

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840086

研究課題名(和文)植物細胞分裂を制御する新奇蛋白質リン酸化酵素と脱リン酸化酵素の単離と機能解析

研究課題名(英文) Search for novel protein kinases and protein phosphatases regulating cell division in plant cells

研究代表者

笹部 美知子 (Sasabe, Michiko)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：00454380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：動物と比較して植物の細胞分裂の制御のしくみは未解明な部分が多い。本研究では、植物の細胞質分裂に必須の制御系であるMAPKカスケードを基軸として、植物細胞の分裂を制御する新奇因子の同定を目指した。このカスケードの活性化は、CDKによって負に制御されていることが明らかとなっていたが、本研究により、CDKと競合的に働き、細胞分裂の促進に機能すると考えられる新規PP2C様プロテインホスファターゼが単離された。本遺伝子は分裂の盛んな組織で優先的に発現しており、過剰発現体では細胞数の増加により成長が促進していた。これらのことから、本因子は細胞分裂を正に制御する新奇因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms of cell division in various organisms is important to reveal the developmental and differentiation processes in each organism. In this study, we aimed to identify the novel factors controlling plant cell division. The NACK-PQR pathway, which is a MAPK cascade unique to plant, is known as a key regulator of plant cytokinesis. This pathway is suppressed by CDKs during early M phase, and it is specifically activated during cytokinesis. Here we identified a novel type 2C protein phosphatase (PP2C) as a candidate that functions competitively to CDKs. This PP2C gene was dominantly expressed in the division zone of primary roots, emerging lateral roots and developing young leaves. Overexpression of this PP2C promoted the cell division but not the cell elongation in Arabidopsis plants, resulting in bigger seedlings with long roots. These results suggest this PP2C is involved in the cell division in plants.

研究分野：生物学

キーワード：細胞分裂 MAPK CDK プロテインキナーゼ プロテインホスファターゼ 細胞質分裂 植物 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は生命の根源的な現象であり、多くの生物が保存された分裂機構を有している。一方で、生物種に特徴的な分裂様式が存在することも知られており、そのメカニズムの解明は生物種特有の発生、分化及び進化のメカニズムを理解する上で重要である。これまでに我々は、植物細胞の分裂において、その最終過程である細胞質分裂が、一連の MAPK カスケードにより制御されていることを明らかにしてきた。この経路のシロイヌナズナ変異体の最も重篤な表現型は、配偶体致死であることから、この経路は植物の生存にとって必須であり、植物の細胞分裂を制御する鍵となる制御系の 1 つであることが明らかとなっている。この経路は、タバコ、シロイヌナズナ、イネ等調べられた植物全てにおいて保存されていることが報告されているが、現在までに動物細胞では保存された経路は見つかっていない。このことから、この経路は、植物特有の形質である細胞板形成を支える植物特異的な制御系として機能していると考えられている。そこで、本研究では、この MAPK カスケードを基軸として、植物細胞の分裂を制御する新奇因子の同定を目指した。

これまでに、我々はこのカスケードが、M 期（核分裂）進行の鍵酵素であるサイクリン依存性キナーゼ（CDK）によって負に制御されていることを見いだしている。具体的には、染色体の分離が正常に開始され、細胞質分裂が開始されるまでは、MAPK カスケードの活性化因子が CDK によりリン酸化されており、カスケードの活性化が抑制されていた。変異体の解析から、この制御がうまくいかなくなると、個体の生長にも異常が現れることも分かった。つまり、このシステムは核と細胞質の分裂を同期させ、正確な細胞分裂と個体の発達を保証するシステムであると言える。しかし、現在までに CDK による MAPK カスケードの負の制御を解除し、細胞質分裂の開始を促進する実行因子は同定されておらず、分裂と正常な分化をつなぐ因子も未同定である。本研究では、細胞質分裂を制御する MAPK カスケードの活性化を促進する実行因子の同定を中心として、植物の細胞分裂の制御に関わる新奇因子の同定を目指した。

2. 研究の目的

植物細胞の分裂過程には、動物細胞には見られない形態的特徴があると同時に、動物では必須の分裂期キナーゼやホスファターゼが存在しないという制御系における違いも存在する。しかし、植物細胞の分裂に特徴的な因子はまだわずかしか同定されておらず、その制御系については未解明な部分が多い。これまでに我々は、植物の細胞分裂の最後の重要な過程である細胞質分裂の進行に、特定の MAPK カスケードが必須であること、このカスケードの活性化が、細胞分裂進行の鍵因

子・CDK によって制御されていることを示してきた。本研究では、(1) 植物の細胞質分裂に必須の MAPK カスケードとその上流の制御因子である CDK によるリン酸化制御系と関連して機能する新奇因子の同定及び、(2) その制御系と独立に機能する植物細胞における新奇 M 期キナーゼの同定と機能解析を行い、植物の細胞分裂の進行を制御する分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞質分裂の開始を制御する実行因子の同定：MAPK カスケードの活性化因子 NACK1 は CDK によりリン酸化されることにより不活性化されている。リン酸化による負の制御を解除し、NACK1 の機能を活性化させる因子を得るために、NACK1 と直接相互作用する因子を探索する。酵母の 2 ハイブリッドシステムと、生化学的な複合体精製の両面から行い、脱リン酸化酵素等、NACK1 の CDK によるリン酸化を解除する因子に着目して研究を行う。同定された分子について、生化学的手法、蛍光イメージング、変異体やノックダウン細胞を中心とした遺伝学的手法を用いて解析し、分子機能を明らかにする。

(2) 新奇分裂期キナーゼの同定：生化学的スクリーニング及び *in silico* 解析により、M 期に活性が上昇するキナーゼ及び、細胞分裂時に発現の上昇する遺伝子をスクリーニングし、細胞分裂の制御に関与している考えられる新奇制御因子を探索し、同定する。

4. 研究成果

(1) 細胞質分裂の開始を制御する実行因子の同定：CDK は、MAPK カスケードの活性化因子である NACK1 をリン酸化することにより不活性化し、細胞質分裂の開始を抑制している。そこで、CDK による NACK1 の負の制御を解除する因子の探索のため、NACK1 の CDK リン酸化サイトを用いて酵母 2 ハイブリッドシステムによりスクリーニングを行った。その結果、タンパク質脱リン酸化酵素である PP2C 様プロテインホスファターゼが候補の 1 つとして単離された。NACK1-associated protein phosphatase type 2C (NA2C) と名付けたこのホスファターゼは、酵母内で NACK1 の CDK リン酸化領域と結合する因子として同定されたが、*in vitro* においても NACK1 と結合することが分かった。また、細胞分裂時の細胞内局在は NACK1 と一部類似したパターンを示したことから、本因子は細胞内でも NACK1 と相互作用している可能性が示唆された。

シロイヌナズナゲノム中には、本遺伝子とよく似た配列を持つ遺伝子が 2 つ存在する。レポーター遺伝子を用いて、これらの遺伝子のシロイヌナズナにおける発現パターンを解析したところ、そのうちの 1 つは主根及び側根の根端の分裂領域、葉原基といった分裂

の盛んな組織で優先的に発現していることが示された。さらに、本遺伝子の過剰発現体では、野生型植物と比較して植物体が大きくなり、主根が長くなることも明らかとなった。過剰発現体において成長が促進された根について、細胞数及び細胞サイズについて統計的な解析を行ったところ、過剰発現体では分裂領域が広がり、分裂細胞が増加していることが分かった。このことから、本遺伝子の異所的過剰発現は、細胞分裂を促進することが示唆され、本因子が細胞分裂を正に制御する新奇プロテインホスファターゼとして機能している可能性が示唆された。

(2) 新奇分裂期キナーゼの同定: M 期特異的に発現が上昇することがすでに明らかになっている複数の細胞分裂関連因子と共発現する遺伝子を *in silico* 解析により探索したところ、M 期特異的に発現するシグナル伝達関連因子を複数得ることができた。この中には、すでに動植物で細胞分裂に関与することが報告されている Haspin キナーゼや Aurora キナーゼとともに、機能未知の 2 つのレセプター様キナーゼと 1 つのキナーゼ結合因子が含まれていた。これら 3 つの遺伝子について、細胞周期における発現パターンを、リアルタイム PCR により解析したところ、いずれも M 期特異的に発現が上昇することが分かった。さらに、これら因子の細胞内局在を解析したところ、レセプター様キナーゼの 1 つは細胞分裂前期から中期にかけては細胞質に局在しているが、細胞分裂の最終段階である細胞質分裂時には細胞板の周縁に局在することが明らかとなった。またこの因子はシロイヌナズナ個体において、根の先端や葉原基といった分裂の盛んな組織で特異的に発現していることも分かった。これらの結果から、本因子は、細胞分裂の制御過程において何らかの機能を有している可能性があると考えている。今後、同定された 3 つの因子について細胞レベル、個体レベルで機能解析を進める予定である。

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 7 件)

Li, H., Sun, B., Sasabe, M., Deng, X.-G., Machida, Y., Lin, H., Lee Y.-R., Liu, B. (2017) Arabidopsis MAP65-4 Plays A Role in Phragmoplast Microtubule Organization and Marks the Cortical Cell Division Site. *New Phytologist* doi: 10.1111/nph.14532. 査読あり

Suzuki, T., Matsushima, C., Nishimura, S., Higashiyama, T., Sasabe, M., Machida, Y. (2016) Identification of Phosphoinositide-binding Protein PATELLIN2 as a Substrate of Arabidopsis MPK4 MAP Kinase during Septum

Formation in Cytokinesis. *Plant Cell Physiol.* 57, 1744-55. doi: 10.1093/pcp/pcw098. 査読あり

笹部美知子, 町田泰則 (2016) 植物における細胞質分裂の制御機構. 生化学 第 88 巻 第 4 号, 465-475 査読なし

伊藤正樹, 笹部美知子, 町田泰則 (2016) 植物に特徴的なタンパク質複合体による細胞分裂の制御機構. 領域融合レビュー, 5, e005, DOI: 10.7875/leading.author.5.e005 査読なし

Sasabe, M., Ishibashi, N., Haruta, T., Aki 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. doi: 10.1007/s10265-014-0687-2 査読あり

Kawamoto, N., Sasabe, M., Endo, M., Machida, Y. and Araki, T. (2015) Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation. *Scientific Rep.* 5, 8341, doi: 10.1038/srep08341 査読あり

Tanaka, H., Nodzyński, T., Kitakura, S., Feraru, M.I., Sasabe, M., Ishikawa, T., Kleine-Vehn, J., Kakimoto, T., Friml, J. (2014) BEX1/ARF1A1C is Required for BFA-Sensitive Recycling of PIN Auxin Transporters and Auxin-Mediated Development in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 55, 737-749 査読あり

〔学会発表〕(計 21 件)

増子雄貴, 笹部美知子: M 期特異的に発現する新奇レセプター様キナーゼの機能解析. 東北植物学会第 6 回大会, 2016.12.10-11, 東北大学青葉山北キャンパス (仙台市)

鈴木伶奈, 森岡祉門, 西田結花, 桧垣匠, 植村知博, 安原裕紀, 馳澤盛一郎, 上田貴志, 町田泰則, 笹部美知子: 細胞板形成における NACK1 キネシンの役割. 東北植物学会第 6 回大会, 2016.12.10-11, 東北大学青葉山北キャンパス (仙台市)

笹部美知子・大和田理恵・中野理恵・中田美果子・町田泰則: 植物の細胞分裂を制御するキネシンと相互作用するプロテインホスファターゼの解析. 日本植物学会第 80 回大会, 2016.9.16-19. 沖縄コンベンションセンター (宜野湾市)

増子雄貴・笹部美知子: 植物における新奇 M 期キナーゼの探索. 日本植物学会第 80

回大会, 2016.9.16-19. 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

大和田理恵・中田美果子・中野理恵・町田泰則・笹部美知子: 植物の細胞分裂を制御するキネシンと相互作用する新規プロテインホスファターゼのシロイヌナズナホモログの解析. 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016.3.18-20. 岩手大学(盛岡市)

大和田理恵・中田美果子・中野理恵・町田泰則・笹部美知子: 植物の細胞分裂を制御するキネシンと相互作用する新規プロテインホスファターゼのシロイヌナズナホモログの解析(3). 東北植物学会第 5 回大会, 2015.12.19-20. 福島大学(福島市)

相田治寿・笹部美知子: トマトにおけるキネシン様タンパク質 SINACK1 の単離と機能解析. 東北植物学会第 5 回大会, 2015.12.19-20. 福島大学(福島市)

森岡祉門・西田結花・桧垣巧・安原裕紀・植村知博・馳澤盛一郎・上田貴志・町田泰則・笹部美知子: M 期キネシン NACK1 の細胞板形成における機能解明. 東北植物学会第 5 回大会, 2015.12.19-20. 福島大学(福島市)

増子雄貴・笹部美知子: 植物における新奇 M 期キナーゼの探索. 東北植物学会第 5 回大会, 2015.12.19-20. 福島大学(福島市)

樋口奈々美・伊藤千尋・笹部美知子: 植物細胞における分裂軸決定機構の解析. 東北植物学会第 5 回大会, 2015.12.19-20. 福島大学(福島市)

笹部美知子, 桧垣匠, 栗原大輔, 東山哲也, 馳澤盛一郎, 町田泰則: 植物の細胞板形成を支える M 期キネシン NACK1 と MAPK カスケード. 第 24 回 日本バイオイメージング学会, 2015.9.27-28. 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都, 葛飾区)

笹部美知子, 桧垣巧, 西田結花, 石橋奈々子, 栗原大輔, 東山哲也, 西浜竜一, 伊藤正樹, 馳澤盛一郎, 町田泰則: M 期特異的キネシン NACK1 の C 末端領域は細胞板形成部位への局在に必要である. 日本植物学会第 79 回大会, 2015.9.6-8. 朱鷺メッセ: 新潟コンベンションセンター(新潟市)

笹部美知子, 桧垣匠, 大和田理恵, 相田治寿, 西田結花, 馳澤盛一郎, 町田泰則: 植物の細胞板形成を支える分子メカニズム. 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015.3.16-18. 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都, 世田谷区)

笹部美知子, 石橋奈々子, 春田剛, 南明

希, 栗原大輔, 東山哲也, 西浜竜一, 伊藤正樹, 町田泰則: シロイヌナズナ AtNACK1/HINKEL キネシンの C 末端領域は細胞板形成領域への局在に必要である. 東北植物学会第 4 回大会, 2014.12.13-14, 山形大学理学部(山形市)

伊藤千尋, 笹部美知子: 植物細胞における細胞極性及び分裂方向の決定に関わる分子メカニズム解明のための基礎的研究. 東北植物学会第 4 回大会, 2014.12.13-14, 山形大学理学部(山形市)

中田美果子, 大和田理恵, 中野理恵, 町田泰則, 笹部美知子: 植物の細胞分裂を制御するキネシンと相互作用する新規プロテインホスファターゼのシロイヌナズナホモログの解析(2). 東北植物学会第 4 回大会, 2014.12.13-14, 山形大学理学部(山形市)

西田結花, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, 町田泰則, 笹部美知子: 細胞板形成の鍵因子である NACK1 キネシン及び NPK1 MAPKKK の細胞板形成部位への特異的局在機構の解析. 東北植物学会第 4 回大会, 2014.12.13-14, 山形大学理学部(山形市)

大和田理恵, 中野理恵, 南明希, 町田泰則, 笹部美知子: シロイヌナズナの側根原基で発現するプロテインホスファターゼの機能解析. 日本植物学会第 78 回大会, 2014.9.12-14, 明治大学生田キャンパス(川崎市)

[図書](計 1 件)

Sasabe, M. and Machida, Y. (2014) Signaling pathway that controls plant cytokinesis. in Signalling Pathways in Plants: ed. by Yasunori Machida, Chentao Lin & Fuyuhiko Tamanoi, *THE ENZYMES*, vol. 35, Burlington: Academic Press, pp. 145-165.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801922-1.0006-3>

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹部 美知子 (SASABE, Michiko)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号: 00454380

(2)研究協力者

大和田 理恵 (OWADA, Rie)
相田 治寿 (SOTA, Harutoshi)
増子 雄貴 (MASUKO, Yuki)