



Title	植物の核小体ストレス応答におけるANAC082転写因子の機能と発現制御に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐々木, 駿
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15295号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89490
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sasaki_Shun_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（農学）

氏名 佐々木 駿

学位論文題名

植物の核小体ストレス応答における ANAC082 転写因子の機能と発現制御に関する研究

【背景】

核小体とは真核生物の核内に存在する構造体であり、その内部ではリボソームの生合成が行われている。リボソーム生合成経路において、リボソーム RNA (rRNA) の転写ならびにプロセッシングは、真核細胞内で最も ATP を必要とする過程であり、したがって核小体は真核細胞内で最もエネルギーを消費する器官である。リボソームの生合成は細胞に対する様々なストレスによって阻害される。紫外線や放射線、栄養飢餓は rRNA の転写やリボソームタンパク質の合成を阻害する。このようなリボソームの生合成異常を感知した細胞は、細胞増殖の抑制やアポトーシスを引き起こす。このとき、しばしば核小体の構造変化がみられることから、リボソームの生合成異常に伴うストレス応答は、核小体ストレス応答と呼ばれる。核小体ストレス応答は、真核生物にとって重篤なエネルギーロスを回避するための重要なメカニズムである。

動物細胞における核小体ストレス応答においては、転写因子である p53 とその分解に関わる MDM2 が中心的な役割を担っている。植物では、核小体ストレス応答において中心的な役割を果たす転写因子として、NAC ドメインをもつ ANAC082 がシロイヌナズナから同定された。ANAC082 は核小体ストレスに応答して発現が誘導され細胞増殖を抑制する機能を持つことから、動物の p53 に相当する機能をもつと考えられるが、ANAC082 の発現制御機構と ANAC082 が細胞増殖を抑制する機構については明らかにされていなかった。

本研究では、植物の核小体ストレス応答機構を解明するために、ANAC082 の発現制御機構の解析と、ANAC082 の下流で細胞増殖抑制に関与する因子の探索を行った。

1. ANAC082 の核小体ストレスに応答した発現制御機構の解析

シロイヌナズナの ANAC082 遺伝子の 5' 非翻訳領域には 37 アミノ酸をコードする上流 ORF (uORF) が存在し、この uORF のアミノ酸配列は被子植物において高度に保存されている。この uORF にコードされるペプチドは ANAC082 の発現を抑制することがこれまでに報告されている。本研究では、核小体ストレスに応答した ANAC082 の発現制御にこの uORF が関与する可能性を検証した。そのために、ANAC082 遺伝子のプロモーターと 5' 非翻訳領域の下流につないだルシフェラーゼ遺伝子を持つレポーター植物を、rRNA の転写を阻害することで核小体ストレスを引き起こすことが知られている薬剤で処理した。この処理により、uORF 配列依存的にルシフェラーゼ

遺伝子の発現が上昇した。また、アミノ酸合成阻害剤でレポーター植物を処理した場合にも、ルシフェラーゼ遺伝子の発現上昇がみられた。これらの結果から、*ANAC082* mRNA の uORF は非ストレス条件では *ANAC082* の発現を抑制し、核小体ストレスが生じると uORF による発現抑制が緩和されて *ANAC082* の発現が誘導されることが示唆された。

2. *ANAC082* が転写および翻訳に与える影響の検討

ANAC082 の機能欠損変異は核小体ストレスによる細胞増殖抑制を抑圧し、*ANAC082* の過剰発現は植物の生育を抑制することから、転写因子としての *ANAC082* の機能は細胞増殖の抑制であると考えられる。その機構を明らかにするために、RNA シークエンス解析ならびにリボソームプロファイリング解析により、シロイヌナズナにおいて *ANAC082* の過剰発現によって発現量が変動する遺伝子群の網羅的同定を行った。また、*ANAC082* の発現がリボソーム合成量に与える影響を検討するために、ポリソームプロファイリング解析を行った。その結果、シロイヌナズナの *ANAC082* 過剰発現株では、リボソームの 40S サブユニット、60S サブユニット、及びポリソームの減少がみられた。これらの結果から、*ANAC082* の過剰発現によりリボソーム合成の抑制と翻訳レベルの低下が引き起こされることが示唆された。

3. 植物の核小体ストレス応答への TOR 経路の関与の検討

真核生物の栄養応答において重要な役割を担う Target of Rapamycin (TOR) は、リボソームタンパク質 S6 (RPS6) のリン酸化を行うシグナル伝達経路の上流因子であり、植物においてもストレスや栄養飢餓によって活性が低下する。TOR が不活性化された場合には、RPS6 のリン酸化レベルが低下し、それにより rRNA の転写が抑制されることが知られている。*ANAC082* の過剰発現によりリボソームサブユニット量の減少がみられたことから、*ANAC082* 過剰発現株では TOR の活性が低下している可能性が考えられた。その可能性を検証するために、TOR のリン酸化標的である S6 キナーゼならびにさらにそのリン酸化標的である RPS6 のリン酸化レベルをウェスタンブロットティングにより解析した。その結果、両者ともに *ANAC082* の過剰発現によってリン酸化レベルが低下した。また、上述のレポーター植物を TOR 阻害剤で処理したところ、*ANAC082* の発現量は有意に上昇した。これらのことから、*ANAC082* は TOR 経路を阻害すると同時に、その発現は TOR 経路によるフィードフォワード制御を受けている可能性が示唆された。

以上、本研究により、核小体ストレスに応答した *ANAC082* の発現制御に uORF が関与すること、*ANAC082* が TOR 経路を介して核小体ストレス時にリボソーム合成を抑制することが見出された。TOR が不活性化されると植物の生育が阻害されることが知られており、*ANAC082* による細胞増殖の抑制も TOR 経路を介して行われている可能性が考えられる。本研究を端緒とした今後のさらなる研究により、植物の核小体ストレス応答機構のより一層の解明が進むことが期待される。