

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21088

研究課題名(和文) 転写超複合体による植物の細胞周期制御とその作用メカニズム

研究課題名(英文) Cell cycle regulation by super complex of transcription factors in plants

研究代表者

鈴木 俊哉 (Suzuki, Toshiya)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：80773712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：動物では、複数の転写因子を含む転写超複合体によって、細胞周期特異的な遺伝子の発現が制御されることが報告されている。一方で、植物における制御の仕組みはよくわかっていなかった。本研究では、シロイヌナズナの遺伝子の中から動物の転写超複合体に含まれる因子と相同性のあるものを探索し、その突然変異体の表現型観察や網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、植物においても転写超複合体の存在が示され、細胞周期に関する遺伝子の発現を統合的に制御する仕組みの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In animals, the expression of cell cycle-specific genes is regulated by a super complex including multiple transcription factors. However, little is known about such a regulation mechanism in plants. In this study, I searched Arabidopsis genome for homologs of factors forming the super complex in animals, and carried out phenotypic observation and comprehensive gene expression analyses using the mutants of the homologous factors. The result showed the existence of the super complexes including some transcription factors in plants and revealed a part of the mechanism which comprehensively controls the expression of genes related to cell cycle regulation.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：細胞周期 転写因子

1. 研究開始当初の背景

細胞周期の過程では、S 期の DNA 複製や M 期の有糸分裂など、様々なイベントに必要な遺伝子を時期特異的に発現する仕組みが重要である。最近、細胞周期特異的な遺伝子を制御する主要な転写因子 (E2F と Myb) を含む転写超複合体 DREAM complex が、ヒトやショウジョウバエから発見されている。DREAM complex は、転写因子とそれらの機能を調節する複数の補助因子を含む複合体として生化学的に同定されたが、その機能や作用の仕組みには未だによくわかっていない。研究代表者らは、G2/M 期特異的な遺伝子発現に関する独自の研究を展開する中で、植物の細胞周期を制御する 2 種類の主要な転写因子 (E2F と R1R2R3-Myb) が、共通の複合体 (Myb-E2F 超複合体) に存在することを見いだした。この研究により、植物にも DREAM complex のような転写超複合体が存在する可能性が示された。

これまで植物の細胞周期では、E2F が DNA 複製などに関わる遺伝子群 (G1/S 期遺伝子) の転写を、R1R2R3-Myb が有糸分裂に必要な遺伝子群 (G2/M 期遺伝子) の転写をそれぞれ制御すると考えられてきた。しかし Myb-E2F 超複合体の発見は、細胞周期の進行に関連する遺伝子群の発現を包括的に制御する仕組みが存在することを示唆している。動物の DREAM complex の構成因子の一部は植物にもホモログとして存在することから、転写超複合体による細胞周期の制御には、動植物で一定の共通性があると考えられる。しかし研究代表者らの研究から、植物には動物とは異なる独自の制御メカニズムが存在することが示唆されている。まず植物の R1R2R3-Myb には転写を活性化するタイプ抑制するタイプが存在し、それぞれが異なる複合体を構成している点である。動物の Myb にそのようなタイプの違いが存在することは知られていない。また植物では発生の進行

にともなって、複合体の構成因子が変化していくこともわかっている。さらに DREAM complex の構成因子の中には植物にホモログが存在しないものもあり、植物の転写超複合体の実体は、動物の DREAM complex とは大きく異なるものであると予想される。

2. 研究の目的

細胞周期の中で、G1/S 期遺伝子と G2/M 期遺伝子がともに Myb-E2F 超複合体によって制御される仕組みには、どのような可能性が考えられるだろうか。E2F と R1R2R3-Myb には、ともに活性化型と抑制型が存在することが知られている。例えば S 期では活性化型 E2F と抑制型 Myb による複合体が、M 期では抑制型 E2F と活性化型 Myb による複合体が形成されているなど、働きの異なる Myb または E2F によって異なる複合体が構成されている可能性がある。また Myb-E2F 超複合体にも動物の DREAM complex のように複数の構成因子が含まれ、それらが転写因子の機能を調節していることも考えられる。そこで本研究ではこれらの可能性について検証するため、細胞周期の各時期で Myb-E2F 超複合体の構成因子を決定し、その構成が周期の中でどう変化していくかを明らかにする。

多くの植物種では、M 期をスキップして DNA 複製を繰り返すエンドリプリケーションが起こることが知られているが、これは G2/M 期遺伝子の発現が特異的に抑制されることで引き起こされると考えられる。また発生の進んだ器官を構成する細胞の大半は分裂を停止して分化した状態であるが、これは G1/S 期遺伝子と G2/M 期遺伝子の発現がともに抑制された状態と理解される。本研究ではこれらの制御に Myb-E2F 超複合体がどのように関与しているかを検証するため、エンドリプリケーションを起こしている細胞や分裂が停止した細胞における Myb-E2F 超複合体の構成因子を明らかにする。

細胞周期の各時期やエンドリプリケーション、細胞分裂の停止といった各局面において、Myb-E2F 超複合体の構成因子はダイナミックに変化していることが予想される。本研究ではそれぞれの局面で複合体が結合する DNA 配列を網羅的に同定し、Myb-E2F 超複合体がどのような構成のときに、どのような遺伝子に結合しているのかを明らかにする。

Myb-E2F 超複合体には、R1R2R3-Myb や E2F の機能を活性化または抑制する補助因子が含まれる可能性がある。本研究では、Myb-E2F 超複合体に含まれるそれら新奇の構成因子の機能も明らかにする。上述の実験から新規に同定された構成因子、および動物の DREAM complex を構成するタンパク質のホモログを対象として、それらの変異体や Myb および E2F との多重変異体を用いた解析を行う。

3. 研究の方法

(1) E2F の機能解析

Myb-E2F 超複合体を構成する主要な転写因子である E2F は、G1/S 期遺伝子の制御に関わることが知られている。シロイヌナズナには E2F をコードする遺伝子が 6 個存在し、E2FA~C、E2FD~F の 2 グループに分けられる。これまでにそれぞれの突然変異体の解析がなされてきたが、機能の冗長性により顕著な表現型は見られていなかった。そこで植物の生育過程における E2F の機能を明らかにするため、多重変異体を作成してその解析を行った。幼植物体を材料にして RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、細胞周期特異的な遺伝子の発現を網羅的に調べた。また変異体の生育の様子を詳細に観察し、細胞分裂や発生に異常が見られないかを顕微鏡観察によって調べた。

(2) ALY の機能解析

Myb-E2F 超複合体を構成する新奇因子の機能を明らかにするため、動物の DREAM

complex の構成因子と相同性のある因子をシロイヌナズナゲノムより探索した。その中でヒトの LIN9 と類似性の高い ALY に着目し、その突然変異体の解析を行った。変異体の様々な生育過程における表現型を観察し、RNA-seq による幼植物体のトランスクリプトーム解析を行った。同時に定量 PCR によって細胞周期特異的な遺伝子の発現量を調べ、ALY と R1R2R3-Myb および E2F との関連性を調べた。また GUS レポーターを用いて ALY のプロモーター解析を行い、植物体で発現する場所や時期についても調べた。さらに酵母ツーハイブリッド法を用いて、ALY と Myb-E2F 超複合体に含まれると考えられる各因子間との相互作用を調べた。

4. 研究成果

研究開始当初は、「研究の目的」で述べたように、細胞周期の各局面における Myb-E2F 超複合体の構成因子を決定する、そして構成因子の機能を明らかにするという主に二つの目的を設定していた。しかし研究を進めるにあたり、Myb-E2F 超複合体の構成因子を決める前に、個々の構成因子の役割をより詳細に明らかにすることが重要であると考えた。そこで後半の目的に重点を置いて研究を行い、Myb-E2F 超複合体の構成因子の機能に関する重要な知見を得ることができた。

(1) E2F の機能解析

シロイヌナズナに存在する 6 個の E2F 遺伝子のうち、E2FA と E2FB は活性化型、E2FC は抑制型であることがこれまでに報告されていた。しかしそれぞれの機能が欠損した突然変異体は異常を示さず、植物の生育における役割はよくわかっていなかった。そこで E2FA と E2FB の単独変異体を交配して E2FA と E2FB の機能がともに欠損した二重変異体を作成し、その表現型を調べたところ、受精直後の胚発生初期の段階で生育が止まってしまうことがわかった。その原因は、雄性配

偶体で起こる雄原細胞の分裂が阻害され、本来2つできるはずの精細胞が1つしかできず重複受精に失敗することになった。従って E2FA と E2FB は細胞分裂に必須であり、その機能には冗長性があることが遺伝学的にも明らかとなった。次に E2FA と E2FC の二重変異体を作成し、幼植物体を用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、E2F の標的であることが知られている遺伝子の大部分の発現が上昇していることがわかった。

残りの3つの E2F (E2FD、E2FE、E2FF) についても、それぞれ単独の突然変異体の生育はほぼ正常であった。またいずれの組み合わせの二重変異体も生育にはほとんど異常が見られなかったことから、三重変異体を作成してその表現型を調べた。その結果、三重変異体は葉などの器官や植物体全体が小さくなるものの、致死とはならないことがわかった。従ってこれら3つの E2F は機能に冗長性があるものの、E2FA や E2FB ほど生育に必須ではないことが明らかとなった。次に三重変異体の幼植物体から RNA を抽出してトランスクリプトーム解析を行ったところ、E2F の標的遺伝子の発現が顕著に上昇していることがわかった。これは E2FA と E2FC の二重変異体でも同様であったことから、シロイヌナズナにおける E2F の主要な機能は、G1/S 期遺伝子の抑制にあることが示された。これまで E2F には活性化型と抑制型があるとされてきたが、これらの結果はそれを覆す重要な発見である。

一方でトランスクリプトーム解析の結果から、E2F の変異体では R1R2R3-Myb の標的である G2/M 期遺伝子の発現に大きな影響は見られないことがわかった。逆にこれまでの研究から、R1R2R3-Myb の変異は E2F の標的遺伝子の発現にほとんど影響しないこともわかっている。以上の事実は、E2F と R1R2R3-Myb が同じ複合体に存在すると考え

られるにも関わらず、お互いの標的遺伝子には影響しないこと示している。今後は、これらが同じ複合体に存在する生物学的な意義を明らかにする必要がある。

(2) ALY の機能解析

動物の DREAM complex の構成因子と類似性の高い因子をシロイヌナズナゲノムより探索したところ、ヒトの LIN9、LIN54、RBBP4 とよく似たタンパク質がそれぞれ3個、8個、5個存在することがわかった。それらの中で、LIN9 と相同性のある ALY1、ALY2、ALY3 に着目し、植物の Myb-E2F 超複合体の構成因子の候補として解析を行った。それぞれの単独変異体を入手して表現型を調べたが、生育などに異常は見られなかった。ALY は機能が重複していると考えられたため、単独変異体の交配による三重変異体の作出を試みた。しかし配偶体の致死性のため得ることができなかったため、二重変異体の解析を行なった。その結果、種子や幼植物体のサイズが大きくなる、受精後の胚の発生に異常を示すなど、抑制型の R1R2R3-Myb の変異体とよく似た表現型が見られた。特に ALY1 と ALY2 の二重変異体が最も強い表現型を示し、雌性配偶体の形成異常や、雄性配偶体で起こる雄原細胞の分裂停止などが高頻度で観察された。これまで ALY の機能は全くわかっていなかったが、本研究から配偶体形成や胚の発達に必須の役割を果たしていることが初めて明らかとなった。

表現型の解析と並行して、GUS レポーターを用いて ALY1 と ALY2 のプロモーター解析を行った。その結果、いずれも幼植物体の全体で発現し、発現のパターンは細胞周期特異的ではないことが示された。

続いて ALY1 と ALY2 の二重変異体の幼植物体を用いて、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、発現が上昇していた遺伝子の中に、E2F のターゲットである G1/S 期遺伝子と R1R2R3-Myb のターゲ

ットである G2/M 期遺伝子が多く含まれることがわかった。定量 PCR 解析により、G1/S 期遺伝子の発現上昇は ALY1 と ALY3、ALY2 と ALY3 それぞれの二重変異体でも確認された。さらに詳細な解析により、ALY1 と ALY2 の二重変異体における G1/S 期遺伝子の変動は、上述の E2FA と E2FC の二重変異体のそれと非常に似ていることがわかった。これは ALY と E2F が協働して G1/S 期遺伝子を制御（多くは抑制）し、ALY が E2F-Myb 超複合体の一員として機能していることを強く示唆するものと考えられた。一方で、G2/M 期遺伝子の変動は、R1R2R3-Myb の変異体と比較しても相関性が見られなかった。これは ALY による G2/M 期遺伝子の制御に、R1R2R3-Myb は直接関与しないことを示している。今後は、ALY が R1R2R3-Myb を介さずにどのように G2/M 期遺伝子の発現を抑制しているかを明らかにする必要がある。

ALY が E2F と協働して G1/S 期遺伝子を制御している可能性が示されたため、酵母ツーハイブリッド法を用いて ALY と E2F との相互作用を調べた。E2F の他にも R1R2R3-Myb など、Myb-E2F 超複合体に含まれると想定される複数の因子との相互作用も調べたが、ポジティブな結果は得られなかった。今後は酵母の生育条件を再検討することや、相互作用を調べる他の実験によって検証することが必要である。

（3）今後の展望

本研究は、細胞周期特異的な遺伝子を統合的に制御する Myb-E2F 超複合体の構成因子の解析に重点を置き、複合体に含まれる可能性のある新奇の構成因子を発見するなど、多くの重要な知見を得た。一方で、細胞周期の各局面における Myb-E2F 超複合体の構成因子を決定する、という本研究で設定していたもう一つの目的を達成することができなかった。今後は、共免疫沈降などによって構成因子のメンバーを決定し、さらに複合体が結

合する DNA 配列を ChIP-seq 法によって網羅的に同定することで、Myb-E2F 超複合体による細胞周期の包括的な制御メカニズムが明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊哉 (SUZUKI, Toshiya)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：80773712