

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570048

研究課題名(和文)植物の光依存的細胞周期制御と細胞分裂機構

研究課題名(英文)Analyses on photoregulation of the cell cycle and mechanisms of cell division in plants

研究代表者

西浜 竜一(Nishihama, Ryuichi)

京都大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：70283455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物では、光が細胞分裂を伴う器官形成や再生に重要な働きをする。コケ植物苔類に属するゼニゴケにおいては、赤色光が細胞増殖に促進的に作用する。本研究により、赤色光はその受容体フィトクロムと光合成を介した情報伝達により、細胞周期S期への進入制御に関わる遺伝子の発現制御を異なる段階で行うこと、またフィトクロムは細胞の等方性成長を促進することが示唆された。

また、細胞板に局在する微小管モータータンパク質について機能解析を行い、細胞板形成のための膜小胞の輸送に関わる機能を持つことが示唆された。その遺伝子が必須遺伝子であったことから、条件的ノックアウト株を作成するためのベクターと方法論を構築した。

研究成果の概要(英文)：In plants, light plays critical roles in processes that accompany with cell proliferation, such as organogenesis and regeneration. For the liverwort *Marchantia polymorpha*, a bryophyte, red light promotes cell proliferation. This research project revealed that red light regulates different steps of expression of a gene that regulates S-phase entry by signaling via photosynthesis and the red-light receptor phytochrome, and that the phytochrome also promotes isotropic cell growth. Functional analysis on the microtubule-based motor protein that is localized to the cell plate suggested that the protein may play a role in the transport of membrane vesicles for cell-plate formation. As this gene was found to be essential, a vector and a protocol for obtaining conditional knockout mutants were created.

研究分野：植物細胞分子遺伝学

キーワード：細胞分裂 細胞周期 環境応答 光シグナリング

1. 研究開始当初の背景

植物の個体発生は、細胞増殖と細胞分化、そして細胞分裂と細胞伸長のバランスを巧妙にとりながら展開する。生育場所を自由に変わることができない植物は、環境に応じてそのバランスを調節するための様々な戦略を発達させてきた。光合成によりエネルギーを生産する植物にとって、光情報は特に重要である。光量が少ない所では伸長することにより光量の多い場所を探し、十分な光量が得られる場所では細胞分裂を促進して個体発生を行う。光が細胞分裂を伴う器官形成や再生に重要な働きをすることは古くから知られていたが、その分子機構はほとんど知られていなかった。

陸上植物の細胞分裂は、細胞板形成により行われる。細胞板は細胞間連絡プラスモデスマータの形成の場でもあり、細胞板構築のメカニズムを知ることにより、発生プロセスのさらなる理解が得られると考えられる。細胞板の構築と拡大は、微小管やアクチンなどから構成されるフラグモプラストに依存する。その赤道面に微小管依存的に膜小胞が運ばれ、互いに融合することで細胞板が形成される。これらの小胞輸送には、キネシン微小管モーターが関わると古くから考えられているが、未だその分子は同定されていなかった。

陸上植物進化の初期に分岐したコケ植物は、陸上植物の基本的な発生制御機構を持つと考えられている。当研究室において、コケ植物苔類に属するゼニゴケの分子遺伝学的実験基盤の整備が進められてきた。米国 Joint Genome Institute とのゲノム解析から、多くの制御系遺伝子の遺伝的冗長性が低いことがわかってきていた。さらに、遺伝子ターゲットングによるノックアウト (KO) 株作出も可能になってきていた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞増殖の光制御機構の解明、および細胞板形成に関わるキネシンの機能解明を目的とした。陸上植物の基本的な仕組みの解明を目指して、ゼニゴケをモデルとして研究を行った。

(1) 先行研究により、ゼニゴケにおいては赤色光が細胞増殖に促進的に、遠赤色光が抑制的に作用することがわかっていた。また、赤色光/遠赤色光受容体であるフィトクロムの恒常活性化型変異体の過剰発現株が、糖存在下では光非依存的に成長できることが示されていた。そこで本研究では、赤色光が細胞増殖に与えるインパクトを、細胞周期制御、および細胞形態の観点から解析した。

(2) タバコやシロイヌナズナのフラグモプラストに局在するキネシンは複数知られている。その内 Kinesin-7 ファミリーに属する NACK は、MAPK カスケードからなるシグナル伝達系の制御を介して、細胞板の拡大において必須な役割を果たすことが報告されている。C 末端テールにはこのファミリーのタン

パク質にだけ保存されている DUF3490 というドメインがあり、カーゴとの結合に機能する可能性が考えられた。そこで、ゼニゴケに 1 分子種だけ存在する MpNACK のカーゴ輸送モーターとしての役割解明を目指して研究を行った。

(3) まず、これらの研究を進めるために、ゼニゴケの細胞分裂研究の研究基盤整備を行った。

3. 研究の方法

(1) 暗処理した葉状体に赤色光を照射し、細胞周期がどのように進行するか解析した。そのために、細胞周期制御遺伝子の発現、チミジン類似体 EdU の取り込み、ルシフェラーゼをレポーターとした細胞周期制御遺伝子発現のライブ解析などを行った。また、葉状体切断後の再生過程における光の役割を解析するために、走査型電子顕微鏡を用いた組織形態学的観察、フローサイトメトリー解析、EdU 取り込み実験による細胞周期解析を、様々な光条件で行った。さらに、細胞増殖の光制御に関わる新奇因子の同定を目指して、その制御に異常を示す EMS を変異原とした点突然変異体や T-DNA 挿入変異体の単離を行った。

(2) ゼニゴケにおいても MpNACK がフラグモプラストに局在するのかわかるために、蛍光タンパク質 Citrine を融合したタンパク質を自身のプロモーターで発現する *proMpNACK:Citrine-MpNACK* 株を作成し、細胞内局在を観察した。また、小胞輸送阻害剤で処理したり、DUF3490 を欠失させたりしたときの局在観察を行い、小胞輸送に関与するか解析した。さらに、KO 株の作出を試みた。必須遺伝子と考えられたので、条件的 KO 株作出手法の開発も行った。

(3) 細胞周期可視化マーカー、細胞周期解析に有効なゼニゴケの培養細胞系、胞子や培養細胞を用いた細胞周期同調系の確立を試みた。

4. 研究成果

(1) 暗処理した葉状体に赤色光を照射したところ、G1 サイクリンと推定される *MpCYCD;1* と G2/M サイクリンと推定される *MpCYCB;1* の mRNA の蓄積パターンが、それぞれ照射後 6-12 時間、12 時間目以降にピークを示すことが定量 RT-PCR により明らかになった。さらに EdU 取り込み実験を行ったところ、S 期細胞は 6 時間目以降に増加することがわかった。これらのことから、暗処理後により細胞周期は G1 期で停止し、光照射により S 期進入が促進されることが示唆された。

赤色光照射直後に遠赤色光を照射したところ、*MpCYCD;1* mRNA のレベルの増加は抑制されたことから、フィトクロムが *MpCYCD;1* 発現を調節することが示唆された。そこで *proMpCYCD;1:ELuc (PEST)* 株を作成したところ、赤色光単独でも赤色光/遠赤色光の順番

照射でも同様にルシフェラーゼ活性の一過的な上昇が認められ、フィトクロムは *MpCYCD;1* の転写制御には関与せず、mRNA 安定性を制御する可能性が考えられた。

赤色光照射により光合成が活性化されることで *MpCYCD;1* の転写誘導が起こる可動化検証するために、光合成阻害剤 DCMU で処理したところ赤色光によるルシフェラーゼ活性上昇が全く起こらなくなり、そこにショ糖を添加することでルシフェラーゼ活性上昇が回復した。このことから、赤色光は光合成産物の糖を介して *MpCYCD;1* の転写を誘導することがわかった。つまり、赤色光はフィトクロムと光合成を介して *MpCYCD;1* の発現を2段階に制御することが示唆された。

コケ植物は傷を受けると非常に効率よく再生するが、この過程に光が重要な働きをすることが古くから知られていた。ゼニゴケ葉状体を切断すると、その基部側の断片の中肋付近から再生芽が形成され、明所では横方向によく展開した葉状体を再生する。光は再生に必須ではないものの、暗所では細くて貧弱な再生体しか形成されない。

フローサイトメトリー解析により、基部断片の細胞のほとんどが G1 期で停止していることが示唆された。EdU 取り込み実験から切断 24 時間目までに中肋付近の細胞が S 期に進入すること、さらに走査型電子顕微鏡観察から 36 時間目までに最初の細胞分裂が起こることがわかった。光条件を変えることにより、赤色光はフィトクロムを介して、G1 停止細胞の切断誘導的な細胞周期再開を促進することを明らかにした。

恒常活性型フィトクロム変異体 *Mpphy*^{Y241H} を過剰発現する株においては、暗所においても糖を含む培地では正常な葉状体が再生した。このことからフィトクロムは細胞増殖だけでなく、横方向への展開も促進する役割をもつことがわかった。そこで、赤色光条件と赤色光/遠赤色光条件の再生体について細胞の各種パラメータを測定したところ、後者では前者に比べて細胞が細長く伸長していることが明らかとなった。

再生は、胞子が発芽してから葉状体になるまでの sporeling と呼ばれる段階を経ていると古くから言われている。Sporeling においても、赤色光条件では細胞分裂が、赤色光/遠赤色光条件では細胞伸長が促進されることがわかった。以上のことから、フィトクロムは、細胞増殖および細胞形態を制御することで、光形態形成に影響を及ぼすことが示唆された。再生に関するこれらの知見を *Journal of Plant Research* 誌に発表した(雑誌論文①)。

(2) *proMpNACK:Citrine-MpNACK* 株を作出し、ゼニゴケにおける MpNACK の細胞内局在を調べたところ、細胞増殖が盛んなメリステムにおいて Citrine 発現細胞がパッチ状に認められ、FM4-64 で染色された細胞板と共局在した。小胞輸送阻害剤ブレフェルディン A で処理し

たところ、MpNACK の細胞板局在が抑制されたことから、MpNACK は小胞に依存して細胞板に局在できるようになることが示唆された。また、C 末端に存在する DUF3490 を欠失させると細胞板局在が起こらなくなった。以上より、DUF3490 が小胞と結合するドメインとして機能し、その結合により MpNACK のモーター機能が活性化されるという作業仮説を立て、さらなる解析を行っている。DUF3490 に結合するタンパク質の探索が進行中である。

MpNACK の機能解析を行うために、K0 株の作出を試みた。既に確立された相同組換えに基づく遺伝子ターゲティングを行うためのベクターを作製し、野生型胞子を形質転換して相当数をジェノタイピングしたが、K0 株を得ることはできなかった。推定される機能から必須遺伝子と考えられた。そこで、*proMpNACK:Citrine-MpNACK* 株を野生型株と交配し得られた胞子を用いてターゲティングベクターで形質転換したところ、*Citrine-MpNACK* 発現カセットを持ち、かつ内在 *MpNACK* 遺伝子座が K0 された株が複数得られた。これを再度野生型株と交配し、得られた胞子を培養したところ、不完全細胞板を持つ巨大な多核細胞が約 4 分の 1 の頻度で生じた。以上の結果から、MpNACK の細胞板形成における機能は陸上植物において保存されていることがわかった。

必須遺伝子でも相補しながら K0 できることが実証されたので、条件的 K0 株を作出するためのベクターを開発した。まず、ゼニゴケのヒートショックタンパク質遺伝子を同定し、そのプロモーター (*proMpHSP*) を用いて外来遺伝子発現をヒートショック (HS) で誘導できることを確認した。また、部位特異的組換え酵素 Cre をグルココルチコイド受容体 (GR) のリガンド結合ドメインと融合し、*proMpHSP* の制御下に配置すると、HS と薬剤 (デキサメタゾン; DEX) 依存的に *loxP* 配列間での組換えを誘導でき、かつ非誘導時の漏出組換えがほとんど起こらなくなることを見出した。そこで *loxP* 配列で挟まれた Gateway カセットとターミネーターを恒常プロモーターで発現する融合遺伝子と、*proMpHSP:Cre-GR* 融合遺伝子を両方含む一体型ベクターを作製した。これを相補用コンストラクトとして用いて内在遺伝子を K0 することで、HS+DEX 依存的に K0 の表現型を解析できるようになる。

(3) シロイヌナズナなどで広く使われている G2/M 期マーカーを模倣して作製した *proMpCYCB;1:MpCYCB;1^{D-box}-Citrine* がメリステムにおいてパッチ状に発現した。また、G1/S 期マーカーとなることを期待して作製した *proMpCYCD;1:MpCYCD^{PEST}-tdTomato-NLS* も同様にパッチ状に発現した。さらに微小管可視化用の *pro35S:Citrine-MpTUB1* も作製できた。*proNACK:Citrine-NACK* も含めて様々な組み合わせで発現させることで、各マーカー候補の細胞周期特異性を明らかにできると考

えられる。

ゼニゴケ培養細胞確立を目指して、過去に報告されたカルス作製法をもとに、高濃度グルコースを含む培地でゼニゴケ孢子や無性芽を培養したところ、カルス状に増殖する細胞塊を得ることができた。しかしながら、その増殖速度は非常に遅く、また低グルコース濃度培地に移すと葉状体発生を始めてしまうなど、細胞周期研究に用いることができる培養細胞としては確立できなかった。一方、次亜塩素酸で強めに滅菌した孢子から、いつまでも葉状体への発生を開始せず、細胞塊として1年弱成長し続けている株が得られた。形態的には sporeling で維持され続けている。

同調培養は2つの系を試した。一つ目は孢子からの培養1週間目の sporeling 集団に対して、暗処理を行い、その後光照射をすることで細胞周期を同調させる試みである。いくつかの細胞周期遺伝子の発現を定量 RT-PCR で調べたところ、それぞれ異なるタイミングで予想される順序にピークを形成したことから、同調して培養されたと考えられる。2つ目は、休眠無性芽を杯状体から取り出し、液体培養を開始すると同時に DNA 合成阻害剤であるアフィディコリンで処理し、S 期に進入したところで細胞周期を停止させ、薬剤を除去すること細胞周期を再開させた。proNACK:Citrine-NACK 株で検討したところ、薬剤除去後 14-16 時間目くらいに Citrine-NACK 発現細胞数がピークを迎え、同調していることがわかった。

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10件)

- ① Nishihama, R., Ishizaki, K., Hosaka, M., Matsuda, Y., Kubota, A., and Kohchi, T. (2015) Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporeling development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* **128**, 407-421 doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10265-015-0724-9>
- ② Kawashima, T., Lorković, Z. J., Nishihama, R., Ishizaki, K., Axelsson, E., Yelagandula, R., Kohchi, T., and Berger, F. (2015) Diversification of histone H2A variants during plant evolution. *Trends Plant Sci.* In press. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.005>
- ③ Kanazawa, T., Era, A., Minamino, N., Shikano, Y., Fujimoto, M., Uemura, T., Nishihama, R., Yamato, K. T., Ishizaki, K., Nishiyama, T., Kohchi, T., Nakano, A., and Ueda, T. (2015) SNARE molecules in *Marchantia polymorpha*: unique and conserved features of the membrane fusion machinery. *Plant Cell Physiol.* Ahead of print. 査読有 doi: [10.1093/pcp/pcv076](https://doi.org/10.1093/pcp/pcv076)
- ④ Kato, H., Ishizaki, K., Kouno, M., Shirakawa, M., Bowman, J. L., Nishihama, R., Kohchi, T. (2015) Auxin-mediated transcriptional system with a minimal set of components is critical for morphogenesis through the life cycle in *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genet.* **11**, e1005084. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005084>
- ⑤ 西浜 竜一、河内 孝之、陸上植物の細胞分裂の光制御とその進化、植物科学の最前線、2015、**6**、pp. 51-62、査読無 http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ-Review_6A_51-62.pdf
- ⑥ Sasabe, M., Ishibashi, N., Haruta, T., Minami, A., Kurihara, D., Higashiyama, T., Nishihama, R., Ito, M., and Machida, Y. (2015) The carboxyl-terminal tail of the stalk of Arabidopsis NACK1/HINKEL kinesin is required for its localization to the cell plate formation site. *J. Plant Res.* **128**, 327-336. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10265-014-0687-2>
- ⑦ Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., and Kohchi, T. (2014) Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution. *Nat. Commun.* **5**, 3668. 査読有 doi: [10.1038/ncomms4668](https://doi.org/10.1038/ncomms4668)
- ⑧ Komatsu, A., Terai, M., Ishizaki, K., Suetsugu, N., Tsuboi, H., Nishihama, R., Yamato, K. T., Wada, M., and Kohchi, T. (2014) Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast photorelocation movements in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol.* **166**, 411-427. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.245100>
- ⑨ Ishizaki, K., Mizutani, M., Shimamura, M., Masuda, A., Nishihama, R., and Kohchi, T. (2013) Essential role of the E3 ubiquitin ligase NOPPERABO1 for schizogenous intercellular space formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell* **25**, 4075-4084. 査読有 doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.117051>
- ⑩ Nishihama, R. and Kohchi, T. (2013) Evolutionary insights into photoregulation of the cell cycle in the green lineage. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 630-637. 査読有

[学会発表] (計 2 2 件)

- ① 井上 佳祐、西浜 竜一、石崎 公庸、河内 孝之、苔類ゼニゴケを用いた転写因子 PIF による赤色光シグナル伝達機構の解析、1aD05、3/16/2015、第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大、東京
- ② 神埜 勝、加藤 大貴、武田 真由子、石崎 公庸、西浜 竜一、河内 孝之、ゼニゴケのオーキシン応答転写因子 ARF1 は無性芽の細胞分裂パターンを制御する、3aD02、3/18/2015、第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大、東京
- ③ Nishihama, R., Ishida, S. Matsuda, Y., and Kohchi, T. Essential roles of the cytokinetic kinesin NACK in cell-plate formation in *Marchantia polymorpha*. 12/9/2014, Marchantia Workshop 2014, Kobe University, Kobe
- ④ Nishihama, R., Ishida, S. Matsuda, Y., Ishizaki, K., and Kohchi, T. How to deal with essential genes in *Marchantia polymorpha*? 12/8/2014, Marchantia Workshop 2014, Kobe University, Kobe
- ⑤ 神埜 勝、加藤 大貴、武田 真由子、石崎 公庸、西浜 竜一、河内 孝之、オーキシン応答転写因子 ARF1 による無性芽発生の制御、10、10/18/2015、第 49 回植物化学調節学会大会、京都大、京都
- ⑥ 西浜 竜一、石田 咲子、河内 孝之、細胞板形成に必須なゼニゴケ NACK オートログの機能解析、3aD05、9/14/2014、日本植物学会第 78 回大会、明治大、神奈川
- ⑦ 井上 佳祐、石崎 公庸、西浜 竜一、河内 孝之、基部陸上植物ゼニゴケにおける祖先的な赤色光シグナル伝達機構、8/22/2014、日本光生物学協会、大阪市立大、大阪
- ⑧ Nishihama, R., Ishizaki, K., and Kohchi, T. Photoregulation of of the cell cycle in the liverwort *Marchantia polymorpha*, an emerging model basal land plant. 6/27/2014, Plant Cell Cycle Workshop, Academy of Science Czech Republic
- ⑨ 井上 佳祐、西浜 竜一、石崎 公庸、河内 孝之、苔類ゼニゴケを用いた祖先的な赤色光シグナル伝達機構の解析、3C05p19、3/28/2015、日本農芸化学会 2014 年度大会、東京
- ⑩ 西浜 竜一、河内 孝之、ゼニゴケを用いた細胞質分裂キネシン NACK の機能解析、1aF05、3/18/2014、第 55 回日本植物生理学会年会、富山大、富山
- ⑪ 竹谷 千尋、井上 佳祐、石崎 公庸、西浜 竜一、河内 孝之、苔類ゼニゴケにおける転写因子 HY5 を介した光形態形成制御機構、1aB10、3/18/2014、第 55 回日本植物生理学会年会、富山大、富山
- ⑫ 西浜 竜一、Photoregulation of

regeneration and cell division in a basal land plant, *Marchantia polymorpha* L. 1/28/2014、基生研研究会「再生研究会」、基礎生物学研究所、愛知

- ⑬ 西浜 竜一、石崎 公庸、河内 孝之、苔類ゼニゴケにおける光依存的な細胞分裂活性制御機構、1pSH05、9/13/2013、日本植物学会第 77 回大会、北海道大、北海道
- ⑭ 井上 佳祐、石崎 公庸、西浜 竜一、河内 孝之、苔類ゼニゴケにおける転写因子 PIF を介した赤色光シグナル伝達機構、1aD12、9/13/2013、日本植物学会第 77 回大会、北海道大、北海道
- ⑮ 真鍋 諒、中村 衣里、井上 佳祐、保坂 将志、石崎 公庸、河内 孝之、西浜 竜一、赤色光受容体フィトクロムと光合成によるゼニゴケ細胞周期の光制御、1aF01、9/13/2013、日本植物学会第 77 回大会、北海道大、北海道
- ⑯ 神埜 勝、加藤 大貴、武田 真由子、石崎 公庸、西浜 竜一、河内 孝之、ゼニゴケのオーキシン信号伝達因子 MpARF1 による無性芽発生制御、1aF02、9/13/2013、日本植物学会第 77 回大会、北海道大、北海道
- ⑰ 水谷 未耶、石崎 公庸、増田 晃秀、嶋村 正樹、西浜 竜一、河内 孝之、ゼニゴケ NOPPERABO1 は E3 ユビキチンリガーゼとして気室の細胞間隙形成を正に制御する、2aG13、9/14/2013、日本植物学会第 77 回大会、北海道大、北海道
- ⑱ 西浜 竜一、真鍋 諒、中村 衣里、井上 佳祐、石崎 公庸、河内 孝之、ゼニゴケの赤色光によるサイクリン D 遺伝子発現制御機構、3aG11、3/23/2013、第 54 回日本植物生理学会年会、岡山大、岡山
- ⑲ Nishihama, R., Inoue, K., Nakamura, E., Manabe, R., Ishizaki, K., and Kohchi, T. Studying the cell cycle and its control by red light in *Marchantia polymorpha*. 11/15/2012, Marchantia Workshop 2012, Aso, Kumamoto
- ⑳ 西浜 竜一、中村 衣里、保坂 将志、井上 佳祐、真鍋 諒、石崎 公庸、河内 孝之、ゼニゴケのフィトクロムによる細胞周期制御機構、1pB10、9/15/2012、日本植物学会第 76 回大会、兵庫県立大、兵庫

[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：
出願年月日：
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

西浜 竜一 (NISHIHAMA, Ryuichi)
京都大学大学院生命科学研究科・講師
研究者番号：70283455

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

河内 孝之 (KOHCHI, Takayuki)
京都大学大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：40202056

石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)
神戸大学大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00452293