

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291064

研究課題名(和文)植物の形態形成を司る転写制御ネットワークの解明

研究課題名(英文)Gene regulatory network underlying plant organ growth

研究代表者

杉本 慶子(Sugimoto, Keiko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：30455349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物の器官が継続的に成長し形態形成を進めるためには、細胞の増殖と分化、成熟のバランスが協調的に制御される必要がある。細胞増殖期から分化、成熟期への移行には転写制御因子による大規模な遺伝子発現変動が関与する可能性が示唆されているがその制御機構の解明は遅れている。我々はシロイヌナズナの新規変異体スクリーニングからこれらの移行過程を制御する転写因子候補を多数同定しており、本研究では植物の細胞増殖と分化、成熟のバランスを調節する新規転写制御ネットワークを解明することを目的とした。特にDOF転写因子をコードするOBP4の下流標的遺伝子を同定しOBP4が根毛の細胞伸長を負に制御するしくみを解明した。

研究成果の概要(英文)：Plant organ growth is mediated by a balanced progression of cell division and differentiation. Plant cells undergo massive transcriptional changes when they transit from proliferative to differentiation phases but how these modifications in gene expression are regulated is not well understood. From a new genetic screen we have recently identified several putative transcriptional regulators that might mediate these transcriptional responses. In this study we investigated functional roles of these new regulators and we showed that a DOF transcriptional factor OBP4 negatively regulates root hair growth.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：植物ホルモン・成長生理・全能性 細胞分化 細胞周期 遺伝子発現調節 発生遺伝

1. 研究開始当初の背景

動植物をはじめとする多細胞生物の形態形成は、細胞の増殖、分化、成熟のバランスが協調的に制御されることによって実現する。例えば植物のメリステムとよばれる組織では幹細胞が増殖を繰り返して新しい細胞を供給し続ける一方、一部の娘細胞が細胞成長を伴う分化を開始し、やがて成熟することによって、葉や根などの器官の最終的な形を作り出す。シロイヌナズナをはじめとする多くの植物のメリステムでは、細胞が増殖期から分化期へ移行するのに伴って、DNA複製と細胞分裂を交互に行う細胞分裂周期から、細胞分裂を伴わずDNA複製のみを行う核内倍加周期へ転換する。いったん核内倍加周期に移行した細胞は核内のDNA量を上昇させながら分化を続け、通常再び増殖を開始することはない。植物の器官形成の過程で細胞分裂周期から核内倍加周期へ転換するタイミングや、その後核内倍加周期を終了させるタイミングを時空間的に正しく制御することが、細胞増殖と分化、成熟のバランスを維持するための一つの重要な鍵となるが、これらの分子機構はまだよく分かっていなかった。

私たちはこれまでトライヘリックス型転写因子GT2-LIKE1 (GTL1)とそのホモログDF1の二重変異体の解析を通して、これらの転写因子が細胞増殖、分化において重要な働きをすることを発見した。さらに冗長性の高い転写因子ファミリーの解析に優れたキメラリプレッサー系統(転写抑制ドメインの付加により、転写活性化因子を転写抑制因子に変換した形質転換体)を用いた変異体スクリーニングを開始し、これまでに15個のGROWTH REGULATING TRANSCRIPTION FACTOR (GRTF) 遺伝子のキメラリプレッサー系統が著しい形態異常の表現型を示すことを見いだした。これらの表現型は細胞の増殖や分化、成熟の異常を伴うことが分かっており、GRTFが細胞の分化、成熟バランスを調節することによって形態形成を制御する可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

GTL1, DF1によって制御を受ける転写ネットワークを解明し、これらの因子がいかに細胞増殖、分化を制御するかを解明する。

また私たちがこれまでに単離したGRTFキメラリプレッサーは、植物体が矮小化する(3系統)、本葉のふちが鋸歯化する(2系統)、根のメリステムが矮小化する(2系統)、過剰な細胞増殖によりカルス形成する(2系統)、根毛細胞が過剰成長する(1系統)、根毛細胞がほとんど成長しない(2系統)等、細胞の増殖や分化、成熟の異常が原因と予想される表現型を示していた。そこで本研究では、これらのGRTFについて欠損変異体や過剰発現体を作成し、

表現型を評価するとともに、RNAseqによって下流標的遺伝子を同定することを目的とした。これらの転写制御の標的遺伝子としては、細胞周期の制御因子やメリステム形成の制御因子、もしくは細胞分化の制御因子を予測しており、標的因子の解析を通じて、細胞周期の進行と細胞分化、成熟の進行との機能関係を分子レベルで明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

GTL1, DF1については、すでに取得しているマイクロアレイ及びクロマチン免疫沈降(ChIP-ChIP)解析データを用いて、GTL1, DF1が直接プロモーターに結合し、発現を制御する遺伝子を同定した。これらの解析から、GTL1とDF1が共にプロモーター領域に結合し、またGTL1, DF1依存的に発現量が変化することが確認出来た下流候補因子については、次に植物体内での発現をモニターした。さらにこれらの変異体と*gtl1 df1*変異体との多重変異体を作成し、*gtl1 df1*変異体の表現型が下流候補因子の過剰な蓄積に起因するかどうかを調べた。

またGRTFについては、スクリーニングに用いたキメラリプレッサー系統は35Sプロモーターを用いた過剰発現をベースとしているため、GRTF自身のプロモーターを用いて発現誘導するキメラリプレッサー系統の作成を進めた。また同時にそれぞれのGRTFのノックアウト変異体の整備を進めた。さらにそれぞれのGRTFを35Sプロモーターや発現誘導プロモーターに連結するコンストラクト(35S:GRTF, *pER8:GRTF*等)を作成し、安定型もしくは誘導型のGRTF過剰発現体を整備した。このなかから、誘導型の過剰発現体で既に細胞増殖、成長に異常のみられるGRTFについては、その下流標的遺伝子群を網羅的に同定するため、RNAseqによる全ゲノム発現解析の準備を進めた。またGRTFの植物体内での発現場所を特定するために、GRTF遺伝子をGFPに結合して発現する*pGRTF:GRTF-GFP*植物体の作成を進めた。

4. 研究成果

GTL1, DF1の2重変異体の持つ表現型のうち、特に根毛細胞が野生型に較べて昂進するという表現型について詳細な解析を進めたところ、この表現型は核内倍加によるDNA量の増加には依存しないことが分かった。またGTL1, DF1はDNA量に依存せず根毛成長を制御することが知られる*ROOT HAIR DEFECTIVE 6-LIKE 4 (RSL4)*遺伝子の発現を直接抑制し、根毛成長が終了するタイミングを制御することが分かった(Shibata and Breuer et al, 投稿準備中)。さらにGTL1, DF1はRSL4の下流で根毛成長を促進する34個の遺伝子の発現も抑制することを見だし、根毛形成における負のフ

ードフォワードループが存在することが分かった。

また GRDF のひとつとして同定していた DOF 転写因子をコードする OBP4 に関する研究を進め、OBP4 の発現がストレスホルモンのひとつである ABA によって数時間以内に誘導されること、また OBP4 が細胞伸長を負に制御することを発見した (Plant Physiol, 2017)。また誘導型の OBP4 過剰発現体を用いた RNAseq 解析を行い、OBP4 に依存して発現量が変化する遺伝子をゲノムワイドに同定した。Gene Ontology 解析により OBP4 が特に根毛細胞の制御因子の発現を抑制することが判明したため、根毛細胞における OBP4 の機能解析を進め、OBP4 が根毛成長の鍵制御因子である *RSL2* 遺伝子の発現を直接抑制することによって根毛の細胞成長を停止させることを発見した (Plant Physiol, 2017)。

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 13 件)

1. Rymen B, Kawamura A, Schäfer S, Breuer C, Iwase A, Shibata M, Ikeda M, Mitsuda N, Koncz C, Ohme-Takagi M, Matsui M, Sugimoto K. ABA Suppresses Root Hair Growth via the OBP4 Transcriptional Regulator. (2017) *Plant Physiol*. 査読有 173: 1750-1762.
2. *Franciosini A, *Rymen B, Shibata M, Sugimoto K. (2017) Molecular networks orchestrating plant cell growth. *Curr Opin Plant Biol* 査読有 35:98-104. *co-first authors
3. Kobayashi K, Ohnishi A, Sasaki D, Fujii S, Iwase A, Sugimoto K, Masuda T, Wada H. Shoot removal induces chloroplast development in roots via cytokinin signaling. (2017) *Plant Physiol*. 査読有 173(4): 2340-2355.
4. Weimer AK, Biedermann S, Harashima H, Roodbarkelari F, Takahashi N, Foreman J, Guan Y, Pochon G, Heese M, Van Damme D, Sugimoto K, Koncz C, Doerner P, Umeda M, Schnittger A. (2016) The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in Arabidopsis. *EMBO J* 査読有 35(19):2068-2086.
5. Favero DS, Jacques CN, Iwase A, Le KN, Zhao J, Sugimoto K, Neff MM. (2016) SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME B4-#3 represses genes associated with auxin signaling to modulate hypocotyl growth. *Plant Physiol* 査読有 171(4): 2701-16.

6. Cifuentes M, Jolivet S, Cromer L, Harashima H, Bulankova P, Renne C, Crismani W, Nomura Y, Nakagami H, Sugimoto K, Schnittger A, Riha K, Mercier R. (2016) TDM1 regulation determines the number of meiotic divisions. *PLoS Genet* 12(2) 査読有: e1005856.
7. Harashima H and Sugimoto K. (2016) Integration of developmental and environmental signals into cell proliferation and differentiation through RETINOBLASTOMA-RELATED 1. *Curr Opin in Plant Biol* 15 査読有: 683-690.
8. Kumar N, Harashima H, Kalve S, Bramsiepe J, Wang K, Sizani BL, Bertrand LL, Johnson MC, Faulk C, Dale R, Simmons LA, Churchman ML, Sugimoto K, Kato N, Dasanayake M, Beemster G, Schnittger A, Larkin JC. (2015) Functional conservation in the SIAMESE-RELATED family of Cyclin-dependent kinase inhibitors in land plants. *Plant Cell* 27 査読有: 3065-3080.
9. Kobayashi K, Kobayashi K, Suzuki T, Iwata E, Nakamichi N, Suzuki T, Chen P, Ohtani M, Ishida T, Hosoya H, Müller S, Leviczky T, Pettkó-Szandtner A, Darula Z, Iwamoto A, Nomoto M, Tada Y, Higashiyama T, Demura T, Doonan JH, Hauser MT, Sugimoto K, Umeda M, Magyar Z, Bögre L, Ito M. (2015) Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J* 34(15)査読有:1992-2007.
10. Narukawa H, Yokoyama R, Komaki S, Sugimoto K, Nishitani K. (2015) Stimulation of cell elongation by tetraploidy in hypocotyls of dark-grown Arabidopsis seedlings. *PLoS ONE* 査読有: e0134547.
11. Okushima Y, Shimizu K, Ishida T, Sugimoto K, Masaaki U. Differential regulation of B2-type CDK accumulation in Arabidopsis roots. (2014) *Plant Cell Rep* 33(7)査読有:1033-40.
12. Breuer C, Braidwood L, and Sugimoto K. (2014) Endocycling in the path of plant development. *Curr Opin Plant Biol* 17 査読有: 78-85.
13. Braidwood L, Breuer C, and Sugimoto K. My body is a cage: Mechanisms and modulation of plant cell growth. (2014) *New Phytol* 201 査読有: 388-402.

[学会発表] (計 8 件)

1. Shibata M, Breuer C, Kawamura A, Rymen B, Watt L, Clark NM, Braidwood L, Sozzani R, Benfey PN, Sugimoto K. : Two transcription factors govern root hair growth in Arabidopsis” 第 58 回日本植物

- 生理学会年会 (鹿児島大学、鹿児島県鹿児島市、2017年3月16-18日)
2. Shibata M, Breuer C, Kawamura A, Rymen B, Watt L, Clark NM, Braidwood L, Sozzani R, Benfey PN, Sugimoto K. : A trihelix transcription factor GTL1 regulates root hair development in Arabidopsis, Cold Spring Harbor Asia Conference (淡路夢舞台、兵庫県淡路市、2016年11月29日-12月2日)
 3. Rymen B, Kawamura A, Ikeda M, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Matsui M, and Sugimoto K. Transcriptional control of root hair growth under adverse conditions. ICAR2015 (Palais des congress, France, Paris, 2015年7月5-9日)
 4. Harashima H, Retinoblastoma resets the cell cycle after S phase through a system of interconnected feedback loop. ICAR2015 (Palais des congress, France, Paris, 2015年7月5-9日)
 5. Shibata M, Breuer C, Kawamura A, Braidwood L, Sugimoto K. The transcription factor GTL1 negatively regulates root-hair growth depending on multiple environmental cues, 第56回日本植物生理学会年会 (東京農業大学、東京都、2015年3月16-18日)
 6. Harashima H, Hammann P, Sugimoto K, Schnittger A. : Chemical genetic approach to identify the substrates of plant cyclin-dependent kinases, The 38th Naito Conference on Molecule-based biological systems (シャトレゼガトーキングダム札幌、北海道札幌市、2014年10月7-10日)
 7. Rymen B, Iwase A, Sugimoto K. : To grow or not to grow: plant growth signaling under environmental limiting conditions, The 38th Naito Conference on Molecule-based biological systems (シャトレゼガトーキングダム札幌、北海道札幌市、2014年10月7-10日)
 8. Rymen B, Ikeda M, Mitsuda N, Takagi M, Matsui M, Sugimoto K. : Transcriptional regulation of organ growth under limiting conditions ICAR2014 (University of British Columbia, Canada, Vancouver, 2014年7月28-8月1日)

〔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://cellfunction.riken.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 慶子 (Sugimoto Keiko) 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー
 研究者番号：30455349

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

Breuer Christian 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員
 研究者番号：90525859

原島 洋文 (HARASHIMA, Hirofumi) 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員
 研究者番号：00700113

(4)研究協力者

Rymen Bart 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員 研究者番号：80737255