

## 論文の内容の要旨

### Studies on the relationship of mitochondrial RNA processing to cell division control underlying early development of lateral roots in Arabidopsis

(シロイヌナズナの側根形成初期における細胞分裂制御とミトコンドリア RNA プロセッシングの関係性についての研究)

氏名 間宮 章仁

#### 【背景・目的】

シロイヌナズナの側根形成は、器官形成のモデルとして研究され、主根内部の内鞘細胞の垂層分裂に始まる初期過程の様相など、いくつかの側面の解明は非常に進んでいる。しかし、活性化された細胞分裂のその後の精緻な調節により、側根が一定の形・構造に発達していく機構に関しては、多くの不明な点が残されている。

TDF 変異体は、当研究室で単離されたシロイヌナズナの温度感受性変異体のうち、側根形成誘導系において、許容温度 (22°C) では正常な側根を形成し、制限温度 (28°C) では内鞘細胞の過剰な分裂により帯状で幅の広い側根 (帯化側根) を形成する (図 1) 特徴をもつもので、*rrd1*、*rrd2*、*rid4* の 3 つがある。先行研究により、各変異体の責任遺伝子 (TDF 遺伝子) はいずれも、ミトコンドリア (mt) の mRNA プロセッシングに関わることが示唆されていた。本研究では、TDF 遺伝子機能の詳細と側根帯化のしくみを調査し、植物における mt-mRNA、細胞分裂の制御の新たな側面、及びこれらの相互関係を明らかにすることを目指した。

#### 【結果・考察】

##### ① TDF 遺伝子による RNA プロセッシングの解析

*RRD2* と *RID4* は PLS 型ペンタトリコペプチドリピート (PPR) タンパク質をコードし、mt-mRNA の特定箇所での C から U への編集に関わることが示唆されていた。既報の mt-mRNA 編集サイト (32 遺伝子、計 496 箇所) の編集状態を解析したところ、*rrd2*、*rid4* において編集が全く起きないサイトがそれぞれ複数見出された (図 2)。一方、*RRD1* は mt 局在のポリ A 特異的リボヌクレアーゼ (PARN) 様タンパク質をコードし、mt-mRNA のポリ A テール分解への関与が推測された。mt-mRNA の 3'末端の解析の結果、野生型ではほとんど存在しないポリ A テールが *rrd1* では約半数の mRNA でみられた。さらに、mt 局在ポリ A ポリメラーゼ *AGS1* (図 2) の変異を *rrd1* に導入すると、表現型が回復することもわかった。

##### ② TDF 変異体における mt タンパク質の解析

TDF 変異体のカルス由来の mt を用いて、電子伝達系複合体構成の解析を行った結果、*rid4* において、温度に依らず、ATP 合成酵素複合体 (複合体 V) の存在量の顕著な低下がみられ (図 4a)、*atp4* mRNA の編集不全との関連が考えられた。さらに、*RRD2* が標的とする編集サイトがシトクロム c (*cyt c*) の成

熟に携わる *ccb2* と *ccb3* の mRNA にあったため (図 2、3)、*cyt c* タンパク質量を調査したところ、*rrd2* では制限温度下において減少がみられた (図 4b)。興味深いことに、*rrd1* も *cyt c* の減少を示した。なお、*rrd2* において *ccb3* のタンパク質量は変化していなかった。

### ③ RNA 編集とポリ A 状態の相互関係の解析

②の *cyt c* の解析結果を受け、*ccb* 遺伝子の mRNA における編集とポリ A 付加の相互作用を調べた。*rrd1* で *ccb* mRNA の編集レベルを解析したところ、*ccb3* の多数のサイトで不完全な編集レベルの低下が検出された。*rrd2* においても、特異的な標的サイトの完全な編集不全に加え、同様の *ccb3* 全体に亘る編集低下が認められた。この中には活性に重要なアミノ酸のコドンの構成に関わるものがあり、*ccb3* の編集低下はタンパク質の活性低下をもたらすものと考えられた。一方、*rrd2* 変異体に *ags1* 変異を導入したところ、*rrd1* の場合と同じく表現型の回復がみられた。このとき *ccb3* mRNA では、RRD2 の標的サイトは編集されないままで、他のサイトの編集レベルは高まっていた。これらの結果より、*rrd1*、*rrd2* の表現型の少なくとも一部は、*ccb3* の全般的な編集レベルの低下による不活性型 *ccb3* タンパク質の合成に起因することが示唆された。また、ポリ A テールの付加が何らかのしくみにより、*ccb3* mRNA の編集を抑制することがわかった。

### ④ 側根帯化における ROS の関与についての解析

①～③の結果から、活性酸素種 (ROS) の発生が帯化の要因となっている可能性に目を向け実験を行ったところ、野生型への ROS 誘導剤処理により TDF 変異体同様の側根帯化が起こること、ROS 除去剤を TDF 変異体に与えると側根の帯化が抑えられることが判明し (図 5)、この仮説が支持された。

### ⑤ 帯化側根形成時の細胞分裂の解析

側根形成細胞で高発現を示す膜タンパク質の蛍光レポーター株に ROS 誘導剤を投与し、帯化形成過程のライブイメージングを行った。その結果、ROS の発生が原基の辺縁部・中央部での細胞分化や、協調的な細胞分裂方向の切り替えを攪乱している可能性が示唆された。

