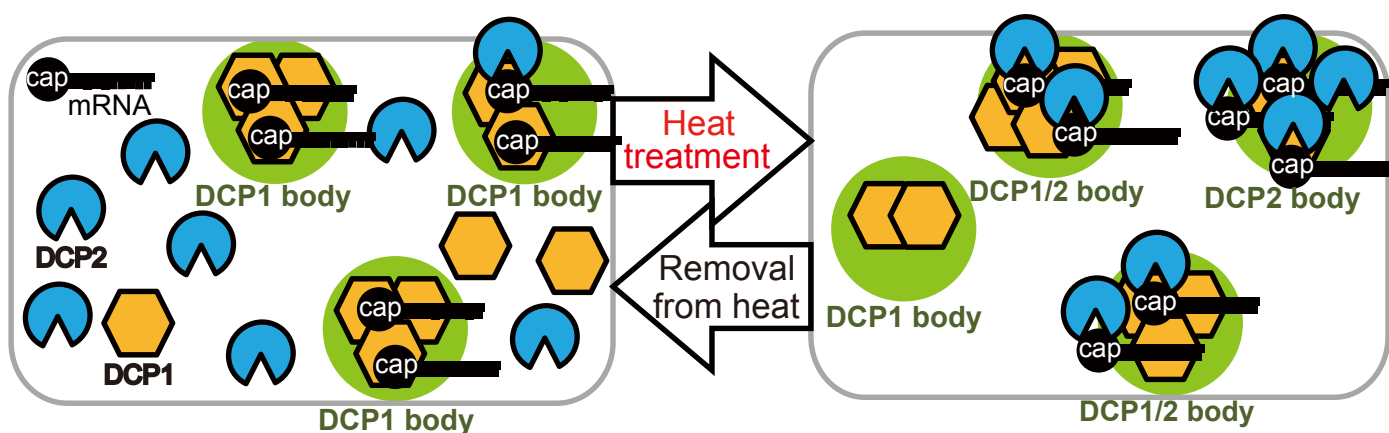


図 12. 高温時の DCP1/2 body 形成機構の模式図

平温時には DCP2 の多くは細胞質中に拡散して存在している一方、DCP1 の多くは mRNA と共に顆粒状に局在している (DCP1 body)。

植物が高温に晒されると、DCP2 が DCP1 body の元に集合し、DCP1/2 body を形成する。DCP1 も互いに相互作用して、新たな DCP1 body や、より大きな DCP1 body を形成する。

材料と方法

1. 植物材料

材料としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)のアクセッション Columbia-0 (Col-0)を野生型植物として用いた。シロイヌナズナの T-DNA 挿入ライン、*dcp1-1* (GABI_844B03)(Xu et al. 2006)、*dcp2-1* (SALK_000519)(Xu et al. 2006, Iwasaki et al. 2007)、*dcp5-1* (SALK_008881)(Xu and Chua 2009) は Ohio リソースセンターから取り寄せた。35S::DCP1-CFP、35S::DCP2-CFP、DCP1SA、DCP1SD は米 Rockefeller 大学の Nam-Hai Chua 博士より譲り受けた (Xu et al. 2006)。育てた植物について表 1 のプライマーセットを用いた PCR によりジェノタイピングを行い、T-DNA 挿入変異アレルが入ったヘテロまたはホモ接合体を選抜し、その種子を以下の実験に用いた。DCP1-GFP#7-9、DCP1-GFP#4-17、DCP1-GFP#1-5、DCP2-GFP、DCP1SA-GFP#16-1、DCP1SA-GFP#49-4、DCP1SD-GFP#6-5、DCP1SD-GFP#34-1 は下記、「3. シロイヌナズナの形質転換」、DCP1-GFP/DCP2-RFP、DCP1-RFP/DCP2-GFP、DCP1GFP/*dcp5-1*、DCP2-GFP × DCP1SA、DCP2-GFP × DCP1SD は下記、「4. シロイヌナズナの交配」に従って作出した。

2. シロイヌナズナの育成

シロイヌナズナ種子に滅菌溶液 (50% エタノール、50% 塩素系漂白剤(有効塩素濃度 6%) (商品名: ハイター))を加えて 3 分間 vortex 後、滅菌水で 3 回洗浄した。その後 0.05% の plant preservative mixture (Plant Cell Technology) を加え、休眠打破処理として暗所 4 下で 2 日間静置した。MS 寒天培地 (2.15 mg/mL MURASHIGE & SKOOG MEDIUM (Duchefa)、0.5 mg/mL MES, 1% sucrose、3 µg/mL thiamine HCl、0.5 µg/mL pyridoxine HCl、5 µg/mL nicotinic acid、pH5.7 になるよう KOH で合わせた) – 0.8% (寝かせて育てる場合) または 1.5% (立てて育

てる場合) (W/V) agar (Nacalai tesque))上に無菌的に播種し、22℃、白色連続光下で育成した。土で育成させる場合には、同様に休眠打破処理した後、JIFFY mix (サカタのタネ) とパーミキュライト (白元) を 1:2 で混合した土に播種し、22℃白色連続光下で育成した。

3. シロイヌナズナの形質転換

3.1 形質転換の概要

本研究ではシロイヌナズナの形質転換にはアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を用いた。植物体で発現させたい遺伝子配列を持つバイナリーベクターをまずアグロバクテリウム GV3101 株に導入し、そのアグロバクテリウムを植物体に感染させて形質転換を行った。バイナリーベクター上の T-DNA 領域に発現させたい遺伝子断片と蛍光タンパク質を事前に導入しておき、形質転換に用いた。

本研究では *dcp1*、*dcp2* 変異体を相補するため、ゲノム上の自身のプロモーターにより発現する DCP1 あるいは DCP2 遺伝子コンストラクトを形質転換に用いた。また、局在観察にも利用できるよう、DCP1 あるいは DCP2 遺伝子の下流には G3GFP、または tagRFP を融合タンパク質として発現するように繋いだ。

3.2 pGWB550-DCP1 と pGWB550-DCP2 の作製

ベクターとして pGWB550 を用いて植物に形質転換するプラスミドを作成した (Nakagawa et al 2007)。pGWB550 には Gateway システムを用いて DNA 断片を挿入すること、さらに C 末端側に G3GFP を融合させたタンパク質遺伝子を構築することが可能であり、転写終結領域：ターミネーターとしてはノパリン合成遺伝子 (*nos*) 遺伝子のものを用いている。さらにバイナリーベクター法により、植物に遺伝子を導入することができる。

まず、DCP1 プロモーター (P_{DCP1}) から DCP1 ORF の DNA 断片を作成した。

シロイヌナズナ Col-0 ゲノム上の DCP1 の開始コドンより 2063 塩基上流の配列から終止コドンの前までの領域を KOD -Plus- Neo (Toyobo)を用いて PCR 増幅し(プライマー : caccDCP1Left border と caccDCP1 Right border、配列は表 2)、DCP1 プロモーターから終止コドン直前までの DCP1 コード領域を持つ約 4kbp の DNA 断片 (PDCP1::DCP1) を得た。

同様に DCP2 プロモーター(P_{DCP2})から DCP2ORF の DNA 断片を作成した。Col-0 ゲノム上の DCP2 の開始コドンより 2555 塩基上流の配列から終止コドンの前までの領域を PCR 増幅し(プライマー : caccDCP2Left border と caccDCP2 Right border、配列は表 2)、DCP2 プロモーターと終止コドン直前までの DCP2 の配列を持つ約 4.5kbp の DNA 断片 (PDCP2::DCP2) を得た。PCR は 94°C : 3min、[94°C : 30sec、55°C : 30sec、68°C : 4.5min]×40cycle、68°C : 5min、4°C : ∞の条件で行った。

上記それぞれの DNA 断片を pENTRTM Directional TOPO® Cloning kits (Invitrogen)を用いて中間ベクターpENTR vector にまず挿入した。こうして得られた pENTR 上の P_{DCP1} ::DCP1 もしくは P_{DCP2} ::DCP2 の DNA 配列を Gateway® LR ClonaseTMII Enzyme Mix (Invitrogen)を用いて pGWB550 に挿入し、形質転換用ベクターpGWB550-DCP1、pGWB550-DCP2 を得た。

3.3 pGWB559-DCP1 と pGWB459-DCP2 の作製

ベクターとして pGWB559 または pGWB459 を用いて植物に形質転換するプラスミドを作成した(Nakagawa et al 2007)。pGWB559 と pGWB459 は pGWB550 と同様に Gateway システムを用いて DNA 断片を挿入すること、さらに C 末端側に tagRFP を融合させたタンパク質遺伝子を構築することが可能であり、転写終結領域 : ターミネーターとしてはノパリン合成遺伝子 (nos) 遺伝子のものを用いている。さらにバイナリーベクター法により、植物に遺伝子を導入することができる。得られた PDCP1::DCP1 もしくは PDCP2::DCP2 の DNA 配列を Gateway® LR ClonaseTMII Enzyme Mix (Invitrogen)を用いてそれぞれ pGWB559 または

pGWB459 に挿入し、形質転換用ベクターpGWB559-DCP1、pGWB459-DCP2 を得た。

3.4 アグロバクテリウムの形質転換

GV3101 株のコンピテントセルを氷上で解凍し、プラスミド DNA を 1 μ g 分加えた。その後、液体窒素で凍結させたのち、37°C で 25 分間静置し、LB 培地を 1 mL 加え 28°C で 2 時間培養した。22°C、3,000rpm の条件で 3 分間遠心し、上清を 100 μ L 程度残るまで除いたのち菌体を再懸濁し、用いたプラスミドによって抵抗性をしめす抗生物質であるスペクチノマイシンとリファンピシリン (それぞれ 50 μ g/mL)を加えた LB 寒天培地にまき、2 日間 28°C で培養した。その後生えてきたシングルコロニーを選び、以後のシロイヌナズナの形質転換に用いた。

3.6 シロイヌナズナの形質転換

3.5 で得られたシングルコロニー由来のアグロバクテリウムを、抗生物質を含む 200 mL LB 培地で、28°C で振とう培養した。その後、7,000rpm、15 分間、4°C で遠心分離し、上清を取り除いた後、infiltration medium (5% sucrose、0.05% Silwet L-77)で菌体を懸濁した。この懸濁液に、播種後約 1 ヶ月の形質転換用植物(開花、結実している花を取り除いたもの)を 1 分間浸し、暗所に一晚置いた(Clough & Bent 1998)。翌日植物を暗所から取り出し、約 1 ヶ月後に T1 種子を回収した。この T1 種子を滅菌処理した後、100 µg/mL クラフォラン、50 µg/mL ハイグロマイシン(pGWB550 と pGWB559)または 20 µg/mL カナマイシン(pGWB459)を含む MS 寒天培地に播種し、発芽したものを形質転換植物の候補として土に植え替え、更にジェノタイピングにより確認した。*dcp1-1*、*dcp2-1* をそれぞれ pGWB550-DCP1 と pGWB550-DCP2 により相補した植物 *dcp1-1*/PDCP1::DCP1-GFP、*dcp2-1*/PDCP2::DCP2-GFP をそれぞれ DCP1-GFP 植物、DCP2-GFP 植物と呼ぶことにした。

これらの植物について、ジェノタイピングによって、染色体上の DCP1 または DCP2 遺伝子への T-DNA 挿入がホモ接合体として存在し(つまり *dcp1-1* ホモ接合体または *dcp2-1* ホモ接合体) なおかつ導入した遺伝子により相補された植物を選抜した。世代を回した上で T3 植物を MS 寒天培地にまき、正常に発生する個体が 100%となるライン(導入した遺伝子がホモで挿入されたもの)を選抜し、そのラインから収穫した T4 植物を以下の実験に用いた。

pGWB559-DCP1 も同様に *dcp1-1* ヘテロ接合体に形質転換を行い、*dcp1-1* ホモ接合体の T2 植物をジェノタイピングで選抜、DCP1-RFP 植物と名付け、その後の交配実験に用いた。pGWB459-DCP2 は先述の DCP2-GFP 植物に形質転換を行い、薬剤選抜後、蛍光で形質転換を確認したものを DCP1-GFP/DCP2-RFP と名づけた。複数ラインで蛍光を確認し、DCP2-RFP 蛍光がよく観察できる T2 植物をその後の共局在観察実験に用いた。

4 シロイヌナズナの交配

3 で得られた DCP2-GFP 植物と DCP1-RFP 植物が交配に用いられた。まだ開花していない未成熟な柱頭をピンセットで露出させ、そこに他方の花粉をつけた。その後正常に育った鞘から取れた種を F1 種子として、DCP1-RFP/DCP2-GFP と名づけた。F3 まで世代を回してジェノタイピングにより *dcp1-1* と *dcp2-1* がホモ接合体であることを確認し、共局在観察実験に用いた。

5 顕微鏡観察

5.1 顕微鏡観察-用いた顕微鏡とプレパラート作成

発芽 10 日目の植物が観察に用いられた。共焦点ユニット (C2, Nikon) とパーフェクトフォーカスシステムを備えた共焦点レーザー顕微鏡 (Ti-E, Nikon) を用いて観察を行った。組織別観察を除き、全ての観察は 60 倍の対物レンズを用いて行った。植物細胞が持つ自家蛍光の影響を防ぐため、根の伸長領域で観察を行った。ピントの合わせ方による誤差を防ぐため、表皮組織の最も外側の細胞の細胞質一層のみを観察した。植物の根をスライドガラスに載せた後、滅菌水を 20 μ L たらした。そして、植物を圧迫しないようにカバーガラスを静かに載せてプレパラートを作成して観察した。誤差を少なくするために、プレパラート作成開始から観察終了まで 5 分以内に行った。

5.2 顕微鏡観察-高温・低温処理

顕微鏡観察実験のために発芽後 10 日目の植物に高温あるいは低温処理をした。予備実験の継続的な観察の結果から、それぞれの処理で顆粒が最もよく観察できた時間、及びそれぞれの処理から通常温度に戻した後、顆粒が平常値まで減少した時間を見定めた。そして高温処理では植物を MS 寒天培地ごと 40 90 分明所に静置 (コントロールは 22 90 分明所) したあと、それぞれ実験に用いた。低温処理は 4 20 時間暗所に静置 (コントロールは 22 20 時間暗所に

静置)したあと、実験に用いた。

また通常温度に戻す実験では、それぞれ処理をした後、22℃で育成した。高温では40℃2時間処理した後22℃3時間静置した。低温では4℃20時間(暗所)処理した後22℃5時間(明所)静置し、その後実験に用いた。

高温処理をしながらの経時的な観察ではスライドガラス上にテープ(商品名: Scotch 透明美色(3M))を用いてクッションを作成した。植物を置いたあと滅菌水50 µLをたらし、カバーガラスを乗せたあとマニキュアを用いて密封することで乾燥を防いだ。そして顕微鏡の台上を40℃にして密閉し、経時的な観察を行った。

シクロヘキシミド処理では発芽後10日目の植物を300 µg/mL シクロヘキシミドを含むMS液体培地(コントロールはシクロヘキシミドを含まないMS液体培地)に入れ、22℃で3時間置いたのち、顕微鏡観察した。高温処理では植物を300 µg/mL シクロヘキシミドを含むMS液体培地で22℃1時間処理したのち、40℃に移して2時間処理して顕微鏡観察した。

5.3 顕微鏡観察-画像処理及び顆粒数の数値化と統計解析

顕微鏡で撮影した写真をその後顆粒数の定量に用いた。顆粒数の定量にはImageJソフトウェア上で蛍光強度に応じて「Threshold」で閾値を設定した後、「Analyze particles」ツールにより自動的に顆粒数をカウントし、領域辺りの顆粒数を算出した。ピントが完全に合っている領域から1個体につき3枚の画像を抽出し、それぞれの領域辺りの顆粒数を算出した。各植物から得られた領域辺りの顆粒数を統計解析した。2群間比較にはWelchのt検定、多重比較にはANOVAとTukeyの方法を用いた。エラーバーは標準誤差を示す。

6 シロイヌナズナからのタンパク質抽出

高温または低温処理した植物体を回収し、低温室にて液体窒素を加えながら乳鉢と乳棒を用いて粉砕した。その後、0.1 gの植物体に対し4-5倍量のprotein

extraction buffer (図 9 と 20 では 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1% Triton-X100、5% glycerol、5 mM DTT、1 タブレット/50 mL complete proteinase inhibitor cocktail; Roche) (図 21 と 22, 24 では 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、100 mM NaCl、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、Protease Inhibitor cocktail for general use; ナカライ)を加え、チューブに移した。これを 15000rpm 5 分間 4 遠心分離し、上清を回収し新しい 1.5 mL チューブに移した。この操作を 2 回行い、得られた上清をタンパク質抽出液とし、Bradford 法によりタンパク質の濃度を測定した。それぞれのタンパク質抽出液を同じ濃度に調節し、4xLoading buffer (200 mM Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、40% glycerol、0.07% bromophenol blue、20% 2-メルカプトエタノール) に 3:1 の比率でよく混合したのち 95 5 分程度 インキュベートし、これをタンパク質サンプルとした。

7 ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE は、10.8% ポリアクリルアミドゲル (Stacking Gel; 7.6% ポリアクリルアミド: ビス(29:1)(Nacalai tesque)、147.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.1% SDS) (Separating Gel; 10.8%ポリアクリルアミド: ビス(29:1)、372.8 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% SDS)を用いた。2.7 または 2.8 で作製したタンパク質抽出液と Loading buffer の混合液を等量アプライし、泳動バッファ(25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS)中で泳動した。マーカーは AccuRuler Prestained Protein Ladder (Lambda Biotech) を用いた。

泳動後、Immobilion-P Transfer Membrane (Millipore) に転写バッファ(25 mM Tris、192 mM glycine、15% メタノール) 40V で 3 時間転写し、5% Blocking Buffer (5%スキムミルク(COOP)、1×PBS-T (80 mM Na₂HPO₄、20 mM NaH₂PO₄、100 mM NaCl、0.1% Tween 20、pH 7.5))で 1 時間振盪させた。一次抗体には Anti-GFP Mouse (Roche, 型番:11814460001), 1% Blocking buffer で 1000 倍希釈 (図 9、20、24) または Anti-DCP1 (ウサギ精製抗体, Can Get Signal (TOYOBO) で 500 倍希釈(図 21、22、31)を用いた。二次抗体には Anti-Mouse IgG, HRP-Linked

Whole Ab Sheep (1×PBST で 2 万倍希釈)または Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (Can Get Signal で 5000 倍希釈)を用いた。検出試薬として Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore)を用い、HRP による発光に基づいて、LAS-3000(Fujifilm)を用いて化学発光の検出を行った。バンドの濃さを ImageJ で数値化し、3 区画の biological replicates を用いて (n=3)、 平均値と標準誤差を計算した。エラーバーは標準誤差を示す。

8 Reverse transcription Quantitative PCR (RT-qPCR)

10 日目の植物体を約 0.1 g ずつ集め、乳鉢と乳棒で液体窒素を用いて凍結破碎した。溶けないよう液体窒素を適宜加えながら粉碎し、細かな粉状になったところで 1 mL の RNAiso plus (Takara)を加え、よく混合した。植物サンプルと RNAiso plus の混合液が溶けたらすぐに 1.5 mL チューブに移した。その後 30 秒 Vortex し、室温で 5 分間静置した。12,000×g、4 で 5 分遠心し上清を別のチューブに移し、その後 200 µL のクロロホルムを加えて Vortex し、5 分間静置した。12,000×g、4 で 15 分遠心し上清を別のチューブに移し、500 µL のイソプロパノール(Wako)を加えて転倒混和し、室温で 10 分静置した。その後 12,000×g、4 で 10 分間遠心し、上清を捨てた。そしてペレットに 75%エタノールを加え、7,500×g、4 で 5 分間遠心した。その後、上清を捨てペレットが透明になるまで風乾し、DEPC 水 (0.1% DEPC を溶かしたのち数時間放置し、オートクレーブした水)を加えてペレットを 10 分間膨潤させた後ピペッティングし、55 で 10 分間インキュベートした。それを更にピペッティングし、ペレットを完全に溶かして RNA 抽出液とした。この RNA 抽出液を ND-1000 Nano Drop (Thermo scientific)及び 1%のアガロースゲル電気泳動により RNA の濃度と純度を確認した上で以後の解析を行った。抽出した total RNA 500 ng 相当分を PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) を用いて処理し、プロトコルに従いゲノム DNA の除去と逆転写反応を行った。

qPCR は KAPA SYBR Fast qPCR kit (KAPA BIOSYSTEMS)を用いて行った。

qPCR で使用したプライマーは表 1 に示してある。全てのプライマーは qPCR 反応で希釈系列の標準曲線の相関値が 98%以上、増幅効率が 80-120%の間に収まることが確かめられた。使用する cDNA の分解度を検出するために、ハウスキーピング遺伝子である EF-1 α で 3':5'assay を行った。3':5'assay とは、ハウスキーピング遺伝子 mRNA の 3'側と 5'側にそれぞれ設計したプライマーセットを用いてその量比が近いことを確認し、作成した cDNA が qPCR に使用にたえうる品質であることを確認する作業である (Nolan et al. 2006, Bustin et al. 2009)。PCR 産物をテンプレートにして検量線を作成した (5 倍希釈、5 段階)。EF-1 α の 3'側と 5'側の検出量の比が 5 倍以内の cDNA を、qPCR に用いた。DCP1 と DCP2 の mRNA を定量するのに、2.11 で得られた cDNA から 3 倍希釈、5 段階の希釈系列を作り、検量線を作成した。プロトコルに従い試薬を調製し、StepOnePlusTM (Applied Biosystems)を用いて DCP1 と DCP2 の mRNA 量をそれぞれ定量した。全ての qPCR 実験は 3 区画の biological replicates (n=3)と、2 区画の technical replicates を用いた。リファレンスとして EF-1 α の 3'側でノーマライズし、相対定量法を用いて得られた DCP1、DCP2 の値から平均値と標準誤差を計算した。エラーバーは標準誤差を表す。

参考文献

- Arribere, J. A., Doudna, J. A. and Gilbert, W. V (2011) Reconsidering Movement of Eukaryotic mRNAs between Polysomes and P Bodies. *Mol. Cell.* 44: 745–58.
- Battisti, D. S. and Naylor, R. L. (2009) Historical Warnings of Future Food Insecurity with Unprecedented Seasonal Heat. *Science.* 323: 240–4.
- Beelman, C. A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrandeur, T. E., Lianna, H., Fortner, D. M. et al. (1996) An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature.* 382: 642–6.
- Bitá, C. E. and Gerats, T. (2013) Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front. Plant Sci.* 4: 273.
- Bregues, M., Teixeira, D. and Parker, R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science.* 310: 486–9.
- Bustin, S. a, Benes, V., Garson, J. a, Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55: 611–22.
- Chiba, Y., Mineta, K., Hirai, M. Y., Suzuki, Y., Kanaya, S., Takahashi, H. et al. (2013) Changes in mRNA Stability Associated with Cold Stress in Arabidopsis Cells. *Plant Cell Physiol.* 54: 180–94.
- Coller, J. and Parker, R. (2004) Eukaryotic mRNA decapping. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 861–90.
- Cougot, N., Babajko, S. and Séraphin, B. (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* 165: 31–40.
- Erickson, S. L. and Lykke-Andersen, J. (2011) Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *J. Cell Sci.* 124: 293–7.

- Ferraiuolo, M. A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E. L., Schoenberg, D. R. and Sonenberg, N. (2005) A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J. Cell Biol.* 170: 913–24.
- Franks, T. M. and Lykke-Andersen, J. (2007) TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev.* 21: 719–35.
- Franks, T. M. and Lykke-Andersen, J. (2008) The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol. Cell.* 32: 605–15.
- Goeres, D. C., Van Norman, J. M., Zhang, W., Fauver, N. A., Spencer, M. L. and Sieburth, L. E. (2007) Components of the Arabidopsis mRNA decapping complex are required for early seedling development. *Plant Cell.* 19: 1549–64.
- Grover, A., Mittal, D., Negi, M. and Lavania, D. (2013) Generating high temperature tolerant transgenic plants: Achievements and challenges. *Plant Sci.* 205-206: 38–47.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H. and Watanabe, Y. (2007) Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett.* 581: 2455–9.
- Jud, M. C., Czerwinski, M. J., Wood, M. P., Young, R. a, Gallo, C. M., Bickel, J. S. et al. (2008) Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Dev. Biol.* 318: 38–51.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J. et al. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169: 871–84.
- Motomura, K., Le TN., Q., Kumakura, N., Fukaya, T., Takeda, A. and Watanabe, Y. (2012) The role of decapping proteins in the miRNA accumulation in Arabidopsis thaliana. *RNA Biol.* 644–52.

- Narsai, R., Howell, K. A., Millar, A. H., O'Toole, N., Small, I. and Whelan, J. (2007) Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 19: 3418–36.
- Nolan, T., Hands, R. E. and Bustin, S. a (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* .
- Parker, R. and Sheth, U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell*. 25: 635–46.
- Pomeranz, M. C., Hah, C., Lin, P.-C., Kang, S. G., Finer, J. J., Blackshear, P. J. et al. (2010) The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA. *Plant Physiol*. 152: 151–65.
- Sheth, U. and Parker, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 300: 805–8.
- Swetloff, A., Conne, B. and Huarte, J. (2009) Dcp1-bodies in mouse oocytes. *Mol. Biol. Cell*. 20: 4951–61.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-sanchez, M. A., Brengues, M. and Parker, R. (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*. 371–82.
- Thomashow, M. F. (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571–99.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244–52.
- Weber, C., Nover, L. and Fauth, M. (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J*. 56: 517–30.

- Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W. and Chua, N.-H. (2006) Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE Form a Decapping Complex Required for Postembryonic Development. *Plant Cell*. 18: 3386–98.
- Xu, J. and Chua, N.-H. (2009) Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *Plant Cell*. 21: 3270–9.
- Xu, J. and Chua, N.-H. (2011) Processing bodies and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 88–93.
- Xu, J. and Chua, N.-H. (2012) Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *EMBO J.* 31: 1975–84.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 781–803.
- Yeh, C.-H., Kaplinsky, N. J., Hu, C. and Charng, Y.-Y. (2012) Some like it hot, some like it warm: phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Sci.* 195: 10–23.
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K. et al. (2011) Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol. Genet. Genomics*. 286: 321–32.