

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03965

研究課題名(和文) DNA倍加誘導の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of induction of DNA polyploidization

研究代表者

梅田 正明 (Umeda, Masaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：80221810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA倍加は一つの細胞の中でDNA量が倍々に増える現象であり、多くの植物において細胞の肥大化、ひいては器官の巨大化をもたらす。以前の研究で、DNA倍加は細胞周期進行の阻害により引き起こされると考えられていたが、最近の我々の研究により、クロマチン構造制御もDNA倍加誘導に重要であることが明らかになった。そこで、本研究では、DNA倍加を誘導するクロマチン構造の制御要因について解析したところ、植物ホルモンのオーキシンを介したヘテロクロマチン構造の制御が重要な役割をもつことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA倍加誘導は、これまで育種分野で倍数体を作成する際に多く利用されてきた。この際は細胞分裂の阻害剤がよく用いられるが、一時的処理に止めないと細胞分裂を恒常的に阻害し、植物の成長も阻害してしまうことになる。本研究で明らかになったクロマチン構造を制御する鍵因子をターゲットとした分子育種、あるいは薬剤開発を進めれば、このような細胞分裂に対する阻害的影響を排除できるため、より高効率かつ高度なDNA倍加誘導を期待でき、植物バイオマスの増産や食糧の安定的供給に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA polyploidization occurs by increasing the DNA content in individual cells. In most plant species, it promotes cell enlargement, thereby increasing organ size. Previous studies suggested that DNA polyploidization is induced by inhibition of cell cycle progression, while we recently revealed that regulation of chromatin structures also participates in the induction process. In this study, we have investigated the key factors associated with chromatin regulation, and found that the plant hormone auxin plays an important role in controlling heterochromatin structures which affect the ability to induce DNA polyploidization.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：クロマチン 細胞周期 植物ホルモン DNA倍加 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの植物種において、器官成長は細胞分裂と、その後起こる DNA 倍加によってもたらされる。DNA 倍加は個々の細胞がもつ DNA 量が倍々に増えていく現象であり、これに伴い、細胞および器官サイズが増大することが知られている。以前の多くの研究で、細胞分裂から DNA 倍加への移行には細胞周期の G2/M 期の進行阻害が重要であることが知られていた。しかし、DNA 倍加能をもたない植物を用いた解析から、細胞周期進行の阻害だけでは DNA 倍加は誘発されないことが明らかとなり、クロマチン構造の制御も重要であることが示唆されていた。

(2) 細胞周期の中心的な制御因子であるサイクリン依存性キナーゼ(Cyclin-dependent kinase; CDK)の活性阻害が DNA 倍加誘導に関与すると考えられてきたが、これだけでは細胞周期を停止させることはできても、DNA 倍加を誘導することはできないと考えられる。したがって、CDK は未知の制御因子を介して細胞周期以外の生理現象に関与していると予想した。

(3) これまでの研究で、シロイヌナズナにおいてオーキシンが DNA 倍加を抑制する作用をもつことが報告されている。これも細胞周期制御の観点から理解されてきたが、オーキシンの作用点が細胞周期以外にある可能性も否定できず、新たな観点からオーキシンの DNA 倍加に与える影響について精査する必要があった。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえて、本研究では、CDK 活性とオーキシンがクロマチン構造を制御することにより DNA 倍加誘導に関与しているのではないかと、という仮説を立てた。この仮説を検証し、その分子メカニズムを解明することを目的として研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

(1) CDK によるクロマチン構造制御因子のリン酸化を調べる実験では、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。酵素側の CDK-cyclin 複合体は、各種 CDK を特異的に認識する抗体を用いて、シロイヌナズナ培養細胞から調製した全タンパク質の免疫沈降を行い、回収した。基質タンパク質は、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を精製して用いた。

(2) DNA 倍数性の測定は、植物の各器官を使ってプロイディーアナライザーを用いて行った。DNA 損傷応答の解析は、主にプレオマイシンやゼオシンといった DNA 二本鎖切断をもたらす薬剤で植物体を処理し、根の伸長や根端(や茎頂)の細胞死の表現型を定量的に観察することにより行った。

(3) ヘテロクロマチンの凝縮度については、DAPI 染色と FISH 解析により調べた。DAPI 染色はクロモセーターを可視化させるので、クロモセーターの面積が細胞全体に占める割合を算出することにより、ヘテロクロマチンの凝縮度を推定した。また、FISH 解析においては、ペリセントロメア領域に特異的なプローブを用いて蛍光観察を行うことにより、セントロメア周辺のクロマチンの緩みを測定した。

(4) 相同組換え頻度は、レポーター遺伝子を植物体に導入して調べた。レポーター遺伝子は、分断された *GUS* 遺伝子が組み込まれたものを使用し、相同組換えが起こると全長の *GUS* 遺伝子が復活するシステムを利用した。レポーター遺伝子を導入した植物体の葉を *GUS* 染色し、そのスポット数を測定することにより、相同組換え頻度を推定した。

## 4. 研究成果

(1) CDK の基質の中にクロマチン構造を制御する因子が存在するかどうかを、*in vitro* キナーゼアッセイにより網羅的に調べた、シロイヌナズナの CDK のうち、細胞周期を直接制御する CDKA, CDKB1, CDKB2 の 3 種類について解析した結果、ヘテロクロマチン構造を制御することが報告されている因子 (Heterochromatin-related factor; HRF と呼ぶ) がすべての CDK によりリン酸化されること、また、特に CDKB1 により強くリン酸化される可能性があることを見出した。

(2) *HRF* 遺伝子の変異体(*hrf* 変異体)を入手し、DNA 倍数性を測定した結果、この変異体では DNA 倍加が促進されていることが明らかになった。また、興味深いことに、DNA 損傷に対する感受性が高いことも明らかになった。そこで、ヘテロクロマチン構造に変化が見られることが知られている他のシロイヌナズナ変異体を用いて同様な解析を行ったところ、ヘテロクロマチン構造と DNA 損傷感受性の相関に関して *hrf* 変異体と似た傾向が見られることが明らかになった。

(3) HRF が CDKB1 により強くリン酸化されることが示唆されたため、CDKB1 がクロマチン構造の制御に関与しているかどうか調べた。*cdkb1* 変異体を入手し、DAPI 染色によりクロモセーターの可視化、および FISH 解析によりセントロメア周辺のクロマチン凝縮度の解析を行った結果、*cdkb1* 変異体では少なくともセントロメア領域のクロマチン構造が緩和していることが定量的に

示された。以前の研究で、CDKB1 は細胞分裂から DNA 倍加への移行を抑制することが知られていることから、以上の結果は、CDKB1 による HRF のリン酸化がヘテロクロマチンを凝縮させることにより、DNA 倍加誘導を阻害する役割をもつことを示唆している（図 1）。

(4) オーキシンと DNA 倍加の関連性について、まずエピジェネティック制御因子に着目して研究を進めた。様々なエピジェネティック制御因子についてオーキシンに対する発現応答性を確認したところ、シュートで発現するヒストン修飾酵素遺伝子が高いオーキシン応答性を示すことが明らかになった。そこで、レポーター遺伝子を用いて詳細な発現解析を行った結果、この遺伝子は茎頂分裂組織や若いステージの葉で高発現していることが示された。

(5) (4)で同定したヒストン修飾酵素遺伝子について、変異体入手してクロモセンターの解析を行った結果、ヘテロクロマチン構造が緩和していることが明らかになった。また、DNA 損傷に高感受性を示すことも明らかになったので、相同組換え頻度を測定したところ、野生型より変異体の方が有為に相同組換えが抑制されていることがわかった。この結果から、このヒストン修飾酵素は何らかのメカニズムで相同組換えに関与していると考えられるが、DNA 倍加との直接的な関連性を見出すことができなかったため、これ以上実験を進めるのは中止した。

(6) HRF が CDK によるリン酸化制御を受け、ヘテロクロマチンを凝縮させることにより、DNA 倍加誘導を阻害する役割をもつことが示唆されたので、オーキシンと HRF の関連性について調べた。その結果、*hlf* 変異体では、オーキシンによる DNA 倍加や DNA 損傷応答の阻害効果が抑圧されることが明らかになった。したがって、オーキシンは HRF を介してクロマチン構造を制御し、DNA 倍加誘導を阻害する可能性が示唆された（図 1）。

(7) オーキシンは CDK 活性を正に制御することが知られている。したがって、オーキシンによる CDK の活性化が HRF 活性を制御し、クロマチン構造と DNA 倍加への移行を制御している可能性が考えられる（図 1）。今後は、HRF のリン酸化部位に変異を導入した変異 *HRF* 遺伝子を植物体に導入し、リン酸化制御が実際にクロマチン構造や DNA 倍加誘導に関与しているかどうかを検証していく。また、オーキシンがどのように HRF 活性を制御しているのか、その実体を分子レベルで把握するために、CDK 活性の制御因子に焦点をあてて、オーキシンによる mRNA およびタンパク質レベルの発現解析を行っていく必要があると考えている。

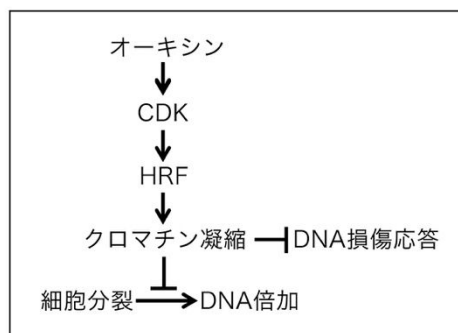


図1 オーキシンと CDK 活性による DNA 倍加の制御モデル

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chen Poyu, Takatsuka Hiroto, Takahashi Naoki, Kurata Rie, Fukao Yoichiro, Kobayashi Kosuke, Ito Masaki, Umeda Masaaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Arabidopsis R1R2R3-Myb proteins are essential for inhibiting cell division in response to DNA damage	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-00676-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogita Nobuo, Okushima Yoko, Tokizawa Mutsutomo, Yamamoto Yoshiharu Y., Tanaka Maho, Seki Motoaki, Makita Yuko, Matsui Minami, Yoshiyama Kaoru Okamoto, Sakamoto Tomoaki, Kurata Tetsuya, Hiruma Kei, Saijo Yusuke, Takahashi Naoki, Umeda Masaaki	4. 巻 94
2. 論文標題 Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 439 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Naoki, Ogita Nobuo, Takahashi Tomonobu, Taniguchi Shoji, Tanaka Maho, Seki Motoaki, Umeda Masaaki	4. 巻 8
2. 論文標題 A regulatory module controlling stress-induced cell cycle arrest in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e43944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.43944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Umeda Masaaki, Aki Shiori S, Takahashi Naoki	4. 巻 51
2. 論文標題 Gap 2 phase: making the fundamental decision to divide or not	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbi.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梅田正明
2. 発表標題 Development of high-biomass plants by induction of DNA polyploidization
3. 学会等名 International Conference on Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高塚大知、梅田正明
2. 発表標題 DNA 倍加の開始におけるヒストンメチル化の制御
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木信一郎、高塚大知、梅田正明
2. 発表標題 イネの細胞周期進行におけるヒストンメチル化の役割
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高塚大知、梅田正明
2. 発表標題 クロマチン構造制御によるDNA 倍加誘導
3. 学会等名 第35回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高塚大知、梅田正明
2. 発表標題 Control of chromatin structure along differentiation trajectories
3. 学会等名 第57回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高塚大知、梅田正明
2. 発表標題 DNA倍加を誘導する新規なエピジェネティック制御系の解析
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋はるか、高塚大知、梅田正明
2. 発表標題 細胞周期制御におけるヒストンメチル化酵素ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED5/6の役割
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物成長制御研究室ホームページ  
<https://bsw3.naist.jp/umeda/>

