

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840006

研究課題名(和文)オルガネラ核間に存在する細胞周期制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of cell cycle regulation system by organelle signal.

## 研究代表者

小林 勇気 (Kobayashi, Yuki)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：80644616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞ではオルガネラDNA複製(ODR)と核DNA複製(NDR)が協調している。NDRの開始には葉緑体からのテトラピロールシグナルが必要である。しかし、ODR開始の機構は不明である。本研究ではODR開始機構の一端を明らかにするために研究を行った。ODR開始にMAPKが関与することをすでに明らかにしており、このMAPKを特定した。このMAPKは光刺激により活性化された。また、ODR開始にはNDRと同様にテトラピロールシグナルが関与しており、ヘムがODRを誘導することを明らかにした。このことから、光環境変化をMAPKが、ミトコンドリアの状態をヘム蓄積がモニターしODRを開始させる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In plant cells, organelle DNA replication (ODR) is coordinated with nuclear DNA replication (NDR), with ODR preceding NDR during cell cycle progression. We previously reported that the occurrence of ODR is signalled by a tetrapyrrole compound, resulting in the activation of cyclin-dependent kinase and consequent initiation of NDR in red algae *C. merolae*. However, mechanism of ODR initiation is unknown. But, we previously found that MAPK cascade correlate the ODR initiation. In this study, we aimed to clear the mechanism of ODR initiation. We found that MAPK3 activation is correlated with ODR, this activation induced by light illumination. On the other hand, we found that inhibition of tetrapyrrole synthesis caused ODR inhibition, and this ODR inhibition canceled by exogenous heme addition. These observations suggested that change of light environmental and state of mitochondria were monitored by both MAPK3 and intercellular heme accumulation and consequent initiation of ODR.

研究分野：植物生理

キーワード：レトログレードシグナル DNA複製 テトラピロール 植物ホルモン アブシジン酸

## 1. 研究開始当初の背景

現在までに細胞周期に関する研究は数多く行われており、多くの重要な事象が明らかになってきている。しかし、これまでの研究では細胞周期の中心は核であり、葉緑体とミトコンドリアのようにゲノムをもつオルガネラが細胞周期に対してどのような関わりがあるのかを明らかにした例はない。これらのオルガネラは細胞内共生を由来とし、葉緑体は光合成を、ミトコンドリアは呼吸を司り生命維持に不可欠な機能を果たしており、それぞれ独自の複製、転写、翻訳を行う半自立的なオルガネラである。だが形態維持や機能に不可欠なタンパク質因子の多くが核ゲノムにコードされていることから、これらのオルガネラは機能、形態共に核に支配されていると考えられてきた。しかし、近年の研究から葉緑体からのレトログレードシグナルやミトコンドリアからのレドックスシグナルによって細胞全体の機能調節が行われている事が次々と明らかになっており、葉緑体・ミトコンドリアが細胞全体に与えるに影響についての興味が近年高まっている。にもかかわらず、細胞周期とオルガネラとの関係性という視点での研究は現在のところ皆無であった。これは、葉緑体・ミトコンドリアは細胞内に多数存在し分裂を繰り返すため、関係性を見出しづらいことに一因がある。そこで研究代表者は、これらの問題点を解決すべく *Cyanidioschyzon merolae* (以下シゾン) を用いて、細胞周期制御における葉緑体・ミトコンドリアの機能を明らかにするために研究を行ってきた。シゾンは核、ミトコンドリア、葉緑体を各1個ずつしか持たない。さらにオルガネラに含まれるDNAは細胞周期の特定の時期に複製し、オルガネラ自体も順次分裂した後、娘細胞に分配される。さらにすべのゲノムが解読されている。まさに、想定される細胞内共生を開始した当時の細胞

の様であり、他の真核生物では見られない特徴である。

研究代表者はシゾンを用いた解析により細胞周期におけるオルガネラの役割について幾つかの成果を上げている。葉緑体・ミトコンドリアのDNA複製(オルガネラDNA複製: ODR)は核のDNA複製(核DNA複製: NDR)に先んじて行われる。NDRの開始にはODR開始のシグナルが必要である。研究代表者はこのシグナルがレトログレードシグナルの一つとして知られていたテトラピロールの中間体であるMg-Protoporphyrin IX(MgP)であることを明らかにした(1)。シゾンの細胞周期をG1期からS期へ移行させるサイクリン(サイクリン1)はユビキチンリガーゼのサブユニットの一つであるFbx3によって、ユビキチン化され分解されている。しかし、ODRが開始されると細胞内に一過的にMgPが蓄積し、Fbx3と結合する事によってユビキチン化を阻害する事を研究代表者は明らかにした(2)。このためサイクリン1は安定化し細胞周期がS期に移行するためNDRが開始される。さらに研究代表者は高等植物でもMgPが同様にNDR開始を誘導する事を示し、植物一般にMgPがシグナルとして機能する可能性を強く示唆した。この様にオルガネラによるNDR開始機構は分子機構をはじめ多くの事が明らかになってきたが、ODRの開始機構についてはほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

葉緑体とミトコンドリアは進化の過程で、細胞内共生によって誕生し、独自のゲノムと、複製、転写、翻訳機構を持っている。研究代表者らの単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) を用いた解析から、核のDNA複製(NDR)はオルガネラDNA複製(ODR)によって制御されており、葉緑体で

合成されるテトラピロール分子の一種が、シグナルとして働いていることを明らかにした。しかし、ODR の開始を制御する機構については明らかではない。そこで本研究では、ODR の開始機構を明らかにする事を目的とする。

### 3 . 研究の方法

光りによる ODR の開始は光受容体によるシグナル伝達ではなく、光合成電子伝達の変化をモニターしている事、ODR 開始のシグナル伝達に MAP キナーゼ (MAPK) が働いている事、ミトコンドリアで合成される Heme が ODR 開始に関与している事、ODR 開始には未同定なサイクリン CDK の活性化が必要な事等をすでに明らかにしている (未発表)。これらのヒントを元に ODR の開始機構を解明していく。そこで ODR 開始時に活性化される MAPK を特定する。ODR 開始に必要なサイクリン CDK を同定するために、ODR 開始前後の状態のシゾンライセート化し、免疫沈降にて時期特異的に活性化しているサイクリン CDK を特定する。得られた MAPK およびサイクリン CDK はお互いに何らかの相互作用があると考えられるので、相互作用地図を作成する。上記で得られた結果を元に遺伝子破壊株等の形質転換体を作製し、Heme の添加や合成阻害等を行い ODR における MAPK, サイクリン CDK, Heme の関係を明らかにする。

### 4 . 研究成果

本研究では ODR 開始の分子機構を、断片的に得られている情報を元に仮説を立て検証する手法をとっている。仮説を証明する上で必要な解析は、(1) ODR 開始に関わる MAP キナーゼ経路の特定、(2) 未同定なサイクリン CDK の同定、(3) ODR 開始に関わる Heme 機能の同定、(4) ODR 開始機構の活性化機序の解

明の 4 つである。

#### ODR 開始を制御する MAPK と CDK の特定

ODR の開始は MAPK 阻害剤、CDK 阻害剤及びプロテアソーム阻害剤によって阻害されることから MAPK カスケード、CDK とユビキチンリガーゼが関係することがすでにわかっていたので、これらの特定を目指した。ODR 開始時に活性化される MAPK の特定を行った。シゾンには MAPK が 3 つ存在している。MAPK はシグナル伝達の上流である MAPKK によってリン酸化されることで活性化する。そこで、各 MAPK のリン酸化状態とキナーゼ活性を経時的に測定した。ODR 開始時に活性化する MAPK は MAPK3 のみであり、そのため、MAPK3 が ODR に関与する MAPK であると結論した。また、同様に ODR と関連して活性化する CDK の特定を行った。その結果、CDKB が ODR 開始時期に特異的に活性化されることを明らかにした。CDK の活性は結合するサイクリンによって制御されている。相互作用解析の結果から CDKB にはサイクリン A が結合している可能性が示唆された。

#### ODR 開始には光と呼吸が必要

ODR の開始には光のシグナルが必要であり、暗条件では ODR は起こらない。しかし、暗条件下でも MAPK の活性化剤とテトラピロールである heme を添加することで ODR が活性化されることから ODR 開始に heme が必要であることが示唆されていた。今回、MAPK の活性化と Heme がどのような上流シグナルによってもたらされるか検証した。明条件下でもテトラピロールの合成阻害剤を添加することで ODR が阻害された。この阻害は Heme 添加によってキャンセルされた。Heme はミトコンドリアで合成されるため、ミトコンドリアの呼吸活性と Heme が関係あるかを調べるため、呼吸鎖の阻害剤を添加したところ ODR が阻害された。この ODR の阻害はテトラピロール号税阻害剤と同様に Heme 添加によってキャン

セルされた。これらの結果から、MAPK は光のシグナルを、Heme はミトコンドリアの呼吸のシグナルをそれぞれモニターしており、光照射と呼吸活性が揃わなければ ODR が開始されないことが明らかになった。

#### Heme 結合性 F-box タンパクの探索

NDR の開始には、テトラピロール結合性の F-box タンパクによるユビキチン化及び解除によるプロテアソーム型のタンパク分解系が重要な役割を果たしている。プロテアソームの阻害剤は ODR の開始を阻害することから ODR の開始にも NDR と同様にテトラピロール結合性の F-box タンパクによるユビキチン化が関与していると考えた。そこで、Heme 結合能のある F-box タンパクを実験的に探索した結果、Fbx2 が Heme 結合能が有ることが明らかになった。

#### MAPK, CDK, F-box の相互作用

MAPK3、CDKB、サイクリン A、Fbx2 の 4 種でプルダウン法による相互作用を種々の組み合わせで検討したが、CDKB とサイクリン A 以外に明確な相互作用は確認できなかった。このことから、これら 3 種を結ぶ新たな因子が存在している可能性が示唆された(図 1)。新たな因子を探るため、MAPK3、CDKB、サイクリン A、Fbx2 以外で ODR 誘導に関係することが明らかになっている Heme に着目して解析を行った。

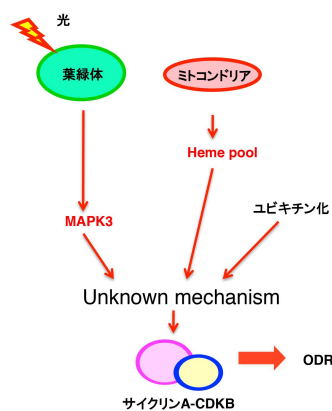


図1. ODR開始の分子機構のモデル

#### 細胞内 Heme 量の変化

ODR 開始には Heme が必要である。そこで、ODR 誘導時に細胞内 Heme の蓄積量がどのように変化するか測定した。しかし、細胞内 Heme 量は、ほぼ一定であった。細胞内で Heme は何らかのタンパクに結合することで、安定に存在している。しかし、近年の研究から、タンパクに結合していないフリーのヘムがシグナル伝達物質として働いていることが示唆されている。そこで、ODR 開始時のフリーヘムを測定したところ、ODR 開始に相関してフリーヘムが一過的に蓄積することが明らかになった。細胞内フリーヘム量の変化は高等植物では、植物ホルモン・アブシジン酸 (ABA) の効果として知られている(3)。そこで、シゾンにおける ABA と Heme の関係について解析を行った。

#### 藻類における ABA の作用

ABA は植物ホルモンとして知られており、高等植物では、気孔の開閉や細胞の休眠・生長抑制、ストレス耐性に働いていることが知られている。しかし、藻類等の単細胞生物での ABA の機能は未だ未知である。単細胞紅藻であるシゾンに ABA を添加したところ、ODR の阻害が確認された。この ODR の阻害は、ABA による Heme 量の変化が関与していると考え、Heme とフリーヘムの量を測定した。その結果、ABA 添加によって Heme 量が一過的に上昇することが明らかになった。しかし、ODR 開始に相関するフリーヘムの一過的上昇が、ABA 添加によって阻害されていた。このフリーヘム蓄積の阻害が、ODR 阻害の原因だと考え、ABA 添加と同時に Heme 添加を行ったところ、ODR が正常に開始された。

#### ABA によるテトラピロールを介した細胞周期制御

次に ABA によって細胞内のフリーヘム量を

調節する因子の探索を行った。その結果、Heme のスカベンジャーである TSPO を見いだした。TSPO は ABA によって発現が誘導されフリーヘムと結合し、フリーヘムの減少を引き起こしていることを幾つかの形質転換株を用いて明らかにした。高等植物では ABA による Heme 量の上昇は、フリーヘムに結合して活性化する ABA 分解酵素の活性化を引き起こし、細胞内 ABA 量の調節に寄与している(3)。この際、過剰に合成されたフリーヘムは活性酸素の発生を誘導するため危険である。このため ABA 添加によってフリーヘムのスカベンジャーである TSPO も発現が誘導され、細胞内のフリーヘム量の調節を行っている。このような高等植物の機構がシゾンにも保存されていることを実験的に証明した。細胞内には一定のフリーヘムのプールが存在しており、ODR 開始のチェックポイントとしても機能している。本来このフリーヘムプールはミトコンドリア呼吸活性の指標として機能していると考えられるが、ABA 添加によって TSPO が過剰にフリーヘムをスカベンジする事によってフリーヘムプールが減少し、ODR の阻害が引き起こされることが考察された(図 2)。

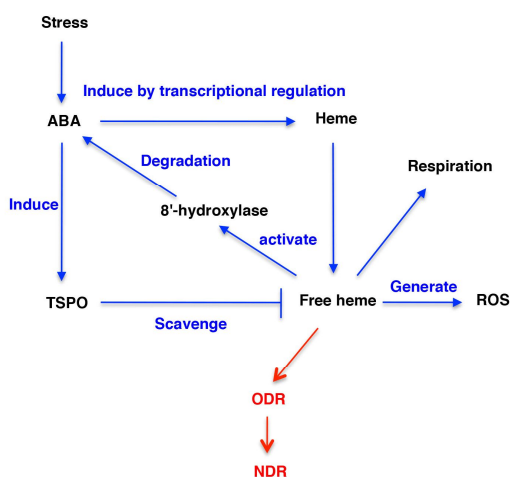


図2. ABAによるODR開始制御の分子機構

### 藻類における ABA の生理的意義

研究代表者は、この様にテトラピロールによる細胞周期制御に植物ホルモンが密接に

関係していることを明らかにした。ABA による ODR 開始の制御が恒常的に起こっているかを明らかにするために ABA の測定を行った。その結果、シゾンにおける ABA は塩ストレス環境下でのみ誘導されることが明らかになった。高等植物では比ストレス環境下でも ABA は合成されており、高等植物と藻類の違いが明らかになった。また、ABA 合成遺伝子を欠失させた形質転換シゾンでは、塩ストレスによる生存率が著しく低下したことから、塩ストレス時に細胞周期を G1 で停止させることで、塩耐性を獲得していることが明らかになった。当初、恒常的に ODR 開始に関与する因子であると期待して ABA の解析を行ったが、ストレス応答時に ODR を介して細胞周期を停止させる機構であった。しかし、藻類における ABA の機能を、生理的意義から分子機構に至るまで明らかにした例は初めてであり、ABA 作用機構の進化や、いまだ未知なタイプの ABA 受容体探索の礎になるであろう。上記の内容は論文にまとめ、現在リバイス中である。

未だ ODR 開始の分子機構については、全容は明らかにはならなかったが、本研究の成果により、ODR 開始機構の解明を大きく進めることができた。その過程でテトラピロールによる細胞周期の制御と植物ホルモンが密接な関係にあることが示され、よりグローバルな研究分野へと発展することが出来るだろう。

### 引用文献

1. Kobayashi et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 803-807.
2. Kobayashi et al. (2011) *Nature Cell Biol.* 13, 483-487.
3. 13. Guillaumot D et al. (2009) *Plant J.* 60, 242-56.

## 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 6件)

1. 第56回日本植物生理学会、Yuki Kobayashi、Hiroyuki Ando、Mitsumasa Hanaoka、Kan Tanaka. Functional analysis of ABA in red algae, 東京農業大学(東京都世田谷区)、2015年3月16日、ポスター
2. 第56回日本植物生理学会、鈴木紀之、小林勇氣、田中寛. 紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の細胞周期制御に関わる MAPK の同定、東京農業大学(東京都世田谷区)、2015年3月16日、ポスター
3. Tokyo Tech-HHU Dusseldorf joint symposium on photosynthesis as a new chemical resource、Yuki Kobayashi. Tetrapyrrole signaling in abscisic acid response、東京工業大学(東京都目黒区)、2015年3月5日、招待講演
4. Tokyo Tech-HHU Dusseldorf joint symposium on photosynthesis as a new chemical resource、Noriyuki Suzuki、Yuki Kobayashi、Kan Tanaka. Analysis of MAPK that relates to organelle DNA replication in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*、東京工業大学(東京都目黒区)、2015年3月5日、ポスター
5. Japan-Finland binational seminar、Yuki Kobayashi、Kan Tanaka. Abscisic acid signaling in a unicellular red alga、定山溪万世閣ホテルミリオーネ(札幌)、2014年10月13日、招待講演

6. 第36回日本分子生物学会、小林勇氣、久保田樹、田中 寛. 紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* においてアブシジン酸はテトラピロール量を制御している、国内学会、神戸ポートアイランド(神戸)、2013年12月4日、ポスター

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 勇氣 (Kobayashi, Yuki)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：80644616