

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06696

研究課題名(和文)植物細胞の分裂期微小管構造体の動態を制御する分子機構の研究

研究課題名(英文)Molecular Mechanisms Controlling the Dynamics of Mitotic Microtubule Structures in Plant Cells

研究代表者

笹部 美知子(Sasabe, Michiko)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：00454380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の細胞分裂は、分裂の進行に伴いダイナミックに変化する植物細胞にユニークな微小管構造体を介して実行される。本研究では、分裂期を通して種々の分裂期微小管構造体に局在するキネシン14タンパク質を基軸として研究を行い、この因子がリン酸化や相互作用因子によりその分子活性を変化させること、さらに異なる分子活性を介して中期紡錘体及び細胞質分裂装置であるフラグモプラストの動態制御に寄与していることを示した。また、本因子の相互作用因子の同定を進め、キネシン14の分子活性の制御に関与している可能性のある候補因子を複数同定した。これらは分裂期微小管の構造変換のしくみを解明するための基盤的知見となる成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、特定の微小管結合タンパク質が、異なる活性を介して種々の分裂期微小管構造体の動態制御に関与していることを示し、その活性制御に関与する可能性のある候補因子を複数同定した。植物細胞において、分裂期における微小管構造体の連続的な構造変換を駆動するしくみは未解明な部分が多いが、本成果は植物の細胞分裂及び個体発生を支える未解明のメカニズム解明の基盤となる学術的に重要な成果である。これらの知見は医学、農学分野における新しい技術創成の基盤となる可能性もあることから、社会的にも意義のある研究に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In plants, the cell division process is executed via microtubule structures unique to plant cells that dynamically change during the progression of mitosis. In this study, we investigated these processes, focusing on specific Kinesin-14 family proteins (Kin-14s), which localize to various mitotic microtubule structures throughout mitosis. It was shown that Kin-14s change their molecular activity through phosphorylation and/or interacting factors and contribute to the dynamics of the metaphase spindles and the cytokinetic microtubule apparatus, the phragmoplast, via their different molecular activities. Additionally, the identification of the interacting molecules of the Kin-14 proteins was conducted, resulting in several candidates that might be involved in regulating the molecular activity of these proteins. These results provide fundamental knowledge for elucidating the molecular mechanisms of the continuous and systematic changes of mitotic microtubule structures.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：細胞分裂 微小管 紡錘体 フラグモプラスト キネシン 微小管結合タンパク質 リン酸化 相互作用因子

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞分裂は、分裂方向の決定に関与する前期前微小管束 (Pre-prophase band; PPB)、中心体を持たない中期紡錘体、細胞質分裂装置である隔膜形成体 (フラグモプラスト) といった、分裂の進行に伴いダイナミックに変化する植物細胞にユニークな微小管構造体を介して実行される。これら微小管構造体は、連続的に構造変換を伴いながら細胞分裂を実行するが、それぞれの微小管構造体の連続的かつダイナミックな構造変換を駆動する分子メカニズムは未だ未解明な部分が多い。動物細胞では、サイクリン依存性キナーゼ、Polo-like キナーゼ等の分裂期キナーゼを中心とする制御系が、紡錘体や収縮環といった微小管やアクチンからなる分裂装置を構成する因子の制御を介してその動態をコントロールしていることが報告されており、その分子メカニズムが明らかになりつつある。一方、植物では、これらの分裂期微小管構造体の維持や動態に関与する分子は動物細胞と同様に数多く報告されているものの、分裂期微小管構造体の動態を制御する上流のメカニズムについては不明な点が多く、制御系の同定とその制御下におけるエフェクター因子の分子動態の解明が、植物細胞の分裂機構の理解のための重要課題の一つである。

我々は、細胞分裂の最後の過程である細胞質分裂の制御機構について長年研究を進めており、植物の細胞質分裂が、細胞周期の鍵酵素であるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の制御下で、細胞質分裂時依存的に活性化される特異的な MAP キナーゼ (MAPK) カスケードにより制御されていること、さらに、この MAP キナーゼ (MAPK) カスケードの制御下で、細胞質分裂装置であるフラグモプラスト微小管上に局在する因子を直接リン酸化することにより、微小管の動態制御を介してフラグモプラストの動態を制御していることを明らかにしてきた (Sasabe et al. 2006, 2011, 2015, Suzuki et al. 2016)。本研究開始時において、我々は、このカスケードに制御される細胞質分裂の全体像の解明を目指して行ったシロイヌナズナにおける本 MAPK カスケードの下流因子の網羅的探索から、新しい基質候補としてキネシン 14 ファミリーに属する二つのタンパク質 (Kin14) を同定していた。同定された Kin14 タンパク質は、これまで紡錘体形成に関わる因子として報告されていたが、我々の解析により、細胞質分裂時にもこのカスケードの制御下でフラグモプラストの動態制御に関わっている可能性が高いことが明らかとなりつつあった。つまり、本因子は、分裂期を通して、紡錘体とフラグモプラストの両構造体の動態制御を担っている可能性があると考えられた。一方で、MAPK は細胞質分裂時に特異的に活性化されることから、紡錘体の機能する分裂期中期から後期にかけては、本因子は細胞質分裂時とは異なる制御因子が存在する可能性がある。この可能性が正しければ、分裂期において重要な微小管制御因子であると考えられる Kin14 の上流の制御因子 (リン酸化酵素や相互作用する活性化因子など) を明らかにすれば、植物のユニークな分裂期微小管構造体の動態制御のメカニズムの一端が明らかとなり、植物の分裂様式の理解につながると考え本研究の着想に至った。本研究では、シロイヌナズナの Kin14 を基盤として、各分裂期におけるそれぞれの構造体における本因子の分子機能を明らかにすると同時に、上流の制御因子を同定することにより、分裂期を通じた微小管構造体の動態制御の分子メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、植物の細胞質分裂を制御する鍵酵素である MAPK カスケードの基質として見いだしたシロイヌナズナのキネシン 14 ファミリー (Kin14) を中心に研究を行う。これまでに、特定のキネシン 14 ファミリーメンバーが分裂期の様々な微小管構造体に局在し、分裂の過程でその分子機能を変化させながら構造体の動態制御に関与している可能性が示唆されるデータを得ている。本研究では、1) 分裂期微小管構造体に局在する多機能性のキネシン 14 ファミリータンパク質が、分裂期を通してどのような分子機能によりそれぞれの微小管構造体の動態を制御しているのかを明らかにし、2) 本キネシンの活性や機能を制御する因子 (修飾酵素や相互作用因子) を同定することを目的とする。上記研究から、植物細胞にユニークな微小管構造体の形成

と動態を制御する分子基盤を解明し、植物の細胞分裂を制御している未知の分子メカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 分裂期微小管構造体に局在するキネシン 14 の分子機能の解析

キネシン 14 ファミリーに属する遺伝子はシロイヌナズナに 21 個存在するが、その中で少なくとも Class I サブファミリーに属する 2 種のメンバー (Kin14A, Kin14B) は分裂期特異的に発現し、PPB, 紡錘体及びフラグモプラストに局在することが報告されており、我々の実験でも再現されている。一方で、Class I キネシン 14 タンパク質は、生化学的にマイナス端方向への微小管モーター活性、微小管プラス端結合活性 及び、微小管同士を架橋する微小管束化活性を持つ多機能性キネシンであることが知られているが、これらの分子が様々な分裂期微小管構造体において、どの分子機能を介してその動態を制御しているのかについては明らかではない。本研究では、これまでに我々の研究で明らかになった MAPK によるリン酸化がこれら活性のうちどの活性の制御に関与しているのかについて解析を進めると同時に、様々なドミナントネガティブ型に対する表現型を詳細に解析することにより、紡錘体やフラグモプラスト等の分裂期微小管構造体の動態制御におけるこれら因子の分子機能を明らかにする。具体的には、微小管、染色体、細胞板小胞マーカー等との多色蛍光ライブセルイメージングにより、Kin14A, 及び Kin14B の分裂期における細胞内局在と分子動態、及び微小管構造体の動態を解析する。また、変異体やゲノム編集技術を用いて、これら因子の単独、もしくは多重変異体を作製し、表現型を解析することにより、個々の因子の特異的、もしくは重複した分子機能を細胞及び個体レベルにおいて明らかにする。

2) Class I キネシン 14 の制御因子及び相互作用因子の同定と機能解析

Kin14A, B は分裂期に出現する 3 つの微小管構造体において異なった分子機能を持つ可能性が高いことが明らかになりつつある。Kin14A, B の多機能性が相互作用する因子によりコントロールされている可能性を検証するために両因子の相互作用因子の同定を進める。相互作用因子の探索には、生体内のタンパク質相互作用を解析可能な近接依存性標識法 (proximity labeling, PL) 及び免疫沈降法を用いる。PL 法は、生細胞内で特定タンパク質と相互作用するタンパク質をビオチンでラベリングし、ラベルされたタンパク質を質量分析により解析する新しいタンパク質-タンパク質相互作用解析法である。分裂期の各フェーズにおける相互作用因子を同定するために、培養細胞に本方法を適用するためのコンストラクトとシロイヌナズナ個体を用いるためのコンストラクトを作製し、多角的に解析を進める。また、すでに得られているオリジナルプロモーター下で GFP-Kin14A, B を発現する形質転換植物を用いて、免疫複合沈殿法による相互作用因子の同定も同時に進める。同定した Kin14A, B の制御因子や相互作用因子の細胞分裂における機能解析を細胞生物学的手法や遺伝学的解析により進める。得られた結果を総合的に解析して、分裂期を通じた微小管構造体の動態制御の分子メカニズムの解明を目指す。

4. 研究成果

1) 分裂期微小管構造体に局在するキネシン 14 の分子機能の解析

シロイヌナズナのキネシン 14 ファミリーは 21 のメンバーから構成され、分子機能も多岐に渡ることが予想されている。我々はこれまでの研究から、本ファミリーの特定のメンバー (Kin14A 及び Kin14B) が、植物の細胞質分裂に必須の MAPK によりリン酸化されること、そのリン酸化が細胞質分裂及び細胞板形成に重要であることを明らかにしてきた。これらのメンバーはこれまで、染色体分配を制御する中期紡錘体の形成に関与していると考えられてきたが、我々の研究により細胞質分裂時にはフラグモプラストの動態制御に深く関与していることが明らかとなった (投稿準備中)。さらに、これら因子の分裂期における挙動を詳細に解析し、MAPK によるリン酸化が、本因子の束化活性を制御することにより、フラグモプラスト微小管の正常なターンオーバーを維持し、フラグモプラスト構造体の機能化に寄与していることを明らかにした。一方で、

このリン酸化は、紡錘体の構造維持には必要ないことも明らかとなった。このことは、これらの因子が、二つの異なる分裂期微小管構造体において、異なる分子制御をうけていること、これらの構造体は Kin14s の異なる分子活性により維持されている可能性を示唆している。また、MAPK によるリン酸化サイトに加え、推定のリン酸化サイトや推定の機能部位に変異を入れた Kin14s の変異体を発現させた培養細胞の解析から、これまでに報告していた MAPK によるリン酸化配列以外にも分子機能に影響を与える推定のリン酸化サイトがあることが分かった。この未知のキナーゼによるリン酸化サイトの変異も、中期紡錘体と細胞質分裂装置であるフラグプラストに対して異なった分子機能を持つ可能性を示唆する表現型を示した。これらの結果は、本因子が分裂期の段階に応じて特異的な翻訳後修飾または相互作用因子を介してそれぞれの微小管構造体の構造と機能を制御している可能性を示唆している。本研究終了時までには、このサイトをリン酸化するキナーゼは同定できなかったが、2)で進めている相互作用因子の探索においていくつかのリン酸化酵素を同定することができた。今後、これらの候補因子の検証を含めて、Kin14A 及び B の活性制御に関与する因子の同定を進める予定である。

2) Class I キネシン 14 の制御因子及び相互作用因子の同定と機能解析

上述した通り、多機能性キネシンである Class I キネシン 14 は、分裂期の進行に従って特異的な制御を受けることにより多機能性が付与されていることが示唆されるデータが得られている。つまり、Class I キネシン 14 は、分裂期特異的な修飾や相互作用因子との結合を介して、各種分裂期微小管構造体の動態を独立に制御している可能性がある。そこで、Kin14A 及び Kin14B の多機能性を制御する因子を探索するために、両因子の相互作用因子の同定を試みた。本研究では、生体内で相互作用している因子を時空間的に探索することを可能とする近接依存性標識法(PL法)と、従来の免疫沈降法を平行して行った。PL法を実施するために、ビオチンリガーゼである TurboID と Kin14A 及び Kin14B の融合コンストラクトを作成し、シロイヌナズナ形質転換体の作出を進めていたが、最終段階になり、TurboID-Kin14s をホモ接合で持ち、野生型 Kin14s と同レベルの発現量を示すシロイヌナズナ形質転換体は、花粉形成の過程において細胞分裂の異常が生じ不稔となることが判明した。この表現型は、kin14a 変異体において観察される花粉の形成不全の表現型と類似していることから、TurboID-Kin14s が植物個体においてドミナントネガティブに作用した可能性がある。立体構造の予測解析の結果、Kin14 の N 末端に融合した TurboID が Kin14 の N 末端テールドメインをマスクするような立体構造をとるために、このような表現型となっている可能性が高いことが分かった。不稔形質を示すことから、本形質転換体を用いた PL 法の実施は困難であり、今後、使用するビオチンリガーゼの種類や融合部位を工夫する必要がある。しかし、TurboID-Kin14s を導入した形質転換体の表現型と立体構造予測の結果を合わせて考えると、Kin14s のテールドメインに何らかの相互作用因子が結合することが、正常な細胞分裂に必要であることが改めて示された結果と言える。

植物の Class I キネシン 14 の分子機能を明らかにするためには、相互作用因子の同定が必須であることが明らかとなったので、平行して実施していた従来の免疫沈降法を完了させた。その結果、細胞板形成に関与すると思われる因子や、微小管結合因子に加えて、小胞輸送関連タンパク質、動物細胞における紡錘体構成因子のホモログ、そしてタンパク質リン酸化酵素等、複数の興味深い因子を相互作用候補因子として同定することができた。さらに、これらのいくつかについては、BiFC 法により Kin14A または Kin14B との相互作用が確認できた。今後、Kin14A 及び Kin14B と、同定された相互作用因子との関係を明らかにすると同時に、個々の因子の分子機能の解析を進めることにより、各分裂期における Class I キネシン 14 の分子制御機構に加え、分裂期微小管の構造変換のしくみの解明が期待できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuura Yuki, Fukasawa Narumi, Ogita Kosuke, Sasabe Michiko, Kakimoto Tatsuo, Tanaka Hirokazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Early Endosomal Trafficking Component BEN2/VPS45 Plays a Crucial Role in Internal Tissues in Regulating Root Growth and Meristem Size in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.01027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山地良樹, 三上裕大, 菅原史帆, 千葉俊太, 笹部美知子
2. 発表標題 シロイヌナズナの細胞分裂を制御するキネシン14ファミリータンパク質の相互作用因子の探索
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯塚雄麻, 山地良樹, Allen Yi-Lun Tsai, 澤進一郎, 笹部美知子
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるKinesin 14 ファミリーの機能解析：ゲノム編集を用いた多重変異体作出の試み
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉俊太, 田安智明, 細井俊良, 飯田智子, 橋場真子, 鈴木伶奈, 笹部美知子
2. 発表標題 植物細胞における分裂方向の制御とホスファチジルイノシトール
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Michiko Sasabe, Yudai Mikami, Masanobu Tomita, Yoshiki Yamaji, Takahiro Hamada, Hirofumi Nakagami, Takashi Hashimoto, Yasunori Machida
2. 発表標題 The function of Kinesin-14 family proteins of Arabidopsis thaliana is regulated by phosphorylation
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山地良樹, 三上裕大, 富田昌伸, 宮武亮悟, 濱田隆宏, 中神弘史, 橋本隆, 町田泰則, 笹部美知子
2. 発表標題 シロイヌナズナの細胞分裂を制御するATK1の機能解析
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉俊太, 田安智明, 細井俊良, 飯田智子, 橋場真子, 鈴木伶奈, 渡邊悦子, 上村松生, 笹部美知子
2. 発表標題 植物細胞における分裂方向の制御に関わる因子の探索
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木景子, 岩山慎太郎, 小島晶子, 岩川秀和, 安藤沙友里, 町田千代子, 町田泰則, 笹部美知子
2. 発表標題 葉の運命決定に関するASYMMETRIC LEAVES2タンパク質の動態解析と相互作用因子の探索
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田恵祥, 笹部美知子, 町田泰則, 馳澤盛一郎, 花俣繁, 檜垣匠
2. 発表標題 アクチン繊維による初期フラグモプラスト微小管配列の制御
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 凌, 笹部美知子, 福澤 雅志
2. 発表標題 細胞性粘菌の自己分泌型多細胞体発生促進因子の探索
3. 学会等名 東北植物学会第10回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細井 俊良, 田安 智明, 飯田 智子, 橋場 真子, 鈴木 伶奈, 笹部 美知子
2. 発表標題 植物細胞における分裂方向決定メカニズムの解析と分裂方向決定因子の探索
3. 学会等名 東北植物学会第10回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山家 広大, 細井 俊良, 別役 重之, 笹部 美知子
2. 発表標題 シロイヌナズナの二つの NACK キネシンは発生過程で見られる多様な細胞質分裂の制御に関与する
3. 学会等名 東北植物学会第10回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小黒 那智, 久保 稔, 澤 進一郎, 山尾 僚, 池田 紘士, 笹部 美知子
2. 発表標題 マンサクに形成される2種の虫こぶの形成機構の解析
3. 学会等名 東北植物学会第10回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水木まゆ, 金子洋平, 雪江祥貴, 陶山佳久, 廣田峻, 澤進一郎, 久保稔, 山尾僚, 笹部美知子, 池田紘士
2. 発表標題 マンサクの地理分化に伴う近縁な3 種のアブラムシにおける虫こぶ形態の多様化
3. 学会等名 第68回 日本生態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山地良樹・三上裕大・菅原史帆・千葉俊太・笹部美知子
2. 発表標題 シロイヌナズナの細胞分裂を制御する多機能性キネシンATK1の相互作用因子の探索と機能解析
3. 学会等名 東北植物学会第 13 回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯塚雄麻・山地良樹・笹部美知子
2. 発表標題 多機能性キネシンKinesin-14ファミリーメンバーATK2及びATK3の解析
3. 学会等名 東北植物学会第 13 回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 蝦名賛・山地良樹・菅原史帆・千葉俊太・笹部美知子
2. 発表標題 植物の細胞質分裂を制御するキネシン14ファミリータンパク質の相互作用候補因子BGLC1の解析
3. 学会等名 東北植物学会第 13 回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木啓充・小黒那智・池田紘士・笹部美知子
2. 発表標題 マルバマンサクに形成される2種類の虫こぶの形態的差異を生み出す要因の探索
3. 学会等名 東北植物学会第 13 回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹部美知子・鈴木景子・山上楓・安藤沙友里・岩川秀和・小島晶子・町田泰則・町田千代子
2. 発表標題 シロイヌナズナASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) タンパク質の細胞周期に依存した動態変化
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	町田 泰則 (Machida Yasunori) (80175596)	名古屋大学・理学研究科・名誉教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山地 良樹 (Yamaji Yoshiki)	弘前大学・大学院農学生命科学研究科・大学院生	細胞生物学的研究の遂行

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関