

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23870012

研究課題名（和文）

根の成長における活性酸素種による情報統御

研究課題名（英文）

Transcriptional network for regulating the root growth via the ROS

研究代表者

塚越 啓央 (HIRONAKA TSUKAGOSHI)

名古屋大学・高等研究院（農）・特任講師

研究者番号：30594056

研究成果の概要（和文）：

根の成長における活性酸素(ROS)による情報統御を目指し、根端での細胞周期遺伝子群への発現影響を分子遺伝学的な解析を進めた。

ROSの一種である過酸化水素によってシロイヌナズナの根の成長は顕著に阻害を受ける。そこで過酸化水素が細胞周期のS期もしくはM期どちらの遺伝子発現制御に大きく影響を与えるかを解析した。過酸化水素処理により根端メリステムサイズが小さくなることからM期進行が抑制されていると推測された。実際にM期マーカーであるCyclinB1;1マーカーラインの発現は過酸化水素処理によって顕著に抑制されていた。さらにDAPIにより核を染色し、M期中期、後期の根端における細胞数を数えたところ、過酸化水素処理ではM期中期、後期の細胞数も減少していた。また、S期進行の指標となるDNAの複製イベントを可視化する為にBrdUによる染色実験を行ったところ、過酸化水素処理によりBrdU染色レベルも減少していることが分かった。以上の結果から、過酸化水素は根端においてS期、M期両イベントの進行を抑制していることが強く示唆された。

これらの結果を受け、S期、M期チェックポイントに重要な機能を持つ遺伝子群の発現をq-PCR法により定量した。その結果、染色実験と同様に過酸化水素はそれら遺伝子発現を抑制していることがわかった。特にS期進行に重要な役割を果たす転写因子E2Faの発現は顕著に抑制されていた。細胞内のROSレベルを変化させる為にペルオキシダーゼ過剰発現株とカタラーゼ遺伝子破壊株を用いた同様の実験を行ったところ、E2Faの発現はペルオキシダーゼ過剰発現株では野生型株より高かった。以上のことから細胞内ROSレベルは細胞周期関連遺伝子群の発現に影響を与えることにより根端メリステムサイズを調節していることを明らかにし、論文として発表した(Tsukagoshi, Plant Sci. 2012)。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the mechanism of how ROS regulates the plant root growth, I analyzed that the effect of ROS to the cell cycle progression by using the molecular biology technique.

The present study investigated the effect of hydrogen peroxide (H_2O_2), a ROS compound, on cell cycle-related gene expression. Gene expression analyses coupled with microdissected sections of the developmental zone of Arabidopsis root tips revealed that H_2O_2 affects the expression of cell cycle-related genes. Additionally, ROS scavenging enzymes were found to play an important role in the root growth phenotype induced by H_2O_2 . Specifically, root growth inhibition by H_2O_2 was diminished in transgenic Arabidopsis overexpressing peroxidase but increased in a *catalase2* (*cat2*) mutant. Overall, these

results confirm that ROS function not only as stress-related compounds but that they also function as signaling molecules to regulate the progression of the cell cycle in root tips.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子・生理学

キーワード：根端メリステム、活性酸素種、転写因子、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

エネルギー問題や食料危機が世界で叫ばれる中、遺伝子組換えを含めた品種改良を加速し石化燃料代替エネルギー資源として、或は食料安定供給の為に植物の開発、改良が重要な課題となっている。植物の根と地上部の先端に存在するメリステム細胞は細胞の伸長に先立ち急速に分裂を繰り返し、個々の細胞が周囲の細胞とコミュニケーションをとりつつ高度に制御された形態形成を行う。このような細胞形態の変化に関する詳細な分子メカニズムは非常に複雑で様々な制御機構の存在が知られているが、近年の分子生物学の発達によりその複雑な制御ネットワークの研究が多数なされている。前述した複雑系を解析するにあたり、遺伝子発現ネットワークを上位で制御する転写制御因子の機能解析は有効なアプローチだと考えられる。転写ネットワークの研究により分裂活性を抑制し細胞を伸長させるような急激な機能転換機構や、植物細胞の形作り機構を分子レベルで明らかにすることができ、植物バイオマスの効率的な増加に貢献する植物の育成に繋がると考えられる。シロイヌナズナの根端は長軸方向にメリステム領域、細胞伸長領域の2領域に大別される。メリステム領域は分裂活性の高い細胞を供給し、伸長領域では分裂活性は低下する。通常

メリステム領域の細胞数とサイズはほぼ一定に保たれ、細胞伸長領域の細胞は急激に長軸方向へ肥大化する為に根が伸長する。この過程を制御するには上記領域の境界情報が重要な役割を果たしていると考えられる。即ち、分裂細胞から伸長細胞への細胞アイデンティティの変化を司る厳密な制御機構が存在する。この境界情報を制御し細胞を急激に伸長させる転写ネットワークを解析することは植物サイズ決定機構を理解するのに重要であり、この転換機構の分子メカニズムを解明することを本課題の大きな目的とした。

これまでにシロイヌナズナ根端における急激な細胞機能転換を制御する因子のスクリーニングを行い、UP BEAT1 (UPB1) と命名した根の伸長を主に制御する新奇転写因子を単離してその詳細な分子機能を解析した。upb1変異株やUPB1過剰発現株を用いたマイクロアレイ解析に加え、クロマチン免疫沈降法とゲノムアレイを組み合わせたChIP-chip解析を行いゲノムワイドにUPB1が直接制御する下流の因子を探索した。その結果UPB1はいくつかのペルオキシダーゼ遺伝子の転写を直接制御することでROSシグナルを調節していることが明らかになった。根端におけるROSの染色実験から超酸化物はメリステム領域に、過酸化水素

は伸長領域に蓄積しupb1変異株ではこのバランスが乱れており、少なくとも2種のROSの根端における空間的分布が細胞の分裂から伸長への転換、ひいてはメリステムサイズの決定に重要な役割を果たしていると結論した (Tsukagohsi et al., *Cell*, 2010)。そこで、本課題ではUPB1の機能解析から得られた知見から先に進み、ROSを介して行われる植物根端での急激な細胞機能転換の分子メカニズムを以下の点に重点を置き研究を展開する予定である。

2. 研究の目的

植物の成長はメリステム領域と呼ばれる根と地上部の先端に存在する分化能を有した未分化な細胞群から分裂、分化を規則正しく行うことで個体全体の成長を促す。細胞分裂と分化のバランスを適切に保つ為に、植物は様々なシグナルを介した複雑な転写ネットワークを構築している。

その中でも申請者が現在までに発見した活性酸素種 (ROS) を主たるシグナルとして、上記細胞機能転換を制御している転写ネットワークは未だ未解明な点が多い。本申請ではROSを介した植物の根の大きさを決定する転写ネットワーク機構の解明を第一の目的とすることで、植物器官の形作りの制御機構を分子レベルで明らかにし、ひいては植物バイオマス向上に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

【研究1年目】

ペルオキシダーゼ遺伝子発現制御因子の解析

候補Alba遺伝子の発現様式の解析、Alba遺伝子破壊株ならびに過剰発現株の作成、細胞周期関連遺伝子のレポーターラインに与えるROSの影響の検討を中心に行う。具体的にはAlba遺伝子上流3kbをプロモーター領域としてクローニングをおこない、この領域と緑色

蛍光タンパク質 (GFP) との融合遺伝子をシロイヌナズナ野生型株Col-0に形質転換を行う。シロイヌナズナデータベース (TAIR ; <http://www.arabidopsis.org>) 上では当該遺伝子とその上流の遺伝子間の距離は330bpほどしか無いので、Alba遺伝子上流の330bpを第2のプロモーター領域としてクローニングし、この領域とGFPの融合遺伝子も形質転換に用いる。これと合わせて、Albaタンパク質のコーディング領域もクローニングを行い、前述のプロモーター領域と融合させ、プロモータータンパク質 : GFP融合遺伝子を持つ形質転換体も作出する。これらの形質転換体のGFPの蛍光を共焦点顕微鏡により観察することでAlba遺伝子の根端における発現部位の特定、さらにはAlbaタンパク質の細胞内局在を決定する。Albaレポーターラインの作成とともに、Alba遺伝子破壊株の獲得、ならびにAlba過剰発現株の作成を行う。遺伝子破壊株はSALK instituteやNASCより入手する。もし、Alba遺伝子破壊株の遺伝子発現が野生型と比較し変化が見られないならば、artificial smallRNAを野生型株で発現させ人為的にAlba遺伝子の発現を抑制する形質転換体を作成する。過剰発現株は35SもしくはUBQ10プロモーターといった植物において恒常的に強い発現を示すプロモーターとAlba遺伝子のタンパク質コード領域を融合させ、これを発現する形質転換体を作成する。それらの形質転換体を用いてPer57遺伝子発現に与える影響や根の伸長、メリステムサイズ等の表現型の解析を詳細に行う。

ROSによる細胞周期制御

細胞周期マーカーラインを用いて、マーカー遺伝子の発現変化を指標にROSシグナルと細胞周期制御の関わりを遺伝子発現レベルで明らかにする。具体的にはG2/M期のマーカー遺伝子であるCyclinB1;1遺伝子とGFPとの融合

タンパク質を発現するマーカーラインを、過酸化水素で処理し、GFPの蛍光を観察する。CyclinB1;1遺伝子は細胞周期の研究においてG2期からM期へ移行する細胞のマーカーとして広く使用されており、その発現の変化により、細胞のG2/M期への移行を可視化することが出来る(Gutierrez, The Arabidopsis Book, 2009)。現在までに申請者は過酸化水素がシロイヌナズナの根端のメリステムサイズを小さくすることを見いだしており(Tsukagoshi et al., Cell, 2010)、CyclinB1;1-GFPの発現もこれにともない減少されることが期待される。CyclinB1;1の発現のみならず他の細胞周期マーカーラインが入手可能ならば同様の実験を行う。

CyclinB1;1-GFP以外のマーカーラインを入手できない可能性もあるので、その場合にはROS修飾薬剤で処理したシロイヌナズナからRNAを抽出しリアルタイムPCRにより、S期やM期チェックポイントに重要ないくつかの細胞周期関連遺伝子の発現変化を調べる。また、前項で述べたようにシロイヌナズナ根端ではメリステム領域と細胞伸長領域に分類され、それぞれの細胞機能は厳密に異なる。そこで根端のメリステム領域と伸長領域にわけて、それぞれについてRNAを抽出して細胞周期関連遺伝子の発現変化を調べる。人為的にROSの量を変化させる為にROS解毒酵素を部位特異的に発現するプロモーターにより根端で強く発現させるectopic expressorを作成する。具体的には強力に超酸化物を分解するスーパーオキシドジスムターズ(SOD)タンパク質(Kliebenstein et al., Plant Physiol., 1998)をシロイヌナズナメリステム領域でのみ強く発現するRCH1プロモーター(Casamitjana-Martinez et al., Curr. Biol., 2003)との融合遺伝子を持つ形質転換体を作成する。

【研究2年目】

ペルオキシダーゼ遺伝子発現制御因子の解析

1年目に作製したAlba-GFP融合タンパク質を発現する形質転換体を用いて、クロマチン免疫沈降法(Chromatin Immunoprecipitation; ChIP)を行いAlbaタンパク質がPer57遺伝子プロモーターに結合するかを検討する。この解析によりAlbaのPer57遺伝子発現の直接の関与を知ることが出来る。Alba遺伝子破壊株や過剰発現株をROS検出指示薬で染色することにより、Alba遺伝子によるペルオキシダーゼを介したROSの空間的分布への関与を検討する。

ROSによる細胞周期制御

一年目において大まかな細胞周期へのROSの関与がつかめると期待されるので、本年度はROS関連酵素遺伝子の破壊株を用いて研究を展開する。ROSの生成酵素で、かつ植物成長に影響を与えることが知られているrbohC変異株(Foreman, et al., Nature, 2003)や根端で強く発現しているカタラーゼの遺伝子破壊株を入手し、RNAを抽出しリアルタイムPCRにより各細胞周期遺伝子への発現への影響を調べる。同時に、1年目で作成したSOD ectopic expressorを用い同様の実験を行い、ROSの空間的分布の変化が細胞周期の適切な進行に与える影響を検討する。もしこれらの遺伝子破壊株やectopic expressorにおいて細胞周期の進行に異常が見られるのであれば、ROSシグナルと細胞周期の遺伝子発現の相関がより明確に示される物であると考えられる。

4. 研究成果

ROSの一種である過酸化水素によってシロイヌナズナの根の成長は顕著に阻害を受ける。そこで過酸化水素が細胞周期のS期もしくはM期どちらの遺伝子発現制御に大きく影響を与えるかを解析した。過酸化水素処理により根

端メリステムサイズが小さくなることからM期進行が抑制されていると推測された。実際にM期マーカーであるCyclinB1;1マーカーラインの発現は過酸化水素処理によって顕著に抑制されていた。さらにDAPIにより核を染色し、M期中期、後期の根端における細胞数を数えたところ、過酸化水素処理ではM期中期、後期の細胞数も減少していた。また、S期進行の指標となるDNAの複製イベントを可視化する為BrdUによる染色実験を行ったところ、過酸化水素処理によりBrdU染色レベルも減少していることが分かった。以上の結果から、過酸化水素は根端においてS期、M期両イベントの進行を抑制していることが強く示唆された。

これらの結果を受け、S期、M期チェックポイントに重要な機能を持つ遺伝子群の発現をq-PCR法により定量した。その結果、染色実験と同様に過酸化水素はそれら遺伝子発現を抑制していることがわかった。特にS期進行に重要な役割を果たす転写因子E2Faの発現は顕著に抑制されていた。細胞内のROSレベルを変化させる為にペルオキシダーゼ過剰発現株とカタラーゼ遺伝子破壊株を用い同様の実験を行ったところ、E2Faの発現はペルオキシダーゼ過剰発現株では野生型株より高かった。カタラーゼ遺伝子破壊株は過酸化水素に対し高感受性を示し、過酸化水素存在化ではその根の伸長はほぼ完全に停止した。タイムラプスイメージングを用いた根の伸長を観察すると、カタラーゼ遺伝子破壊株は過酸化水素処理3時間ほどで根の伸長が停止することも分かった。以上のことから細胞内ROSレベルは細胞周期関連遺伝子群の発現に影響を与えることにより根端メリステムサイズを調節していることを明らかにし、また、植物が保持している活性酸素種代謝酵素は酸化ストレスの際に正常な生育を担う為に重要であることを見いだ

し論文として発表した(Tsukagoshi, *Plant Sci.* 2012)。

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. **Tsukagoshi H.** (2012) Defective root growth triggered by oxidative stress is controlled through the expression of cell cycle-related genes, *Plant Sci.* 査読有 **197**: 30-39.
2. **塚越啓央.** (2012) 植物の根のサイズ決定に関わる分子メカニズム. *化学と生物* 査読無 **50**: 255-261.
3. Iyer-Pascuzzi AS, Jackson T, Cui H, Petricka JJ, Busch W, **Tsukagoshi H.** Benfey PN. (2011) Cell identity regulators link development and stress responses in the Arabidopsis root. *Dev. Cell* 査読有 **21**: 770-782.

[学会発表] (計6件)

1. **Tsukagoshi H.** Defective root growth caused by oxidative stress is regulated through the expression of cell cycle-related genes. 第54回日本植物生理学会、岡山2013.3
2. **Tsukagoshi H.**, Busch W, Benfey P.N. Analysis of the ROS signaling that affects the root growth. *The 23th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR)*, Vienna, Austria, 2012.6
3. **Tsukagoshi H.**, Busch W, Benfey P.N. UPB1 controls transition from proliferation to differentiation in the root via ROS. 第53回日本植物生理学会年会、京都、2012.3
4. **Tsukagoshi H.** UPB1, which controls transition from proliferation to differentiation in the root tip, *International Symposium, Strategies of Plants against Global Environmental Change*, 倉敷、2011.12 (招待講演)

5. **Tsukagoshi H**, Busch W, Benfey P.N. 植物根端における細胞分裂から分化への移行を制御する新奇転写因子UP BEAT1.

日本植物学会第75回大会 シンポジウム「根の発生の分子機構」、東京、2011.9 (招待講演)

6. **Tsukagoshi H**, Busch W, Benfey P.N.

UPB1,植物根端の細胞分裂から細胞分化への移行を調節する転写因子UP BEAT1の解析. 岡田学術創成研究費 阿蘇フロンティアサミットシンポジウム、植物の形作りの明日を語る、阿蘇、2011.8 (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[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://hiroarabidoros.the-ninja.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚越 啓央 (HIRONAKA TSUKAGOSHI)
名古屋大学・高等研究院 (農)・特任講師
研究者番号：30594056

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：