HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Physiological roles of Arabidopsis deadenylase, AtCCR4 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	鈴木, 悠也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11842号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59071
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuya_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（**生命科学**）　氏　名　　鈴木　悠也

学 位 論 文 題 名

Physiological roles of Arabidopsis deadenylase, AtCCR4
（植物の脱アデニル化酵素 AtCCR4 の機能と役割）

1）細胞内の様々な生命現象の基本原理は，遺伝子発現の適切な制御にある。これまで，遺伝子発現の調節に関しては転写制御を中心とした研究が進められてきたが，実際の発現量の決定には，転写後の様々な制御が関わっている。中でも，ポリ A 鎖を失った mRNA はその後速やかに分解され，またポリ A 鎖は翻訳のための mRNA ループ構造を安定化させることから，細胞質におけるポリ A 鎖除去，すなわち脱アデニル化反応の制御は，mRNA の安定性と翻訳効率の両方に影響を与え得る重要な制御段階のひとつであると言える。酵母では Ccr4 が主要な脱アデニル化酵素として機能している（Tucker *et al.*, 2002, *EMBO J.*, 21: 1427-1436）。モデル植物であるシロイヌナズナには，酵母 CCR4 のオルソログとして AtCCR4a および AtCCR4b が存在するが，その機能および生理学的な役割は未だ解明されていない。そこで申請者は，AtCCR4a および AtCCR4b の生理生化学的解析および逆遺伝学的な解析を通して，これら**脱アデニル化酵素の標的となる mRNA を同定し，脱アデニル化反応の生理学的な役割を明らかにする**ことを目的とした研究を行った。

【AtCCR4a および AtCCR4b は P-body に局在する】

mRNA 分解に関わる多くの酵素は細胞質内で Processing body（P-body）と呼ばれる顆粒状の凝集体を形成することから，P-bodies は mRNA の分解の場であると考えられている。申請者はシロイヌナズナの培養細胞を用いた一過的発現系を用いて，AtCCR4 の細胞内局在性を調べた。mRNA 分解において 5’ 側のキャップ構造の除去に関わる酵素である AtDCP1 と AtDCP2 は既に P-bodies へ局在することが示されている（Iwasaki et al., 2007, FEBS Lett., 29: 2455-2459）。そこで申請者は AtDCP1･mCherry および AtDCP2･CFP 融合タンパク質をコントロールとして用い，AtCCR4a および AtCCR4b が P-bodies へ局在することを明らかにした。

【*atccr4a/4b* 二重変異株はショ糖やスターチの生合成において異常が見られる】

植物生体内における AtCCR4 の機能と役割を解明するためには，機能欠損変異株を用いた逆遺伝学的解析が有効である。しかしながら AtCCR4a と AtCCR4b は酵素活性ドメインにおいてアミノ酸配列が 81%相同であることから，機能が互いに重複していると考えられた。そこで二重変異株を作出したところ，**二重変異株では高濃度のショ糖条件下で見られる発芽後成長阻害に耐性を示す**ことが明らかとなった。また，植物体における糖の含有量を定量したところ，グルコース量は野生型株と二重変異株で差が見られないのに対し，ショ糖量は二重変異株で顕著に減少していた。さらに，ヨウ素デンプン反応によってデンプンを染色したところ，**二重変異株ではデンプンが過剰に蓄積している**ことが明らかとなった。これらのことから，AtCCR4a および AtCCR4b は糖代謝およびデンプン生合成に関与する因子の発現を制御していることが示唆された。

【AtCCR4a および AtCCR4b は *GBSS1* のポリ A 鎖の制御する】

ヨウ素デンプン反応は主にスターチの中でも Amylose を染めることがわかっており，Amylose 生合成には GBSS1 という酵素が主要な役割を担っている。そこで申請者は野生型株および二二重変異株における *GBSS1* の発現量を比較したところ，*GBSS1* の発現は二重変異株で上昇していることが明らかとなった。さらに *GBSS1* のポリ A 鎖の長さを LM-PAT 法（Reverdatto *et al.*, 2004, *RNA*, 10: 1200-1214）により比較したところ，二重変異株では野生型株と比べて長いポリ A 鎖を持つことがわかった。このことから，**AtCCR4a と**

AtCCR4b は *GBSS1* mRNA のポリ A 鎖の長さの決定に関与していることが明らかとなった。

【AtCCR4a および AtCCR4b は概日時計を構成する遺伝子の転写後制御に関わっている】

AtCCR4a および AtCCR4b の役割を分子レベルで捉えるために，マイクロアレイを用いて野生型株と *atccr4a/4b* 変異株における mRNA 蓄積量の違いを調べたところ，興味深いことに *atccr4a/4b* 変異株で mRNA の蓄積量が変化している遺伝子群に，日周リズムを刻む遺伝子が有意に濃縮されていた。そこで申請者は植物の概日時計の中心振動子である *CCA1*, *LHY* および *TOC1* 遺伝子の発現パターンを解析したところ，いずれの遺伝子においても *atccr4a/4b* 変異株において位相が遅れることが明らかとなった。さらに申請者は LM-PAT 法により，***CCA1* および *TOC1* mRNA のポリ A 鎖が *atccr4a/4b* 変異株において長くなっている**ことを明らかにした。

2) 植物は核だけではなく葉緑体やミトコンドリアにもゲノムを持ち，それぞれが異なる mRNA 分解機構を持つことが知られている。原核生物では未だ脱アデニル化反応の存在が知られていないことから，原核生物由来のオルガネラである葉緑体やミトコンドリアの mRNA 分解でも，脱アデニル化反応は起こらないと考えらえてきた。しかしながら近年，植物の脱アデニル化酵素である AtPARN が，ミトコンドリア mRNA のポリ A 鎖分解を介して遺伝子発現を制御していることがわかり，オルガネラにおける脱アデニル化反応の重要性が明らかとなった（Hirayama *et al.*, 2013, *Nature Comm.*, 4: 2247）。そこで申請者は葉緑体に局在する脱アデニル化酵素の同定を行い，さらに変異株を用いた解析により葉緑体に局在する脱アデニル化酵素の機能を明らかにする研究を行った。

【AtCCR4c は葉緑体に局在する】

データベースを用いた解析により，AtCCR4c が葉緑体からの Retrograde Signaling により発現抑制を受けることが明らかとなった。このことから AtCCR4c が葉緑体に局在している可能性が高いと考え，AtCCR4c･GFP 融合タンパク質を用いた局在観察を行った。その結果，**AtCCR4c は葉緑体に局在し，かつ N 末端側の約 90 アミノ酸が葉緑体への移送に必要である**ことが明らかとなった。さらに申請者は，日周変動に応答した発現パターンを測定したところ，AtCCR4c **が** AtCCR4 **ファミリーの中で唯一日周リズムを刻む**ことを明らかにした。また，連続光条件下に移した植物体においても同様の発現パターンが見られたことから，AtCCR4c は概日リズムを刻み，かつその発現が概日時計によって制御されていることが明らかとなった。

【*atccr4c* 変異株はショ糖量が減少する表現型を示す】

atccr4c 変異株における表現型を観察したところ，*atccr4c* 変異株では野生型株と比べてショ糖量が顕著に減少することが明らかとなった。さらにマイクロアレイを用いた解析により，スターチ生合成に関与する *QQS* の発現が変異株で顕著に減少することが明らかとなった。