

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08141

研究課題名(和文) イネ変異体を利用した核内倍加制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of rice mutants with polyploid cells

研究代表者

梅根 美佳 (Tsugane, Mika)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・特別協力研究員

研究者番号：90625592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多くの被子植物とは異なり、イネの葉や根には倍加細胞(染色体が倍数化した細胞)を生じない。これは「核内倍加」とよばれる特殊な細胞周期の抑制によるものである。細胞周期を制御するCYCA2タンパクの変異はイネで倍加細胞を誘導する。イネと核内倍加を行う植物ではCYCA2の制御機構が異なり、またイネの倍加は複数の因子で抑制されていると考えられる。イネにおける倍加は細胞分化とも関わりがあり、組織特異的に強く抑制されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内倍加をする植物を用いた倍加の程度に影響する因子の研究報告は多くあるが、核内倍加を起こさないイネを材料として倍加の有無の決定に着目した研究はこれまでにない。本研究により、細胞分化と核内倍加の関連性が示唆されたことから、今後はクロマチン構造に関わる制御機構の解明が鍵となることを示すことができた。イネが核内倍加を起こさない要因を明らかにすることができれば、倍加制御の仕組みだけでなく、倍加を起こす(起こさない)戦略を選んだ植物における倍加の役割を明らかにできる。

研究成果の概要(英文)：Plants produce polyploid cells by a unique cell cycle, endoreplication. However, in rice vegetative tissues, endoreplication is inhibited. We demonstrated that a mutant of cell-cycle related gene CYCA2 induced polyploid cells in leaves and roots of rice. Regulation mechanisms of CYCA2 seemed to be different between rice and other plants with polyploid cells produced by endoreplication. In rice, endoreplication was strictly repressed with several factors. Moreover, the results suggested that polyploidy is tissue specifically regulated and is dependent on plant developmental stages.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：細胞周期 イネ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内倍加は一部の体細胞の核 DNA 量が増加する現象であり、多くの被子植物で見られる。シロイヌナズナでは胚や分裂組織を除くほぼ全ての組織で倍加した細胞が生じるが、核内倍加を起こさない植物として木本植物の他、イネが知られる。核内倍加は主に 2 つの異なるプロセス (1) 通常の分裂を伴う細胞周期から核内倍加サイクルへの移行 [核内倍加の initiation] と、(2) 連続的な核内倍加サイクルの繰り返しによる倍数性の増加 [核内倍加の progression] から成り立っていると考えられる。シロイヌナズナからは核内倍加を開始できない変異体や 2 回以上の核内倍加サイクルを起こせない変異体が単離されてこないことから、本来区別されるべき 2 つのプロセスが混同して議論されているという問題点がある。

シロイヌナズナの倍加関連因子として知られるサイクリン A2 (CYCA2) が欠損すると、通常は核内倍加を起こさないイネが倍加を起こすことを明らかにした。植物種による核内倍加の有無は CYCA2 を介した倍加制御の仕組みに原因がある可能性があり、この因子が植物核内倍加に本質的に重要であると考えられた。

2. 研究の目的

イネ倍加変異体 *cyca2* は 2C と 4C の細胞だけからなることから、この変異体は initiation を起こすが progression を起こす事ができない表現型を示していると解釈できる。CYCA2 は少なくともイネでは核内倍加の initiation を抑制しており、CYCA2 とは別の因子により progression が抑制されていると考えられる。イネ倍加変異体を使って 4C 細胞の出現頻度に影響する種々の因子を明らかにできれば、核内倍加 initiation に関する分子機構の解明に大きく貢献できると考えられる。また initiation を起こした倍加変異体から 8C 以上の細胞を生じる因子を同定できれば progression の仕組みの理解、そこに関する因子の同定に繋がると考えられる。このように、これまで研究されてこなかったイネを材料とした核内倍加の知見をシロイヌナズナ研究に加味していくことで、核内倍加の個々のプロセスの分子レベルでの理解に大きく寄与することができると考えられる。

イネおよびシロイヌナズナにおいて CYCA2 制御機構を解析し、その比較から核内倍加を進化的な側面を含めて理解することを目指す。倍加したイネの変異体を利用して、これまでに知られていない倍加制御の仕組みを解明する。

3. 研究の方法

CYCA2 の周辺メカニズムを解明し、倍加制御の本質的なメカニズムの理解を目指す。

(1) CYCA2 の相互作用因子の同定と組織特性の解明

サイクリン CYCA2 は、核内倍加を起こさないイネと倍加を起こすシロイヌナズナの両方において倍加抑制に大きく寄与する因子であるが、その分子制御機構が異なる事が示唆された。シロイヌナズナ CYCA2 と相互作用することが知られている因子との相互作用を、形質転換体の作出および 2-hybrid 法により評価する。また、*cyca2* 変異体における倍加細胞の誘導を組織別に調べる。

(2) CYCA2 変異が細胞周期に与える影響

cyca2 変異体の倍加細胞の染色体の状態を免疫染色法で調べることにより、染色体分離の起きない核内倍加であることを確認する。EdU の取り込み実験により変異体の細胞周期を検出する。

(3) タンパクのドメイン機能の解析

CYCA2 タンパクは N-、C-末にサイクリンドメインを持つ。イネ *cyca2* 変異体では、CYCA2 特異的で機能未知な C-末のドメインの末端に欠損が生じており、弱い変異形質を示している可能性がある。そこで、CYCA2 の役割と A2 特異的ドメインの機能を検証するために、CRISPR/Cas9 を用いて CYCA2 の各ドメインに変異を導入した形質転換体の作出を行う。

(4) 新規倍加変異体の単離および評価

イネ CYCA2 に関する研究報告が 2018 年に Qu らによってなされた (doi:10.1093/jxb/ery158)。そこで、倍加抑制には複数の因子が関わっていると考えられたので、遺伝子の大規模欠損を生じる放射線変異体から新規倍加変異体の単離を行うとともに、CRISPR/Cas9 を利用して他の細胞周期関連因子の変異体を作成する。新規制御因子の同定と機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) CYCA2 分解系の制御因子として知られる CCS52A と CYCA2 との相互作用がイネでは見られなかったことから、シロイヌナズナとは異なる分解制御がイネで行われていることが示唆された。イネ *cyca2* 変異体の葉における倍加細胞の分布を調べたところ、倍加細胞は細胞分裂の過程で

増加するものではないことが示唆された。また、早い時期に展開する葉で高頻度に倍加細胞が検出されることから、個体の生育過程で何らかの倍加抑制メカニズムが強くなることが示唆された。

イネの胚乳は倍加する組織である。変異体ではその倍加頻度が促進されていたことから、胚乳での CYCA2 の機能はシロイヌナズナと同じである可能性が高く、CYCA2 の組織特異的な制御が考えられた。シロイヌナズナでは CYCA2 過剰発現により核内倍加の抑制が見られるが、イネでは野生型との違いは観察できなかった。

(2) *cyca2* 変異体では G2 期の顕著な延長がみられたが、一般的な核内倍加では観察されない染色体分離を生じていた。胚乳以外で誘導された変異体の倍加は、核内倍加とは異なる状態にあることが示唆された。倍加を誘導する薬剤のスクリーニングを行ったところ、クロマチン構造がイネ倍加抑制に影響を与えていることが示唆された。

(3) C-末ドメインの欠損個体は単離できなかった。このことから、C-末ドメインは必須であり、最初に単離した変異体が弱いアレルを示していることが明らかとなった。ドメイン欠損により個体を再生できなかったカルスでは 8C 細胞が生じていたことから、倍加の誘導が個体への分化を阻害していると考えられた。

(4) 倍加と関連した形質を示す放射線変異体 20 系統を入手した。しかし倍加の生じている個体は得られなかった。他の細胞周期関連因子に変異を導入したところ、葉での倍加は見られなかったが、ホモ個体での稔性低下が顕著であった。カルスからの再生効率は、CYCA2 と同様に低かったことから、これらの因子も細胞分化に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅根美佳、梅根一夫
2. 発表標題 Mutants of cell cycle related genes in rice
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅根美佳、長谷川淳子、松永幸大、伊藤正樹
2. 発表標題 なぜイネは核内倍加を起こさないのか
3. 学会等名 日本植物学会 第80回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 梅根美佳、坂本勇貴、長谷川淳子、松永幸大、伊藤正樹
2. 発表標題 核内倍加を起こさないイネにおける細胞増殖制御の特性
3. 学会等名 第58回 日本植物生理学会
4. 発表年 2017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
連携研究者	梅根 一夫 (Tsugane Kazuo) (50343744)	基礎生物学研究所・大学共同利用機関等の部局等・助教 (63904)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	前川 雅彦 (Maekawa Masahiko) (00142703)	岡山大学・資源植物科学・教授 (15301)	
連携研究者	伊藤 正樹 (Ito Masaki) (10242851)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	