

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14603

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24114004

研究課題名(和文)細胞外刺激に応答する細胞骨格の再編成

研究課題名(英文)Reorganization of cytoskeleton in response to extracellular stimuli

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80180826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 56,800,000円

研究成果の概要(和文)：PHS1は チューブリンのThr349をリン酸化し、リン酸化されたチューブリンは微小管ポリマーに重合できないことを明らかにした。また、細胞内ではPHS1のフォスファターゼ・ドメインはキナーゼ・ドメインの活性を抑制しているが、環境ストレス(特に高浸透圧)によりこの抑制が解除され、キナーゼが活性化されることを見出した。ゼニゴケやクラミドモナスもPHS1を持ち、塩や高浸透圧のストレスによりチューブリンリン酸化活性が活性化された。組換えPHS1タンパク質を用いた実験により、PHS1は基本的なリン酸化活性を持ち、その活性がPHS1のMPKフォスファターゼにより直接抑制されていることが判明した。

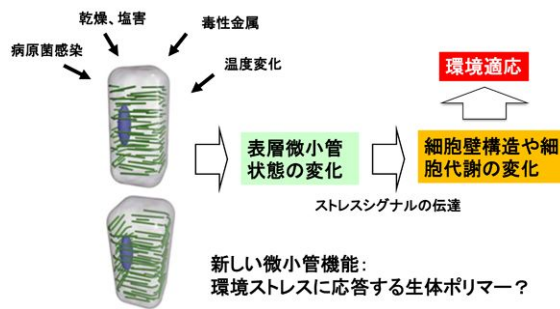
研究成果の概要(英文)：PHS1 was shown to phosphorylate Thr349 of alpha-tubulin, and the phosphorylated tubulin does not polymerize to microtubule polymer. In plant cells, the phosphatase domain suppresses the kinase domain of PHS1. In response to environmental stress (especially hyperosmotic stress), this suppression is cancelled and the kinase is activated. Liverwort and Chlamydomonas possess PHS1, which is activated by salt and hyperosmotic stresses. In vitro experiments with recombinant proteins show that PHS1 has basal kinase activity, which is directly inactivated by the MPK phosphatase activity within PHS1.

研究分野：植物分子細胞生物学

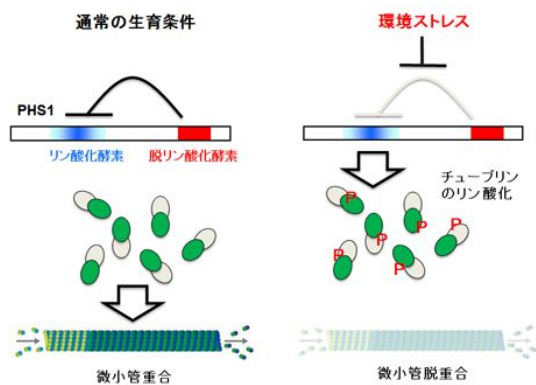
キーワード：微小管 環境ストレス チューブリン リン酸化 植物

1. 研究開始当初の背景

植物細胞膜内側に張り付く細胞骨格である表層微小管はセルロース合成酵素複合体が細胞膜中を移動する際のレールとして働くことばかりでなく、セルロース合成酵素複合体がゴルジ体から細胞膜に移動するのを制御することにより、細胞壁の主要ポリマーであるセルロース微繊維の合成効率や存在様式をコントロールする。また、表層微小管は高浸透圧や塩ストレスなどの外界刺激により迅速に脱重合や再編成することにより、細胞レベルの環境適応能力を高めていると考えられる。細胞壁機能の制御因子である表層微小管の外界刺激に応答したダイナミクスの分子機構は不明であった。



研究代表者はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の微小管関連変異株の分子遺伝学・細胞生物学解析, および微小管標識系統のライブセル・イメージング解析により、表層微小管の形成機構や制御因子を明らかにしてきた。特に、微小管再編成に関わるリン酸化シグナル伝達系因子 PHS1 を遺伝学的・生化学的に同定した。



微小管再編成に関わるリン酸化シグナル伝達系因子 Propyzamide Hypersensitive 1 (PHS1) は元々表層微小管を不安定化する MAP キナーゼ・フォスファターゼの機能獲得型変異として発見されたが、その後の我々の研究により非典型的なキナーゼ・ドメインも併せ持ち、このキナーゼ活性によりチュープリンをリン酸化することが判明した。また、細胞内では PHS1 のフォスファターゼ・ドメインはキナーゼ・ドメインの活性を抑制している。

2. 研究の目的

浸透圧や塩ストレスなどの細胞外刺激に応答した微小管パターン再編に關与するタンパク質リン酸化シグナル制御機構並びに生理的機能を PHS1 に焦点を当てて解明する。

3. 研究の方法

(1) PHS1 がリン酸化する標的タンパク質の同定

in vitro で PHS1 によりリン酸化された精製チュープリンをリン酸化質量分析にかけることにより、PHS1 の標的タンパク質とリン酸化アミノ酸残基を同定する。さらに、植物体 (in vivo) においても、in vitro 解析により同定したアミノ酸残基が PHS1 によりリン酸化されることを証明する。また、リン酸化されたチュープリンの重合特性を in vitro の実験系で解析することにより、PHS1 によるリン酸化が微小管細胞骨格の再編に及ぼす影響を推定する。

(2) PHS1 を活性化する環境刺激

全長 PHS1 は植物体では通常不活性化状態で存在するが、どのような生育環境状況で PHS1 が活性化するかは不明であった。PHS1 が浸透圧や塩などのストレス環境条件下で活性化し、チュープリンがリン酸化されるかどうかを調べる。さらに、PHS1 を活性化するのに關与する、環境ストレス・センサーや下流のシグナル伝達経路を解明する。

(3) PHS1 を活性化する分子機構

全長 PHS1 は通常的环境状況では、C 末端のフォスファターゼ・ドメインの脱リン酸化活性の働きにより不活性化されているが、上記の環境ストレスにより活性化される。しかし、この活性化 (脱不活性化) の分子機構はまったく判っていない。PHS1 のフォスファターゼ・ドメインは MAP キナーゼ・フォスファターゼに分類されることなどから、PHS1 の活性化/不活性化機構には MAP キナーゼが関与することが推定される。PHS1 との相互作用が報告されている D ファミリーの複数の MAP キナーゼの多重変異株におけるストレス応答性チュープリンリン酸化とその際の PHS1 の関与を調べる。シロイヌナズナには機能重複する複数の MAP キナーゼが存在することから、MAP キナーゼ遺伝子を 3 つしか持たないゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) を利用した解析も行う。

高浸透圧ストレスにより PHS1 自体がリン酸化されるらしいことが、予備実験によりわかった。PHS1 が活性化される条件で特異的にリン酸化される PHS1 のアミノ酸残基を同定する。このリン酸化されるアミノ酸残基を非リン酸化アミノ酸やリン酸化ミミックアミノ酸に変異させたときの PHS1 の植物体における機能を調べる。

さらに、精製タンパク質を用いた in vitro 再構築系により PHS1 の活性制御を再現する。

(4) 藻類における PHS1 の機能

PHS1 遺伝子は緑藻類よりも新しい植物系統

に存在する。モデル緑藻であるクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の微小管がどのような環境ストレスにより脱重合するのか、またこの現象に PHS1 が関与しているのかを調べる。

4. 研究成果

(1) PHS1 がリン酸化する標的タンパク質の同定

・ PHS1 は チューブリンヘテロ二量体を認識し、チューブリンのトレオニン (Thr) 349 残基を特異的にリン酸化する。多様な生物種の チューブリン間で保存されているこのアミノ酸残基はチューブリン二量体が縦につながる際にその境界面に位置しており、チューブリンが微小管に重合する際に重要な相互作用をする。

・ T349 リン酸化チューブリンは *in vitro* および *in vivo* において微小管にほとんど重合しないことが判明した。その結果、チューブリンリン酸化により微小管ポリマーが速やかに脱重合する。

(2) PHS1 を活性化する環境刺激

・ シロイヌナズナおよびゼニゴケでは高浸透圧ストレスにより PHS1 が活性化され、細胞内微小管が脱重合する。この反応はストレス処理後 10 分以内に起こり、1, 2 時間後がマックスで、その後数時間で非ストレス条件下と同様の低リン酸化状態に戻る一過的なストレス応答反応である。

・ シロイヌナズナでは、高浸透圧が一番効果的な反応誘導ストレスであるが、高濃度の塩によってもある程度のチューブリンリン酸化が引き起こされる。

・ シロイヌナズナ PHS1 欠損変異株は通常栽培条件および恒常的高浸透圧ストレス条件において、野生株と大きな生育の違いは見られない。

・ 酵母 MAP キナーゼの一過的活性化は、周期的なストレス処理により高活性化状態に維持できる。同様の周期的ストレス条件をシロイヌナズナにおいても検討中であるが、まだ最適条件を特定できていない。概日周期による乾燥ストレスが今後の検討課題である。

・ ゼニゴケの PHS1 ヌル変異株では、高浸透圧ストレスによる生育障害がかかりにくいという予備実験結果が得られているが、相補試験などにより確認する必要がある。

(3) PHS1 を活性化する分子機構

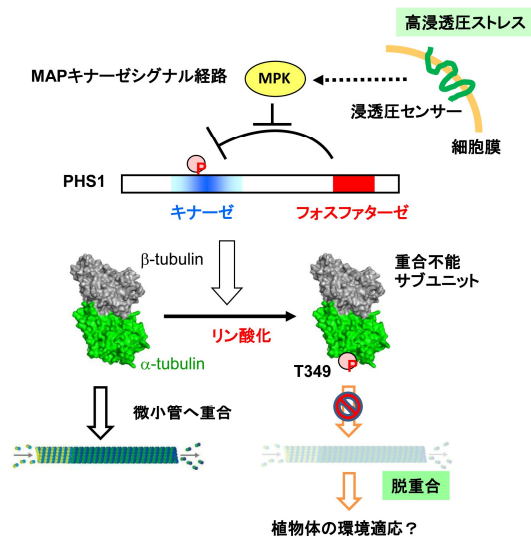
・ PHS1 は MPK18 と相互作用することが報告されている (Plant J. 2009) ため、*mpk18* ヌル変異株および相同性の高い MPK19 との *pmk18mpk19* 二重ヌル変異株における高浸透圧誘導的 チューブリンのリン酸化を調べたところ、野生株と比較して変化は見られなかった。また、この論文で報告されている酵母 2 ハイブリッド法による PHS1 と MPK18 の相互作用は再現されなかった。

・ ゼニゴケの 3 つの MAP キナーゼ遺伝子の内、MPK2 と MPK3 のヌル変異株を作製し、

PHS1 依存的ストレス誘導性チューブリンリン酸化反応を調べたところ、野生株と比較して変化は見られなかった。残りの MPK1 (アラビドプシスの A/B タイプに相当) のヌル変異株は致死であるため、条件的ノックアウト系統を作製中である (京大、河内研との共同研究)。

・ 組換え PHS1 は野生型で弱いチューブリンリン酸化活性を持ち、フォスファターゼ不活性化変異株は強いリン酸化活性を示した。また、フォスファターゼ活性阻害剤により野生型 PHS1 のリン酸化活性が増大した。PHS1 フォスファターゼはリン酸化されたチューブリンを脱リン酸化しなかった。さらに、PHS1 はそのリン酸化活性に対応した自己リン酸化状態を示した。

・ 以上の実験結果より、PHS1 フォスファターゼはリン酸化活性発現に重要なキナーゼ領域のリン酸基を脱リン酸化することにより、チューブリンリン酸化活性を抑制していると推定した。上流 MAP キナーゼはこのフォスファターゼによる抑制を解除 (脱抑制) することにより、チューブリンリン酸化活性を誘導するモデルを構築した。



(4) 藻類における PHS1 の機能

・ クラミドモナスでは、高浸透圧よりも中程度濃度の塩 (0.1-0.2M NaCl) によりチューブリンのリン酸化が顕著に誘導された。また、反応は浸透圧剤や塩の中間濃度のみで起こり、高濃度では反応が起こらなかった。PHS1 ヌル変異株ではこの反応が消滅したことから、PHS1 依存的塩誘導性チューブリンリン酸化反応である (京大、福澤研との共同研究)。

・ クラミドモナスは淡水性藻類であるが、海洋性藻類の *Ostreococcus lucimarinus* ゲノムには PHS1 遺伝子は存在しなかった。藻類の生育環境と PHS1 機能との関係について、さらなる研究が必要である。

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 14 件)

- (1) J.H. Wong, and T. Hashimoto (2017) Novel Arabidopsis microtubule-associated proteins track growing microtubule ends. *BMC Plant Biol.* 17: 33. doi: 10.1186/s12870-017-0987-5
- (2) M. Murakami, K. Soga, T. Kotake, T. Kato, T. Hashimoto, K. Wakabayashi, and T. Hoson (2016) Roles of MAP65-1 and BPP1 in gravity resistance of Arabidopsis hypocotyls. *Biol. Sci. Space* 30: 1-7. doi: 10.2187/bss.30.1
- (3) T. Hotta, S. Fujita, S. Uchimura, M. Noguchi, T. Demura, E. Muto, and T. Hashimoto (2016) Affinity purification and characterization of functional tubulin from cell suspension cultures of Arabidopsis and tobacco. *Plant Physiol.* 170: 1189-1205. doi: 10.1104/pp.15.001173
- (4) S. Takatani, T. Hirayama, T. Hashimoto, T. Takahashi, and H. Motose (2015) Abscisic acid induces ectopic outgrowth in epidermal cells through cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 5: 11364. doi: 10.1038/strep11364
- (5) T. Hashimoto (2015) Microtubules in Plants. *The Arabidopsis Book* 13: e0179. doi: 10.1199/tab.0179
- (6) A. Walia, M. Nakamura, V. Kirk, D. Moss, T. Hashimoto, and D. Ehrhardt (2014) GCP-WD mediates γ -TuRC recruitment and the geometry of microtubule nucleation in theacentrosomal interphase arrays of Arabidopsis. *Curr. Biol.* 24: 2548-2555. doi: 10.1016/j.cub.2014.09.013.
- (7) T. Hotta, and T. Hashimoto (2014) Microtubule nucleation in plants. In: *The Plant Sciences: Cell Biology*, Ed. B. Liu, Springer, New York, pp. 1-11. doi: 10.1007/978-1-4614-7881-2_16-1
- (8) T. Hamada, N. Nagasaki-Takeuchi, T. Kato, M. Fujiwara, S. Sonobe, Y. Fukao, and T. Hashimoto (2013) Purification and characterization of novel microtubule-associated proteins from Arabidopsis cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 163: 1804-1816. doi: 10.1104/pp.113.225607
- (9) S. Fujita, J. Pytela, T. Hotta, T. Kato, T. Hamada, R. Akamatsu, Y. Ishida, N. Kutsuna, S. Hasezawa, Y. Nomura, H. Nakagami, and T. Hashimoto (2013) An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 23: 1969-1978. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.006
- (10) T. Hashimoto (2013) A ring for all: γ -tubulin-containing nucleation complexes inacentrosomal plant microtubule arrays. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 : 698-703. doi: 10.1016/j.pbi.2013.09.002.

- (11) Y. Ban, Y. Kobayashi, T. Hara, T. Hamada, T. Hashimoto, S. Takeda, and T. Hattori (2013) Alpha-tubulin is rapidly phosphorylated in response to hyperosmotic stress in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 54: 848-858. doi: 10.1093/pcp/pct065
- (12) T. Hashimoto (2013) Dissecting the cellular functions of plant microtubules using mutant tubulins. *Cytoskeleton* 70: 191-200. doi: 10.1002/cm.21099
- (13) M. Nakamura, N. Yagi, T. Kato, S. Fujita, N. Kawashima, D.W. Ehrhardt, and T. Hashimoto (2012) Arabidopsis GCP3-INTERACTING PROTEIN 1/MOZART1 is an integral component of the γ -tubulin-containing microtubule nucleating complex. *Plant J.* 71: 216-225. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04988.x.
- (14) T. Hamada, M. Tominaga, T. Fukaya, M. Nakamura, A. Nakano, Y. Watanabe, T. Hashimoto, and T. Baskin (2012) RNA processing bodies, peroxisomes, Golgi bodies, mitochondria, and ER tubule junctions frequently pause at cortical microtubules. *Plant Cell Physiol.* 53: 699-708. doi: 10.1093/pcp/pcs025.

〔学会発表〕(計 26 件)

橋本隆、Rapid and reversible tubulin phosphorylation regulates plant microtubule stability upon hyperosmotic stress、MBL Workshop: Microtubules、2017/5/29 ~ 6/1、EMBL Conference Center, Heidelberg (Germany)

加藤壮英、微小管結合タンパク質 BPP ファミリーは葉表皮細胞の形態形成に關与する、第 58 回日本植物生理学会年会、2017/3/16、鹿児島大学、鹿児島県鹿児島市

Duncan Coleman、In-vitro Functional Analysis of Arabidopsis Tubulin Kinase PHS1、第 58 回日本植物生理学会年会、2017/3/16、鹿児島大学、鹿児島県鹿児島市

Lee Mei Ng、PHS1 tubulin kinase is transiently activated by salt and hyperosmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* and *Chlamydomonas reinhardtii*、第 58 回日本植物生理学会年会、2017/3/16、鹿児島大学、鹿児島県鹿児島市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/hashimoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 隆 (HASHIMOTO, Takashi)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・教授
研究者番号：80180826

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

加藤 壮英 (KATO, Takehide)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・助教
研究者番号：70379535

(4) 研究協力者

なし