

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 06 月 01 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570043

研究課題名（和文） 植物表層微小管の安定性に関与するシグナル伝達因子の同定

研究課題名（英文） Analysis of signaling factors related to stability of plant cortical microtubules

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

植物微小管の形成・維持に関わる PHS1 の N 末端側保存領域のみで表層微小管を消失する活性を有する事を発見した。このドメインは PHS1 自身と α チューブリンを直接リン酸化した。さらに、この活性は C 末端側フォスファターゼドメインによって抑制された。つまり、PHS1 はキナーゼと、フォスファターゼの両方の活性を有しており、表層微小管の存在・消失がその両ドメインによってコントロールされているという可能性が提示できた。さらに、PHS1 を介した α チューブリンリン酸化が、塩ストレスなどに誘導されることが示された。

研究成果の概要（英文）：

It was elucidated that the N-terminus conserved region of PHS1 showed the activities of dissipation of cortical microtubules in Arabidopsis. The region phosphorylated PHS1 oneself and α -tubulins, directly. Moreover the activities were repressed by the C-terminus region of PHS1. Thus, these results indicated the possibility that the existence or dissipation of cortical microtubules may be controlled by PHS1 protein, which possesses both kinase domain and phosphatase domain. It was also shown that the PHS1-mediated phosphorylation of α -tubulins was induced by salt stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：オルガネラ・細胞壁

1. 研究開始当初の背景

微小管は α 、 β チューブリンのヘテロダイマーが集合した細胞内ポリマーであり、その末端は重合と脱重合を繰り返す動的不安定

性を示す。この性質は、微小管が生理的意味を持つ構造をとるのに必要である。植物細胞の分裂期には、前期前微小管束(分裂面の位置)、紡錘体(染色体分配)、フラグモプラスト(分裂板の形成)といった微小管構造が順

に現れ、その機能を果たす。間期には微小管が細胞表層に同じ方向に配向し、表層微小管として細胞壁の形成に働く。多様な微小管構造を形成する為には、様々な微小管付随タンパク質 (MAP) や、その制御因子による微小管とチューブリンの巧みな調節が必要となる。

微小管付随タンパクの中には、重合・脱重合の盛んな微小管の末端で微小管の重合を促進するもの、逆にカタストロフを促進または抑制するもの、隣接する微小管をつなぐもの、微小管を分断するもの、チューブリン量を調節するもの、など様々存在する。近年、植物では、動物・酵母の MAP との相同性、変異体解析、さらに生化学的精製から、保存された MAP や、植物独自の MAP が多数報告されている。これらが発生プログラム、細胞周期、特に植物では生育環境を端に発するシグナル下、微小管構造の形成に関わると考えられる。

動物・酵母と同様、リン酸化や低分子量 G タンパク質を介したシグナル伝達系が、植物の細胞骨格の制御に深く関与する事が報告されている。当研究グループは、微小管重合阻害剤の感受性変異体から MAP キナーゼフォスファターゼ様 PHS 1 遺伝子を同定した (Naoi and Hashimoto, 2004)。又、他のグループからフラグモフラストの形成に関与する MAP キナーゼカスケードが報告されている。他に微小管関連の調節因子として PP2A 調節サブユニットをコードする TON2 遺伝子、NIMA 関連キナーゼ NEK6/IBO1 遺伝子なども報告されている。また、低分子量 G タンパク質 ROP (Rho Of Plant) 2, 4 が、RIC1, 4 エフェクターを介し微小管・アクチンに働きかけ、葉の表皮細胞の形態制御に関わる事が示されている。このように鍵となる上流の制御因子が同定されつつあるが、未だメカニズムの全容を示すに至ってなかった。

申請者らは、PHS1 タンパク質の脱リン酸化反応の活性中心のシステインをセリンに置換した C792S 不活性型 PHS1 ゲノムが、間期表層微小管を劇的に消失させることを明らかにした。この置換により、脱リン酸化反応が途中で停止し、基質をトラップすることが期待された。実際、動物細胞では同様の変異を利用し、チロシンフォスファターゼの基質を生化学的に単離する多数の報告例がある。この不活性型 PHS1 を野生型に形質導入すると、多くは生育過程で死滅し不稔となり、一部、器官のねじれや細胞肥大といった微小管機能欠損変異体に特有な表現型を示す形質転換体を得られた。これらの結果は、表層微小管を不安定にするシステムが存在し、PHS1 の介するリン酸化シグナル系が上流で制御していることを予想させる。ところで、植物の微小管を不安定にする因子は、ある種のキネシンや、チューブリンプールに関わるチュ

ーブリンのフォールディングコファクターくらいしか知られておらず、PHS1 関連シグナルがどの下流因子を調節するか全く予想がつかなかった。

2. 研究の目的

本研究では、植物の微小管構造の形成・維持に関する新たな因子の同定と、分子メカニズムの解明を目指した。とくに C792S 不活性型 PHS1 による強力な間期表層微小管の不安定化に注目し、かつそれを利用することにした。以下の3項目を3年間で行う計画を立てた。

- 1) 不活性型 PHS1 を用いて、間期表層微小管の形成・維持に関わる因子の同定
 - ・ FOX-hunting 法による PHS1 (C792S) 表現型を抑制する因子の同定
- 2) 表層微小管を積極的に不安定にする因子の探索
 - ・ アグロバクテリアを用いて表層微小管不安定化のアッセイ法の確立
 - ・ FOX-hunting 法を用いた表層微小管不安定化因子の単離
 - ・ 表層微小管不安定化のメカニズムの可視化の試み
- 3) PHS1 に関連のある MAP キナーゼカスケードの同定
 - ・ MAP キナーゼにターゲットを絞り、上記 2 つの方法を試みる。

3. 研究の方法

- 1) C792S 不活性型 PHS1 を用いて間期表層微小管の形成・維持に関わる因子の同定
 - ・ FOX-hunting 法による PHS1 (C792S) 表現型を抑制する因子の同定： 継代維持できるが、根や花茎が強くなじれ、細胞肥大を示す PHS1 (C792S) 植物は変異型 PHS1 の発現量が比較的弱く、野生型 PHS1 と拮抗して働いていると考えられた。表層微小管を完全に脱重合してないが、基質のリン酸化状態のバランスが大きく崩れていると考えられた。PHS1 (C792S) 植物で基質トラップが起こっているなら、基質の発現量を変化させることで表現型が回復する可能性がある。そこで、PHS1 (C792S) 植物に対して FOX-hunting (Full-length cDNA over expressor gene hunting) 法を行う。約 10000 種の独立したシロイヌナズナ完全長 cDNA からなる標準化 cDNA ライブラリーがアグロバクテリアのバイナリーベクター上で作成してある。これを PHS1 (C792S) 植物に感染し cDNA 過剰発現体を作る。そこから表現型を抑制する変異体をスクリーニングする。このスクリーニングでは、

直接の基質だけでなく、基質の発現量や性質を調節する上流制御因子や、基質の下流で調節を受ける因子の単離も期待できる。強制発現系による優性形質のスクリーニングを行うので、PCR増幅により抑圧の原因遺伝子が迅速に決定できる利点を持つ。また、変異体の不稔なども遺伝子の同定に影響しない。初年度でスクリーニングを終え、次年度以降、同定した原因遺伝子の機能解析を行う。

2) 表層微小管を積極的に不安定にする因子の探索

申請者らは、パーティクルガンを用いて C792S 不活性型 PHS1 を一過的に導入・発現させることで、表層微小管の消失を可視化した。これは、表層微小管を不安定にするシステムが存在する事を示唆する。さらにこのアッセイを利用すれば、表層微小管を不安定にする新規因子をスクリーニングすることが可能である。一過的な発現系を利用すれば、時間的な利点に加え、stable な発現系では得られない致死性の高い因子の同定を可能とし、in vitro 系で問題になる生化学的性質の検討も必要でない。

・アグロバクテリアを用いて表層微小管不安定化のアッセイ法の確立：パーティクルガンでの遺伝子導入法の問題点は、作業の手間とコスト面である。PEG 法による培養細胞への一過的導入法もあるが、細胞をプロトプラストにすることで表層微小管が視認しにくくなる。そこで、アグロバクテリアによるインフィルトレーション法を利用したアッセイ法を構築する。初年度に条件検討を行う。微小管を可視化する GFP マーカーと、実際に不活性型 PHS1 を用いて共感染による形質転換をおこなう。微小管可視化については、シャペロンやコファクターを必要とする GFP-tubulin に加え、新規微小管付随タンパク質 PHS2 を検討する。GFP-PHS2 は表層微小管を可視化し、ほとんど微小管機能に影響を与えない。このアッセイでは遺伝子発現に 35S プロモーターを用いるので、植物材料も検討する。形質転換効率のよいシロイヌナズナ培養細胞 Alex は一方向への伸長を示し、表層微小管の観察が可能と考えられる。また、報告例の多いタバコ葉 (*Nicotiana benthamiana*) 表皮細胞でのアッセイも検討する。

・FOX-hunting 法を用いた表層微小管不安定化因子の単離：アグロバクテリアによる一過的なアッセイ系を構築できたならば、先の実験計画で使用する FOX-hunting 法を用いて、表層微小管を脱重合するような因子を同定する。既に標準化 cDNA ライブラリーが組み込まれた強制発現用バイナリーベクターがアグロバクテリアに導入されている。そこで、ライブラリーを適当に分割し約 10 系統ごと

バルク化し、これを植物に導入し感染させる。感染した細胞群から表層微小管の消失を指標に共焦点顕微鏡によるスクリーニングする。消失の表現形が観察されれば、候補バルクより 2nd スクリーニングを行い、クローンを同定する。3年間かけてスクリーニングを順次行っていく。

・表層微小管不安定化のメカニズムの可視化の試み：本研究では表層微小管の消失を指標に新規因子の同定を試みる。しかし、表層微小管の消失が、微小管重合因子の不活性化によるものか、脱重合因子の活性化によるものか、微小管とチューブリン量のバランスが変化したことによるものか、微小管重合核の減少によるものか、考えうる要因だけでも複数存在する。そこで、微小管重合に必須な MOR1、脱重合に関与するキネシン、チューブリンのプールに関与するフォールディングコファクター、微小管重合核に含まれる GCP タンパク質などの既知の MAP と蛍光タンパク質との融合遺伝子を作成し、マーカーラインにする。マーカー植物を用いて、新規因子の表層微小管の消失がどのメカニズムと関わるか、視覚的に解析する。

3) PHS1 に関連のある MAP キナーゼカスケードの同定

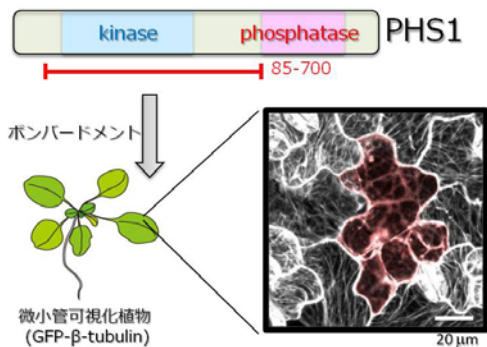
生理的な機能相関がある遺伝子群はその発現プロファイルも相関を示すことが多い。MPK カスケードに関わる 120 遺伝子の発現相関性の解析がなされた (Menges et al., *New Phytologist*, 2008)。そのデータと PHS1 遺伝子の発現プロファイルを組み合わせ、PHS1 と共発現する MPKKK、MPKK、MPK 遺伝子ファミリーを割り出した。一方、二重変異体の解析から、半優性アレル *phs1-1* ヘテロの表現形を昂進する MPK ファミリー [D グループ] の変異体を明らかにしているが、発現プロファイルと遺伝学的相互作用の情報が MPK レベルで一致した。これらキナーゼ群について、野生型と活性型・不活性型の変異型を作成し、MPK カスケードに的を絞って、上記 1) 2) の実験システムを実行する。

4. 研究成果

1) について、C792S 不活性型 PHS1 を発現した植物に対して、Fox-hunting 法を試みた。しかし、不活性型植物は、湿潤・乾燥のコントロールが難しく、スクリーニングに必要なだけの種子を得られなかった。実際、得られた種子からは抑圧変異体は得られなかった。現在、EMS 処理によるスクリーニングも行い、表現型を抑圧する変異体の単離を試みている。すでに、20 系統ほど候補が得られており、現在、さらなる検証を行っている。2) につい

て、現在、共発現データベース ATTED などを用いて、PHS1 と発現相関性の高い、キナーゼ、及び MAP キナーゼも含めてクローニングを行った。さらに、すでに報告のある MAPs についても、可視化マーカー作成を行っている。3) について、現在 D グループ MPK の一部の 4 重変異体が完成した。しかし、微小管関連の表現型どころか、ほぼ野生型を示した。

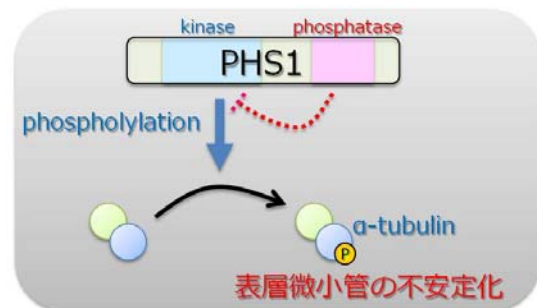
これまで PHS1 を MAP キナーゼフォスファターゼ様タンパク質として扱ってきた。つまり、微小管の安定性に関わる何らかのリン酸カスケードが存在し、その経路を PHS1 がフォスファターゼとして抑制する事を想定していた。ところが当該年度に 2) で計画していた微小管可視化植物への導入アッセイを、保存された領域に基づいて幾つかに断片化した PHS1 について行ったところ、C 末端のフォスファターゼ領域を欠く N 末端側保存領域のみで表層微小管を消失する活性を有する事を発見した。さらに、N 末端と C 末端を分けて同時に導入すると、N 末端による微小管脱重合活性が抑制されること、また、C792S 不活性型変異により C 末端フォスファターゼは抑制効果を持たないことが示された。この結果は、PHS1 自体が表層微小管を不安定にさせる要因を N 末端側に持っており、C 末端側によりその効果が抑制されている事を強く示唆した。この結果は当初想定していた PHS1 の機能と異なった。そこで、この発見以降、まず PHS1 がもつ微小管脱重合能がどのようなメカニズムによって調節されているのかを明らかにする事が優先的だと考え、当該年度で詳細に調べる事にした。



この保存領域は、申請時にはアノテーションがつけられていなかったが非典型的なキナーゼとして扱われている粘菌の AFK キナーゼに非常に弱い相同性をしめす事が示された。そこで、この領域にリン酸化活性があるか否かを探るべく、人工基質を用いて酵素活性を調べたがその活性は見られなかった。しかし、PHS1 は自己リン酸を示し、Mn イオン依存的なキナーゼ活性であることが明らかになった。

次に、この N 末端側ドメインのリン酸化タ

ーゲットを同定する為に、大腸菌で PHS1 組換えタンパク質を作り、シロイヌナズナ培養細胞より単離した微小管共沈タンパク質を NaCl 濃度で分画し、各画分に対してリン酸化バンドを探索した。すると、チューブリンを含む画分において PHS1 依存的に非常に強いリン酸化が検出された。精製されたシロイヌナズナ培養細胞由来のチューブリン、ブタ脳より精製したチューブリンに対しても、リン酸化活性は検出され、PHS1 のターゲットが α チューブリンであることが明らかとなった。大腸菌由来の α チューブリンに対しては、リン酸化活性を示さなかったことから、PHS1 は一次配列ではなく成熟した α/β チューブリンヘテロダイマーの α チューブリンを認識してリン酸化していることが強く予想された。公共の網羅的リン酸化プロテオミクスのデータと、実際に PHS1 によって処理したチューブリンに対するリン酸化質量解析により、 β チューブリンとのインターフェースに位置する一箇所のスレオニンが少なくともリン酸化されている事が示された。実際に、このスレオニンへの修飾が微小管の重合もしくは、植物体へ影響を示すか調べるため、リン酸化ミミック型の変異を入れた GFP-TUA を植物に導入したところ、微小管に取り込まれないこと、優性に生長に影響を与えることから、PHS1 は α チューブリンのリン酸化を介して微小管を重合しにくくする効果を示す事が示された。



PHS1 の null 変異体は、通常生育条件下、野生型とそれほど違いを示さないため、PHS1 は何らかの外刺激に応じて、微小管リン酸化をコントロールしていると考えた。浸透圧ストレスの一つとして高塩条件に植物をさらすと、野生型植物では、微小管が脱重合し、かつ α チューブリンのリン酸化が観察された。一方、PHS1 の null 変異体では、 α チューブリンのリン酸化が観察出来なかった。この結果は高塩ストレスの下流において、PHS1 を介した α チューブリンのリン酸化が起こる事を意味している。

本研究の結果により、 α チューブリンのリン酸化を介した微小管重合・脱重合の調節機構が初めて明らかになった。また、このリン酸化はこれまで報告されてない新しい非典

型的キナーゼドメインによって起こる事を示した。PHS1はこの新奇チューブリンキナーゼドメインとその活性を抑制するフォスファターゼドメインを両方供えたユニークなタンパク質であり、まだ確認中であるが、植物の高塩ストレス応答に関与している事が強く示唆された。これらの結果をまとめて、近く高インパクトな雑誌へ投稿する計画である。

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3件)

1) Nakamura M, Yagi N, Kato T, Fujita A, Kawashima N, Ehrhardt D. W. and Hashimoto T. Arabidopsis GCP3-INTERACTING PROTEIN 1/MOZART1 is an integral component of the γ -tubulin-containing microtubule nucleating complex. *Plant J.* Article first published online: 14 MAY 2012 査読有り

2) Pytela J, Kato T and Hashimoto T. Mitogen-activated protein kinase phosphatase PHS1 is retained in the cytoplasm by nuclear extrusion signal-dependent and independent mechanisms. *Planta* 231(6), 1311-22., 2010 査読有り

3) Kato T, Morita M and Tasaka M. Defects in Dynamics and Functions of Actin Filament in Arabidopsis Caused by the Dominant-Negative Actin fiz1-Induced Fragmentation of Actin Filament. *Plant Cell Physiol.* 51(2), 333-8., 2010 査読有り

[学会発表] (計8件)

1) 藤田智史、Pytela Jaromir、野村有子、加藤壮英、高林周平、中神弘史、橋本隆
Atypical kinase PHS1は微小管の脱重合を促進する
第53回日本植物生理学会年会、2012.3.16、京都

2) Noriyoshi Yagi, Masayoshi Nakamura, Noriyuki Kawashima, Takehide Kato, Takashi Hashimoto
Functional Analysis of Novel γ -Tubulin Ring Complex Proteins

第53回日本植物生理学会年会、2012.3.18、京都

3) Takehide Kato, Kuniko Naoi, Takashi Hashimoto

PROPYZAMIDE HYPERSENSITIVE2 is a novel microtubule associate protein related with plant cell elongation.

第34回日本分子生物学会年会、2011.12.16、横浜

4) Satoshi Fujita, Jaromir Pytela, Takehide Kato, Shuhei Takabayashi, Takashi Hashimoto

An atypical kinase PHS1 induces microtubule destabilization in Arabidopsis

第34回日本分子生物学会年会、2011.12.16、横浜

5) 加藤壮英、橋本隆

細胞伸長に関与する新規微小管関連遺伝子 PHS2 の解析

第52回日本植物生理学会年会、2011.3.21、仙台(仙台の予定が中止となり、3.11付け年会講演要旨集のWeb公開をもって発表成立)

6) 藤田智史、Pytela Jaromir、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、2011.3.21、仙台(仙台の予定が中止となり、3.11付け年会講演要旨集のWeb公開をもって発表成立)

7) 藤田智史、Pytela Jaromir、加藤壮英、乾良充、神戸雅人、橋本隆

PHS1はシロイヌナズナの間期表層微小管を制御する

第33回日本分子生物学会年会、2010.12.8、神戸

8) 加藤壮英、橋本隆

シロイヌナズナ新規微小管調節因子 PROPYZAMIDE HYPERSENSITIVE2 (PHS2) の解析

第33回日本分子生物学会年会、2010.12.8、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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