

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580149

研究課題名(和文)植物ホルモン応答の新規シグナル伝達制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Novel post-translational modifications involved in plant hormone signaling

研究代表者

亀村 和生 (KAMEMURA, Kazuo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：00399437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナにおいてヒストンタンパク質が糖鎖によって修飾されていることを示した。本糖鎖は、非還元末端にGlcNAcを有していた。これまでに植物ヒストンが糖鎖修飾されることを示した報告例はなく、本成果が初めての報告となる。動物ヒストンの化学修飾はエピジェネティックコードとして高い注目を集めているのに対し植物の解析例は極めて少なく、この点において植物分子細胞生物学的に有益な報告である。加えて、被子植物界における α -チューブリンのアセチル化修飾の普遍性を証明するとともに、ファストプランツをモデル植物として植物成長過程や組織依存的な α -チューブリンアセチル化の動態・変動を解明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified that plant histones are glycosylated by a sugar chain having N-acetylglucosamine in the non-reducing end. This is the first report on the glycosylation of plant histones, and it indicates that glycosylation might play an epigenetic role in plants. We also identified that acetylation of α -tubulin is a widespread post-translational modification in angiosperms, and we characterized regulated changes in acetylation of α -tubulin during the growth and the organ development of Fast Plants.

研究分野：細胞生物学

キーワード：O-GlcNAc ヒストン エピジェネティックコード アセチル化 チューブリン

1. 研究開始当初の背景

植物の成長制御因子として植物ホルモンは極めて重要であり、植物ホルモンが植物体にもたらす生理作用が徐々に解明されている一方で、植物ホルモンの受容から遺伝子発現変化に至るシグナル伝達メカニズムには不明な点が多い現状である。

シロイヌナズナの遺伝学的解析から、ジベレリン応答性シグナル伝達経路の制御因子として SPINDLY (SPY) が同定され、SPY が動物の O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) と約 50% のアミノ酸配列相同性を有し、ドメイン構造の特徴が一致することがわかり、SPY は植物における OGT であると考えられている¹⁾。その後、SPY 以上に動物 OGT と高い相同性 (約 60%) を有するタンパク質としてシロイヌナズナから SECRET AGENT (SEC) が同定されている²⁾。しかしながら、SPY/SEC によって O-GlcNAc 修飾される植物内在性の核・細胞質タンパク質は未だ同定されていない現状であった (図 1)。

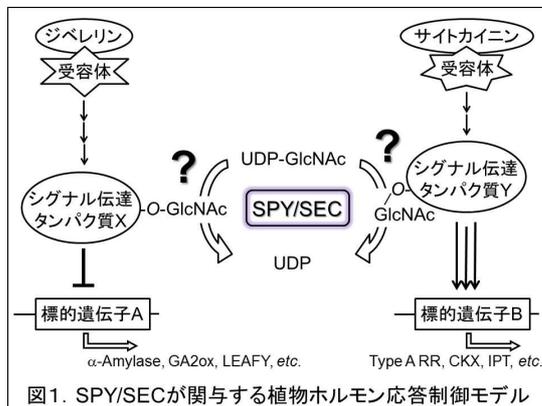


図 1. SPY/SEC が関与する植物ホルモン応答制御モデル

なお、O-GlcNAc 修飾とは、核・細胞質タンパク質のセリン、およびスレオニン残基に 1 分子の N-アセチルグルコサミンが付加される動的な翻訳後修飾であり、リン酸化と拮抗あるいは協調して起こる。動物では、哺乳類を主とした解析から 4,000 を上回る核・細胞質タンパク質が O-GlcNAc 修飾されることが同定されており、癌はじめ種々の疾患発症の分子メカニズムに注目し、O-GlcNAc 修飾によるタンパク質の生理機能変化を解明することが重要な研究課題となっている。一方、植物では O-GlcNAc 修飾が存在すると考えられているものの、その確証は得られておらず、その生理機能は推測の域を出ない実状が本研究の根本の背景にある。

上記、SPY/SEC の研究とは独立して、O-GlcNAc 修飾酵素は不明ながら、カボチャ、ならびにタバコ細胞の原形質連絡に関わるタンパク質 (Nt-NCAPP1 等) に O-GlcNAc 修飾が起こる可能性が示唆されているが³⁾、O-GlcNAc 構造の糖鎖であるかは不明であり、詳細な糖鎖構造解析が待たれる。

以上の通り、SPY/SEC という 2 種の OGT 様のタンパク質が存在するものの、植物の

核・細胞質における O-GlcNAc 修飾タンパク質の存否、ならびに SPY/SEC により O-GlcNAc 修飾される植物内在性蛋白質は確認づけられておらず、そもそも植物ホルモンのシグナル伝達に糖鎖修飾が関与しているのか、研究開始当初は不明であった (図 1)。

2. 研究の目的

糖鎖修飾をはじめとする翻訳後修飾に着目し、全く新しい切り口から植物ホルモン応答のシグナル伝達制御メカニズムの解明に迫ることを当初の本研究の目的とした。

具体的には、シロイヌナズナを用い、核・細胞質タンパク質の糖鎖修飾の存否を検証する。そして、糖鎖修飾が存在するのであれば、実際に植物体において糖鎖修飾される核・細胞質タンパク質を同定する。その後、ジベレリンやサイトカイニン応答の制御因子である SPY、ならびに SEC の本質的作用が、生理的に O-GlcNAc 転移酵素活性を發揮し、植物ホルモン応答性シグナル伝達経路のタンパク質を O-GlcNAc 修飾することによりシグナルを制御する点にあるのか検証する、というものである。

3. 研究の方法

培養細胞、カルス、あるいは植物体から調製したタンパク質抽出液に対し、抗 O-GlcNAc 抗体 (モノクローナル抗体 CTD110.6、RL2、ならびに HGAC85) を用いたウエスタンブロッティングにより、O-GlcNAc 修飾タンパク質をサーベイした。高純度のヒストン画分を調製し、二次元電気泳動により高解像度で各ヒストンタンパク質を分離した後、抗 O-GlcNAc 特異抗体を用いたウエスタンブロッティング、ならびにハプテン阻害実験により、抗 O-GlcNAc 抗体反応性を検証することによる糖鎖構造の部分予測を行った。また、植物体タンパク質抽出液のプロテアーゼ消化産物をアフィニティークロマトに供し、O-GlcNAc 修飾ペプチドを精製し、ショットガン法を用いた液体クロマトグラフィー質量分析により O-GlcNAc 修飾タンパク質候補を同定した。

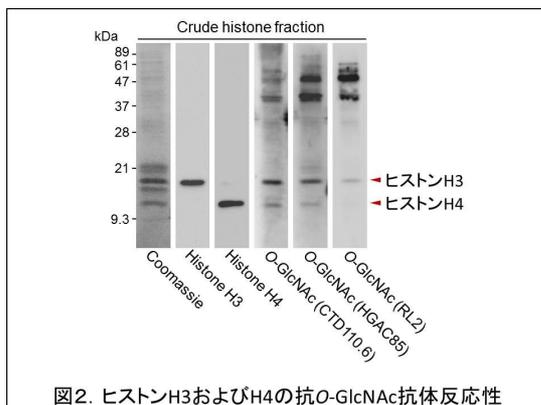
15 種 (20 品種) の被子植物につき、葉における γ-チュープリンアセチル化の存否を検証した。ファストプランツをモデル植物として、発生および器官形成過程における γ-チュープリンアセチル化の動態を解析した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ培養細胞ヒストンの GlcNAc 含有糖鎖修飾の発見

シロイヌナズナ培養細胞の核画分から、抗 O-GlcNAc 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより分子量 10-20 kDa 領域に 2 種の抗体陽性バンドを検出した。核画分における分子量 10-20 kDa の主要タンパク質はヒストンであることから、抗体陽性バンドがヒ

ストンである可能性を検証し、ヒストン H3、および H4 が抗 *O*-GlcNAc 抗体陽性であることを突き止めた (図 2)。ヒストン H3、および H4 が有する糖鎖構造について、ヘキサミンナーゼを用いた解析より、非還元末端に GlcNAc を有する糖鎖であることを示した。これまでに植物のヒストンが糖鎖を有するという報告例はなく、本成果は初めての報告となる。なお、動物細胞では、ヒストンの化学修飾はエピジェネティックコードとして高い注目を集めているが、植物における解析例は極めて少なく、この点において有益な報告となるであろう。



(2) シロイヌナズナ植物体中の *O*-GlcNAc 修飾候補タンパク質の同定

シロイヌナズナ植物体から抽出したタンパク質のトリプシン消化産物から、ショットガン法を用いた液体クロマトグラフィー質量分析により7種の *O*-GlcNAc 修飾候補タンパク質を同定した (表 1)。これらのうち、GID1L2 はジベレリン応答性シグナル伝達経路に関わるタンパク質であり、SPY/SEC の本質的機能 (*O*-GlcNAc 修飾酵素) によってジベレリン応答性シグナル伝達が制御されている可能性を示唆する知見である。他にも、細胞周期制御因子や転写因子、脱リン酸化酵素などが含まれており、今後の植物ホルモン応答のシグナル伝達制御メカニズムの解明のための有力な手がかりになるであろう。

表 1. ショットガン法により同定された *O*-GlcNAc 修飾候補タンパク質

Protein name	Accession no.	Calculated Mw
F-box protein At1g59680	Q9LQ46	41392
Probable gibberellin receptor (GID1L2)	Q9LYC1	40300
Cyclin A1-2	Q9FVX0	49637
B3 domain-containing transcription factor (ABI3)	Q01593	79500
Cleavage & polyadenylation specificity factor (CPSF30)	A9LNK9	70015
Probable protein phosphatase (2C75)	Q9FLI3	46043
UPF0497 membrane protein At2g38480	Q8LE26	20888

(3) 被子植物界におけるチューブリンアセチ

ル化の普遍性の証明

本研究の遂行過程において、細胞分画の指標とした α -チューブリンの SDS 電気泳動による挙動が細胞の状態に応じて変化することに気付いた。この要因として α -チューブリンのアセチル化レベル変動が関与していることを見出した。動物細胞では、 α -チューブリンのアセチル化は微小管の動的不安定性の調節機能をもち、細胞増殖や遊走と密接に関わる翻訳後修飾であることが多数の知見から明らかであるが、植物細胞においては殆ど解析例がなく、アセチル化 α -チューブリンの存否すら明確ではなかった。そこで、20 品種の被子植物についてアセチル化 α -チューブリンの存否を検証した。用いた植物は、シロイヌナズナ、タマネギ、ニラ、イネ、ホウレンソウ、ニガウリ、キュウリ、ナタネ、チンゲンサイ、ミズナ、キャベツ、コマツナ、カブ、カラシナ、ブロッコリー、ハクサイ、ナズナ、ワサビ、パセリ、セロリである。その結果、試供した全ての植物においてアセチル化 α -チューブリンが存在することを認め、被子植物界における α -チューブリンアセチル化の普遍性を示した (Nakagawa et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013a)。さらに、成長が速く、組織毎の採取が容易なファストプランツを用い、植物成長過程や組織における α -チューブリンアセチル化の動態変化を解明した (Nakagawa et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013b)。本成果は、動物細胞と同様の α -チューブリンアセチル化による微小管の動的不安定性制御メカニズムが植物細胞にも備わっていることを示唆する有力な知見であり、今後の植物細胞における増殖や形態変化制御などのシグナル伝達研究に新しい視点をもたらすことが期待できる。

< 引用文献 >

T.M. Thornton, S.M. Swain, N.E. Olszewski. Gibberellin signal transduction presents ...the SPY who *O*-GlcNAc'd me. Trends Plant Sci. 4, 1999, 424-428.

L.M. Hartweck, C.L. Scott, N.E. Olszewski. Two *O*-linked N-acetylglucosamine transferase genes of Arabidopsis thaliana L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. Genetics 161, 2002, 1279-1291.

K. Taoka, B.K. Ham, B. Xoconostle-Cázares, M.R. Rojas, W.J. Lucas. Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. Plant Cell 19, 2007, 1866-1884.

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 2件)

Umihito Nakagawa, Kazuo Kamemura, Aya Imamura. Regulated changes in acetylation of α -tubulin on Lys40 during the growth and the organ development of Fast Plants, *Brassica rapa* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有) 77, 2013, 2228-2233. <http://de.doi.org/10.1271/bbb.130475>.

Umihito Nakagawa, Daisuke Suzuki, Mai Ishikawa, Hideki Sato, Kazuo Kamemura, Aya Imamura. Acetylation of α -tubulin on Lys40 is a widespread post-translational modification in angiosperms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有) 77, 2013, 1602-1605. <http://de.doi.org/10.1271/bbb.130261>.

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀村 和生 (KAMEMURA, Kazuo)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
准教授
研究者番号：00399437

(2)研究分担者

今村 綾 (IMAMURA, Aya)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
講師
研究者番号：50410965

(3)連携研究者

蔡 晃植 (CHE, Fang-Sik)
長浜バイオ大学・大学院バイオサイエンス
研究科・教授
研究者番号：00263442