

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660290

研究課題名(和文) 転写超複合体による植物細胞周期の包括的制御とその分子実体

研究課題名(英文) Molecular identity of large protein complexes with potential roles in cooperative regulation of different phases in plant 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の発生において細胞分裂を時空間的に制御するためには、細胞周期に関わる遺伝子の発現を適切にコントロールする必要がある。このような細胞周期遺伝子を制御する主要な転写因子として、G1/S期制御に関わるE2FとG2/M期制御に重要なMYB3Rが知られている。本研究では、植物のMYB3RとE2Fが同一のタンパク質複合体に存在していることを初めて明らかにし、それが動物において知られるDREAM complexと進化的に関連している可能性を示した。またシロイヌナズナには、このような複合体が複数種類存在することなど、この複合体が示す植物特有の性質を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Proliferation of plant cells should be regulated spatially and temporally during plant organ growth. This regulation largely relies on the proper transcriptional regulation of the cohort of genes with cell cycle-related functions. Among them, two main classes of genes, G1/S- and G2/M-specific genes, are known to be regulated by families of transcription factors, called E2F and MYB3R, respectively. In this study, we first showed that MYB3R and E2F family proteins are present together in the same multi-protein complex in plants, which may be evolutionarily related to the protein complex, known as DREAM complex in animals such as human, fly, and worm. Unlike other organisms, plants specifically express multiple DREAM-like protein complexes that contain different members from E2F and MYB3R families and probably have distinct functions in the cell cycle.

研究分野：植物生理学

キーワード：転写因子複合体 細胞周期 Myb転写因子 E2F シロイヌナズナ DREAM複合体

1. 研究開始当初の背景

植物の成長はメリステムにおける継続的な細胞分裂と、メリステムから離脱した細胞における分裂の停止と分化によって引き起こされている。メリステムにおける細胞分裂には、細胞周期の各ステージを規則正しく移行させるための制御が必要であり、このためには細胞周期の特定のステージに、次のステージへの移行に必要な遺伝子を発現させることが重要である。また、シロイヌナズナをはじめとする多くの植物種では、細胞分裂の停止に伴って M 期をスキップする特殊な細胞周期、すなわちエンドリプリケーションサイクルを起こし、その結果、核内 DNA 量の倍加と細胞サイズの増大が引き起こされる。このため、植物の発生における細胞分裂の停止には、とりわけ細胞周期中の G2/M 期における制御が重要であると考えられている。

細胞周期中で発現が変動する主要な遺伝子群として、DNA 複製などに機能をもつ G1/S 期遺伝子と、有糸分裂や細胞質分裂に機能する G2/M 期遺伝子の 2 つのクラスが知られている。動物細胞の研究により G1/S 期遺伝子の多くは進化的に保存された E2F 転写因子によって共通に制御されることが明らかにされている。一方、G2/M 期遺伝子群の転写制御に中心的な役割を持つ転写因子として R1R2R3 型 Myb が本研究代表者らにより同定されている。

シロイヌナズナに 5 個存在する R1R2R3 型 Myb は MYB3R と名づけられており、これまでの逆遺伝学的な研究から以下のことがわかっている。(1) MYB3R ファミリーには転写活性化因子として働くもの(活性化型 MYB3R)と転写抑制因子として働くもの(抑制型 MYB3R)の両方が存在している。(2) 活性化型 MYB3R である MYB3R4 は、それ自身が G2/M 期に特異的に発現しており、MYB3R1 と共にメリステムにおいて G2/M 期遺伝子の発現を誘導し、細胞質分裂をはじめとする M 期の進行を正に制御している。(3) 抑制型 MYB3R である MYB3R3 と MYB3R5 は、メリステムの細胞とメリステムを離脱した細胞の両方において G2/M 期遺伝子の転写を負に制御している。(4) メリステムの細胞における抑制型 MYB3R の機能は、G2/M 期以外の細胞周期の時期に標的遺伝子の発現を抑制し、発現の起きる期間を G2/M 期に限定することである。(5) 一方、メリステムを離脱した細胞では、抑制型 MYB3R は G2/M 期遺伝子を継続的な抑制状態に保つために必要である。このように、活性化型 MYB3R と抑制型 MYB3R の協調的な働きにより、増殖中の細胞と増殖を停止した細胞(休止細胞)の両方において、G2/M 期遺伝子の発現を適切に制御し、細胞周期の規則的なイベントの進行を支え、発生における時空間的な細胞分裂の制御を可能にしている。しかし、これらの MYB3R がどのようにして下流遺伝子

の転写を制御しているのかについて、生化学的な知見はまだほとんど得られていない。

2. 研究の目的

抑制型 MYB3R3 の標的遺伝子を網羅的に同定する目的で、MYB3R3-GFP を発現するシロイヌナズナを用いて、クロマチン免疫沈降と次世代シーケンスを組み合わせた ChIP-seq 解析を行った。その結果、MYB3R3 は期待通りに *in vivo* において G2/M 期遺伝子群の上流域に結合していることが示されたが、それ以外の標的遺伝子として、E2F に制御される G1/S 期遺伝子群が数多く同定された。シロイヌナズナの E2F 標的遺伝子には、E2F 結合モチーフが高度に濃縮されているが、MYB3R の標的配列である MSA エlement にはそのような濃縮が見られないことから、MYB3R は E2F 標的遺伝子に直接結合するのではなく、E2F との複合体形成により間接的に結合していると考えられた。このように Myb と E2F を同時に含むタンパク質複合体として、ショウジョウバエの dREAM complex が知られている。類似のタンパク質複合体は、ヒトやセンチュウにも知られており、機能や構造が進化的に保存されている可能性が指摘されている。ヒトの DREAM complex には、抑制型の E2F (E2F4/5)、E2F とヘテロ二量体を形成する DP、Rb 関連タンパク質 (p130/p107) のほかに、5 個のタンパク質 (LIN9/Mip130, LIN37/Mip40, LIN52, LIN54/Mip120, LIN53/Caf1/RBRP4) からなるコア複合体 (MuvB コア) が含まれており、タンパク質 8 個以上からなる大きな複合体として存在している。これらの複合体では Myb と E2F が共通の MuvB 複合体に異なる時期に結合する場合(ヒト)や同じ複合体に同時に存在する場合(ショウジョウバエ)などがあり、Myb と E2F の機能がこの複合体を通じて密接に関連していると考えられている。このような観察から、DREAM complex は細胞周期関連の多くの遺伝子の転写制御を統合する役割を担っている可能性が指摘されているが、研究の歴史が浅く、まだ多くのことは明らかにされていない。本研究では、シロイヌナズナにおいて MYB3R と E2F が同一の複合体に含まれているかどうか、そして、それが進的に保存された植物版の DREAM complex であるのかについて明らかにすることを目的とした。さらに、本研究から、動物においても未だ完全な理解に至っていない、この謎に満ちたタンパク質複合体の機能やその制御について知見が得られることを期待した。

3. 研究の方法

(1) 共免疫沈降解析

MYB3R3-GFP あるいは GFP-MYB3R4 を発現する形質転換シロイヌナズナの芽生え、または葉を用いて、乳鉢、乳棒により全可溶性タ

ンパク質を抽出した。抗 GFP 抗体が結合した磁性ビーズを用いて免疫沈降を行い、精製された沈降物をイムノプロット解析、または質量分析によるプロテオミクス解析に供した。

(2) 質量分析によるタンパク質複合体の解析
抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降により精製したサンプルをトリプシン処理後、質量分析 LC-MS/MS (Orbitrap-Elite, Thermo Fisher Scientific 社)に供した。質量分析による解析や、データ処理の詳細は文献 を参照。

(3) AlphaScreen によるタンパク質間相互作用解析
PCR により目的タンパク質のコード配列を増幅し、*in vitro* transcription の鋳型として用いた。AlphaScreen による相互作用解析のため、PCR の際に FLAG タグ、または BAP タグを末端に付加して cDNA を合成した。*in vitro* transcription により合成した RNA に対して小麦胚芽抽出物を用いて *in vitro* translation を行い、タグが付加されたタンパク質を合成した。PerkinElmer 社の AlphaScreen のシステムを用い、MYB3R3 および MYB3R4 が、DREAM complex 構成タンパク質のホモログと相互作用するかどうか調べた。詳細は文献 を参照。

(4) 多重変異体の作出と表現型解析
複数のリソースからシロイヌナズナ T-DNA 挿入システムを取得し、*E2FA/B/C*、*MYB3R1/3/4/5*、*RBR*、および *ALY1/2/3* の各遺伝子が破壊されていることを PCR をベースとした方法により確認した。それぞれの遺伝子の破壊をホモに持つ株を選抜するとともに、交配により多重変異体の作出を行った。得られた多重変異体における表現型を、表皮や胚における細胞分裂の異常を中心に評価した。

4. 研究成果

(1) MYB3R3-GFP および GFP-MYB3R4 形質転換体を用い、抗 GFP 抗体による免疫沈降を行った結果、それぞれの MYB3R が E2F および RBR と同じタンパク質複合体に存在していることが明らかになった。この結果から、ヒトやショウジョウバエで知られる DREAM complex に対応するタンパク質複合体が植物にも存在し、それらが多様な細胞周期関連遺伝子の制御に関わっている可能性が考えられた。他の生物の複合体とは異なり、シロイヌナズナに見出された複合体には、主要なサイクリン依存性キナーゼである CDKA;1 も含まれていた。おそらく、MYB3R など、複合体の構成タンパク質をリン酸化することにより、複合体の働きをコントロールしているのではないかと予想される。

(2) MYB3R3-GFP 植物から、抗 GFP 抗体を用いて得られた免疫沈降物をプロテオミクスの手法により解析した結果、ヒトやショウジ

ョウバエの DREAM complex の構成因子に対応するシロイヌナズナのホモログが複数検出された。これらには、LIN54/Mip120、LIN9/Mip130 に対応するシロイヌナズナのタンパク質 (ALY2, ALY3, TCX5) が含まれていた。この複合体解析の精度を上げることで、今後、未知の構成タンパク質の同定や、このタンパク質複合体の実体の解明が期待される。

(3) E2FB-GFP 形質転換体から、抗 GFP 抗体を用いて得られた免疫沈降物をプロテオミクス解析した結果、動物の DREAM complex の構成因子のホモログが検出された。これらには ALY2, TCX5/6 のほか、LIN53/Caf1/RBRP4 のホモログである MSI1 も含まれていた。またこの実験により MYB3R1 も検出されたことから、改めて E2F と MYB3R が同じ複合体に存在していることが支持された。同様に E2FC-GFP 形質転換体を用いた場合にも、ALY3, TCX5, および MSI1 が検出された。しかし、E2FA-GFP を用いた場合には、DREAM complex の構成因子のホモログは検出されないことから、E2FA は他のシロイヌナズナの E2F とは異なり、DREAM 様の複合体を形成せずに機能していると考えられた。

(4) MYB3R3 および MYB3R4 が、DREAM complex の既知の構成因子と相互作用するかどうかを検討した。このため、*in vitro* におけるタンパク質間相互作用を簡便に検出することができる AlphaScreen の手法を用いた。この解析から、MYB3R3 は DREAM 構成因子のホモログと物理的に相互作用することを示す結果が得られた。興味深いことに *in vitro* translation に用いた小麦胚芽抽出物中において、DREAM 様の大きなタンパク質複合体が再構成されることを示唆する結果が得られた。今後、この小麦胚芽抽出物を用いた AlphaScreen の実験系を DREAM 様複合体の再構成系として利用できるかどうかの検討を行い、これを用いて、未知の構成因子の同定など、タンパク質複合体のサブユニット構成を決定していく予定である。

(5) ヒトやショウジョウバエの DREAM complex を構成するコアサブユニットの 1 つとして LIN9/Mip130 が存在する。この因子に相同な遺伝子が、シロイヌナズナには 3 個 (*Aly1*, *Aly2* および *Aly3*) 存在している。これらの遺伝子の変異を組み合わせた多重変異体を作成し、表現型の解析を行った。2 つの遺伝子に同時に変異を持つ 2 重変異体では、植物の成長に大きな違いは見られなかった。一方、3 重変異体は単離することができず、種々の組合せの多重変異体において胚発生の様子を観察した結果から、*ALY1,2,3* は機能重複しており、その機能は胚発生に必須であることが示唆された。今後、*ALY1,2,3* の多重

変異体における遺伝子発現を解析し、G1/S 期遺伝子や、G2/M 期遺伝子の転写に対する影響を調べる予定である。また、ALY1,2,3 が同じ複合体に存在して機能しているのであれば、MYB3R や E2F と遺伝学的に相互作用する可能性がある。今後、この可能性について MYB3R や E2F の変異を組み合わせた多重変異体を作成することにより検討する予定である。

(6) MYB3R と E2F の間の機能的な相互作用を調べるため、MYB3R と E2F を同時に欠く多重変異体を作成して、表現型の解析を行った。また、すべての組み合わせの変異体は得られていないが、現在までのところ、MYB3R と E2F の遺伝学的な相互作用は観察されておらず、植物において、この 2 つの転写因子が同じ複合体内で機能していることの生理的な意義は明らかではない。今後、MYB3R と E2F の変異を様々な組合せで持つ多重変異体を作成し、この可能性について調べていく。また、RBR の変異体を用いて、同様に MYB3R や E2F との間の遺伝学的な相互作用の有無を調べ、相互作用が検出された場合にはその分子的背景を解析する予定である。

[引用文献]

Kobayashi, K. et al. (2015) Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J* **34**, 1992-2007.

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 7 件)

Kozgunova, E., Suzuki, T., Ito, M., Higashiyama, T., Kurihara, D. (2016) Haspin kinase has multiple functions in the plant cell division regulatory network. *Plant Cell Physiol* **57**, 848-861. DOI: 10.1093/pcp/pcw030 (査読有り)

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Magyar, Z., Bögre, L., Ito, M. (2015) MYB3Rs, plant homologs of Myb oncoproteins, control cell cycle-regulated transcription and form DREAM-like complexes. *Transcription* **6**, 106-111. DOI: 10.1080/21541264.2015.1109746 (査読有り)

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., Leviczky, T., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J.H., Hauser, M.T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bögre,

L., Ito, M. (2015) Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J* **34**, 1992-2007. DOI: 10.15252/embj.201490899 (査読有り)

Maruyama, D., Völz, R., Takeuchi, H., Mori, T., Igawa, T., Kurihara, D., Kawashima, T., Ueda, M., Ito, M., Umeda, M., Nishikawa, S., Groß-Hardt, R., Higashiyama, T. 2015. Rapid elimination of the persistent synergid through a cell-fusion for polytubey block. *Cell* **161**, 907-918. DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.018 (査読有り)

Machida, Y., Ito, M. (2015) Reprogramming of plant cells induced by 6b oncoproteins from the plant pathogen *Agrobacterium*. *J Plant Res* **128**, 423-435. DOI: 10.1007/s10265-014-0694-3 (査読有り)

Sasabe, M., Ishibashi, N., Haruta, T., Minami, A., Kurihara, D., Higashiyama, T., Nishihama, R., Ito, M., Machida, Y. (2015) The carboxyl-terminal tail of the stalk of *Arabidopsis* NACK1/HINKEL kinesin is required for its localization to the cell plate formation site. *J Plant Res* **128**, 327-336. DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.018 (査読有り)

Saito, T., Fujikawa, H., Haga, N., Suzuki, T., Machida, Y., Ito, M. (2015) Genetic interaction between G2/M phase-specific transcription factor MYB3R4 and MAPKKK ANP3 for execution of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **10**, e990817. DOI: 10.4161/15592324.2014.990817 (査読有り)

[学会発表](計 10 件)

奥村徹、鈴木孝征、東山哲也、伊藤正樹：塩ストレス下での成長抑制に必要なシロイヌナズナ MYB3R 転写抑制因子 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

鈴木俊哉、桑田啓子、伊藤正樹：シロイヌナズナを用いた後期促進複合体 APC/C の新奇標的因子の同定 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

鈴木俊哉、Christian Breuer、石田喬志、鈴木孝征、東山哲也、杉本慶子、伊藤正樹：植物特異的な GRAS ファミリー転写因子による細胞分裂と DNA 倍数性の制御 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

梅根美佳、梅根一夫、寺内良平、鈴木孝征、東山哲也、長岐清孝、伊藤正樹：多倍数

体細胞を生じるイネ変異体の解析 第 38 回
日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、
神戸

奥村徹、伊藤正樹：塩ストレス下における
植物の積極的な成長抑制 日本植物学会
第 79 回大会、2015 年 9 月 7 日、朱鷺メッセ
(新潟県新潟市)

鈴木俊哉、浜村有希、東山哲也、石黒澄
衛、伊藤正樹：葯壁タペート細胞で起こる
DNA 倍加のメカニズム 日本植物学会第 79
回大会、2015 年 9 月 7 日、朱鷺メッセ(新潟
県新潟市)

梅根美佳、井上慎子、梅根一夫、寺内良
平、永澤信洋、前川雅彦、伊藤正樹：イネ体
細胞の DNA 倍数性に影響を与える遺伝子の
解析 第 56 回日本植物生理学会年会、2015
年 3 月 18 日、東京農業大学(東京都世田谷
区)

鈴木俊哉、Christian Breuer、石田喬志、鈴
木孝征、東山哲也、杉本慶子、伊藤正樹：GRAS
ファミリー転写因子によるシロイヌナズナ
の細胞分裂と核内倍加の制御 第 56 回日本
植物生理学会年会、2015 年 3 月 18 日、東京
農業大学(東京都世田谷区)

梅根美佳、井上慎子、梅根一夫、寺内良
平、永澤信洋、前川雅彦、伊藤正樹：イネ体
細胞の DNA 倍数性に影響を与える遺伝子の
解析 第 37 回日本分子生物学会年会、2014
年 11 月 25 日、パシフィコ横浜(神奈川県横
浜市)

鈴木俊哉、Christian Breuer、石田喬志、鈴
木孝征、東山哲也、杉本慶子、伊藤正樹：植
物特異的な GRAS ファミリー転写因子による
細胞周期の制御 第 37 回日本分子生物学会
年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜(神
奈川県横浜市)

〔その他〕

伊藤正樹、笹部美知子、町田泰則. 植物に
特徴的なタンパク質複合体による細胞分裂
の制御機構.
ライフサイエンス領域融合レビュー 5, e005
(2016) DOI: 10.7875/leading.author.5.e005

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