

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770040

研究課題名(和文)

植物の細胞分裂を制御する分子機構の解析

研究課題名(英文)

The molecular mechanisms of a regulatory pathway involved in plant cell division

研究代表者：

笹部 美知子 (SASABE MICHIKO)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：00454380

研究成果の概要(和文)：

キネシン様タンパク質、NACK1 とMAPKカスケードから成るNACK-PQR経路は、植物の細胞質分裂を制御する中心の制御系である。NACK-PQR経路は、NACK1とMAPKカスケードの最初の酵素であるNPK1 MAPKKKが直接結合することにより活性化される。この活性化は細胞質分裂時に特異的であるが、NACK-PQR経路を構成する全てのタンパク質は中期以前にも存在しているため、この特異的な活性化を制御するメカニズムの存在が予想されていた。本研究では、この経路の活性化にサイクリン依存性キナーゼ(CDK)が関わっていることが明らかとなった。生体内で、NPK1とNACK1はCDK活性に依存してリン酸化されており、このリン酸化は両タンパク質の結合を阻害することが分かった。細胞質分裂異常を示すAtNACK1/HINKEL(NACK1のシロイヌナズナホモログ)の変異体において、野生型AtNACK1はatnack1変異体の表現型を相補したが、CDKリン酸化サイトにリン酸化ミミック変異を持つAtNACK1はこれを相補することが出来なかった。これらの結果はCDKが、適切な時期までNACK-PQR経路の活性化を抑制する因子として機能していることを示唆している。また、CDKによるNACK-PQR経路の抑制を解除する因子を明らかにするために酵母の系を用いて解析を進め、NACK1のCDKリン酸化サイトに特異的に結合するフォスファターゼを見つけた。生化学的な解析を進め、このフォスファターゼが、CDKリン酸化NACK1に対して脱リン酸化活性を有していることが分かった。さらに、このフォスファターゼは、NPK1のCDKリン酸化サイトにも結合することが明らかとなり、この分子がNACK-PQR経路の活性化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The NACK-PQR pathway, which is composed by NACK1 kinesin-like protein, NPK1 MAPKKK, NQK1 MAPKK and NRK1/NTF6 MAPK in tobacco, is known as a key regulator for plant cytokinesis. This pathway is specifically activated during cytokinesis via the direct binding between NACK1 and NPK1, however, it remains to be determined how the interaction of these proteins is regulated. Here, we report that CDKs negatively regulate the NACK-PQR pathway before metaphase. Using tobacco cells, we demonstrated that cyclin-dependent kinases (CDKs) phosphorylate both NPK1 and NACK1 before metaphase. Such phosphorylation prevents the transition to cytokinesis via inhibition of interactions between these two proteins. Failure to inactivate CDKs after metaphase prevents dephosphorylation of these two proteins, causing incomplete mitosis. Experiments with Arabidopsis NACK1 (known also as HINKEL) revealed that phosphorylated NACK1 fails to mediate cytokinesis. Thus, timely and coordinated phosphorylation by CDKs and dephosphorylation of cytokinetic regulators from prophase to anaphase are critical for the appropriate onset and/or progression of cytokinesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：植物, 細胞分裂, 細胞質分裂, フラグモプラスト, 細胞板, MAP キナーゼ, サイクリン依存性キナーゼ, キネシン様タンパク質

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞分裂において、その最終過程である細胞質分裂は植物特異的な MAP キナーゼカスケードにより制御されている (Nishihama et al., 2001, 2002, Soyano et al., 2003, Tanaka et al., 2004)。この経路の下流では、微小管結合タンパク質である MAP65 がリン酸化されており、そのリン酸化によりその活性が変化し、細胞質分裂が制御されていることも明らかとなった (Sasabe et al. 2006)。そ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たが (町田, 笹部未発表)、実験材料として、データベースの整っていないタバコを用いていたため、微量タンパク質分析による解析が困難でタンパク質の同定には未だ至っていない。そこで、本研究では、ゲノム解析が完了し、種々のデータベースが利用可能なシロイヌナズナの培養細胞を用いて、生化学的に本 MAP キナーゼカスケード (このカスケードはタバコ及びシロイヌナズナにおいて保存されていることが分かっている) の下流因子の探索、同定を行う。

多くの細胞周期研究者の多くが用いているタバコ BY-2 培養細胞は非常に高度な同調培養が可能であり、細胞周期研究を遂行する上で非常に有用であるが、ゲノムの解読が成されておらずタンパク質の同定までには多くの労力と時間を要する。一方、ゲノムの解読されているシロイヌナズナの培養細胞では、効率のよい同調培養法が確立していない。そこで、本研究では、既にこれまでの研究により分子機能の明らかとなっている MAP キナーゼカスケードの構成因子を GFP と融合し、マーカータンパク質として導入した培養細胞と、植物由来の天然化合物、及び合成化合物を用いたケミカルバイオロジーの手法により、植物の細胞分裂を制御する新規活性物質の同定を試みる。さらに同定された物質を用いてシロイヌナズナ培養細胞における同調培養法を開発する。シロイヌナズナにおいて、タバコと同様な同調培養が可能となれば、今後の細胞周期研究において非常に有用なツールとなると考えられる。

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; Sasabe et al. (2006) *Genes & Dev.* 20:1004-1014

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物の細胞分裂を制御する分子機構を明らかにすることである。細胞分裂、すなわち細胞増殖は、生命の根源的な現象であり、多くの生物種で細胞レベルでは非常によく保存された機構が存在することが知られている。一方で、生物種に限定された機構の存在も知られており、その機構の解明は生物種特有の発生・分化のシステムを理解する上で非常に重要である。しかし、動物や微生物と比べて、植物の細胞分裂の制御機構については不明な点が多い。その原因として、植物の細胞分裂の機構が他の生物種と比較していくつかの特異な性質をもつことが上げられる。例えば、細胞分裂のエンジンとして知られているサイクリン依存性キナーゼ (CDK) やサイクリンの数が非常に多く、チェックポイント機構が未だ不明なこと、また、動物細胞で必須と言われているいくつかの分子が存在しないこと、逆に植物に特異的な因子が存在することなどである。このような理由から、他の生物種で細胞分裂研究に使われている既存の阻害剤等の薬剤が必ずしも有効ではなく、植物においては生化学的、細胞生物学的なアプローチからの体系的な研究が遅れてきた。そこで、本研究では、植物の細胞分裂において解析の進んでいる細胞板形成を制御する MAP キナーゼカスケードを基軸として、(1)植物の細胞質分裂に関わる MAP キナーゼカスケードの上流・下流因子を複数同定し、細胞板形成を制御する分子機構を明らかにし、細胞分裂の分子メカニズムの理解を進める。(2)同調培養の可能なタバコ培養細胞のマーカーラインを作成し、細胞増殖能、及びマーカータンパク質の発現や局在を指標として、細胞周期進行に影響を与える化合物を同定する。(3)既存の薬剤及び、同定された化合物を用いて、シロイヌナズナの培養細胞における同調培養法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 植物の細胞質分裂に関わる MAP キナーゼカスケードの上流・下流因子の同定

シロイヌナズナの培養細胞用いて、生化学的手法により細胞質分裂に関与する新奇分子を同定する。これまでの研究から、植物の細胞質分裂は特異的な MAP キナーゼカスケ

ードにより制御されていること、そのカスケードの構成因子は細胞質分裂時に微小管を主成分とする細胞質分裂装置（フラグモプラスト）上に存在し、タバコにおいては、いくつかの微小管結合タンパク質を基質とし得ることが明らかとなっている（Nishihama et al., 2001, 2002, Soyano et al., 2003, Tanaka et al. 2004, Sasabe et al. 2006）。本研究では、微量タンパク質の同定が可能なシロイヌナズナの培養細胞を用いて微小管結合タンパク質を精製し、細胞質分裂時に活性化される MAP キナーゼによりリン酸化されるタンパク質を網羅的に同定し、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。さらにシロイヌナズナ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。

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）。さらに、近年の我々の研究により、細胞周期を制御している鍵酵素であるサイクリン依存性キナーゼ（CDK）が、NPK1 と NACK1 をリン酸化すること、このリン酸化が MAP キナーゼカスケードの活性化を細胞質分裂の時期まで負に制御していることが明らかとなってきた。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する。また、同時にこの経路の活性化、つまり細胞質分裂の開始には、NACK1 と NPK1 の脱リン酸化が必要であることが分かってきたので、この脱リン酸化に関わる新奇因子の同定を酵母の系を用いて試みる。

引用文献

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

(2)植物培養細胞のマーカライクの作成と、細胞分裂の進行を制御する新規活性物質の同定

これまでの研究で明らかとなった細胞分裂に関わる分子を GFP と融合したマーカタンパク質をタバコ培養細胞導入し、細胞周期マーカライクを構築する。培養細胞を用いて、周期依存的な発現を確認後、シロイヌナズナ個体に導入し、植物個体において細胞周期マーカとして機能し得るか検討する。また、マーカライク構築後は、植物由来の天然化合物、もしくは合成化合物を処理し、細胞増殖変化やマーカタンパク質の局在の変化をもとにスクリーニングを行い、新奇な生理活性物質を同定し、細胞周期研究への応用を目指す。

4. 研究成果

(1) 植物の細胞質分裂に関わる MAP キナーゼカスケードの上流・下流因子の同定

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っていない。そこで、シロイヌナズナの培養細胞を用いて、生化学的にこのカスケードの下流因子の探索を行った。最近、タバコで見いだされたこの MAP キナーゼカスケードはシロイヌナズナでも保存されていることが明らかとなり、機能的なホモログタンパク質も同定されたことから、本研究の遂行が可能となった（Takahashi et al. 2010, Kosetsu et al. 2010）。シロイヌナズナの培養細胞 5L より、生化学的に精製したタンパク質を用いて、細胞質分裂に関わるシロイヌナズナの MAPK MPK4 によりリン酸化されるタンパク質の探索を行ったところ、10 以上の MPK4 リン酸化タンパク質を見いだした。これらのタンパク質は、質量分析による同定を試みているが、この中の一つが、これまでに、多くの生物で微小管束化活性を持つ微小管結合タンパク質 MAP65 であることが分かった。MAP65 は、既にタバコ培養細胞を用いたこれまでの解析から、MAP キナーゼカスケードの下流で細胞質分裂を制御する分子として示されているが（Sasabe et al. 2006）、シロイヌナズナにおいても、同様の機能を持っているのかどうか検討し、さらに、これらの分子の個体における機能について遺伝学を用いて解析し検討した。シロイヌナズナに MAP65 は 9 つのメンバーからなるファミリーを形成するが、そのうち、細胞質分裂時に細胞板形成部位に局在する、MAP65-1, MAP65-2, MAP65-3 について、解析した。MAP65-1, -2, -3 はいずれも、これまでの報告どおり、細胞質分裂時に MPK4 と少なくとも一部は共局在しており、さらに、*in vitro* で MPK4 によって効率的にリン酸化された（Kosetsu et al. 2010, Sasabe et al. 2011）。これら 3 つの遺伝子の組織特異的な転写パターンを調べたところ、MAP65-1 はどの組織でも一様に高い発現を示したが、MAP65-2 と MAP65-3 は特に分裂活性の高い、メリステム周辺の組織と花芽で高い発現を示し、これらの遺伝子が分裂期特異的に転写されている可能性が示唆された。また、変異体の解析を行い、MAP65-1 と MAP65-2 がそれぞれ MAP65 と細胞質分裂を制御する機能を重複して担っている可能性が示唆された（Sasabe et al. 2011）。本研究で、これまでタバコの研究から生化学的に細胞質分裂に関与する MAPK カスケードの下流因子であることが示唆されていた MAP65 タンパク質が、重複して個体内で細胞質分裂の制御に関わ

っていることが示された。今後、さらにこれら3つの因子のそれぞれの役割を解析すると同時に、未同定の下流因子の同定を進め、それぞれの機能及び、それぞれの因子の機能的関わりを明らかにしていく予定である。

キネシン様タンパク質、NACK1 と MAPK カスケードから成る NACK-PQR 経路は、植物の細胞質分裂を制御する中心の制御系である。NACK-PQR 経路は、NACK1 と MAPK カスケードの最初の酵素である NPK1 MAPKKK が直接結合することにより活性化される。この活性化は細胞質分裂時に特異的であるが、NACK-PQR 経路を構成する全てのタンパク質は中期以前にも存在しているので、この特異的な活性化を制御するメカニズムの存在が予想されていた。我々は、NPK1 が活性化前に高度にリン酸化されていることと、そのリン酸化パターンが細胞周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に着目して生化学的な解析を行い、NPK1 をリン酸化しているキナーゼが CDK であることを見いだした。さらに CDK は NPK1 の活性化因子である NACK1 も同時にリン酸化していることが明らかとなった。生体内で、NPK1 と NACK1 は CDK 活性に依存してリン酸化されており、このリン酸化は両タンパク質の結合を阻害した。細胞質分裂異常を示す *AtNACK1/HINKEL* (NACK1 のシロイヌナズナホモログ) の変異体において、野生型 *AtNACK1* は *atnack1* 変異体の表現型を相補したが、CDK リン酸化サイトにリン酸化ミミック変異を持つ *AtNACK1* はこれを相補することが出来なかった。これらの結果は CDK が、適切な時期まで NACK-PQR 経路の活性化を抑制する因子として機能していることを示唆している。また、CDK による NACK-PQR 経路の抑制を解除する因子を明らかにするために酵母の系を用いて解析を進め、NACK1 の CDK リン酸化サイトに特異的に結合するフォスファターゼを見つけた。生化学的な解析を進め、このフォスファターゼが、CDK リン酸化 NACK1 に対して脱リン酸化活性を有していることが分かった。さらに、このフォスファターゼは、NPK1 の CDK リン酸化サイトにも結合することが明らかとなり、この分子が NACK-PQR 経路の活性化に関与している可能性が強く示唆された。今後、さらに分子機能を解析し、この可能性を検証していく予定である。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 期の中期以降に 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。本研究成果については、現在論文投稿中である (Sasabe et al. submitted)。

引用文献

Sasabe et al. (2006) *Genes & Dev.* 20:1004-1014, Takahashi et al. (2010) *Plant Cell & Physiol.* 51: 1766-1776, Kosetsu et al. (2010) *Plant Cell* 22: 3778-3790, Sasabe et al. (2011) *Plant Signal. & Behav.*, 6: Epub ahead of print

(2)植物培養細胞のマーカラインの作成と、細胞分裂の進行を制御する新規活性物質の同定

有用な細胞周期マーカライン作成のために、これまでに明らかとなっている細胞周期に密接に関わる分子に蛍光タンパク質を融合し、タバコの培養細胞に導入した。導入した遺伝子はタバコのチューブリン NtTUA、シロイヌナズナのヒストン H2B、シロイヌナズナの NACK1 AtNACK1 である。NtTUA 及び、H2B はタバコ培養細胞内で、それぞれ、微小管構造体、染色体をと、細胞周期を通して共局在し、細胞分裂の様子をライブイメージングすることができた。また、AtNACK1 については、細胞質分裂時に特異的にタンパク質が蓄積されることがわかり、細胞質分裂時特異的なマーカーとして機能しうることが示された。

また、近年、動物において G1 期特異的に蓄積する Cdt1 と S/G2/M 期特異的に蓄積する Geminin に蛍光プローブを融合させたタンパク質を発現させる事で、それぞれのフェーズにある細胞を検出できるマーカー (pFucci-G1 Orange, pFucci-S/G2/M Green) が開発されたが (Sakaue et al. 2008)、これらが植物でも効果的に使えるかを検討した。タバコ培養細胞において、pFucci-G1 Orange は、M 期では蓄積が見られず、M 期が終わると蓄積が始まり、Fucci-S/G2/M Green は S 期の初期から蓄積し、M 期の途中で分解されることが分かった。植物細胞において Fucci-S/G2/M Green タンパク質が分解される時期は動物細胞と異なるようだが、このシステムは植物細胞でも機能し得ることが示された。先に作成したマーカーを組み合わせることで、pFucci のシステムが植物細胞でどのような発現パターンを示すのかさらに詳細に検討し、G1 期初期から M 期までの細胞周期を蛍光タンパク質により可視化できるシステムの構築を目指す。最近、細胞の分化と細胞周期のフェーズが密接に関わっていることが明らかとなりつつあり、分化を理解する上で個体において個々の細胞の細胞周期のフェーズを知ることが重要な課題となっている。本研究で作製したマーカーは現在、シロイヌナズナ個体にも導入中で、個体における発現パターンを解析し、細胞分裂と細胞

胞分化の研究へと発展させていきたい。今回、課題としてあげた細胞分裂を制御する新奇生理活性物質の同定を行う研究に関しては、課題1が予想外に広がりを見せたことにより研究を縮小したため、これまでに予備的な結果しか得られていない。今後は、細胞周期マーカーを利用して、この課題に取り組みたいと考えている。

引用文献

Sakaue et al. (2008) Cell 132:487-498

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. Sasabe, M., Kosetsu, K., Hidaka, M., Murase, A., Machida, Y. *Arabidopsis thaliana* MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant Signaling & Behavior*, **6**: Epub ahead of print (2011) 査読あり

2. Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Hirt, H., Machida, Y. The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **22**: 3778-3790 (2010) 査読あり

3. Takahashi, Y., Soyano, T., Kosetsu, K., Sasabe, M., Machida, Y. HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, **51**: 1766-1776 (2010) 査読あり

[学会発表] (計7件)

1. 笹部美知子, 中野理恵, Veronique Boudolf, Lieven De Veylder, Dirk Inze, 町田千代子, 町田泰則; 植物の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制御するサイクリン依存性キナーゼとフォスファターゼ (第52回日本植物生理学会年会、仙台、年会講演要旨集、2011年3月)

2. 笹部美知子, 中野理恵, Veronique Boudolf, Lieven De Veylder, Dirk Inze, 町田千代子, 町田泰則; サイクリン依存性キナーゼによる植物の細胞質分裂の制御 (第33回日本分子生物学会年会、神戸ポートピアアイランド、神

戸、2010年12月)

3. 笹部美知子, 中野理恵, Veronique Boudolf, Lieven De Veylder, Dirk Inze, 町田千代子, 町田泰則; サイクリン依存性キナーゼは植物の細胞質分裂の開始を負に制御している (日本植物学会第74回大会、中部大学、春日井市、2010年9月)

4. Michiko Sasabe, Rie Nakano, Véronique Boudolf, Lieven De Veylder, Dirk Inzé, Chiyoko Machida, Yasunori Machida; CDKs negatively regulate a MAPK cascade involved in plant cytokinesis (21th International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, Japan, June, 2010)

5. 笹部美知子, 中野理恵, 幸節健, 町田千代子, 町田泰則; サイクリン依存性キナーゼは植物の細胞質分裂の制御に関わる MAP キナーゼカスケードを負の制御している (第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市、2009年12月)

6. Michiko Sasabe, Rie Nakano, Chiyoko Machida, Yasunori Machida; CDKs are regulators of a MAPK Cascade involved in Plant Cytokinesis (9th IPMB Congress, St. Louis, Missouri, USA, October, 2009)

7. 笹部美知子, 中野理恵, 町田千代子, 町田泰則; 植物の細胞質分裂を制御する MAP キナーゼカスケードの活性化機構の研究 (日本植物学会第73回大会、山形大学、山形市、2009年9月)

[図書] (計1件)

1. 笹部美知子・町田泰則, 植物における MAP キナーゼカスケード, 「植物のシグナル伝達」(柿本辰夫・高山誠司・福田裕穂・松岡信編), 共立出版, 52-60 (2010)

[産業財産権]
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

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