

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19870024
 研究課題名(和文) MAPキナーゼカスケードによる植物の細胞板形成の制御機構の解析
 研究課題名(英文) The regulatory mechanisms of a MAP kinase cascade involved in plant cytokinesis
 研究代表者
 笹部 美知子(SASABE MICHIKO)
 名古屋大学・大学院理学研究科・特任助教
 研究者番号：00454380

研究成果の概要：植物細胞に特異的な器官である細胞板(細胞壁)形成の分子機構を明らかにするために、細胞板形成に関与する新規分子の同定、機能解析を行った。植物の細胞板形成には、細胞質分裂時に特異的に活性化されるMAPキナーゼカスケードが必要である。本研究により、このカスケードの活性化が上流でサイクリン依存性キナーゼ(CDK)により負に制御されている可能性が示された。また、いくつかの新奇な下流因子の候補を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物生理・分子

キーワード：植物、細胞分裂、細胞質分裂、細胞板、フラグモプラスト、MAPキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

植物細胞の分裂の制御機構を理解することは、植物体の成長や分化の仕組みを知る上で非常に重要である。真核生物では、サイクリンとCDK(サイクリン依存性キナーゼ)の複合体が、細胞周期の進行において中心的な役割を果たしていることが明らかになっている。しかし、植物細胞は他の細胞では見られない幾つの特徴があり、それにともなった植物に特異的な細胞分裂機構が存在することが知られている。そのうちの 하나가、細胞質分裂(細胞分裂の最終段階である細胞板形成)である。

近年、国内外でモデル植物、シロイヌナズナの大規模な変異体のスクリーニングが行われ、細胞質分裂異常を示す変異体が多数単離された結果、細胞板形成に関与する分子がいくつか報告されている。しかし、その制御機構や分子機能については不明な点が多い。また、一方で細胞質分裂の開始メカニズムについては、現在のところ全く分かっていない。

近年、植物の細胞質分裂が植物特異的なMAPキナーゼカスケードに制御されていることが明らかとなった(Nishihama et al. 2001, 2002, Soyano et al. 2003, Tanaka et al. 2004)。また、このカスケードの下流では、微小管結合

タンパク質である MAP65 が MAP キナーゼによるリン酸化のターゲットとなっており、そのリン酸化が、本タンパク質の活性を制御することにより細胞質分裂の進行を制御していることも明らかとなってきた (Sasabe et al. 2006)。我々は、この研究過程において、MAP65 以外にもこの MAP キナーゼによりリン酸化されるタンパク質を複数見いだしている (町田、笹部未発表)。このことは、このカスケードが細胞質分裂の複雑な過程をいくつかの複数の下流因子を介して制御している可能性を示唆していると言えるであろう。そこで本研究では、これまでの研究成果を踏まえ、植物の細胞質分裂に関わる MAP キナーゼカスケードの下流の新規制御因子を同定・単離し、細胞板形成を制御する分子機構の全体像を解明することを目指す。

また、植物の細胞周期の過程では動物で知られているような明確なチェックポイント機構が見つかっていない。そこで、植物の細胞質分裂を特異的に制御する MAP キナーゼカスケードの活性化機構を研究することにより、細胞質分裂の開始機構、言い換えると、細胞分裂後期から細胞板形成期への移行のメカニズムが明らかになる考え、本研究では、MAP キナーゼカスケードの活性化を制御する因子の同定と制御機構の解明を試みる。

引用文献

Nishihama et al. (2001) *Genes & Dev.* 15:352-363; Nishihama et al. (2002) *Cell* 109:87-99; Soyano et al. (2003) *Genes & Dev.* 17:1055-1067; Tanaka et al. (2004) *Genes Cells.* 9:1199-1211; Sasabe et al. (2006) *Genes & Dev.* 20:1004-1014

2. 研究の目的

本研究の目的は、タバコとシロイヌナズナを用いて植物細胞に特異的な器官である細胞板 (細胞壁) の形成を制御する分子機構を明らかにすることである。細胞板は細胞分裂の最終過程である細胞質分裂の過程で形成されるが、細胞板 (細胞壁) は骨格系をもたない植物において個体を維持する上で非常に重要な役割を果たす。また、細胞分化においても、時間空間的に正確な細胞板の形成は不可欠である。従って、細胞板形成 (細胞質分裂) の仕組みを明らかにすることは、独自の進化をとげた植物の分化や形態形成 (形づくり) の仕組みを知る上で学術的に非常に重要である。本研究では、これまでに植物において細胞質分裂の進行に必須であることが明らかとなっている MAP キナーゼカスケードの下流で働く新規制御因子及び、この MAP キナーゼカスケードを活性化する上流の制

御因子を明らかにし、細胞板形成を制御する分子機構の全体像を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞板形成に関与する MAP キナーゼカスケードの下流標的因子の同定

これまでに、この MAP キナーゼカスケードの下流で少なくとも3つの微小管結合タンパク質が関与している可能性を見だし、その1つについてはタンパク質を同定し機能を報告した (Sasabe et al., 2006, 町田、笹部未発表)。本研究では、残りの2つの下流因子の候補を同定し、生化学的、細胞生物学的手法を用いてその機能とリン酸化による制御機構を明らかにする。また、シロイヌナズナの対応する因子の変異体を解析することにより細胞板形成の形態形成における機能を明らかにする。また、シロイヌナズナのデータベースを用いた *in silico* 解析により、MAP キナーゼによってリン酸化される可能性のあるタンパク質を網羅的に検索し重要と思われる遺伝子の単離を行う。下流因子の候補として着目した因子については、*in vitro* のアッセイ系を用いて MAP キナーゼによるリン酸化の有無、細胞内局在を確認することにより、MAP キナーゼの標的因子であるかどうか、細胞板形成への関与の可能性を検討し、生化学的、細胞生物学、分子遺伝学的手法を用いて機能解析を行う。

(2) 細胞板形成に関与する MAP キナーゼカスケードの上流の制御因子の同定

細胞質分裂の進行を制御する MAP キナーゼカスケードの最上流因子である NPK1 MAP キナーゼ・キナーゼ・キナーゼは、NACK1 との結合を介してその活性と局在が制御されている (Nishihama et al. 2002)。一方で、予備的な実験から NPK1 は活性化前に高度にリン酸化されているが、脱リン酸化にもなって NPK1 の活性化が観察されることが分かってきた。このことから、このリン酸化は MAP キナーゼカスケードの活性化を制御していると考えられる。そこで、このリン酸化を実行しているタンパク質リン酸化酵素を生化学的に同定することを目指す。また、このリン酸化が NACK1 と NPK1 の分子間相互作用に与える影響を生化学的手法及び、細胞生物学的手法を用いて明らかにし、植物の細胞質分裂開始の分子メカニズムを明らかにする。

引用文献

Nishihama et al. (2002) *Cell* 109:87-99; Sasabe et al. (2006) *Genes & Dev.* 20:1004-1014

4. 研究成果

(1) 細胞板形成に関与する MAP キナーゼカスケードの下流標的因子の同定

MAP キナーゼカスケードの下流因子の候補として、複数の微小管結合タンパク質をタバコにおいて見いだしていたが、ゲノム配列の解析が進んでいないタバコではタンパク質同定にまで至らなかった。そこで、シロイヌナズナのデータベースを用いた *in silico* 解析を行った。*in silico* 解析では、生化学的に MAP キナーゼによりリン酸化されるタンパク質の分子量、MAP キナーゼリン酸化配列、微小管結合タンパク質、という3つのパラメータを用いた。この解析により、多くの生物で微小管脱重合活性を持つことが知られている Kinesin13 ファミリーと相同性を示すキネシン様タンパク質が下流因子の候補として見いだされた。Atkinesin13B と命名したこのタンパク質は、*in vitro* で MAP キナーゼによりリン酸化されることがわかり、主要なリン酸化サイトが一カ所であることが分かった。また、GFP 融合 AtKinesin13B は、細胞質分裂時に、染色体とともに、細胞板形成部位への局在が観察された。この細胞板形成部位への局在は、細胞質分裂を制御する MAP キナーゼカスケードの各構成因子に共通して観察される局在パターンである。このことから、このタンパク質が細胞板形成に関与している可能性が示唆された。現在、このタンパク質の細胞質分裂における分子機能を明らかにするために、リン酸化が微小管への結合や脱重合、重合に影響を及ぼすのか、また細胞内局在に関与しているのかどうかを解析中である。

(2) 細胞板形成に関与する MAP キナーゼカスケードの上流の制御因子の同定

細胞質分裂を制御する MAP キナーゼカスケードの最上流因子である NPK1 MAP キナーゼ・キナーゼ・キナーゼは、活性化前に高度にリン酸化されているが、そのリン酸化パターンは細胞周期の M 期を制御するサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の活性化パターンとよく似ていることが分かった。NPK1 と、その活性化因子である NACK1 について、CDK によるリン酸化の有無を *in vitro* の実験系を用いて調べたところ、両タンパク質は CDK によりリン酸化されることが示された。両タンパク質の CDK によるリン酸化サイトは、両タンパク質の結合部位の周辺にそれぞれ3つずつあることも明らかとなった。

NPK1 及び NACK1 の CDK リン酸化部位特異的な抗体を作製し、*in vivo* におけるリン酸化の実態を解析したところ、両タンパク質ともに、M 期の前半に蓄積しているタンパク質はリン酸化されているが、中期以降、NPK1 が活性化する時期にはリン酸化レベルは急

激に低下することが明らかとなった。さらに、CDK の活性が低下しない形質転換体を用いた解析により、このリン酸化は CDK の活性に依存していることを示した。また、CDK によるリン酸化は、*in vitro* で両タンパク質の直接結合を阻害した。NPK1 は NACK1 との直接結合により活性化されることから、CDK がリン酸化を介して両タンパク質の相互作用を制御することにより、MAP キナーゼカスケードの活性化を制御している可能性が示唆された。

CDK は細胞周期の進行をコントロールする主要な制御因子であるが、M 期中期以降に CDK が関わっているかどうかについては知見が少ない。今回、CDK が MAP キナーゼカスケードの上流の制御因子として機能することが示されたことにより、CDK が中期以降の進行を厳密に制御する機能も持つという可能性を提示した。

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4件)

① Krupnova T., Sasabe M., Ghebreghiorghis L., Gruber C.W., Hamada T., Dehmel V., Strompen G., Stierhof Y.D., Lukowitz W., Kemmerling B., Machida Y., Hashimoto T., Mayer U., Jürgens G. (2009) Microtubule-associated kinase-like protein RUNKEL needed for cell plate expansion in Arabidopsis cytokinesis. *Current Biology*, **19**: 518-523, 査読有り

② Tanaka, H., Watanabe, M., Sasabe, M., Hiroe, T., Tanaka, T., Tsukaya, H., Ikezaki, M., Machida, C., Machida, Y. (2007) Novel receptor-like kinase ALE2 controls shoot development by specifying epidermis in Arabidopsis. *Development*, **134**: 1643-1652, 査読有り

③ Kudo, C., Suzuki, T., Fukuoka, S., Asai, S., Suenaga, H., Sasabe, M., Takano, Y., Okuno, T., Toyoda, K., Shiraiishi, T., Ichinose, Y., Inagaki, Y. (2007) Suppression of Cdc27B expression induces plant defense responses. *Molecular Plant Pathology*, **8**: 365-373, 査読有り

④ Sasabe, M., Naito, K., Suenaga, H., Ikeda, T., Toyoda, K., Inagaki, Y., Shiraiishi, T., Ichinose, Y. (2007) Elicitor-responsive lectin-like receptor kinase in BY-2 cells. *DNA Sequence*, **18**: 152-159, 査読有り

[学会発表] (計5件)

① 笹部美知子、サイクリン依存性キナーゼは植物細胞質分裂を制御する MAP キナーゼカスケードの活性化を負に抑制する、第 50 回 日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21 日、名古屋 (名古屋大学)

② 笹部美知子、CDK は植物細胞質分裂の開始を制御する、第 31 回 日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 11 日、神戸 (神戸国際会議場他)

③ Sasabe M., CDKs trigger the Onset of a MAPK Cascade involved in Plant Cytokinesis., The 55th NIBB Conference / Arabidopsis Workshop 2008、2008 年 9 月 14 日、Okazaki, Aichi, Japan

④ 笹部美知子、サイクリン依存性キナーゼによる植物細胞質分裂の制御、第 49 回 日本植物生理学会年会、2008 年 3 月 22 日、札幌 (札幌コンベンションセンター)

⑤ 笹部美知子、CDK による MAP キナーゼ

カスケードの活性化と植物細胞質分裂の制御、第 30 回 日本分子生物学会年会、2007 年 12 月 14 日、横浜 (パシフィコ横浜)

〔図書〕 (計 2 件)

① Sasabe, M., Machida, Y. (2008) Signaling by protein phosphorylation in cell division. in *Annual Plant Reviews*, **33**: 336-361

② Sasabe, M., Machida, Y. (2007) MAP kinase signaling during M phase progression. in *Plant Cell Monographs*, **9**: 233-250

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹部 美知子 (SASABE MICHIKO)

名古屋大学・大学院理学研究科・特任助教
研究者番号：00454380