

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440135

研究課題名(和文) 腋芽の成長・休眠を制御する細胞周期制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of cell cycle control during the dormancy to growth transition in axillary buds

研究代表者

佐藤 佐江(志水佐江)(Shimizu-Sato, Sae)

国立遺伝学研究所・実験圃場・特任研究員

研究者番号：90397472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：無傷の植物では、頂芽が優先的に成長し腋芽の成長は抑制されている。この現象は頂芽優勢といわれ植物固有の生き残りの戦略である。本研究では、腋芽の休眠・成長を細胞周期制御機構の観点から解析した。細胞周期を抑制するカギタンパク質である「サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質(ICK)」を同定した。免疫沈降法により休眠腋芽細胞内でICKタンパク質と相互作用するタンパク質群を明らかにした。頂芽切除により直ちに分解されるICKタンパク質はプロテオソーム阻害剤などの影響を受けなかった。これらの結果より、休眠中の腋芽の細胞周期抑制機構の一部が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In intact plants, the terminal bud grows predominantly, while the growth of the axillary buds is suppressed. This phenomenon is called apical dominance, which is a survival strategy in plants. This study is focused on the cell cycle regulation in comparison dormancy with growth in axillary buds. I identified the inhibitor of cyclin-dependent kinase (ICK) protein as a negative regulator in cell cycle control. Immunoprecipitation with anti-ICK antibody showed the protein complex in dormant axillary buds. After decapitation, ICK protein was degraded immediately in axillary buds. The levels of ICK protein were not affected with inhibitors of proteasome. These results suggested a part of molecular mechanisms of cell cycle regulation during the dormancy to growth transition in axillary buds.

研究分野：植物生理

キーワード：頂芽優勢

1. 研究開始当初の背景

無傷の植物では、頂芽が優先的に成長し、腋芽の成長は抑制されている。この現象は頂芽優勢といわれ植物生理学では最も古くから知られている現象の一つである。傷害により頂芽が損傷して成長することが不可能になると、休眠中の腋芽は頂芽に代わって直ちに成長を始める。頂芽優勢は、成長不可能な頂芽の代わりに腋芽が成長を始めるという意味で、植物特有な「生き残り戦術」の一つであるといえる。頂芽優勢の程度は植物種により大きく異なり、植物全体の形を決めている。また、頂芽が花芽に分化すると腋芽の休眠が打破され多くの枝が発達し多くの花・果実をつける植物種もある。このように、頂芽優勢の分子機構は植物全体の生産性に関して重要な要素でもある。

これまで植物ホルモンに着目した多くの研究がなされてきた結果、オーキシン、サイトカイニン、ストリゴラクトンといった植物ホルモンによって頂芽優勢は制御されていることが明らかになってきている。

植物ホルモンが頂芽優勢の分子機構に重要な役割を担っていることは全く疑いの余地はない。しかしながら、植物ホルモンの効果は一般的に多面的であり複雑であることから、植物ホルモンがどのような因子群(情報伝達経路)を介して腋芽の休眠と休眠打破を制御しているかは全く明らかになっていない。腋芽の休眠・休眠打破を言い換えるならば、腋芽細胞の細胞分裂の抑制と進行と捉えることができる。そこで、本研究では、頂芽優勢の分子機構を植物ホルモン側から解析するのではなく、腋芽の細胞周期制御機構という観点から解析しようとしている。

これまでに報告者が明らかにした腋芽の細胞周期制御機構の観点から解析した頂芽優勢の分子機構モデルを図1に示した。細胞周期の進行においてエンジン役(正の因子)のタンパク質の複合体(サイクリン依存性キナーゼとサイクリンDとの複合体、以下CDK/CycDと表記)は休眠中の腋芽及び、頂芽切除により成長を開始した腋芽にも存在した。一方、ブレーキ役(負の因子)のタンパク質(サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質、以下ICKと表記)は、休眠中の腋芽にのみ存在した。動物細胞では、ブレーキ役のICKタンパク質が細胞外からの増殖シグナルを受け取り、細胞周期の休止・進行制御の重要な役割を果たしている事が明らかになっている。これらのことを考え合わせると、腋芽においてもブレーキ役のICKタンパク質が細胞周期の休止・進行のカギとなっており、このICKタンパク質の挙動を解析することにより腋芽細胞の細胞周期抑制機構及び、抑制解除機構の理解に重要な知見をもたらすと考えた。

2. 研究の目的

エンドウ腋芽における細胞周期制御因子 1

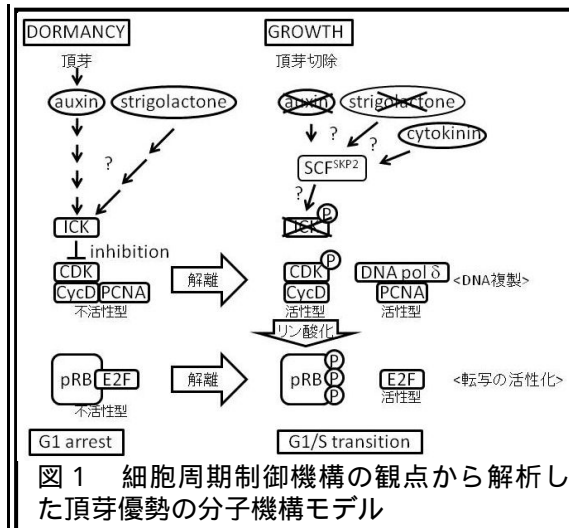


図1 細胞周期制御機構の観点から解析した頂芽優勢の分子機構モデル

つ1つの挙動を明らかにしていくことで、動物の細胞周期制御機構との類似点・相違点を明らかにしながら、腋芽の休眠・休眠打破の制御機構を解明することを目的とする。

動物細胞では、ICKタンパク質はCDK/CycD複合体と直接結合することにより、CDK/CycDキナーゼ活性を阻害し細胞周期が休止している。細胞外から増殖シグナルが来るとICKタンパク質はリン酸化され、核外に運ばれユビキチン-プロテアソーム経路(SCF^{SKP2})を介して素早く分解される。その結果、細胞周期が進行することが知られている。そこで、エンドウICKタンパク質が動物ICKタンパク質と同様の制御機構で腋芽の細胞周期の休止・進行を制御しているのかを解析する。

腋芽は頂端分裂組織から細胞分裂を繰り返しながら分化し、ある一定の大きさまで成長した段階で細胞分裂を休止し休眠する。頂芽切除のシグナルを受け取ると、直ちに細胞分裂の開始と同時に協調的に細胞の分化も開始する。すなわち、腋芽細胞では細胞周期の休止・進行の制御と同時にメリステム活性の休止・活動期への相転移が協調的に起こっている。メリステム活性の最も基本となる制御機構は、受粉後の胚発生時に形成されることが知られている。そこで、受粉直後の胚を用いメリステム活性を作り出している遺伝子ネットワークの解析を行うことにより、腋芽細胞の細胞分裂と協調的に制御されているメリステム活性を司る分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 抗ICK抗体を用いた免疫沈降法によるICKタンパク質とCDK/CycD複合体との分子間相互作用の解析

これまでの解析により調製した抗エンドウICK抗体の特異性を解析する。休眠中の腋芽から調製したタンパク質抽出液から、抗ICK抗体カラムを用いた免疫沈降法により、エンドウICKタンパク質がサイクリン依存性キナーゼやサイクリンDと複合体を形成しているのか調べる。またその逆に当たる p13^{suc1}

タンパク質カラムを用いた免疫沈降法により、CDK/CycD 複合体にエンドウ ICK タンパク質が結合しているか調べる。

(2) ICK タンパク質の特性に関する解析 (ICK タンパク質の酵素活性 (キナーゼ阻害活性) の測定、組織免疫染色法による細胞内局在の解析、ICK リン酸化状態の解析)

CDK/CycD 複合体による pRB タンパク質のリン酸化の阻害活性を解析することにより、エンドウ ICK タンパク質が細胞周期の抑制因子として機能するかどうか調べる。活性型 CDK/Cyclin 複合体は、p13^{SUC1} タンパク質を用いて精製できることが既に知られている。そこで成長中の腋芽から調製したタンパク質抽出液 (細胞分裂が盛んなので、多くの活性型 CDK/Cyclin 複合体が含まれている) から、p13^{SUC1} タンパク質カラムを用いて活性型 CDK/Cyclin 複合体を調製する。次に、³²P-r-ATP を基質にして、調製した活性型 CDK/Cyclin 複合体を用いて、大腸菌に発現させ精製したエンドウ pRB をリン酸化する系を確立する。この反応系に、大腸菌に発現させ精製したエンドウ ICK タンパク質を加えることにより、エンドウ ICK が CDK/Cyclin 複合体によるエンドウ pRB のリン酸化を阻害するか調べる。

³²P-無機リン酸を腋芽に取り込ませた後、抗 ICK 抗体を用いた免疫沈降法及び、ウエスタン・プロット法により、休眠中及び、頂芽切除により成長を開始した腋芽におけるエンドウ ICK タンパク質のリン酸化状態の経時の変化を解析する。

抗 ICK 抗体を用いた組織免疫染色法により、休眠中及び、頂芽切除により成長を開始した腋芽におけるエンドウ ICK タンパク質の細胞内局在経時の変化を解析する。

(3) ユビキチン-プロテアソーム経路に関する解析

動物細胞では、SKP2 は SCF^{SKP2} の F-box タンパク質そのものであり、SKP2 が分解されると、SCF^{SKP2} の分解標的である ICK タンパク質が安定化され細胞周期が休止することが知られている。エンドウ ICK タンパク質がプロテアソーム阻害剤に対してどのような挙動をしめすのか解析する。さらに植物ホルモン、オーキシン、サイトカイニン供与によりどのような挙動を示すのか調べる。

(4) メリステム活性を制御する遺伝子ネットワークの解明

メリステム活性の最も基本となる制御機構は、受粉後の胚発生時に形成されると考えられている。そこで、受粉後 3 日後のイネの胚から調製した mRNA を用いて、発現している遺伝子群を同定することにより、遺伝子ネットワークを明らかにする。

4. 研究成果

近年、地球規模での気象変動や水資源不足などにより、食糧問題はますます深刻化していく中で、植物資源の生産性向上、低炭素社会への技術革新などは急務の研究課題である。植物資源の生産性向上を目指す中で、植物の生産性に直結している「植物の枝分かれ機構の解明」は一つの有力な戦略と考えられる。本研究により得られた成果として、エンドウ ICK タンパク質が休眠中の腋芽の細胞周期に抑制的に働くこと、エンドウ ICK タンパク質の分解により腋芽の細胞周期が進行することが明らかになった (詳細は以下に記述)。このように、腋芽の細胞周期の情報伝達系のステップを一つ一つ上がっていくことで、最終的には植物ホルモンから実働部隊である末端の細胞周期制御因子まで情報伝達系がつながることが今後期待でき、頂芽優勢の分子機構の解明という点で極めて意義が大きいと思われる。

(1) 抗 ICK 抗体を用いた免疫沈降法による ICK タンパク質と CDK/CycD 複合体との分子間相互作用の解析

これまでに調製した抗 ICK 抗体の評価を行った。エンドウの休眠腋芽から調製した抽出液を用いたウエスタン・プロット法による解析結果、27 kDa のサイズに主なバンドを検出した。このことはエンドウ ICK タンパク質を検出できていることを示している。しかし他にもマイナーなバンドも検出され、このことは免疫沈降法による解析に影響を与えることが考えられた。そこで ICK タンパク質を用いて抗原カラムを調製し抗 ICK 抗体を精製した。その結果、特異的に 27 kDa の ICK タンパク質のみを検出可能になった。

次に、抗 ICK 抗体を用いて抗体カラムを調製し、休眠中の腋芽細胞から調製したタンパク質抽出液を用いて、ICK タンパク質を結合している複合体の検出を行った。既に調製してあった抗エンドウサイクリン D 抗体及び、抗エンドウ cdc2 抗体を用い、溶出液に対するウエスタン・プロット法による解析結果、休眠中の腋芽細胞では、ICK タンパク質がサイクリン D タンパク質及び、cdc2 タンパク質と複合体を形成していることが明らかになった。さらに、市販の p13^{SUC1} ビーズを用いて、同様の実験を行った。その結果、休眠中の腋芽細胞内で、cdc2 タンパク質と ICK タンパク質が結合していることが明らかになった。これらの結果は、細胞周期抑制因子である ICK タンパク質が細胞周期進行に関わる CDK/CycD 複合体と結合することにより、休眠中の腋芽の細胞周期を抑制している可能性を強く示唆している。

(2) ICK タンパク質の特性に関する解析 (ICK タンパク質の酵素活性 (キナーゼ阻害活性) の測定、組織免疫染色法による細胞内局在の解析、ICK リン酸化状態の解析)

(1)による解析結果により、エンドウ ICK

タンパク質が CDK/CycD 複合体と結合していることが分かったので、ICK タンパク質のキナーゼ阻害活性について解析を行った。成長を開始した腋芽から調製したタンパク質抽出液を市販の p13^{suc1} ビーズと混ぜ、CDK/Cyclin 複合体を精製した。大腸菌を用いて調製した pRB タンパク質と ³²P-r-ATP とを混ぜて pRB タンパク質のリン酸化状態の検出を試みた。しかしながら、リン酸化された pRB タンパク質を検出することができなかった。おそらく大腸菌内に含まれている脱リン酸化酵素などが反応を阻害している、あるいは p13^{suc1} ビーズで精製している間に CDK/Cyclin 複合体のキナーゼ活性が失活してしまうことなどが考えられた。脱リン酸化酵素阻害剤の添加、より精製度の高い pRB タンパク質の使用、様々なバッファーの検討を行ったがリン酸化された pRB タンパク質は検出できなかった。

エンドウ ICK タンパク質のリン酸化状態の解析を行った。この実験に先立ち、休眠中の腋芽、及び頂芽切除により成長を始めた腋芽における ICK タンパク質の量的変化をウエスタン・プロット法で解析した。その結果、休眠中の腋芽細胞では 27 kDa のバンド、すなわち ICK タンパク質が検出されたが、頂芽切除 2, 3 時間後には ICK タンパク質量の減少がみられ、12 時間後には完全に消失していた。この結果は、ICK タンパク質が休眠中に腋芽細胞の細胞周期の抑制機構に機能しており、頂芽切除のシグナルによって、ICK タンパク質の分解が誘導され、腋芽の細胞周期が進行していくことを強く示唆している。次に、³²P-無機リン酸を腋芽に取り込ませた後、抗 ICK 抗体を用いた免疫沈降法及び、ウエスタン・プロット法による解析結果、休眠中の腋芽細胞では、ICK タンパク質はリン酸化されていないことが明らかになった。成長中の腋芽ではリン酸化された ICK タンパク質を検出することができなかったが、リン酸化されると直ちに ICK タンパク質が分解されたためと考えられた。なお、ポジティブコントロールとして pRB タンパク質のリン酸化状態を解析し、pRB タンパク質は、休眠中の腋芽細胞では低リン酸化状態であり、成長を開始した腋芽細胞では高リン酸化状態であることを示した。

抗 ICK 抗体を用いたエンドウ ICK タンパク質の組織免疫染色法による細胞内局在の解析の結果、休眠中の腋芽細胞内で、ICK タンパク質は核に局在しているように観察された。しかしながら、シグナルが弱いため別の方法による確認実験が必要であると考えている。

(3) ユビキチン-プロテアソーム経路に関する解析

(2)による解析結果で、頂芽切除後、ICK タンパク質が直ちに分解されることが明らかになったので、その分解の分子機構にユビキチン-プロテアソーム経路が関わっている可能性を解析した。休眠中の腋芽に幾つかのプ

ロテアソーム阻害剤を供与し、その後、頂芽切除を行い、成長を始めた腋芽からタンパク質抽出液を調製、抗 ICK 抗体を用いたウエスタン・プロット法で ICK タンパク質量の変化を解析した。その結果、プロテアソーム阻害剤供与の有無に関わらず、頂芽切除後 ICK タンパク質は直ちに分解された。様々な条件検討を行ったが、同様の結果が得られたのでエンドウ ICK タンパク質はユビキチン-プロテアソーム経路によらずに分解されると考えた。

(4) メリステム活性を制御する遺伝子ネットワークの解明

腋芽細胞では細胞周期の休止・進行の制御と同時にメリステム活性の休止・活動期への相転移が協調的に起こっている。メリステム活性の最も基本となる制御機構は、受粉後の胚発生時に形成されることが知られている。そこで、受粉 3 日後の胚を用いメリステム活性を作り出している遺伝子ネットワークの解析を行うことにより、腋芽細胞の細胞分裂と協調的に制御されているメリステム活性を司る分子機構の解明を試みた。その結果、幾つかの転写因子がメリステム活性に関与していることが明らかになった(発表論文 1)。

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 1 件)

1. Jun-Ichi Ito, Yutaka Sato, Yutaka Sato, Ken-Ichiro Hibara, Sae Shimizu-Sato, Hiromi Kobayashi, Karen A. Sanguinet, Nobukazu Namiki, and Yoshiaki Nagamura.

“Genome-wide analysis of spatiotemporal gene expression patterns during early embryogenesis in rice.”

Development

査読有

vol. 143,

2016,

p1217-p1227,

DOI, 10.1242/dev.123661

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤（志水） 佐江（Shimizu-Sato Sae）
国立遺伝学研究所・実験圃場・特任研究員
研究者番号：90397472

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()