

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770053

研究課題名(和文) SUMOによる細胞周期制御機構の解析

研究課題名(英文) How do SUMO regulate cell cycle progression in Arabidopsis?

研究代表者

石田 喬志 (Ishida, Takashi)

熊本大学・自然科学研究科・特任助教

研究者番号：00462656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期の正常な進行には、高度な制御機構が必須である。本研究では、翻訳後修飾機構であるSUMOが植物細胞の細胞周期制御にどのような形で関与しているのかを解明することを目標とした。細胞周期の進行を担うCDK、AUR、RBRを対象として、大腸菌によるリコンビナントタンパク質発現系を構築し、semi-in vitro実験系によりSUMO化の検討を行った。その結果、すべてのタンパク質がSUMO化の基質となりうることを見出した。また、これらのタンパク質のSUMO化サイトを同定し、SUMO-null型タンパク質を用いた機能解析を行うことで、SUMO化による制御が細胞周期制御に必須であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Scrupulously designed cell cycle regulation is the fundamental mechanism for development of higher organisms. SUMO-mediated posttranslational modification appeared to be involved in the developmental regulation since the fact that a mutation in SUMO E3 ligase HPY2 affect cell cycle progression have reported in Arabidopsis. However, further analyses are needed to understand the molecular mechanism. In this study, we analyzed cell cycle regulators, e.g. CDKs, AURs and RBR on the SUMO-mediated cell cycle regulation context. We established experimental conditions to express and purify these proteins. Our semi-in vitro SUMOylation assays showed that the cell cycle regulators are SUMOylated proteins. Then we identified SUMOylation sites for the substrates. Furthermore, we generated binary vectors harboring SUMO-null version of the regulators and introduced into their mutants plants. The mutant version lose their functions, suggesting that the SUMOylation is essential for their functions.

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：SUMO 細胞周期 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO)は分子量約 11kDa のユビキチン様の小型タンパク質であり、ユビキチン同様の E1-E2-E3 酵素群によって基質タンパク質のリジン残基へと共有結合される。SUMO による基質タンパク質の修飾は、タンパク質に多様な性質の変化をもたらすとされ、動物や酵母では染色体構造の安定的な維持や DNA ダメージに対する応答などの幅広い過程で機能していることが報告されている。植物細胞の SUMO も同様に細胞分化や細胞周期の進行、環境変化への応答などの過程に機能していることがこれまでに明らかとされてきている。

多細胞システムにおいて細胞周期制御は正常な発生を支える重要なメカニズムである。多細胞生物は個体の中でも幹細胞を含む分裂組織でのみ細胞増殖を行ない、分化後の細胞はほとんど分裂を起こさない。そのため、細胞周期制御に不調が生じた場合にはガン化や矮化、胚性致死といった個体の生存そのものに関わる異常を引き起こしてしまう。これを防ぐために細胞周期の進行には多段階のチェックポイント分子が機能していることが知られている。

植物の根端分裂組織では、幹細胞における細胞周期制御に植物ホルモンの一種であるオーキシンが関与している。オーキシンは転写因子 PLETHORA を通じて SUMO E3 ligase である HIGH PLOIDY 2 (HPY2)の発現を制御し、HPY2 による SUMO 化が細胞分裂周期を活性化して細胞増殖を促進している。これらの知見に基づいて細胞周期制御因子に対して SUMO による制御が行われていると考え、シロイヌナズナの細胞周期制御因子ライブラリーを用いて基質タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、CYCLIN Dependent Kinases (CDKs)、Aurora Kinases (AURs)、Retinoblastoma-related (RBR)が SUMO 化を受けることが明らかとなった。CDKs は細胞周期全体を統御する分子であり、AURs は染色体分離の際に、RBR は染色体複製の際にそれぞれチェックポイントとして機能する分子である。そのため、CDKs、AURs、RBR に対する SUMO 化が各タンパク質にどういった変化をもたらす、細胞周期制御においてどのような役割を持つのかを検証する必要がある。

2. 研究の目的

細胞周期の正常な進行はすべての生物にとって必須な機能であり、高度な制御機構が存在している。先行研究の成果より、SUMO E3 ligase である HPY2 による SUMO 化機構が細胞周期制御に重要な役割を担うことが

明らかとなっている。また、細胞周期制御を担う分子群を対象とした SUMO 化の目印となる保存配列の探索を行った結果、CDKs、AURs、RBR といった因子が、SUMO 化の基質候補であることが示唆された。そこで、本研究ではこれらの細胞周期制御因子に着目し、実際にこれらの因子が持つ保存配列が SUMO 化サイトであるのかどうかを検証する。また、SUMO 化されるものに関しては、SUMO がどのようにこれら因子の機能性に寄与しているのかを検証する。これにより、SUMO 修飾が細胞周期制御因子への機能制御を通じて細胞周期全体を制御する分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

SUMO 化サイトの同定と semi-in vitro SUMO 化法による確認

SUMO 化の分子メカニズムは真核生物で広く保存されており、いくつかの酵素は互いに置き換えが可能である。一方で、原核生物である大腸菌は SUMO 化に必要な分子を持っていない。そのため、SUMO、E1、E2 と基質タンパク質を大腸菌の体内で同時に発現させることで SUMO 化反応を再構築することができる。この方法により、基質候補因子が SUMO 化されるかどうかを検証する。さらに、SUMO 化サイトであることが予想されたリジン残基に変異を導入し、同様に semi-in vitro 系を用いた試験を行うことで、SUMO 化されなくなることを確認する。実際には、基質候補因子をリコンビナントタンパク質として発現させ、簡易精製を行った後にウェスタンブロッティングにより検出する。SUMO 化は共有結合が生じる翻訳後修飾であり、分子量が増加するため非 SUMO 化タンパク質との判別が可能である。

SUMO-null 型発現ベクターの構築と in vivo における機能の検証

細胞周期制御因子の機能欠失変異体は致死であるか細胞増殖の不良による生長遅延などの表現型を示すことが予想される。各変異体に対してゲノム配列を用いた相補性の実験を行い、機能的なゲノム領域を決定する。さらに、前項の結果に基づいて SUMO 化サイトに変異を導入した形質転換ベクターを作製し、変異体に導入する。ゲノム配列上の SUMO 化サイトを変異させたゲノム配列ベクターで変異表現型を相補できなかったときには、SUMO 化が基質タンパク質にとって重要な機能であることが示される。

4. 研究成果

本研究で解析対象とした複数の細胞周期制御因子を用いて発現ベクターを作製し、リ

コンビナントタンパク質の発現系を構築した。この系と semi-in vitro SUMO アッセイシステムとを組み合わせ、候補とした細胞周期制御因子における SUMO 化の有無とその詳細なサイトの同定を行った。シロイヌナズナゲノム中に複数のアイソマーを持つ因子に関しては少なくとも一つを用いて実験を行った。その結果、今回着目した CDKs、AURs、RBR に関しては 1 つ以上の SUMO 化サイトを持っていることを明らかとした。特に推定上の SUMO 化サイトが進化的に保存されている分子に関しては全ての因子で SUMO 化が起こりうることを確認した。

細胞周期制御因子をコードする遺伝子の機能欠失変異体やノックダウン形質転換体を作成し、表現型の解析を行った。さらに、SUMO-null 変異型ゲノム配列を用いた相補性試験を行った。本研究で実験に供した全ての変異体で、ゲノム配列を導入した相補系統では野生型植物体と同様の旺盛な生育が観察できたことに対し、SUMO-null 配列の導入では生育不良や致死性になるなど変異体と同様の異常形質を観察した。このことは、SUMO-null 型のタンパク質ではその機能に何らかの異常が生じ、正常に機能できていないことを示唆している。すなわち、SUMO 化による翻訳後修飾は、実験対象とした細胞周期制御因子が正常に機能するために必要不可欠であると考えられる。これらの結果から、植物の細胞周期制御に SUMO が一定の役割を果たし、何らかのタンパク質間相互作用に影響を与えている可能性があるものと結論付けた。

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)

1. Differential regulation of B2-type CDK accumulation in Arabidopsis roots. Okushima Y, Shimizu K, Ishida T, Sugimoto K, Umeda M, *Plant Cell Rep*, 査読あり, in press, 2014
2. The ATM-dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in the fas1 mutation during Arabidopsis leaf development. Hisanaga T, Ferjani A, Horiguchi G, Ishikawa N, Fujikura U, Kubo M, Demura T, Fukuda H, Ishida T, Sugimoto K, Tsukaya H. *Plant Physiol*, 査読あり, Volume 162, 831-841, 2013
3. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. Noir S, Bömer M, Takahashi N, Ishida T, Tjir-Li T, Balbi V, Shanahan H, Sugimoto K, Devoto A, *Plant Physiol*, 査読あり, Volume 161, 1930-1951,

2013

4. Transcriptional repression of the APC/C activator CCS52A1 contributes to the active termination of cell growth. Breuer C, Morohashi K, Kawamura A, Takahashi N, Ishida T, Umeda M, Grotewold E, Sugimoto K, *EMBO J*, 査読あり, Volume 31, 4488-4501, 2012
5. MMS21/HPY2 and SIZ1, two Arabidopsis SUMO E3 ligases, have distinct functions in development. Ishida T, Yoshimura M, Miura K, Sugimoto K, *PLoS ONE*, 査読あり, e46897, 2012
6. Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. Tokunaga H, Kojima M, Kuroha T, Ishida T, Sugimoto K, Kiba T, Sakakibara H, *Plant J*, 査読あり, Volume 69, 355-365, 2012
7. (特集 酵母から動植物まで包括するユビキチン-プロテアソーム系の新展開) 植物における SUMO システムと E3 リガーゼの機能. 石田喬志, *杉本慶子, *生化学*, 査読なし, 第 84 巻第 6 号 440-447, 2012
8. “核内倍加と細胞成長を規定する発生制御”. 石田喬志, クリスチャンブラウアー, 杉本慶子, *化学と生物*, 査読なし, Vol. 49, No.07, 461-467, 2011

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 学会賞受賞講演 第 8 回日本植物学会若手奨励賞
石田喬志 "細胞の形態形成を担う分子メカニズムの解析" 日本植物学会第 75 回大会 東京大学(東京都) 2011 年 9 月 18 日
2. Analysis of CLAVATA signaling with the enhancer of peptide insensitive mutants. Ishida T, Tabata R, Yamada M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Sawa S, 第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学(富山県富山市) 2014 年 3 月 20 日
3. 線虫感染過程における CLAVATA 伝達系の関与. 江島千佳, Ngan Bui Thi, 田畑亮, 佐藤博, 石田喬志, 澤進一郎, 第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学(富山県富山市) 2014 年 3 月 19 日
4. ペプチドホルモン受容体 BAM1 による CLE ペプチドシグナル伝達機構の解析. 志水法子, 石田喬志, 田畑亮, 重信秀治, 長谷部光泰, 山口勝司, 山田昌史, 澤進一郎, 第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学(富山県富山市) 2014 年 3 月 18 日
5. *clv2* エンハンサー突然変異体の単離と機能解析. 志水法子, 石田喬志, 田畑亮, 重信秀治, 長谷部光泰, 山口勝司, 山田昌

- 史, 澤進一郎, 第 55 回日本植物生理学会
年会 富山大学(富山県富山市)2014 年 3
月 18 日
6. The Anaphase-Promoting
Complex/Cyclosome Regulates Microtubule
Structures through the Cell Cycle. Komaki S,
Ishida T, Heyman J, Hamada T, Hashimoto T,
De Veylder L, Sugimoto K, 第 55 回日本植
物生理学会年会 富山大学(富山県富山
市)2014 年 3 月 18 日
 7. CLAVATA シグナル伝達に關与する新規
因子の探索. Breuer C, Morohashi K,
Kawamura A, Takahashi N, Ishida T, Umeda
M, Grotewold E, Sugimoto K, 石田喬志,
植物科学若手研究 2013 臨江館(愛知県犬
山市)2013 年 12 月 7 日
 8. シロイヌナズナ SUMO E3 ligase
MMS21/HPY2 と SIZ1 の発生制御に關
する機能分化. 石田喬志, 吉村美香, 三
浦謙治, 杉本慶子, 第 54 回日本植物生理
学会年会 岡山大学(岡山県岡山市)2013
年 3 月 23 日
 9. Termination of ploidy-dependent cell growth
is transcriptionally regulated through an
active developmental mechanism during
plant cell morphogenesis. Breuer C,
Morohashi K, Kawamura A, Takahashi N,
Ishida T, Umeda M, Grotewold E, Sugimoto
K, 第 54 回日本植物生理学会年会 岡山
大学(岡山県岡山市)2013 年 3 月 23 日
 10. Activity of the Anaphase-Promoting
Complex/Cyclosome is Required for the Cell
Cycle Transition and the Endocycle
Progression. Komaki S, Ishida T, Stacey N,
Sugimoto K, 第 54 回日本植物生理学会年
会 岡山大学(岡山県岡山市)2013 年 3
月 21 日
 11. シロイヌナズナ SUMO E3 ligase
MMS21/HPY2 と SIZ1 の発生制御に關
する機能分化. 石田喬志, 吉村美香, 三
浦謙治, 杉本慶子, 日本分子生物学会第
35 回年会 マリンメッセ福岡(福岡県福
岡市)2012 年 12 月 14 日
 12. MMS21/HPY2 and SIZ1, two Arabidopsis
SUMO E3 ligase, have distinct functions in
development. Ishida T, The 4th
NIBB-MPIPZ-TLL Symposium
"Arabidopsis and Emerging Model Systems"
基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)2012
年 11 月 19-20 日
 13. シロイヌナズナ SUMO E3 ligase
MMS21/HPY2 と SIZ1 の発生制御に關
する機能分化. 石田喬志, 植物科学若手
研究会 2012 基礎生物学研究所(愛知県
岡崎市)2012 年 9 月 27 日
 14. オーロラキナーゼのノックダウン個体の
イメージング解析. 北原英里奈, 松永朋
子, 伊藤正樹, 坂本卓也, 小牧伸一郎, 石
田喬志, 栗原大輔, 杉本慶子, 松永幸大,
日本植物学会第 76 回大会 兵庫県立大学
(兵庫県姫路市)2012 年 9 月 15 日
 15. シロイヌナズナ SUMO E3 ligase
MMS21/HPY2 と SIZ1 の発生制御に關
する機能分化. 石田喬志, 吉村美香, 三
浦謙治, 杉本慶子, 日本植物学会第 76 回
大会 兵庫県立大学(兵庫県姫路市)2012
年 9 月 15-16 日
 16. 細胞増殖と細胞成長の切り替え制御を担
う分子機構の解析. 石田喬志, 筑波大学
遺伝子実験センター形質転換植物デザイ
ン研究拠点平成 23 年度成果報告会 筑波
大学(茨城県つくば市)2012 年 7 月 17
日
 17. 細胞分裂周期から核内倍加周期への移行
制御メカニズムの解析. 小牧伸一郎, 石
田喬志, Stacey N, 杉本慶子, 第 53 回日本
植物生理学会年会 京都産業大学(京都府
京都市)2012 年 3 月 17 日
 18. シロイヌナズナ SUMO E3 ligase SIZ1 と
HPY2 の機能分化に關する研究. 石田喬
志, 筑波大学遺伝子実験センター形質転
換植物デザイン拠点セミナー 筑波大学
(茨城県つくば市)2012 年 3 月 2 日
 19. *fugu2/fas1* の補償作用は DNA 損傷応答に
よって誘導される. 久永哲也, Ali Ferjani,
堀口吾朗, 石田喬志, 杉本慶子, 塚谷裕
一, 日本植物学会第 75 回大会 東京大学
(東京都)2011 年 9 月 17 日
 20. 発生分化過程におけるオーロラキナーゼ
の動態解析. 松永幸大, 栗原大輔, 大村
知広, 石田喬志, 北原英里奈, 浅田拓也,
万代文子, 松永朋子, 杉本慶子, 福井希
一, 日本植物学会第 75 回大会 東京大学
(東京都)2011 年 9 月 17 日
 21. シロイヌナズナのオーロラキナーゼのイ
メージング解析. 北原英里奈, 松永朋子,
小牧伸一郎, 石田喬志, 杉本慶子, 松永
幸大, 日本植物形態学会第 23 回総会 日
本女子大学(東京都)2011 年 9 月 16 日
 22. SUMO in plant development. 石田喬志, 細
胞周期合同セミナー(2011 年度)かんぼ
の宿 山代(石川県加賀市)2011 年 6 月
17 日
- 〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 喬志 (ISHIDA TAKASHI)
熊本大学・自然科学研究科・特任助教
研究者番号：00462656

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：