

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 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22770043

研究課題名（和文）

植物細胞の極性を制御する機構の解明

研究課題名（英文） The regulatory mechanisms of plant cell polarity

研究代表者

本瀬 宏康 (Hiroyasu Motose)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：70342863

研究成果の概要（和文）：

植物細胞は移動することができないため、細胞の分裂・伸長・分化の方向や極性が厳密に制御されることで、葉や根などの器官が作られる。本研究では、シロイヌナズナの NIMA 関連キナーゼが微小管の制御を介して植物細胞の分裂・伸長の方向を調節し、器官形成に関わることを示した。また、連続的で方向性のある木部分化に必要な糖タンパク質 xylogen の輸送機構、xylogen ファミリーの発現パターンを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Cell polarity is fundamental to plant development. However, its precise mechanisms are largely unknown. This study revealed that *Arabidopsis* NIMA-related kinases regulate the polarity of cell division and elongation via microtubule organization. In addition, we have characterized the mechanism of xylogen transport and the expression pattern of xylogen family.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子・生理科学

キーワード：細胞極性、細胞分化、細胞分裂、細胞伸長、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

細胞が極性を獲得し、非対称な成長と分化を行うしくみは、多細胞生物の発生に不可欠である。動物の発生過程では、タンパク質リン酸化を介した情報伝達系が極性制御に重要であるが、植物細胞の極性を制御する機構はほとんどわかっていない。

申請者は、植物の細胞極性を制御する新た

な因子を同定するため、表皮細胞が異常な伸長を行い、異所的な突起を形成するシロイヌナズナ *ibo1* 変異体を単離した。*ibo1* は NIMA-related kinase 6 (NEK6) の機能欠損変異体で、NEK6 が異所的な伸長を抑制して細胞の伸長方向を制御することがわかった。また、NEK6 はアルマジロリピート型キネシン (ARK1～ARK3) と結合して働く (Sakai et al. 2008)。

これらのことから、NEK と ARK の複合体が植物細胞の伸長極性の制御に重要であると考えられる。また、申請者の研究から、NEK6 が細胞分裂過程でも機能していることが示唆されている。本研究では、シロイヌナズナの7つの NEK 遺伝子の機能を明らかにし、細胞分裂と細胞伸長における方向制御、および分裂と伸長の協調機構を解明する。

Xylogen は維管束分化を促進し、維管束の連続的な分化に関与する。これまでの研究から、xylogen は細胞の片側に極性輸送され、隣接した細胞の分化を促進すると考えられる。Xylogen は脂質輸送ドメインを持つプロテオグリカンであり、アラビノガラクトサンによる糖修飾を受ける。また、糖脂質の glycosyl phosphatidylinositol (GPI) アンカーが C 末端に付加され、細胞膜の表面に局在した後、GPI アンカーの分解により細胞外に放出されると考えられる。申請者の研究から、GPI アンカー付加が xylogen の輸送に重要であることが示唆されている。本研究では、xylogen の輸送過程や作用機構を解析し、組織分化における方向性制御と細胞間での協調機構を明らかにする。

2. 研究の目的

生物の発生過程では、細胞が方向性を持って分裂・伸長・分化することが不可欠である。植物細胞は細胞壁という外殻を持ち、運動性を失っているため、動物細胞とは異なる独自の機構を発達させていると考えられるが、植物の細胞極性制御については不明な点が多い。本研究では、植物細胞の極性の確立と維持の機構を明らかにするため、細胞分裂と細胞伸長の極性を制御する NIMA 関連キナーゼ (NEK) の機能解析を行う。また、細胞分化における極性制御を明らかにするため、維管束分化を促進し、方向性のある組織分化を実現する xylogen の作用と輸送の研究を行う。

1) シロイヌナズナの7つの NEK 遺伝子の機能解析

最も解析が進んでいる NEK6 について、その下流因子や相互作用するタンパク質を同定し、分子機能を明らかにする。また、NEK キナーゼファミリーの変異体の解析から、植物における NEK の機能と役割分担を明らかにする。

2) Xylogen を主軸とした GPI アンカー型タンパク質の機能解析

xylogen の作用や極性輸送についての研究を主軸として、GPI アンカー型タンパク質の解析を進め、新奇な形態形成の機構を明らかにする。

3. 研究の方法

NEK6-GFP, NEK6-GUS 融合タンパク質を発現するシロイヌナズナを作出し、共焦点顕微鏡観察と発現解析を行った。*nek6* 変異体に GFP-TUB6 を導入し、表層微小管の観察を行った。酵母 2 ハイブリッド法と免疫沈降法により NEK6 と相互作用するタンパク質を同定した。大腸菌で発現させた NEK6 をチューブリンや微小管と混合し、リン酸化アッセイや結合実験を行った。NEK ファミリーのプロモーター-GUS ライン、多重変異体を作成し、発現パターンや表現型の解析を行った。NEK ファミリーの細胞内局在を調べるため、GFP 融合 NEK を発現する系を開発した。

シロイヌナズナの xylogen タンパク質 XYP1, XYP2 に GFP を融合した XYP1-GFP, XYP2-GFP を発現する植物の観察を行った。XYP1-GFP, XYP2-GFP を免疫沈降する方法を開発した。シロイヌナズナの xylogen ファミリーについて、プロモーター-GUS ラインを作成して発現パターンを解析した。植物の xylogen ファミリーをゲノムデータベースから同定し、構造の比較と系統樹解析を行った。GPI 生合成変異体の単離と解析を行った。

4. 研究成果

1) シロイヌナズナ NEK の機能解析

NEK6-GFP, NEK6-GUS 融合タンパク質を NEK6 プロモーター下で発現するシロイヌナズナを作出した。NEK6-GFP, NEK6-GUS は、*nek6/ibo1* 変異体の表現型を回復させるため、機能的な融合タンパク質であることを示した。NEK6-GFP は微小管上の顆粒状構造に局在し、この NEK6 顆粒は微小管上でダイナミックに移動し、衝突や融合を繰り返すことがわかった。

nek6 変異体における微小管動態を観察したところ、*nek6* 変異体では表層微小管が安定化しており、渦巻き状の異常な構造をとることがわかった。この渦巻き状微小管がある領域から、突起が形成された。*nek6* 変異体の突起形成の表現型は、微小管脱重合剤により回復し、微小管安定化剤により促進された。従って、NEK6 は微小管を不安定化し、細胞伸長の極性を制御することがわかった。

NEK6 によりリン酸化されるタンパク質を

試験管内リン酸化アッセイにより探索したところ、NEK6がbeta-チューブリンをリン酸化することがわかった。また、NEK6タンパク質は試験管内で微小管に直接結合した。このことから、NEK6はbeta-チューブリンのリン酸化を介して、微小管を不安定化すると考えられる。

次に、酵母2ハイブリッド法により、NEK6と相互作用するタンパク質を探索したところ、NEK6がNEK6自身と結合すること、他のNEKメンバーであるNEK4、NEK5と結合することがわかった。*nek4 nek6*, *nek5 nek6* 二重変異体では突起形成の表現型が抑圧されることから、NEK6の機能はNEK4, 5を介していると考えられる。実際に、NEK6は微小管上でNEK4, 5と共局在することが明らかになり、NEK6-NEK4, 5の複合体が微小管の調節に関わると考えられる。

NEK6-GUSの発現パターンから、NEK6が伸長中の器官や分裂組織で発現することがわかった。他のNEKファミリーについてもプロモーターGUSラインを観察したところ、分裂組織や維管束など分裂や伸長の盛んな組織で発現していた。また、NEKファミリーの多重変異体では分裂面や細胞列の形成が乱れていた。従って、NEKファミリーは細胞の分裂パターンの制御に関わることが示された。

植物のNEKの機能についてはほとんどわかっておらず、申請者の研究により初めて細胞伸長と細胞分裂の両方を制御することがわかった。また、これらの機能はチューブリンのリン酸化を介していることを突き止めた。今後は、NEKがどのような状況でどの部位をリン酸化しているのか解析することで、NEKによる分裂・伸長の制御機構を明らかにしたい。また、免疫沈降法などにより、NEKが様々なタンパク質と相互作用することを見出しており、その機能的意義についても解析を進める。

2) Xylogen を主とした GPI アンカー型タンパク質の解析

シロイヌナズナのxylogenタンパク質であるXYP1、XYP2にGFPを融合したXYP1-GFP、XYP2-GFPを発現する植物の観察を行った。GPI合成を抑制した場合、XYP1-GFP、XYP2-GFPの蓄積が低下することが示唆された。また、各種輸送阻害剤を投与したところ、XYP1-GFP、XYP2-GFPの分泌が阻害された。特に、Brefeldin A (BFA) 投与ではxylogenがエンドソームにとどまることから、BFA感受性因子が輸送に関わることがわかった。また、XYP1-GFP、

XYP2-GFPの輸送と局在が異常な変異体候補を単離することができ、これらを解析することでxylogenの輸送機構を明らかにしたい。

XYP1-GFP、XYP2-GFPを免疫沈降し、相互作用する因子を探索した。免疫沈降の際の回収率が低いことが判明し、緩衝液の組成や出発材料の調整などを検討した。現在、改良した方法を用いてxylogenと相互作用する因子を探索している。

Xylogenと類似したタンパク質をコードする遺伝子をシロイヌナズナやイネ、コケなどのゲノムデータベースから同定した。これらxylogenファミリーはいずれもアラビノガラクトサン付加部位、GPIアンカー付加配列、脂質輸送ドメインを持ち、よく知られている塩基性脂質輸送タンパク質とは構造が異なっていた。また、シロイヌナズナのxylogenファミリーについて、プロモーターGUSラインを作成して発現パターンを解析したところ、維管束や分裂組織、内皮や内鞘、葯や花粉などで特異的な発現パターンを示した。これらのことから、xylogenファミリーは多様な機能を果たしていると考えられる。

XylogenなどのGPIアンカー型タンパク質は250種以上存在しているが、その機能はわかっていない。我々は、ほぼ全てのGPIアンカー型タンパク質の機能が欠損するGPIアンカー生合成変異体をシロイヌナズナから単離し、解析を行った。これらの変異体では顕著な矮性と生長の遅延、トリコームや根毛の形態異常が見られた。また、セルロース含量が低下していた。これらのことは、GPIアンカー生合成およびGPIアンカー型タンパク質が、セルロースの合成に必要であることを示している。

本研究から、これまで不明であったxylogenの輸送と作用の分子機構について手がかりを得ることができた。また、xylogenファミリーの構造と発現の多様性を明らかにした。更に、GPI生合成変異体の解析から、GPIアンカー型タンパク質のセルロース合成・細胞壁形成における役割が示された。今後もxylogenファミリーを主軸として、GPIアンカー型タンパク質の機能解析を進めることにより、詳細な機能が明らかになることが期待される。

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 6 件)

- ① J. Kakehi, Y. Kuwashiro, H. Motose, K. Igarashi, and T. Takahashi Norspermine substitutes for thermospermine in the control of stem elongation in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 584, 3042-3046 (2010) 査読有 doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.035
- ② Y. Kobayashi, H. Motose, K. Iwamoto, and H. Fukuda Expression and genome-wide analysis of the xylogen-type gene family. Plant Cell Physiol. 52, 1095-1106 (2011) 査読有 doi: 10.1093/pcp/pcr060
- ③ H. Motose, T. Hamada, K. Yoshimoto, T. Murata, M. Hasebe, Y. Watanabe, T. Hashimoto, T. Sakai, and T. Takahashi NIMA-related kinases 6, 4, and 5 interact with each other to regulate microtubule organization during epidermal cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 67, 993-1005 (2011) 査読有 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04652.x
- ④ K. Yoshimoto, Y. Noutoshi, K. Hayashi, K. Shirasu, T. Takahashi, and H. Motose A chemical biology approach reveals an opposite action between thermospermine and auxin in xylem development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 53, 635-645 (2012) 査読有 doi: 10.1093/pcp/pcs017
- ⑤ K. Yoshimoto, Y. Noutoshi, K. Hayashi, K. Shirasu, T. Takahashi, and H. Motose Thermospermine suppresses auxin-inducible xylem differentiation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Signal. Behav. 7, 937-939 (2012) 査読有 doi.org/10.4161/psb.20784
- ⑥ H. Motose, S. Takatani, T. Ikeda and T. Takahashi NIMA-related kinases regulate directional cell growth and organ development through microtubule function in *Arabidopsis thaliana*. Plant Signal. Behav. 7, 1552-1555 (2012) 査読有 doi.org/10.4161/psb.22412

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① H. Motose, J. Kakehi, Y. Kuwashiro, K. Igarashi and T. Takahashi Thermospermine and norspermine are novel suppressors of xylem differentiation. 21st International Conference on Arabidopsis Research,

Yokohama, Japan, July 2010.

- ② H. Motose, Kakehi, J., Kuwashiro, Y., Igarashi, K. and T. Takahashi Thermospermine and norspermine suppress xylem differentiation in vascular plants. International Polyamine Conference, Shizuoka, Japan, August 2010.
- ③ 本瀬宏康、酒井達也、橋本隆、高橋裕一郎、高橋卓 シロイヌナズナNIMA関連キナーゼの機能的重複と多様化. 日本植物生理学会第52回年会 仙台 2011年3月
- ④ H. Motose, K. Yoshimoto, Y. Takahashi, T. Sakai and T. Takahashi NIMA-related kinases redundantly regulate directional cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. 22nd International Conference on Arabidopsis Research, Madison, USA, July 2011.
- ⑤ H. Motose, T. Ikeda, Y. Takahashi, T. Sakai and T. Takahashi NimA-related kinases redundantly regulate cell expansion and stress response in *Arabidopsis thaliana*. 日本植物生理学会第53回年会 京都 2012年3月16-18日
- ⑥ 本瀬宏康、高谷彰吾、池田龍也、酒井達也、高橋卓 NimA関連キナーゼは細胞分裂と器官成長に関与する. 日本植物学会 第76回年会 姫路 2012年9月15-17日
- ⑦ 高谷彰吾、池田龍也、川本望、酒井達也、平山隆志、後藤弘爾、荒木崇、高橋卓、本瀬宏康 NIMA関連キナーゼは花成制御因子FT, TFL1と相互作用する 日本植物生理学会第54回年会 (岡山) 2012年3月21-23日
- ⑧ 本瀬宏康、吉本香織、ウリナ、懸樋潤一、高村浩由、門田功、高橋卓 サーマスペルミン合成阻害剤は道管分化を促進する 日本植物生理学会第54回年会 (岡山) 2012年3月21-23日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www15.atwiki.jp/motosehiroyasu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本瀬 宏康 (MOTOSE HIROYASU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号: 70342863

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋 卓 (TAKAHASHI TAKU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：20271710