

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14545

研究課題名(和文)植物のキネトコア複合体の理解

研究課題名(英文)Molecular analysis of plant kinetochore

研究代表者

田村 謙太郎 (Tamura, Kentaro)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：40378609

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)：染色体上に形成されるキネトコア構造は微小管と結合し、娘細胞への染色体の正しい分配を制御する。しかしながら、植物におけるキネトコア構成タンパク質の同定数は少なく、その構造や形成機構については不明な点が多い。そこで本研究はシロイヌナズナを用いて、植物キネトコアを構成するタンパク質群の同定を目的とした。本計画では生化学的手法および酵母ツーハイブリッド法を組み合わせ研究を進めた。その結果、キネトコア候補因子として、キナーゼ結合タンパク質、微小管結合タンパク質、スプライシング関連タンパク質および機能未知タンパク質を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Kinetochores are the fundamental link between chromosomal domains called centromeres and spindle microtubules in all eukaryotes. This link, composed by multiprotein complexes, is essential for precise chromosome segregation into daughter cells and thus keeps genetic stability. In yeast and animal cells, many components of kinetochores have been identified and characterised. On the contrary, in plants, number of identified kinetochore protein is largely limited. To identify comprehensively the kinetochore components in plants, we performed interactome analysis in Arabidopsis plants that stably express centromere proteins fused with a fluorescent protein. We found that newly identified proteins, which include kinase-associated protein and unknown proteins, are likely associated with plant kinetochore structure. Together, these findings contribute to a unified view of how plant kinetochore functions as a regulator of chromatin segregation.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：シロイヌナズナ キネトコア タンパク質複合体 インタラクトーム GFP

1. 研究開始当初の背景

個体の生命維持を支える上で、娘細胞への安定的な遺伝情報の継承は重要な生命活動である。細胞分裂時、染色体上に形成されるキネトコア構造は微小管と結合し、染色体の正しい分配を制御する。動物や酵母では多くのキネトコア構成タンパク質が単離されており、その数は百種類近くあると考えられている (Westermann *et al.* *Trends Cell Biol* 2013)。しかしながら、植物におけるキネトコア構成タンパク質の同定数は少なく、その構造や形成機構については不明な点が多い。

生物種間において、セントロメア配列およびキネトコア構造には多様性がある。従って、他生物からのアナロジーに頼らない研究手法が求められていた。申請者らは以前、GFP タグを利用したアフィニティー精製-プロテオミクスによって、植物の核膜タンパク質複合体の精製に成功している (Tamura *et al.* *Plant Cell* 2010, Tamura *et al.* *Curr Biol* 2013)。この解析手法は、生化学的にタンパク質複合体の効率的な精製・網羅的な同定が行えることから、植物キネトコア構造を直接的かつ包括的に解明できる強力な手法と考えた。植物細胞による遺伝情報継承機構の解明の緒としての本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

シロイヌナズナを用いて、植物キネトコアを構成するタンパク質群の同定を目的とした。この目的を達成するために、生化学的なキネトコアタンパク質複合体を精製して、構成成分を明らかにするとともに、既知のキネトコアタンパク質をベイトに用いた酵母ツーハイブリッド法によって、相互作用因子の同定を目指す。

3. 研究の方法

上記研究目的を達成するために、本研究計画では2つのアプローチを用いて進めた。

(1) キネトコア複合体のアフィニティー精製。

キネトコアマーカであるセントロメアヒストン (CENH3) および Nuf2 にそれぞれ GFP または RFP との融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを作出した (図1)。これら形質転換体からタンパク質を抽出した後、抗蛍光タンパク質抗体ビーズを用いて融合タンパク質および相互作用タンパク質を精製した。精製後、質量分析計によりその構成タンパク質を同定した。

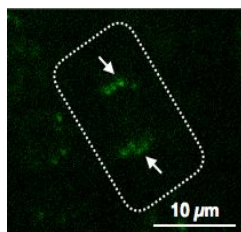


図1. Nuf2-GFP を発現する形質転換体の根端。矢印はキネトコアを、細胞の輪郭を破線で示す。

(2) 酵母ツーハイブリッド法を用いたキネトコアタンパク質相互作用因子の同定。CENH3 および Nuf2 をベイトとした酵母ツーハイブリッド法により、相互作用因子をシロイヌナズナ cDNA ライブラリーよりスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) キネトコア複合体の構成因子の探索。

CENH3 または Nuf2 と融合した蛍光タンパク質を発現するシロイヌナズナから温和な条件下で可溶性タンパク質を抽出した。その後、抗蛍光タンパク質抗体ビーズを用いて、免疫沈降を行った。免疫沈降産物を質量分析計 (LTQ-Orbitrap) に供して、免疫沈降産物のタンパク質の同定を試みた。CENH3 に関しては、融合タンパク質の蓄積量が少なかったためか、多くのタンパク質を同定することが出来なかった。Nuf2 に関しては、CENH3 よりも多くのタンパク質を同定できたが、十分量を得ることは出来なかった。この計画で同定できたタンパク質群をキネトコア構成候補因子とした。

CENH3 および Nuf2 をベイトとし、Clontech 社の Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System を用いた酵母ツーハイブリッド法を行った。スクリーニングに用いたシロイヌナズナ cDNA ライブラリーは Mate & Plate™ Library - Universal *Arabidopsis* (Normalized) を用いた。CENH3 に関しては、ポジティブクローンが全く得られなかった。一方で、Nuf2 をベイトとして用いたスクリーニングでは多くのポジティブクローンが得られた。ポジティブクローンの塩基配列を解析した結果、最終的に 48 種類の候補因子を得た。

上記のと の結果を併せて、核内に局在する可能性が強いと予想される 6 種類のタンパク質についてさらなる解析を行うこととした。これらタンパク質にはキナーゼ結合タンパク質、微小管結合タンパク質、NDC80-Nuf2 複合体構成タンパク質、スプライシング関連タンパク質および機能未知タンパク質が含まれていた。これら因子の機能を解析するために、T-DNA ノックアウト変異体または人工マイクロ RNA (ami RNA) によるノックダウン株を複数単離したが、多くが発生の早い段階で致死性の強い表現型を示した (図2)。このことはこれら因子が細胞の生命活動に非常に重要な役割をになっていることを強く示すもので、キネトコアの構成要素である可能性を示唆している。より詳細な表現型を観察するために、コンディショナルに amiRNA の発現を誘導できる形質転換体を作製した。現在、これら形質転換体における染色体 DNA の娘細胞への分配様式、および蛍光タンパク質マーカを用いたキネトコアの構造に着目した表現型解析を

順次行っているところである。



図2. 12日目の幼植物体. 野生型およびamiRNAによるキネトコア構成候補タンパク質のノックダウン株. ノックダウン株は野生型と比較して著しく成長が阻害され, 致死性を示す.

<引用文献>

S. Westermann and A. Scheliffner, Family matters: structural and functional conservation of centromere-associated proteins from yeast to humans, *Trends in Cell Biology*, 23, 2013, pp. 260-269.

K. Tamura, Y. Fukao, M. Iwamoto, T. Haraguchi, and I. Hara-Nishimura, Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 12, 2010, pp. 4084-4097.

K. Tamura, K. Iwabuchi, Y. Fukao, M. Kondo, K. Okamoto, H. Ueda, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura, Myosin XI-i links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in *Arabidopsis*, *Current Biology*, 23, 2013, pp. 1776-1781.

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 8 件)

K. Tamura, Y. Fukao, N. Hatsugai, F. Katagiri, I. Hara-Nishimura, Nup82 functions redundantly with Nup136 in a

salicylic acid-dependent defense response of *Arabidopsis thaliana*, *Nucleus*, 査読有, in press.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19491034.2017.1279774>
DOI: 10.1080/19491034.2017.1279774

X. Zhou, K. Tamura, K. Graumann, and I. Meier, Exploring the protein composition of the plant nuclear envelope, *Methods in Molecular Biology*, 査読有, 1411, 2016, pp. 45-66.

https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-3530-7_2
DOI: 10.1007/978-1-4939-3530-7_2

K. Tamura, T. Kawabayashi, T. Shikanai, and I. Hara-Nishimura, Decreased expression of a gene caused by a T-DNA insertion in an adjacent gene in *Arabidopsis* *PLoS One*, 査読有, 2016, 11, e0147911.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0147911>
DOI: 10.1371/journal.pone.0147911

K. Iwabuchi, J. Hidema, K. Tamura, S. Takagi, and I. Hara-Nishimura, Plant nuclei move to escape ultraviolet-induced DNA damage and cell death, *Plant Physiology*, 査読有, 170, 2016, pp. 678-685.

<http://www.plantphysiol.org/content/170/2/678.long>
DOI: 10.1104/pp.15.01400

H. Ueda, E. Yokota, K. Kuwata, N. Kutsuna, S. Mano, T. Shimada, K. Tamura, G. Stefano, Y. Fukao, F. Brandizzi, T. Shimmen, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura, Phosphorylation of C-terminus of RHD3 has a critical role in homotypic ER membrane fusion in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 査読有, 170, 2016, pp. 867-880.

<http://www.plantphysiol.org/content/170/2/867.full>
DOI: 10.1104/pp.15.01172

H. Ueda, K. Tamura, and I. Hara-Nishimura, Functions of plant-specific myosin XI: from intracellular motility to plant postures, *Current Opinion in Plant Biology*, 査読有, 28, 2015, pp. 30-38.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526615001260>
DOI: 10.1016/j.pbi.2015.08.006

K. Tamura, C. Goto, and I.

Hara-Nishimura, Recent advances in understanding plant nuclear envelope proteins involved in nuclear morphology, Journal of Experimental Botany, 査読有, 66, 2015, pp. 1641-1647.
<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erv036>
DOI: 10.1093/jxb/erv036

K. Okamoto, H. Ueda, T. Shimada, K. Tamura, T. Kato, M. Tasaka, M. T. Morita, and I. Hara-Nishimura, Regulation of organ straightening and plant posture by an actin-myosin XI cytoskeleton, Nature Plants, 査読有, 2015, 15031.
<https://www.nature.com/articles/nplants201531>
DOI: 10.1038/nplants.2015.31

〔学会発表〕(計 4 件)

K. Tamura, Emerging roles for nuclear membrane in signaling pathway in higher plants, Society of Experimental Biology Annual Main Meeting, 2016年7月4日, Brighton (UK)

K. Tamura and I. Hara-Nishimura, Nuclear movement and shape are controlled by nuclear membrane myosin XI-i, 日本植物生理学会, 2016年3月18日, 岩手大学(岩手県, 盛岡市)

K. Tamura, The unique nucleocytoplasmic linkage in plants, Biochemistry and Molecular Biology 2015, 2015年12月4日, 神戸ポートピアホテル(兵庫県, 神戸市)

K. Tamura, Molecular relationships between the plant-specific nuclear envelope proteins, International Plant Nucleus Consortium 2015, 2015年7月4日, Olomouc (Czech Republic)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/4_saibou.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 謙太郎 (TAMURA, Kentaro)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号 : 40378609

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し