

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570034

研究課題名（和文） 植物の G2/M 期遺伝子の転写制御に関わる未知因子群の探索

研究課題名（英文） Search for novel factors regulating transcription of G2/M phase-specific genes in plant cells.

研究代表者

伊藤 正樹 (ITO MASAKI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：10242851

研究成果の概要：植物の G2/M 期特異的遺伝子群の発現は R1R2R3 型の Myb 転写因子により制御されていることをすでに明らかにしている。本研究では、G2/M 期遺伝子の転写制御に関わる新奇因子を同定するため、シロイヌナズナの R1R2R3-Myb 遺伝子破壊株に見られる細胞質分裂の異常が促進される変異体の単離およびその原因遺伝子の同定を行った。現在までに同定することができた原因遺伝子の一つは、細胞質分裂を制御する MAP キナーゼカスケードを構成する MAPKK キナーゼであった。また、他の複数の変異体についても同様に解析を進めており、原因遺伝子の同定を行う予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：細胞増殖・細胞質分裂・細胞周期・転写制御・植物・シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

植物のゲノムには非常に大きな Myb 転写因子ファミリーが存在するが、この中で Myb ドメインが 3 回の繰り返し配列からなる R1R2R3-Myb は小さなサブファミリーを形成している。シロイヌナズナには 5 個の R1R2R3-Myb をコードする遺伝子が存在し、それらは一次配列の類似性から 3 つのグループ (A-type, C-type, D-type) に分類すること

ができる。このうち A-type Myb と C-type Myb はイネやタバコにも存在しており進化的に保存されているが、D-type Myb は今のところシロイヌナズナにしか見つかっていない。

R1R2R3-Myb は G2/M 期特異的遺伝子群のプロモーター領域に存在する共通のシスエレメントである MSA エレメントに結合し、転写を制御していることが示されている。シロイヌナズナの A-type Myb をコードする遺伝子 2 つ (*MYB3R1* と *MYB3R4*) を同時に破壊した

二重変異体では、一群の G2/M 期遺伝子の発現の低下と不完全なサイトキネシスが生じることがわかっている。このサイトキネシスの異常は MSA エlement をプロモーター領域に持ち細胞板形成に必須な機能を担っている *KNOLLE* 遺伝子の発現の低下が主要な原因であることを明らかにした。これらの結果から A-type Myb は MSA エlement に結合する転写活性化因子であり、下流の G2/M 期遺伝子の発現を通じてサイトキネシスを正に制御していると考えられる。一方、シロイヌナズナに 2 つ存在する C-type Myb 遺伝子の破壊を A-type Myb 遺伝子の破壊と組み合わせてもサイトキネシスの異常や G2/M 期遺伝子の発現の低下を促進しないことから、C-type Myb は A-type Myb とは異なった働きをしていることが予想されている。

2. 研究の目的

A-type Myb の二重変異体では多くの G2/M 期遺伝子の発現が低下し、不完全なサイトキネシスが高頻度で生じるが、致死にはならず成熟個体にまで成長し、稔性も有する。一方で、A-type Myb の標的である *KNOLLE* 遺伝子はサイトキネシスに必須であり、その機能欠失型変異は芽生えの段階で致死となることが知られている。さらに、MSA エlement に変異を導入した *KNOLLE* ゲノム断片は、この致死性を相補することができないことから、MSA エlement を通じた転写活性化は *KNOLLE* の十分な機能の発現に不可欠であると考えられる。これらのことから、MSA エlement を通じた転写活性化には A-type Myb 以外の未知の因子が関わっていることが示唆される。MSA エlement を通じた G2/M 期遺伝子の転写活性化のメカニズムを理解するためには、このような未知の因子を同定することが不可欠である。そこで、本研究では、MSA エlement に結合し、A-type Myb と冗長的に働く新奇転写制御因子の同定を目指して研究を進めた。

3. 研究の方法

A-type Myb と冗長的に働くことが期待される因子として、構造的に類似する転写因子が考えられる。このような因子として、他のタイプの R1R2R3-Myb や R2R3-Myb が考えられる。しかし、シロイヌナズナに存在する C-type や D-type の R1R2R3-Myb は A-type Myb との機能的な冗長性はないことがわかっている。シロイヌナズナに 125 個の遺伝子が存在する R2R3-Myb の中に、MSA エlement に結合する転写活性化因子が含まれているとすれば、

DNA 結合領域である Myb ドメインのアミノ酸配列が、A-type Myb に類似している可能性が考えられる。そこで、R2R3-Myb ファミリーのうち、遺伝子系統樹上で R1R2R3-Myb と隣接する分類群に属する Myb の遺伝子破壊株を解析することにした。これらの R2R3-Myb が A-type Myb と同様な機能を持つものであれば、遺伝子破壊株において G2/M 期遺伝子の発現が減少していると予想される。

一方、A-type Myb とは構造的な類似性を持たない因子が冗長的に働く可能性も考えられる。このような因子に機能欠失型変異が起きると、A-type Myb 変異体に見られる異常が促進されると考えられる。そこで、A-type Myb 遺伝子破壊株の異常を促進する変異体を単離して、原因遺伝子を同定すれば、A-type Myb と冗長的に働く因子を同定できると考えられる。

(1) A-type Myb 変異体の異常を促進するエンハンサー変異体の単離および解析

A-type Myb と冗長的に働く因子が機能欠失型の変異を引き起こすと、A-type Myb 遺伝子破壊株の異常が促進されることが期待される。しかし、2 個の A-type Myb 遺伝子 (*MYB3R1* と *MYB3R4*) を同時に欠く二重変異体に冗長的な因子の変異が組み合わせると、致死となる可能性が考えられる。また、*myb3r1 myb3r4* 二重変異体では、胚発生初期に生じる不完全なサイトキネシスの結果、次世代の植物の中に倍数化した個体が高頻度 (約 40%) で出現することがわかっている。このような性質は遺伝学的な解析や原因遺伝子の同定には大きな障害となるため、*myb3r1 myb3r4* 二重変異体よりもマイルドな異常を示す *myb3r4* 単独変異体を親株として用いることにした。*myb3r4* 変異体には、非常に弱いサイトキネシスの異常が現れることがわかっているが、この弱い異常を促進するエンハンサー変異体のスクリーニングを行った。合計 20,000 粒の *myb3r4* 変異体の種子に EMS による突然変異誘発処理を行った。M2 世代の種子を寒天培地上に播種し、子葉表皮におけるサイトキネシスの異常が強く現れる個体の選抜を行った。サイトキネシスの異常の程度は、特徴的な形態異常を示す気孔の頻度により定量化することができる。*myb3r4* 変異体の子葉では、異常となる気孔の頻度は全気孔の 1%未満であり、一見したところ野生型植物と区別がつかないが、この頻度が顕著に増加する変異株をエンハンサー変異体として選抜した。約 5,000 個体の子葉を透明化処理後、ノマルスキー顕微鏡で観察し、異常の強い個体を 176 株単離した。これら一次スクリーニングで選抜された個体から種子を採取し、M3 世代の植物体を用いて二次スクリーニングを行ったところ、176 株中 61 株に異常の促進が確認さ

れた。

このような異常の促進を示す変異体の原因遺伝子として、①MYB3R4 と冗長的に働く転写活性化因子、②MYB3R1 の働きを正に制御する因子、③MYB3R4 の下流でサイトキネシスを正に制御する因子、および④サイトキネシスに必要であるが MYB3R4 とは直接の関連がない因子などが想定される。G2/M 期転写に関わる新奇制御因子を同定するためには、①や②に相当する因子群に変異をもつ株を選抜する必要がある。このような変異株では、(a) G2/M 期遺伝子の発現の低下が起きていること、そして(b) サイトキネシスの異常の程度が *myb3r4* 変異に依存していることが考えられる。そこでまず、二次スクリーニングで得られた 61 株中から、G2/M 期遺伝子の転写産物が親株 (*myb3r4* 変異体) に比べて減少しているものを選抜するために、リアルタイム RT-PCR により、複数の G2/M 期遺伝子 (*KNOLLE*, *CYCB1;1*, *AtNACK1*, および *imk2*) の転写産物レベルを解析した。この結果、調べた 4 種の転写産物のうち全部あるいは一部のレベルが低下している 13 株を選抜した。さらに、これらの変異株のうちサイトキネシスの異常が *myb3r4* 変異に依存しているものを選抜した。変異株を野生型株と交配して、F2 世代の植物の遺伝子型を決定するとともに、子葉における形態異常を持つ気孔の頻度を解析した。このようにして、野生型 MYB3R4 遺伝子を受け継いだ F2 個体においてサイトキネシスの異常が回復するかどうかを調べたところ、現在までに少なくとも 3 株において、サイトキネシスに関する表現型が *myb3r4* 変異に依存していることが示された。

(2) *myb3r4* の異常を促進するランズバーグ型の遺伝的多型

コロンビア背景の *myb3r4* 遺伝子破壊株を遺伝学的に解析する過程で、野生型ランズバーグ株の背景に存在する遺伝的な多型により *myb3r4* 変異体に見られるサイトキネシスの異常が促進されることを偶然見いだした。遺伝学的解析の結果、*myb3r4* の異常を促進する多型は複数の遺伝子座に存在するが、それらのうち表現型に大きな影響を及ぼす主要な遺伝子座が一つ存在することが示唆された。そこで、マップベースクローニング法により原因遺伝子の特定を行った。異常の促進は、目的の遺伝子座がランズバーグ型のホモになったときに最も顕著に現れるが、ランズバーグ型とコロンビア型のヘテロ接合体にも、ある程度の異常の促進が見られた。これら二通りの遺伝子型を F2 植物の表現型だけを指標にして判定するのは困難であったため、F3 世代の植物における表現型を調べて、その分離のパターンから、F2 世代植物の遺伝子型を判定するという方法をとった。また、表現型

を観察するには、1 個体ごとに莢の表皮組織をノマルスキー顕微鏡で観察することが必要であり、このための手間と時間を節約するために FIRE 法によるマッピングを行った。FIRE 法では、原因遺伝子を挟む二つの DNA マーカーの間で組換えが起こっている個体を PCR による遺伝子型解析により選抜し、選抜された個体についてだけ表現型の解析を行う。このために、観察する植物個体数を大幅に減少させることができる。最終的に第 3 染色体上腕の約 19 kb に候補領域を絞り込んだ。この領域には 5 個の遺伝子が存在すると予想された。この領域に対応するコロンビア型ゲノムを含む BAC クローン (F2010 および F24F17) から、サブクローンを作製して、異常が促進された株にアグロバクテリアを介した方法により導入したところ、At3g06030 を含むサブクローンによってのみサイトキネシスの異常が回復した。また、At3g06030 に T-DNA 挿入を持つコロンビア背景の遺伝子破壊株を取得して解析を行ったところ、At3g06030 を単独で欠失した変異体はサイトキネシスの異常を示さないこと、*myb3r4* と組み合わせた二重変異体は顕著な異常の促進を示すことがわかった。これらの結果から、ランズバーグ型の At3g06030 では、何らかの原因によりコロンビア型に比べて機能が低下していること、そしてこの機能の低下が *myb3r4* 変異体の異常を促進することが示唆された。

(3) R1R2R3-Myb に構造が類似する R2R3-Myb 遺伝子の多重変異体

A-type Myb と冗長的な働きを持つ未知因子の候補として、R1R2R3-Myb に構造が類似する R2R3-Myb が考えられる。シロイヌナズナの Myb 遺伝子ファミリーの遺伝子系統樹上で、Myb ドメインの一次配列が R1R2R3-Myb に似通った R2R3-Myb のグループが二つ存在している。一つは 4 個の遺伝子 (MYB73, MYB70, MYB44, MYB77) から構成されており、もう一つのグループには 3 個の遺伝子 (MYB1, MYB109, MYB25) が存在する。これらのグループの R2R3-Myb 遺伝子の破壊株を解析し、G2/M 期遺伝子の発現に対する影響やサイトキネシスの異常について解析を行った。各グループのメンバーの間には機能的な冗長性が考えられるため、グループ内の複数あるいは全部の遺伝子に破壊をもつ多重破壊株を交配により作出した。作出したのは、*myb44 myb73 myb77* 三重変異体、*myb44 myb73 myb77 myb70* 四重変異体、および *myb1 myb109* 二重変異体の 3 株である。MYB25 の破壊株は既存の変異体としては見つけることができなかったため、*myb1 myb109 myb25* 三重変異体を作成することはできなかった。作出した 3 株にサイトキネシスの異常が見られるかどうかを、莢

や子葉の表皮を観察することによって調べたが、異常は全く確認されなかった。また芽生えにおける遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析したが、G2/M 期遺伝子の転写産物レベルには大きな影響を与えていないことがわかった。

4. 研究成果

(1) A-type Myb 変異体の異常を促進するエンハンサー変異体の単離および解析

myb3r4 変異体が示す弱いサイトキネシスの異常を促進するエンハンサー変異体を 61 株単離した。これらのうち、G2/M 期遺伝子の上流で機能すると考えられる因子に変異を持つものの候補は、現在までに 3 株得られている。今後、エンハンサー変異体の選抜を完了させて、有望な株から原因遺伝子の同定を行う予定である。

(2) *myb3r4* の異常を促進するランズバーグ型の遺伝的多型

myb3r4 変異体の異常を促進するランズバーグ型の遺伝的多型を、マップベースクローニング法により、At3g06030 の遺伝子座に同定した。この遺伝子は ANP3 と名付けられた既知の MAPKK キナーゼ (MAPKKK) をコードしており、構造のよく似た他の二つの因子

(ANP1, ANP3) と共に、サイトキネシスを正に制御することが示されている。ANP3 単独の遺伝子破壊株では異常を示さないが、ANP2 変異と組み合わせた二重変異体では、様々な組織で不完全なサイトキネシスが生じること、*anp1 anp2 anp3* 三重変異体は配偶体致死であることが報告されている。現在のところ、*anp3 myb3r4* 二重変異体で異常が促進されるメカニズムとして、以下の様な仮説を考えている。つまり、ANP3 の位置する MAPK カスケードを構成する因子群の中に MYB3R4 の標的遺伝子が存在しており、*myb3r4* 変異によりそのレベルが低下する。しかし、この発現レベルの低下だけではサイトキネシスの異常を引き起こすまでには至らないが、*anp3* 変異との組合せにより MAPK カスケードのシグナルの流れがさらに低下し、その結果不完全なサイトキネシスが生じる。この仮説を証明すれば、A-type Myb が MAPK カスケードの制御を通じてサイトキネシスを促進しているという結論を得ることができる。MAPK カスケードの構成因子のうち、MSA エレメントを持ち G2/M 期に特異的に発現する遺伝子にコードされるものが複数存在している。これらを *anp3 myb3r4* 二重変異体に発現させて、異常の促進が回復するかどうかを調べる予定である。

また、本研究の結果から、ANP3 のランズバ

ーグ型アシルでは、コロンビア型に比べて機能の低下が起きていることが予想された。ランズバーグ型アシルでは、コロンビア型と比べて 1 塩基の相違がみられ、これによりキナーゼドメインの C 末端側に位置するプロリン (コロンビア型) がセリン (ランズバーグ型) に置換する。このアミノ酸置換がキナーゼ活性に影響を与えている可能性が考えられる。ランズバーグ型とコロンビア型の ANP3 ゲノム断片を *anp3 myb3r4* 二重変異体に導入して、表現型を相補する能力がアシル間で異なるかどうかを検定する予定である。また、ANP3 リコンビナントタンパク質の *in vitro* でのキナーゼ活性を測定し、アシル間で活性の異なる産物をコードしているのかどうかを調べる予定である。

myb3r4 変異体の異常を促進する変異として、本研究では、*anp3* 変異を同定した。しかし、この因子は A-type Myb の下流に位置すると考えられるため、現在のところ当初目的とした新規 G2/M 期転写制御因子の同定には至っていない。突然変異誘発処理により得られた *myb3r4* のエンハンサー変異体の解析から、目的とする因子が同定されることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Kato K, Gális I, Suzuki S, Araki S, Demura T, Criqui MC, Potuschak T, Genschik P, Fukuda H, Matsuoka K, Ito M. (2009) Preferential up-regulation of G2/M phase-specific genes by overexpression of the hyperactive form of NtmybA2 lacking its negative regulation domain in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* 149:1945-1957. (査読有り)

Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., Suzuki, K., Müller, I., Voß, U., Jürgens, G., Ito, M. (2007) R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134: 1101-1110. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

加藤貴一, Ivan Galis, 鈴木しをり, 松岡健,

伊藤正樹 (2009年3月22日)
R1R2R3-Myb 転写活性化因子を過剰発現する
タバコ BY2 細胞のトランスクリプトーム解析
日本植物生理学会第 50 回大会 (名古屋)

小林耕介, 伊藤正樹 (2008年9月25日)
シロイヌナズナの発生過程における G2/M 期
遺伝子の転写制御
日本植物学会第 72 回大会 (高知)

齊藤隆, 藤河秀喜, 羽賀望, 伊藤正樹 (2008
年3月20日)
シロイヌナズナ MYB3R4 破壊株に見られるサ
イトキネシスの異常をエンハンスする変異
体の解析
日本植物生理学会第 49 回大会 (札幌)

山本裕二郎, 伊藤正樹 (2007年3月29日)
G2/M 期遺伝子群の発現を抑制するシロイヌ
ナズナ R1R2R3-Myb.
日本植物生理学会第 48 回大会 (愛媛)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 正樹 (ITO MASAKI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教
授
研究者番号 : 10242851