

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22119009

研究課題名（和文）根の成長を支える細胞増殖の相転換機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying phase transition of cell proliferation during root growth

研究代表者

梅田 正明（UMEDA, MASAAKI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80221810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 87,200,000円

研究成果の概要（和文）：根の伸長は土壌環境により大きく左右される。その伸長速度を決めるのは、根端での細胞分裂と、細胞分裂が細胞伸長へと転換するタイミングである。我々は様々なストレスにより根の伸長が調節される仕組みを明らかにする目的で、それらの制御機構を解析した。その結果、植物ホルモンの一つであるサイトカイニンが細胞分裂から細胞伸長への転換を促進すること、またMYB3R転写因子がDNA損傷に応答した細胞分裂の停止に重要な役割をもつことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Root growth is affected by various underground conditions. The growth rate is determined by cell division in the root apex and transition from cell division to cell elongation. In this project, we studied underlying mechanisms to uncover the major machinery controlling root growth in response to external stimuli. We found that cytokinin, one of the phytohormones, promotes transition from cell division to cell elongation, and that MYB3R transcription factor plays an important role in arresting cell division under DNA stress conditions.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：細胞分裂 細胞伸長 細胞周期 根 植物ホルモン DNA損傷 転写因子 イメージング

1. 研究開始当初の背景

植物の根の伸長は、根端の分裂領域における細胞分裂、移行領域における細胞分裂から細胞伸長(分化)への移行のタイミング、伸長/分化領域における細胞伸長の3つのファクターによって規定される。このうち、移行領域における細胞分裂から細胞伸長への移行は、DNA倍加の誘導により引き起こされることが明らかにされていたが、その分子機構は未解明のままであった。この移行のタイミングは根端分裂組織の長さを決めることにもなるので、土壌環境に応じて根の伸長を変化させる上で非常に重要である。

根端分裂組織における細胞分裂も環境要因に応答して変化し、根の伸長を制御している。例えば、アルミニウムやホウ素過剰の条件ではDNA損傷が誘導され、細胞分裂が阻害されることが明らかにされていた。このようなストレス下ではサイクリン依存性キナーゼ(CDK)インヒビターの発現誘導が起こり、CDKの活性阻害により細胞分裂が抑制されると考えられていたが、その他の可能性についてはほとんど研究されていなかった。

根端分裂組織における細胞分裂を質的に正確に把握するためには、組織レベルのリアルタイムイメージングに適用可能な細胞周期モニタリング系が必須である。しかし、植物科学分野ではこれまでサイクリンB1遺伝子を改変したG2/M期マーカー遺伝子しか存在せず、細胞周期進行をモニタリングすることは技術的に不可能であった。動物分野ではG1/S期マーカーとG2/M期マーカーを組み合わせたFucciと呼ばれる細胞周期インディケータが開発されているので、植物でもサイクリンB1マーカーとは異なる細胞周期ステージを標識するマーカー遺伝子を開発することにより、組織レベルの細胞周期モニタリングが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナの根において細胞分裂からDNA倍加への移行を制御する分子機構を解明することを目的とした。それを踏まえて、環境ストレスに応答して根端分裂組織の長さを調節する仕組みの解明を目指した。また、DNA損傷に応じて根端分裂組織における細胞分裂を抑制する分子マシーナリーの同定も目標とした。さらに、細胞周期モニタリング系Cytrapを作成し、植物組織において細胞周期進行のイメージング解析を可能にする技術開発を行った。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの過剰発現体やノックアウト変異体を用いて、根端分裂組織の長さを皮層細胞の長さを指標として測定した。遺伝子発現については、*promoter:GUS/GFP* や *promoter:ORF-GUS/GFP* をシロイヌナズナに導入して観察した。転写因子の標的配列への結合については、酵母 one-hybrid 法およ

び ChIP-PCR 法により解析した。後者においては、HA タグを付加した転写因子を発現する形質転換体を用いて、抗 HA 抗体による免疫沈降により行った。転写因子の活性については、シロイヌナズナ培養細胞由来のプロトプラストを用いた一過的発現系を利用して、ルシフェラーゼ活性を指標にして測定した。DNA 倍数性は Partec 社製のプロイディーアナライザーを用いて測定した。qRT-PCR は Roche 社製の LightCycler 480 を用いて行った。ホルモン含量は理化学研究所の榊原均博士に測定を依頼した。タイムラプスイメージングはオリンパス社製の共焦点レーザー顕微鏡 FV1000 を用いて行った。

4. 研究成果

(1) DNA 倍加誘導には後期促進複合体(APC)の活性化が重要であることが知られている。植物においては APC 活性化因子をコードする *CCS52A1* 遺伝子の発現が根端の移行領域で特異的に見られることから、*CCS52A1* の転写制御因子の同定を試みた。まず、プロモーター領域の欠失シリーズを作成し、GUS 融合遺伝子を用いて移行領域での発現に必要なシス領域を特定した。この領域を bait として用いて one-hybrid スクリーニングを行うことにより、シロイヌナズナ転写因子ライブラリーの中から *CCS52A1* プロモーターに結合する転写因子を選抜した。その結果、サイトカイニンのレスポンスレギュレーターである *ARR2* を同定した。別の B 型レスポンスレギュレーターである *ARR1* は結合しなかったことから、*CCS52A1* の発現は *ARR2* により特異的に制御されていると考えられた。*in vivo* での結合性も ChIP-PCR により確認することができた。

CCS52A1 の発現はサイトカイニン処理によって上がり、サイトカイニン受容体の変異体や *arr2* 変異体では低下していた。また、様々な変異体や過剰発現体を用いて遺伝学的解析を行った結果、*ARR2* による *CCS52A1* 遺伝子の発現制御により細胞分裂から DNA 倍加への移行が促進されること(根端の分裂領域が短くなること)が裏付けられた。一方、以前の研究により *ARR1/12* が Aux/IAA の一つである *SHY2* の発現を誘導してオーキシシンシグナルを抑制することが報告されていたが、こちらも遺伝学的解析により、*ARR2-CCS52A1* と *ARR1/12-SHY2* は独立な経路として働いていることが明らかになった。

以上の結果から、根の移行領域においては2つの経路により細胞分裂からDNA倍加(エンドサイクル)への転換が起こることが示された。一つは、サイトカイニンにより活性化された *ARR1/12* が *SHY2* の発現誘導を介してオーキシシンシグナルを抑制する経路であり、もう一つは、*ARR2* が *CCS52A1* の発現誘導を介して APC を活性化し、細胞周期因子を分解に導く経路である(図1)。

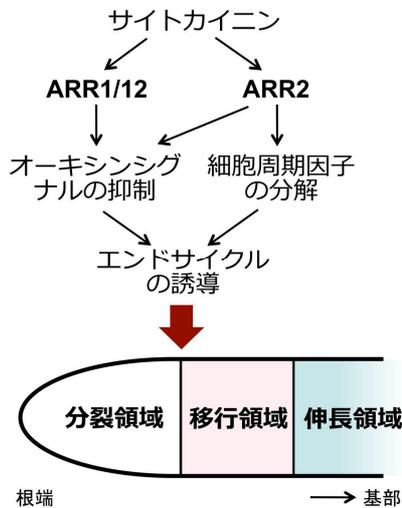


図1 サイトカイニンによる細胞分裂から DNA 倍加への移行制御

(2) DNA 損傷は、アルミニウムやホウ素過剰ストレス、病原菌感染、各種ストレス下で発生する活性酸素種により誘発される。また、通常の DNA 複製の過程においても恒常的に DNA 損傷が起きている。我々は以前、DNA 損傷が細胞分裂から DNA 倍加への移行を促進することを見出したが、その分子機構は未解明であった。上述のように、サイトカイニンが細胞分裂から DNA 倍加への転換に重要であることが明らかになったので、DNA 損傷時のサイトカイニン関連遺伝子の発現を調べたところ、サイトカイニン合成遺伝子のいくつかは DNA 損傷に反応して発現誘導されることが明らかになった。これらの遺伝子の変異体では DNA 損傷に対する感受性の低下が観察されたことから、*de novo* のサイトカイニン合成が DNA 損傷に反応した DNA 倍加誘導に重要であることが示唆された。一方で、DNA 損傷時には *PIN* の発現が低下すること、オーキシン関連変異体は DNA 損傷に対して高感受性を示すこと、オーキシンを外から与えると DNA 損傷に対する感受性が低下することが明らかになった。そこで、オーキシンとサイトカイニン関連遺伝子の多重変異体を作成し、遺伝学的解析を行った結果、サイトカイニン合成が DNA 損傷に反応した DNA 倍加誘導において主要因となっていることが明らかになった。以上の結果から、DNA 損傷ストレスを受けた植物では、サイトカイニン合成を活性化することにより DNA 倍加を促進し、根の伸長を抑制していることが示された。

(3) 以前の我々の研究により、DNA 損傷ストレスは CDK インヒビターの発現を上げるとともに、B 型サイクリンなどの G2/M 期遺伝子の発現を低下させることが明らかになっていた。植物の G2/M 期遺伝子の発現は MYB3R 転写因子により制御されていること

から、*myb3r* 変異体の DNA 損傷応答について解析した。その結果、抑制型 MYB3R の変異体は DNA 損傷に耐性を示すことが明らかになった。そこで、抑制型 MYB3R の機能解析を進めたところ、タンパク質分解制御を受けること、またその分解制御はリン酸化に依存していることを見出した。リン酸化部位に変異を導入して解析した結果、脱リン酸化状態になりタンパク質の安定性が増すことが、DNA 損傷時に細胞周期を G2/M 期で停止させるのに重要であることが明らかになった。

以上の結果から、DNA 損傷により抑制型 MYB3R のタンパク質安定性が増すと、B 型サイクリンなどの標的遺伝子の発現が効率的に抑制され、G2/M 期停止が引き起こされることが示された。つまり、分裂組織においては CDK インヒビターの発現誘導とともに、抑制型 MYB3R のタンパク質安定化を介して G2/M 期遺伝子の発現が抑制され、細胞分裂から DNA 倍加への転換が促進されることが明らかになった。

(4) 細胞周期進行をモニタリングするためには、既存の G2/M 期マーカーであるサイクリン B1 遺伝子他に、別の細胞周期ステージを標識するマーカー遺伝子が必要不可欠であった。そこで、DNA 複製に関わる *CDT1a* 遺伝子に着目し、マーカー遺伝子として最適なゲノム領域の特定を行った。特定した領域が *CDT1* としての機能を有しないことは、酵母の *cdt1* 変異株の相補実験により確認した。また、*CDT1a* 自身のプロモーターは活性が弱かったため、ヒストン *HTR2* 遺伝子のプロモーターに代えたレポーター遺伝子を作成し、シロイヌナズナ根端における発現様式を確認した。その結果、作成したレポーター遺伝子は S~G2 期で発現すること、このレポーター遺伝子から産生されるタンパク質は M 期に進入すると積極的に分解されることが明らかになった。次に、この S/G2 期マーカーと G2/M 期マーカーを組み合わせ、根の表皮における細胞周期進行のタイムラプス観察を行った。その結果、根の表皮では G1 期が 6 時間、S~G2 期が 8 時間、M 期が 2 時間であり、細胞周期 1 サイクルに 16 時間程度かかっていることが示唆された。

次に、上記の細胞周期モニタリング系を利用して、シロイヌナズナの根で細胞分裂から DNA 倍加へと移行する過程を観察した。その結果、移行領域に入って細胞伸長が活性化されるよりも数個根端側の細胞で、S/G2 期停止が起きていることが明らかになった。また、移行領域より基部側では S/G2 期マーカーのタンパク質分解が観察されなかった。このことは、DNA 倍加では G2/M の境界ステージを含まないサイクルが回っていることを意味している。以上のように、本研究で作成した細胞周期モニタリング系 Cytrap は DNA 倍加への移行過程の観察にも有効であることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件)

- Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., *et al.* (25 人中22番目) Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* in press, 2015. 査読有
Yin, K., Ueda, M., Takagi, H., Kajihara, T., Sugamata Aki, S., Nobusawa, T., Umeda-Hara, C., Umeda, M. A dual-color marker system for *in vivo* visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 80, 541-552, 2014. 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12652
Takatsuka, H., Umeda, M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J. Exp. Bot.* 65, 2633-2643, 2014. 査読有
DOI: 10.1093/jxb/ert485
Takahashi, N., Kajihara, T., Okamura, C., Kim, Y., Katagiri, Y., Okushima, Y., Matsunaga, S., Hwang, I., Umeda, M. Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots. *Curr. Biol.* 23, 1812-1817, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.cub.2013.07.051
Yoshiyama, K. O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H., Umeda, M. ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 14, 817-822, 2013. 査読有
DOI: 10.1038/embor.2013.112
Nobusawa, T., Okushima, Y., Nagata, N., Kojima, M., Sakakibara, H., Umeda, M. Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation. *PLoS Biol.* 11, e1001531, 2013. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pbio.1001531
Breuer, C., Morohashi, K., Kawamura, A., Takahashi, N., Ishida, T., Umeda, M., Grotewold, E., Sugimoto, K. Transcriptional repression of the APC/C activator *CCS52A1* contributes to the active termination of cell growth. *EMBO J.* 31, 4488-4501, 2012. 査読有
DOI: 10.1038/emboj.2012.294
Sakamoto, T., Tsujimoto-Inui, Y., Uruguchi, S., Yoshizumi, T., Matsunaga, S., Matsui, M., Umeda, M., Fukui, K., Fujiwara, T. Condensin II alleviates DNA damage and is essential for tolerance of boron overload stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3533-3546, 2011. 査読有
DOI: 10.1105/tpc.111.086314
Inagaki, S., Umeda, M. Cell-cycle control and plant development. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 291, 227-261, 2011. 査読有

DOI: 10.1016/B978-0-12-386035-4.00007-0
Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., Kurihara, D., Matsunaga, S., Umeda, M. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 108, 10004-10009, 2011. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1103584108

〔学会発表〕(計 84 件)

- 梅田正明、藤本啓介、高橋直紀、Stem cell replenishment maintains genome integrity、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 17 日、東京農業大(東京都世田谷区)
梅田正明、信澤岳、Epidermis-derived signals control plant organ growth、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
高橋直紀、Poyu Chen、梅田正明、DNA damage response in *Arabidopsis* roots、Plant Genome Stability and Change、2014 年 7 月 19 日、アシロマ(米国)
梅田正明、DNA damage response in *Arabidopsis* roots、Plant Cell Cycle Workshop、2014 年 6 月 26 日、トレボン(チェコ)
梅田正明、高塚大知、高橋直紀、The essential function of cytokinin in promoting cell elongation in *Arabidopsis* roots、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山大(富山県富山市)
梅田正明、Control of organ growth by restricting cell proliferation、Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology、2013 年 7 月 5 日、バレンシア(スペイン)
梅田正明、高橋直紀、Cytokinin coordinates DNA ploidization and cell differentiation in roots、10th International Congress on Plant Molecular Biology、2012 年 10 月 25 日、済州島(韓国)
高橋直紀、梅田正明、ゲノム倍加はサイトカイニンシグナルにより直接制御される、日本植物学会第 76 回大会、2012 年 9 月 17 日、兵庫県立大(兵庫県姫路市)
梅田正明、信澤岳、表皮由来のシグナルによる器官成長の制御、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学(京都府京都市)
植田美那子、渡部貴史、田伏順平、高木瞳、梅田正明、イメージングと顕微操作で迫る細胞分裂と組織形成の統御機構、日本植物学会第 75 回大会、2011 年 9 月 18 日、東京大(東京都目黒区)
梅田正明、植物における DNA 二本鎖切断による核内倍加の誘導機構、日本放射線影響学会第 53 回大会、2010 年 10 月 21 日、京都テルサ(京都府京都市)

梅田正明、DNA 二本鎖切断による核内倍
加の誘導機構、日本植物学会第 74 回大会、
2010 年 9 月 10 日、中部大学（愛知県春
日井市）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 正明 (UMEDA, Masaaki)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサ
イエンス研究科・教授
研究者番号：80221810