

植物の細胞増殖を制御する転写制御システム
Studies of Transcriptional Regulation that Controls Cell Proliferation in Plants
(日本植物学会推薦)

代表研究者 名古屋大学 伊藤 正樹

Nagoya University Masaki Ito

Periodic gene expression is fundamental for the ordered occurrence of events through the cell cycle. Many G2/M phase-specific genes in plants contain mitosis-specific activator (MSA) elements in their promoter regions, which act as G2/M phase-specific enhancers and bind with R1R2R3-Myb transcription factors. The R1R2R3-Myb transcription factors can be generally classified into two groups, A-type Myb and C-type Myb. We showed that A-type Myb functions as transcriptional activator, and overexpression of its hyperactive form up-regulated many G2/M phase-specific genes in tobacco cells, thus allowing genome-wide identification of its target genes. In Arabidopsis, C-type Myb proteins repress transcription of their target genes both in tissues with actively dividing cells and in those with resting cells. Our data suggested that C-type Myb may be involved in developmentally regulated transcriptional repression of many G2/M phase-specific genes, and responsible for cessation of cell division during formation of plant organs. Finally, we identified mutations that enhance the defective cytokinesis in loss-of-function mutant of *MYB3R4*, one of the A-type Myb genes in Arabidopsis. Further analysis of the enhancer mutants may reveal the novel factors that may be involved in transcriptional regulation of G2/M phase-specific gene in association with R1R2R3-Myb proteins.

研究目的

植物が適切な形やサイズの器官を形成するためには、細胞増殖が時間的・空間的に厳密に制御される必要がある。このような細胞増殖の発生的な制御は、個々の細胞の細胞周期が制御されることによって実現している。このため細胞周期制御に関連する遺伝子群の発現を発生過程において厳密にコントロールする仕組みが重要であると考えられるが、そのメカニズムは多くの部分が未解明である。私たちは細胞周期の G2/M 期制御に重要な働きをもつ一群の遺伝子上流域に、共通のシスエレメント (MSA エレメント) が存在し、そこに R1R2R3-Myb 転写因子が結合することを示してきた。R1R2R3-Myb には、転写活性化因子として働く分子種 (A-type Myb) と転写抑制因子として働く分子種 (C-type Myb) が存在する。本研究では、このような R1R2R3-Myb による転写活性化と抑制を器官発生の時間軸上に位置づけるとともに、転写制御の分子メカニズムの解明を目指して研究を行った。具体的には、(1) R1R2R3-Myb の標的遺伝子群の網羅的な同定、(2) A-type Myb と C-type Myb の標的 G2/M 期遺伝子の発現を指標とした機能解析、および(3) R1R2R3-Myb と冗長的に働く因子や上流因子の同定を目指した遺伝学的な研究を行った。

研究経過

(1) R1R2R3-Myb の標的遺伝子群の同定

タバコの A-type Myb として NtmybA1 と NtmybA2 の二つが同定されている。これらの Myb を一過的に過剰発現させると *NACK1* や *CYCB1* などの G2/M 期特異的遺伝子のプロモーターが活性化されることを既に報告している。そこで本研究では、NtmybA2 を安定に過剰発現する形質転換細胞株を作出し、G2/M 期遺伝子の転写産物レベルを解析した。材料として、同調培養と形質転換が容易なタバコ培養細胞 BY2 を用いた。全長の NtmybA2 を過剰発現する細胞株では、ベクターだけを導入したコントロールの細胞株と比べて大きな発現の変化は見られなかった。NtmybA2 の C 末端領域には自身の転写活性化能を負に制御する領域が存在し、この領域を削った NtmybA2 (NtmybA2ΔC) は、全長 NtmybA2 の 10 倍程度の転写活性化能を示すことを既に報告している。そこで、NtmybA2ΔC を過剰発現する形質転換細胞株を作出し同様に解析したところ、*NtKN*、*NACK1* および *CYCB1* などの G2/M 期遺伝子の転写産物レベルが有意に上昇していることが明らかになった。NtmybA2ΔC 過剰発現の効果を網羅的に調べるため、BY2 細胞由来の cDNA マイクロアレイを用いて解析を行った。また、同調培養した BY2 細胞における細胞周期中の遺伝子発現の変化

をマイクロアレイにより解析した。過剰発現体と同調培養した細胞のマイクロアレイデータを組み合わせることにより、*NtmybA2ΔC* の過剰発現により M 期に発現のピークを持つ多くの遺伝子の転写産物レベルが選択的に上昇することが明らかになった。このような遺伝子を任意に 8 個選抜してプロモーター領域を単離し、塩基配列を決定したところ、すべてのプロモーターに 1-4 個の MSA 類似配列が存在することが明らかになった。これらの結果から、*NtmybA2* はプロモーター中の MSA エlement に直接結合することにより、多くの G2/M 期遺伝子の転写を共通に活性化していることが示唆された。また、この研究から、*NtmybA2* により正の制御を受ける標的遺伝子群の候補を網羅的に特定することができた。

(2) 発生過程における G2/M 期遺伝子の転写制御

モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、葉などの器官の発生過程における G2/M 期遺伝子の発現が、*R1R2R3-Myb* によりどのように制御されているかを解析した。全ゲノムが明らかにされているシロイヌナズナには、*R1R2R3-Myb* をコードする遺伝子が 5 個存在し、このうち A-type Myb が二個 (*MYB3R1* と *MYB3R4*)、C-type Myb が二個 (*MYB3R3* と *MYB3R5*) の遺伝子によりコードされている。これまでの研究から、A-type Myb 破壊株 (*myb3r1 myb3r4* 二重破壊株) では、一群の G2/M 期遺伝子の発現の低下と、それに伴って引き起こされる不完全なサイトキネシスが見られること、また C-type Myb 破壊株 (*myb3r3 myb3r5* 二重破壊株) では逆に一群の G2/M 期遺伝子の発現が上昇することを明らかにしていた。つまり、A-type Myb は転写活性化因子として、C-type Myb は転写抑制因子として働くことが予想された。このような転写活性化と抑制が発生過程でどのように働くのかを明らかにするために、本研究では葉や根の発生過程を通じて A-type Myb や C-type Myb の遺伝子破壊が、標的 G2/M 期遺伝子の発現にどのように影響を及ぼすかについて解析した。このため、G2/M 期遺伝子 (*CYCB1;2*, *AtNACK1*, *IMK2* および *EDE1*) のプロモーターにレポーター遺伝子 *GUS* を連結した融合遺伝子を野生型株や遺伝子破壊株に導入して、*GUS* 発現を組織染色により解析した。野生型株における *GUS* の発現は、細胞分裂活性の高い茎頂分裂組織や若い葉および根端分裂組織において強く見られた。A-type Myb 破壊株では、このような分裂の盛んな組織における *GUS* 発現の低下が見られた。一方、C-type Myb 破壊株では逆に、分裂の盛んな組織における発現の増大が観察された。また、A-type Myb と C-type Myb の破壊を組み合わせた株では、それぞれの破壊株の中間の強さで *GUS* が発現していた。これら結果から、(1)

C-type Myb による転写抑制は分裂の盛んな組織において機能していること、(2) 分裂の盛んな組織では、A-type Myb による転写活性化と C-type Myb による転写抑制が競合的に働いていることが示唆された。また葉の発生過程における G2/M 期遺伝子の転写産物レベルを調べるために、野生型株や遺伝子破壊株における様々な発生段階の葉から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を行った。この結果、発生初期の若い葉における G2/M 期遺伝子の mRNA レベルは、GUS レポーターを用いた解析と同様の増減を示したが、細胞分裂活性の低い発生の進んだ葉では、C-type Myb を破壊すると G2/M 期遺伝子の mRNA レベルが顕著に増大することがわかった。つまり、C-type Myb は葉の発生の進行に伴う G2/M 期遺伝子の発現の低下や、発生が進んだ葉における発現停止状態の維持に機能していることが示唆された。また、この結果は、発生の進行に伴う G2/M 期遺伝子の発現の低下は、単に細胞分裂活性の低下の結果引き起こされるのではなく、C-type Myb が関与する発生に依存した積極的な転写抑制によるものであることが示唆された。

(3) A-type Myb 破壊株のエンハンサー変異体の単離と解析

シロイヌナズナに存在する二つの A-type Myb 遺伝子 (*MYB3R1* と *MYB3R4*) を同時に破壊した株では、G2/M 期遺伝子の発現の低下と、これに起因する不完全なサイトキネシスが生じることを以前の研究から既に明らかにしていた。しかし、この二重変異体では G2/M 期遺伝子の発現は完全には消失せず、このため致死にはならない。一方、G2/M 期遺伝子のプロモーター中の MSA エlement に変異を導入すると、下流のレポーター遺伝子の転写はほぼ完全に消失する。これらの結果から、シロイヌナズナには MSA エlement に結合する転写活性化因子が A-type Myb の他にも存在するのではないかと考えられた。このような因子をコードする遺伝子に変異すると A-type Myb 破壊株に見られる異常が促進すると予想される。A-type Myb のうちのひとつ *MYB3R4* を単独で破壊すると、非常に弱いサイトキネシスの異常が現れることがわかっている。そこで、*myb3r4* 破壊株の異常を促進するエンハンサー変異体の単離を行った。このような変異体から原因遺伝子を特定すれば、A-type Myb と同様の機能を持つ因子の他に、A-type Myb の働きを制御する上流因子が同定される可能性が考えられる。*myb3r4* 変異体の種子に EMS により突然変異誘発処理を行い、次世代 (M2 世代) の芽生えにおけるサイトキネシスの異常の程度を解析した。サイトキネシスの異常の程度は、孔辺母細胞が不完全なサイトキネシスを起こすときに生じる特徴的な形態異常を示す気孔の頻度を調べることにより定量化した。この一

次スクリーニングで 176 個の変異株を選抜し、これらの次世代 (M3 世代) の芽生えを用いて二次スクリーニングを行い、61 株をエンハンサー変異体として単離した。これらの変異体の中に、A-type Myb と同様の働きを持つ因子が欠失しているものがあれば、以下の二つの条件を満たしているはずである。(1) *myb3r4* 単独変異体に比べて G2/M 期遺伝子の発現が低下している。(2) サイトキネシスの異常の程度は *myb3r4* 変異に依存している。まず、(1)の条件を満たす変異体を選抜するため、単離した 61 株の芽生えにおける遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。この結果、G2/M 期遺伝子の発現が低下している 11 株を得ることができた。現在、これら変異体のサイトキネシスの異常が *myb3r4* 変異に依存しているかどうかを遺伝解析により調べているところである。

このように突然変異誘発処理により単離したエンハンサー変異体に加え、野生型ランズバーグ株の遺伝的背景に *myb3r4* 変異体の異常を促進する多型が存在することを偶然見いだした。遺伝解析の結果、ランズバーグの遺伝的背景には、*myb3r4* 変異体 (コロンビア背景) の異常を促進する遺伝子座が複数存在することがわかった。このうち特に表現型に大きな影響を与える遺伝子座を、マップベースクローニング法により第 3 染色体上の 5 個の遺伝子を含む座乗候補領域に特定した。コロンビア型ゲノム断片を形質転換することにより相補テストを行ったところ、一つの遺伝子 (*ANP3* 遺伝子) を含むゲノム断片の導入により、促進されたサイトキネシスの異常が回復することがわかった。*ANP3* 遺伝子は、サイトキネシスを正に制御することが報告されている *MAPKKK* をコードする遺伝子であった。ランズバーグ株とコロンビア株における *ANP3* 遺伝子の塩基配列を比較すると、1 塩基の置換が見られ、この置換によりキナーゼ領域の C 末端側に存在するプロリン残基 (コロンビア株) がランズバーグ株ではセリンに置き換わっていることがわかった。現在、このアミノ酸置換が *myb3r4* 変異の異常を促進する原因であるかどうかを解析している。

考察

タバコ A-type Myb を過剰に発現する BY2 細胞のマイクロアレイ解析により、A-type Myb が G2/M 期遺伝子の転写を選択的に活性化する働きを持つことを示した。同時に転写活性化を受ける標的遺伝子の候補を網羅的に同定することができた。現在、シロイヌナズナにおける A-type Myb や C-type Myb の標的遺伝子群を同定するために、遺伝子破壊株にグルココルチコイド受容体を融合させた誘導型 Myb を導入した

形質転換体の解析を行っている。また、本研究により選抜した 11 株の *myb3r4* エンハンサー変異体のうち、少なくとも 2 株ではサイトキネシスの異常が *myb3r4* 変異に依存していることがわかった。これら 2 株では、A-type Myb と同様な機能を持つ因子や上流で機能する制御因子に変異を持っている可能性がある。今後、これらの変異体の原因遺伝子を特定する予定である。ランズバーグ型 ANP3 と *myb3r4* 変異の組み合わせにより、サイトキネシスの強い異常が生じることを見いだした。ANP3 遺伝子は、単独で変異してもサイトキネシスに異常を生じないことから、*myb3r4* 変異により ANP3 が機能する MAPK カスケードで働く何らかの因子の発現が低下しているのではないかと考えている。今後、この仮説に基づき、ランズバーグ型の ANP3 が *myb3r4* 変異の異常を促進するメカニズムの解明に向けた研究を行う予定である。

研究発表

口頭発表

1. 齊藤隆・藤河秀喜、羽賀望、伊藤正樹；「シロイヌナズナ MYB3R4 破壊株に見られるサイトキネシスの異常をエンハンスする変異体の解析」、日本植物生理学会（札幌、2008）
2. 小林耕介、伊藤正樹；「シロイヌナズナの発生過程における G2/M 期遺伝子の転写制御」、日本植物学会（高知、2008）
3. 加藤貴一、Ivan Gális、鈴木しをり、松岡健、伊藤正樹；「R1R2R3-Myb 転写活性化因子を過剰発現するタバコ BY2 細胞のトランスクリプトーム解析」、日本植物生理学会（名古屋、2009）

誌上発表

1. Kato K, Gális I, Suzuki S, Araki S, Demura T, Criqui MC, Potuschak T, Genschik P, Fukuda H, Matsuoka K, Ito M. “Preferential up-regulation of G2/M phase-specific genes by overexpression of the hyperactive form of NtmybA2 lacking its negative regulation domain in tobacco BY2 cells.” *Plant Physiol.* (2009) *in press.*