

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06058・19K21183

研究課題名（和文）陸上植物全般に存在する分裂面制御の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of division plane control in land plants

研究代表者

幸節 健（Kosetsu, Ken）

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・NIBBリサーチフェロー

研究者番号：20821482

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：動物、植物ともに細胞がどの方向に分裂するかは、正常な発生に大きな影響を与える。植物においては、動物とは異なる細胞分裂面を決定するメカニズムがあると考えられている。本研究では、特定の脂質と細胞骨格、細胞分裂に必要なリン酸化酵素に着目して研究を行った。生化学的解析および遺伝学的解析によって、新たに細胞分裂面に異常を示す遺伝子を同定した。この遺伝子がコードするタンパク質は、リン酸化酵素と、脱リン酸化酵素と結合することが明らかになった。この結果は、同定した新規遺伝子がリン酸化酵素、脱リン酸化酵素の活性のバランスの調整をすることを通して、細胞分裂面を決定していることを示唆しているかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動植物の発生過程において、細胞分裂面の制御は器官形成に必須である。動物において、紡錘体軸を制御するタンパク質が複数同定されており、これらのタンパク質が星状体微小管に結合することで、紡錘体軸が制御され細胞分裂方向が決定される。一方、陸上植物においては、星状体微小管が観察されないこと、動物の紡錘体軸を制御する遺伝子が保存されていないことから、動物とは異なる細胞分裂面制御機構が存在すると考えられる。本研究において、基部陸上植物であるヒメツリガネゴケを用いて、細胞分裂面制御に必要な遺伝子を同定できた。この結果は、陸上植物全般に保存される細胞分裂面制御機構の一端を明らかにできる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：In animals and plants, the control of the division plane is essential for the normal development. In plants, it has been considered that they have a unique mechanism controlling the division plane compared to that of animals. In this research, I focused on the relationship between specific lipids and cytoskeleton, and Aurora kinase which is required for the cell division. From biochemical and genetical analysis, a novel protein, which is required for the cell division plane determination, was identified. And this protein can bind both Aurora kinase and PP2A phosphatase. These results might indicate that the novel protein determines the cell division plane by controlling the activity between Aurora kinase and PP2A phosphatase.

研究分野：植物発生学

キーワード：植物発生学 細胞分裂面制御 フラグモプラスト

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

動植物の発生過程において、細胞分裂面の制御は器官形成に必須である。動物において、紡錘体軸を制御する因子が同定されており（Par complex、Insc、LGN、NuMA、Dynein/Dynactin など）、これらの紡錘体軸制御因子が星状体微小管と結合することで、紡錘体軸が制御され細胞分裂方向が決定される（Williams and Fuchs, 2013, Curr. Opin. Cell Biol.）。一方、陸上植物においては星状体微小管が観察されないこと、動物の紡錘体軸を制御する遺伝子がコードされていないことから、動物とは異なる細胞分裂面制御機構が存在すると考えられる（De Smet and Beeckman, 2010, Nat. Rev. Mol. Cell Biol.）。

シロイヌナズナ等を用いた研究から、プレプロフェーズバンド（PreProphase Band, PPB）が細胞分裂面の決定に必要であることが示されてきた。PPB は細胞周期 G2 期に、細胞表層に形成される主に微小管からなるリング状の構造で、細胞周期前期において消失する。PPB が形成された向きとは垂直に紡錘体が形成され、細胞質分裂時には主に微小管から構成されるフラグモプラストと呼ばれる細胞質分裂装置が形成され、その内側で細胞板が形成される。このフラグモプラストが PPB が形成されていた場所に向かい拡大し、細胞が二分される。これらのことから PPB が最終的な細胞分裂面を G2 期に決定していると考えられていた（図 1）。しかし、近年、シロイヌナズナにおいて PPB 形成のみを欠損する変異体が同定され、変異体において細胞分裂面に異常は観察されないことが報告された（Schaefer et al., 2017, Science）。このことは PPB 非依存的に、紡錘体の方向を適切に決め、フラグモプラストを親細胞壁にガイダンスする未知のメカニズムが細胞分裂面を規定していることを示唆している（図 2）。

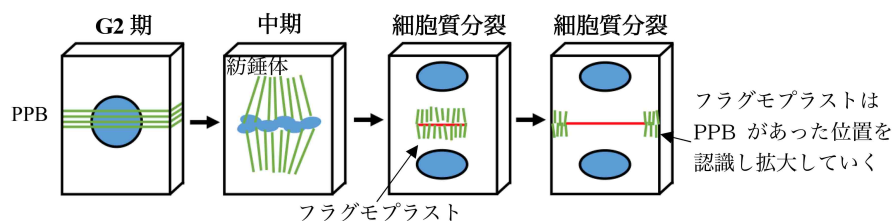


図 1 PPB 依存的な分裂軸の制御

細胞分裂 G2 期から M 期前期に細胞表層に PPB が形成される。紡錘体は PPB の向きとは垂直方向に形成され、細胞質分裂装置であるフラグモプラストは PPB があった位置に拡大して、細胞が二分される。

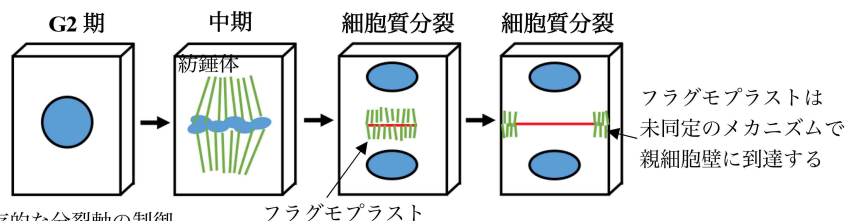


図 2 PPB 非依存的な分裂軸の制御

紡錘体の方向を適切に決め、フラグモプラストを親細胞壁にガイダンスする未知のメカニズムが細胞分裂面を決定することを示唆している

細胞分裂面の制御は、細胞骨格である微小管、アクチンが関与する。微小管、アクチンのダイナミクスは微小管関連因子、アクチン結合タンパク質により制御される。シロイヌナズナの微小管結合タンパク質である MAP65-1は、ホスファチジン酸と結合すること、ホスファチジン酸はアクチンフィラメントの動態に影響を与えること、アクチン結合タンパク質は特定のリン脂質と相互作用することが報告されている。このことは、特定の脂質が細胞分裂面制御に影響を与える可能性を示唆している。また、シロイヌナズナにおいて、誘導型 RNAiを用いた Auroraキナーゼのノックダウン株では、細胞の分裂方向に異常を示す。Auroraキナーゼは、細胞分裂期の紡錘体の全体、フラグモプラスト微小管の赤道面に局在することから、Auroraキナーゼが細胞骨格である微小管の動態を介して、細胞分裂面制御に機能していることを示唆している。

2. 研究の目的

細胞分裂の研究はシロイヌナズナを用いて活発に行われているが、細胞分裂時に PPB が形成されるため、PPB 非依存的に分裂面が決定されるメカニズムを研究するには適していない。本研究は、ヒメツリガネゴケを用いて細胞分裂面の制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケの原系体、および初期茎葉体は PPB 非依存的に細胞分裂面が決定される。細胞分裂面の制御機構を明らかにするために、原系体及び初期茎葉体において (1) 脂質と、細胞骨格を制御するアクチン結合タンパク質、微小管関連因子のライブセルイメージング、(2) 真核生物に広く保存される細胞分裂に必須な Aurora キナーゼに着目した研究を行った。

4. 研究成果

(1) 脂質に脂質と、細胞骨格を制御するアクチン結合タンパク質、微小管関連因子のライブセルイメージング

脂質である PI(4)P、PI(4,5)P₂、ホスファチジン酸を可視化する形質転換体を作製し、それぞれの細胞内局在を観察した。その結果、ホスファチジン酸が細胞質分裂中の細胞板と、その結果、形成される隔壁に局在していることを見出した。本研究を行っている間に、シロイヌナズナの胚発生初期において、一番新しく出来た隔壁に近い微小管の安定化と、細胞の縁での微小管の不安定化によって表層微小管の配向が決まり、最終的な細胞分裂面が決まりうることが報告された (Chakraborty et al., 2018, Current Biology)。ホスファチジン酸が微小管結合タンパク質である MAP65-1 (微小管の束化活性を有する) と結合することから、細胞内の位置情報と細胞骨格制御をつなぐ候補因子と考えられ実験を進めた。まず、ホスファチジン酸の合成を阻害することが知られている薬剤を加えて、細胞分裂面への影響を解析した。しかしながら、薬剤によって細胞分裂が阻害されることから細胞分裂面への影響を評価することが出来なかった。そこで、初期茎葉体において MAP65 の動態を観察した。その結果、MAP65 はホスファチジン酸と同様に細胞質分裂中の細胞板と、その結果、形成される隔壁に強く局在していることが明らかになった。現在、MAP65 の機能欠損変異体を作製中で、細胞分裂面への影響を評価できると考えている。

(2) 真核生物に広く保存される細胞分裂に必須な Aurora キナーゼに着目した研究

ヒメツリガネゴケの Aurora キナーゼは、細胞分裂時には紡錘体、フラグモプラスト (微小管で作られ、細胞赤道面に対してプラス端、その反対側をマイナス端という極性を持つ) のマイナス端側に局在する。またセントロメアにも局在が観察される。この二つの局在がどのように制御されているかを、FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) を用いて解析した。核膜崩壊前に、核の中にドット状の Aurora キナーゼのシグナルが観察されたことから、このシグナルに対して FRAP を行ったところ、核膜崩壊後のセントロメアでのシグナルが回復しなかった。このことは細胞分裂期の Aurora キナーゼの二つの局在パターンは核膜崩壊前に決まっていることが示された。次に Aurora キナーゼの相互作用因子を LC/MS/MS 解析を用いて複数同定した。そのうちの 2 つを Ilp1、Ilp2 と命名し解析を行った。Ilp1 と Ilp2 はアミノ酸配列に高い相同性を有する。Ilp1、Ilp2 タンパク質の細胞内局在を解析したところ、両タンパク質ともに、フラグモプラストが親細胞壁に到達する場所で強く局在することが明らかになった。そこで Ilp1、Ilp2 を同時にノックダウンする誘導型 RNAi 株を作製し、微小管の動態を観察した。その結果、フラグモプラストが正常に親細胞壁に到達できないため細胞分裂面に異常を来すことが明らかになった。Ilp1、Ilp2 それぞれの機能欠損型変異体を作製したが、誘導型 RNAi 株で見られた表現型は観察されないことから、これら遺伝子は機能が重複していると考えられる。これらの結果は Aurora キナーゼが Ilp1、Ilp2 タンパク質の機能を通して、細胞分裂面を制御していることを示唆している。

次に Ilp1 の相互作用因子を LC/MS/MS 解析で同定を試みた。その結果、ホスファターゼである PP2A regulatory subunit を同定した。そこで、PP2A regulatory subunit の細胞内局在の解析を行った。その結果、PP2A regulatory subunit はスピンドルの赤道面で弱く検出され、フラグモプラストの赤道面で強く検出された。

本研究では Aurora キナーゼの動態、新たに相互作用因子として同定した Ilp1、Ilp2 の動態、その Ilp1 と相互作用する因子として PP2A regulatory subunit の動態を明らかにした。現在、Ilp1、Ilp2 タンパク質が、Aurora キナーゼのリン酸化活性と、PP2A の脱リン酸化活性のバランスをすることで、細胞分裂方向の制御をしている可能性を考慮し、解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 幸節健
2 . 発表標題 ヒメツリガネゴケのAuroraキナーゼの解析
3 . 学会等名 第18回植物細胞周期合同セミナー
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Ken Kosetsu, Bert De Rybel, Mitsuyasu Hasebe, and Daniel Van Damme
2 . 発表標題 Elucidation of the Aurora kinase function during mitosis and cytokinesis in Pyscomitrella patens
3 . 学会等名 The 66th NIBB Conference, ABiS International Symposium "Cutting Edge Techniques of Bioimaging"（国際学会）
4 . 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----