

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07406

研究課題名(和文)植物細胞の分裂と伸長を同時に調節する微小管制御系の解明

研究課題名(英文)The microtubule-based mechanisms for controlling both cell division and elongation in plants

研究代表者

日渡 祐二 (Hiwatashi, Yuji)

宮城大学・食産学群(部)・教授

研究者番号：10373193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：微小管関連因子が細胞分裂と細胞伸長という異なる細胞内現象に作用するメカニズムを明らかにするために、ヒメツリガネゴケの分子モータータンパク質キネシンKINID1をモデルに細胞質分裂装置および先端成長制御装置へ移動するメカニズムを解析した。変異型KINID1の発現解析、光変換蛍光タンパク質を融合させたKINID1の動態解析、細胞骨格破壊を用いた生理学的解析により、KINID1は細胞質分裂装置にはタンパク質レベルで移動し、分裂装置内を移動しながら機能すること、また、先端成長制御装置にはmRNAレベルで移動する可能性があり、またタンパク質は装置内で数時間内に入れ換わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質が細胞内で異なる場所に同時に局在するメカニズムに関しては、これまでほとんど知見がなかった。微小管関連因子KINID1はタンパク質レベルで細胞質分裂装置に、またmRNAレベルで先端成長制御装置に移動することが示唆されたことから、KINID1は2つの方法を使い分けて異なる場所に局在すると考えられる。このようなタンパク質移動の使い分けは、異なる場所にタンパク質を局在化させるメカニズムとして新しい知見である。

研究成果の概要(英文)：To understand molecular mechanisms for dual roles of microtubule-associated proteins on cell division and elongation, we investigated targeting systems of a microtubule-based motor protein (kinesin), KINID1, to a division apparatus and a tip growth machinery in the moss *Physcomitrella patens*. The expression analysis of the truncated KINID1 as well as the KINID1 fused with a photo-convertible fluorescent protein suggested that the KINID1 was recruited to the division apparatus, such as spindles and phragmoplasts, in a protein-dependent manner, and moved along the equatorial part of the phragmoplast during its expansion. On the contrary, the KINID1 was possibly targeted to the tip growth machinery in an mRNA-dependent manner. The turnover of the KINID1 was estimated within a few hours in the machinery in contrast to the longer maintenance of the machinery. Moreover, the correct targeting of KINID1 to the machinery is also dependent on both microtubules and actin filaments.

研究分野：植物細胞生理学、植物分子遺伝学

キーワード：微小管関連因子 キネシン タンパク質動態 細胞分裂 先端成長 微小管 アクチン繊維

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の形態は、細胞の分裂と伸長のバランスによって決定される。植物細胞の分裂と伸長が適切に進行するためには、細胞骨格、とりわけ微小管を介した調節が不可欠である。従って、植物の体がどのように作られるかを理解する上で、細胞伸長と細胞分裂を調節する微小管制御のしくみを解き明かすことが必須となる。

従来までに、細胞伸長や細胞分裂を調節する微小管制御系については、数多くの微小管制御因子が同定され、微小管のオーガナイゼーションやダイナミクスとともにその役割が報告されている。植物細胞の分裂は細胞内部で、伸長は細胞膜近傍で起こるように、これらの現象は細胞内部の異なる場所で生じる。従って、分裂と伸長のバランスをとるためには、分裂と伸長を協調的に調節する微小管制御因子が、伸長や分裂が起こる場所に移動し機能しなければならない。しかしながら、被子植物の微小管制御因子は機能分化が進んでいるため、分裂と伸長の微小管制御の両方に作用する因子はほとんど同定されていない。従って、微小管制御因子が分裂と伸長という異なる機能の場へどのようにリクルーティングされ、適切に作用しているのかは不明のままである。

コケ植物ヒメツリガネゴケは、胞子発芽後、原系体と呼ばれる糸状の組織を発達させる。原系体の先端には、1個の幹細胞が存在し、この細胞が先端成長しながら分裂を繰り返すことにより、原系体組織が形成される。研究代表者は、頂端幹細胞の細胞分裂制御機構を研究し、モータータンパク質キネシン KINID1a と KINID1b (以下、KINID1) が、細胞質分裂装置フラグモプラストの微小管重合端を架橋することで、細胞質分裂の進行を制御することを明らかにした [1]。加えて、2014年にこれらのキネシンが先端成長制御装置 MT foci の微小管重合端を架橋することで、伸長速度と方向性を制御することを示した [2]。つまり、KINID1 は細胞質分裂と先端成長を同時に調節する微小管制御因子であり、細胞の異なる場所で作られる細胞質分裂装置と先端成長制御装置へリクルートされ、微小管を同じ作用機作で制御することがわかった。このことから、研究代表者は、KINID1 が細胞質分裂装置と先端成長制御装置へどのような分子システムでリクルートされるのかを明らかにすれば、細胞分裂と細胞伸長を同時に調節する微小管制御系解明の重要な端緒となると考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

細胞の異なる場所に形成される細胞質分裂装置と先端成長制御装置に、KINID1 がいつ、どのようにリクルートされるかを明らかにすることにより、異所的な現象を同時に制御するシステムの分子的基盤を明らかにする。さらに、細胞分裂と細胞伸長という異なる形質を制御する KINID1 微小管制御系をモデルに、細胞新奇形質進化における分子システムの流用 (co-option) メカニズムについて検証する。

3. 研究の方法

(1) KINID1 の細胞質分裂装置と先端成長制御装置への移動解析

タンパク質依存的な移動を調べるために、KINID1a 遺伝子の Coding region と緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子の Coding region を連結した KINID1a-GFP 融合遺伝子を細胞内で発現させた。一方、mRNA 依存的な移動を調べるために、KINID1 遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインし、非翻訳領域 (UTR) を含む KINID1a-GFP 融合遺伝子を細胞内で発現させた。このような遺伝子発現から翻訳される KINID1a-GFP 融合タンパク質の局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡で解析した。またタンパク質依存的な移動に関与するドメインを同定するために、KINID1a のモータードメインや Coiled coil ドメインなどを部分的に欠失させた変異型タンパク質に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合し発現させた。これらの変異型 KINID1a-GFP 融合タンパク質の局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

(2) KINID1 の細胞質分裂装置と先端成長制御装置内での移動解析

KINID1 のターンオーバーを明らかにするために、光変換蛍光タンパク質 Dendra2 を用いた解析を行った [3]。KINID1a-Dendra2 融合タンパク質を発現する安定形質転換システムを作成した。このシステムを用いて、細胞質分裂装置、先端成長制御装置での KINID1a-Dendra2 融合タンパク質のターンオーバー解析を行った。細胞骨格による KINID1 の局在制御を明らかにするために、微小管の脱重合剤 Oryzalin 処理を細胞に行い、微小管を破壊した。また、アクチン繊維の脱重合剤 Latrunculin B 処理を細胞に行い、アクチン繊維を破壊した。それぞれの細胞骨格を破壊した条件下で、KINID1a-GFP 融合タンパク質の局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。KINID1a と EB1 のタンパク質相互作用は、LexA-VP16 に基づく酵母 2-ハイブリッド系で検討した。

(3) 細胞質分裂装置と先端成長制御装置へ移動する微小管関連因子の解析

ヒメツリガネゴケのゲノムデータベースを用いて微小管関連因子を選抜し、黄色蛍光タンパク質 Citrine 遺伝子をノックインして Citrine 融合タンパク質を発現させた。融合タンパク質の局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。また細胞質分裂装置および先端成長制御装置に局在するタンパク質はエストロゲン誘導的遺伝子ノックダウン法 [4] を用いて、因子の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) KINID1 の細胞質分裂装置と先端成長制御装置への移動解析

KINID1a 遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインして発現させた KINID1a-GFP 融合タンパク質は、細胞質分裂装置および先端成長制御装置に局在した。一方、KINID1a 遺伝子および GFP 遺伝子の Coding region のみを連絡させた融合遺伝子を発現させた場合には、KINID1a-GFP 融合タンパク質は細胞質分裂装置に局在したが、先端成長制御装置には局在しなかった。これらの結果から、先端成長制御装置への KINID1a の局在は、KINID1a 遺伝子の非翻訳領域 (UTR) が必要であることがわかった。特に、3' UTR を欠くが、5' UTR を連結している KINID1a-GFP 融合遺伝子を発現させたところ、先端成長制御装置に融合タンパク質が局在したことから、先端成長制御装置の移動には、KINID1a 遺伝子の 5' UTR が機能していることが示唆された。KINID1a mRNA 移動の関わるシスエレメントが 5' UTR に存在する可能性がある。

タンパク質のドメインを欠失させた KINID1a を発現させたところ、モータードメインおよび核移行シグナル (NLS) を欠失させた変異型 KINID1a-GFP 融合タンパク質は細胞質分裂装置に局在せず、coiled-coil ドメインをもつ変異型 KINID1a-GFP 融合タンパク質のみが細胞質分裂装置に蓄積することがわかった。従って、この Coiled-coil 領域が KINID1a の分裂装置への移動に機能することが示唆されたため、細胞質分裂装置に対する KINID1a の移動は、KINID1a のタンパク質自体が移動することが示された。Coiled coil ドメインはタンパク質多量体形成に関わるため、KINID1a が Coiled coil ドメインを介して何らかのタンパク質と複合体になり、細胞質分裂装置に移動するメカニズムが示唆される。

(2) KINID1 の細胞質分裂装置と先端成長制御装置内での移動解析

KINID1a-Dendra2 融合タンパク質を光変換させ、ライブイメージングにより KINID1a-Dendra2 融合タンパク質の動態を解析した。細胞質分裂では、細胞質分裂装置 (フラグモプラスト微小管) が細胞中央部から周縁部に拡大する。光変換した KINID1a-Dendra2 融合タンパク質は、フラグモプラスト微小管の拡大に伴い細胞周縁部へ移動することが観察された。この結果は、KINID1a がタンパク質レベルで細胞質分裂装置内を移動し、繰り返し利用されることを示唆している。また、光変換したタンパク質は細胞質分裂装置のみに蓄積し、先端成長制御装置には蓄積しないことがわかった。この結果は、KINID1a がタンパク質レベルで細胞質分裂装置に移動することを支持している。

先端成長では、先端成長制御装置の微小管束が 2-3 分の寿命で周期的に形成される。光変換した KINID1-Dendra2 融合タンパク質は、伸長領域に 1 時間以上検出された。従って、KINID1-Dendra2 融合タンパク質は、形成と消失を繰り返す微小管束よりも安定に存在し、微小管束の形成に繰り返し機能することが示唆される。しかしながら、光変換された KINID1a-Dendra2 融合タンパク質が 2-3 時間程度で消失すること、さらに新たに合成された KINID1a-Dendra2 融合タンパク質が同様に 2-3 時間で蓄積することから、KINID1a は新たに合成された KINID1a と数時間で入れ換わることが示唆された。KINID1a は mRNA として先端成長制御装置へ移動する可能性を考慮すると、常に KINID1a mRNA が先端成長制御装置に運ばれ、そこで局所的な翻訳が起こり、KINID1 がタンパク質として機能するメカニズムが考えられる。

先端成長制御装置の微小管束への移動メカニズムについては、KINID1-Dendra2 融合タンパク質と微小管重合制御因子 EB1 が共局在することから、EB1 とともに移動する可能性が考えられた。KINID1a のアミノ酸配列には EB1 結合モチーフが認められるため、KINID1a が EB1 と相互作用するか調べた。酵母 2 ハイブリット系を用いて EB1 と KINID1a のタンパク質相互作用を検討したが、この系では相互作用が検出されなかった。

先端成長制御装置における KINID1 の局在制御を明らかにするために、微小管脱重合剤処理により微小管を破壊したところ、先端成長制御装置の微小管束に KINID1a は蓄積しなくなり、伸長領域全体に広がった。このことは、KINID1a の局在は微小管に依存的であることを示している。さらにアクチン繊維の脱重合剤処理によりアクチン繊維を破壊したところ、先端成長制御装置に対する KINID1a の蓄積が消失し、KINID1a は細胞先端の細胞膜に沿うように広がった。この結果から、KINID1a の局在は微小管のみならずアクチン繊維でも制御されていると考えられる。先端成長制御装置の細胞骨格に対する KINID1 の役割を明らかにするために、KINID1a および KINID1b の二重遺伝子破壊を行った。その結果、微小管束の局在が不安定化するとともにアクチン繊維束の局在も不安定化した。以上の結果から、KINID1 は微小管およびアクチン繊維に依存して伸長領域中央の微小管束に蓄積すること、さらに KINID1 は微小管束の維持に機能するとともに、KINID1 がアクチン繊維束の局在も制御していることが示された [5]。

(3) 細胞質分裂装置と先端成長制御装置へ移動する微小管関連因子の解析

ゲノム情報を用いて選抜された因子の局在解析から、微小管生成複合体因子 augmin 8 (AUG8) が細胞質分裂装置および先端成長制御装置に局在することがわかった。AUG8 は 4 つのパラログが存在するが、これらのパラログの機能をすべて阻害したところ、細胞質分裂装置の微小管量が減少することがわかった。さらに、先端成長制御装置の微小管量が減少するとともに微小管のダイナミクスが異常になることがわかった。以上の結果から、AUG8 も KINID1 と同様に細胞質分裂装置と先端成長制御装置の移動し、微小管生成に機能することがわかった。

<引用文献>

[1] Hiwatashi et al.(2008) Plant Cell. 20: 3094-3106. [2] Hiwatashi et al.(2014) Plant Cell. 26:1256-1266. [3] Kitagawa and Fujita (2013) J. Plant Res.126: 577-585. [4] Nakaoka et al. (2012) Plant Cell.24:1478-1498. [5]大塚沙穂子 他. (2019) アグリバイオ. 3:81-85.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) 大塚沙穂子、佐藤良勝、日渡祐二. (2019) ライブイメージングで探る細胞骨格を介した植物先端成長制御. アグリバイオ. 3:81-85. 査読無.
- (2) Lee, Y.J., Hiwatashi, Y., Hotta, T., Xie, T., Doonan, J.H, and Liu, B. (2017) The mitotic function of augmin is dependent on its microtubule-associated protein subunit EDE1 in *Arabidopsis thaliana*. Curr. Biol. 27:3891-3897. 査読有.
- (3) Sato, Y., Sugimoto, N., Hirai, T., Imai, A., Kubo, M., Hiwatashi, Y., Nishiyama, T., and Hasebe, M. (2017) Cells reprogramming to stem cells inhibit the reprogramming of adjacent cells in the moss *Physcomitrella patens*. Scientific Reports. 7:1909. DOI: 10.1038/s41598-017-01786-1. 査読有.

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 宮崎裕貴、室井大輝、John H. Doonan、日渡祐二. ヒメツリガネゴケにおける微小管形成複合体オーグミンの植物特異的サブユニット AUG8 の機能解析. 東北植物学会第8回大会. 2018
- (2) 日渡祐二、佐藤良勝. ヒメツリガネゴケの先端成長における細胞骨格制御. 日本植物学会第82回大会シンポジウム. 2018
- (3) 大塚沙穂子、川村亜美、後藤史奈、佐藤良勝、日渡祐二. アクチン繊維微小管同時可視化によるヒメツリガネゴケ先端成長の細胞骨格動態. 第59回日本植物生理学会年会. 2018.
- (4) 大塚沙穂子、川村亜美、後藤史奈、佐藤良勝、日渡祐二. アクチン繊維微小管同時可視化によるヒメツリガネゴケ先端成長の細胞骨格動態. 日本植物学会第81回大会. 2017.
- (5) 日渡祐二、大塚沙穂子. きぼう船内実験に向けた植物先端成長の動態解析. 日本植物学会第81回大会. 2017.
- (6) 日渡祐二. 分裂と伸長の両方に機能するキネシンの細胞内局在. 第16回植物細胞周期合同セミナー. 2016
- (7) 日渡祐二. 先端成長の重力反応に関するきぼう船内実験に向けて. 日本植物学会第80回関連集会「Space Moss」2016.
- (8) 渡辺菜摘、佐藤良勝、藤田知道、日渡祐二. 光変換タンパク質 Dendra2 を用いた細胞分裂と細胞伸長の両方を制御するキネシン KIN1D1a の細胞内ターンオーバー解析. 東北植物学会第6回大会. 2016.
- (9) Watanabe, N., Sato, Y., Fujita, T., and Hiwatashi, Y. Intracellular turnover of KIN1D1 kinesins that function in both cell division and expansion explored by the convertible protein Dendra2. MOSS meeting 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.myu.ac.jp/teacher/food/hiwatash/labo/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 佐藤 良勝

ローマ字氏名: (SATO, Yoshikatsu)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: トランスフォーマティブ生命分子研究所

職名: 特任准教授

研究者番号(8桁): 30414014

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 大塚 沙穂子

ローマ字氏名：(OTSUKA, Sahoko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。