

機関番号：23303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570042

研究課題名 (和文) スクロースによる増殖制御におけるシロイヌナズナ AtRBR1 遺伝子の機能解析

研究課題名 (英文) Functional Analysis of Arabidopsis AtRBR1 after sucrose starvation

研究代表者

関根 政実 (MASAMI SEKINE)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：70226653

研究成果の概要 (和文)：植物は動物のように動くことができないため、環境から様々なストレスを受けて生育している。スクロースは主要な光合成産物であり、植物の生育にとって非常に重要な炭素源でもある。したがって、スクロースの状況に応じて増殖を制御することは、植物の発生・成長に不可欠である。本研究では、スクロース飢餓状態での植物細胞の増殖に関して、シロイヌナズナの *AtRBR1* 遺伝子に着目して研究を行った。*AtRBR1* 遺伝子の機能欠損変異体では、雌性配偶体形成に異常が生じるため、RNAi を誘導発現する実験系を構築した。また、比較的均一な細胞集団が得られ、スクロースの濃度設定が容易に調整できるシロイヌナズナ培養細胞を用いることにした。解析の結果、*AtRBR1* 遺伝子はスクロース飢餓による G1 期の停止に必要で、RNAi の誘導発現により G1 期で停止する細胞の割合が大きく低下することが示された。また、スクロースを飢餓状態にして 1 日以内に *AtRBR1* タンパク質が、ユビキチン・プロテアソーム系により分解されることが明らかとなり、動物とは異なる制御系の存在が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Although sucrose availability is crucial for commitment to plant cell division during G1

phase by controlling the expression of D-type cyclins, it has remained unclear how these

factors mediate entry into the cell cycle. Here we show that *Arabidopsis*

RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 (AtRBR1) is involved in G1-phase cell cycle

arrest caused by sucrose starvation. We generated estrogen-inducible AtRBR1 RNA

interference (RNAi) *Arabidopsis* suspension MM2d cells, and found that downregulation of

AtRBR1 leads to a higher frequency of arrest in G2 phase, instead of G1-phase arrest in the

uninduced control, after sucrose starvation. Downregulation of AtRBR1 also stimulated the

activation of E2F-regulated genes when these genes were repressed in the uninduced cells

under the limited sucrose conditions. We conclude that AtRBR1 is a key effector for the

ability of sucrose to modulate progression from G1 phase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,700,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	5,170,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：5703

キーワード：細胞周期、シロイヌナズナ、栄養飢餓、RNAi

1. 研究開始当初の背景

2. 研究の目的

本研究では、RNAi を誘導発現するシロイヌナズナ培養細胞を用いて、スクロース欠乏による増殖停止における *AtRBR1* 遺伝子の役割を解明することを目的としている。そのため、1)G1/S 期移行に必要な E2F 転写因子との相互作用と *AtRBR1* のリン酸化制御との関連を生化学的に解析する、2)スクロース欠乏による増殖停止と細胞周期の関連をヒストグラムにより解析する、3)real-time PCR による E2F/DP の下流遺伝子の発現における *AtRBR1* の機能解析、などを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) E2F転写因子との相互作用の解析

動物では Rb と E2F の相互作用に関して多くの知見が蓄積しているが、植物ではそれらの類推で議論されており、植物で明確な実験的証拠を提示することは重要である。まず、*AtRBR1* と E2F の相互作用における *AtRBR1* のリン酸化の役割を解明するため、シロイヌナズナ培養細胞のタンパク抽出液に対してタグを付加した E2F により pull-down を行い、結合する *AtRBR1* がリン酸化されているか否かを検証する。このため、リン酸化された *AtRBR1* とリン酸化されていないものを区別できる電気泳動条件を検討して確立する。また、DNA 合成阻害剤を用いた同調化により細胞周期における *AtRBR1* のリン酸化状態を解析し、どの時期に E2F と相互作用するかなどの基礎的知見を得る。なおリン酸化 *AtRBR1* の検出が上手く行かない場合、部位特異的なリン酸化抗体を用いる。*AtRBR1* には 16 カ所のリン酸化部位が存在する。私たちは既にこれらの部位

のリン酸化ペプチドを用いたリン酸化特異抗体の作製に成功しており、共通して使用できるタバコ *NtRBR1* のリン酸化が細胞周期で変動することを報告している(Kawamura *et al.*, 2006, *Plant Biotech.*, **23**: 467-473)。

(2) スクロース欠乏処理による *AtRBR1* の機能解析

AtRBR1 の RNAi (RNA interference) を誘導発現するシロイヌナズナ培養細胞 MM2d 株を確立したことから、スクロース欠乏処理により以下の項目に関して誘導発現の有無で解析する。1) DNA ヒストグラム解析による細胞周期の継時変化、2) 細胞数の継時変化、3) *AtRBR1* 抗体を用いた Western 解析による *AtRBR1* タンパク質の蓄積量の継時変化、4) E2F により制御される遺伝子群の転写量の継時変化を real-time PCR によって解析する。シロイヌナズナ培養細胞を用いたスクロース欠乏処理による解析はサイクリン *CYCD3;1* で先行しており (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000, *Mol. Cell. Biol.*, **20**:4513-4521)、*CYCD3;1* 抗体による対照実験を含めて対比しながら実験を進行させる。

4. 研究成果

(1) *AtRBR1* タンパク質は G1/S 移行期で高リン酸化される

細胞周期における *AtRBR1* の発現状況を調べるため、分裂停止期の MM2d 細胞 (植え継ぎ後 7 日目) を新鮮な培地に植え継ぐことで、部分同調できる細胞周期リエントリーの系を用いて解析を行った。分裂停止期の細胞はほとんどが G1 期で細胞周期を停止しているため、この実験系では主に G1 期から S 期の発現を見ることが可能である。*AtRBR1* のリン酸化状態を解析するため、この実験系では

主に G1 期から S 期の発現を見ることが可能である。そこで、精製した抗 AtRBR1 抗体を用いて、AtRBR1 のタンパク質レベルの発現を解析した (Fig.1A)。同時にそれぞれの細胞から DNA 含量を測定し、細胞周期を算出した (Fig.1B)。さらに細胞周期の進行を詳しく調べるために、定量的リアルタイム RT-PCR を用いて S 期マーカーである *HistoneH4* の発現も解析した (Fig.1C)。まず、細胞周期の進行を見てみると、*HistoneH4* の発現が植え継ぎ後 6 時間目から上昇し、8 時間目でピークを迎えている (Fig.1C)。また Fig.1B の DNA 含量の結果も 8 時間目から S 期の細胞が増えてきているので、6 時間目から 8 時間目が G1/S 移行期 (G1 期から S 期への移行期) だと考えられる。植え継ぎ後 0 時間目から 6 時間目まではシングルバンドで AtRBR1 が検出されたが、S 期の細胞が増加する 8 時間目からは高分子量側にシフトバンドが検出された (Fig.1A)。

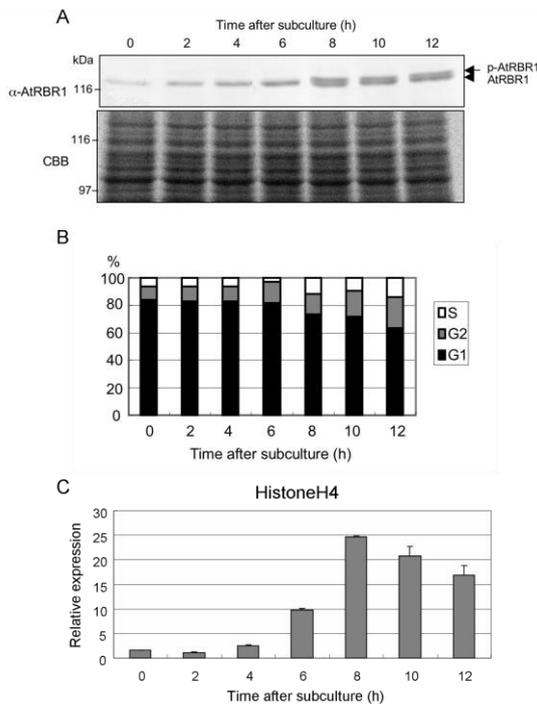


Fig.1 細胞周期リエントリーにおける AtRBR1 タンパク質の発現

(A) AtRBR1 抗体を用いてウェスタン解析。矢印がリン酸化されている AtRBR1、矢頭がリン酸化されていない AtRBR1 を示している。(B) フローサイトメーターを用いての細胞周期解析 (白色バー: S 期、灰色バー: G2 期、黒色バー: G1 期)。(C) S 期マーカー遺伝子の定量的リアルタイム RT-PCR 解析。ACT8 の発現でサンプル間を標準化してときの相対値で示している。エラーバーは SD (n=3) を示している。

(2) 誘導系 RNAi によって AtRBR1 を抑制した細胞のサイズが小さくなる

AtRBR1 の転写をその RNAi を誘導して抑制するために、アグロバクテリウム法で MM2d 細胞に導入したところ、AtRBR1 を検出限界以下まで抑制でき、かつ細胞サイズや定常期の新鮮重量が同様に变化する 4 つの系統が得られた。これ以降はその代表として 1 系統 (これ以降 RNAi 細胞と表記) の結果を示した。最初に、定常期の RNAi 細胞をエストロゲン含む培地と溶媒コントロールとして DMSO を含む培地に植え継いで、各々 1 日おきにサンプルを回収して細胞数と重量の解析を行った。その結果、7 日間の培養期間で DMSO コントロールと比較して細胞数は変化しないが、重量がコントロールよりも減少することが分かった。次に、この重量の変化が細胞サイズの違いによるかどうかを確認するために、細胞サイズの比較を行った。MM2d 細胞は互いに凝集しやすいため、細胞をプロトプラスト化してから細胞サイズを測定した。その結果、誘導をかけた細胞で細胞サイズが 2 日目から持続的に減少することが分かり (Fig.2A)、細胞サイズの差が顕著な 7 日目のプロトプラスト化していない細胞を、蛍光色素で染色した蛍光顕微鏡像を示した (Fig.2B)。さらに、植え継ぎ後から 7 日目までのサンプルの DNA 含量を測定し、細胞周期を算出したところ大きな違いが見られた (Fig.2C)。通常、細胞が定常期を迎えるとコントロールのように 80% 以上の細胞が G1 期で細胞周期を停止させ、G2 期は 20% 程度の割合となる。

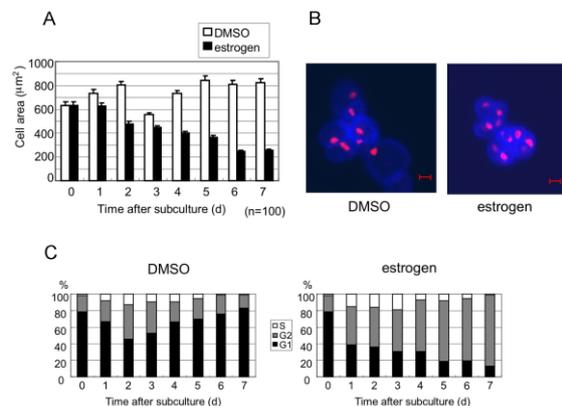


Fig.2 AtRBR1 を抑制した時の細胞面積および細胞周期の解析

植え継ぎ時にエストロゲンで誘導をかけたもの (estrogen) と溶媒コントロールである DMSO を加えたもの (DMSO) を 1 日毎に 7 日目までサンプリングした。(A) 細胞をプロトプラスト化し、凝集した細胞をばらしてから細胞面積を測定した。エラーバーは SE (n=100) を示している。白色バーが

DMSO サンプルで黒色バーが estrogen サンプルを示している。(B)培養7日目のDMSO、estrogen 細胞を propidium iodide (PI) と Calcofluor で染色した。赤色が PI で核を染色しており、青色が Calcofluor で細胞壁を染色している。(C) それぞれの細胞からフローサイトメーターを用いて細胞周期解析した (白色バー : S 期、灰色バー : G2 期、黒色バー : G1 期)。

(3) AtRBR1 を抑制することによりシヨ糖飢餓で G2 期停止する細胞割合が増加する

培養2日目の誘導をかけた細胞とコントロール細胞を、それぞれ0%、0.3%、3%シヨ糖を含む新鮮な培地で洗浄後に各培地に移し換え、12時間ごとにサンプリングして細胞周期 (Fig.3A) と細胞数 (Fig.3B) を調べた。誘導2日目で AtRBR1 が検出限界以下のレベルになるために2日目の細胞を用いたが、Fig.2Cの結果から分かるように、植え継ぎ後2日目でコントロールと誘導をかけた細胞で細胞周期の分布に違いが見られ、この実験でも培地交換後0時間目で両者は同じ割合ではない。したがって、この実験では最終的な細胞周期の割合ではなく細胞周期の変化率に着目した。細胞数の計測データから、3%シヨ糖存在下では細胞分裂が続いており、36時間後でも細胞が増殖し続けた。0.3%シヨ糖存在下では24時間後までは増殖を続けるが、それ以降はほぼ分裂が停止した。一方、0%シヨ糖の場合は培地交換後から全く細胞数の増加が見られず、細胞分裂が停止していることが分かった。このときの細胞周期の変動を見てみると、増殖が活発な3%シヨ糖存在下では誘導をかけた細胞、コントロール細胞ともにほとんど細胞周期の割合に変化はなかった。0.3%シヨ糖存在下において、コントロール細胞では36時間後にG1期の細胞が比較的蓄積しており、逆に誘導をかけた細胞ではG1期細胞の割合が減少しG2期細胞の割合が多くなっていった。さらに0%シヨ糖において、コントロール細胞ではS期細胞がほとんど見られなくなり、12時間以降ほとんど細胞周期の割合が変動せず、G1、G2期でともに細胞周期が停止していることが分かった。これに対して誘導をかけた細胞では、培地交換後12時間でG1期の細胞が顕著に減少しG2期の細胞が蓄積していた。これらの結果から、シヨ糖飢餓において、AtRBR1を抑制した細胞ではG1期の制御点が機能せずにS期に移行し、G2期まで細胞周期が進行することが示唆された。

(4) AtRBR1 の抑制によりシヨ糖飢餓においても E2F 制御遺伝子が転写活性化される
シロイヌナズナ培養細胞を用いたシヨ糖飢

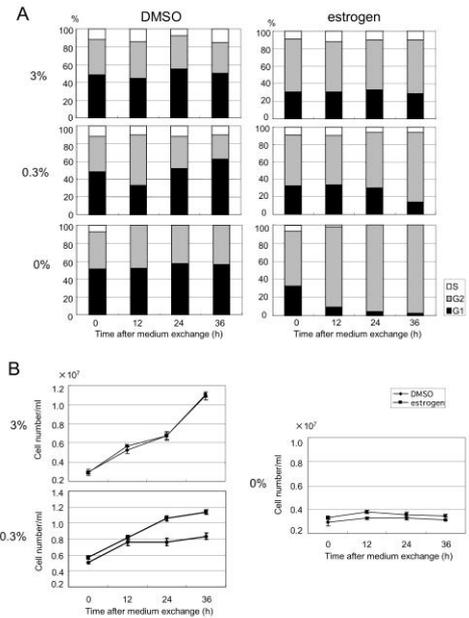


Fig.3 シヨ糖飢餓における AtRBR1 を抑制した細胞の細胞周期の変動

植え継ぎ時からエストロゲンで誘導処理を行い、AtRBR1 がほぼ検出できなくなる2日目まで培養し、その細胞をそれぞれ3%、0.3%、0%のシヨ糖を含む培地に交換した (図の左側にシヨ糖濃度を示した)。その後12時間毎に36時間までサンプリングを行った。

(A) フローサイトメーターによる細胞周期解析 (白色 : S 期、灰色 : G2 期、黒色 : G1 期)。 (B) 細胞数の経時変化。エラーバーは SD (n=3) を示している。

飢におけるトランスクリプトーム解析によって、DNA複製に関わる遺伝子群が転写抑制されることが報告されている。AtRBR1を抑制したときにシヨ糖飢餓においてもG1期からG2期への細胞周期の進行が観察されたので、シヨ糖飢餓におけるE2F制御遺伝子群の発現を解析することにした。発現解析には定量的リアルタイムRT-PCRを用い、構成的に発現しているACT8を用いてテンプレート間の補正を行った。その結果、3%シヨ糖存在下で誘導をかけた細胞と非誘導細胞の発現を比較すると、誘導をかけた細胞ではコントロール細胞よりもこれら遺伝子群の発現が全体的に上昇しており、特にRNRでは高い発現上昇が確認されE2F制御遺伝子が転写活性化していることが分かった (Fig.4)。次に、0.3%シヨ糖存在下で発現を比較したところ、コントロール細胞ではPCNA1やORC6、RNRは培地交換後36時間後には発現が減少するのに対して、誘導をかけた細胞では36時間後に若干の減少は見られるものの、ほとんど発現が減少せずに高い発現レベルを維持してい

ることが分った。また、*CDC6* や *MCM2*、*MCM3* もコントロール細胞において 36 時間後にやや発現が減少したが、誘導した細胞ではコントロールよりも高い発現レベルを維持していた。最後に、0%シヨ糖では培地交換後 12 時間でこれら遺伝子群の発現が急激に減少したが、誘導をかけた細胞では高い発現レベルを維持していた。しかし、*PCNA1* や *ORC6*、*RNR* では誘導をかけた細胞においても発現が段階的に減少して行くことが分った。一方、比較対照として用いた *ACT2* はシヨ糖濃度に関わらず、誘導をかけた細胞とコントロール細胞で特に大きな発現の変動は見られなかった。

これらの結果から、シヨ糖飢餓において *AtRBR1* を抑制しても DNA 複製に関わる遺伝子群の転写を抑制することができないために、G1 期から S 期へと細胞周期が進行する可能性が考えられた。

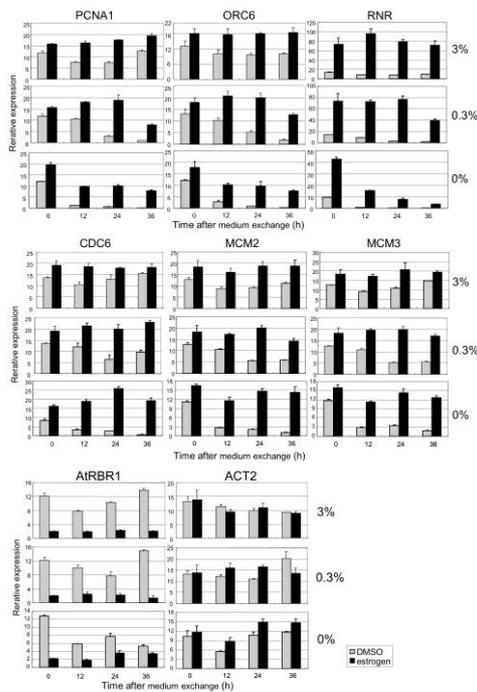


Fig.4 シヨ糖飢餓における *AtRBR1* を抑制した細胞の E2F 制御遺伝子の発現解析

細胞から全 RNA を抽出し、定量的リアルタイム RT-PCR を行い、E2F 制御遺伝子の発現を解析した (灰色 : DMSO コントロールの発現、黒色 : エストロゲンによって誘導をかけた細胞の発現)。ACT8 の発現でサンプル間を標準化したときの相対値で示し、エラーバーは SD (n=3) を示している。

(5) シヨ糖飢餓において *AtRBR1* はプロテアソーム系で分解される

これまでの結果から、シヨ糖欠乏状態において *AtRBR1* が DNA 複製に関わる遺伝子群

の転写抑制に寄与することが示唆されたが、実際にどのような機構で転写抑制を行っているのかが分かっていない。そこで、まずシヨ糖欠乏状態において *AtRBR1* タンパク質がどの程度存在しているのかを解析することにした。

そこで RNAi 細胞からタンパク質を抽出し、*AtRBR1* の発現を調べた (Fig.5)。誘導をかけた細胞では *AtRBR1* は検出されなかったが、コントロール細胞において 3%シヨ糖存在下では *AtRBR1* は 36 時間後まで同程度に存在していた。一方、0.3%シヨ糖存在下では培地交換して 24、36 時間後に *AtRBR1* の減少が見られた。さらに、0%シヨ糖では培地交換後 12 時間で *AtRBR1* が検出できなくなった。ローディングコントロールとして示した CBB 染色では主要なバンドは変化がないため、*AtRBR1* が特異的に減少していると考えられる。シヨ糖飢餓においても *AtRBR1* 遺伝子の発現は特に大きな減少は見られないため (Fig.4)、おそらく翻訳後制御を受けているものと考えられる。

ここで、細胞周期に関わる因子の多くがプロテアソーム系による分解を受けることが知られており、*AtRBR1* もプロテアソーム系によって分解されるかを解析した。植え継ぎ後 3 日目の通常の MM2d 細胞をシヨ糖飢餓培地に交換し、その後プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えたもの、コントロールとして DMSO を加えたものを用意した。その後、4 時間ごとに 24 時間までサンプリングして *AtRBR1* タンパク質の蓄積量を比較した (Fig.15)。その結果、Fig.14 の結果と同様に 3%シヨ糖存在下では *AtRBR1* は 24 時間後まで同程度蓄積したが、0%シヨ糖では 12 時間後にはかなり蓄積量が減少して、16 時間以降ほとんど検出されなかった。一方で、プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えたものでは培地交換後 20 時間でも *AtRBR1* が検出され、明らかにプロテアソームによる分解が遅延していることが分かった。コントロールとして用いた DMSO では *AtRBR1* の蓄積量の変動に影響はほとんどなかった。

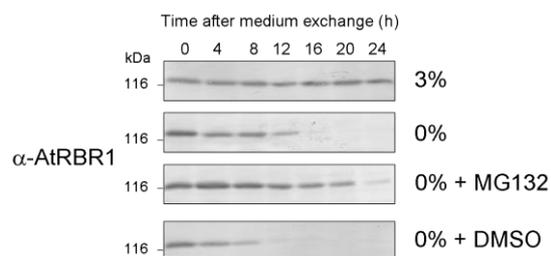


Fig.5 シヨ糖飢餓におけるプロテアソーム阻害剤 MG132 を加えたときの *AtRBR1* タンパク質の蓄積量の経時変化

植え継ぎ後 3 日目の細胞を 3%、0% のシヨ

糖を含む培地、0%のショ糖培地にプロテアソーム阻害剤である MG132 を終濃度 100 μ M となるように加えた培地、溶媒コントロールとして 0%ショ糖培地に DMSO を加えた培地にそれぞれ置換し、4 時間毎に 24 時間までサンプリングを行った。その後、抗 AtRBR1 抗体を用いてウエスタン解析を行った。

以上の結果から、AtRBR1 はショ糖飢餓においてプロテアソーム系によって分解を受けることが強く示唆された。

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 3 件)

1. Hirano, H., Shinmyo, A., Sekine, M. 2011. Key *Arabidopsis* cell cycle proteins undergo proteasome-mediated degradation during sucrose starvation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49: 687-691.

2. Ohno, R., Kadota, Y., Fujii, S., Sekine, M., Umeda, M., Kuchitsu, K. 2011. Cryptogein-induced cell cycle arrest at G2 phase is associated with inhibition of cyclin-dependent kinases, suppression of expression of cell cycle-related genes and protein degradation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant & Cell Physiology*. 52: 922-932.

3. Hirano, H., Shinmyo, A., Sekine, M. Both negative and positive G1 cell cycle regulators undergo proteasome-mediated degradation during sucrose starvation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, in press.

[学会発表] (計 1 件)

Hirano, H., Shinmyo, A., Sekine, M. *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN1 is involved in G1-phase arrest in sucrose starvation. 21st International Conference on Arabidopsis Research. June 6-10, 2010. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

[図書] (計 1 件)

Harashima, H., Sekine, M., Plant cyclin-dependent kinase activity using immunoprecipitation coupled kinase assay and baculovirus expression system. *Methods in Molecular Biology*. Plant

Kinases: Methods and Protocols. Edited by N. Dissmeyer and A. Schnittger, Humana Press Inc., Totowa, NJ. in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

http://www.ishikawa-pu.ac.jp/guidance/teacher/bioproduciton/b_sekine.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 政実 (MASAMI SEKINE)

研究者番号 : 70226653

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :