

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06288

研究課題名(和文) 高頻度に起こる植物のゲノム倍加の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of polyploidization in plants

研究代表者

小牧 伸一郎 (Komaki, Shinichiro)

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：50584588

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)： 種子植物はその進化の過程で何度もゲノムを倍加させてきた。研究代表者はこれまでの研究より、このゲノム倍加に紡錘体形成チェックポイント(SAC)が関与することを明らかにしてきた。動物では、Chromosomal passenger complex (CPC)がSACの制御に関わることが知られているが、植物CPCの機能は不明であった。

本研究では、植物CPCの構成因子であるBorealinを初めて見つけ出し、他の構成因子と共にCPCの局在を制御することで、ゲノムの維持に働くことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム倍加を起こした植物は大きく育つ特性を持つことから、農業的にも非常に重要な現象であるが、その分子機構は分かっていない点が多い。

本研究では、このゲノム倍加に関わると考えられるChromosomal passenger complexの構成因子を植物で初めて見つけ出し、その機能を明らかにすることに成功した。この研究成果は、植物のゲノム維持機構の生物学的解明に寄与するとともに、将来的には、安定したゲノム構成を持つ倍加作物の作製にも繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)： During evolution, whole-genome duplication (WGD) has occurred multiple times in plants, but its molecular mechanisms are not yet clear. Previously, we revealed that the spindle assembly checkpoint (SAC) has a crucial role in WGD. Since the chromosomal passenger complex (CPC) is essential for the SAC activation and proper cell division in animals and yeast, we investigated whether CPC activity exists in plants and how the potential complex is composed.

In this study, we have identified a homolog of Borealin, one of the core CPC subunit, in Arabidopsis. Together with detailed localization studies including the putative Arabidopsis INCENP homolog, these results support the existence of a CPC and its importance in genome stability in plants.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：染色体パッセンジャー複合体 紡錘体形成チェックポイント ゲノム倍加

1. 研究開始当初の背景

ふだん我々が目にする作物の多くは、ゲノム倍加を起こしている。ゲノム倍加を起こした植物は2倍体の植物と比べ、各細胞のサイズが大きくなるなど個体としても大きくなる。つまり古代から人類が行ってきた収量を基準とした育種は、無意識のうちにゲノム倍加した植物を選抜してきた結果ともいえる。現在の育種においても、コルヒチンなど微小管を破壊する薬剤を用いることで、人為的にゲノム倍加を起こした作物を作り出すことが盛んに行われている。また近年の研究から、現存する全ての高等植物はその進化の過程で少なくとも3度のゲノム倍加を起こしていることが明らかとなった。つまり、ゲノム倍加が容易に起こる性質は植物が元来有している有用な特徴であり、農学的そして生物学的にも非常に興味深い特徴であるが、その分子機構は分かっていなかった。

研究代表者は、これまでの研究よりこのゲノム倍加が起こりやすい植物の性質に Spindle assembly checkpoint (SAC) が関与していると考えた。細胞周期には遺伝情報を正確に次世代に伝えるために、いくつものチェックポイントが存在する。その中で、M期のチェックポイントである SAC は、全ての染色体と微小管が結合するまで Anaphase promoting complex / cyclosome (APC/C) の活性を阻害することで、細胞周期をM期中期に停止させる。そのため、細胞は低温など染色体と微小管の結合が不安定になるストレス条件下においても、SACの機能により中期に留まる時間を長くすることで不均等な染色体分配の発生を防ぐことができる。このように本来はストレス条件下でのゲノムの安定性に重要な SAC であるが、動物細胞ではこの SAC の機能が「継続的」なストレス条件下においては逆に、負の影響を持つことが知られている。つまり、動物細胞はストレスが続いている限り SAC によって細胞周期が中期で停まってしまふ。そのため長時間 (ヒトの細胞では約20時間) ストレスが続くと、細胞は SAC を解除できないまま異常に分裂を終えてしまい、アポトーシスやガン化を起こす。一方、研究代表者は植物細胞では継続的なストレス条件下の反応が動物とは異なることを報告した。具体的には、植物細胞は微小管が不安定な状況に継続的に晒されても、短時間 (シロイヌナズナの細胞では約90分) で SAC を自らシャットオフすることを明らかとした。興味深いことに SAC をシャットオフした後の細胞は、S期で複製した全ての染色体を保持することから、ゲノム倍加を起こした状態の細胞になることがわかった。つまり上述のゲノム倍加が起こりやすい植物の性質は、ストレス条件下においても短時間で SAC をシャットオフする植物に特徴的な制御に深く関与していると考えられたが、その分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

植物ではこれまで SAC の研究がほとんど行われておらず、研究代表者によって初めて植物での SAC の存在が示された。またその研究結果から明らかとなった植物に特異的な SAC 制御機構は、ゲノムを正確に次世代に伝えるという生物にとって最も重要な課題と相反する性質を持っていることがわかった。つまり、この制御機構の詳細を明らかにすることで、様々な危険性を含むゲノム倍加という現象を高頻度で起こす植物の生存戦略に新たな解釈を生み出せると考えた。そこで、本研究では「ストレス条件下での短時間で起こる SAC のシャットオフ」という植物特有の SAC 制御機構を明らかにすることで、「なぜ植物のゲノ

ムは倍加しやすいのか？」という問いに答えることを目的とした。具体的には、SAC の活性化に重要な Chromosomal Passenger Complex (CPC)の機能に注目し、研究を進めた。

3. 研究の方法

動物細胞では、SAC の活性化因子である MPS1 の局在および活性が Aurora kinase, INCENP, Survivin そして Borealin の4種類のタンパク質複合体から構成される Chromosomal Passenger Complex (CPC) によって制御されることが知られていたが(図1)、植物ではCPCの構成因子の多くが見つかっていなかった。研究代表者は、これまでの研究から、未発見であった植物の Borealin のホモログ(BORR)の候補をシロイヌナズナで同定していた。そこで本研究では、その BORR の機能解析を通じて、植物 CPC とゲノム維持の関係性を調べた。具体的には、(1) BORR と他の CPC 構成因子の結合解析、(2) BORR の細胞内局在解析、そして (3) BORR の変異体解析を行った。

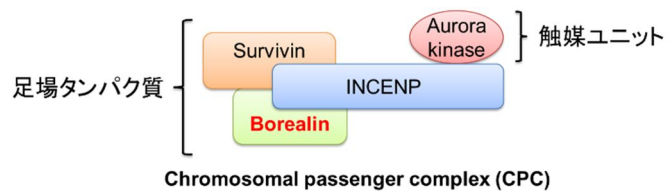


図1. CPC 複合体構成因子

CPC は Borealin、INCENP、Survivin からなる足場タンパク質と触媒ユニットである Aurora kinase から構成される

4. 研究成果

本研究を始めるにあたり、研究代表者は、植物で未発見であった CPC の構成因子である Borealin ホモログの候補を、発現解析とシーケンスの相同性の詳細な解析より見出していた。CPC は、動物では SAC の活性化に必要であることが知られていたことから、植物での CPC の機能解析を進めることとした。

(1) BORR と他の CPC 構成因子の結合解析

モデル植物であるシロイヌナズナで新規に発見した遺伝子である BORR は、動物の Borealin と非常に弱いシーケンスの相同性が見られたものの、ホモログであるかどうかは分かっていなかった。また、植物では、他の CPC 構成因子である INCENP も CPC として機能するかどうか不明であった。一方、CPC の触媒ユニットである Aurora kinase の存在は確認されており、シロイヌナズナでは AUR3 が CPC の構成因子であると考えられていた。そこで、BORR、INCENP、AUR3 の間での結合解析を行った。初めに酵母ツーハイブリッド解析を行ったところ、AUR3 と INCENP の結合が確認されたことから、植物の INCENP も CPC の構成因子であることが初めて分かった。しかし、BORR と他の CPC 構成因子での間の結合は確認できなかった。そこで、より生体内での結合状態に近い条件で実験を行うために、免疫沈降法(IP)による結合確認を行った。GFP:INCENP と BORR:RFP を共発現させた植物体を作製し、GFP 個体を用いた IP を行ったところ、BORR:RFP と結合が観察された。これらの実験より、BORR は INCENP、AUR3 とともに CPC を形成することが明らかとなった。

(2) BORR の細胞内局在解析

次に、BORR に GFP を融合し、細胞内局在を観察することで、植物 CPC の機能解析を行うこととした。作製した BORR:GFP を、微小管マーカーである RFP:TUA5 を発現する植物に導入し、細胞周期における BORR の局在変化を調べた(図 2)。すると、分裂前期から中期までは、GFP シグナルがキネトコアに観察されたが、後期の始めには、そのシグナルが植物特有の微小管構造物であるフラグモプラストの中央部へと局在変化することが分かった。このキネトコアでの BORR の局在をより詳細に調べるために、inner kinetochore に局在する RFP:CENH3 との共局在を調べることにした。すると、BORR:GFP のシグナルは RFP:CENH3 のシグナルよりさらに内側に観察されたことから、inner centromere に局在することが明らかとなった。動物では、CPC が inner centromere に局在することで、SAC の活性化因子である MPS1 の制御に関わることや、異常な染色体分離の監視を行っていることが知られている。本研究で行ったの局在解析より、植物の CPC も同様の機能を備えていることが示唆された。

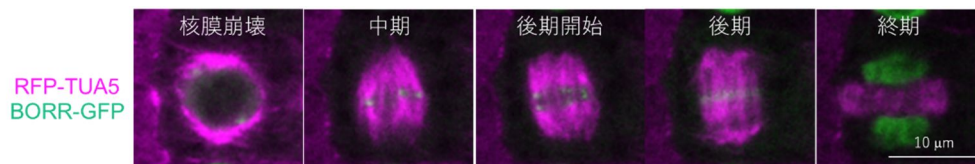


図 2. BORR の細胞周期における局在変化

核膜崩壊後、inner kinetochore に局在した BORR:GFP が、後期にはフラグモプラストの中央部に局在を変化させることが観察された。

(3) BORR の変異体解析

シロイヌナズナの BORR には変異体が存在しなかったため、CRISPR/Cas を用いた変異体の作出を行った。BORR 遺伝子の 2 番目のエキソンに T が挿入された *borr-1* は null 変異体であり、ホモ個体が得られなかったことから、BORR は植物の生存に必須の遺伝子であることが分かった。また、*borr-1* のヘテロ個体から得られた胚を観察したところ、異常な分裂が見られた。胚発生以降の BORR 遺伝子の機能を調べるために、artificial microRNA interference (amiRNAi) を用いた、BORR 遺伝子発現抑制株 (*amiBORR*) の作製を行った。得られた *amiBORR* 変異体は生長が著しく抑制されたことから、根の分裂領域を調べたところ、異常な分裂が起きていることが観察された。この異常な分裂の原因を解明するために、染色体のマーカーである GFP:CENH3 を導入し、その動態を共焦点レーザー顕微鏡によって調べた。すると、*amiBORR* 変異体では、細胞の分裂時に、分裂面に取り残された染色体 (lagging chromosomes) が高頻度で見られ、ゲノムが不安定になっていることが分かった(図 3A,B)。BORR は CPC の構成因子であり、染色体分離に関わる Aurora kinase の局在を制御していることが考えられた。そこで、シロイヌナズナの Aurora kinase の 1 つである AUR3 に GFP を連結し、*amiBORR* 変異体内での局在を観察した。すると、野生型と比べ、*amiBORR* 変異体では AUR3 のキネトコアへの集積が著しく低下していることが明らかとなった(図 3C,D)。

CPC は SAC と共に、細胞分裂時のゲノム維持に必須のチェックポイント機構として働く重要な複合体であるが、これまでその存在が植物では確認されていなかった。本研究により、植物の Borealin ホモログである BORR は、CPC の構成因子として AUR3 のキネトコ

ア局在を制御することで、分裂時のゲノムの維持に関わっていることが分かった。今後、植物のCPCが、MPS1の局在および活性に寄与するかどうかを調べることで、「ストレス条件下での短時間で起こるSACのシャットオフ」という、植物特有のSAC制御機構の解明を進める予定である。

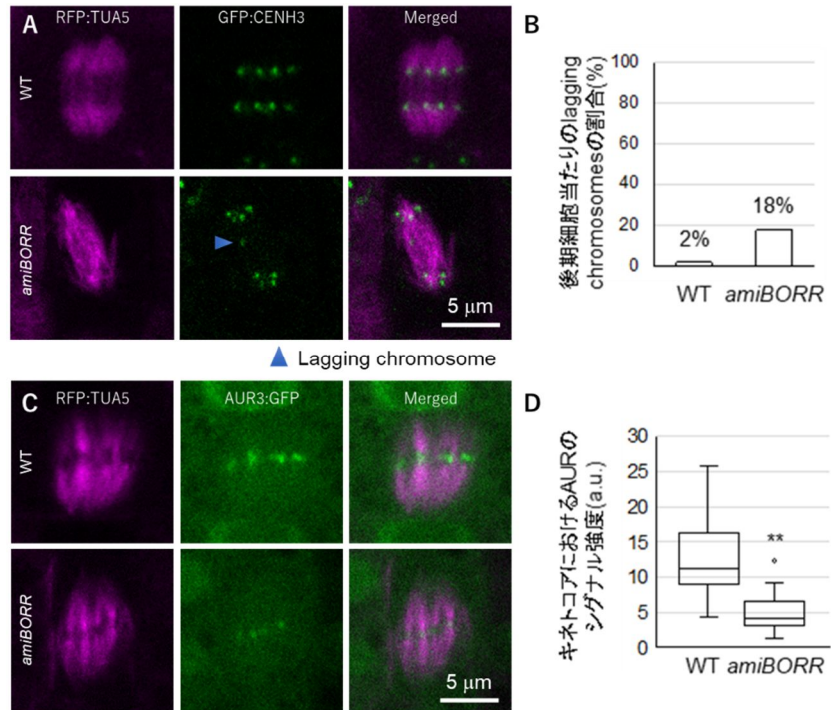


図3. *amiBORR* 変異体の表現型解析

A-B, 野生型と *amiBORR* 変異体に RFP:TUA5 および GFP:CENH3 を共発現させ、lagging chromosomes の頻度を測定した。C-D, 野生型と *amiBORR* 変異体に RFP:TUA5 および AUR3:GFP を共発現させ、キネトコアにおける GFP のシグナル強度を測定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 小牧伸一郎・橋本隆	4. 巻 9
2. 論文標題 植物におけるSpindle assembly checkpoint	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BSJ-Review	6. 最初と最後の頁 169-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24480/bsj-review.9c7.00146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Komaki Shinichiro, Takeuchi Hidenori, Hamamura Yuki, Heese Maren, Hashimoto Takashi, Schnittger Arp	4. 巻 183
2. 論文標題 Functional Analysis of the Plant Chromosomal Passenger Complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1586 ~ 1599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.20.00344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Balboni Martina, Yang Chao, Komaki Shinichiro, Brun Jordan, Schnittger Arp	4. 巻 30
2. 論文標題 COMET Functions as a PCH2 Cofactor in Regulating the HORMA Domain Protein ASY1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 4113 ~ 4127.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.07.089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Komaki S, Hamamura Y, Hesse M, Hashimoto T, Schnittger A
2. 発表標題 Identification and characterization of a putative Borealin in Arabidopsis
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Komaki S, Schnittger A, Hashimoto T.
2. 発表標題 The spindle assembly checkpoint as a gatekeeper of polyploidization
3. 学会等名 The 90th Annual Meeting of the Genetics Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Komaki S, Hamamura Y, Hesse M, Hashimoto T, Schnittger A.
2. 発表標題 Identification and characterization of a putative Borealin in Arabidopsis
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Komaki S, Lampou K, Hamamura Y, Hashimoto T, Schnittger A
2. 発表標題 The spindle assembly checkpoint in plants as a gateway to polyploidization
3. 学会等名 Plant Biology 2019 (ASPB meeting) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小牧 伸一郎, Hesse M, 橋本 隆, Schnittger A
2. 発表標題 植物におけるSurvivin 機能的ホモログの解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------