

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05951

研究課題名(和文)植物のDNA倍加誘導において再複製を可能にする仕組みの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism that enables re-replication at the onset of endoreplication in plants

研究代表者

高塚 大知 (Takatsuka, Hiroto)

金沢大学・生命理工学系・助教

研究者番号：70633452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：「DNA倍加」は、細胞分裂を経ずにDNA複製のみを繰り返す細胞周期様式であり、核相の増加を通じて細胞肥大を誘発するため、植物バイオマス生産強化の鍵を握る重要な現象である。本研究で、私たちは今まで着目されてこなかった「エピジェネティクス(DNA配列の変化を伴わないクロマチン動態変化システム研究分野)」とDNA倍加の意外な接点を明らかにした。特定のエピジェネティック制御因子が、DNA倍加開始を阻害する働きを持つことを明らかにした。実際、この制御因子を欠損した変異体ではDNA倍加が顕著に亢進し、細胞サイズの増大が見られた。今後、この制御因子を利用した植物バイオマス増産技術の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA倍加は細胞肥大を誘発するため、植物バイオマス増産の観点から重要な生命現象である。従来の細胞周期因子に着目した研究では、イネやポプラのようなDNA倍加能力の低い植物種でDNA倍加を誘発することはできないことがわかっており、DNA倍加開始に必要な未知のファクターの存在が示唆されていた。本研究の成果から、そのファクターがエピジェネティック制御である可能性が示唆された。今後、「細胞周期」と「エピジェネティック制御」を同時改変することで、イネやポプラで自在にDNA倍加を誘発し、植物バイオマスを人為的に増産する技術の開発が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Endoreplication, a specialized mode of cell cycle in which DNA replication is repeated without cell division, induces dramatic cell enlargement, thereby drawing a great deal of attraction. In this study, we revealed an unexpected connection between endoreplication and epigenetics, a field of research on chromatin dynamics without changes in DNA sequence, which has not been focused on before. We found that a specific epigenetic regulator has a function in inhibiting the onset of endoreplication. Indeed, mutants lacking this regulator showed markedly enhanced ploidy level and increased cell size. This regulator might be the key to develop technology for increasing plant biomass production.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：DNA倍加 細胞周期 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂を伴わずに DNA の複製を繰り返し、核 DNA 量を増やす特殊な細胞周期様式である DNA 倍加は、植物に広く見られる現象である。DNA 倍加を起こすと劇的な細胞成長が起こるため、植物が効率よく器官サイズを増大させるのに DNA 倍加は有効な戦略であると考えられる。本来、DNA は再複製されないように厳密に制御されているが、なぜ DNA 倍加移行時には再複製が可能になるかは全く分かっていなかった。私たちはこれまでに DNA 倍加は、S 期で DNA 複製完了→ G2 期で停止→ 特定のエピジェネティック修飾(H3K27me1)が大きく低下→ DNA の再複製の開始、という順序で起こることを明らかにしてきた。しかし、H3K27me1 が DNA 倍加直前で低下する意義は不明なままである。そこで、本研究では、G2 期停止後に H3K27me1 が低下することが DNA 倍加の開始に必要な場合、なぜ H3K27me1 の低下により DNA の再複製が可能になるか、を明らかにし、DNA 倍加という植物の器官サイズ制御に重要な役割を持つ現象の全容解明に迫りたい。

2. 研究の目的

以下 2 点の疑問に対する答えを得ることで、H3K27me1 の DNA 倍加サイクルを含む細胞周期進行への役割を明らかにすることを目的とする。

H3K27me1 および、その修飾を行う酵素である ATXR5 および ATXR6 が細胞周期過程でどのような挙動を示すか？

ATXR5 および ATXR6 を欠損すると、DNA 倍加への移行の鍵を握る有糸分裂細胞周期の進行はどのような変化を示すか？

3. 研究の方法

に対する方法：

私たちが確立した、各細胞周期ステージにおける H3K27me1 レベルを検出する免疫染色法と、ATXR5 および ATXR6 の蛍光レポーターを用いて、H3K27me1 およびその修飾酵素の細胞周期進行におけるダイナミクスを明らかにした。

に対する方法：

ゲノム編集技術を用いて作出した *atxr5/6* 二重変異体に細胞周期進行を可視化できるレポーターラインを導入し、細胞周期の各ステージの長さを測定した。また、クロマチンを可視化できるレポーターの導入や遺伝子発現の定量解析により、*atxr5/6* 二重変異体でのゲノム恒常性に異常が生じているかを観察した。

4. 研究成果

に対する結果：

ATXR5, ATXR6 いずれも S 期初期に高レベルで存在することが明らかになった。また、H3K27me1 も S 期初期に高レベルで存在し、特にヘテロクロマチン領域にエンリッチされていることが明らかになった。ATXR5 は S 期後期から G2 期にかけて発現低下した後、G2 期後期に発現が再開する一方、ATXR6 は S 期後期に発現低下した後、次の細胞周期までほぼ発現しない、というように ATXR5 と ATXR6 の間に発現様式の違いがあることがわかった。更に、この細胞周期依存的な ATXR5/6 の発現様式に、SCF 複合体によるタンパク質分解による蓄積量制御が重要な役割を担っていることを突き止めた。

に対する結果：

atxr5/6 二重変異体は野生型に比べ、S 期が短く、G2 期が長い表現型を示した。更に、S 期の進行の様子を詳しく観察したところ、ユークロマチン領域が複製される S 期初期の長さは野生型と大差ないのに対し、ヘテロクロマチン領域が複製される S 期後期が顕著に短縮されていることがわかった。このことは、ATXR5/6 は S 期初期に発現し、H3K27me1 をヘテロクロマチン領域に付加することで、ヘテロクロマチン領域が S 期初期に複製されるのを防ぐ役割を担う可能性が示唆された。

また、G2 期遅延は DNA 損傷ストレスとの関連が報告されているので、*atxr5/6* 二重変異体での DNA 修復遺伝子の発現を調べた。その結果、*atxr5/6* 二重変異体では DNA 修復関連遺伝子の発現が軒並み増加していた。加えて、*atxr5/6* 二重変異体では、分裂期の細胞で染色体が正常に分配されず、姉妹染色体間が、DNA を含む異常な構造体である Chromosome bridge で架橋されている様子も高頻度で観察された。Chromosome bridge は S 期の DNA 複製異常の結果として生じることが知られていることから、「ATXR5/6 を欠損すると、ヘテロクロマチンの複製タイミングが異常に早くなった結果、DNA 複製ストレスによって DNA 損傷が発生し、G2/M 期の進行が阻害される」という可能性が考えられた。

また、おそらくこういった G2 期進行の遅延の結果として、*atxr5/6* 二重変異体の葉では、発生

初期から成熟期に至るまで、常に DNA 倍加が亢進する表現型を示した。

以上の結果から、ATXR5 および ATXR6 はヘテロクロマチンの複製タイミングを S 期後期に限定し、異常な DNA 複製が起こらないようにすること、そしてその働きによってゲノム恒常性を維持することで G2 期遅延およびそれに伴う DNA 倍加移行を抑制する機能を持つことが明らかになった。これらの知見は、DNA 複製におけるクロマチン動態の重要性、更には、分裂サイクルにおける S 期進行タイミングが他の細胞周期ステージの進行、ひいては有糸分裂サイクルから DNA 倍加への移行に関与することを示す初めての知見となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takatsuka Hiroto, Ito Masaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Cytoskeletal Control of Planar Polarity in Root Hair Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.580935	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 -
1. 著者名 Okumura Toru, Nomoto Yuji, Kobayashi Kosuke, Suzuki Takamasa, Takatsuka Hiroto, Ito Masaki	4. 巻 134
2. 論文標題 MYB3R-mediated active repression of cell cycle and growth under salt stress in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 261~277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-020-01250-8	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 -
1. 著者名 Nomoto Yuji, Takatsuka Hiroto, Yamada Kesuke, Suzuki Toshiya, Suzuki Takamasa, Huang Ying, Latrasse David, An Jing, Gombos Magdolna, Breuer Christian, Ishida Takashi, Maeo Kenichiro, Imamura Miyu, Yamashino Takafumi, Sugimoto Keiko, Magyar Zoltan, B?gre L?szl?, Raynaud C?cile, Benhamed Moussa, Ito Masaki	4. 巻 13
2. 論文標題 A hierarchical transcriptional network activates specific CDK inhibitors that regulate G2 to control cell size and number in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29316-2	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 該当する
1. 著者名 Nagaki Kiyotaka, Furuta Tomoyuki, Yamaji Naoki, Kuniyoshi Daichi, Ishihara Megumi, Kishima Yuji, Murata Minoru, Hoshino Atsushi, Takatsuka Hiroto	4. 巻 29
2. 論文標題 Effectiveness of Create ML in microscopy image classifications: a simple and inexpensive deep learning pipeline for non-data scientists	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chromosome Research	6. 最初と最後の頁 361~371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10577-021-09676-z	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 -

1. 著者名 Takatsuka Hiroto, Shibata Atsushi, Umeda Masaaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Genome Maintenance Mechanisms at the Chromatin Level	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10384 ~ 10384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910384	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 -

1. 著者名 Lang Lucas, Pettko-Szandtner Aladar, Tuncay Elbasi Hasibe, Takatsuka Hiroto, Nomoto Yuji, Zaki Ahmad, Dorokhov Stefan, De Jaeger Geert, Eeckhout Dominique, Ito Masaki, Magyar Zoltan, Bogre Laszlo, Heese Maren, Schnittger Arp	4. 巻 4
2. 論文標題 The DREAM complex represses growth in response to DNA damage in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202101141	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 該当する

1. 著者名 Takatsuka Hiroto, Nomoto Yuji, Araki Satoshi, Machida Yasunori, Ito Masaki	4. 巻 38
2. 論文標題 Identification of two tobacco genes encoding MYB3R proteins with repressor function and showing cell cycle-regulated transcript accumulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 269 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.21.0224a	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 -

1. 著者名 Takatsuka Hiroto, Umeda Masaaki	4. 巻 2329
2. 論文標題 Whole-Mount Immunostaining for the Identification of Histone Modifications in the S-Phase Nuclei of Arabidopsis Roots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1538-6_6	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

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 植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotomo Takatsuka, Shiori Sugamata-Aki, and Masaaki Umeda.
2. 発表標題 Chromatin-level regulation of endoreplication onset
3. 学会等名 The 31st International Conference on Arabidopsis Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------