

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：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22570040

研究課題名（和文）

細胞周期G2/M期制御を通じたエンドリプリケーション開始機構

研究課題名（英文）

Onset of endoreplication through the regulation of G2/M phase during the cell cycle

研究代表者

伊藤 正樹 (ITO MASAKI)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：10242851

研究成果の概要（和文）：

DNA 倍加は細胞分裂を経ずに DNA 複製を繰り返す特殊な細胞周期と見なされており、多くの植物の発生過程において、細胞の大きさ、代謝活性、細胞の分化などに関連した重要な現象であると考えられているが、その制御機構には未知な部分が多い。本研究では DNA 倍加の開始に関連する 2 つの因子、GIG1 と SCL に着目し研究を行った。GIG1 は M 期の進行に必要なタンパク質分解系の負の制御因子であることを示した。また、SCL の機能は M 期に DNA 複製関連遺伝子の転写を抑制することではないかと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Plant cells often increase their cellular DNA content (ploidy) during plant development, through the modified cell cycle where DNA replication occurs repeatedly without intervening cell division. Although it has been generally believed that increased cellular ploidy may be important for the control of cell size, metabolic activity, and cell differentiation, little is known about the regulatory mechanisms of this processes. In this study, we have focused on the two factors, GIG1 and SCL, that may have important roles in increasing cellular ploidy. We showed that GIG1 may negatively regulate ploidy increase by inhibiting a specific protein degradation system acting during G2 and mitosis. On the other hand, SCL may accelerate increasing ploidy by transcriptional repression of genes involved in DNA replication, possibly during M phase in the cell cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：細胞分裂、細胞周期、エンドリプリケーション、核内倍加、植物、ユビキチンリガーゼ、転写制御

1. 研究開始当初の背景

葉や花などの植物の器官が発生する過程では、発生初期の原基などの段階で見られる高い細胞分裂活性が、発生の進行とともに低下し、やがて一部の細胞を除いて完全に細胞分裂が停止する。この細胞増殖の発生的な制御は、何らかの発生シグナルが個々の細胞に作用し、サイクリンや CDK などの細胞周期制御因子群の働きをコントロールすることによりなされていると考えられるが、そのメカニズムには未知の部分が多い。多くの植物種では、発生の進行に伴い細胞分裂を停止する過程で、核分裂や細胞質分裂を経ずに DNA 複製だけを繰り返す DNA 倍加とよばれる現象を引き起こす。DNA 倍加は M 期の一部(あるいは全体)を欠く特殊な細胞周期と見なすことができ、通常の分裂を伴う細胞周期と区別して、DNA 倍加サイクルと呼ばれる。DNA 倍加には、主に 2 つの型が知られている。エンドリプリケーションは、M 期を完全にスキップする細胞周期であり、植物において広範囲に見られるタイプの倍加である。もう一つは、M 期に入ることはできるものの、正常に完了することができず、その後の細胞質分裂も起きないために染色体数が倍加するエンドマイトーシスである。エンドマイトーシスは、他ピーと細胞などごく一部の細胞にだけ見られる特殊な倍加であると考えられている。

発生における細胞分裂の停止は、この mitotic cycle から DNA 倍加サイクルへの切り替えにより引き起こされるため、この切り替え機構が何らかのメカニズムにより発生的に制御されていると考えられる。また DNA 倍加は細胞の分化とも関連しており、例えば孔辺細胞は DNA 倍加を全く起こさないことが知られている。このように、DNA 倍加は、それ自体が興味深い研究対象であるばかりではなく、その開始機構を明らかにすることができれば、細胞周期と発生・分化がどのような関連により制御されているのかを理解する上で重要な手掛かりが得られると考えられる。

mitotic cycle から DNA 倍加サイクルへの切り替えは、M 期の開始や進行に関する活性を抑制的に制御することによりなされており、これは通常の細胞周期で働く G2/M 期制御因子を発生的に制御することを通じて行われていると考えられている。従って、発生の進行に伴う細胞分裂の抑制的な制御を理解するには、mitotic cycle から endocycle への切り替えの鍵となる G2/M 期制御因子を特

定し、その因子が発生的に制御される仕組みを明らかにすることが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

植物の G2/M 期特異的な遺伝子群の転写を制御する Myb 転写因子を研究する過程で、mitotic cycle から DNA 倍加サイクルへの切り替えに働くと考えられる植物特異的な因子、GIG1 と SCL をシロイヌナズナから同定した。これらの因子はシロイヌナズナ培養細胞において G2/M 期に特異的に発現することから、通常の細胞周期においては G2/M 期制御に関連する機能を持つことが推測されるが、*gig1* 変異体や *SCL* 過剰発現体では、本来 DNA 倍加が起きない組織や発生ステージにおいて異所的な DNA 倍加を引き起こす。本研究では、これらの異所的なエンドリプリケーションにより引き起こされる発生の異常を詳細に解析し、遺伝子の分子機能を明らかにすることにより、植物における DNA 倍加制御の意義とそのメカニズムの解明することを目的とした。

以下に本研究で対象とした 2 つの因子、GIG1 と SCL に関する背景について概説する。

(1) 新奇因子 GIG1 による DNA 倍加制御

gig1 変異体は、孔辺細胞において異所的な DNA 倍加を引き起こし、気孔の巨大化と形態異常を引き起こすというこれまでに知られていないユニークな表現型を示す。この変異体は、G2/M 期遺伝子群の転写を正に制御する MYB3R4 の遺伝子破壊株を親株としたエンハンサー変異体のスクリーニングの過程で単離された。この異所的な DNA 倍加は *gig1* 変異単独でも引き起こされるが、*myb3r4* 変異を同時に持つことで著しく促進されることがわかっている。GIG1 は孔辺細胞を分化する細胞系譜(以下、気孔細胞系譜)において DNA 倍加の抑制に働いている可能性がある。原因遺伝子 *GIG1* は植物に特異的な機能未知タンパク質をコードしており、シロイヌナズナにもう 1 コピー類似遺伝子 (*UVI4*) が存在することから、機能的に重複する二つの遺伝子が、より広範囲の細胞の DNA 倍加制御に関わっている可能性が考えられる。

以下に示す二つの根拠から、GIG1 の機能は、M 期サイクリン(CYCA および CYCB)に細胞周期依存的なユビキチン化を行うユビキチンリガーゼ複合体 APC (anaphase promoting complex)を抑制的に制御することではないかと考えられた。つまり、*gig1* 変異体では APC の活性を抑制することができ

ないため、CYCB1などのM期開始因子の過剰な分解が起きる。このため細胞はM期に入ることができず、M期をスキップするDNA倍加サイクルへと移行するというモデルである。まず一つ目の根拠は、GIG1の過剰発現体は花茎の節間が特徴的なパターンで短縮する矮性化個体となるが、この表現型はAPCの構成サブユニットをノックダウンした株の異常に酷似していることである。二つ目の根拠は、MYB3R4の標的遺伝子群にCYCB1, CYCB2, CYCA1などM期サイクリンが複数含まれていることである。つまり、*myb3r4*変異による表現型の促進は、*gig1*変異によるM期サイクリンの過剰な分解に加え、M期サイクリンの転写レベルの低下が加わることにより引き起こされると解釈できる。

(2)転写調節因子 SCLによるエンドリプリケーション制御

SCLはMYB3R4により直接の転写活性化を受ける標的遺伝子であり、細胞周期中ではG2/M期に特異的に発現する。遺伝子産物は、SCARECROWなどが属する植物特異的転写因子GRASファミリーの一員であり、まだ研究の報告がない遺伝子である。シロイヌナズナにおいて過剰発現体を作製したところ、葉、花、種子などほぼ全ての器官において異所的なエンドリプリケーションによる核の巨大化と細胞サイズの増大が観察された。また、タバコのSCLオルソログをBY2細胞に過剰発現させると、巨大な核をもつ大型化した細胞が高頻度で出現することもわかっている。SCLはおそらくM期開始の抑制因子としての働きを持つが、その機能が強く発現することによりエンドリプリケーションが開始されるのではないかと推測している。

3. 研究の方法

この研究で行ったDNAコンストラクトの作成、シロイヌナズナの育成・形質転換、レーザーコンフォーカル顕微鏡などを用いた画像解析、プロイディアナライザを用いた倍数性解析、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析、マイクロアレイ解析などは、全て常法により行った。

4. 研究成果

(1)新奇因子 GIG1によるDNA倍加制御

- 以下の3つの証拠からGIG1遺伝子産物はAPC(後期促進複合体)の新奇抑制因子であることを示した。(1)*gig1*変異体の表現型は、APC活性化因子として知られるCDC20の過剰発現により促進された。(2)M期サイクリンの一つCYCB2;2の遺伝子破壊により促

進された。(3)また、M期サイクリン(CYCB1;2)をYFP融合タンパク質として発現する形質転換体を使って調べたところ、GIG1の過剰発現により顕著に蓄積量が増加することが分かった。

- GFP-GIG1を導入した形質転換体の解析から、GIG1遺伝子は、細胞分裂の盛んな組織で発現する核局在タンパク質をコードしていることが分かった。
- gig1*変異体に見られる核DNA量の増大は、有糸分裂を正常に完了できないために染色体数が倍加する現象(エンドマイトーシス)に起因していることがわかった。
- GIG1遺伝子のパラログであるUVI4の変異体では、過剰なエンドリプリケーションを起こし、核DNA量を増大させていることがわかった。
- gig1 uvi4*二重変異体は致死であったことから、機能重複が考えられるが、単独変異体の表現型が異なるため、それぞれ独自の機能も有していると考えられた。
- GIG1とUVI4は異なるAPCの基質の安定性に影響することにより、異なった倍加サイクルの制御に関わっていることがわかった。GIG1は主にCYCB1やCYCB2を安定化させてDNA倍加を抑制するが、UVI4に関しては、M期サイクリン以外のAPC基質がDNA倍加制御に重要であることが示唆された。
- GIG1はエンドマイトーシスのほか、G2期からM期への進行や減数分裂による雄性配偶体形成にも重要なはたらきをしていることが示された。

(2)転写調節因子 SCLによるエンドリプリケーション制御

- GR(グルココルチコイド受容体)融合型のSCLをシロイヌナズナに導入した形質転換体を作成し、誘導条件、および非誘導条件における遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、誘導後3時間で、細胞周期のS期に関連する遺伝子群の発現が減少することがわかった。SCLはDNA複製関連の遺伝子を標的とした転写抑制に働いている可能性が考えられた。
- GFP-SCLをシロイヌナズナに形質転換し、SCLタンパク質の局在解析を行った。この形質転換体の根ではパッチ状にGFPの蛍光が観察されたため、細胞周期依存的に発現していることが確認された。細胞内局在性についても調べた結果、ほとんどの蛍光は核に見ら

れるが、核以外にも細胞質の特定の構造体に蛍光が観察された。

- 人工miRNAを用いて、SCL遺伝子のノックダウン株を作出した。しかし、予想されるような細胞分裂やDNA倍加に関する異常は認められなかった。今後、遺伝子破壊株を取得するためTALENやCRISPR/cas等を利用したターゲットングを試みる予定である。

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 6 件)

- Magyar, Z., Ito, M., Binarová, Mohamed, B., Bogre, L. 2013. Cell cycle modules in plants for entry into proliferation and for mitosis. In J. Greilhuber et al., eds., *Plant Genome Diversity Vol. 2*, 77-97. (査読なし)
DOI: 10.1007/978-3-7091-1160-4_6
- Araki, S., Machida, Y., Ito, M. 2012. Virus-induced silencing of *NtmybA1* and *NtmybA2* causes incomplete cytokinesis and reduced shoot elongation in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology*, 29: 483-487. (査読あり)
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.1004a
- Iwata, E., Ikeda, S., Abe, N., Kobayashi, A., Kurata, M., Matsunaga, S., Yoshioka, Y., Criqui, M.-C., Genschik, P., Ito, M. 2012. Roles of GIG1 and UVI4 in genome duplication in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 7: 1079 -1081. (査読あり)
DOI: 10.4161/psb.21133
- Iwata, E., Ikeda, S., Matsunaga, S., Kurata, M., Yoshioka, Y., Criqui, M-C, Genschik, P., Ito, M. 2011. GIGAS CELL1, a novel negative regulator of the anaphase-promoting complex/cyclosome, is required for proper mitotic progression and cell fate determination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 4382-4393. (査読あり)
DOI: 10.1105/tpc.111.092049
- Ishida, J.K., Yoshida, S., Ito, M., Namba, S., Shirasu K. 2011. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *PLoS One* 6: e25802. (査読あり)
DOI: 10.1371/journal.pone.0025802
- Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Demura, T.,

Nakamura, K., Jürgens, G., Ito, M. (2011) Mutations in *MYB3R1* and *MYB3R4* cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/M-specific genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 157: 706-717. (査読あり)
DOI: 10.1104/pp.111.180836

[学会発表] (計 11 件)

- Eriko Iwata, Norihito Nakamichi, Masaki Ito (2013 年 3 月 21 日) R1R2R3-Myb transcriptional repressors are important for developmentally controlled expression of G2/M-specific genes.
第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山大学)
- Masaki Ito (2012 年 10 月 25 日) Negative regulators of APC/C as determinants of ploidy levels
10th International Congress of Plant Molecular Biology (Jeju, Korea)
- 伊藤正樹 (2012 年 9 月 17 日) ゲノム倍加を制御する新奇 APC/C 阻害タンパク質
日本植物学会第 76 回大会 (兵庫県立大学)
- Masaki Ito, Eriko Iwata, Saki Ikeda, Asuka Kobayashi, Natsumi Abe, Mariko Kurata (2012 年 7 月 5 日) Cellular ploidy levels are regulated by novel inhibitor proteins of APC/C during organ development in *Arabidopsis*
23th International Conference on Arabidopsis Research (Vienna, Austria)
- 池田早希、岩田恵里子、倉田真理子、松永幸大、伊藤正樹 (2012 年 3 月 17 日) 新奇 APC/C 阻害タンパク質をコードする GIG1 と UVI4 の機能分担
第 53 回日本植物生理学会年会 (京都産業大学)
- 岩田恵里子、池田早希、倉田真理子、松永幸大、伊藤正樹 (2012 年 3 月 16 日) APC/C 阻害因子を欠失した *gigas cell1* 変異体における細胞運命決定の異常
第 53 回日本植物生理学会年会 (京都産業大学)
- Masaki Ito (2011 年 12 月 10 日) GIGAS CELL1, a novel negative regulator of APC/C, is required for proper mitotic progression and cell fate determination in *Arabidopsis thaliana*.
International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change" (invited) (倉敷市芸文館)

8. 岩田恵里子、松永幸大、吉岡泰、伊藤正樹
(2011年9月17日) 体細胞の染色体数が倍加
するシロイヌナズナ *gigas cell1* 変異体の解析
日本植物学会第75回大会 (東京大学駒場キ
ャンパス)

9. 岩田恵里子、吉岡泰、松永幸大、伊藤正樹
(2010年9月11日) 巨大な孔辺細胞様の細
胞が生じるシロイヌナズナ *gigl* 変異体の解
析
日本植物学会第74回大会 (中部大学)

10. 岩田恵里子、松永幸大、吉岡泰、伊藤正
樹 (2010年9月9日) *gigas cell1* 変異体に生
じるエンドマイトーススによる核内倍加
日本植物学会第74回大会 (中部大学)

11. Kosuke Kobayashi, John Doonan, Taku
Demura, Marie-Theres Hauser, Masaki Ito (2010
年6月7日) R1R2R3-Myb proteins acting as
transcriptional repressors for G2/M
phase-specific genes.
21st International Conference on Arabidopsis
Research (パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 正樹 (ITO MASAKI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教
授

研究者番号: 10242851

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし