論文の内容の要旨

論文題目

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)

氏名　　元村一基

序論

移動という手段を持たない植物は、多くの遺伝子発現を変動させて細胞内状態を変えることで、環境変化に対応（環境応答）していると考えられている。しかしこれまでの環境応答に関する研究は転写因子などによる転写レベルでの制御に関するものが多く、mRNA の分解などを含む包括的な遺伝子発現抑制に関しては研究が進んでいない。

DCP1 と DCP2 は複合体を作り、mRNA の 5’末端の cap 構造を除去することで mRNA 分解を促す、真核生物に保存されたタンパク質である。DCP2 が脱 cap 反応の活性をもち、DCP1 は脱 cap 反応の活性化因子だと考えられている。酵母では DCP1、DCP2 は細胞質で顆粒状に共局在しており、その顆粒は Processing body (P-body)と呼ばれている。mRNA の分解中間体が P-body に蓄積することから、酵母の P-body は mRNA の分解の場であると考えられている。植物が低酸素などに晒されると DCP1 顆粒数が増加することから P-body が環境応答に関与することが示唆されてきたが、植物ではまだ DCP1 と DCP2 の挙動に関して詳細な解析はなされていない。

本研究ではモデル植物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」を明らかにすることを目的とした。本実験では主に環境変化として「高温」に焦点を当てた。本実験では 40℃という温度を用いた。40℃という温度は 1-2 時間程度では植物の生育に大きな影響は無いが、長時間（10 時間以上）さらされると生育阻害を引き起こし、場合によっては死に至る温度である。

結果

第 I 章　　温度応答時の DCP1 と DCP2 の挙動解析

第 I 章では RNA 分解の場と考えられている P-body に着目した。DCP1 と DCP2 を可視化した植物を作出し、通常時、温度応答時の挙動を顕微鏡観察により明らかにした。

はじめに適切な生育条件（22℃）に置いた植物で顕微鏡観察を行った。すると DCP1 は顆粒状に局在していた一方、DCP2 は細胞質全体に拡散していた。この植物に 90 分高温処理をすると、DCP2 が顆粒状に局在した。DCP1 と DCP2 を同時に可視化した植物の蛍光観察から、DCP2 が高温処理により数十分の間に DCP1 顆粒の元に集合していく様子が経時的に観察できた。一方植物を低温（4℃）に晒しても、DCP2 は細胞質に拡散したままだった。

DCP1 と DCP2 が高温耐性に影響を与えるか調べるため、DCP2 過剰発現植物体を長時間の高温に晒した。その結果野生型植物体に比べて生存率が増加した。

以上の結果から 1) 細胞質中に拡散している DCP2 が高温処理で DCP1 顆粒の元に集合していくこと、2) DCP1 と DCP2 が高温耐性に寄与することが明らかとなった。そして本研究で見つかった高温時に形成される DCP1 と DCP2 が共局在する顆粒を DCP1/2 body と名付けた。

第 II 章　高温応答時に変動する RNA の網羅的解析

第 II 章では高温時に起こる RNA の制御を網羅的に調べるため、トランスクリプトーム解析を行った。本実験では ①22℃、②22℃から 40℃にして 90 分後、③40℃から 22℃に戻して 3 時間後、の三点で植物を回収、サンプルを抽出した。

①と②（高温処理）を比較した結果、全ゲノム約 27000 遺伝子中、増加した RNA と減少した RNA はそれぞれ約 7000 種となり、ほぼ同数であった。Gene ontology (GO)解析の結果、高温処理で増加した RNA には高温応答性のものが多く含まれており、既知の高温応答経路が働いていることが示唆された。一方減少した RNA には細胞外領域などに関するものが多く含まれており、特定の機能を持つ RNA を選択的に分解するメカニズムがあることが示唆された。

次に②と③（高温解除）を比較した結果、高温処理のときと同様に、約 7000 種ずつの RNA が同様に増加、減少していた。そこで高温処理で増加した RNA と高温解除で減少した RNA を比較したところ、約 60%の RNA が一致していた。また、高温処理で減少した RNA と高温解除で増加した RNA も約 60%が一致していた。

以上の結果から 1) 高温処理・高温解除時に転写と同程度の RNA 分解が起きること、2) 植物が温度を感知して選択的な RNA 分解を行い、細胞内環境を柔軟に変化させていることが示唆された。

第 III 章　DCP1 リン酸化を介した DCP2 顆粒形成と RNA 制御の比較解析

第 III 章では第一章で明らかになった DCP2 の集合と、第二章で明らかになった RNA 分解との関係性を明らかにすることを目指した。そこではじめに高温処理時に DCP1 のリン酸化が起きる

ことに着目した。DCP2 顆粒数増加と DCP1 のリン酸化がほぼ同時に起きることから、DCP1 のリン酸化が DCP2 の集合に関与するのではないかと考えた。そこで DCP1 のリン酸化ができない形質転換植物（DCP1SA）で DCP2 の局在解析を行ったところ、コントロール植物に比べて、DCP1SA では高温処理時の DCP2 顆粒数が少なかった。この結果から、高温処理時に起きる DCP1 のリン酸化が DCP2 の集合に関与することが示唆された。

次に DCP1 リン酸化が高温処理時の RNA 分布に影響を与えるかどうかを調べるため、DCP1SA 植物に高温処理をしてトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、DCP1SA 植物はコントロール植物に比べて高温時に幾つかの RNA の蓄積量が変化していた。第二章で同定された高温処理で発現変動する RNA との比較から、DCP1 リン酸化は高温時に発現変動する RNA のうち、一部の減少に重要であることが示唆された。また、DCP1 と DCP2 が RNA 分解にはたらく酵素であるにも関わらず、DCP1 リン酸化が“高温時に減少する RNA”だけでなく高温時に増加する RNA”の蓄積量にも影響を与えることが示唆された。

また、DCP1SA を長時間の高温に晒した実験で、高温耐性が弱まっていることが分かった。

以上の結果から 1) DCP1 リン酸化が高温処理時の DCP2 顆粒形成を促進すること、2) DCP1 リン酸化が高温処理時に起きる遺伝子発現制御の少なくとも一部に関与すること、3) DCP1 リン酸化が植物の高温耐性獲得に寄与することが示唆された。

考察

以上の実験結果から、植物が高温応答時に mRNA 分解を介して大きく細胞内 RNA 分布を変化させること、そして DCP2 が素早く局在を変化させることで、その機能の一端を担っていることが示唆された。また、リン酸化がこの迅速な局在変化を可能にしていることも示唆された。本研究により「mRNA 分解を介した植物の環境応答機構」に関して、高温応答における mRNA 分解機構とその意義の一端を明らかにすることができた。

本研究で得られた実験結果から、植物の高温応答における DCP1 と DCP2 の働きを考察し、仮説を立てた。植物が高温状態を感知すると DCP1 のリン酸化が起き、DCP1 顆粒への DCP2 の集合が促進される（DCP1/2 body の形成）。その後 DCP1/2 body に不要な mRNA が集められることで積極的な分解が可能となる。一方高温応答性の新規転写 mRNA は DCP1/2 body に集められず、分解されない、というものである。この仮説が正しければ、DCP1SA 植物では高温時に一部の DCP2 が細胞質全体に存在することで、新規に転写された RNA の安定性を低下させてしまうと考えられる。その結果コントロールに比べて DCP1SA では高温応答性 RNA の発現が少なかったのではないかと考えられる。

このように mRNA 分解を介した高温応答メカニズムが示唆された一方で、一部の RNA だけが影響を受けた理由など不明な点はまだ残っている。更なる解析をすることで植物の環境応答機構の理解が深まり、様々な応用に結びつくことが期待できる。

展望

高温処理時に発現変動した遺伝子のうち DCP1SA 変異による影響を受けたものは 10%程度に留まったが、他にも DCP1 や DCP2 の局在が影響を与える RNA が存在する可能性は高い。DCP1SA 植物でも高温処理後 30 分まではコントロールと同程度に DCP2 顆粒数が観察されており、DCP1 リン酸化以外は複数ある DCP2 の集合を促進する要因の一つであると考えられる。高温処理をしても DCP2 の局在が全く変化しない植物を作出できれば、DCP2 の局在と RNA 発現変動の関係性が明らかになるだろう。

ただし高温処理で減少する RNA 約 7000 種全てに DCP2 が関わるとは考えにくく、真核生物に存在する複数の RNA 分解機構が協調的に働くのではないかと考えられる。環境応答に対する RNA 分解経路一つひとつの貢献度を評価するのは困難であるが、本研究をきっかけに「植物体における mRNA 分解を介した環境応答機構」の包括的な理解に繋がることを期待している。

また本研究は高温に焦点を当てたが、他の環境応答機構では DCP1 と DCP2 が異なった働きを持つ可能性がある。例えば低温状態では DCP1 は脱リン酸化され、DCP1 body を作った。このように環境変化に応じて制御方法を変えることで、様々な環境で植物が生存してきた可能性がある。今後は生物学的ストレスなど他の環境応答にも着目して研究を行うことで、mRNA 分解を介した環境応答機構の理解が深まると考えている。