

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2009
課題番号：19770044
研究課題名（和文）エンドリデュプリケーションを制御する葉緑体に依存した情報伝達機構の解析
研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms of endoreduplication through chloroplast-dependent regulation.
研究代表者
吉積 毅 (Yoshizumi Takeshi)
独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム機能研究チーム・研究員
研究者番号：80342872

研究成果の概要（和文）：

本研究では、特殊な細胞周期であるエンドリデュプリケーションの葉緑体による制御機構を明らかにすることを目的として、葉緑体関連遺伝子が過剰発現した結果、核相が増大した変異株の詳細な解析を行った。しかし、これら遺伝子が機能欠損した場合に核相の減少が明確に現れていないため、エンドリデュプリケーションとの生理学的な関連は得られていない。なお、この解析において、機能欠損のための新規 RNAi 法の開発に成功しており、論文として報告した。

研究成果の概要（英文）：

We focused on the molecular mechanisms of endoreduplication controlled by chloroplast. Because two genes relating chloroplast were identified as the corresponding genes of dominant mutants, *ilp2-D* and *ilp5-D* that shows increased polyploidy. To examine physiological function of these genes, we analyzed loss of these genes mutants. However, these mutants did not showed significant phenotypes on polyploidy levels.

We newly developed a unique construction of RNAi for the knock-down of these genes, and published a paper describing several advantage points of this method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：発生・分化、エンドリデュプリケーション、葉緑体、情報伝達、細胞サイズ

1. 研究開始当初の背景

植物における細胞周期研究は、酵母や動物で得られた因子のホモログを単離し、解析を行う逆遺伝学的な手法が主流になっている。エンドリデュプリケーションについても同様の手法で解析が進められているのが現状である。例えば、動物で解析が進んでいる細胞周期関連遺伝子である *E2F* など S 期制御に関わる遺伝子の過剰発現株や破壊株において DNA 含量の変化が認められ、エンドリデュプリケーションに関連することが報告されている。しかし、エンドリデュプリケーションは酵母や動物ではあまり観察されないため、従来の方法では新規の制御機構を明らかにすることが困難であることが予想された。そこで、申請者らは新規制御因子を明らかにすることを目的として、遺伝学的手法を用いた解析を行った。手法として、DNA 含量が増加する変異株を、優性変異が期待される変異株集団であるアクチベーションタグラインからフローサイトメーターを用いて探索を行った。15 の変異株を既に単離している。そのうち *ilp2-D* および *ilp5-D* と名付けた優性変異株では DNA 含量が増大することから、原因遺伝子がエンドリデュプリケーションを正に制御することが予測されている。これに加えて、これら遺伝子が葉緑体に関する知見が得られている。*ilp2-D* の原因遺伝子産物である ILP2 は葉緑体に局在することが明らかになっている。*ILP2* 遺伝子破壊株では生育の弱い遅延が認められ、この表現型に伴い、光合成活性の減少も認められた。これら結果は、ILP2 が葉緑体（色素体）の構造もしくは機能に関与していることが考えられる。一方、*ILP5* 遺伝子のアンチセンス形質転換株では、DNA 含量の減少に伴う植物の矮小化と、本葉におけるアルビノおよび葉緑素が減少した黄緑色の表現型が認められる。そして、*ILP5* 過剰発現株を暗所に育てた植物を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、核コードの光合成関連遺伝子発現が上昇していた。このことは、ILP5 が葉緑体の機能を制御する因子であることが考えられる。以上の結果は、ILP2 および ILP5 が葉緑体に依存したエンドリデュプリケーションの制御機構に関与する因子であることを強く示唆している。

2. 研究の目的

これまでに報告されていない葉緑体によ

るエンドリデュプリケーションの制御機構を解明する。そこで変異株や形質転換体を用いて、ILP2 および ILP5 のエンドリデュプリケーション制御への機能、および葉緑体に関する機能（葉緑体数や構造への機能）を明らかにする。そして、これら因子が発現することにより、葉緑体もしくは核 DNA 含量のどちらを直接的に制御しているのかが明らかにする。

2. 研究の方法

核相が増大する機能獲得型変異株 *ilp2-D* および *ilp5-D* の詳細な解析を行った。生理学的な機能を明らかにするために、原因遺伝子の機能欠損変異株単離および解析を行った。これら原因遺伝子産物は既存の機能ドメインが保存されていないため、ドメインごとに発現させた組換え体を用いた生化学的な解析も行った。

3. 研究成果

ILP2 遺伝子の欠損変異株を単離したが、弱い生育遅延以外に、ほとんど表現型が見られなかった。シロイヌナズナのゲノムには *ILP2* の類似遺伝子 (*ILP2L*) がもう一つあり、冗長性があると考えた。*ILP2L* の欠損変異株も解析したが、やはり核相の減少が認められなかった。そこで、これら欠損変異をもつ二重変異株の作成を行った。ホモ接合体でも *ILP2* 単一欠損変異株と同様に弱い生育遅延が認められているが、核相については有意な減少は認められなかった。

ILP2 タンパク質は葉緑体局在タンパク質であることから、光合成に着目した欠損変異株の解析も同時に行った。光合成に関連するいくつかの表現型について調べたところ、*ILP2* 欠損変異株では、光化学系 I 循環的電子伝達に異常が認められた。*ILP2* タンパク質には膜貫通ドメインがあるため、様々な光合成関連タンパク質をチラコイド膜に繫留する役割があると考えている。そこで、ILP2 タンパク質の一部欠失したタンパク質を発現させた植物を用いた機能解析を計画し、7 種類の変異タンパク質を発現させた形質転換植物を用いて解析を行った。その結果、膜貫通ドメインを欠失したタンパク質を発現させた場合、ドミナントネガティブの効果が得られた。この結果は、ILP2 のチラコイド膜へのアンカーとしての機能を支持するものである。

ilp5-D では、暗所において光合成関連遺伝子の発現が活性化させることから、ILP5 タンパク質は転写制御に関わる因子だと考えた。レポーターを

用いた *in vivo* transcription assay を試みたが、転写を活性化能は認められなかった。また、ILP5 の生理学的な機能を明らかにする目的で、ILP5 遺伝子のアンチセンス植物を作成した。この植物体では、核相の減少はほとんど認められなかった。そのため、より強力な機能抑制が期待できる RNAi 法を用いた機能抑制株の作成を行った。しかし、作成した ILP5 機能欠損形質転換体でも、有意な核相の減少は認められなかったことから、ILP5 についてもエンドリデュプリケーション制御機構への関与を明らかにすることは出来なかった。

なお、本研究で行った ILP5 遺伝子の機能欠損は、新規に開発した RNAi 法を基に行った。本方法は、RNAi 用に改変した特別なベクターや、PCR などを介さずに RNAi に必要な inverted repeat を作成する方法で、従来の方法より簡便に作成が可能である。また、用いる標的遺伝子特異的配列も短いことから、従来の方法で危惧されていた OFF target 効果も除くことが出来る利点も考えられる。本方法を用いることで、既に作成されている様々なベクターに RNAi 法を利用することが出来る。そのため、現在用いられているような単純な過剰発現だけでなく、様々なプロモーターを利用した特定の環境や組織での発現も容易に可能になる。この方法は論文として報告しており、本研究の重要な成果であると考えている。

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 5 件・査読有)

1) Higuchi M, Yoshizumi T, Kuriyama T, Hara H, Akagi C, Shimada H, Matsui M, (2009) Simple construction of plant RNAi vectors using long oligonucleotides. *J. Plant Res.* 122:477-482.

2) Tojo T, Tsuda K, Yoshizumi T, Ikeda A, Yamaguchi J, Matsui M, Yamazaki KI. (2009) *Arabidopsis* MBF1s control leaf cell cycle and its expansion. *Plant Cell Physiol.* 50: 254-264.

3) Kaminuma E, Yoshizumi T, Wada T, Matsui

M, Toyoda T. (2008) Quantitative analysis of heterogeneous spatial distribution of *Arabidopsis* leaf trichomes using micro X-ray computed tomography. *Plant J.*, 56, 470-482.

4) Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, Ichikawa T, Yoshizumi T, Suzuki K, Ishikawa A, Koshi T, Matsui R, Muto S, Matsui M. (2008) RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a New Basic Helix-Loop-Helix Protein, Expresses in Endosperm to Control Embryo Growth. *Plant Physiol.*, 147, 1924-1935.

5) Takahashi N, Lammens T, Boudolf V, Maes S, Yoshizumi T, De Jaeger G, Witters E, Inzé D, De Veylder L. (2008) The DNA replication checkpoint aids survival of plants deficient in the novel replisome factor ETG1. *EMBO J.*, 27, 1840-1851.

[学会発表] (計 4 件)

1) SD5, a homologue of spliceosome subunit, is essential for proliferation in post-seedling development. Yoshizumi T, Hongo H, Kuromori T, Horii Y, Imura Y, Kamiya A, Shimada H, Matsui M. 20th International Conference on *Arabidopsis* Research, July 30 - June 4, 2009, United Kingdom.

2) スプライセオソームの構成因子と相同性を持つシロイヌナズナSD5 の欠損は、細胞増殖の抑制を引き起こす。吉積毅, 本郷洋明, 黒森崇, 井村優子, 神谷麻子, 島田浩章, 松井南. 第 50 回日本植物生理学会年会 2009 年 3 月 21-24 日 名古屋

3) SD5, a homologue of spliceosome subunit, is essential for proliferation in post-seedling development. Yoshizumi T, Hongo H, Kuromori T, Horii Y, Imura Y, Kamiya A, Shimada H, Matsui M. 19th International Conference on *Arabidopsis* Research, July 23-27, 2008. Canada

4) スプライセオソームの構成因子と相同性を持つシロイヌナズナSD5 の欠損は、細胞増殖の抑制を引き起こす。吉積毅, 本郷洋明, 黒森崇, 井村優子, 神谷麻子, 島田浩章, 松井南. 第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 9-12 日 神戸

〔図書〕（計 1 件・査読なし）

1) Yoshizumi T, Breuer C, Minami M, Sugimoto-Shirasu K (2007). Plant cell growth signalling and its link to ploidy. *The Plant Growth Regulators* (eds. Beemster G and Bogre L), Springer, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉積 毅 (Yoshizumi Takeshi)

独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム機能
研究チーム・研究員

研究者番号：80342872