

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2012

課題番号：22770040

研究課題名（和文）オーキシンによる細胞周期制御の分子機構の解析

研究課題名（英文）Study on auxin-mediated cell cycle regulation

研究代表者

奥島 葉子（OKUSHIMA YOKO）

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：00432592

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物ホルモンであるオーキシンが細胞周期制御因子の発現調節に果たす役割について検討した。その結果、細胞周期の中心的な制御因子であるサイクリン依存性キナーゼ（CDK）のうち、G2/M 期の進行に重要な役割を持つ CDKB2 の蓄積が、オーキシンシグナルの下流において、転写レベルでの制御に加え、タンパク質分解および安定性の制御によって調節される可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, expression analyses of cell cycle regulators were performed to elucidate the mechanisms underlying auxin-mediated cell cycle regulation. We found that the level of B2-type cyclin-dependent kinase (CDKB2), a major regulator of plant cell cycle progression, is tightly controlled by multiple pathways to maintain the meristem size in developing roots.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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：細胞周期、サイクリン依存性キナーゼ、植物

1. 研究開始当初の背景

植物の器官のほとんどは発芽後に茎頂と根端に存在する分裂組織より形成されるので、植物の成長は、分裂組織およびその周辺での細胞分裂や分化の制御に大きく依存している。従って、植物の成長を制御する機構の理解には、細胞分裂の制御という面から解析を行う必要がある。細胞分裂は細胞周期により厳密に制御されているが、細胞周期の進行に中心的な役割を持つのがサイクリン依存性キナーゼ（CDK）である。CDK は活性

調節サブユニットであるサイクリンと複合体を形成することにより活性化され、様々な基質をリン酸化することにより細胞周期の進行を制御する。植物の細胞周期を直接制御する CDK は CDKA と CDKB の 2 種類である。CDKB は植物特異的な因子であり、さらに CDKB1 と CDKB2 に分類される。このうち CDKB2 は G2 期から M 期にかけて発現し、G2/M 期の制御に重要な役割を持っていると考えられている。また、シロイヌナズナ CDKB2 は N 末端側にタンパク質分解に関わ

る PEST 配列を持ち、実際にプロテアソームを介したタンパク質分解制御を受けることが報告されている。さらに最近、CDKB2 の分解が DNA 損傷ストレスにより促進されることもわかってきた。しかし、通常の成長過程で CDKB2 のタンパク質分解を引き起こすシグナルや、CDKB2 の分解制御が植物の成長過程で果たす役割は明らかではなかった。

オーキシンは、細胞の分裂や伸長を促進する植物ホルモンであり、植物の成長や器官の形成に重要な働きを持つことが知られている。近年、オーキシンが受容体に感知され遺伝子発現レベルでの応答に至るまでの分子機構が解明されつつある。しかし、オーキシンが細胞周期のどの時期にどのような機構で作用するかは分っていない。私たちは、これまでにオーキシンの初期応答を制御する転写因子の下流で転写制御を受ける遺伝子を数多く同定してきたが、その中に細胞周期制御因子は存在しなかった。このことから、オーキシンが細胞周期制御因子のタンパク質レベルの安定性制御を行っている可能性が考えられる。そこで、本研究では、細胞周期進行の中心制御因子である CDK の中でも、分裂領域の決定に特に重要であり、タンパク質分解制御を受ける CDKB2 の安定性がオーキシンによって制御される可能性について検討した。

2. 研究の目的

本研究では、オーキシンによるシロイヌナズナ CDKB2 タンパク質の安定性制御に注目して、その分子機構および生理的意義の解析を行う。これまで、分裂活性の高い領域でオーキシンが蓄積し、そこで細胞周期の進行を促進する因子が発現することは半ば当然の事として認識されてきた面があり、因子の発現制御機構そのものに焦点を当てて解析しようとする研究は少なかった。興味深いことに、酵母や動物ではタンパク質分解を受ける CDK は知られていない。オーキシンが CDKB2 のタンパク質安定性を制御する機構が存在し、それが細胞周期の進行に重要であることが明らかになれば、植物ホルモンによる細胞増殖の制御機構の理解に近づくことになる。そこで本研究においては、オーキシンによる細胞周期の制御の根幹を理解し、それを介した植物の成長制御の機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ CDKA, CDKB1, CDKB2 の植物体における転写及びタンパク質レベルの発現の解析には、それぞれをモニターする GUS レポーターラインを利用した。これらのラインを利用し、オーキシン、およびオーキシシンシグナルの競合阻害剤である

PEO-IAA の添加による GUS 発現の変化を観察し、それぞれの CDK がオーキシンによる発現制御を受ける可能性について調べた。

さらに、根における CDKB2 タンパク質の蓄積様式と、オーキシン蓄積の分布はよく似ていることから、根での CDKB2 の蓄積はオーキシシンシグナルの下流で制御されている可能性が考えられた。そこで、オーキシシンシグナルの下流で根端分裂組織の幹細胞の維持に機能する転写因子、PLETHORA (PLT) が CDKB2 の誘導に関与しているかどうかを調べるため、PLT2 を誘導的に過剰発現させる形質転換系統、*35S:PLT2-GR* に CDKB2 の GUS レポーター系統を導入した系統を作成した。また、オーキシン-PLT 経路の下流で根端分裂組織の維持に働くことが示唆されている HPY2 と CDKB2 の関係は、*pHPY2:HPY2-GFP* レポーター系統の発現様式を CDKB2 のそれと比較することで行った。

さらに、CDKB2 の分解制御を組換えタンパク質を用いて *in vitro* で見る分解アッセイ系を確立した。この *in vitro* 分解アッセイの系に関しては、今後 CDKB2 の分解制御の分子機構を詳細に調べる際にも利用できると思われる。

4. 研究成果

まず、シロイヌナズナ CDKA, CDKB1, CDKB2 のタンパク質レベルをモニターする GUS レポーターライン [*pCDKA:1:CDKA:1-GUS*, *pCDKB1:1:CDKB1:1-GUS*, *pCDKB2:1:CDKB2:1(NT)-GUS*] を使い、タンパク質分解制御を受けるかどうかを調べた。これらレポーターラインをプロテアソームの阻害剤である MG132 を含む培地で生育させたところ、根端分裂組織における *pCDKB2:1:CDKB2:1(NT)-GUS* の発現レベルが上昇することを確認した。このことから、CDKB2 はプロテアソーム依存的なタンパク質分解制御を受けることが示された。一方、MG132 処理による蓄積は *pCDKA:1:CDKA:1-GUS* や *pCDKB1:1:CDKB1:1-GUS* においては観察されなかったことから、プロテアソームを介したタンパク質分解制御は CDKB2 に特異的に起こることが示唆された。さらに、CDKB2 のタンパク質レベルの安定性を *in vitro* 分解アッセイによって調べた。根の粗抽出液を大腸菌で発現させた組換え CDKB2 タンパク質と共にインキュベートしたところ、早期に分解されることがわかった。この分解は MG132 処理により阻害され、また CDKA や CDKB1 は分解の対象とならないことから、CDKB2 はプロテアソーム依存的な分解制御を受けることが確認され、またそれを促進する何らかの因子が根の抽出液に存在するこ

とが示唆された。

次に、オーキシシグナルが CDK のレベルを制御する可能性について検討した。前述の CDKA, CDKB1, CDKB2 それぞれのタンパク質レベルをモニターする GUS レポーターラインを用い、オーキシシグナルの競合阻害剤である PEO-IAA 応答した発現の変化を観察した。その結果、*pCDKA:1:CDKA:1-GUS* および *pCDKB1:1:CDKB1:1-GUS* の発現は PEO-IAA 処理によっても変化しなかったが、*pCDKB2:1:CDKB2:1(NT)-GUS* の発現は PEO-IAA の添加によって顕著に低下することを見出した。PEO-IAA による蓄積量の低下は、処理後 6 時間以内に見られ、プロテアソーム阻害剤である MG132 による処理で抑制されることから、この過程にはユビキチン-プロテアソーム系を介した迅速なタンパク質分解制御が関与していることが示唆される。このようなオーキシシグナルに応答した顕著な発現の変化は他の CDK (CDKA 及び CDKB1) では観察されず、CDKB2 に特異的な制御であった。これらの結果から、オーキシシグナルの抑制により CDKB2 タンパク質の分解が促進される (言い換えれば、オーキシシグナルが CDKB2 を安定化する) 機構の存在が示唆される。従って、オーキシシグナルは CDKB2 のタンパク質レベルの制御を介して、細胞周期の進行を主に G2/M 期移行の過程で制御している可能性が考えられる。

また、*CDKB2* の発現抑制により分裂組織の機能に異常が見られることが報告されている。この知見から、分裂組織の維持にオーキシシグナルを介した *CDKB2* の制御が関わる可能性がある。そこで、根端分裂組織周辺での *CDKB2* の発現を詳細に観察したところ、*CDKB2* タンパク質の発現は根端の分裂領域で強く観察されるが、細胞伸長が始まり、分化した細胞へと移行し始める伸長領域や成熟領域では発現が完全に消失していた。*CDKB2* mRNA の発現は伸長領域でも強く見られることから、伸長領域以降では *CDKB2* のタンパク質の蓄積を抑制する機構があることが推察される。しかし、MG132 処理を行っても、伸長領域以降での *CDKB2* タンパク質の蓄積は見られなかった。このことから、伸長領域における *CDKB2* タンパク質の安定性制御には、プロテアソームを介したタンパク質分解制御ではなく、何か他の機構が関わっていることが示唆された。ここまで観察した、根における *CDKB2* タンパク質の蓄積様式と、オーキシシグナル蓄積の分布 (分裂領域で高く、伸長領域や成熟領域で極端に減少) はよく似ている。このことから、オーキシシグナルを介した *CDKB2* の制御が根の分裂領域の決定にも大きく関与する可能性が示唆された。そこで、*CDKB2* の発現がオーキシ

シグナルの下流で制御されているかどうかを次に調べた。

オーキシシグナルを介して根端分裂組織の幹細胞の維持に機能する因子として、PLETHORA (PLT) ファミリーに属する転写因子群が知られている。オーキシシグナル-PLT 経路により根端分裂組織における *CDKB2* の蓄積が制御されている可能性を調べるため、デキサメタゾン (DEX) の添加依存的に *PLT2* の機能を誘導できる形質転換ライン (*35S:PLT2-GR*) を用いた。*35S:PLT2-GR* ラインに DEX 処理を行うと、根端分裂組織の領域が拡大することが以前に報告されている。この *35S:PLT2-GR* ラインでは、DEX 処理による *PLT2* の異所的な発現に伴って、*pCDKB2:1: GUS* および *pCDKB2:1:CDKB2:1(NT)-GUS* 両方の発現領域が顕著に拡大することが観察された。これら結果より、オーキシシグナル-PLT 経路の下流で *CDKB2* の発現が転写およびタンパク質レベルの両方で誘導されることが示唆された。

前述の通り、MG132 処理によっても伸長領域での *CDKB2* タンパク質の蓄積が確認できなかったことから、*CDKB2* の蓄積はユビキチン-プロテアソーム系による分解制御のみではなく、別のタンパク質レベルの制御機構によっても制御を受けている可能性が考えられた。その制御機構の一つとしてタンパク質の安定化が考えられる。この点に関して、オーキシシグナル-PLT 経路の下流で働くと思われる SUMO E3 リガーゼ、HIGH PLOIDY2 (HPY2) を欠損した *hpy2* 変異体では *CDKB2* の蓄積量が顕著に低下することが報告されている。そこで、*pHPY2:HPY2-GFP* ラインを用いて根における *HPY2* の発現領域を調べた。その結果、*HPY2* の発現領域は *CDKB2* タンパク質の発現領域と非常によく似ていることがわかった。以上の結果から、伸長領域においては *CDKB2* タンパク質は *HPY2* によって SUMO 化されることで安定化制御を受ける可能性が示唆された。

以上の結果をまとめると、根における分裂領域の維持に必要な *CDKB2* の発現は、転写レベルの制御に加え、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解制御、SUMO 化による安定性制御といった複数の経路により厳密に制御されている可能性が示唆された。これら本研究で得られた結果から、増殖シグナルであるオーキシシグナルを介した *CDKB2* 量の制御そのものが根の分裂領域の決定に関与する可能性が提示された。以上の結果は、現在論文投稿中である。

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 4 件)

(1) Nobusawa T, Okushima Y, Nagata N, Kojima M, Sakakibara H, Umeda M. Synthesis of very-long-chain Fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation. PLoS Biol. (2013) 11(4):e1001531. doi: 10.1371 査読有

(2) Jun SE, Okushima Y, Nam J, Umeda M, Kim GT. Kip-related protein 3 is required for control of endoreduplication in the shoot apical meristem and leaves of Arabidopsis. Mol Cells. (2013) 35(1):47-53. 査読有

(3) Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., Kurihara, D., Matsunaga, S., Umeda, M. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. 108 (2011) 10004-10009 査読有

(4) Okushima, Y., Inamoto, I., and Umeda, M. A high concentration of nitrate causes temporal inhibition of lateral root growth by suppressing cell proliferation. Plant Biotechnology 28 (2011) 413-416 査読有

〔学会発表〕 (計 6 件)

(1) Yoko Okushima, Megumi Ikeda, Ayaka Yamasaki, Takashi Nobusawa and Masaaki Umeda. Regulation of cytokinin biosynthesis genes by synthesis of very-long-chain fatty acids in *Arabidopsis* 第 54 回日本植物生理学会年会 2013 年 3 月 岡山

(2) 奥島 葉子、清水 皓平、梅田 正明. シロイヌナズナ CDKB2 の発現制御機構の解析. 第 30 回日本植物分子生物学会大会 2012 年 8 月 生駒

(3) Okushima Y, Simizu K, Umeda M Regulation of B-type CDK accumulation during Arabidopsis root development. The International Symposium of "Strategies of Plants against Global Environmental Change" 2011 年 12 月 倉敷

(4) Okushima Y, Simizu K, Umeda M. Regulation of B-type CDK accumulation during Arabidopsis root development 第 33 回日本分子生物学会年会/BMB2010 2010 年 12 月 8 日 神戸

(5) Nobusawa T, Okushima Y, Umeda M. Synthesis of very long chain fatty acids in the epidermis suppresses overproliferation of cells in Arabidopsis shoot apices 第 33 回日本分子生物学会年会/BMB2010 2010 年 12 月 8 日、神戸

(6) 信澤 岳、奥島 葉子、梅田 正明. 超長鎖脂肪酸を介した植物の形態形成機構 第 23 回植物脂質シンポジウム、2010 年 11 月、宇治

〔図書〕 (計 1 件)

(1) 奥島葉子、梅田正明、共立出版、植物の細胞周期制御 (「植物のシグナル伝達 分子と応答」中) 61-68 2010 年 5 月

〔産業財産権〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥島 葉子 (OKUSHIMA YOKO)

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし