

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「二酸化炭素資源化を目指した植物の
物質生産力強化と生産物活用のための
基盤技術の創出」
研究課題「DNA 倍加誘導系の確立による
高バイオマス植物の創出」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者:梅田 正明
(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)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

DNA 倍加は器官の巨大化や代謝産物の高蓄積をもたらすので、その誘導は植物バイオマスの増産につながると考えられる。しかし、多くの樹木やイネなどでは DNA 倍加がほとんど起きず、その能力を決定づける要因については未解明のままであった。そこで、本研究では倍加能の有無を決める要因を明らかにし、ポプラやイネで DNA 倍加を誘発することにより、植物バイオマスの増産をもたらす新たな技術開発を目指した。

まず、樹木で DNA 倍加が期待したような形質を付与するのかどうか調べるため、梅田グループではコルヒチン処理による倍数体ポプラの作出法を確立し、4 倍体ポプラを作成した。その結果、4 倍体ポプラでは細胞サイズが大きくなっていること、また幹の伸長が若干遅い分、肥大成長が促進されていることが明らかになった。同じ背丈で比べると、4 倍体ポプラの方が 30% 程度バイオマス生産量が増え、物理的性質は 2 倍体と大きく変わらないことも明らかになった。

次に、細胞周期関連遺伝子の中から DNA 倍加の誘発に有効な遺伝子の同定を試みた。DNA 倍加は通常の細胞周期における G2 期から M 期への移行が阻害されると起こると考えられていることから、特に G2/M 期の CDK 活性の制御に関わる遺伝子をポプラ(梅田グループ)およびイネ(伊藤グループ)で発現操作し、DNA 倍加に与える影響を検討した。その結果、ポプラでは B タイプの CDK の発現抑制や、後期促進複合体の活性化因子である CCS52 や CDC20 の過剰発現により、4 倍体植物が得られることがわかった。一方、イネでは、M 期サイクリンなどの発現を誘導する転写因子 MYB3R の発現抑制や、CDC20 の過剰発現により、エンドミトース型の DNA 倍加が生じることがわかった。しかし、シロイヌナズナで見られるようなエンドリプリケーション型の DNA 倍加は観察されず、ポプラやイネでは体細胞レベルの DNA 倍加は起こりにくいことが示唆された。

そこで、伊藤グループでは DNA 倍加能の有無に関わる因子を特定するため、本来 DNA 倍加を起こさないイネで倍加を起こすような変異体を単離した。原因遺伝子を調べたところ、2 つの変異体についてはサイクリン A2 (CYCA2) 遺伝子の変異により、エンドリプリケーション型の DNA 倍加が生じていることが明らかになった。プロイディは 4C まで上昇し、細胞サイズも大きくなっていたが、同時に G2 期の遅延により細胞数が少なくなる現象が見られ、圃場では成長遅延が認められた。

以上のように、ポプラやイネで細胞周期関連遺伝子の発現を操作してもプロイディは 4C までしか上がらず、効率的な倍加誘導は期待できなかったことから、次に梅田グループで、DNA 倍加能に影響を与える他の制御要因がないかどうか調べた。梅田グループにおいて、ヘテロクロマチンが緩んでいることが予想されるポプラの FAS1, FAS2 の RNAi 形質転換体を用いて、コルヒチン処理により細胞周期進行を阻害したところ、プロイディが 8C まで上がることもわかった。したがって、クロマチン構造と細胞周期の同時制御がポプラやイネにおいて DNA 倍加を誘発するのに非常に効果的であることが示された。

エンドリプリケーション型の DNA 倍加を誘導してバイオマスを増産させるためには、細胞分裂に対する阻害的効果を除くために、DNA 倍加誘導に効果をもつ遺伝子を分裂組織以外で発現させる必要がある。梅田グループでこの目的にかなったプロモーターを探索したところ、ポプラにおいてはシロイヌナズナの TED4 プロモーターが木部特異的な DNA 倍加誘導に適

していることがわかった。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要: CYCA2 はシロイヌナズナにおいて DNA 倍加を阻害する因子として知られており、その変異体は DNA 倍加が亢進する表現型を示す。本研究により、イネにおいても CYCA2 の変異によりエンドリプリケーション型の DNA 倍加が生じることがわかったので、CYCA2 は細胞分裂から DNA 倍加への移行制御に関わる、植物種間で共通の鍵因子であると考えられる。DNA 倍加誘導に関わる細胞周期因子として特筆すべき発見である。

2.

概要: これまで DNA 倍加は、細胞周期の G/M 期進行の阻害により起こると考えられていたが、本研究により、クロマチン構造と DNA 倍加能との間に相関があることが明らかになったことは、DNA 倍加誘導に細胞周期以外の制御要因があることを示す初めての発見であり、そのインパクトは大きい。これまで未知であった、DNA 倍加能をもつ植物ともたない植物の間の本質的な違いを理解する上で、重要な知見である。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要: これまで樹木において DNA 倍加の効果が調べられた例はない。本研究で、ポプラの 4 倍体化により細胞の肥大化や幹の横方向の成長が促進されることが明らかになったのは、木部で効率的にバイオマスを蓄積させるために DNA 倍加が有効な手段であることを示した、重要な知見である。コルヒチンによる倍加技術は、遺伝子組換えを介さずに有用形質をもつ樹木のバイオマス生産を上げることができるという点で、広く応用可能な技術と言える。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「梅田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
梅田 正明	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	H24.10～
高塚 大知	同上	博士研究員 助教	H25.9～H27.9 H28.4～
高橋 直紀	同上	助教	H27.4～
安喜 史織	同上	博士研究員	H27.4～
森本 有代	同上	技術補佐員	H28.4～
原 千景	同上	研究技術員	H24.10～H28.6 H29.4～
佐渡 由希子	同上	研究技術員	H29.4～
岡南 怜子	同上	技術補佐員	H29.4～
松本 英子	同上	技術補佐員	H29.5～
大野 孔子	同上	技術補佐員	H27.4～H28.10
岩川 秀和	同上	博士研究員	H25.1～H25.5
岸 紀美代	同上	技術補佐員	H25.1～H26.3
萩原 由美恵	同上	技術補佐員	H25.4～H26.10
奥島 葉子	同上	助教	H24.10～H27.3
奥田 利美	同上	技術補佐員	H26.4～H27.3
土岐 精一	農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・遺伝子利用基盤研究領域・先進作物ゲノム改変ユニット	ユニット長	H25.4～
遠藤 真咲	同上	主任研究員	H25.4～

研究項目

- ・ ポプラにおける細胞周期関連遺伝子の過剰発現または発現抑制による DNA 倍加誘導
- ・ 分解型 *CDKB2* の導入によるイネの DNA 倍加誘導
- ・ エピジェネティック制御による DNA 倍加誘導
- ・ ポプラで利用できる組織特異的プロモーターの単離

②「伊藤」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
伊藤 正樹	名古屋大学大学院生命農学研究科	准教授	H24.10～

佐藤 豊	国立遺伝学研究所	教授	H24.10～
鈴木 俊哉	同上	助教	H25.4～
梅根 一夫	基礎生物学研究所	助教	H26.4～
野本 友司	名古屋大学大学院生命 農学研究科	研究員	H29.5～
梅根 美佳	同上	研究員	H25.10～
高塚 大知	同上	研究員	H27.10～H28.3
立川 裕依子	同上	技術補佐員	H29.4～
那須 智子	同上	技術補佐員	H29.4～
山本 章子	同上	技術補佐員	H25.5～H27.1
大野 慈子	同上	技術補佐員	H25.4～H26.3
加藤 恭子	同上	技術補佐員	H25.4～H26.3
高橋 圭子	同上	技術補佐員	H25.4～H26.3
小野 奈津子	同上	技術補佐員	H25.9～H26.3
三宅 みちる	同上	技術補佐員	H25.4～H25.8

研究項目

- ・ イネにおける細胞周期関連遺伝子の過剰発現または発現抑制による DNA 倍加誘導
- ・ APC 標的タンパク質の同定と DNA 倍加への利用
- ・ 新規な DNA 倍加促進因子の同定と DNA 倍加への利用
- ・ イネの DNA 倍加変異体の単離と利用

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- 筑波大学の渡邊和男氏の協力を得て、4 倍体ポプラを筑波大学の隔離圃場で植栽した。また、29 年度は日本製紙(株)の関連会社の秋田十條化成(株)の敷地内で植栽し、30 年度から成長解析やバイオマス測定を行う準備を進めている。
- 京都大学の村田功二氏の協力を得て、4 倍体ポプラの物性解析(実質密度、容積密度、動的弾性率、内部摩擦、絶乾重量などの測定)を行った。
- 4 倍体ポプラの成分分析を、奈良先端大の出村拓氏・大谷美沙都氏の協力で行った。また、MYB46 過剰発現ポプラの提供も受けた。
- 東京大学の遠藤暁詩氏からシロイヌナズナの *WOX4*, *TED4* プロモーターの提供を受け、樹木での利用について助言を得た。
- CRISPR/Cas によるイネの *CDKB2* 遺伝子の破壊を、梅田グループメンバーである農研機構の土岐精一氏・遠藤真咲氏と共同で行った。
- 岡山大学資源植物科学研究所、岩手生物工学研究センター、秋田県立大学からイネ変異種子プールの提供を受け、変異種子に関する情報や技術的サポートを得た。岡山大学資源植物科学研究所が支援する、イネの DNA 倍加変異体の単離を課題とした共同研究が採択された。
- イネの DNA 倍加変異体から促進変異体を得るための新規変異導入および変異種子獲得に関して、岡山大学資源植物科学研究所の前川雅彦氏の協力を得た。
- 岡山大学資源植物科学研究所の長岐清孝氏の協力を得て、イネやシロイヌナズナの染色体観察を行った。また、免疫染色に関する技術的サポートや、抗体などの材料提供も受け

た。岡山大学資源植物科学研究所が支援する、エピジェネティック制御解析を課題とした共同研究が採択された。

- 理化学研究所の金鍾明氏から、各種ヒストン修飾に特異的な抗体の提供を受けた。
- 理化学研究所の関原明氏との共同研究として、DNA 倍加能が異なるシロイヌナズナ培養細胞を用いたマイクロアレイ解析を行った。
- ヒストン H3 のメチル化アッセイに関して、早稲田大学の胡桃坂仁志氏から助言と実験材料の提供を受けた。
- 伊藤グループメンバーである梅根一夫氏との共同研究が、基礎生物学研究所の個別共同利用研究に採択され、これにより変異イネの育成、交配、遺伝解析、セルソーターの利用などの協力が得られた。
- イネ tilling ライブラリーの供与、およびスクリーニングの技術的なサポートを九州大学の熊丸敏博氏より受けた。
- 次世代シーケンサーによる原因遺伝子の同定などの技術的サポートを、東山 ERATO (名古屋大学)および鈴木孝征氏 (中部大学)より受けた。
- 本領域他チームの研究代表者である芦荻基行氏の協力を得て、名古屋大学附属農場でのイネ倍加変異体の育成試験を行った。
- 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の桑田啓子氏より、質量分析によるプロテオーム解析の技術的サポートを受けた。
- DNA 倍加を誘導する化合物をスクリーニングするため、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所のケミカルライブラリーセンターから化合物ライブラリーの提供を受けた。
- 本領域他チーム (関チーム) の共同研究者である松永幸大氏 (東京理科大学) との共同研究により、イネ倍加変異体の細胞サイズや核 DNA 量の定量解析、およびそれらの三次元的分布について解析を行った。
- 本領域他チーム (浅見チーム) の共同研究者である中野雄司氏 (理化学研究所) との共同研究により、シロイヌナズナ倍加関連株のブラシノステロイド感受性試験を行った。
- 理化学研究所および産業技術総合研究所から、シロイヌナズナ完全長 cDNA および転写因子ライブラリーの提供を受けた。

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 4 倍体ポプラの作出と形質評価(梅田グループ)

これまで樹木で DNA 倍加を誘発した例がほとんどないため、DNA 倍加がシロイヌナズナで見られるような細胞や器官の巨大化をもたらすかどうか、また樹木においてバイオマスの増大につながるかどうかは不明であった。そこで、コルヒチン処理により 4 倍体のポプラを作出し、その形質評価を行った。

4 倍体ポプラの作出法の確立

in vitro で継代しているポプラを用いて、植え継ぎ後 28 日目に主茎を切除し、残った葉の付け根(腋芽)にコルヒチン溶液を滴下した。24 時間後に新たなコルヒチン溶液を滴下し、さらにその 24 時間後に滅菌水で洗浄した。1 ヶ月間培養を続けた後、出現してきたシュートを新たな培地に植え継いだ。この植え継ぎの作業を繰り返し、葉のプロイディを測定した。その結果、4C や 8C のプロイディをもつシュートの他に、様々なプロイディが混在するキメラのシュートも得られた。植え継ぎを繰り返すうちに、低いプロイディに変化していくシュートも多く見られた。これらの中で、植え継ぎを 3 回繰り返しても 4C のみの安定したプロイディをもつ個体を 4 倍体系統として確立した。同様な手法で、ユーカリの 4 倍体化にも成功した。この 4 倍体作出法により、組織培養を介さず、簡便に樹木の倍数体を得ることが可能なので、現在特許を出願中である。

4 倍体化に伴う細胞サイズの増大

in vitro で培養している 4 倍体ポプラの主茎を観察したところ、外側から内側へと並んだ木部細胞の細胞列あたりの数は 2 倍体と 4 倍体の間で差が見られなかったが、細胞サイズは 4 倍体の方が 1.5 倍程度大きかった(図1)。また、細胞サイズはどの細胞種でも 4 倍体の方が大きいことが明らかになった。つまり、ポプラでも DNA 倍数性が上がると細胞が巨大化することを確認することができた。木部細胞で二次細胞壁を高蓄積している *MYB46* 過剰発現ポプラ(奈良先端大・出村研究室提供)の 4 倍体も作出し、茎切片を観察したところ、巨大化した木部細胞に二次細胞壁が高蓄積している様子が観察された。これは、4 倍体化が有用形質をもつポプラのバイオマス増産にも有効であることを示唆するものである。

4 倍体ポプラの形質評価

鉢上げした 4 倍体ポプラを奈良先端大の植物温室で育成し、光合成能とバイオマスの評価を行った。4 倍体ポプラは葉の枚数が 2 倍体より若干少ないものの、各葉のサイズが大きく、1 個体あたりの総葉面積は 1.5 倍程度増えていることがわかった。葉面積あたりの光合成速度に顕著な差は見られなかったため、総葉面積の増加により、1 個体あたりの光合成量は 1.5 倍程度増えていた。背丈の伸びは 2 倍体より若干遅いものの、幹の基部直径は 4 倍体の方が太いことが明らかになった(図1)。背丈が単位長さ伸びる間に基部直径がどれだけ成長したかを解析したところ、4 倍体の方が横方向の肥大成長を顕著に行っていることがわかり、結果的に同じ背丈で比べると、4 倍体ポプラの方が 30%程度バイオマス生産量が増えていることが明らかになった。重量あたりの遊離糖については 2 倍体と 4 倍体で差が見られなかったことから、糖化効率は倍数体化により変化しないと考えられる。以上の結果から、4 倍体ポプラでは幹の肥大成長が促進され、樹幹基部にバイオマスが高蓄積されることが示された。

4 倍体ポプラの物性解析

京都大学大学院農学研究科の村田功二先生にお願いして、奈良先端大の植物温室で育成した 2 倍体と 4 倍体ポプラの樹幹(基部、中央部、先端部の 3 箇所)の物性解析をして頂いた。その結果、実質密度(細胞壁実質そのものの密度)、空隙率、内部摩擦には差が見られなかった。基部側の樹幹が太いため、基部側の乾燥重量は 4 倍体の方が重く、先端に近くなるほど 2 倍体との差がなくなった。一方、弾性率については、樹幹のどの部位においても 4 倍体の方が 2 倍体より低いことが明らかとなり、4 倍体の樹幹がしなやかな性質をもつことが示された。

4 倍体ポプラの野外実験

4 倍体ポプラが野外でどのような成長特性を示すのかを調べるために、27 年度と 28 年度は筑波大学の実験圃場で植栽を行った。しかし、虫害や急激な気温上昇などに見舞われ、成長解析を実施することができなかった。そこで、29 年度は日本製紙(株)の協力を得て、秋田十條化成(株)の敷地内で植栽を行った。27、28 年度と同様に、頂芽が休眠して成長を止めてしまう個体が多くあったため、腋芽が安定的に成長するのを待ち、冬の休眠時期を過ぎてから腋芽由来の幹の成長解析とバイオマス測定を行っていきたいと考えている。

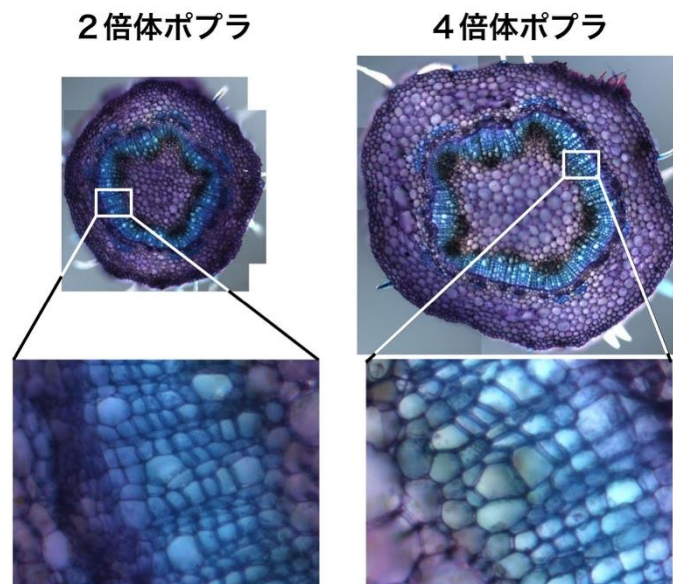


図1 2 倍体と 4 倍体ポプラの幹切片
下は拡大写真。4 倍体は幹が太く、木部細胞が大きい。

3. 2 CDK の機能阻害による DNA 倍加誘導(梅田グループ・伊藤グループ)

体細胞レベルで高度に DNA 倍加が起こるシロイヌナズナでは、G2/M 期の CDK(M-CDK)の活性低下が DNA 倍加を誘導することが知られている。M-CDK 活性の低下により G2 期から M 期への移行が阻害されると、M 期をスキップした DNA 倍加周期が回り始める、という考え方である。そこで、M-CDK 活性の制御に関わる因子をポプラやイネで遺伝子操作することにより、DNA 倍加を誘導できるかどうか検証した。

CDKB1

M-CDK には CDKB1 と CDKB2 の二種類がある。そのうち CDKB1 はサイクリン A2;3 (CYCA2;3)

と複合体を形成し、細胞分裂から DNA 倍加への移行を阻害することがシロイヌナズナの研究で明らかにされている。そこで、ポプラにおいて *CDKB1*, *CDKB2* の発現低下が DNA 倍加を誘導するかどうか調べた。各 2 遺伝子ずつコードされているので、4 遺伝子すべてをターゲットにした RNAi 形質転換体を作成したところ、*CDKB2* のみ、あるいは *CDKB1* と *CDKB2* の両方をノックダウンすると、4 倍体植物が得られることが明らかになった。しかし、体細胞レベルの DNA 倍加は観察されなかった。一方、イネにおいても *CDKB1* 遺伝子を CRISPR/Cas の系により破壊したが、DNA 倍加は観察されなかった。後で述べるように、*CYCA2* はイネにおいても DNA 倍加を抑制しているが、酵母 two-hybrid 法により調べたところ、イネの *CYCA2* は *CDKB1* だけでなく *CDKB2* と相互作用することから、イネでは *CDKB1* と *CDKB2* の間の機能重複により、*CDKB1* 遺伝子の破壊が DNA 倍加に効果を示さなかった可能性が考えられる。

CDKB2

シロイヌナズナの *CDKB2* はタンパク質分解制御を受けることが知られている。このため、シロイヌナズナでは *CDKB2* が積極的に分解されることにより DNA 倍加が誘導される可能性が考えられた。そこで、イネの *CDKB2* 遺伝子に変異を導入し、シロイヌナズナと同様に分解制御を受けるように改変しようと試みたが、うまくいかなかった。そこで、シロイヌナズナの分解型 *CDKB2* をイネに導入し、イネの内生の *CDKB2* を CRISPR/Cas の系により破壊することにした。シロイヌナズナ *CDKB2* をイネで G2/M 期特異的に発現させるのに、イネの内生の *CYCB2* プロモーターが有効であることがわかったので、*pCYCB2:Arabidopsis_CDKB2* をイネに導入した。その後、CRISPR/Cas によりイネの内生の *CDKB2* の破壊を試みたが、ホモで遺伝子破壊が起きた個体は得られなかった。また、ヘテロ個体でもプロイディの変化は観察されなかった。そこで、本実験は中止した。

CDK インヒビター

シロイヌナズナでは CDK インヒビター(SMR)の過剰発現が DNA 倍加を促進することが知られている。そこで、特に *CDKB1*, *CDKB2* の活性を阻害する CDK インヒビターを同定するために、*in vitro* キナーゼアッセイにより 9 種類のシロイヌナズナ SMR の阻害活性を調べた。しかし、*CDKB1*, *CDKB2* の活性を特異的に阻害する SMR を見出すことはできなかった。そこでこの計画は中止し、シロイヌナズナで DNA 損傷に応答した DNA 倍加誘導に働くことが知られている SMR7 に着目した。しかし、ポプラで SMR7 の過剰発現を試みたものの、プロイディの変化は観察されなかった。現在、イネにおける SMR の過剰発現も試みている。

MYB3R

M-CDK と結合して複合体を形成する *CYCA*, *CYCB* は、活性化型 MYB3R 転写因子により発現誘導される。そこで、ポプラやイネで *MYB3R* の発現抑制または遺伝子破壊を行い、DNA 倍加が誘導されるかどうか調べた。まず、ポプラで *MYB3R1*, *MYB3R4* のダブルノックダウンを試みたところ、プロイディが増加した個体は得られたが、これらの多くは枯死してしまった。次に、イネの *MYB3R* である *OsMYB3R1* と *OsMYB3R5* のダブルノックダウン株を作出したところ、2 倍体植物の一部の体細胞で DNA 倍加が高頻度に観察された(図2)。このような植物では、分裂組織で 8C の細胞(4C の細胞が G2 期にいる状態)がわずかに観察されたこと、また葉の表皮で大型化した孔辺細胞が生じる特徴的な細胞列が観察されたことから、倍加により生じた 4C の細胞が分裂により増殖していると考えられた。つまり、イネの *MYB3R* のノックダウン株では染色体数の倍加を伴うエンドマイトーシス

型の DNA 倍加が起きており、これにより生じた 4C の細胞が分裂して数を増やし、2C の細胞と混在したモザイク状態になっていると考えられた。

イネの *MYB3R* ノックダウン株は表現型が安定しないこと、また稔性が低いことから、詳細な表現型解析を行うために、*Tos17* 挿入および遺伝子ターゲティングにより *OsMYB3R1*, *OsMYB3R5* の遺伝子破壊株を取得した。交配により二重破壊株の作出を試みたが、2 つの遺伝子変異をホモにもつ個体は得られず、二重破壊株は胚性致死である可能性が考えられた。一方、単独の遺伝子破壊株では倍加した細胞は検出されなかったが、細胞板形成を阻害するカフェインを低濃度で処理すると、4C の細胞が高度に蓄積することが明らかになった。つまり、*OsMYB3R1* または *OsMYB3R5* の発現低下により細胞板形成が強く影響を受け、細胞質分裂が阻害されることによりエンドマイトーシスが誘発されたと考えられる。*OsMYB3R5* 破壊株にカフェインを処理すると再現性良く倍加した細胞が検出されたが、カフェイン処理を継続すると植物体の成長阻害が起きることが明らかになった。そこで、一過的なカフェイン処理の効果について検討を続けている。

APC 抑制因子

CYCA, CYCB は E3 ユビキチンリガーゼである後期促進複合体 (Anaphase-promoting complex, APC) によりタンパク質分解に導かれることが知られている。APC はその活性化因子である CCS52, CDC20 や、抑制因子である GIG1, UVI4 により活性が調節されている。そこで、ポプラやイネでこれらの制御因子の発現操作を行い、DNA 倍加を誘導できるかどうか検討した。まず、APC 抑制因子である *GIG1/UVI4* の発現抑制をポプラで試みたが、プロイディの変化は観察されなかった。次に、イネに 2 つ存在する *GIG1/UVI4* 遺伝子のうち、1 つに *Tos17* が挿入した遺伝子破壊株を取得し、表現型を解析した。その結果、体細胞レベルの DNA 倍加は認められなかったものの、ホモ破壊株の自家受粉により高頻度に 4 倍体の次世代植物が生じることがわかった。また、もう一方の *GIG1/UVI4* に関しては RNAi による発現抑制を試みたが、ほとんどの個体が不稔性を示し、DNA 倍加も観察されなかった。

APC 活性化因子

ポプラで APC 活性化因子をコードする CCS52, CDC20 を過剰発現させたところ、4 倍体や、2 倍体と 4 倍体のキメラ植物が得られた。しかし、4C より高いプロイディや体細胞レベルの DNA 倍加は観察されなかった。そこで、グルコルチコイドによる発現誘導系も試したが、発現誘導自体がうまくかからないことがわかった。一方、CCS52, CDC20 を過剰発現するイネ形質転換体を作出したところ、CDC20 過剰発現株でキメラ状に大きな細胞が観察された。したがって、エンドマイトーシス型の DNA 倍加が生じていると考えられたが、カフェインに対しては高感受性を示さなかったことから、*OsMYB3R* ノックダウン株の場合とは異なる要因によりエンドマイトーシスが生じていると考えられた。CDC20 過剰発現株では最大 32C までの高度な DNA 倍加が観察されたことから (図2)、イネで DNA 倍加を誘発するのに有効な遺伝子として、組織特異的なプロモーターを用いた遺伝子導入に利用することとした (「DNA 倍加誘導に利用できる組織特異的プロモーターの単離」の項目を参照)。

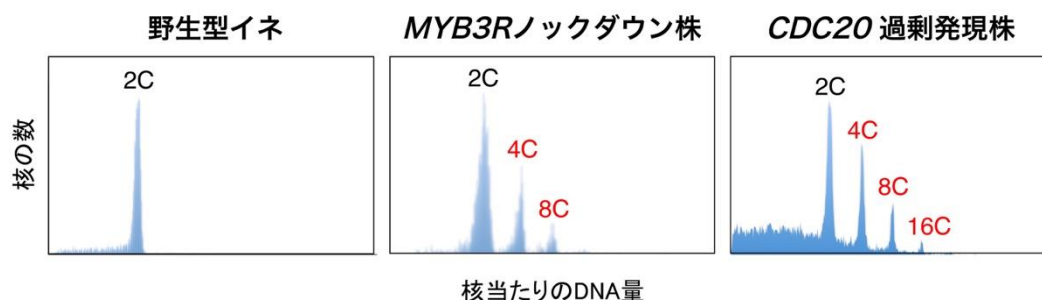


図2 イネ形質転換体のプロイディ解析結果

3. 3 APC 標的タンパク質の同定と DNA 倍加への利用 (伊藤グループ)

上でも述べた通り、CYCA, CYCB などの G2/M 期制御因子は後期促進複合体 (APC) と呼ばれる E3 ユビキチンリガーゼによりタンパク質分解に導かれる。シロイヌナズナでは APC が DNA 倍加を促進することがよく知られていることから、CYCA, CYCB 以外の APC 標的タンパク質を同定し、より効率的にイネやポプラで倍加を誘導する系を確立することを目的として研究を行った。

APC 抑制因子 GIG1 の発現誘導系を用いた APC 標的タンパク質の同定

APC 抑制因子をコードする *GIG1* 遺伝子を誘導的に発現するシロイヌナズナでは、APC 標的タンパク質として知られる CYCB1;1 の蓄積量が増加することがわかっていた。この系を利用して、*GIG1* の発現誘導により蓄積量が増加するタンパク質を網羅的に同定すれば、未知の APC 標的タンパク質を数多く同定できると考えられた。種々の条件検討の結果、細胞分裂活性の高い組織や培養細胞をプロテオーム解析の材料として用いる必要があることがわかったため、まず若い葉や根端分裂組織から抽出したタンパク質を質量分析 (ESI-MS) により解析した。その結果、*GIG1* を誘導した時にのみ検出されるタンパク質を多数同定することができたが、CYCB1;1 などの既知の APC 標的タンパク質は検出されなかった。タバコ培養細胞 BY2 を材料に用いた場合も結果は同様であった。おそらく蓄積量の少ないタンパク質は質量分析により検出されなかったと推測されたため、本実験は中止することとした。

in silico 解析による APC 標的タンパク質の同定

動物で知られる APC 標的タンパク質の多くは、標的となるアミノ酸配列 (D-box) をもち、M 期特異的に発現するという共通の特徴をもっている。そこで、同様の特徴をもつタンパク質を、シロイヌナズナの公開データベースを利用した *in silico* 解析により選抜した。一定の基準を設けて選抜した 7 種のタンパク質に、以前から着目していたタンパク質 1 種を加えた 8 種について、APC の標的であるかどうか検討した。その結果、At5g66230 が *GIG1* の誘導発現によりタンパク質が蓄積すること、また D-box に変異を導入すると蓄積量が増大することなどから、植物特異的な APC 標的タンパク質であることが判明した。しかし、このタンパク質の過剰発現や、D-box に変異を導入した安定型タンパク質の発現は、シロイヌナズナの DNA 倍加に対してほとんど影響を与えなかった。また、この遺伝子の変異体や、パラログ遺伝子 (At3g51230) を CRISPR/Cas9 により破壊した二重変異体の解析を行ったが、DNA 倍加も含め、顕著な表現型を見出すことはできなかった。そこで、イネやポプラへ導入する実験は取りやめることとした。

GRAS ファミリー転写因子 E1M による DNA 倍加誘導

上記の解析で、最終的に APC の標的ではないと結論された新規 GRAS ファミリー転写因子 E1M が、シロイヌナズナで過剰発現させると DNA 倍加を強く促進する効果をもつことが明らかになった。逆に遺伝子破壊株ではプロイディの低下と細胞分裂の促進が見られたことから、E1M は DNA 倍加と細胞分裂のバランスを調節する制御因子であると考えられた。シロイヌナズナで E1M を過剰発現させると、プロイディは上がるものの、細胞分裂の阻害により器官成長は全体として抑制されることがわかった。しかし、*e1m* 変異体で E1M を誘導的に発現させると、誘導のタイミングによって葉の成長が促進されるケースがあることがわかった。つまり細胞分裂から DNA 倍加への移行のタイミングや倍加の程度を適度にコントロールすることにより、植物の器官成長に対してプラスの効果を与えることが可能であることが示された。ポプラにおける E1M の過剰発現ではほとんどプロイディの変化は観察されなかったが(梅田グループ)、現在イネにおいて E1M 過剰発現株を作出しており、今後 DNA 倍加への効果を検討する予定である。

イネの *e1m* 変異体は細胞数が増加する一方、細胞サイズが減少するため、結果として器官サイズは減少することがわかっている。そのため、*e1m* の弱い変異アレルを獲得することにより、細胞数と細胞サイズのバランスの適度な変化により、器官成長にプラスの効果を与える変異体を獲得できる可能性が考えられる。これまでにイネの tilling ライブラリー(九州大学大学院農学研究院・熊丸敏博先生より提供)から E1M に塩基置換をもつ株を取得しており、現在それらの表現型解析を行っている。

3. 4 エピジェネティック制御による DNA 倍加誘導(梅田グループ)

上で述べたように、シロイヌナズナで DNA 倍加に促進的な効果をもつ因子であっても、ポプラやイネにおいては DNA 倍加を誘導する効果はそれほど高くないことがわかった。そこで、DNA 倍加能に影響を与える他の制御要因について検討したところ、クロマチン構造制御が重要であることを見出した。この結果を踏まえて、クロマチン構造に影響を与えるエピジェネティック制御遺伝子や阻害剤を用いて DNA 倍加誘導を試みた。

DNA 倍加の阻害要因の同定

DNA 倍加能の有無を決める制御要因を探るため、梅田グループで継代培養していたシロイヌナズナ培養細胞を用いて解析を行った。LS 培地で培養している細胞(DP(+))は DNA 倍加能が高く、MM2d 培地で培養している細胞(DP(-))は DNA 倍加能が低い。まず、FISH 法によりクロマチン構造を解析したところ、DP(+)細胞ではヘテロクロマチンが緩んでいることが明らかになった。そこで、DP(-)細胞を DNA メチル化阻害剤で処理してクロマチン構造を緩和させたところ、DNA 倍加の誘導と細胞の肥大化が観察された。逆に、ヘテロクロマチン化を亢進する *SUVH2* を過剰発現させたシロイヌナズナでは、DNA 倍加の阻害が観察された。これらの結果から、ヘテロクロマチン構造の緩和が DNA 倍加能の獲得に重要であることが示唆された。

クロマチン構造制御に関わる遺伝子の発現制御による DNA 倍加誘導

chromatin assembly factor 1 (CAF-1)複合体はヒストンシャペロン的一种であり、H3.1 のクロマチンへの取り込みを促進することが知られている。シロイヌナズナでは、CAF-1 のサブユニットの一つである *FAS2* の変異により、DNA 倍加が亢進することが知られている。この結果も、ヘテロクロマチン化が DNA 倍加を阻害するという上述の仮説を支持している。そこで、ポプラがもつ二種類の *FAS*

遺伝子 (*FAS1*, *FAS2*) の発現を抑制する形質転換体を作成し、DNA 倍加を誘導できるかどうか検討した。その結果、*FAS2* の RNAi 形質転換体 1 系統のみでプロイディの上昇が観察されたが、1 ヶ月後には野生型と同じレベルまで戻っていた。このことから、*FAS* 遺伝子の発現抑制だけでは DNA 倍加誘導は難しいと考えられた。そこで、*FAS1*, *FAS2* の RNAi 形質転換体に *CCS52* (過剰発現により 4 倍体シュートが得られた遺伝子) の過剰発現コンストラクトを導入したところ、再分化個体が得られないものが多く、再分化個体が得られたものもプロイディの増加は観察されなかった。

薬剤処理による DNA 倍加誘導

遺伝子操作だけでなく、クロマチンを緩めるような薬剤処理も DNA 倍加誘導に効果がある可能性が考えられる。そこで、まずポプラにおいてコルヒチンとゼブラリン (DNA メチル化阻害剤) の同時処理を試みた。腋芽のコルヒチン処理では、0.0075% 以上のコルヒチン処理でプロイディの高いシュートが得られたので、DNA 倍加を誘導できない最高濃度として 0.005% のコルヒチンを使用し、それにゼブラリンを加えて同時処理を行ったが、プロイディの変化は観察できなかった。次に、4 倍体や 2/4 倍体のキメラ植物が得られた *CCS52* 過剰発現体を用いてゼブラリン処理を行った。その結果、若干 4C のピークの上昇が観察されたが、それほど顕著なものではなかった。そこで、ほとんど DNA 倍加が見られなかった *FAS1*, *FAS2* の RNAi 形質転換体に 0.005% コルヒチン処理を行ったところ、この場合は 8C のピークまで現れるような DNA 倍加が観察された (図3)。

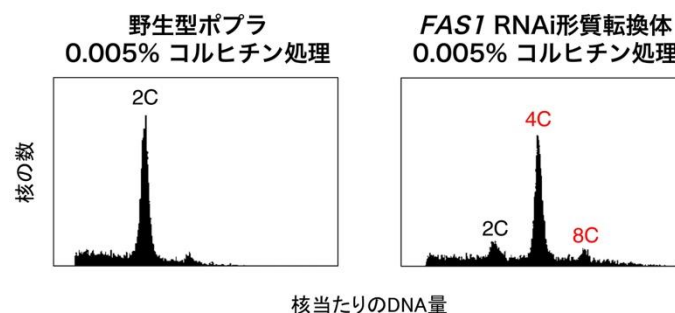


図3 ポプラ *FAS1* RNAi 形質転換体のコルヒチン処理による DNA 倍加誘導

3. 5 新規な DNA 倍加促進因子の同定と DNA 倍加への利用 (伊藤グループ)

これまでシロイヌナズナの DNA 倍加に影響を与える遺伝子は数多く報告されているが、このような遺伝子を網羅的に同定する試みはなされていなかった。そこで、エンドマイトーシスが異所的に起こるシロイヌナズナ *gig1* 変異体を利用して、その表現型を亢進する遺伝子の探索を行った。用いたライブラリーは、シロイヌナズナ完全長 cDNA ライブラリー (約 10,000 クローン) と転写因子ライブラリー (SRDX を付加した転写因子約 1,600 クローン) である。その結果、完全長 cDNA ライブラリーからは 2 クローン、転写因子ライブラリーからは 7 クローンを候補遺伝子として同定した。これらの変異体の解析から、新規 C3H 型 Zinc finger タンパク質 *AZR1/2*、RNA 結合タンパク質 *MAC5A*、およびポリ(A)結合タンパク質 *PABN1* の変異により *gig1* 表現体の表現型が亢進することが明らかになった。*AZR1/2* および *MAC5A* はいずれもスプライソソームを構成するタンパク質として同定されている。実際、*azr1* 変異体の RNA-seq 解析により、intron retention を始めとしたスプライシング異常がゲノム規模で見出された。また、mRNA のポリアデニル化に必須な *PABN1* の変異によっても同様の異常が見られたことから、核内 pre-mRNA 代謝異常が何らかのメカニズムにより細胞周期チ

チェックポイントを発動し、結果的に G2/M 期の移行活性が低下した *gig1* 変異体の表現型を亢進したものと考えられた。しかし、これらの遺伝子の変異は野生型シロイヌナズナに対しては DNA 倍加を亢進する効果を示さなかったことから、この研究項目は平成 27 年度までで終了することとした。

3. 6 イネの DNA 倍加変異体の単離(伊藤グループ)

シロイヌナズナの研究から明らかにされている DNA 倍加関連因子は、いずれも倍加の程度に影響を与える因子であり、倍加の有無を決定するような仕組みに関連しているかどうかは明らかでない。そこで、本来 DNA 倍加を起こさないイネで倍加を起こすような変異体を単離し、原因遺伝子を同定することにより、DNA 倍加能を決定する因子の特定を試みた。

栽培イネと野生イネの解析

国内外の栽培イネ計 126 系統(農業生物資源研究所より提供)に加え、22 種知られているイネ属の植物種(野生イネ)のうち、入手可能な 15 種(国立遺伝学研究所より提供)を用いて DNA 倍加の有無を解析した。しかし、DNA 倍加を示す系統(2C のピークに加え 4C 以上のピークを示す系統)を見出すことはできなかった。

cyca2 変異体の単離・同定

ひとめぼれ(EMS 処理)、あきたこまち(NMU 処理)の変異種子プールから、それぞれ約 2500 個体をスクリーニングし、DNA 倍加を示す個体を合計 6 個選抜した。また、トランスポゾン *nDart* タグ系統(岡山大学資源植物科学研究所より提供)についてもスクリーニングを行い、933 系統から 3 個体の DNA 倍加変異体を選抜した。

まず、DNA 倍加の程度が顕著なひとめぼれ由来の 2 系統について解析したところ、これらは表現型がよく似ており、葉において概ね 1:1 の比で 2C と 4C の細胞が混在していることがわかった(図 4)。4C の細胞は分裂していないと考えられたため、染色体数の倍加を伴わないエンドリプリケーション型の DNA 倍加が生じていると考えられた。次世代シーケンスによりゲノム配列を解析したところ、これら変異体は、M 期サイクリンの一種をコードする *CYCA2* 遺伝子に異なる塩基置換をもつことが明らかになった。シロイヌナズナでは *CYCA2* はエンドリプリケーションを負に制御することが知られているので、イネとシロイヌナズナの *CYCA2* は DNA 倍加に関して似た機能を有することが示唆された。

cyca2 変異体は温室では野生型植物と同様に成長したが、圃場(名古屋大学・東郷フィールド)では成長遅延が認められた。また、この変異体では G2 期の遅延により細胞周期が一回りする時間が野生型植物より 2 時間程度長くなっており、その結果、細胞サイズの増大と細胞数の低下が引き起こされていることがわかった(図 4)。このため、*CYCA2* を器官サイズの増大に利用するためには、完全な機能欠失ではなく、細胞サイズと細胞数のバランスを適度に変化させるような弱い変異アリルが有効であると考えられた。そこで、イネの *tilling* ライブラリーのスクリーニングを行い、合計約 5400 系統のスクリーニングにより、*CYCA2* に一塩基多型を持つ 22 系統を同定した。現在までに 4 系統からホモ個体を分離したが、DNA 倍加に関する表現型は見られていない。今後、残りの系統についてもホモ系統の分離と表現型解析を行っていく予定である。

その他の変異体の単離・同定

イネ倍加変異体のスクリーニングにより単離された *cyca2* 以外の変異体についても原因遺伝子の

同定を進めたが、あきたこまち由来の系統は表現型が不安定なため、原因遺伝子を正しくマッピングすることができず、遺伝子の同定には至らなかった。また、トランスポゾン *nDart* タグ系統から単離された変異体については、次世代シーケンスの結果、候補遺伝子として *Oligourigylate binding protein* が同定されたが、この遺伝子の変異が表現型の原因となっているかどうかはまだ確認していない。

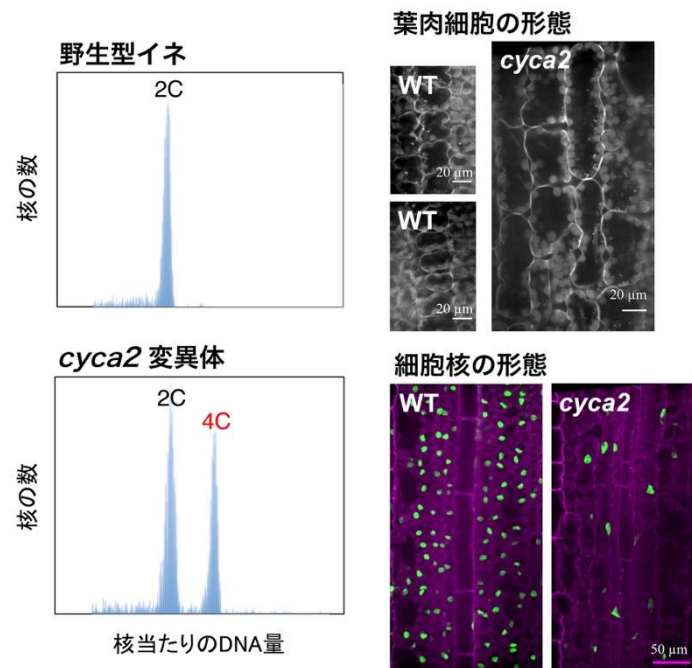


図4 イネ *cyca2* 変異体のプロイディと細胞や核の形態
cyca2 変異体の葉肉細胞や細胞核は野生型より大きい。

3. 7 DNA 倍加誘導に利用できる組織特異的プロモーターの単離 (梅田グループ・伊藤グループ)

エンドリプリケーション型の DNA 倍加を誘導するような遺伝子導入を行うと、DNA 倍加が始まるまでの細胞分裂を阻害するケースがあり、その場合はバイオマスの増産につながらない。そのため、DNA 倍加を誘導する遺伝子を分裂組織以外で発現させる方策が必要となる。一方、エンドマイトーシス型の DNA 倍加を起こした細胞は分裂を続けることができるので、逆に分裂組織で発現させるとバイオマス増産への効果を期待できる。そこで、ポプラやイネで組織特異的なプロモーターを用いて DNA 倍加を誘導する実験を行った。

抑制型 E2F/DEL 転写因子を用いたプロモーターの単離

シロイヌナズナの抑制型 E2F/DEL 転写因子は、細胞分裂の終了時 (DNA 倍加への移行時) まで遺伝子発現を抑制する働きをもつことが知られている。そこで、抑制型 E2F/DEL の標的遺伝子の中に、細胞分裂終了後に活性化するプロモーターをもつものがあると考え、まずポプラの抑制型 E2F/DEL オルソログの機能解析を行った。しかし、ポプラの過剰発現体および発現抑制体のいずれにおいても野生型と比べてプロイディに顕著な差は見られず、形態にも異常は観察されなかつ

た。したがって、ポプラの抑制型 E2F/DEL は細胞分裂の終了にはほとんど関与していないと判断し、この計画は中止した。

ポプラにおける *TED4* プロモーターを用いた解析

樹木でバイオマスを増産させるには、木部細胞特異的に DNA 倍加を誘導し、細胞を巨大化させるのが有効であると考えられる。シロイヌナズナの *WOX4* と *TED4* 遺伝子は、木部特異的に発現することが知られている。そこで、これらのシロイヌナズナ遺伝子のプロモーターがポプラにおいても木部特異的な発現操作に有効かどうかを調べるために、レポーター遺伝子として *pWOX4::GUS*, *pTED4::GUS* をポプラに導入し、*GUS* の発現部位を観察した。その結果、*pWOX4::GUS* は形成層でも強く発現していることがわかり、このプロモーターを用いて DNA 倍加を誘導すると細胞分裂を阻害してしまう可能性が考えられた。一方、*pTED4::GUS* は形成層の内側の細胞で非連続的に発現している様子が観察された。また、シロイヌナズナに *pTED4::CCS52A1* を導入したところ、道管や髄の細胞サイズが大きくなることを確認できた。これらの結果から、*TED4* プロモーターの方が DNA 倍加誘導に適していると判断した。

そこで、ポプラにおいて木部特異的に DNA 倍加を誘導するために、恒常的過剰発現で倍数体シュートの出現を確認できた *CCS52A* と *CDC20* を *TED4* プロモーターにつなぎ、ポプラに導入した。しかし、*pTED4::CCS52A1* については *CCS52A1* の発現量が野生型より低下していることが明らかとなり、木部特異的な発現誘導にはさらなる工夫が必要であると考えられた。

イネにおける *CDC20* の分裂組織特異的な過剰発現

上で述べたように、イネで *CDC20* を過剰発現させるとエンドマイトーシスが誘発される。エンドマイトーシスを起こした細胞は分裂を続けることができるので、*CDC20* を分裂組織で過剰発現させれば、倍加した細胞の数を増やしてバイオマスの生産量を上げることができると考えられる。そこで、既存のトランスクリプトーム情報をもとに、葉や根の分裂組織で特異的かつ強く発現する遺伝子として *OsCYCB2;2* と *OsDEL2* を同定し、これらの遺伝子のプロモーターに *CDC20* をつないでイネに導入した。しかし、*T0* 世代では不稔性を示す系統が多く、また、現在までに種子が得られた系統でも DNA 倍加を起こしているものは見出されていない。残りの形質転換体についても種子が得られ次第、DNA 倍加に関する表現型を解析していく予定である。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 20 件)

1. Ogita, N., Okushima, Y., Tokizawa, M., Yamamoto, Y. Y., Tanaka, M., Seki, M., Makita, Y., Matsui, M., Okamoto-Yoshiyama, K., Sakamoto, T., Kurata, T., Hiruma, K., Saijo, Y., Takahashi, N. and Umeda, M. Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 94: 439-453, 2018 (DOI: 10.1111/tpj.13866)
2. Chen, P., Takatsuka, H., Takahashi, N., Kurata, R., Fukao, Y., Kobayashi, K., Ito, M. and Umeda, M. *Arabidopsis* R1R2R3-Myb proteins are essential for inhibiting cell division in response to DNA damage. *Nature Commun.* 8: 635, 2017 (DOI:10.1038/s41467-017-00676-4)
3. Qi, X., Han, S.K., Dang, J.H., Garrick, J.M., Ito, M., Hofstetter, A.K. and Torii, K.U. Autocrine regulation of stomatal differentiation potential by EPF1 and ERECTA-LIKE1 ligand-receptor signaling. *Elife.* 6: e24102, 2017 (DOI: 10.7554/eLife.24102)
4. 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 (DOI: 10.1111/gtc.12436)
5. Nambo, M., Kurihara, D., Yamada, T., Nishiwaki-Ohkawa, T., Kadofusa, N., Kimata, Y., Kuwata, K., Umeda, M. and Ueda, M. Combination of synthetic chemistry and live-cell imaging identified a rapid cell division inhibitor in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 57: 2255-2268, 2016 (DOI: 10.1093/pcp/pcw140)
6. Weimer, A.K., Biedermann, S., Harashima, H., Roodbarkelari, F., Takahashi, N., Foreman, J., Guan, Y., Pochon, G., Heese, M., Van Damme, D., Sugimoto, K., Koncz, C., Doerner, P., Umeda, M. and Schnittger, A. The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 35: 2068-2086, 2016 (DOI: 10.15252/embj.201593083)
7. Kozgunova, E., Suzuki, T., Ito, M., Higashiyama, T., Kurihara, D. Haspin kinase has multiple functions in the plant cell division regulatory network. *Plant Cell Physiol* 57: 848-861, 2016 (DOI: 10.1093/pcp/pcw030).
8. Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Magyar, Z., Bögre, L. and Ito, M. MYB3Rs, plant homologs of Myb oncoproteins, control cell cycle-regulated transcription and form DREAM-like complexes. *Transcription* 6: 106-111, 2015 (DOI: 10.1080/21541264.2015.1109746)
9. 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. and Ito, M. Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J* 34: 1992-2007, 2015 (DOI: 10.15252/embj.201490899)

10. 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 (DOI: 10.1111/gtc.12255)
11. 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 (DOI: 10.1111/tpj.12872)
12. Saito, T., Fujikawa, H., Haga, N., Suzuki, T., Machida, Y. and Ito, M. 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, 2015 (DOI: 10.4161/15592324.2014.990817)
13. Sasabe, M., Ishibashi, N., Haruta, T., Minami, A., Kurihara, D., Higashiyama, T., Nishihama, R., Ito, M. and Machida, Y. 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, 2015 (DOI: 10.1007/s10265-014-0687-2)
14. 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 (DOI: 10.1111/tpj.12652)
15. Okushima, Y., Shimizu, K., Ishida, T., Sugimoto, K. and Umeda, M. Differential regulation of B2-type CDK accumulation in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Rep.* 33: 1033-1040, 2014 (DOI: 10.1007/s00299-014-1581-z)
16. Yi, D., Kamei, C.L.A., Cools, T., Vanderauwera, S., Takahashi, N., Okushima, Y., Eekhout, T., Yoshiyama, K.O., Larkin, J., Van den Daele, H., Conklin, P., Britt, A., Umeda, M. and De Veylder, L. The *Arabidopsis thaliana* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 control the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell* 26, 296–309, 2014 (DOI: 10.1105/tpc.113.118943)
17. Takahashi, N., Kong, S. and Umeda, M. Dof transcription factors control the expression of the anaphase promoting complex/cyclosome activator *CCS52A1*. *Plant Biotechnol.* 30, 407–410, 2013 (DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0408a)
18. Araki, S., Kato, K., Suzuki, T., Okumura, T., Machida, Y. and Ito, M. Cosuppression of *NtmybA1* and *NtmybA2* causes downregulation of G2/M phase-expressed genes and negatively affects both cell division and expansion in tobacco. *Plant Sig. Behav.* 9, e26780, 2013 (DOI: 10.4161/psb.26780)
19. Takahashi, N., Kajihara, T., Okamura, C., Kim, Y., Katagiri, Y., Okushima, Y., Matsunaga, S., Hwang, I. and Umeda, M. Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots. *Curr. Biol.* 23, 1812–1817, 2013 (DOI: 10.1016/j.cub.2013.07.051)
20. Yoshiyama, K.O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H. and Umeda, M. ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the

DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 14, 817–822, 2013 (DOI: 10.1038/embor.2013.112)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Magyar, Z., Bögre, L. and Ito, M. DREAMs make plant cells to cycle or to become quiescent. *Curr Opin Plant Biol* 34: 100-106, 2016 (DOI: 10.1016/j.pbi.2016.10.002)
2. 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)
3. Aki, S.S. and Umeda, M. Cytrap marker systems for *in vivo* visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Methods Mol. Biol.* 1370: 51-57, 2016 (DOI: 10.1007/978-1-4939-3142-2_4)
4. Takatsuka, H. and Umeda, M. Epigenetic control of cell division and cell differentiation in the root apex. *Front. Plant Sci.* 6: 1178, 2015 (DOI: 10.3389/fpls.2015.01178)
5. Ito, M. and Machida, Y. Reprogramming of plant cells induced by 6b oncoproteins from the plant pathogen *Agrobacterium*. *J. Plant Res.* 128: 423-435, 2015 (DOI: 10.1007/s10265-014-0694-3)
6. Matsunaga, S. and Ito, M. Endomitosis induces a giant polyploidy cell on the leaf epidermis. In *Atlas of plant cell structure* (T. Noguchi *et al.*, eds.), Springer, New York, pp. 165-186, 2015 (DOI: 10.1007/978-4-431-54941-3)
7. Takahashi, N. and Umeda, M. Cytokinins promote onset of endoreplication by controlling cell cycle machinery. *Plant Signal. Behav.* 9: e29396, 2014 (DOI: 10.4161/psb.29396)
8. Yoshiyama, K.O., Kimura, S., Maki, H., Britt, A.B. and Umeda, M. The role of SOG1, a plant-specific transcriptional regulator, in the DNA damage response. *Plant Signal. Behav.* 9: e28889, 2014 (DOI: 10.4161/psb.28889)
9. Takahashi, N. and Umeda, M. Cell cycle. In *The Plant Sciences – Cell Biology* (B. Liu, S. Assmann, eds.), Springer, New York, pp. 1-19, 2014
10. Takatsuka, H. and Umeda, M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J. Exp. Bot.* 65: 2633-2643, 2014 (DOI: 10.1093/jxb/ert485)
11. Ito, M. Expression of mitotic cyclins in higher plants: transcriptional and proteolytic regulations. *Plant Biotech. Rep.* 8: 9–16, 2014 (DOI: 10.1007/s11816-013-0297-9)
12. Magyar, Z., Ito, M., Binarová, P., Mohamed, B. and Bogre, L. Cell cycle modules in plants for entry into proliferation and for mitosis. In *Plant Genome Diversity* (J. Greilhuber *et al.*, eds.) vol. 2, pp. 77–97, 2013 (DOI: 10.1007/978-3-7091-1160-4_6)

13. 伊藤正樹, DNA 倍加サイクルを制御する *GIG1* 遺伝子: 植物細胞の DNA 量を制御する仕組み. *化学と生物* 51: 513–514, 2013

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 12 件、国際会議 17 件)

1. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Control of chromatin structure along differentiation trajectories. 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌, 2018 年 3 月 29 日
2. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Maintenance of genome integrity in root stem cells. Joint Seminar IBT–NAIST, Institute of Biotechnology, Hanoi (Vietnam), March 19, 2018
3. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Maintenance of genome integrity in root stem cells. Plant Cell and Developmental Biology: Approaches to Multiscale Biosystems. International Research Organization for Advanced Science and Technology (IROAST), 熊本, November 14, 2017
4. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Maintenance of genome integrity in root stem cells. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Academia Sinica, Taipei (Taiwan), November 5, 2017
5. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Maintenance of genome integrity in root stem cells. IGDB Bio International Symposium, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing (China), October 26, 2017
6. 伊藤正樹(名大院・生命農), 植物における細胞周期遺伝子の発現制御 ～転写因子研究から見えてきた多様な生理学的役割～. 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科セミナー, 生駒, 2017 年 9 月 15 日
7. 伊藤正樹 (名大院・生命農), 細胞分裂実行因子の発現制御 ～植物の一生を通じて働く転写因子複合体～. 日本植物学会第 81 回大会, 野田, 2017 年 9 月 8 日
- *8. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), Hormonal control of genome integrity in roots. Plant Organ Growth Symposium 2017, Elche (Spain), March 15, 2017
9. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Hormonal control of genome integrity in *Arabidopsis* roots. Life Science Seminar in POSTECH, Pohang (Korea), December 16, 2016
10. 伊藤正樹(名大院・生命農), Endoreplication as an effective growth strategy in plants. International Graduate Student Symposium on Celebration of the 70th Anniversary of Dong-A University, Busan (Korea), November 10, 2016
11. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), DNA double-strand breaks suppress root growth by enhancing cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. Plant Genome Stability and Change, 葉山, July 8, 2016

12. 荻田伸夫(奈良先端大・バイオ), 時澤睦朋(岐阜大・連農), 山本義治(岐阜大・応用生物), 奥島葉子(奈良先端大・バイオ), 倉田哲也(東北大・生命科学), 岡本(愿山)郁(京産大・生命資源環境), 晝間敬(奈良先端大・バイオ), 西條雄介(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Comprehensive analysis of target genes of SOG1, a master regulator of DNA damage response. Plant Genome Stability and Change, 葉山, July 8, 2016
13. Chen, Poyu, Weimer, A. K., Biedermann, S., Harashima, H.(ストラスブルグ大), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 杉本慶子(理研・CNRS), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Koncz, C.(マックスプランク育種学研究所), Doerner, P.(エジンバラ大) and Schnittger, A.(ストラスブルグ大) The cyclin-dependent kinase B1 (CDKB1)-cyclin B1 (CYCB1) complex is a major regulator of homologous recombination repair in *Arabidopsis*. Plant Genome Stability and Change 葉山, July 8, 2016
- *14. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Hormonal control of genome integrity in the root meristem. International Conference on Arabidopsis Research, GyeongJu (Korea), June 30, 2016
15. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 藤本啓介(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Maintenance of genome integrity in root stem cells under DNA stress, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手, 2016 年 3 月 19 日
16. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 植物の幹細胞の死と再生」幹細胞の基本原則と特異性 ～植物と動物の比較から～. 岡崎, 2015 年 11 月 27 日
17. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 植物がもつ DNA 倍加という戦略. 第 15 回けいはんな地区植物科学懇談会／第 40 回植物バイオテクシンポジウム, 京都, 2015 年 10 月 30 日
18. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 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, 新潟, 2015 年 9 月 7 日
19. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 丸池加奈子(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 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, 新潟, 2015 年 9 月 6 日
20. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 伊藤正樹(名大院・生命農), Development of high-biomass plants by induction of DNA polyploidization. 第 33 回日本植物細胞分子生物学会(東京)大会・シンポジウム, 東京, 2015 年 8 月 12 日
21. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 藤本啓介(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), Stem cell replenishment maintains genome integrity. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 2015 年 3 月 17 日
22. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 信澤岳(奈良先端大・バイオ), Epidermis-derived signals control plant organ growth. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 26 日
- *23. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), DNA damage response in *Arabidopsis* roots.

Plant Cell Cycle Workshop, Trebon (Czech) June 26, 2014

24. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Control of cell division in *Arabidopsis* roots. Life Science Seminar in POSTECH, Pohang (Korea), November 25, 2013

*25. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Control of organ growth by restricting cell proliferation. Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology, Valencia (Spain), July 5, 2013

26. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Cell cycle control in *Arabidopsis* roots by internal and external factors. VIB Seminar, Ghent (Belgium), July 2, 2013

27. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Cell cycle control in *Arabidopsis* roots by internal and external factors. IBMP-CNRS Seminar, Strasbourg (France), July 1, 2013

28. 高橋直紀 (奈良先端大・バイオ), 梅田正明 (奈良先端大・バイオ), 植物の細胞増殖を制御する分子機構. 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻セミナー, 名古屋, 2013 年 6 月 5 日

29. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Cytokinin: A key hormone controlling cell division during organ growth. UC Davis Plant Biology Graduate Group Seminar, UC Davis (USA), March 1, 2013

② 口頭発表 (国内会議 32 件、国際会議 5 件)

1. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 荻田伸夫(奈良先端大・バイオ), 高橋知伸(奈良先端大・バイオ), 谷口昌司(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), ANAC044 および ANAC085 は DNA 損傷による細胞周期停止に必要である. 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌, 2018 年 3 月 28 日

2. 杉山輝樹(奈良先端大・バイオ), 野口博史(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), CDK 阻害因子による幹細胞維持機構の解明. 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌, 2018 年 3 月 28 日

3. 野本友司(名大院・生命農), 鈴木俊哉(名大院・生命農), 鈴木孝征(中部大・応用生物), 伊藤正樹(名大院・生命農), 細胞の数とサイズの適切な維持に関わる GRAS 及び AP2 型転写因子の解析. 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌, 2018 年 3 月 28 日

4. 稲田のりこ(奈良先端大・バイオ), 坂本卓也(東京理科大・理工), 松永幸大(東京理科大・理工), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), アクチン脱重合因子による遺伝子発現制御機構の解析. 日本植物学会第 81 回大会, 野田, 2017 年 9 月 8 日

5. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), クロマチン構造制御による DNA 倍加誘導. 第 35 回日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会, 大宮, 2017 年 8 月 31 日

6. 鈴木俊哉(名大院・生命農), 桑田啓子(名大・WPI-ITbM), 東山哲也(名大院・理, 名大・WPI-ITbM), 伊藤正樹(名大院・生命農), 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, 盛岡, 2016 年 3 月 20 日

7. 杉山輝樹(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Control of the cell cycle in two distinct cell files of the root epidermis. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017 年 3 月 18 日
8. 高瀬めぐみ(名大院・生命農), 鈴木孝征(中部大・応用生物), 大谷美沙都(奈良先端大・バイオ), 伊藤正樹(名大院・生命農), RNA 代謝異常と細胞周期抑制を結ぶ新奇チェックポイント機構の存在の可能性. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017 年 3 月 18 日
9. 梅根美佳(名大院・生命農), 坂本勇貴(東京理科大・理工), 長谷川淳子(東京理科大・理工), 松永幸大(東京理科大・理工), 伊藤正樹(名大院・生命農), 核内倍加を起こさないイネにおける細胞増殖制御の特性. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017 年 3 月 18 日
10. 安喜史織(奈良先端大・バイオ), 三神達也(奈良先端大・バイオ), 西浜竜一(京大院・生命科学), 河内孝之(京大院・生命科学), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), ゼニゴケにおけるサイトカイニンレスポンスレギュレーターの機能解析. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017 年 3 月 17 日
11. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), Brassinosteroids are involved in stem cell replenishment in *Arabidopsis* roots under DNA damage. Plant Organ Growth Symposium 2017, Elche (Spain), March 15, 2017
12. 鈴木俊哉(名大院・生命農), Breuer, C.(理研・CNRS), 石田喬志(熊本大・自然科学), 鈴木孝征(中部大・応用生物), 東山哲也(名大院・理, 名大・WPI-ITbM), 杉本慶子(理研・CNRS), 伊藤正樹(名大院・生命農), 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, 神戸, 2015 年 12 月 2 日
13. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 極性をもった根の細胞成長の制御メカニズム. 第1回細胞骨格研究会, 三島, 2015 年 11 月 28 日
14. 奥村徹(名大院・生命農), 伊藤正樹(名大院・生命農), 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, 新潟, 2015 年 9 月 7 日
15. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 栄養応答と細胞分裂・ゲノムの制御, 第1回植物の栄養研究会, 東京, 2015 年 9 月 4 日
16. 梅根美佳(名大院・生命農), 井上慎子(名大院・生命農), 梅根一夫(基生研), 寺内良平(岩手生工研), 永澤信洋(秋田県立大・生物資源), 前川雅彦(岡山大・資植研), 伊藤正樹(名大院・生命農), 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, 東京, 2015 年 3 月 18 日
17. 鈴木俊哉(名大院・生命農), Breuer, C.(理研・CSRS), 石田喬志(熊大院・自然科学), 鈴木孝征(名大院・理), 東山哲也(名大院・理, 名大・WPI-ITbM), 杉本慶子(理研・CSRS), 伊藤正樹(名大院・生命農), 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, 東京, 2015 年 3 月 18 日

18. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *Epidermal cells elongate with polarity in Arabidopsis roots*. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 2015 年 3 月 17 日
19. 安喜(菅又)史織(奈良先端大・バイオ), 三神達也(奈良先端大・バイオ), 西浜竜一(京大院・生命科学), 河内孝之(京大院・生命科学), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *Functional analysis of cytokinin response regulators in Marchantia polymorpha*. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 2015 年 3 月 17 日
20. 荻田伸夫(奈良先端大・バイオ), 奥島葉子(奈良先端大・バイオ), 倉田哲也(奈良先端大・バイオ), 時澤睦朋(岐阜大・応用生物科学), 山本義治(岐阜大・応用生物科学), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *DNA 損傷応答に関わる転写因子 SOG1 の標的遺伝子の解析*. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 2015 年 3 月 16 日
21. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *Regulation of auxin signaling is essential for stem cell maintenance under DNA stress conditions*. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 2015 年 3 月 16 日
22. 藤本啓介(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *Brassinosteroids are involved in stem cell replenishment in Arabidopsis roots under DNA stress conditions*. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 2015 年 3 月 16 日
23. 安喜(菅又)史織(奈良先端大・バイオ), 三神達也(奈良先端大・バイオ), 西浜竜一(京大院・生命科学), 河内孝之(京大院・生命科学), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *Functional analysis of cytokinin response regulators in Marchantia polymorpha*. Marchantia Workshop 2014, 神戸, 2014 年 12 月 10 日
24. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 陳柏佑(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *DNA damage response in Arabidopsis roots*. Plant Genome Stability and Change, Asilomar (USA), 2014 年 7 月 19 日
25. 伊藤正樹(名大院・生命農), 環境ストレスによる成長抑制と細胞周期制御, 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 20 日
26. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *Actin rearrangement is essential for rapid cell elongation in Arabidopsis roots*. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 18 日
27. 陳柏佑(奈良先端大・バイオ), 伊藤正樹(名大院・生命農), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *Essential role of MYB3R transcription factors in genotoxic stress response*. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 18 日
28. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), *Cytokinin signaling is involved in DNA stress response in Arabidopsis roots*. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 18 日

29. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), The essential function of cytokinin in promoting cell elongation in *Arabidopsis* roots. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 18 日
 30. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), サイトカイニンシグナリングを介した根の細胞伸長における細胞骨格変動の解析. 日本植物学会第 77 回大会, 札幌, 2013 年 9 月 15 日
 31. 鈴木俊哉(名大院・生命農), 中道範人(名大院・理, 名大・WPI-ITbM), 陳柏佑(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 伊藤正樹(名大院・生命農), R1R2R3-Myb による G2/M 期遺伝子の転写と細胞増殖の抑制. 日本植物学会第 77 回大会, 札幌, 2013 年 9 月 13 日
 32. 鈴木俊哉(名大院・生命農), 浜村有希(名大院・理), 東山哲也(名大院・理, 名大・WPI-ITbM), 石黒澄衛(名大院・生命農), 伊藤正樹(名大院・生命農), シロイヌナズナを用いた薬壁タペート細胞の二核化機構の解明. 日本植物学会第 77 回大会, 札幌, 2013 年 9 月 13 日
 33. 陳柏佑(奈良先端大・バイオ), 伊藤正樹(名大院・生命農), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), ストレス時に細胞周期の停止状態を維持する分子機構の解析. 日本植物学会第 77 回大会, 札幌, 2013 年 9 月 13 日
 34. Bisova, K. (Inst. Microbiol., CAS), Hlavova, M. (Inst. Microbiol., CAS), Cizkova, M. (Inst. Microbiol., CAS), Vitova, M. (Inst. Microbiol., CAS), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Zachleder, V. (Inst. Microbiol., CAS), Relationship between DNA damage response and cell cycle progression in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology, Valencia (Spain), July 4, 2013
 35. 伊藤正樹(名大院・生命農), R1R2R3-Myb transcriptional repressors are important for developmentally controlled expression of G2/M-specific genes. Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology, Valencia (Spain), July 3, 2013
 36. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), Kim, Y. (POSTECH), Hwang, I. (POSTECH), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Cytokinins control endocycle onset by inducing an APC/C activator in *Arabidopsis* roots. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月 21 日
 37. 岩田恵里子(名大院・生命農), 中道範人(名大院・生命農), 伊藤正樹(名大院・生命農), R1R2R3-Myb transcriptional repressors are important for developmentally controlled expression of G2/M-specific genes. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月 21 日
- ③ ポスター発表 (国内会議 25 件、国際会議 18 件)
1. 野田理江子(名大院・生命農), 野本友司(名大院・生命農), 鈴木俊哉(名大院・生命農), 伊藤正樹(名大院・生命農), GRAS ファミリー転写因子 E1M と AP2 型転写因子 AtSMOS1 の相互作用を介した細胞サイズの制御. 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌, 2018 年 3 月 28 日

2. 荻田伸夫(奈良先端大・バイオ), 沢邊翔吾(奈良先端大・バイオ), 大野暢也(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), DNA 損傷応答における新規 NAC 転写因子の機能解析. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017 年 3 月 16 日
3. 吉國早紀(奈良先端大・バイオ), 大野暢也(奈良先端大・バイオ), 渡邊俊介(理研・環境資源科学研究センター), 笠原博幸(農工大・グローバルイノベーション研究院), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 瀬尾光範(理研・環境資源科学研究センター), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), DNA 損傷応答における indole-3-butyric acid (IBA) 輸送体の機能解析. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017 年 3 月 16 日
4. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Brassinosteroids are involved in stem cell replenishment in *Arabidopsis* roots under DNA damage. Plant Organ Growth Symposium 2017, Elche (Spain), March 15, 2017
5. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Roles of epigenetic regulation in inducing endoreplication in plants. Plant Organ Growth Symposium 2017, Elche (Spain), March 15, 2017
6. 小林耕介(名大院・生命農), 鈴木俊哉(名大院・生命農), Magyar, Z. (Biological Research Centr, Hungary), Bögre, L. (University of London), 伊藤正樹(名大院・生命農), Transcriptional repression by MYB3R proteins is required for spatial and temporal regulation of cell division. The 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference “Latest advances in plant development & environmental response”, 淡路, December 1, 2016
7. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Phytohormone auxin required for genome maintenance in plant stem cells. 10th 3R International Symposium, 松江, November 15, 2016
8. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Role of epigenetic modifications in induction of DNA endoreplication in plants. 10th 3R International Symposium, 松江, November 14, 2016
9. 奥村徹(名大院・生命農), 伊藤正樹(名大院・生命農), G2/M 期制御に関わる MYB 転写因子のジベレリンシグナル伝達系における役割. 日本植物学会第 80 会大会, 宜野湾, 2016 年 9 月 16 日
10. 鈴木俊哉(名大院・生命農), 伊藤正樹(名大院・生命農), サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 SMR の発現制御に関わる GRAS ファミリー転写因子. 日本植物学会第 80 会大会, 宜野湾, 2016 年 9 月 16 日
11. 梅根美佳(名大院・生命農), 長谷川淳子(東京理科大・理工), 松永幸大(東京理科大・理工), 伊藤正樹(名大院・生命農), なぜイネは核内倍加を起こさないのか. 日本植物学会第 80 会大会, 宜野湾, 2016 年 9 月 16 日
12. 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 荻田伸夫(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), The SOG1 transcription factor regulates distinct sets of target

genes and enables continuous organ growth under DNA stress. Plant Genome Stability and Change, 葉山, July 8, 2016

13. 奥村徹(名大院・生命農), 鈴木孝征(中部大・応用生物), 東山哲也(名大院・理, 名大 WPI-ITbM), 伊藤正樹(名大院・生命農), 塩ストレス下での成長抑制に必須なシロイヌナズナ MYB3R 転写抑制因子. 第 57 回日本植物生理学会年会, 盛岡, 2016 年 3 月 20 日
14. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Chromatin structure controls the competence of endoreplication. International Conference on Arabidopsis Research, GyeongJu (Korea), July 2, 2016
15. Nazari, A.N.(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Roles of auxin in controlling chromatin structure. International Conference on Arabidopsis Research, GyeongJu (Korea), July 2, 2016
16. Chen, P. (ストラスブルグ大), Weimer, A.K. (ストラスブルグ大), Biedermann, S. (ストラスブルグ大), Harashima, H.(ストラスブルグ大), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 杉本慶子(理研・CNRS), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Koncz, C.(マックスプランク育種学研究所), Doerner, P.(エジンバラ大) and Schnittger, A.(ストラスブルグ大), The cyclin-dependent kinase B1 (CDKB1)-cyclin B1 (CYCB1) complex is a major regulator of homologous recombination repair in *Arabidopsis*. International Conference on Arabidopsis Research, GyeongJu (Korea), July 2, 2016
17. Cho, H.(POSTECH), Joonghyuk Park, J.(POSTECH), Park, G.(POSTECH), Choi, D.(POSTECH), Park, C.(POSTECH), Park, S.(POSTECH), Lee, S.(POSTECH), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Choi, Y.(POSTECH) and Hwang, I.(POSTECH), A functional genomic approach reveals CKG as a novel growth regulator mediating a cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. International Conference on Arabidopsis Research, GyeongJu (Korea), July 2, 2016
18. 杉山輝樹(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Control of the cell cycle in two distinct cell files of the root epidermis. International Conference on Arabidopsis Research, GyeongJu (Korea), July 1, 2016
19. 大野暢也(奈良先端大・バイオ), 荻田伸夫(奈良先端大・バイオ), 沢邊翔吾(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), DNA 損傷応答における NAC 転写因子の機能解析. 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手, 2016 年 3 月 20 日
20. 杉山輝樹(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Control of the cell cycle in two distinct cell files of the root epidermis. 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手, 2016 年 3 月 20 日
21. Nazari, A.N.(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Roles of auxin in controlling chromatin structure. 第 57 回

日本植物生理学会年会, 岩手, 2016 年 3 月 18 日

22. 野口博史(奈良先端大・バイオ), 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 根における B-type ARR の空間的発現を制御する KISS ME DEADLY 遺伝子の発現解析. 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手, 2016 年 3 月 18 日
23. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Roles of epigenetic regulation in inducing DNA polyploidization in plants. Keystone Symposia "Plant Epigenetics: From Genotype to Phenotype", Taos (USA), February 18, 2016
24. 梅根美佳(名大院・生命農), 梅根一夫(基生研), 寺内良平(岩手生工研), 鈴木孝征(中部大・応用生物), 東山哲也(名大院・理, 名大・WPI-ITbM), 長岐清孝(岡山大・資植研), 伊藤正樹(名大院・生命農), 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. 神戸, 2015 年 12 月 3 日
25. 奥島葉子(奈良先端大・バイオ), 史佳卉(奈良先端大・バイオ), 奥田利美(奈良先端大・バイオ), 服部弘嗣(奈良先端大・バイオ), 坂本智昭(奈良先端大・バイオ), 倉田哲也(奈良先端大・バイオ), 稲垣宗一(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), シロイヌナズナにおいて DNA 損傷応答に関わる新規因子の同定. 日本植物学会第 79 回大会, 新潟, 2015 年 9 月 6 日
26. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), 植物の DNA 倍加誘発におけるエピジェネティック制御の役割. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会, 東京, 2015 年 5 月 25 日
27. 岩川秀和(奈良先端大・バイオ), 渥美祐輔(奈良先端大・バイオ), 奥島葉子(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), VLCFA synthesis controls leaf production in poplar and *Arabidopsis*. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 2015 年 3 月 18 日
28. 史佳卉(奈良先端大・バイオ), 奥田利美(奈良先端大・バイオ), 服部弘嗣(奈良先端大・バイオ), 稲垣宗一(奈良先端大・バイオ), 坂本智昭(奈良先端大・バイオ), 倉田哲也(奈良先端大・バイオ), 奥島葉子(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Identification of genes involved in DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 2015 年 3 月 18 日
29. 梅根美佳(名大院・生命農), 井上慎子(名大院・生命農), 梅根一夫(基生研), 寺内良平(岩手生工研), 永澤信洋(秋田県立大・生物資源), 前川雅彦(岡山大・資植研), 伊藤正樹(名大院・生命農), 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, 横浜, 2014 年 11 月 25 日
30. 鈴木俊哉(名大院・生命農), Christian Breuer(理研・CSRS), 石田喬志(熊大院・自然科学), 鈴木孝征(名大院・理), 東山哲也(名大院・理, 名大・WPI-ITbM), 杉本慶子(理研・CSRS), 伊藤正樹(名大院・生命農), 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, 横浜, 2014 年 11 月 25 日
31. 安喜(菅又)史織(奈良先端大・バイオ), 高木瞳(奈良先端大・バイオ), Ke Yin(奈良

- 先端大・バイオ), 梅田(原)千景(奈良先端大・バイオ), 植田美那子(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Visualization of cell cycle progression using S/G2- and G2/M-specific markers. Auxins and Cytokinins in Plant Development – International Symposium 2014, Prague(Czech), July 1, 2014
32. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Cytokinins promote rapid cell elongation in *Arabidopsis* roots. Auxins and Cytokinins in Plant Development – International Symposium 2014, Prague (Czech), July 1, 2014
 33. 鈴木俊哉(名大院・生命農), Christian Breuer(理研・CSRS), 石田喬志(熊大院・自然科学), 杉本慶子(理研・CSRS), 伊藤正樹(名大院・生命農), 細胞周期の制御に関与する GRAS ファミリー転写因子, 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 20 日
 34. 齊藤いづみ(名古屋大・農), 小林明日香(名古屋大・農), 池田早希(名古屋大・農), 伊藤正樹(名大院・生命農), シロイヌナズナにおける APC/C ユビキチンリガーゼ阻害因子 GIG1 と UVI4 の機能分担. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 20 日
 35. 安喜(菅又)史織(奈良先端大・バイオ), 高木瞳(奈良先端大・バイオ), Ke Yin(奈良先端大・バイオ), 梅田(原)千景(奈良先端大・バイオ), 植田美那子(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Visualization of cell cycle progression using S/G2- and G2/Mor developmeporters. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 20 日
 36. 岩川秀和(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Analysis of functional specificity of *Arabidopsis* SMR-type CDK inhibitors. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 18 日
 37. 奥村徹(名大院・生命農), 伊藤正樹(名大院・生命農), 塩ストレス下の植物において見られる R1R2R3-Myb による細胞周期の抑制. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月 18 日
 38. 高塚大知(奈良先端大・バイオ), 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Cytokinins control two-step transition of root cells in *Arabidopsis*. Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology, Valencia (Spain), July 4, 2013
 39. 高橋直紀(奈良先端大・バイオ), Kim, Y.(POSTECH), Hwang, I. (POSTECH), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots. Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology, Valencia (Spain), July 4, 2013
 40. 陳柏佑(奈良先端大・バイオ), 伊藤正樹(名大院・生命農), 梅田正明(奈良先端大・バイオ), Essential role of R1R2R3-Myb proteins in genotoxic stress response. Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology, Valencia (Spain), July 4, 2013
 41. Jun, S.E.(Dong-A Univ.), Hwang, J.Y.(Dong-A Univ.), Kim, M.J.(Dong-A

Univ.), Kwon, H.I. (Dong-A Univ.), 梅田正明 (奈良先端大・バイオ), Kim, G.T. (Dong-A Univ.), Function of Kip-related proteins of *Arabidopsis* during plant development. 24rd International Conference on Arabidopsis Research, Sydney (Australia), June 25, 2013

42. 高塚大知 (奈良先端大・バイオ), 高橋直紀 (奈良先端大・バイオ), 梅田正明 (奈良先端大・バイオ), Functional role of cytokinin signaling in the transition zone of *Arabidopsis* roots. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月 21 日

43. 陳柏佑 (奈良先端大・バイオ), 伊藤正樹 (名大院・生命農), 梅田正明 (奈良先端大・バイオ), Functional analysis of RIR2R3-Myb proteins in genotoxic stress response. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月 21 日

(4)知財出願

①国内出願 (2 件)

1. 「4倍体ポプラの作出方法」 梅田正明 (奈良先端大)、岩川秀和 (奈良先端大)、出願人: 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 (2015 年 6 月 22 日出願)、出願番号: 特願 2015-125160

2. 「植物の DNA 倍加誘導法」 伊藤正樹 (名古屋大)、梅根美佳 (名古屋大)、梅田正明 (奈良先端大)、出願人: 国立大学法人 名古屋大学、国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 (2016 年 7 月 21 日出願)、出願番号: 特願 2016-143238

②海外出願

なし

③その他の知的財産権

なし

(5)受賞・報道等

① 受賞

日本植物学会 JPR 論文賞 Best Paper 賞 (2016 年 9 月 17 日)

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.

② マスコミ (新聞・TV等) 報道

- 化学工業日報 「植物 DNA—損傷で働く遺伝子群—奈良先端大・耐ストレス作物期待」 (2018 年 2 月 22 日)

- EurekAlert 「Plants fix DNA differently from animals」 (2018 年 3 月 1 日)

- 読売新聞 「DNA 破壊時—独自遺伝子群—先端大など研究チーム・植物、身守る働き解明」 (2018 年 3 月 20 日)

【プレス発表】 奈良先端大で記者会見を行うとともに、奈良先端大ウェブサイトのプレスリリースに内容を掲載した。Ogita *et al.* (2018, *Plant J.*) の論文の内容、および転写因子 SOG1 の活性操作がストレスに曝された植物の成長を促進する技術開発につながる可能性について説明した。

- 日本経済新聞 「植物の DNA が損傷、細胞分裂を一時停止」 (2017 年 9 月 25 日)

- 奈良新聞 「‘DNA に傷’ で成長を一時停止、食料増産の技術開発期待」 (2017 年 9

月 27 日)

【プレス発表】奈良先端大で記者会見を行うとともに、奈良先端大ウェブサイトのプレスリリースに内容を掲載した。Chen *et al.* (2017, *Nature Commun.*)の論文の内容、および抑制型 MYB3R の活性操作がストレス下で植物成長を促進する技術開発につながる可能性について説明した。

- 中日新聞「植物の細胞分裂操作、制御タンパク質に着目」(2015 年 6 月 13 日)
【プレス発表】名古屋大学で記者会見を行うとともに、名古屋大学ウェブサイトのプレスリリースに内容を掲載した。Kobayashi *et al.* (2015, *EMBO J.*)の論文の内容、および MYB3R の発現操作が植物成長の促進につながる可能性について説明した。

- 産経新聞「根の成長スピード調整、新たなタンパク質発見」(2013 年 9 月 13 日)
- 奈良新聞「根の成長、調節可能に」(2013 年 9 月 13 日)
- NHK ニュース「根の成長調節する物質特定」(2013 年 9 月 17 日)
- 化学工業日報「植物根の成長で新発見」(2013 年 9 月 24 日)

【プレス発表】奈良先端大で記者会見を行うとともに、奈良先端大ウェブサイトのプレスリリースに内容を掲載した。Takahashi *et al.* (2013, *Curr. Biol.*)の論文の内容、および ARR2 の発現操作が DNA 倍加と根の伸長を調節する技術開発につながる可能性について説明した。

- ③ その他
なし

(6)成果展開事例

- ① 実用化に向けての展開
なし

- ② 社会還元的な展開活動

- ・ サイエンスカフェ (NAIST Café) で「植物の知恵～細胞の数と大きさを操る戦略」と題したセミナーを行い、主に大学の学部生向けに本研究成果に関する情報提供を行った。
- ・ 奈良先端科学技術大学院大学公開講座で「植物が行う DNA の倍々ゲーム」と題した講演を行い、一般向けに本研究成果に関する説明を行った。
- ・ 第 15 回けいはんな地区植物科学懇談会・第 40 回植物バイオテクシンポジウムで「植物がもつ DNA 倍加という戦略」と題した講演を行い、関西圏の大学・研究機関・企業の植物研究者向けに本研究成果と今後の課題について説明した。
- ・ 大学のオープンキャンパスやインターンシップの際に、本研究成果を学生や社会人にわかりやすく説明した。

§ 5 研究期間中の活動

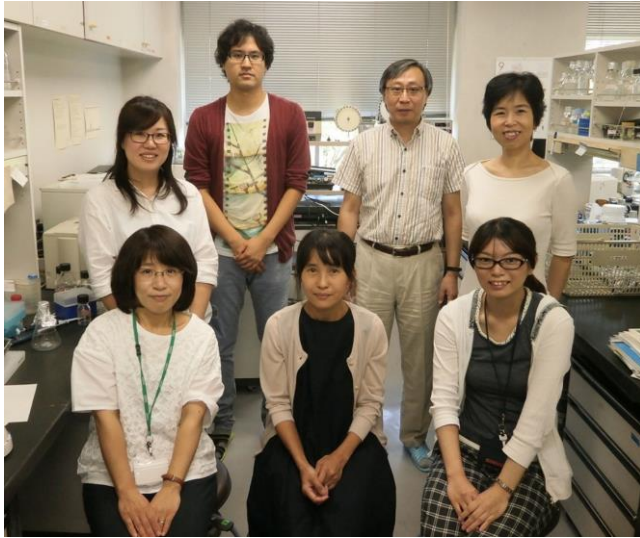
5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2013 年 8 月 31 日	奈良先端科学技術大学 院大学サイエンスカフェ	リバネスカフ ェ	10 人	「植物の知恵～細胞の数と 大きさを操る戦略」と題した セミナー
2014 年 10 月 4 日	奈良先端科学技術大学 院大学公開講座	奈良先端科 学技術大学 院大学	約 400 人	「植物が行う DNA の倍々ゲ ーム」と題した講演
2015 年 10 月 30 日	けいはんな地区植物科 学懇談会/植物バイオテ クシンポジウム	サントリー グロ ー バ ル イ ノ ベ ー シ ョ ン セ ン タ ー	約 130 人	「植物がもつ DNA 倍加とい う戦略」と題した講演

§ 6 最後に

本研究を開始した当初は、DNA 倍加能を決める機構については基礎的知見が全くなく、高い倍加能をもつシロイヌナズナから得られた知見に頼らざるを得なかった。したがって、本研究でクロマチン構造制御が DNA 倍加誘導に重要であることを初めて示した点や、ポプラやイネのような非 DNA 倍加植物でもクロマチン構造制御が倍加誘導に効くことを明らかにした点は、大きな成果であると考えている。一方で、4 倍体ポプラの野外での成長特性やバイオマスの評価にまで至らなかった点は、非常に残念であった。その原因としては、筑波大での植栽が天候等の理由によりなかなか成功しなかった点が挙げられる。今後、国内での実験用ポプラの定植についてノウハウが蓄積し、情報交換できるようになることを期待したい。

梅田グループ



伊藤グループ



ポプラの無菌培養(奈良先端大)



ポプラの野外実験(秋田)

