

令和元年6月3日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15415

研究課題名(和文)植物のDNA倍加誘導におけるエピジェネティック制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Role of epigenetic regulation in inducing endoreplication in plants

研究代表者

高塚 大知 (Takatsuka, Hiroto)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：70633452

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):研究代表者は、G2期にクロマチン緩和することが「有糸分裂」から「DNA倍加」への移行に必須であることを見出している。本研究で、研究代表者は、G2期進行の中心的因子であるCDKB1がヘテロクロマチンを凝縮する働きを持つことを見出した。更に、CDKB1に制御され、ヘテロクロマチン化を促進する因子の同定を進めた結果、当初予想していたATXR6でなく、CAF-1複合体の構成因子であるFAS1とFAS2がCDKB1によってリン酸化されることを見出した。これらの結果より、CDKB1-CAF-1経路が存在し、ヘテロクロマチン化を促進することで分裂からDNA倍加への移行を阻害する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が分裂せず、DNA複製のみを繰り返す「DNA倍加」は細胞・器官サイズの増大をもたらすため、植物バイオマスの重要な原動力である。しかし、「分裂を続けるか」「DNA倍加して細胞を巨大化させるか」を植物がどのように選択しているかは未だ明らかになっていない。本研究で、研究代表者は、「CDKB1」というリン酸化酵素が特定の基質をリン酸化することで、「分裂をするか」「DNA倍加を始めるか」を決めている可能性を明らかにした。今後、更にこの関係性を詳細に解析することで、植物の成長を自在にコントロールできる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文):Chromatin condensation during G2 phase is crucial for the transition from mitotic cycle to endoreplication. In this study, I found that CDKB1, a central regulator of G2 progression, have a promotive function in chromatin condensation. Moreover, my biochemical analyses revealed that CDKB1 directly phosphorylates FAS1 and FAS2, both of which are components of CAF-1 complex which plays an important role in heterochromatin formation. These results suggest the possibility that CDKB1-CAF-1 pathway promotes heterochromatin formation, thereby inhibiting the transition from mitotic cycle to endoreplication.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：細胞周期 細胞分裂 DNA倍加 細胞成長 細胞骨格 クロマチン エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂を伴わずに DNA 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。しかし、DNA 倍加の分子メカニズムの全貌は殆ど分かっていない。研究代表者はこれまでに DNA 倍加には DNA 複製後の特定のステージ(G2 期)での染色体構造の緩和が必須であり、それが特定のエピジェネティック修飾を介して行われている可能性を示唆する結果を得ている。先行研究により、細胞周期の制御を司るサイクリン依存性キナーゼの一種である CDKB1 が G2 期の進行を制御することで「DNA 倍加に移行するか」、「細胞分裂を続けるか」の決定に中心的な役割を担うことが知られていた。しかし、CDKB1 による細胞周期様式の選択を決定する分子メカニズムの実体は未知であった。また CDKB1 がクロマチン動態を制御することで G2 期の進行を促進しているかについても知見が得られていなかった。

### 2. 研究の目的

細胞が分裂せず、DNA 複製のみを繰り返す「DNA 倍加」は細胞・器官サイズの増大をもたらすため、植物バイオマスの重要な原動力である。しかし、「分裂を続けるか」「DNA 倍加して細胞を巨大化させるか」を植物がどのように選択しているかは未だ明らかになっていない。本研究で、申請者は、「CDKB1」という DNA 倍加への移行阻害に決定的な役割を担うリン酸化酵素による「分裂促進および DNA 倍加移行阻害」の制御系を理解するため、CDKB1 の下流でリン酸化され、クロマチン動態を制御する因子の同定を目的とし、研究を遂行した。

### 3. 研究の方法

#### (1)CDKB1 による G2 期クロマチン動態制御の解析

まず、CDKB1 が G2 期にクロマチン動態を制御する働きを持つかを明らかにするため、CDKB1 の発現が低下した変異株の G2 期細胞を DAPI 染色し、クロマチンが凝集した領域であるヘテロクロマチンの大きさを測定した。

#### (2)CDKB1 の基質となるクロマチン制御因子の同定

先行研究により、クロマチン動態に大きな影響を及ぼすことが報告されている ATXR6、CAF-1 複合体に着目し、*in vitro* リン酸化アッセイによりこれらの因子が CDKB1 によるリン酸化を受けるかを解析した。

また、CDKB1 による FAS1 と FAS2 のリン酸化部位を同定するため、*in vitro* でリン酸化させた FAS1 および FAS2 タンパク質を LC/MS 解析に供した。

#### (3)遺伝学的解析による CDKB1-CAF-1 経路の検証

CDKB1 と CAF-1 複合体が同一経路で作用しているかを明らかにするため、CDKB1 およびその活性調節因子である CYCA2;3 の変異体と CAF-1 複合体の構成因子である FAS2 の変異体を交配し、多重変異体を作成し、遺伝学的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)CDKB1 による G2 期クロマチン動態制御の解析

ヘテロクロマチンのサイズを測定した結果、*cdkb1* 変異体では野生型に比べ、顕著にヘテロクロマチンサイズが低下していた。これは *cdkb1* 変異体においてヘテロクロマチンが緩和していることを示す。つまり、CDKB1 は G2 期にクロマチンの凝縮を促進するという、これまでに知られていない新たな役割を持つことを明らかにした。

#### (2)CDKB1 の基質となるクロマチン制御因子の同定

*in vitro* リン酸化アッセイを行った結果、CDKB1 による ATXR6 のリン酸化は検出されなかった。一方、CAF-1 複合体の構成因子のうち、MSI1 はリン酸化されなかったが、FAS1 と FAS2 は CDKB1 によるリン酸化を受けることを見出した。

また、LC/MS 解析の結果、FAS1 は 772 番目のセリン、FAS2 は 469 番目のスレオニンがリン酸化を受けることが明らかになった。このリン酸化部位の保存性を調べたところ、植物では高度に保存されているのに対し、動物の FAS1/2 ホモログでは保存されていなかった。

これらの結果は、CDKB1 による FAS1/2 のリン酸化を介した CAF-1 の制御は植物独自の制御系である可能性が示唆された。

#### (3)遺伝学的解析による CDKB1-CAF-1 経路の検証

*cdkb1 fas2* 変異体の作出を試みたが、両者をホモで欠損した多重変異体は得られなかった。これは、*cdkb1 fas2* 変異体が致死性を示すことが原因である可能性が考えられたため、CDKB1 の活性調節因子である CYCA2;3 と FAS2 の二重変異体の作出を行った。その結果、*cyca2;3 fas2* 二重変異体は *fas2* 変異体と同程度の倍数性を示した。この結果は、CDKB1/CYCA2;3 複合体と CAF-1 複合体が同一経路で作用する可能性を示唆する。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

**Hiroto** **Takatsuka** and Masaaki Umeda. (2019) “ABA inhibits root cell elongation through repressing the cytokinin signaling” *Plant Signaling & Behavior*, 14, e1578632. (査読あり)

**Hiroto** **Takatsuka**, Takumi Higaki and Masaaki Umeda. (2018) “Actin reorganization triggers rapid cell elongation in roots” *Plant Physiology*, 178, 1130-1141. (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

1) **Hiroto** **Takatsuka** and Masaaki Umeda. (2019) “Control of histone methylation at the onset of endoreplication” 日本植物生理学会 第 60 回大会

2) 富永基樹、**高塚大知**、段中瑞、川羽田俊、田中美聡、原口武士、金澤建彦、伊藤光二、上田貴志、梅田正明 (2019) 「原形質流動はどのようにして植物の成長を制御するのか」日本植物生理学会 第 60 回大会

3) 鈴木信一郎、**高塚大知**、梅田正明 (2019) 「イネの細胞周期進行におけるヒストンメチル化の役割」日本植物生理学会 第 60 回大会

4) 安喜史織、Aida Nazlyn Binti Nazari、高橋直紀、**高塚大知**、梅田正明 (2018) 「植物ホルモンによるクロマチン構造変化を介したゲノム恒常性維持機構」日本分子生物学会年会 第 41 回大会 (招待講演)

5) **高塚大知** (2018) 「根の表皮細胞の細胞成長メカニズム」細胞骨格研究会 第 4 回大会

6) **Hiroto** **Takatsuka** and Masaaki Umeda. (2018) “Control of Chromatin Structures along Differentiation Trajectories” 日本植物生理学会 第 59 回大会シンポジウム (招待講演)

7) **高塚大知** (2018) “Cells elongate with polarity in roots of Arabidopsis” 細胞骨格研究会 第 3 回大会

8) **Hiroto** **Takatsuka** and Masaaki Umeda (2018) “Atrichoblast epidermal cells elongate with polarity in Arabidopsis roots” International Plant Molecular Biology

9) Teruki Sugiyama, **Hiroto** **Takatsuka** and Masaaki Umeda (2018) “Control of Stem cell division by fine-tuning Cyclin-dependent kinase activity” International Symposium on Auxins and Cytokinins in Plant Development

10) **Hiroto** **Takatsuka** and Masaaki Umeda (2017) “Roles of epigenetic regulation in inducing endoreplication in plants” Plant Organ Growth Symposium

11) **高塚大知**、梅田正明 (2017) 「クロマチン構造制御による DNA 倍加誘導」日本植物細胞分子生物学会 第 35 回大会

12) 杉山輝樹、**高塚大知**、梅田正明 (2017) “Control of the cell cycle in two distinct cell files of the root epidermis” 日本植物生理学会 第 58 回大会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：梅田正明、長岐清孝

ローマ字氏名：Masaaki Umeda, Kiyotaka Nagaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。