

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580127

研究課題名(和文) 高等植物における細胞周期停止因子の新規機能の探索

研究課題名(英文) Search on new function of cell-cycle-inhibitors in higher plant.

研究代表者

三橋 渉 (MITSUHASHI, Wataru)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：50192761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の細胞周期停止因子KRPs (Kip-related proteins)の新規機能を探索するため、シロイヌナズナKRPIに対する結合タンパク質候補に対してKRPIとの結合を in vitro および in vivo で調べた。その結果、1つはプルダウン・アッセイによっても結合が確認された。このタンパク質については酵母 two hybrid法により結合領域も特定できた。また、幾つかの候補タンパク質は細胞内でも結合しているようだった。さらにこうした現象を確認するため過剰発現体株も作成した。

研究成果の概要(英文)：To search on new function of cell-cycle-inhibitor in higher plant, I focused Arabidopsis KRPs (Kip-related proteins). I isolated many candidates for AtKRP-binding proteins by Yeast two hybrid system before the application. In this study, I checked in vitro and in vivo interaction between AtKRP and the candidates. At least, one of candidate could sediment with AtKRP by using pull-down assay. The candidate applied to define the binding area with AtKRP by using yeast-two-hybrid assay system, and the area was defined. Another candidate(s) might be bound with AtKRP in the Arabidopsis culture T87-cells. I also prepared overexpressing-mutant for AtKRP in Arabidopsis plant. Two homo-lines were established for the mutants.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞周期 細胞周期停止因子 kip-related protein シロイヌナズナ 高等植物

1. 研究開始当初の背景

高等植物の細胞周期は細胞周期エンジンとも言われる Cyclin-dependent kinase (CDK)-cyclin 複合体によるターゲットタンパク質のリン酸化によって制御されている。この複合体の阻害タンパク質群として KRP (Kip-related proteins) ファミリーと SIM (SIAMESE および SIM related proteins, SMR) ファミリーの 2 グループが見いだされている。これらは CDK-cyclin 複合体と結合し、CDK のキナーゼ活性を阻害することで細胞周期を Gap1 (G1) 期あるいは Gap2 (G2) 期で止める。KRP 群は発見当初は一過的な細胞周期の停止に関わると考えられていたが、SIM ファミリーが発見され、一過的な停止の一部は SIM ファミリーが、また、KRP 群は例えば KRP6 と KRP7 は花粉形成を制御すること (Nature, 455, 1134, 2008) や KRP6 が根端の静止中心や側根原基においてオーキシンを介したヒストン・アセチル化によって発現制御されていること (PNAS, 107, 10308, 2010) 等が報告され、発生現象における細胞周期調節にも関与しているものとされ始めている。KRP は、また、葉における特殊な発生現象である「補償作用」にも関与している。「補償作用」とは葉原基の細胞増殖能が低下する突然変異において、細胞が異常に肥大化し、結果的に野生型の「器官サイズ」とほぼ同じに保たれる作用のことで、こうした細胞増殖低下突然変異体の原因遺伝子の一つとして KRP2 が見いだされている。これらの現象の報告は「KRP 分子種は細胞周期停止以外にも様々な現象に関与している」ことを示唆していた。

高等植物の初期胚では胚全体で細胞増殖がおり、次いで、球状型胚期に偏差的な細胞増殖が子葉原基において起こり、結果として心臓型が形成される。申請者は胚発生における KRP の役割に興味を持ち、ニンジン体細胞胚から 2 種類の KRP ホモログ (DcICK1, DcICK2) を単離した。DcICK1-mRNA に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、球状型胚表面や後期心臓型胚の子葉原基で顕著なシグナルを観察した。このことは同遺伝子が分裂活性の高い細胞群で高発現していることを示唆している。本来、CDK 活性を阻害する因子が細胞分裂活性の高い組織で発現量が多いことは、生理的には矛盾しているように思われる。この生理的な意味についても解析を進めるため、植物材料には遺伝子情報が豊富なシロイヌナズナを用い、DcICK1 とドメイン構造が類似した AtKRP3 に着目することにした。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、高等植物の細胞周期停止因子 KRPs (Kip-related proteins) の新

規機能を探索するため、シロイヌナズナとニンジン由来の KRP に対して酵母 Two hybrid 法を用い、多数の結合タンパク質候補を選別してきた。本申請ではこれらの候補タンパク質の幾つかについて、KRP との結合を *in vitro* および *in vivo* で確認し、その結合部位についても明らかにする。また、結合の生理学的意味についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AtKRP3 の各種 *in vitro* 発現系の構築
AtKRP3 の大腸菌内での発現には、発現ベクターとして pMAL-c2、pGEX-4-3、pQE30 ベクターを、また、ホスト大腸菌として BL21 派生株である Rosetta, Origami, Rosetta-gami、pG-KJE8 を用い、各種の組み合わせで発現実験を行なった。pG-KJE8 では大腸菌菌体内では発現が認められるものの、シャペロンから遊離されるため、粗抽出液に ATP を添加すると瞬時に分解されることが見られた。種々検討の結果、発現ベクターに pGEX-4-3 を用い、GST タグ融合タンパク質として発現させ、ホスト大腸菌には BL21 派生株である Rosetta 株を使って、10⁷ での誘導を 5 時間行なうことにした。

また、*in vitro* 転写・翻訳系には Brevibachillus 発現系 (Brevibachillus Expression system, Takara)、コムギ胚芽無細胞転写・翻訳系 (PROTEIOS Wheat germ cell-free protein synthesis core kit, Toyobo)、ヨトウガ細胞由来無細胞転写・翻訳系 (Transdirect *insect cell*、島津製作所)、の各種キットを用いた。

(2) AtKRP3 結合候補の *in vitro* 転写翻訳系の構築

AtKRP3 結合候補の *in vitro* 転写翻訳系については予備的に Brevibachillus 発現系、コムギ胚芽無細胞転写・翻訳系、ヨトウガ細胞由来無細胞転写・翻訳系を試み、コムギ胚芽無細胞転写・翻訳系 (PROTEIOS Wheat germ cell-free protein synthesis core kit, Toyobo) で最も良好な結果を得た。方法はキット添付のマニュアルに従った。

(3) *In vitro* 転写翻訳産物の葉緑体移行能の検討

葉緑体の調製はシロイヌナズナ (Col 株) 幼芽生えとシロイヌナズナ由来 T87 培養細胞を材料に用い、氷冷下、ポリトロンで 2~3 秒間破砕し、ミラクロスでの濾過溶液をパーコール・ステップワイズ (二段階) 密度勾配遠心法で、低速遠心で行った。T87 培養細胞の葉緑体は顕微鏡観察で不定形であり、実際、パーコール界面上に回収するのは破壊された葉緑体のみであった。幼芽生えからは無傷葉緑体が単離された。パーコール除去遠心後、単離葉緑体を、コムギ胚芽無細胞系で調製した葉緑体タンパク質を

含む転写翻訳溶液に混合、あるいは、翻訳前の溶液に添加し翻訳を開始、の2通りの方法で輸送させた。葉緑体を再度、一段階パーコール層を通すことで沈殿として再回収し、SDS-PAGE 後、CBB 染色によって検討した。あるいは、タグに対する抗体を持ちいてウエスタン・ブロットングを行なった。

(4) AtKRP3と相互作用候補タンパク質の *in vitro* での結合 AtKRP3 の大腸菌での発現は、pGEX-4-3 ベクターを用い、GST タグ融合タンパク質とした。宿主大腸菌には BL21-Rosetta 株を用い、誘導を 10 で 5 時間行なった。大腸菌を超音波で破碎後、遠心上清にグルタチオン・セファロース 4B を添加し、4 でインキュベートすることで結合させた。遠心後、沈殿として AtKRP3-GST-グルタチオン・セファロース 4B を回収した。

結合候補タンパク質は His-タグ融合タンパク質として発現させるため、全長-cDNA を pQE-30 ベクターに組み込んだ。大腸菌コンピテントセルには XL1-Blue 株を用い、37 で 7 時間培養することで発現させた。菌体破碎後の遠心上清を Ni-NTA アガロースビーズ(QIAGEN)カラムに供した。溶出画分を AtKRP3-GST-グルタチオン・セファロース 4B と混合後、洗浄し、結合の有無を SDS-PAGE で検討した。また、抗 GST 抗体および抗 His-タグ抗体を用いたウエスタン・ブロットングによる検出も行なった。

(5) AtKRP3 と *in vitro* 結合が確認されたタンパク質の結合領域の決定 AtKRP3 と目的タンパク質との結合領域の決定は MATCH MAKER SYSTEM Kit (Clontech) を用いた酵母 Two hybrid 法で行なった。酵母には総キットの AH109 株を用いた。方法はキットのマニュアルに従った。

(6) BiFC 法による AtKRP3 と葉緑体タンパク質の相互作用

AtKRP3 および結合候補葉緑体タンパク質については、全長 cDNA を pUCJ4-eYFPn(又は-eYFPc)に組み込み、シロイヌナズナ T87 培養細胞をプロトプラスト化後、形質転換した。形質転換はポリエチレングリコール溶液中で攪拌することで行なった。形質転換体を NAA 存在下で約 1 日培養し、YFP の再構成による蛍光を指標に結合の有無とその細胞内局在を観察した。観察は共焦点レーザー顕微鏡(ZEISS LMS5 PASCAL、ZEISS)を用いて行なった。

(7) AtKRP3 過剰発現体の作成

pBI211 由来のアグロバクテリウム用ベクターに AtKRP3-CDS-cDNA を導入した。結果的に 35S-プロモータ(配列を有したもので) AtKRP3 をドライブできるような形質

転換体を作成した。遺伝子導入はアグロバクテリウムを用い、バキューム・インフィルトレーション法で果実を形質転換した。結実した種を選択培地で育て、ヘテロ固体を得た。その中から 2 系統を選び、ホモ化した。

(8) CDK-cyclin 結合ドメインを削った AtKRP3 C 過剰発現体の作成

AtKRP3-CDS-cDNA より CDK-cyclin 結合ドメインを除去したようなミュータント-cDNA (AtKRP3 C-cDNA)を調製後、(7)と同様に pBI211 由来のアグロバクテリウム用ベクターに導入した。35S-プロモータ(配列を有したもの)配下で AtKRP3 C-cDNA が過剰発現する形質転換体を作成した。遺伝子導入はアグロバクテリウムを用い、バキューム・インフィルトレーション法で果実を形質転換した。結実した種を選択培地で育て、ヘテロ固体を得た。

4. 研究成果

(1) AtKRP3 の各種 *in vitro* 発現系の構築 AtKRP3 と結合候補タンパク質との *in vitro* での相互作用を調べるため、まず、AtKRP3 タンパク質の *in vitro* 発現系の構築を行なった。AtKRP3 は生体内からの抽出時に分解されやすく、また、大腸菌内での発現もひくく、菌体からの抽出時にも分解される非常に不安定なタンパク質であることから、タグには MBP、His、GST 等、複数の種類を用い、また、宿主大腸菌には様々なシャペロン共発現株等を用い異所発現系の構築を試みた。その結果、GST をタグに用い、発現プラスミドに pGEX-4-3 を、宿主大腸菌に BL21 派生株である Rosetta 株を使って、低温での誘導を短時間行なうことで、少量ではあるが比較的安定した発現を行なうことが可能となった。一方、*in vitro* 転写・翻訳系についても昆虫のヨトウガ培養細胞由来の無細胞系、また、コムギ胚芽由来の無細胞系について試みたが、有意な合成は認められなかった。

(2) AtKRP3 結合候補の *in vitro* 転写翻訳系の構築 AtKRP3 結合候補タンパク質のうち核コード葉緑体タンパク質についてはコムギ胚芽由来の無細胞転写・翻訳系を用い、生産量に差はあるものの合成に成功した。

(3) *In vitro* 転写翻訳産物の葉緑体移行能の検討葉緑体の調製はシロイヌナズナ(Col 株)幼芽生えと T87 培養細胞からパーコール・ステップワイズ密度勾配遠心法で行った。培養細胞は不定形で巨大な葉緑体をもっており無傷葉緑体を安定的に回収することは出来なかった。幼植物体からは葉緑体を調製することができ、コムギ胚芽由来の無細胞転写・翻訳系に添加し、葉緑体への移行を観察した。SDS-PAGE 後のウエス

タン・プロットングでは目的タンパク質の有意な移行は観察されなかった。

(4) AtKRP3と相互作用候補タンパク質の *in vitro* での結合

AtKRP3はGST タグとの融合体として生産し、グルタチオン・セファロースで回収した。セファロースから溶出すると分解が進み、結合状態では安定であった。そこで、グルタチオン・セファロースとの結合状態でプルダウン・アッセイを行なった。対象には核コード葉緑体タンパク質を選び、コムギ胚芽無細胞転写・翻訳系で合成後、グルタチオン・セファロースに結合させた AtKRP3-GST を混合し、遠心により回収した。しかし、電気泳動後の CBB 染色ではこれらの結合は検出できなかった。GST に対する抗体による検出も試みたが、抗体に反応するタンパク質が多数存在しており、種々条件を検討したが、バックグラウンドを下げることはできなかった。

候補タンパク質の幾つかを大腸菌での異所発現系に供したところ、比較的安定して生産できる植物ホルモン関連因子について実験を進めることにした。同タンパク質は C 末の His タグ融合するタンパク質として発現させ、Ni-ビーズで回収後、グルタチオン・セファロースに結合させた AtKRP3-GST に対してプルダウン・アッセイを行なった。その結果、有意な結合が観察された。

(5) AtKRP3 と *in vitro* 結合が確認されたタンパク質の結合領域の決定

AtKRP3 との *in vitro* での結合が確認された植物ホルモン関連因子については、酵母 two hybrid 法により結合領域をアミノ酸で数十個のレベルまで詰めることに成功した。

(6) BiFC 法による AtKRP3 と葉緑体タンパク質の相互作用 AtKRP3 および結合候補葉緑体タンパク質について、全長 cDNA を pUCJ4-eYFPn(又は-eYFPc)に組み込み、シロイヌナズナ T87 培養細胞を形質転換後、YFP の再構成によって生じる蛍光を指標に結合の有無とその細胞内局在を観察した。その結果、いくつかの葉緑体タンパク質において葉緑体に隣接した細胞質中で YFP 蛍光が観察された。

(7) AtKRP3 過剰発現体の作成

AtKRP3-cDNA を 35S-プロモータ(配列を有したもので)ドライブした形質転換体を作成した。遺伝子導入はアグロバクテリウムを用いた。F1 のヘテロ体では AtKRP3 の過剰発現が確認されている。25 年度末までにホモ系統 2 系列を確立した。今後、同系統を利用して、形質および生理学的な観察をすすめ、また、DNA マイクロアレイを用いた発現遺伝子の解析を進めていく。

(8) CDK-cyclin 結合ドメインを削った AtKRP3 C 過剰発現体の作成

CDK-cyclin 結合ドメインを削ることによって、CDK 活性阻害の阻害された、ドミナントネガティブ的に機能すると予想されるミュータン-AtKRP3(AtKRP3 C)の過剰発現体についても作成を行い、F1 種子を採取した。以後、ホモ系統を確立していく予定。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

二村美恵、阿部中央、高橋伸明、豊増知伸、三橋 渉; 高等植物における ABA 信号伝達因子の細胞周期制御系への関与について、日本農芸化学会 2014 年度大会(東京) 2014 年 3 月 28 日発表

関史恵、大熊康仁、高橋伸明、豊増知伸、三橋 渉; 高等植物細胞周期停止因子の分解にオートファージは関与するのか? 日本農芸化学会 2014 年度大会(東京) 2014 年 3 月 30 日発表

[図書](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~molecular-b/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 渉 (MITSUHASHI Wataru)

山形大学・農学部・教授

研究者番号: 50192761