



Title	Molecular biological studies on Arabidopsis DEAD-box RNA helicase 7 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	刘, 跃林
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12250号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61982
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Liu_Yuelin_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

共生基盤学専攻 博 士（農学）

氏名 Yuelin LIU

審査担当者	主 査	客員教授	今 井 亮 三
	副 査	教 授	森 春 英
	副 査	准教授	尾之内 均
	副 査	助 教	佐分利 亘

学 位 論 文 題 名

Molecular biological studies on *Arabidopsis* DEAD-box RNA helicase 7
(シロイヌナズナ DEAD-box RNA helicase 7 の機能に関する分子生物学的研究)

本論文は序章・終章を含む 5 章からなり、図 23、表 7 を含む総頁数 97 の英文論文である。
別に 1 編の参考論文が添えられている。

RNA helicase は ATP の加水分解により RNA 上の 2 本鎖構造を 1 本鎖構造に巻き戻す活性をもつタンパク質である。DEAD-box RNA helicase はその中で最大のファミリーを形成し、細菌から高等動植物までほぼ全ての生物に見出される。DEAD-box RNA helicase は転写、スプライシング、プロセッシング、輸送、翻訳、分解等、細胞内の RNA 代謝のほぼ全ての過程に関与している。シロイヌナズナにおいて、これまでに多くの DEAD-box RNA helicase が機能解析されているが、機能未知なものも多い。本研究では、機能未知な AtRH7 を低温ショックドメインタンパク質 AtCSP2 の相互作用タンパク質として同定し、その形態形成やストレス耐性における機能を明らかにした。

第 2 章では、まず耐凍性を負に調節する RNA シャペロンである AtCSP2 の機能解析を行った。*atcsp2/atcsp4* 二重変異体が野生株と比べて有意に高い塩耐性を示すこと、及び *AtCSP2* 過剰発現株では野生株より耐塩性が顕著に低下することを示した。この結果から、*AtCSP2* が既知の耐凍性に加えて塩ストレス耐性においても負の調節因子であることが示唆された。次に、*AtCSP2* 機能発現の分子機構を解析するため、酵母ツーハイブリッド法を用いて *AtCSP2* と相互作用するタンパク質を相スクリーニングした。29 種の相互作用タンパク質候補が得られたが、このうち最も高頻度に検出され、DEAD-box RNA helicase をコードする *AtRH7* を以降の解析の対象にした。*AtCSP2* と *AtRH7* の細胞内における相互作用は二分子蛍

光相補 (BiFC) 法により解析し、核内において相互作用することが明らかとなった。

第3章では、AtRH7 の生化学的遺伝学的解析を行った。組換えタンパク質の酵素活性、大腸菌変異体の相補性等から、AtRH7 が活性を持つ RNA helicase であることが示された。AtRH7 のノックアウト変異体 (*rh7*) は、第一葉の形態、葉脈パターン等においてリボソーム関連変異体と酷似の表現型を示した。また、*rh7* は低温下において、発芽や生育が著しく抑制され、ロゼット葉の形成及び形態に著しい変異が観察された。ノーザン及び circular RT-PCR 解析の結果から、変異体では rRNA のプロセッシング過程に異常が見られ、低温下では 18S rRNA 中間体が特に蓄積することが示された。AtRH7 は低温下における rRNA プロセッシングに必要な機能をもつと考えられた。

第4章では、AtRH7 の環境ストレス耐性における機能を解析した。*rh7* 変異体の耐凍性を調べたところ、低温馴化前には野生株と *rh7* 変異株の耐凍性に違いは見られなかったものの、低温馴化後は *rh7* の耐凍性が野生株と比べて大きく上昇することが見出された。*rh7* 変異株においては、低温馴化シグナル伝達に関わる CBF 経路の遺伝子の発現は野生株と同レベルであることから、AtRH7 による耐凍性制御は CBF 経路と独立な機構によると考えられた。細胞内可溶性糖の蓄積を比較したところ、低温馴化後にグルコース及びスクロースの濃度が変異株で上昇しており、可溶性糖の蓄積が耐凍性の違いを説明できることが示された。また、野生株と変異株の間で低温馴化後のトランスクリプトーム解析を行い、数多くのストレス応答性遺伝子に変異体で強く発現していることが示され、これらの発現上昇も耐凍性向上に寄与するものと考えられた。

以上の結果から、シロイヌナズナ AtCSP2 の相互作用タンパク質として単離された AtRH7 は、細胞内で AtCSP2 と物理的に相互作用しており、耐凍性、耐塩性等の環境ストレス耐性の負の制御因子として機能していることが明らかになった。また、AtRH7 は rRNA のプロセッシングに関与しており、低温下における発芽、生長や形態形成において重要な働きを持っていることが明らかとなった。

本研究は、シロイヌナズナの AtRH7 RNA helicase が rRNA の生成過程に深く関与し、低温等の環境ストレス耐性に関して負の調節機能をもつことを明らかにした。これまでに環境ストレス耐性の負の調節因子についてはあまり研究例がなく、特に RNA 関連タンパク質が関与する調節メカニズムは未知の領域である。本研究は、植物のストレス耐性機構を解明する上で、重要な知見を明らかにしており、その科学的な意義は高く評価できる。

よって、審査員一同は、Yuelin Liu 氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。