

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21424

研究課題名（和文）植物細胞分裂における微小管形成と切断の協力関係を理解する

研究課題名（英文）Functional relationship between microtubule nucleation and severing in plant cell division

研究代表者

中村 匡良（Nakamura, Masayoshi）

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：40553409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：植物細胞の増殖と組織における形づくりは微小管構造変化による正確な細胞分裂の制御に委ねられている。微小管形成装置と微小管切断装置が重要と考えられるが、分裂中に機能を阻害することができないためこれまで解析されてこなかった。本研究では、ライブイメージング中のタンパク質機能阻害技術の確立に挑戦した。低い温度でタンパク質を分解できるIt-degronを利用することで、微小管形成因子を消失させることに成功した。この技術をライブイメージングと組み合わせることで、これまで困難であった時期特異的なタンパク質の機能を解析することが可能になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能欠損株が致死であったり、複数の工程で利用されているタンパク質の時期特異的な機能を解析することは、従来の遺伝学的手法では困難であった。今回、我々は誘導的なタンパク質分解システムを利用することでライブセルイメージング中に狙った時間と場所でタンパク質を不活化させる技術確立を目指した。低温でタンパク質分解が誘導されるIt-degronを利用することで、比較的植物体に影響が少ない状態でタンパク質分解が誘導できる。

研究成果の概要（英文）：The regulation of cell division, primarily regulated by microtubules, is crucial for the plant growth and development. The mechanism underlying the assembly and disassembly of microtubule structures in plant cells remains unknown. In this research, we attempted to establish a technique to impede protein function during live cell imaging. Through the utilization of the It-degron system, which facilitates protein degradation at low temperatures, we successfully diminished microtubule nucleating factors. This innovative integration of technology with live cell imaging provides a promising tool for analyzing the spatiotemporal function of proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 チューブリン複合体 カタニン 細胞分裂 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格の一つである微小管は細胞周期に応じてその構造を変化させ、細胞分裂や細胞分化など生物の生存に必須な活動に寄与している。微小管は、チューブリンからなる極性を持ったタンパク質のポリマーであり、中心体から放射状に形成される微小管は多く研究されその説明は進んでいるが、中心体のような微小管形成中心に依存しない微小管構造がどのように構築されるかは未だ謎が多い。植物細胞には中心体がなく間期、分裂期ともに微小管形成中心非依存的に、表層微小管・分裂準備帯・紡錘体・隔膜形成体といったその特徴的な構造を構築する(図1)。細胞周期に沿って、微小管構造体は移り変わり再配置され機能しているが、その推移の詳細な分子メカニズムはよくわかっていない。例えば、どのように微小管はその構造体を紡錘体から隔膜形成体に変化していくのか?植物細胞の分裂過程において重要な機構であるにもかかわらず詳細は理解されていない。

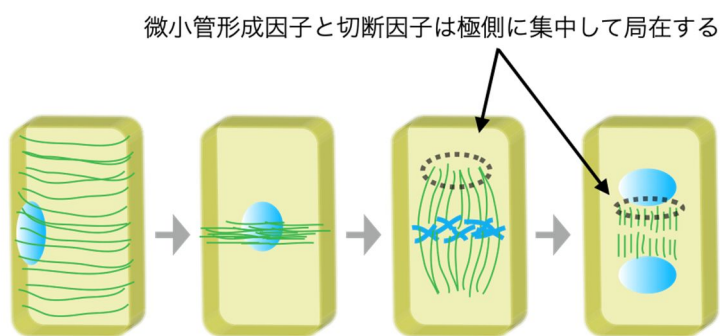


図1. 植物微小管(繊維状のもの)は細胞周期に応じて構造を変化させる。構造体の構築や遷移の分子メカニズムは未だ謎が多い。

2. 研究の目的

近年の研究から、微小管形成に関わるチューブリン複合体と微小管を切断するカタニンがそれぞれ細胞分裂に重要であり、細胞分裂中の各微小管構造体に局在していることが報告されている。興味深いことにチューブリン複合体とカタニンは細胞分裂後期の紡錘体極側への集中した局在も確認されている。微小管形成と微小管切断の物理的・機能的相互作用が細胞分裂の微小管構造体構築に重要と考えられるが、局在は確認され重要性は理解できるものの、紡錘体や隔膜形成体の形成過程や各構造体への移り変わりに微小管形成と切断がどのように関わっているかは研究されていない。これまで解析が困難であった理由は二つ考えられる。一つは、シロイヌナズナの微小管形成因子であるGCP2の機能欠損変異株やNEDD1機能欠損変異株、GIP1機能欠損変異株が致死であることが挙げられる。このため、微小管形成因子の機能異常が細胞や個体レベルでどのような影響を与えるかを解析することが困難であった。二つ目は、カタニンによる微小管切断機構は細胞周期を通してあらゆる微小管構造で時間的空間的に制御され利用されているため、それぞれでの機能をカタニンの機能が常に欠損した変異体を解析し理解することは不可能であることである。この問題を乗り越えるためには、狙った時間と場所でタンパク質を不活化させる必要がある。そこで本研究では、チューブリン複合体とカタニンの時間的空間的な機能を理解することを目的とし、チューブリン複合体やカタニンの相互作用因子の探索、植物細胞での生体イメージング中のタンパク質不活化技術の確立に挑戦した。

3. 研究の方法

細胞分裂期における微小管構造体の構築や、一つの構造から次の構造への再配向におけ

る微小管形成と微小管切断の機能を明らかにするため、時間的空間的なタンパク質機能阻害技術の確立を目指した。標的タンパク質を迅速かつ条件的に不活化する方法に、N末端に熱誘導性 degron を付加する方法が知られている (Sanchez-Diaz et al., 2004)。近年、Faden らのグループから、熱誘導性の N 末端ルール経路を改良した低温度でコントロールできる N 末端タンパク質分解シグナル (It-degron) が報告された (Faden et al., 2016)。植物の生存可能な温度 (29 °C) でタンパク質分解が誘導できる It-degron を利用し、目的のタンパク質の分解を試みた。また、チューブリン複合体とカタニンの相互作用因子の機能解析を行い、微小管形成と微小管切断の機能的関係性の解析を行った。

4. 研究成果

低い温度でタンパク質分解を誘導できる It-degron を、微小管形成因子である NEDD1 と GIP1a、微小管切断因子であるカタニン p60 サブユニット (KTN1) に付加した。局在性を確認するために、蛍光タンパク質 GFP が挿入されている。植物形質転換用プラスミド (It-degron-GFP-NEDD1, It-degron-GFP-KTN1, It-degron-GFP-GIP1a) を作成し、シロイヌナズナに導入した。NEDD1 及び KTN1 は局在が確認できず、機能的な It-degron-GFP-NEDD1 や It-degron-GFP-KTN1 を持つ植物体は作出できなかったが、It-degron-GFP-GIP1a は、これまでに確認されているものと同様に、根の分裂細胞で微小管構造に局在していた。さらに、植物体を 29 °C に 30 分置くことにより、植物の根の先端に観察されていた分裂期の微小管構造体が見えなくなった (図 2)。致死性を示す *gip1agip1b* 二重変異体に It-degron-GFP-GIP1a を導入し、ライブイメージング中に分解を誘導することにより、時期特異的な微小管形成因子の機能を解析することが可能となる。

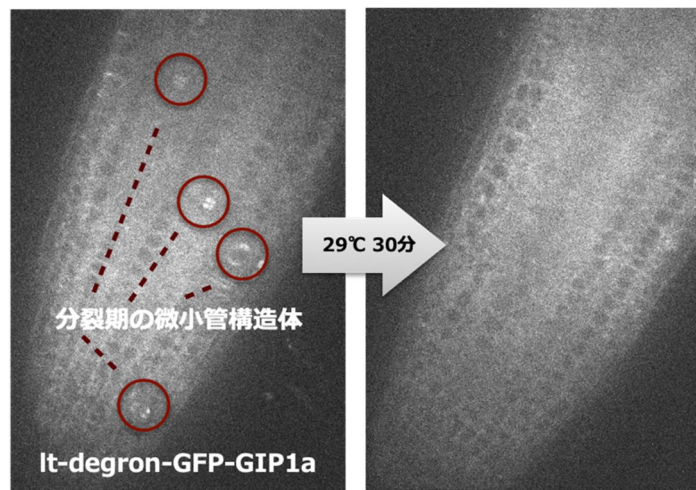


図 2. 微小管形成因子 GIP1a に It-degron:GFP を付加した植物の根の先端。29°C 30 分で分裂期の微小管構造が見えなくなった。

微小管形成・切断の制御機構を理解するため、微小管形成因子や切断因子の相互作用因子の解析を行った。WDR8 と MSD1 が チューブリン複合体に相互作用する複合体として同定され、局在性・遺伝学的解析から、チューブリン複合体が形成する微小管のマイナス端を形成部位に安定化するアンカー機能を有していた。さらに、形成された微小管を形成部位から切り離すため、微小管切断因子カタニンを形成部位にリクルートする役割も有していた (Yagi et al., 2021)。

<引用文献>

A. Sanchez-Diaz et al., Rapid depletion of budding yeast proteins by fusion to a heat-inducible degron. *Science's STKE* **223**:PL8 (2004)

F. Faden et al., Phenotypes on demand via switchable target protein degradation in multicellular organisms. *Nature Communication* **7**:12202 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yagi N, Kato T, Matsunaga S, Ehrhardt DW, Nakamura M, Hashimoto T	4. 巻 12
2. 論文標題 An anchoring complex recruits katanin for microtubule severing at the plant cortical nucleation sites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3687-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24067-y	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 該当する

1. 著者名 Yagi N, Yoshinari A, Iwatate RJ, Isoda R, Frommer WB, Nakamura M	4. 巻 62
2. 論文標題 Advances in Synthetic Fluorescent Probe Labeling for Live-Cell Imaging in Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1259-1268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab104	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 該当する

1. 著者名 Sadoine M, Ishikawa Y, Kleist TJ, Wudick MM, Nakamura M, Grossmann G, Frommer WB, Ho CH	4. 巻 187
2. 論文標題 Designs, applications, and limitations of genetically encoded fluorescent sensors to explore plant biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 485 ~ 503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiab353	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masayoshi Nakamura
2. 発表標題 An anchoring complex stabilizes the association of daughter microtubule minus ends to their nucleation sites
3. 学会等名 Gordon Research Conference 2022, Plant and Microbial Cytoskeleton（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayoshi Nakamura
2. 発表標題 Mechanical insights into plant chiral growth through twisted mutant analysis
3. 学会等名 Yamada Conference LXXV, Origin to left-right asymmetry in animals (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	八木 慎宜 (Yagi Noriyoshi)		

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		
ドイツ	HHU		
米国	University of Illinois	Carnegie Institution for Science	