

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06215

研究課題名（和文）M期チェックポイントから探る植物ゲノムの可塑性

研究課題名（英文）Plant genome plasticity resulting from the alteration of the M phase checkpoint

研究代表者

小牧 伸一郎（Komaki, Shinichiro）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：50584588

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：CPC複合体は、Aurora kinase、INCENP、Borealin、そしてSurvivinから構成される。しかし、Survivinのオルソログは動物と菌類でしか同定されていないかった。研究代表者は、植物のSurvivin様タンパク質としてBOR11とBOR12を同定した。驚くことに、BIRドメインを介して染色体に結合するSurvivinとは異なり、BOR1sはFHAドメインで染色体に結合した。配列比較の結果、BOR1sとSurvivinは、もともと同一のタンパク質に由来し、その後の進化の過程で、各生物群において異なる染色体結合ドメインが付加されるという収斂進化が起こったことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物のSurvivinは、アポトーシスの制御因子として同定された。このアポトーシス経路でのSurvivinは、BIRドメインによってカスパーゼを抑制することから、SurvivinはBIRドメインを持つタンパク質であると信じられてきた。そのため、BIRドメインを持つタンパク質が存在しない生物には、Survivinのホモログも無いと考えられてきた。本研究は、これまで不明であった植物でのCPC複合体の局在機構を明らかにしただけではなく、Survivinの本体がヘリックス領域であると再定義することを可能とし、全ての真核生物にSurvivin /BOR1タンパク質が保存されていることを示した。

研究成果の概要（英文）：The chromosome passenger complex (CPC) is comprised of an Aurora kinase and a scaffold built of INCENP, Borealin, and Survivin. While most CPC components are conserved across eukaryotes, orthologs of the chromatin reader Survivin have only been identified in animals and fungi. This raises the question of how its essential role is carried out in other eukaryotes. We identified BOR11 and BOR12 as redundant Survivin-like proteins in the context of the CPC in plants. The BOR1s were demonstrated to bind to phosphorylated histone H3, which is crucial for the proper association of the CPC with chromatin. However, this interaction is not mediated by a BIR domain as in previously recognized Survivin orthologs, but by an FHA domain. We propose that the unifying criterion of Survivin-type proteins is a helix that facilitates complex formation with the other two scaffold components, and that the addition of a phosphate-binding domain evolved in parallel in different eukaryotic groups.

研究分野：細胞分裂

キーワード：Survivin CPC複合体 M期チェックポイント 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

生命の設計図であるゲノムを正確に次世代に伝えることは、生物にとって最も重要な課題である。しかし、植物はその進化の過程で何度もゲノムを倍加させてきた。この可塑的なゲノム構成は植物を特徴付ける性質であるが、それを生み出す分子機構は不明であった。研究代表者はこれまでの研究で、細胞周期 M 期のチェックポイントに注目し、植物ゲノムの可塑性を司る分子メカニズムの解明に取り組んできた。

M 期チェックポイントは、細胞分裂時に「紡錘体微小管」と「キネトコア」が正確に結合するまで細胞周期を中期に停止させる。これにより、染色体が娘細胞に均等に分配されることを保証し、ゲノムを安定化させる。M 期チェックポイントは、Spindle assembly checkpoint (SAC) 複合体と Chromosomal passenger complex (CPC) 複合体の 2 つの主要な複合体が協調して働くことで機能する。研究代表者は以前、継続的なストレス条件下における植物特異的な SAC 複合体の制御機構が、植物ゲノムの可塑性を生み出す原因の 1 つとなっていることを示した。しかし、もう一方の主要複合体である CPC 複合体の植物における機能は、ほとんどわかっていなかった。

酵母や動物の研究より、CPC 複合体は、INCENP、Borealin、Survivin の 3 つの足場タンパク質と触媒ユニットである Aurora kinase によって構成されることが示されていた。この CPC 複合体は、姉妹染色体が持つキネトコアの間の領域(inner centromere)に特異的に局在することで機能する。Inner centromere にある Histone H3 は、構成するアミノ酸の 3 番目のスレオニンがリン酸化修飾(H3T3ph)を受けている。CPC 複合体の一員である Survivin は N 末端に BIR ドメインを保持しており、このドメインが直接 H3T3ph に結合することで CPC 複合体全体を inner centromere に局在させる役割を持つ。

一方、植物では、研究代表者がシロイヌナズナで Borealin を初めて機能同定し、INCENP と共に足場ユニットを形成することで、触媒ユニットである Aurora kinase 3 (AUR3)の局在を制御することを報告した。しかし、植物ゲノムには、Survivin と同じ配列を持つタンパク質が存在せず、CPC 複合体がどのようにセントロメアに局在しているかは不明であった。そこで、Borealin の結合因子を網羅的に単離同定したところ、C 末にヘリックス構造を持つ機能未知のタンパク質とそのホモログを見出し、Borealin-interacting protein 1 および 2 (BOR11 および BOR12)と名付けた。このヘリックス領域の 3D 構造を予測し、最も近い構造を持つタンパク質を検索したところ、動物の Survivin であることが分かった。また、GFP を融合し、細胞内での局在を観察したところ、セントロメアに局在することが明らかとなった。さらに、この 2 つのタンパク質が N 末に持つ FHA ドメインは、リン酸化ペプチドを認識するドメインであることが知られている。これらの特徴は全て動物の Survivin と合致しており、このタンパク質が植物における Survivin の機能的ホモログであることが強く示唆された。

2. 研究の目的

動物の CPC 複合体のセントロメア局在は、Survivin が Histone H3 のリン酸化部位に結合することで可能となる。この Survivin は、カスパーゼを阻害することでアポトーシス経路を抑制する因子として発見された。しかし、同様の経路を持たない植物には Survivin のホモログも存在しないため、CPC 複合体の局在制御機構は不明であった。研究代表者が Borealin の結合タンパク質として同定した BOR11 と BOR12 は、Survivin とは異なる配列を持つものの、タンパク質機能は極めて似ており、植物における Survivin の機能的ホモログであるという着想に至った。

そこで、本研究では、可塑性を持つ植物ゲノムの原因を突き止めることを目的とし、研究代表者が新規に発見した、植物における Survivin の機能的ホモログと思われる BOR11 および BOR12 の機能解析を進めることで、CPC 複合体の局在制御の解明に取り組むこととした。

3. 研究の方法

BOR11 と BOR12 が植物における Survivin の機能的ホモログであることを証明するために、以下の 3 つの実験を行った。

1) BOR11 と BOR12 の持つ FHA ドメインの機能解明。BOR11 は FHA ドメインを含む N 末だけでセントロメアに局在できたことから、FHA ドメインが Survivin の BIR ドメインのように H3T3ph を認識している可能性がある。そこで、BOR11 と BOR12 が持つ FHA ドメインの、H3T3ph に対する結合能を調べる。まず、in vivo で BOR11 と BOR12 が H3T3ph と結合することを示すために、BOR11-GFP および BOR12-GFP 発現植物体からタンパク質を抽出し、GFP 抗体による免疫沈降を行う。その後、H3T3ph の特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析によって結合を確認する。次に、この in vivo での結合が、FHA ドメインと H3T3ph の直接結合によるものであることを示すために、in vitro での peptide-binding assay を行う。まず、Histone H3 の 1-21 番目のペプチド、およびそのペプチドの T3 をリン酸化したものを人工合成する。それぞれのペプチドの C 末にはビオチンを付加しておき、ストレプトアビジンがコートされた磁気ビーズに結合させる。次に、各 FHA ドメインに GST タグを融合したタンパク質を大腸菌から精製し、先ほどの磁気ビーズと混合する。ビーズを洗浄することで非結合タンパク質を取り除いた後、サンプルをウエスタ

ンプロット解析することで、FHA ドメインが直接 H3T3ph を認識できるかを調べる。

2) BOR11 および BOR12 の生理機能の解明。BOR11 と BOR12 が Survivin の機能的ホモログであると確定するためには、H3T3ph との結合能だけでなく、CPC 複合体の足場タンパク質としての機能を持つことを証明する必要がある。そこで、BOR11 と BOR12 の植物体内での機能を明らかにする。シロイヌナズナの CPC 複合体は生存に必須であるため、構成因子の null 変異体は致死である。また、BOR11 と BOR12 の 2 重変異体も同様に致死であり、機能解析が困難であるため、RNAi による発現抑制株を作製する。同じ足場タンパク質である Borealin の発現抑制株は、BONSAI 表現型と呼ばれる特殊な形態を示し、さらに触媒ユニットである AUR3 のセントロメア局在が減少する。そこで、BOR11 の null 変異体に対し、BOR12 の RNAi を行うことで、同様の表現型を示すことを確認し、BOR11 と BOR12 が Survivin の機能的ホモログであると確定する。

3) BOR11 と BOR12 が Survivin の機能的ホモログであった場合、これら 2 種類のタンパク質が進化の過程でどのように誕生したかを、各生物の持つ Survivin 様タンパク質の配列比較より推定する。

4. 研究成果

1) BOR11-GFP または BOR12-GFP を発現したシロイヌナズナ植物体からタンパク質を抽出し、GFP 抗体による免疫沈降を行ったところ、inner centromere を構成するリン酸化修飾されたヒストン (H3T3ph) が共沈することを確認した。次に、この共沈が BOR1s の持つ FHA ドメインと H3T3ph の直接の結合によるものであることを示すために、in vitro での peptide-binding assay を行った。大腸菌より精製した BOR1s の FHA ドメインと、リン酸化を含まないヒストンのペプチドまたは H3T3ph を含んだヒストンのペプチドとの結合能を調べたところ、BOR1s の FHA ドメインは、リン酸化を含まないヒストンとの結合能も保持しているが、その結合能は H3T3ph により増大することが確認された。これらの結果は、BOR11 と BOR12 が Survivin と同様に CPC 複合体を inner centromere に特異的に局在させる役割を持つことを示唆する。

2) BOR11 と BOR12 が CPC 複合体の足場タンパク質としての機能を持つことを証明するために、シロイヌナズナの BOR11 変異体に対し、BOR12 の RNAi コンストラクトを導入し、BOR1s 発現抑制株を作製した。この BOR1s 発現抑制株は、CPC 複合体活性の低下した植物体と同様に BONSAI 表現型を示した。また、BOR1s 発現抑制株の分裂期における染色体動態を観察したところ、染色体分離がうまくいかない細胞が多数観察された。この時、CPC 複合体の触媒ユニットである AUR3 の細胞内局在を観察したところ、inner centromere への凝集がほとんど観察されないことが分かった。これらの結果より、シロイヌナズナの BOR11 と BOR12 が Survivin の機能的なホモログとして働くことが明らかとなった。

3) BOR1s と Survivin の進化的保存性を調べるために、隠れマルコフモデルを用いた相同性検索を行ったところ、BOR1s と Survivin の持つヘリックス領域 (Borealin 結合領域) は、もともと同一のタンパク質に由来すること、また初期の真核生物はこのヘリックスのみから構成されたタンパク質を保持していたことがわかった。そして、その後の進化の過程で、各生物群において異なる H3T3ph 結合ドメインがヘリックスに付加されるという収斂進化が起こったことが明らかとなった (図 1)。

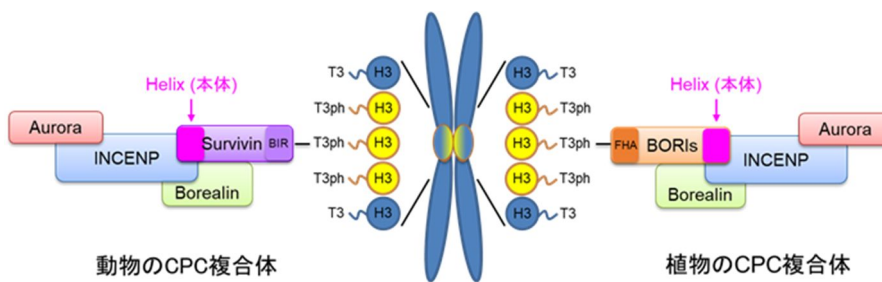


図 1. 動植物の CPC 複合体構成因子

動物と植物の CPC 複合体は、それぞれ Survivin の H3T3ph 認識ドメイン (BIR) と、BOR1s の持つ H3T3ph 認識ドメイン (FHA) によって inner centromere に局在する。本研究によって、Survivin と BOR1s タンパク質の本体であるヘリックス領域は共通祖先を持つことが明らかとなり、収斂進化によって異なる H3T3ph 認識ドメインを獲得したことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komaki Shinichiro, Tromer Eelco C., De Jaeger Geert, De Winne Nancy, Heese Maren, Schnittger Arp	4. 巻 119
2. 論文標題 Molecular convergence by differential domain acquisition is a hallmark of chromosomal passenger complex evolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2200108119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2200108119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小牧伸一郎, Eelco C Tromer, Geert De Jaeger, Nancy De Winne, Maren Heese, 橋本隆, Arp Schnittger
2. 発表標題 分子レベルの収斂進化による染色体パッセンジャー複合体の局在機構
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小牧伸一郎, Eelco C Tromer, Geert De Jaeger, Nancy De Winne, Maren Heese, 橋本隆, Arp Schnittger
2. 発表標題 染色体パッセンジャー複合体の一員である SURVIVIN は収斂進化によって生じた
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ストレス下でも植物の正常な細胞分裂を進めるCPC複合体の局在機構を解明染色体の特定部位に局在して機能
<https://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=2591>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------