

細胞周期 G2/M 期移行に対する植物ホルモン、オーキシンの働き

Involvement of auxin in cell cycle control during the G2/M phase.

研究代表者 名古屋大学大学院生命農学研究科 助教授

伊藤 正樹

Department of Regulation of Biological Signals, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Associate Professor, Masaki Ito

オーキシンは古くから知られる植物ホルモンの一種で、植物細胞の増殖に極めて重要な働きをすることが知られていた。しかし、オーキシンがどのような分子メカニズムによって植物細胞の増殖を制御しているのかについては、ほとんど明らかにされていない。近年、モデル植物であるシロイヌナズナを使った分子遺伝学からオーキシン信号伝達に関わるいくつかの因子が同定された。このようなオーキシン信号伝達に関わる因子をコードする遺伝子の発現に、細胞周期中の分裂期（M 期）で特異的に起きる遺伝子発現制御が関与している可能性を発見した。このことは、オーキシンの信号伝達の一部が分裂期に特異的に活性化することを示唆している。本研究ではこの仮説を検証することにより、オーキシンと増殖を結ぶ分子機構の解明を試みた。その結果オーキシン誘導的転写に働く因子の一部が M 期依存的制御を受けていることを示した。

Auxin is one of the most important plant hormones that promote proliferation of plant cells in vitro. Despite a great effort, the mechanisms of auxin action have not been uncovered. Recently, molecular genetics has identified several genes involved in auxin signaling in Arabidopsis. We found that some of such genes contained promoter motif that is known to direct G2/M phase-specific transcription. This finding suggested interaction between auxin signaling and transcriptional regulation at the G2/M phase in the cell cycle. We tested promoter activities of these genes during the cell cycle, and showed that some of them are actually regulated during the cell cycle.

1. 研究目的

高等植物の細胞周期中で G2/M 期に特異的に発現する遺伝子群が知られている。サイクリン B 遺伝子などがこれに含まれるが、これら G2/M 期特異的遺伝子のプロモーター領域には共通のシスエレメント (MSA エレメント) が存在し、このエレメントに結合する c-Myb 様の転写因子群の働きによって G2/M 期特異的転写が実現されている。タバコから単離された 3 種類の c-Myb 様転写因子 (Ntmyb A1, NtmybA2,

NtmybB) のうち NtmybA1 と NtmybA2 は MSA エレメントに結合し転写を活性化するように働くが、NtmybB は転写活性化能を持たず、MSA エレメントへの競合的な結合により NtmybA1, NtmybA2 による活性化を抑制する転写抑制因子であることがわかっていて。これまでに調べた G2/M 期特異的遺伝子のほとんどのものに、この MSA エレメントが繰り返し存在する。そこで、G2/M 期遺伝子の網羅的同定を目指して、全ゲノムの配列が決定されたシロイ

ヌナズナのゲノム情報を利用し検索を行い、遺伝子上流域に MSA エlementが複数繰り返し存在している遺伝子群を抽出した。抽出された遺伝子群には M 期に機能を持つと考えられる遺伝子が多数含まれていたが、興味深いことに植物ホルモンの一つであるオーキシンのシグナル伝達に関わる遺伝子群が含まれていた。オーキシンは植物細胞の増殖を強力に促進する働きを持つことが知られている。植物の一部を切り取りオーキシンで処理すると未分化細胞からなるカルスが形成され、また植物細胞の液体培養には必須な成分である。しかしながら、オーキシンが細胞周期中のどの時期にどのようなメカニズムで作用するのは全く不明であった。オーキシン関連遺伝子上流域に MSA 様の配列が存在するという発見は、オーキシン信号伝達の少なくとも一部が G2/M 期に活性化されることを示唆している。本研究では MSA 様の配列が存在するオーキシン関連遺伝子のプロモーターを解析することにより、上記の仮説の検証を行った。

2. 研究経過

2.1 遺伝子上流域に MSA エlementをもつ遺伝子の同定

これまでの私たちの研究から、細胞周期中で G2/M 期に発現する遺伝子の多くはプロモーター領域に MSA エlementが複数回繰り返し存在することを明らかにしていた。そこで同様の制御を受け G2/M 期に発現する遺伝子の網羅的同定を目的に全塩基配列が決定されたシロイヌナズナのゲノム情報を用い解析を行った。遺伝子上流域に繰り返し MSA エlementをもつ遺伝子群を抽出した結果、G2/M 期に機能を持つと考えられる *cdc20* 様の遺伝子、サイクリン B 遺伝子などの他、オーキシン信号伝達に必要なタンパク質分解系に働くとされている AXR1 (ユビキチン活性化酵素)、TIR1 (ユビキチンリガーゼ複合体を構成する F ボックスタンパク質) やオーキシ

ンに応答して転写誘導されることが知られている Aux/IAA ファミリーのひとつ IAA14 が含まれていた。MSA エlementとオーキシン関連遺伝子の関係が示唆されたので、さらにオーキシン関連遺伝子群のプロモーター領域の塩基配列を詳細に検討した。その結果、上記の遺伝子に加え、オーキシンの受容体と推定されている ABP1、AXR1 に相同な遺伝子 (AXR1L)、AXR1 と複合体形成する ECR1、AXR1 と同様のタンパク質分解系に働くと考えられている RCE1 (ユビキチン付加酵素) の他、Aux/IAA ファミリー遺伝子の IAA5 と IAA17、オーキシン誘導的転写に働く転写因子ファミリー (ARF ファミリー) に属する ARF9 と ARF9 に構造的に類似する二つの遺伝子 (ここでは ARF9L1、ARF9L2 と呼ぶ) が新たに同定された。

2.2 転写開始点の決定

MSA エlementにより G2/M 期特異的な転写制御を受けている遺伝子は、上流域の転写開始点近傍に MSA エlementが存在する。これまで調べた中では例外なく転写開始点より上流 -500 以内に存在していた。したがって MSA エlementが働くには特定のプロモーター中の位置に存在する必要があると考えられる。そこで上記のオーキシン関連遺伝子群のプロモーターがこの条件を満たすかどうかを検討するため、転写開始点の決定を行った。オリゴキャッピング法と 5' RACE 法を用いて得られた cDNA 断片の塩基配列を決定することにより転写開始点を特定した (Figure 1)。その結果、ユビキチンタンパク質分解系に関わる遺伝子群 (AXR1、AXR1L、ABP1、ECR1、RCE1、TIR1) では、MSA エlementが転写開始点から 500 bp 以上離れて存在することがわかり、これら遺伝子のプロモーターの働きが G2/M 期依存的に制御されている可能性はきわめて低いと判断し、以下の解析からこれらの遺伝子を除外した。一方、オーキシン誘導的に発現する Aux/IAA ファミリーに属する遺伝子 (IAA5、IAA14、IAA17) やオーキシン誘

導的転写に関わる転写因子 ARF ファミリーの遺伝子 (ARF9、ARF9L1、ARF9L2) のプロモーターでは、決定した転写開始点のごく近傍に MSA エlement が存在していたため、これら以降の研究に用いた (Figure 1)。

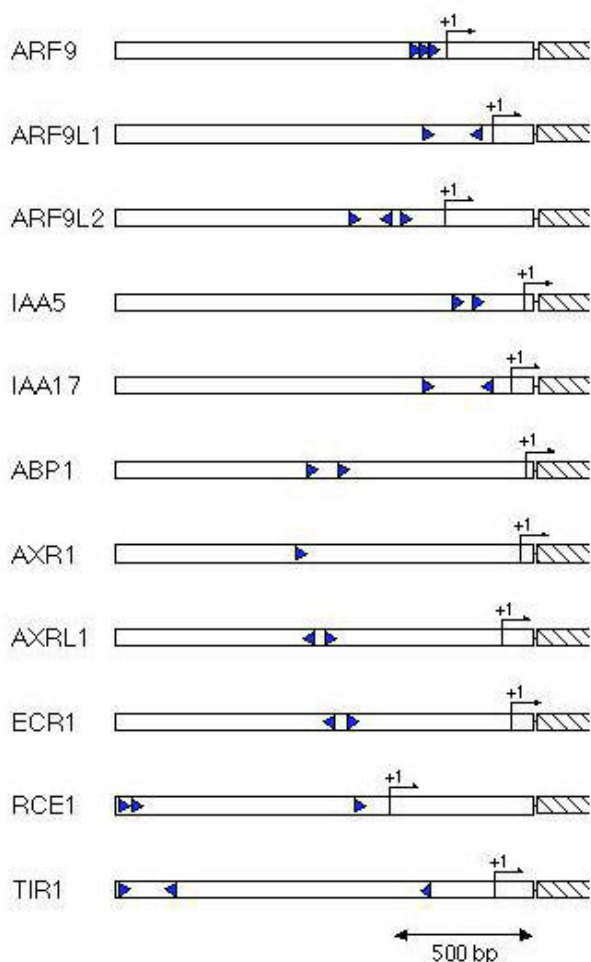


Figure 1. Position and orientation of MSA-like motifs in promoter regions of Arabidopsis genes involved in auxin signaling. MSA-like motifs are shown as triangles. Transcription start sites are indicated by +1. Hatched boxes show the protein coding regions.

2.3 プロモーター活性の細胞周期依存性

転写開始点近傍に複数回繰り返し MSA エlement が存在することが明らかになった上記のオーキシン関連遺伝子について、遺伝子上流域のプロモーター活性が細胞周期中でどのように変化するかを調べた。レポーター遺伝子としてホタルのルシフェラーゼ遺

伝子 (LUC) を用いた。IAA5、IAA14、IAA17、ARF9、ARF9L1、ARF9L2 の遺伝子上流域約 1 kb を LUC の上流につなぎ、アグロバクテリアを介したバイナリー法によりタバコ培養細胞 BY2 に導入した。得られた形質転換 BY2 に DNA 合成阻害剤であるアフィディコリンを用いた方法により同調培養を誘導した。24 時間のアフィディコリン処理により細胞は S 期直前に蓄積し、アフィディコリンを除去すると阻害が解除され同調的に S 期 G2 期 M 期 G1 期と細胞周期が進行する。アフィディコリン除去後、1 時間ごとに細胞を収穫し、分裂指数 (mitotic index) と LUC 活性を決定し、細胞周期中の変化を求めた。分裂指数のピークは同調培養開始後 6-7 時間目に見られこの時期に細胞が M 期にあることを示した。コントロールとして用いたサイクリン B - LUC の形質転換体では 5-9 時間目に LUC 活性の上昇が見られた。これは G2/M 期特異的なサイクリン B 遺伝子プロモーターの働きを反映する結果である。ARF9、ARF9L1、ARF9L2 の場合にはいずれもサイクリン B と似かよった LUC 活性の変動パターンを示した。また IAA17 も同様の変動を示したが IAA5、IAA17 ではパターンは顕著に異なっており、LUC 活性の大きな変動は認められなかった (データは示していない)。これらの結果は ARF9、ARF9L1、ARF9L2、IAA17 が MSA エlement を介した G2/M 期特異的転写制御を受けていることを示している。

2.4 まとめ

MSA エlement の存在を指標に解析を進めた結果、オーキシン誘導的転写に働く ARF ファミリーに属する遺伝子、ARF9、ARF9L1、ARF9L2 が細胞周期中で G2/M 期特異的な転写制御を受けていることが明らかになった。これら 3 つの因子は ARF ファミリーの中でも、構造的にお互いに類似した因子群であることがわかった。

3. 研究成果

オーキシン作用に関するこれまでの考えはオーキシン 細胞増殖というように、オーキシン信号が常に上流に位置し、下流の事象として存在する細胞増殖を制御するというものであった。この研究は ARF ファミリーの一部が G2/M 期特異的に働くことを示唆するものであり、これによりオーキシンが遺伝子発現を制御する仕組み自体が細胞周期制御されている可能性を示した。つまり、細胞周期 オーキシン信号伝達という経路の存在を示唆しており、オーキシンと細胞増殖の関係を一方向的なものではなく、双方向的なものであることを指示している。

4. 今後の課題と発展

オーキシンは細胞増殖の促進の他、重力屈性、頂芽優性、細胞分化など多面的な作用を持つ極めて重要な植物ホルモンである。このオーキシンはおそらく受容体、その後の情報伝達を経て最終的には遺伝子発現を変化させることにより作用すると考えられている。この遺伝子発現の制御に重要な働きをすると考えられているのが ARF ファミリー因子群である。ARF ファミリーの因子はオーキシン応答配列 AuxRE に結合することにより遺伝子の転写を活性化、あるいは抑制する。シロイヌナズナでは ARF ファミリーは 23 個の遺伝子からなるが、本研究により G2/M 期依存的制御を受けていることが明らかにされたのは ARF9 とそれによく類似する 2 つの遺伝子であった。分子系統樹上では ARF9 を含むこれら 3 個の遺伝子は独立した枝を構成することから、これらは共通の機能を持ち、他の ARF ファミリーの遺伝子とは異なる働きを持つと推定される。これら ARF9 サブファミリー遺伝子が共通に MSA エlement による細胞周期制御を受けていることから、オーキシンと細胞増殖を繋ぐ特有の機能を担っていると推定できる。これら ARF9 サブファミリーの働きを明らかにすれば、オーキシンによる細胞増殖制御のメカニズムの糸口

が見いだされると期待される。

5. 発表論文

Cell-cycle regulation of the auxin response factor 9 gene and two related genes. (投稿準備中)