

Title	Analysis of LITTLE NUCLEI family regulating nuclear morphology in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Author(s)	坂本, 勇貴
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34036">https://doi.org/10.18910/34036</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 坂本 勇貴 )

## 論文題名

Analysis of LITTLE NUCLEI family regulating nuclear morphology in  
*Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナにおける細胞核形態を制御するLITTLE NUCLEIファミリーの解析)

## &lt;背景・目的&gt;

植物の細胞核の形態は種、器官、組織や細胞種で様々に異なっている。例えばシロイヌナズナの葉の孔辺細胞の核は小さく丸いのに対し、トライコームの核は大きく紡錘形をしている。核の体積と含まれるDNA量に正の相関があることは知られているが、核の形態を制御する因子やその生物学的意義についてはあまり明らかになっていない。本研究では細胞骨格やLITTLE NUCLEI (LINC)ファミリーの解析を通して、核の形態制御の仕組みに迫ることを目的とした。

## &lt;結果・考察&gt;

## 1. 核の形態制御における細胞骨格とLINCの関与

植物核の形態制御における細胞骨格の関与を確かめるために、シロイヌナズナの葉および脱膜単離核をアクチン脱重合剤および微小管破壊剤で処理したが、核の形態に変化は見られなかった。すなわち核の形態維持に細胞骨格は関与していないことが示された。次に、核の形態制御に関わる核内因子を探索するため、シロイヌナズナの葉から粗核ラミナ領域を調製し、質量分析を行った結果660個のタンパク質が同定された。その中から63個のタンパク質を選抜し、そのT-DNA挿入遺伝子破壊株を取り寄せ核の形態を指標にスクリーニングを行った結果*linc1*および*linc4*遺伝子破壊株では核が著しく丸くなっていた。

## 2. LINCの発現および細胞内局在解析

LINCプロモータと遺伝子の下流に $\beta$ -グルクロニダーゼを繋げた融合タンパク質を用いLINC1-LINC3の発現解析を行った。その結果、LINC1-LINC3は主に未成熟な組織の細胞で強く発現し、成熟に伴って発現レベルが下がることが明らかとなった。次に、GFPをつなげた融合タンパク質を用いて細胞内局在解析を行った。その結果、間期においてはLINC1-LINC4は主に核の周縁部に局在し、この局在パターンは丸い核においても紡錘形の核においても同様であった。分裂期においてはLINC1は染色体上に、LINC2-LINC4は細胞質中に局在した。

3. *linc*遺伝子破壊株の表現型解析

*linc*遺伝子破壊株の表現型を解析するために*linc1-linc4*, *linc1/linc4*, *linc2/linc3*を作成した。これらの葉の表皮細胞の核の形態をCircularity index( $4\pi A/P^2$ ; A: area, P: perimeter)とNuclear areaを指標に半定量化すると、*linc1*, *linc4*, *linc1/linc4*において核が著しく丸くなり、*linc2*, *linc3*, *linc2/linc3*においてはやや丸くなった。すなわち、核の形態維持にはLINC1とLINC4が主に働いていることが明らかとなった。次に核の形態の違いが運動に影響を与えるかを解析するため、全*linc*遺伝子破壊株において核の光定位運動を調べたが正常であった。また、核に含まれるDNA量に影響を与えるかフローサイトメトリーで解析したが、全*linc*遺伝子破壊株において野生型と差がなかった。次に、核内のクロマチン配置に影響を与えるかセントロメアおよび45r-DNAに対するプローブを用いて蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて解析すると、*linc1/linc4*遺伝子破壊株において野生型と比べ異常な配置が見られた。最後に、遺伝子発現パターンをマイクロアレイで解析すると野生型と*linc1/linc4*遺伝子破壊株では違いが見られた。以上のことから、LINC1-LINC4は核の形態制御に関わる核ラミン因子であり、特にLINC1とLINC4は核の形態制御において主要な役割を果たし、且つクロマチンの配置や遺伝子発現制御にも関わっていることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

( 坂 本 勇 貴 )			
	(職)	氏	名
論文審査担当者	主査	教 授	柿 本 辰 男
	副査	教 授	長 谷 俊 治
	副査	准教授	久 保 田 弓 子
	副査	准教授	高 木 慎 吾

## 論文審査の結果の要旨

坂本勇貴君は、植物における核の形の多様性に興味を持ち、核の形態制御に関わる因子の解析に取り組んだ。ゲノムが解読されている維管束植物であるシロイヌナズナの葉から核ラミナ画分を調製し、そこに含まれる蛋白質を質量分析により解析した。それらの遺伝子破壊株から、核が球形化、小型化するものを選抜し、LITTLE NUCLEI 1 (LINC1) とLINC4を特定した。これらのうちLINC1-3について、発生に伴う発現様式と細胞内局在を調べた。いずれの蛋白質も若い未分化な組織で蓄積量が多く、細胞内では核内の主に周縁部に局在することを明らかにした。

核の形態制御に対する関与について、一重欠損株、二重欠損株を作製して解析し、LINC1とLINC4とが独立かつ主要に、LINC2とLINC3は副次的に働くことを示した。作製した全ての欠損株において、プロイディ、核の光定位運動について、野生株との違いはなかった。核が小型化することから核内でのクロマチンの配置に注目した。蛍光in situハイブリダイゼーション法により、*linc1/linc4*二重欠損株では、ヘテロクロマチンの配置の変化が生じている可能性を示した。マイクロアレイ解析により、遺伝子の発現パターンにも変化が生じていることを確かめた。

以上より、シロイヌナズナにおいて、LINC1、LINC4は、核の形態だけでなく、クロマチン配置の制御を介して遺伝子発現調節に関与する可能性が示された。LINCファミリーの一部については既に先行研究が発表されているが、「核の形」という自分自身の興味をモチベーションに研究を進め、これまで知られていなかったクロマチン配置の制御に関与する可能性を提唱した点が高く評価された。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。