

機関番号： 82401
 研究種目： 研究活動スタート支援
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21870048
 研究課題名（和文）
 SUMO化による細胞周期制御機構の解析
 研究課題名（英文）SUMO mediated cell cycle regulation in Arabidopsis

研究代表者
 石田 喬志（ISHIDA TAKASHI）
 独立行政法人理化学研究所・細胞機能研究ユニット・基礎科学特別研究員
 研究者番号： 00462656

研究成果の概要（和文）：

本研究では細胞周期制御因子に対する SUMO 化修飾の有無を検討するための実験系の構築・改良を行った。既報の *in vitro* SUMO アッセイシステムでは複数の必須酵素が大腸菌体内で効率よく発現せずハイスループットな実験を行うことができなかった。そこでベクターの変更や発現条件の検討を行い効率よく発現できるシステムを構築した。また、この系を用いて HPY2 に対する SUMO 化の検証を行い正常に機能することを確認した。

研究成果の概要（英文）：

I have improved the *E. coli* expression system for the components of an *in vitro* SUMOylation assay. Since the expression efficiency of E1 enzymes was not enough, I have modified the vector and culture conditions. The improved system works well.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：細胞周期・SUMO・核内倍加・翻訳後修飾・シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

核内倍加は特に高等植物によく見られる現象で、細胞分裂を伴わずに染色体の複製の

みが起こり DNA 量 (核相、ploidy) が増加する。古くからの研究により核相と細胞体積との間に正の相関が見られること、いったん核内倍加周期に入った細胞は再び分裂することができないことか

らこの二種類の細胞周期の切り替えが細胞分裂と分化の協調的制御の鍵となり得るとされ、細胞分裂周期の活性化因子である CYCs や CDKs が核内倍加周期への切り替えにも作用する可能性が指摘されている。すなわち、新たな細胞の供給源となる茎頂や根の分裂組織では CYCs や CDKs 活性が高く細胞分裂周期が行われるが、この領域から外れた細胞では活性が低下することで核内倍加周期へ移行することが示唆されている。しかし、この切り替えに際して CYCs や CDKs がどのように制御を受けて活性が低下しているのかは未知の部分が多い。

申請者らはこれまでに、新規 SUMO E3 ligase である HPY2/AtMMS21 が細胞分裂周期と核内倍加周期の切り替えに関与することを明らかとした。hpy2 変異体では分裂領域において細胞分裂周期を促進する CYCB、CDKB が mRNA、タンパクとも大幅に減少し組織が縮小するなど細胞増殖機能の低下が観察され、本来であれば分裂組織内では起こらない核内倍加が起こっていた。このことは、HPY2 の機能が何らかの形で細胞分裂周期を促進する機能を有し、hpy2 ではその機能不全によって異所的な核内倍加が起きたことを示唆している。

SUMO は翻訳後タンパク修飾を担う低分子ペプチドの一種であり、Ubiquitin 同様に E1, E2, E3 それぞれの反応を担う酵素によって基質タンパクのリジン残基に共有結合される。SUMO 化修飾は基質タンパクの活性や局在に影響を与え、ストレス応答や染色体の安定性や発生、成長速度の制御に寄与するなどの報告があるが分子ごとに作用機作が少しずつ異なる。申請者らのこれまでの研究では、HPY2 の E3 ligase 活性部位である SP-RING ドメインに変異を導入すると機能しないことが明らかとなっており、hpy2 の細胞周期の異常という表現型は HPY2 による SUMO 機能に依存している可能性が強く示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では HPY2 によって行われる SUMO 化修飾の分子的、生物学的意義を解析することで細胞周期制御因子に関する SUMO 化という新たな制御モデルを明らかとすることを目標とした。HPY2 は何らかのタンパク質に対して SUMO 化修飾を行いそのターゲット分子の機能調節を行うと考えられるが、その対象となる分子は明らかではない。また、HPY2 は自身を SUMO 化する機能を持つことも示されており、自己 SUMO 化反応が HPY2 の分子機能に大きな役割を持つ可能性もある。そこで、既に hpy2 変異体において

影響を受けていることが示されている CYCs や CDKs、CDKs を直接的に制御している E2F/DELs、KRPs といった細胞周期調節因子群に注目し、in vitro SUMO 化アッセイによって HPY2 による SUMO 化修飾因子の選抜を行う。既にインフォマティクス解析によってシロイヌナズナゲノム上の多くの細胞周期調節因子に SUMO 化修飾のターゲット配列 (Ψ -K-x-D/E) が存在することが確認されているため、これら候補因子を対象に in vitro 実験系で HPY2 による SUMO 化の有無を検証する。また、HPY2 自身を含めて SUMO 化修飾が確認された分子に関しては修飾が分子自身の性質にどのような変化を生じるのか、また、それが生体内の機能にどのような影響を持つのかといった点を in vivo の実験系で検証する。これらの研究により、HPY2 による細胞分裂周期制御の作用点を明らかとし、細胞分裂周期から核内倍加周期への切り替えを担う分子機構の詳細を明らかとする。

3. 研究の方法

in vitro SUMO 化アッセイの効率化

既報のアッセイシステムは SUMO、E1、E2 などを大腸菌体内で発現、精製して in vitro で SUMO 化反応を再現する手法を用いている。しかし、この方法で用いている E1 の大小両サブユニットの発現ベクターは非常に効率が悪い。原因は不明であるが、両遺伝子が¹大腸菌にとって何らかの毒性を持っているために生育そのものに影響を与えていると考えられている。そこで本研究ではまずこのシステムに手を加えて多量の E1 酵素を得られるように改良した。実際には非誘導条件下におけるバックグラウンドが低い pCOLD ベクターを用いることで毒性の影響を低減して菌体量を増やした。

細胞周期制御因子発現ベクターの構築

Gateway テクノロジーによって作成された細胞周期制御因子群のクローンコレクションを作成し、さらに pDEST15 ベクターを用いて GST 融合型の発現ベクターを構築した。

4. 研究成果

本研究を通じ、in vitro SUMOylation アッセイを遂行するにあたり必須となる E1 酵素と基質候補となる細胞周期関連因子群を、大腸菌による組換えタンパク質発現システムを用いて発現、精製するための実験系の条件検討を主に行った。これは、既存の E1 酵素群の発現系が非常に貧弱であり、一度の発現、精製によって実験数回分のタンパクしか生成できなかったため、改良を要したことによる。本研究以前に報告されている E1 発現系では、スモールサブユニット SAE1b とラージサブユニット SAE2 とを共発現させていたが、これは大

腸菌に対して毒性を持つ可能性が高く十分な発現量が得られていなかった。そこで、数種類の発現ベクターを用いて各遺伝子を個別にクローニングしてさらに菌株や誘導条件の検討を行った。その結果、既存のベクターを用いた場合に比べて100倍強の効率で酵素群を得ることに成功した。さらに、この新規ベクターを用いて発現、精製した酵素を用いた *in vitro* SUMO 化アッセイを行い、SUMO E3 ligase である HPY2 の自己 SUMO 化がおこなわれることを確認した。また、細胞周期関連因子群を Gateway テクノロジーによって多数クローニングしたベクターコレクションを作成し、これらが大腸菌発現用の vector に導入して各種細胞周期関連因子群の GST 融合型発現ベクターコレクションを作成した。次年度にはこれらの材料を用いて SUMO 化される因子の探索とそれに続く機能解析を行う予定である。

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5件)

① Ishida T, Adachi S, Yoshimura M, Shimizu K, Umeda M, Sugimoto K, "Auxin modulates the transition from the mitotic cycle to the endocycle in *Arabidopsis*" **Development** Vol.137 pp63-71 (2010) (査読あり)

② Breuer C*, Ishida T*, Sugimoto K (*equal contribution), "Developmental control of endocycles and cell growth in plants" **Current Opinion in Plant Biology** Vol.13 Issue 6 pp 654-660 (2010) (査読あり)

③ Ishida T, Fujiwara S, Miura K, Stacey N, Yoshimura M, Schneider K, Adachi S, Minamisawa K, Umeda M, Sugimoto K, "SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in *Arabidopsis*" **The Plant Cell** Vol.21 pp2284-2297 (2009) (査読あり)

④ Kuroha T, Tokunaga H, Kojima M, Ueda N, Ishida T, Nagawa S, Fukuda H, Sugimoto K, Sakakibara H, "Functional Analyses of *LONELY GUY* Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the

Importance of the Direct Activation Pathway in *Arabidopsis*" **The Plant Cell** Vol.21 pp3152-3169 (2009) (査読あり)

⑤ Ishida T, Sugimoto K, "核内倍加-自発的に倍加してしまう染色体の制御" **生物の科学 遺伝** Vol.63 No. 3 pp24-29 (2009) (査読なし)

[学会発表] (計15件)

① Ishida T, "DEVELOPMENTAL CONTROL OF CELL SIZE AND PLOIDY IN ARABIDOPSIS" 9th IPMB Congress 2009 St. Louis USA 2009 10/25-30

② Ishida T, Fujiwara S., Miura K., Stacey N., Yoshimura M., Schneider K., Adachi S., Minamisawa K., Umeda M., and Sugimoto K. "SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in *Arabidopsis*" 21st International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, 2010 6/6-10

③ 石田 喬志, "細胞増殖と核内倍加を制御する分子機構の解析" 細胞周期合同セミナー(2009年度) 東京 日本 2009 6/26

④ 石田 喬志, 藤原 すみれ, Schneider Katja, Stacey Nicola, 杉本 慶子, "細胞増殖と核内倍加を制御する分子機構の解析" 日本植物学会第73回大会 山形市 日本 2009 9/19

⑤ 石田 喬志, "SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in *Arabidopsis*" 特定領域研究「植物メリステム」若手ワークショップ 2009 千歳市 日本 2009 10/8

⑥ 石田 喬志, 藤原 すみれ, Stacey Nicola, 吉村 美香, Schneider Katja, 杉本 慶子, "SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 / AtMMS21 Regulates Endocycle Onset and Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis*" 第32回日本分子生物学会年会 横浜 日本 2009 12/12

⑦ 石田 喬志, 安達 澄子, 吉村 美香, 清水 皓平, 梅田 正明, 杉本 慶子, "オーキシン依存的な細胞分裂周期と核内倍加周期の切り替えによる細胞分化制御" 第51回日本植物生理学会年会 熊本市 日本 2010 3/20

⑧ 石田 喬志, 藤原 すみれ, 三浦 謙治, Stacey Nicola, 吉村 美香, Schneider Katja, 安達 澄子, 南澤 一徳, 梅田 正明, 杉本 慶子, "HPY2 は核内倍加周期への移行とメリステム維持の制御に関わる新規 SUMO E3 ligase である" 第51回日本植物生理学会年会 熊本市 日本 2010 3/19

⑨ 清水 皓平, 石田 喬志, 杉本 慶子, 奥島 葉子, 梅田 正明, "オーキシンに応答した CDKB2 の発現制御機構の解析" 第51回日本植物生理学会年会 熊本市 日本 2010 3/19

⑩ 石田 喬志, 杉本 慶子, "SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in *Arabidopsis*" 第51回日本植物生理

学年会 熊本市 日本 2010 3/21

⑪石田喬志, 安達澄子, 吉村美香, 清水皓平, 梅田正明, 杉本慶子, "オーキシン依存的な細胞分裂周期と核内倍加周期の切り替えによる細胞分化制御" 日本植物学会第 74 回大会 春日井市 日本 2010 9/11

⑫石田喬志, "SUMO in plant development" RIKEN PSC retreat 横浜市 日本 2010 10/12

⑬石田喬志, "SUMO in plant development" 植物科学若手研究会 2010 神戸市 日本 2010 10/23

⑭石田喬志, "SUMO in plant development" 第 8 回 SUMO 研究会 つくば市 日本 2010 11/26

⑮石田喬志, 吉村美香, 杉本慶子 "新規 SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY 2 の分裂組織における機能の解析" 第 52 回日本植物生理学会年会 仙台市 日本 2011 3/20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 喬志 (ISHIDA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能研究ユニット・基礎科学特別研究員

00462656