HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A regulatory mechanism of a heat-activated retrotransposon in Arabidopsis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	松永, 航
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12272号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61792
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Wataru_Matsunaga_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　　松　永　　航

学 位 論 文 題 名

A regulatory mechanism of a heat-activated retrotransposon in *Arabidopsis*
(シロイヌナズナ熱活性型レトロトランスポゾンの制御機構)

トランスポゾンは植物を含め、多くの真核生物ゲノムの大部分を構成する要素となっている(Feschotte *et al.* 2002)。トランスポゾンの転移は宿主にとって有害である場合が多く、植物では RNA dependent DNA methylation (RdDM)がその抑制に重要な役割を果たしている。植物特異的な RNA polymerase IV (PolIV)によって合成された short interfering RNA (siRNA)がトランスポゾンを新規にメチル化することでその活性を抑制している(Kanno *et al.* 2005, Onodera *et al.* 2005, Pontier *et al.* 2005)。

シロイヌナズナで報告された Long terminal repeat(LTR)型レトロトランスポゾン *ONSEN*は、熱ストレスによって活性化する(Ito *et al.* 2011)。*ONSEN* のプロモーターを含む LTR 領域には熱活性化転写因子が結合する Heat response element(HRE)が保存されており、*ONSEN* は熱活性化転写因子である Heat shock transcription factor A2 (HsfA2)によって制御されていることが示唆された(Cavrak *et al.* 2014)。*ONSEN* は発芽後 7 日目の芽生えに対し 37℃、24 時間の熱ストレスによって転写が活性化し、染色体外 DNA を合成する。野生型のシロイヌナズナと比較して、PolIV の機能喪失変異体である *nrpd1* においては、熱ストレスによって転写量が顕著に増加し、さらに熱ストレスをかけた植物の次世代において高頻度な転移が観察された(Ito *et al.* 2011)。この結果から、siRNA が *ONSEN* の転写、転移の抑制に寄与していることが示唆されたが、その具体的なメカニズムは不明であった。そのため、本研究ではシロイヌナズナにおける *ONSEN* の転写及び転移の制御機構を明らかにすることを目的とした。

ONSEN の転写活性における熱感受性を調べたところ、活性化の閾値は 37℃付近に存在することが示唆された。また *nrpd1* 変異体において、次世代で新たに転移した *ONSEN* のコピーも活性化能をもっていることが示唆された。また、*ONSEN* は酸化ストレスによって活性化し、HsfA2 の変異体では発現がみられなかったことから、酸化ストレスにおいても HsfA2 を介した転写活性を行うことが示唆された。さらに *ONSEN* の転写動態について調べるため、プロモーターとして機能している LTR を、GFP をレポーター遺伝子として組み合わせた形質転換体を作

製したところ、熱ストレス後のトランスジーンの発現は一過的なものであることが示唆された。*ONSEN*の発現は一過的にも関わらず、*nrpd1*変異体では*ONSEN*の転移は熱ストレス処理をした当代では観察されず、次世代において観察される。この点から、*ONSEN*の発現は生殖細胞を形成する茎頂分裂組織において、組織特異的に維持されていると推測した。未分化細胞塊であるカルスにおいては、熱ストレスから30日後でも*ONSEN*の活性が維持されていることが示唆された。この結果が茎頂分裂組織においても反映されるか調べるため、茎頂組織を特異的に切り出し、*ONSEN*の発現を調べたが、茎頂組織では熱ストレスから5日後には活性がほとんど残っていなかった。以上の結果から、茎頂分裂組織でも *ONSEN* の発現は一過的であることが示唆された。

先行研究より *ONSEN*の転移は生殖成長組織において起きることが示唆された。そこで、*ONSEN*の転移制御機構について考察するため、*nrpd1*変異体において *ONSEN*の転移を観察した。その結果、*ONSEN*の転移は雌雄どちらの生殖細胞からも次世代に伝わっていることが示唆された。また熱ストレスは発芽後 1 日に与えても、次世代で転移が観察されことから、熱ストレス時の発生段階は転移に影響を与えないことが示唆された。さらに熱ストレスから花成までの時間は転移に影響を与えないことが示唆された。また側枝ごとの転移パターンの違いを検証したところ、各側枝から得られた次世代で独立した転移パターンが観察された。この結果から、転移は個々の分裂組織で独立に起きていることが示唆された。また熱ストレス処理後に誘導した、ロゼット葉からの側枝から得られた次世代においても転移が観察され、分裂組織自体が熱ストレスを経験せずとも転移が起きることが示唆された。

以上の点から、*ONSEN*の転写は一過的であり、植物体全体で観察されることが示唆された。いくつかのトランスポゾンや繰り返し配列は熱ストレス後に一過的に発現するが、DNA メチル化とは独立に、ヌクレオソーム構造の凝縮によって再抑制されることが報告されており(Pecinka *et al.* 2010)、*ONSEN*の再抑制も同様な機構によって制御されていることが示唆された。また、シロイヌナズナでは花成後にグローバルなクロマチン構造の脱凝縮が起こることが知られており(Tessadori *et al.* 2007)、*ONSEN*においても花成を引き金にしたクロマチン構造の脱凝縮により、*ONSEN*が再活性化し、*nrpd1*変異体では転移が起こるのではないかと推測された。しかし、野生型ではPolIVによってクロマチン構造が抑制状態へと復帰され、転移が観察されないのではないかと考えられる。