

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370026

研究課題名(和文) 翻訳後修飾による植物メリステムの細胞増殖制御

研究課題名(英文) Post-translational modification in plant meristem

研究代表者

杉本 慶子 (Sugimoto, Keiko)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：30455349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物が継続的に器官成長を行うためには、細胞の増殖と分化のバランスが協調的に制御され、維持される必要がある。植物のメリステムでは、幹細胞が未分化性を維持しながら増殖を繰り返す一方で、一部の娘細胞が核内倍加を伴う細胞分化を開始するが、これらの過程を制御する分子メカニズムには未解明の点が多い。私たちはシロイヌナズナのHIGH PLOIDY1, 2 (HPY1, HPY2)の解析を通して、メリステム細胞が高い増殖能を維持するための分子メカニズムの解明を進めた。

研究成果の概要(英文)：Balanced progression of cell proliferation and differentiation is a prerequisite for organ growth in multicellular organisms. In the plant meristem, some daughter cells that derive from self-renewing stem cells eventually commit to differentiate but how this transition is regulated is not well understood at the molecular level. In this study we investigated how HIGH PLOIDY1 (HPY1) and HPY2 mediate the transition from proliferation into differentiation in the Arabidopsis meristem.

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：細胞増殖 細胞分化 翻訳後修飾 SUMO化 植物メリステム シロイヌナズナ 細胞周期 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

動植物をはじめとする多細胞生物の器官成長は、細胞増殖による細胞数の増加と細胞分化による細胞体積の増大によってもたらされる。例えば植物のメリステムとよばれる組織では幹細胞が増殖を繰り返して新しい細胞を供給し続ける一方、一部の娘細胞が細胞成長を伴う分化を開始し、葉や根などの成長を実現している。シロイヌナズナをはじめとする多くの植物のメリステムでは、細胞が増殖過程から分化過程へ移行するのに伴って、DNA複製と細胞分裂を交互に行う細胞分裂周期から、細胞分裂を伴わずDNA複製のみを行う核内倍加周期へ転換する。いったん核内倍加周期に移行した細胞は核内のDNA量(核相, ploidy)を上昇させながら分化の道をたどり、通常再び細胞増殖を開始することはない。植物の器官形成の過程で、細胞分裂周期を停止し、核内倍加周期へ転換するタイミングを時空間的に正しく制御することが、細胞増殖と分化のバランスを正しく維持するための重要な鍵となると考えられるが、これらの分子メカニズムはまだよく分かっていなかった。

私たちは近年主に植物の細胞増殖、分化過程が発生シグナルによって制御されるしくみの解明を目指した研究を進めてきた。なかでも最近の研究からは、メリステムにおける細胞分裂周期から核内倍加周期への移行の制御に、植物ホルモンの一つであるオーキシンの濃度勾配が必要であることを明らかにした(Ishida et al. 2010)。さらに細胞分裂周期から核内倍加周期への移行を制御する新規因子を同定するための変異体スクリーニング系を構築し、これまでに4系統の突然変異体 *hpy1-4* を単離した。このうちSUMO (small ubiquitin-like modifier) E3 ligase をコードするHPY2に関する研究から、HPY2依存的なタンパク質のSUMO化翻訳後修飾が、オーキシシグナルの下流で細胞分裂周期を促進し、核内倍加周期への移行を抑制することを解明した(Ishida et al. 2009)。またHPY1についても原因遺伝子を同定し、HPY1が ubiquitin E3 ligase である APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) のサブユニットAPC8をコードしていることを発見した。*hpy1*, *hpy2*変異体では、メリステム細胞の増殖能が低下し、野生型よりも早く分化し始めるため、植物体は極度に矮小化する。これらの結果から、メリステムの細胞増殖と分化のバランス調節に、タンパク質のユビキチン化とSUMO化という二つの翻訳後修飾機構が機能することが示唆された。

2. 研究の目的

先行研究から、メリステムにおいて高い細胞増殖能を維持するためには、タンパク質のユビキチン化とSUMO化による翻訳後修飾機構が機能することが明らかになってきた。そこで本研究では、HPY1/APC8、HPY2の機能解析を進め、これらの翻訳後修飾機構によ

って細胞増殖から分化への移行が制御される分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

HPY1 についてはほとんど機能が未知であったため、植物体内での発現パターンや細胞内局在を解析するためのレポーター解析を行った。また過剰発現体、機能欠損体など、各種の変異体シリーズを作出し、機能解析を進めた。特にタンパク質の細胞内局在や変異体の表現型から、APC/Cの基質を推測し、同定を進めた。

HPY2については、*in vitro*でのSUMO化アッセイ法確立を優先した。また遺伝学的解析から、発生段階での機能の解明を進めた。

4. 研究成果

HPY1 遺伝子のプロモーター領域に *GUS* 遺伝子を連結し、発現領域を調べたところ、メリステム領域の分裂細胞で最も強く発現し、細胞分化が進行するにつれて発現量が減少することがわかった。この結果は、変異体の表現型とも一致することから、HPY1 遺伝子がメリステム領域において細胞増殖を維持することに必須であることが示された。遺伝学的解析からこうした発現勾配が根の発生のマスターレギュレーターである PLETHOLA 転写因子の制御下にあることが分かった。

HPY1 遺伝子のゲノム配列に *GFP* を挿入し、細胞内局在を観察したところ、HPY1 タンパク質はメリステム細胞中では主に細胞質に局在することがわかった。さらに驚いた事に、HPY1 タンパク質は、細胞が分化し始めるタイミングで核内に移行することも見いだされた。上記の *HPY1-GFP* コンストラクトにさらに核移行シグナル (NLS, nuclear localization signal), 核外移行シグナル (NES, nuclear export signal) を付与することでその生物学的意義を調べたところ、HPY1の核内への移行が細胞増殖から分化への転換のドライビングフォースになっていることが分かった。また *HPY1-GFP* 植物体の解析から、HPY1 自身が APC/C の基質であり、26プロテアソームによる分解を受ける事が判明した。

HPY1 過剰発現体、機能欠損体の解析を通して、当初単離した *hpy1* 変異体が機能獲得型の変異を持つ事も分かった。またこれらの変異体シリーズの解析を通し、HPY1 がメリステム領域で細胞増殖を促進するだけでなく、核内倍加の進行を通して細胞分化をも促進することを見いだした。またこのときの APC/C の基質のひとつが、CYCA2;3 であることを示した。これらの成果によって、分化細胞での APC/C の機能とその作用機構を初めて遺伝学的に証明する事が出来た (Komaki et al. to be submitted to *The Plant Cell*)。)

さらに予想外の発見として、HPY1 が細胞の増殖期、分化期を通して、細胞骨格のひとつである微小管に局在することが分かった。興

味深いことに、HPY1 は間期の表層微小管から、分裂期の preprophase band, spindle, phragmoplast と常に微小管と挙動を共にしていた。HPY1 が微小管付随タンパク質の安定性を制御し、その結果微小管自身のダイナミクスを調整するのではないかという仮説を検証したところ、実際 APC/C の基質となる微小管付随タンパク質を同定することが出来た(Komaki et al. to be submitted to Curr Biol)。

HPY2 についてはその構造から SUMO E3 ligase であることが示唆されていたが、in vitro アッセイによってその活性を証明した。HPY2 のターゲット因子を単離することで SUMO 化とメリステムの維持機構の関係を明らかにすることを目指し、植物からの最適な SUMO 化タンパク質の抽出方法を検討した。さらに得られたターゲットの SUMO 化状態を in vitro アッセイを用いて簡便に確認する方法を開発した。いくつかの候補タンパク質については、この新たに開発した方法を用いることで SUMO 化の有無を明らかにした。またこれまでに報告されているもうひとつの SUMO E3 ligase をコードする SIZ1 との機能冗長性について解析し、シロイヌナズナの発生段階においては、両者が独立の機能を持つ事を明らかにした(Ishida et al 2012)。

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)

Okushima Y, Shimizu K, Ishida T, Sugimoto K, Masaaki U. Differential regulation of B2-type CDK accumulation in Arabidopsis roots, *Plant Cell Rep*, 査読有、February, 2014, 10.1007/s00299-014-1581-z

Hisanaga T, Ferjani A, Horiguchi G, Ishikawa N, Fujikura U, Kubo M, Demra T, Fukuda H, Ishida T, Sugimoto K, Tsukaya H, The ATM-dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in the *fas1* mutation during Arabidopsis leaf development, *Plant Physiol*, 査読有、162、2013、831-841、10.1104/pp.113.216796

Noir S, Bomer M, Takahashi N, Ishida T, Tjir-Li T, Balibi V, Shanahan H, Sugimoto K, Devoto A, Methyl-jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode, *Plant Physiol*, 査読有、161、2013、1930-1951、10.1104/pp.113.214908

Breuer C, Morohashi K, Kawamura A, Takahashi N, Ishida T, Umeda M,

Grotewold E, Sugimoto K, Transcriptional repression of the APC/C activator CCS52A1 promotes the active termination of cell growth, *EMBO J*, 査読有、31(24), 2012, 4488-501, 10.1038/emboj.2012.294

Schneider K, Breuer C, Kawamura A, Jikumaru Y, Hanada A, Fujioka S, Ichikawa T, Kondou Y, Matsui M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sugimoto K, Arabidopsis PIZZA has the capacity to acylate brassinosteroids. *PLoS ONE*, 査読有、7(10), 2012, e46805, 10.1371/journal.pone.0046805

Ishida T, Yoshimura M, Miura K, Sugimoto K, MMS21/HPY2 and SIZ1, two Arabidopsis SUMO E3 ligases, have distinct functions in development, *PLoS ONE*, 査読有、7(10), 2012, e46897, 10.1371/journal.pone.0046897

Rymen B, Sugimoto K, Tuning growth to the environmental demands, *Curr Opin in Plant Biol*, 査読有、15(6), 2012, 683-690, 10.1016/j.pbi.2012.07.005

Komaki S, Sugimoto K, Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant Cell Physiol*, 査読有、53(6), 2012, 953-964, 10.1093/pcp/pcs070

石田喬志、杉本慶子、植物における SUMO システムと E3 リガーゼの機能、*生化学*、査読有、84(6), 2012, 440-447, <http://ci.nii.ac.jp/naid/10030809429>
小牧伸一郎、杉本慶子、細胞増殖から見た個体サイズの制御機構、*植調*、査読無、45(9), 2011, 363-372, DOI、URL 無

[学会発表](計 10 件)

Sugimoto K, Endocycling up the path of plant development, University of California Davis, 2013/10/30, UC Davis, USA

Sugimoto K, Endocycling up the path of plant development, North Carolina State University, 2013/10/28, NCSU, USA

Rymen B, Transcriptional control of cell differentiation in optimizing plant growth, 第 55 回日本植物生理学会年会、2014/03/19, 富山大学、富山県
鈴木俊哉、細胞周期の制御に關与する GRAS ファミリー転写因子、第 55 回日本植物生理学会年会、2014/03/18, 富山大学、富山県

Komaki S, The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Regulates Microtubule Structures through the Cell Cycle, 第 55 回日本植物生理学会年

会、2014/3/18,富山大学、富山県
Komaki S, HPY1 is required for both mitotic cycle and endocycle regulation in Arabidopsis, ICAR2012, 2012/07/03, Vienna, Austria
Hisanaga T, The ATM-Dependent DNA Damage Response Acts as an Upstream Trigger for Compensation in the fas1 Mutation during Arabidopsis Leaf Development, ICAR2012, 2012/07/03, Vienna, Austria
小牧伸一郎、Activity of the anaphase-promoting complex/cyclosome is required for the cell cycle transition and the endocycle progression,第54回日本植物生理学会年会、2013/03/21、岡山大学、岡山県
小牧伸一郎、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、第53回日本植物生理学会年会、2012/3/17、京都府京都市
Komaki S, Controlling the transition from cell proliferation to cell differentiation, ICAR2011, 2011/12/08, 倉敷市、岡山県

〔その他〕

ホームページ等

<http://cellfunction.riken.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 慶子 (Sugimoto, Keiko)
理化学研究所 環境資源科学研究センター
チームリーダー
研究者番号：30455349

(2)連携研究者

石田 喬志 (Ishida Takashi)
熊本大学 特任助教
研究者番号：50584588

小牧 伸一郎 (Komaki Shinichiro)
理化学研究所 環境資源科学研究センター
特別研究員
研究者番号：50584588