



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 [全文の要約]
Author(s)	佐々木, 駿
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 <a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
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	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89494">https://hdl.handle.net/2115/89494</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Sasaki_Shun_summary.pdf



# 博士論文の要約

生命フロンティアコース： 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、核小体ストレスに応答した 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導入した形質転換シロイヌナズナ（レポーター植物）を用いた。また、核小体ストレス源として、アクチノマイシン D（ActD）と 5-フルオロウラシル（5-FU）を用いた。ActD は rRNA の転写を阻害す

ることで核小体ストレスを引き起こし、5-FUはrRNA前駆体のプロセッシング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。レポーター植物を6日間液体振盪培養した後、ActDまたは5-FUを添加してさらに24時間培養した。培養後の植物からタンパク質を抽出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ActDまたは5-FUの添加によってルシフェラーゼ活性の上昇がみられた。定量PCRによってルシフェラーゼ mRNA量を測定したところ、ActDや5-FUのルシフェラーゼ mRNA量への影響はルシフェラーゼ活性への影響と比べて小さかった。ルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼ mRNA量で標準化した値を翻訳効率として評価すると、野生型のuORF配列を持つレポーター植物では、ActDや5-FUに応答してレポーター遺伝子の翻訳効率が有意に上昇することが示された。一方、フレームシフト変異によってアミノ酸配列を変化させたuORFを持つレポーター植物では、ActDや5-FUに応答したレポーター遺伝子の翻訳効率の上昇はみられなかった。これらの結果から、ANAC082 mRNAのuORFにコードされるペプチドは非ストレス条件ではANAC082の翻訳を抑制し、核小体ストレスが生じるとuORFペプチドによる翻訳抑制が緩和されてANAC082の発現が誘導されることが示唆された。

## 2. ANAC082の過剰発現が植物の成長や遺伝子発現に与える影響の検討

核小体ストレスに反応して発現が誘導されたANAC082が植物にどのような変化を引き起こすかを明らかにするために、ANAC082を過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作出した。ANAC082の過剰発現は致死となる可能性があったので、デキサメタゾン(Dex)による誘導発現系を用いた。Dex誘導性のプロモーターの下流につないだANAC082遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナの種子をDexを含む固形培地に播種したところ、発芽後に植物の生長が停止した。このことから、ANAC082は核小体ストレス時に植物の生長を抑制する働きがあることが示唆された。

次に、ANAC082の下流で働く遺伝子を同定するために、RNAシーケンス解析を行った。この解析では、前述のANAC082過剰発現植物と、ANAC082を含まない空ベクターを導入した形質転換植物をそれぞれ6日間液体振盪培養した後、Dexを培地に添加してさらに24時間培養した。培養後の植物から抽出したRNAを用いてRNAシーケンス解析を行い、ANAC082の過剰発現によって発現量が変動する遺伝子群を網羅的に同定した。その結果、ANAC082の過剰発現によって発現量が上昇する遺伝子の中に、ストレス応答に関与することが知られている遺伝子が多く見つかった。

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。この解析では、ANAC082過剰発現植物を6日間液体振盪培養した後、Dexを培地に添加してさらに48時間培養した。Dex処理した植物と未処理の植物の間で比較したところ、Dex処理によってリボソームの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不活性化される。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 が不活性化され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ティングにより解析した。そのために、ANAC082 過剰発現植物を6日間液体振盪培養した後、Dex を培地に添加してさらに24時間培養した。リン酸化された S6 キナーゼを検出する抗体とリン酸化された RPS6 を検出する抗体をそれぞれ用いたウェスタンブロッティング解析により、Dex 処理した植物と未処理の植物の間で S6 キナーゼと RPS6 のリン酸化レベルを比較した。その結果、S6 キナーゼ、RPS6 とともに ANAC082 の過剰発現によってリン酸化レベルの低下がみられた。この結果から、ANAC082 の過剰発現により TOR 経路が阻害されることが示唆された。

TOR 経路は翻訳制御に関与することが知られていることから、次に TOR 経路の阻害が ANAC082 の翻訳に影響を与える可能性を検討した。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導入した形質転換シロイヌナズナ (レポーター植物) を用いた。レポーター植物を6日間液体振盪培養した後、TOR の阻害剤である AZD-8055 を添加してさらに24時間培養した。培養後の植物からタンパク質と RNA をそれぞれ抽出し、ルシフェラーゼ活性とルシフェラーゼ mRNA 量を測定した。ルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼ mRNA 量で標準化した値を翻訳効率として評価すると、AZD-8055 の添加によりレポーター遺伝子の翻訳効率の有意な上昇がみられた。このことから、TOR 経路の阻害によって ANAC082 の翻訳が促進されることが示唆された。

以上の結果から、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考えられる。

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解明が進むことが期待される。