

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20370023

研究課題名（和文） リン酸化による微小管細胞骨格の制御

研究課題名（英文） Regulation of microtubule cytoskeleton by phosphorylation

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

研究成果の概要（和文）：チューブリンのリン酸化と脱リン酸化酵素に着目して微小管のリン酸化反応を調べたところ、mitogen-activated protein kinase phosphataseに分類されるアラビドプシスのPropyzamide-Hypersensitive 1 がatypical protein kinaseのキナーゼドメインを併せ持つことが判明した。このリン酸化活性は分子内のフォスファターゼ活性により不活性化されているが、活性化されるとチューブリンをリン酸化し、間期細胞の表層微小管を速やかに脱重合することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Phosphorylation of plant microtubules was investigated with respects to tubulin phosphorylation and protein phosphatases. I found that the Arabidopsis Propyzamide-Hypersensitive 1 protein of the mitogen-activated protein kinase phosphatase family also possesses a kinase domain of atypical protein kinases. The kinase activity is suppressed by the intra-molecular phosphatase activity, but when this suppression is removed, the activated kinase rapidly phosphorylates tubulin and depolymerizes cortical microtubules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：微小管、リン酸化、フォスファターゼ、キナーゼ、アラビドプシス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 微小管細胞骨格は $\alpha$ と $\beta$ のチューブリン・ヘテロ二量体から構成される生体ポリマーであり、細胞分裂や細胞の形の制御に非常に重要な役割を担っている。微小管は細胞周期の進行に伴い、表層微小管、前期前微小管束、紡錘体微小管、フラグモプラストとその形態を変化させる。このような多様な微小管構造物の形成やそれらの機能は、微小管に働

く様々なタンパク質（微小管付随タンパク質；MAPs）が制御していると考えられる。また、チューブリン自身の翻訳後修飾も重要な役割を持っていることが動物細胞などでわかっているが、植物においてはチューブリンの翻訳後修飾はほとんどわかっていない。

最近、高等植物の微小管形態や動態がGFPなどのマーカーを用いて詳細に観察されるようになり、生細胞における表層微小管の誕生

や微小管分布パターンの形成過程が時間を追って追跡できるようになった。こうした微小管変化の詳細な記述を踏まえて、その分子基盤である「微小管機能を制御する微小管制御タンパク質の同定と機能解析」と「微小管制御タンパク質の活性を制御するシグナル伝達系の解析」に研究の焦点が移りつつある。前者に関しては、我々のグループを含む世界中の研究者が分子遺伝学や生化学などを用いて、動物と保存された遺伝子や植物特有の遺伝子を次々と見出してきている。

(2) 本研究は後者に対応するが、これまでに植物の微小管機能に関するシグナル系として、リン酸化経路とRop (低分子GTPase) 経路が報告されている。リン酸化経路のアラビドプシス変異株として、protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunit B の変異である *tonneau2* (*ton2*; Camilleri et al., 2002) と mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase の変異である *propyzamide-hypersensitive1* (*phs1*) が知られている。Rop経路については、そのエフェクターRIC1 が表皮細胞の表層微小管を制御することが最近報告された。こうしたバイオニクス的研究成果は複数のシグナル経路が最終的に微小管制御タンパク質の活性制御を介して表層微小管パターンの形成をコントロールしていることを示唆しているが、シグナル経路の全貌や各経路の使い分けや相互作用などは将来の研究課題である。

(3) 申請者はこれまでに PHS1 MAPK phosphatase の触媒能欠損変異が劇的にかつ特異的に表層微小管の安定性を低下させることを見出し、この効果がPHS1の基質トラップ作用によるものであると推察した (平成18-19年度基盤Bの成果)。また、野生型PHS1を bait として酵母2ハイブリッド法により PHS1 と相互作用するタンパク質を網羅的に検索したが、適当な候補は得られなかった。さらに、アラビドプシスのMAPK 20種が属する4つのサブグループを代表する17種のMAPKと野生型PHS1の間の一対一の相互作用を酵母2ハイブリッド法により調べたが、特異的に結合するMAPKは見出せなかった。推定されるMAPK相互作用モチーフに変異 (R64C) を持つ *phs1-1* 変異株と野生株を phospho-proteome 解析で比較することにより、変異株において特異的にリン酸化状態が変化しているタンパク質を探索したが、大きな差異は見出せていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、特にリン酸化シグナル伝達経路に注目し、チューブリンや植物MAPをリン酸化するキナーゼや脱リン酸化するフォスファターゼを同定し、リン酸化によりチューブリンやMAPsの生化学的活性がどのように調節さ

れるかを明らかにする。具体的には、以下の2つのテーマの各項目について研究する。

1)  $\beta$  チューブリンのリン酸化制御

- $\beta$  チューブリンのリン酸化部位の特定
- リン酸化  $\beta$  チューブリンの細胞内局在と微小管重合能
- リン酸化酵素 (CDKか?) と脱リン酸化酵素 (TON2か?) の同定
- 細胞周期と環境要因によるリン酸化の制御様式

2) PHS1フォスファターゼによる微小管構築制御

- PHS1の基質となるリン酸化タンパク質の同定
- PHS1触媒機能欠損変異が微小管脱重合を促進する分子機構の解明

## 3. 研究の方法

1)  $\beta$  チューブリンのリン酸化制御

細胞周期を同調化したアラビドプシス培養細胞抽出液から各種CDK抗体を用いてCDK-cyclin複合体を免疫沈降し、アラビドプシス培養細胞から精製したチューブリンを基質としてリン酸化反応を行う。CDK-A (動物Cdk1に相当)、CDK-B1 (植物特異的)、CDK-B2 (植物特異的) に対する特異的抗体を用いて、どのCDK複合体がリン酸化活性をもつのかを調べた。

2) PHS1フォスファターゼによる微小管構築制御

C792S不活性型PHS1は標的タンパク質を安定にトラップする可能性があるため、この変異PHS1を bait として用いた酵母2ハイブリッド法により、PHS1相互作用タンパク質を再度探索する。

また、PHS1の植物細胞における微小管不安定化活性を調べるために、GFP-TUB6微小管標識アラビドプシス系統の葉表皮細胞にPHS1遺伝子とRFP (導入細胞同定用) をパーティクルガンで導入し、表層微小管形態を観察する。

## 4. 研究成果

1) 研究課題1「 $\beta$  チューブリンのリン酸化制御」については、目ぼしい成果が得られなかった。研究課題2では、PHS1と相互作用する因子は酵母2ハイブリッド法では得られなかった。しかし、PHS1の種々の断片やアミノ酸変異が植物細胞の表層微小管形態に及ぼす影響を調べる実験において、重要な知見が得られたので、計画を一部変更して実施した。

2) アラビドプシス葉肉細胞由来プロトプラストでPHS1-GFPを発現させたところ、細胞質、主にミクロソーム膜画分に局在した。核局在

シグナルを付加したPHS1-GFPも細胞質に分布し、核外輸送受容体exportin1の阻害剤leptomycin Bの存在下でのみ核に局在した。PHS1には核外輸送シグナルがC末端部位に同定され、細胞分裂後に速やかに細胞質に放出され、細胞質で機能することが判明した。3) PHS1のフォスファターゼドメインを除いた中央部分のみ植物細胞で発現させると、強い微小管脱重合活性を示した。脱重合活性を示す最小部分には、atypical protein kinaseと弱い相同性を示す領域が含まれていた。この領域のキナーゼ活性に必要であると予想されるアミノ酸残基を変異させると、微小管脱重合活性が消失した(図1)。全長PHS1は微小管脱重合活性を示さないが、フォスファターゼ活性部位を変異させると、脱重合活性が現れることから、フォスファターゼ活性が微小管脱重合活性を負に制御することが明らかとなった。

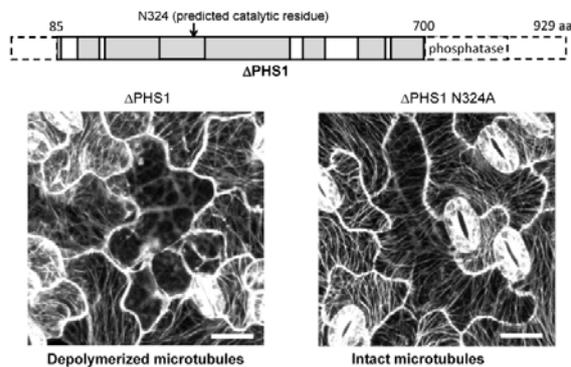


図1 PHS1中央部分(アミノ酸85-700:ΔPHS1)をアラビドプシス微小管標識システムの葉表皮細胞で発現させると、表層微小管が脱重合する。この脱重合活性には、予想されるキナーゼ活性部位が必須である。バーは20 μm。

4) タバコ培養細胞由来プロトプラストから精製した微小管付随タンパク質画分を基質として用いて、微小管脱重合活性を示すPHS1部分長(キナーゼ領域を含む)がどのタンパク質をリン酸化するのかをin vitroリン酸化アッセイ法により調べた。その結果、チューブリンが強くリン酸化された。また、このPHS1キナーゼ断片は自己リン酸化活性も持っていた。

従って、PHS1はフォスファターゼ活性とキナーゼ活性を同一分子内に持つユニークなタンパク質であり、通常はフォスファターゼ活性がキナーゼ活性を抑制していると考えられる。活性化されたキナーゼはチューブリンをリン酸化することにより、植物細胞の表層微小管を速やかに脱重合すると考えられる(図2)。

5) 今後は、αとβのどちらのチューブリンのどのアミノ酸残基をリン酸化するのか、フォスファターゼ活性を抑制してキナーゼを活性化する細胞内シグナルは何か、PHS1の微

小管脱重合活性はどのような生理現象に関与しているのか、などを明らかにしてゆきたい。

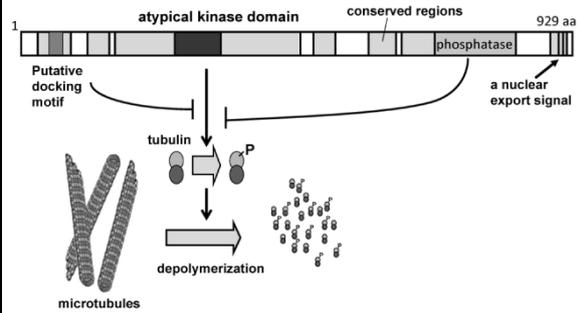


図2 PHS1の構造と機能。本文参照。

## 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9件)

① T. Hashimoto (2011) Microtubule and cell shape determination. In: **The Plant Cytoskeleton**, B. Liu, ed (Springer, New York), Chapter 11, pp. 245-257、査読なし。

② M. Nakamura, D. Ehrhardt, and T. Hashimoto (2010) Microtubule and katanin dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the Arabidopsis cortical array. **Nature Cell Biol.** 12: 1064-1070、査読あり。

③ J. Pytela, T. Kato, and T. Hashimoto (2010) Mitogen-activated protein kinase phosphatase PHS1 is retained in the cytoplasm by nuclear extrusion signal-dependent and independent mechanisms. **Planta** 231: 1311-1322、査読あり。

④ S. Matsumoto, S. Kumasaki, K. Soga, K. Wakabayashi, T. Hashimoto, and T. Hoson (2010) Gravity-induced modifications to development in hypocotyls of Arabidopsis tubulin mutants. **Plant Physiol.** 152: 918-926、査読あり。

⑤ S. Komaki, T. Abe, S. Coutuer, D. Inze, E. Russinova, and T. Hashimoto (2010) Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in Arabidopsis. **J. Cell Sci.** 123: 451-459、査読あり。

⑥ T. Hamada, T.J. Itoh, T. Hashimoto, T. Shimmen, and S. Sonobe (2009) GTP is required for the microtubule catastrophe-inducing activity of MAP200, a tobacco homolog of XMAP215. **Plant Physiol.** 151: 1823-1830、査読あり。

⑦ M. Nakamura, and T. Hashimoto (2009) A mutation in the Arabidopsis γ-tubulin-containing complex subunit causes helical growth and abnormal microtubule branching. **J. Cell Sci.** 122: 2208-2217、査読あり。

⑧ M. Yao, Y. Wakamatsu, T. J. Itoh, T. Shoji,

and T. Hashimoto (2008) Arabidopsis SPIRAL2 promotes uninterrupted microtubule growth by suppressing the pause state of microtubule dynamics. **J. Cell Sci.** 121: 2372-2381、査読あり。

⑨ P. Hussey, and T. Hashimoto (2008) The cytoskeleton and signal transduction: Role and regulation of plant actin and microtubule binding proteins. In: **Intracellular Signalling in Plants**, (ed. Z. Yang), Wiley-Blackwell, pp. 244-272、査読なし。

〔学会発表〕(計20件)

①藤田智史, Jaromir Pytela, 加藤壮英, 乾良充, 神戸雅人, 橋本隆, PHS1の新奇キナーゼ様ドメインは微小管脱重合を促進する、第52回日本植物生理学会年会、2011.3.20-22、予稿集において発表成立

②Masayoshi Nakamura, David W. Ehrhardt, Takashi Hashimoto, Analysis of dynamical behavior of microtubule-nucleating complexes in the cortical microtubule nucleation of Arabidopsis cells, Gordon research conference, 2010.8.18-13, Andover, USA

③ Takashi Hashimoto, Organization of cortical microtubule arrays in Arabidopsis, Gordon research conference, 2010.8.11, Andover, USA

④濱田隆宏、深谷雄志、渡辺雄一郎、橋本隆、mRNA代謝における細胞骨格ネットワークの役割、第51回日本植物生理学会、2010.3.21、熊本

⑤小牧伸一郎, 阿部竜也, Silvie Coutuer, Dirk Inze, EugeniaRuscinova, 橋本隆、アラビドプシスにおいて核局在型EB1は紡錘体の編成に必要である、第51回日本植物生理学会、2010.3.21、熊本

⑥八木慎宜、檜垣マリコ、榎木竜二、岡田清孝、橋本隆、方向依存的な細胞伸長に関わる新規因子ITOSUGIの機能解析、第51回日本植物生理学会、2010.3.21、熊本

⑨藤田智史、Pytela Jaromir, 加藤壮英、橋本隆、植物の表層微小管を制御するPHS1の機能解析、第51回日本植物生理学会、2010.3.21、熊本

⑩中村匡良、David W. Ehrhardt、橋本隆、植物細胞の表層微小管形成における微小管重合核の動的挙動の解析、第51回日本植物生理学会、2010.3.21、熊本

⑪ Takashi Hashimoto, Helical Asymmetry and Regulation of Cortical Microtubule Arrays in Plants, 16th International Society of Developmental Biologists Congress, 2009.9.8, Edinburgh, UK

⑫Masayoshi Nakamura, David W. Ehrhardt, Takashi Hashimoto, Live cell imaging of

cortical microtubule nucleation events in Arabidopsis cells, Plant Biology 2009.7.20, Hawaii, USA

⑬小牧伸一郎, 橋本隆、AtEB1cは正常な染色体分離と分裂期微小管の配置に必要である、第50回植物生理学会年会、2009.3.23、名古屋

⑭中村匡良、Ehrhardt DW, 橋本隆、シロイヌナズナ生細胞における微小管形成のライブイメージング、第50回植物生理学会年会、2009.3.23、名古屋

⑮加藤壮英, 直井国子, 橋本隆、新規微小管関連因子 PROPYZAMIDE HYPERSENSITIVE2 (PHS2)の機能解析、第50回植物生理学会年会、2009.3.23、名古屋

⑯濱田隆宏、深尾陽一朗、藤原正幸、小牧伸一郎、中村匡良、園部誠司、橋本隆、シロイヌナズナ微小管付随タンパク質群のショットガン解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2009.3.23、名古屋

⑰ 橋本隆、Organization of cortical microtubule arrays in non-centrosomal plant cells, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008.12.9、神戸

⑱Shinichiro Komaki, Tatsuya Abe, Silvie Coutuer, Joanna Boruc, Dirk Inze, Eugenia Ruscinova, Takashi Hashimoto, Functional analysis of Arabidopsis EBI protein family, 19th International Conference on Arabidopsis Research, 2008.7.24, Montreal, Canada

⑲Masayoshi Nakamura, Takashi Hashimoto, Microtubule-nucleation complexes contribute cortical microtubule array organization in Arabidopsis cells, 19th International Conference on Arabidopsis Research, 2008.7.24, Montreal, Canada

⑳Takehide Kato, Kuniko Naoi, Takashi Hashimoto, Analysis of propyzamide hypersensitive2 (phs2) mutant, related with microtubule regulation in Arabidopsis, 19th International Conference on Arabidopsis Research, 2008.7.24, Montreal, Canada

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/courses/courses103.html>

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

なし