

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291061

研究課題名(和文)細胞分裂から分化への変換を統御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the molecular mechanisms underlying the transition from cell division to cell differentiation

研究代表者

梅田 正明 (UMEDA, Masaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80221810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞分裂から分化への転換機構を明らかにするために、シロイヌナズナの根において、B型レスポンスレギュレーターの分解制御に関わるKRPの機能解析と、DNA倍加を引き起こすエピジェネティックな制御機構の解析を行った。その結果、ある種のKRP遺伝子が根の移行領域で発現し、DNA損傷ストレス下での細胞分裂から分化への移行促進に重要な役割を果たしていることを見出した。また、オーキシンがクロマチン構造制御を介して、細胞分裂から分化への移行に関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed the mechanisms underlying the transition from cell division to cell differentiation by conducting functional analyses of KRPs, which are involved in degradation of B-type response regulators, and by analyzing the epigenetic regulation in triggering DNA polyploidization in roots. We found that some KRPs are expressed in the transition zone in roots and play an important role in an early onset of cell differentiation in response to DNA damage. Our results also indicated the possibility that auxin controls chromatin structure, thereby being associated with the transition from cell division to cell differentiation.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：発生・分化 植物ホルモン 細胞分裂 DNA倍加 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

(1) シロイヌナズナの根では、根端分裂領域 (PM) で作られた細胞が移行領域 (TZ) で分裂を停止し、DNA 倍加を起こす。そして、伸長・分化領域 (EDZ) では DNA 倍加も停止し、さらなる細胞伸長が起きる。この過程において、細胞分裂から分化への転換は TZ で起こるため、この領域で機能する制御系が植物細胞の分化転換を理解する上で重要である。

(2) これまでの研究から、TZ では B 型レスポンスレギュレーターである *ARR1*, *ARR2*, *ARR12* の発現が上がり、その結果オーキシンシグナルの低下や細胞周期因子の分解が起こり、細胞分裂の停止と DNA 倍加が起こると考えられている。つまり、TZ における分化転換には B 型レスポンスレギュレーターの空間的発現制御が重要と考えられるが、これまではそれがタンパク質レベルの制御であることしかわかっていなかった。

(3) 細胞分裂から分化への転換にはエピジェネティックな制御系が重要と考えられるが、これまでオーキシンやサイトカイニンなどのホルモンシグナルとの関連、あるいは DNA 倍加との関連についてはほとんど解析されてこなかった。分化転換を高次レベルで統御する制御系を明らかにするためには、これらの視点も取り入れた包括的な解析が不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、シロイヌナズナの根において細胞分裂から分化への変換を制御する機構を解明することを目的として行った。中でも、サイトカイニン情報伝達に関わる B 型レスポンスレギュレーターのタンパク質レベルの制御機構と、DNA 倍加に伴うエピジェネティックな制御機構に焦点をあてて解析を行った。本研究により、植物発生を支える分化転換の機構について基盤原理の一端を明らかにできるものと期待し、研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 発現解析には、各遺伝子のプロモーター領域に GUS または GFP を連結させた遺伝子をシロイヌナズナに導入して用いた。タンパク質レベルの発現解析には、プロモーター領域に in frame でコード領域を連結させた遺伝子を用いた。

(2) 変異体解析には、T-DNA 挿入変異体を取り寄せて、発現が見られない系統をノックアウト変異体として用いた。過剰発現体は、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターにコード領域を連結させた遺伝子をシロイヌナズナに導入して作出した。DNA 損傷ストレス処理は、DNA 二本鎖切断を引き起こすゼオシンを含む MS 培地上で植物を生育させることにより行った。根端メリステム

のサイズは、皮層細胞列の QC から TZ 領域までの距離をもって測定した。

(3) FISH 解析は、セントロメア領域を標識する 180 bp 反復配列のプロンプを用いて行った。クロモセンターは DAPI 染色により検出し、クロモセンターとセントロメア領域の重なり具合を調べることにより、ヘテロクロマチンの凝縮度を推定した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの B 型レスポンスレギュレーターの分解制御に働くことが知られている F-box タンパク質 KMD に着目して研究を行った。まず、4 種類の KMD 遺伝子 (*KMD1*~*KMD4*) についてレポーター遺伝子を作成し、mRNA およびタンパク質レベルの発現様式を解析した。その結果、1 種類の KMD (以降 *KMD* と呼ぶ) が根の TZ 付近で特異的に発現することを見出した。また、この発現様式は mRNA レベルで制御されていることを明らかにした。

(2) 次に根の TZ における KMD の機能を明らかにするため、ノックアウト変異体を購入して表現型解析を行った。また、過剰発現体も作出して同様に解析した。その結果、*kmd* 変異体では根端メリステムのサイズが縮小すること、逆に過剰発現体では拡大することを見出した。これは、KMD が B 型レスポンスレギュレーターの分解制御を介して、細胞分裂から分化への移行を抑制する機能をもつことを示唆している。

(3) 次に、*KMD* 自身がサイトカイニンによる発現制御を受けているかどうか調べた。定量的 RT-PCR やレポーター系統を用いて解析したところ、外生のサイトカイニン処理により *KMD* の発現が低下することがわかった。以上の結果から、TZ ではサイトカイニンシグナルが活性化しているため、*KMD* の発現が一定レベルで抑制され、サイトカイニンシグナルが高く保持されているものと考えられた。

(4) TZ における KMD を介したサイトカイニンシグナルの制御がどのような生理的意味をもつか調べるために、DNA 損傷ストレスに対する応答性について解析を行った。これまでの我々の解析により、野生型植物では DNA 損傷ストレスによりサイトカイニン合成が活性化すること、そのため TZ における分化転換が促進され、根端メリステムのサイズが縮小することが明らかになっている。*KMD* 過剰発現体において同様な DNA 損傷ストレス処理を行ったところ、野生型で見られるようなメリステムサイズの縮小 (および根の伸長抑制) が起きにくくなっていることが明らかになった。この結果は、DNA 損傷を引き起こすような環境ストレス下で分化

転換が促進される（細胞分裂が抑制される）ためには、サイトカニン量の増加に伴う KMD の発現抑制が重要な意味をもつことを示唆している。つまり、ストレスに対する迅速な応答反応に KMD を介したサイトカニンシグナルの制御が重要であると考えられる。

(5) 根においてはオーキシンシグナルの濃度勾配が見られ、これが細胞分裂から分化への転換を制御している。一方で、我々は細胞分裂から DNA 倍加への移行にクロマチン構造の制御が重要であることを見出している。これらの予備的知見から、オーキシンはクロマチン構造を制御することにより、細胞の分化転換（DNA 倍加への移行）を制御していると考えた。オーキシン関連変異体を用いた FISH 解析により、オーキシンとクロマチン構造の関連性を解析した結果、確かにオーキシンシグナルはクロマチンの構造制御に関与していることが示された。

(6) 次に、オーキシンに応答するエピジェネティック関連遺伝子を探索したところ、複数の遺伝子がオーキシンに応答することを見出した。オーキシン関連変異体においては逆の発現変化が観察された。そこで、これらの遺伝子のレポーター系統を作出し、発現様式を解析することにより、根端において発現する遺伝子を絞り込んだ。現在多重変異体を作成中であり、これらの変異体を用いてクロマチン構造や分化転換について解析を進めていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Davis, O. M., Ogita, N., Inagaki, S., Takahashi, N. and Umeda, M. DNA damage inhibits lateral root formation by up-regulating cytokinin biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Cells* 21, 1195-1208, 2016. 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12436

Sugamata Aki, S. and Umeda, M. Cytrap marker systems for *in vivo* visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Methods Mol. Biol.* 1370, 51-57, 2016. 査読無
DOI: 10.1007/978-1-4939-3142-2_4

Chen, P. and Umeda, M. DNA double-strand breaks induce the expression of flavin-containing monooxygenase and reduce root meristem size in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Cells* 20, 636-646, 2015. 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12255

Takatsuka, H., Umeda-Hara, C. and Umeda, M. Cyclin-dependent kinase-activating kinases CDKD;1 and CDKD;3 are essential for preserving mitotic activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 82, 1004-1017, 2015. 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12872

Takatsuka, H. and Umeda, M. Epigenetic control of cell division and cell differentiation in the root apex. *Front. Plant Sci.* 6, 1178, 2015. 査読有
DOI: 10.3389/fpls.2015.01178

Yin, K., Ueda, M., Takagi, H., Kajihara, T., Sugamata Aki, S., Nobusawa, T., Umeda-Hara, C. and Umeda, M. A dual-color marker system for *in vivo* visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 80, 541-552, 2014. 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12652

Takatsuka, H. and Umeda, M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J. Exp. Bot.* 65, 2633-2643, 2014. 査読有
DOI: 10.1093/jxb/ert485

〔学会発表〕(計 16 件)

梅田正明、高橋直紀、Hormonal control of genome integrity in roots. Plant Organ Growth Symposium 2017、2017 年 3 月 15 日、エルチェ（スペイン）

梅田正明、Hormonal control of genome integrity in the root meristem. International Conference on Arabidopsis Research、2016 年 6 月 30 日、慶州（韓国）

Aida Nazlyn Nazari、高塚大知、梅田正明、Roles of auxin in controlling chromatin structure. International Conference on Arabidopsis Research、2016 年 6 月 30 日、慶州（韓国）

高橋直紀、藤本啓介、梅田正明、Maintenance of genome integrity in root stem cells under DNA stress. 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大（岩手県・盛岡市）

高塚大知、梅田正明、極性をもった根の細胞成長の制御メカニズム、日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6 日、朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）

高橋直紀、丸池加奈子、高塚大知、梅田正明、根端分裂組織のサイズ制御機構、

日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6 日、朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）

高塚大知、梅田正明、Cytokinins promote rapid cell elongation in *Arabidopsis* roots.
Auxins and Cytokinins in Plant Development International Symposium 2014、2014 年 6 月 29 日、プラハ（チェコ）

〔その他〕

植物成長制御研究室ホームページ
<http://bsw3.naist.jp/umeda/>

6．研究組織

(1)研究代表者

梅田 正明（UMEDA, Masaaki）
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
研究者番号：8 0 2 2 1 8 1 0

(2)研究分担者

高橋 直紀（TAKAHASHI, Naoki）
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：4 0 5 5 3 6 2 3

(3)連携研究者

関 原明（SEKI, Motoaki）
理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー
研究者番号：8 0 2 8 1 6 2 4

(4) 連携研究者

深尾 陽一郎（FUKAO, Yoichiro）
立命館大学・生命科学部・准教授
研究者番号：8 0 4 3 2 5 9 0