

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650099

研究課題名(和文) サイトカニンによる細胞分裂の活性化に関わるCDKフォスファターゼの解析

研究課題名(英文) Analysis of Cdc25-like phosphatases involved in cytokinin-induced cell division

研究代表者

梅田 正明 (UMEDA, Masaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80221810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物や酵母のCdc25フォスファターゼは、細胞周期のG2期からM期への移行に重要な機能を持っているが、植物にはCdc25のオルソログはないとされている。そこで、本研究は、植物が持つCdc25様フォスファターゼの特徴付けを行うことを目的として行った。シロイヌナズナ及びゼニゴケを用いた解析から、植物のCdc25様フォスファターゼはG1～S期の進行制御に関与すること、また動物や酵母のCdc25と起源を同じくしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cdc25 is a protein phosphatase that plays an important role in controlling the G2-to-M transition in animals and yeasts. However, no orthologous gene has been identified in plants. In this study, we aimed to characterize Cdc25-like phosphatases in plants. Our analyses using *Arabidopsis thaliana* and *Marchantia polymorpha* suggested that plant Cdc25-like phosphatases are associated with cell cycle progression from the G1 to the S phase, and that they are originated from the same ancestor as animal and yeast Cdc25.

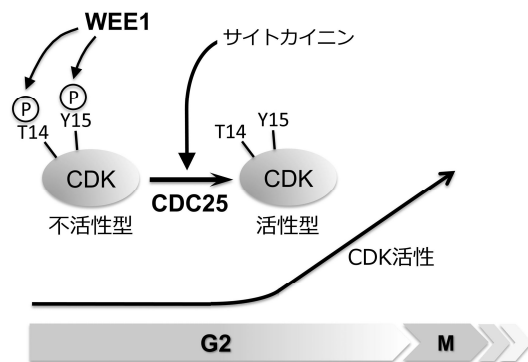
研究分野：植物分子生物学

キーワード：細胞周期 サイクリン依存性キナーゼ 植物ホルモン ゼニゴケ

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物や酵母において、G2 期から M 期への移行には、Cdc25 フォスファターゼによるサイクリン依存性キナーゼ(CDK)の脱リン酸化が重要な役割を果たすことが知られている。しかし、植物にはそのオルソログが存在しないとされており、その代わりに G2/M 期で発現する B 型 CDK が CDK 活性の上昇に寄与すると考えられている。しかし、酵母の *Cdc25* を植物に導入すると表現型が見られること、また CDK の脱リン酸化部位は植物でもよく保存されており、その部位をリン酸化するキナーゼも存在することから、Cdc25 様の機能を有するフォスファターゼが植物にも存在する可能性は未だ残されている。

(2) 植物細胞の同調系を用いた実験から、G2/M 期の進行におけるサイトカニンの要求性が酵母の *Cdc25* の導入により相補されるといった結果が得られている。これは、サイトカニンが Cdc25 を介して G2/M 期進行を制御していることを示唆しており、植物ホルモンによる細胞分裂制御という観点から、Cdc25 様フォスファターゼの機能解明は大変重要であると考えられる。



2. 研究の目的

本研究ではシロイヌナズナの *Cdc25* 様フォスファターゼを同定することを目的として、動物の *Cdc25* 特異的阻害剤を用いた解析を行った。また、基部陸上植物であるゼニゴケを用いて、動物及び植物タイプの *Cdc25* の機能解析を行うことにより、植物の *Cdc25* 様フォスファターゼの進化的起源について理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 動物の *CDC25* 特異的阻害剤である NSC663284 がシロイヌナズナに与える影響を観察した。EdU の取り込みを観察することで S 期への進行を定量化し、当研究室で開発した細胞周期マーカー-Cytrap を用いて細胞周期進行をモニタリングした。また、これらの解析には、Cdc25 が脱リン酸化する部位をリン酸化するキナーゼ Wee1 の変異体も用いた。

(2) ゼニゴケの *Cdc25* オルソログを探索し、*promoter-GUS* レポーター遺伝子を作成して組織レベルの発現解析を行った。また過剰発現体及びノックアウト変異体を作成し、特に葉状体に着目して表現型を観察した。さらに、分裂酵母の *cdc25* 温度感受性変異株を用いて相補実験を行い、ゼニゴケの遺伝子が酵母の *Cdc25* と似たような機能を持っているかどうか解析した。

4. 研究成果

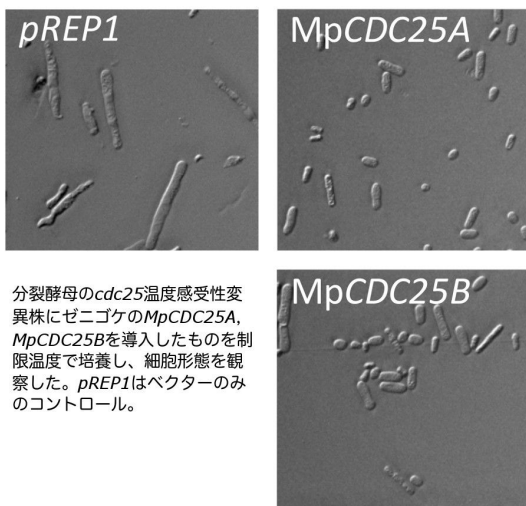
(1) シロイヌナズナの根に *CDC25* の特異的阻害剤である NSC663284 を処理し、細胞周期進行について解析したところ、主に G1/S 期で進行阻害が起きていることが明らかになった。動物・酵母の *Cdc25* は G2 期から M 期への移行に重要な役割を持っているので、この結果は予想外のものであった。そこで、*Cdc25* の標的アミノ酸をリン酸化する Wee1 キナーゼの変異体について解析したところ、この変異体は NSC663284 処理に耐性を示すことが明らかになった。この結果は、NSC663284 の作用点確かに Wee1 によるリン酸化部位にあることを示唆している。近年の研究により、シロイヌナズナの Wee1 は細胞分裂の制御よりも、むしろ DNA 複製の制御に関与する可能性が指摘されている。したがって、*Cdc25* も G2/M 期よりも G1~S 期の制御に関わっていて不思議ではない。今後は DNA 複製の観点から、シロイヌナズナの *Cdc25* が S 期の進行制御にどのように関与しているかを解析する必要がある。

(2) ゼニゴケのゲノム配列から動物や酵母の *Cdc25* と相同性を持つ配列を探索したところ、2 つの遺伝子を見出すことができた。1 つは動物の *Cdc25* と比較的高い相同性を持つ遺伝子で、もう 1 つは植物で最初に *Cdc25* として報告され、その後ヒ素代謝に関わるとされた遺伝子である。我々は前者を *MpCDC25A*、後者を *MpCDC25B* と名付けた。動物タイプの *Cdc25* と植物タイプの *Cdc25* を併せ持つ生物は他に知られていないので、ゼニゴケにおいてこれらの比較解析を行うことにした。

(3) *promoter-GUS* レポーター遺伝子を作成して、*MpCDC25A*、*MpCDC25B* の発現部位について調べたところ、メリステムや無性芽杯、中肋などで発現が観察された。そこで、まず各々の過剰発現体を作成して、葉状体の観察を行ったところ、系統によっては細胞サイズが大きく、細胞数が減少しているものがあることが明らかになった。しかし、細胞分裂が活性化しているような過剰発現体は得られなかった。また、相同組換えによりノックアウト変異体も作成したが、いずれも目立った表現型は示さなかった。今後は *MpCDC25A*、*MpCDC25B* の両者をノックアウトした変異体を作成し、表現型を解析する

必要がある。

(4) 分裂酵母の *cdc25* 温度感受性変異株に *MpCDC25A* 及び *MpCDC25B* を導入したところ、両遺伝子とも高温での相補活性は示さなかったものの、若干低い温度で相補活性を示した。細胞形態から、分裂活性が上昇して相補したと考えられること、また同様な弱い相補活性はシロイヌナズナの *Cdc25* でも観察されたことから、植物タイプの *Cdc25* も動物や酵母の *Cdc25* と起源を同じくしていることが示唆された。



分裂酵母の *cdc25* 温度感受性変異株にゼニゴケの *MpCDC25A*, *MpCDC25B* を導入したものを制限温度で培養し、細胞形態を観察した。 *pREP1* はベクターのみのコントロール。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Sugamata Aki, S. and Umeda, M. Cytrap marker systems for *in vivo* visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Methods Mol. Biol.* 1370: 51-57, 2016. 査読無
DOI: 10.1007/978-1-4939-3142-2_4

Takatsuka, H. and Umeda, M. Epigenetic control of cell division and cell differentiation in the root apex. *Front. Plant Sci.* 6: 1178, 2015. 査読有
DOI: 10.3389/fpls.2015.01178

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., Leviczky, T., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J. H., Hauser, M.-T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bögre, L. and Ito, M. Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* 34: 1992-2007, 2015. 査読有
DOI: 10.15252/embj.201490899

Takatsuka, H., Umeda-Hara, C. and Umeda,

M. Cyclin-dependent kinase-activating kinases CDKD;1 and CDKD;3 are essential for preserving mitotic activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 82: 1004-1017, 2015. 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12872

Yin, K., Ueda, M., Takagi, H., Kajihara, T., Sugamata Aki, S., Nobusawa, T., Umeda-Hara, C. and Umeda, M. A dual-color marker system for *in vivo* visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 80: 541-552, 2014. 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12652

Takahashi, N. and Umeda, M. Cytokinins promote onset of endoreplication by controlling cell cycle machinery. *Plant Signal. Behav.* 9: e29396, 2014. 査読有
DOI: 10.4161/psb.29396

〔学会発表〕(計5件)

高橋直紀、藤本啓介、梅田正明、Maintenance of genome integrity in root stem cells under DNA stress、第57回日本植物生理学会年会、2016年3月18日～20日、岩手大(岩手県盛岡市)

高橋直紀、丸池加奈子、高塚大知、梅田正明、根端分裂組織のサイズ制御機構、日本植物学会第79回大会、2015年9月6日～8日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市中央区)

安喜(菅又)詩織、三神達也、西浜竜一、河内孝之、梅田正明、Functional analysis of cytokinin response regulators in *Marchantia polymorpha*、第56回日本植物生理学会年会、2015年3月16日～18日、東京農業大(東京都世田谷区)

安喜(菅又)詩織、三神達也、西浜竜一、河内孝之、梅田正明、Functional analysis of cytokinin response regulators in *Marchantia polymorpha*、Marchantia Workshop 2014、2014年12月8日～10日、神戸大(兵庫県神戸市)

安喜(菅又)詩織、高木瞳、Ke Yin、梅田(原)千景、植田美那子、梅田正明、Visualization of cell cycle progression using S/G2- and G2/M-specific markers、Auxins and Cytokinins in Plant Development International Symposium 2014、2014年6月29日～7月4日、プラハ(チェコ)

〔その他〕

植物成長制御研究室ホームページ
<http://bsw3.naist.jp/umeda/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 正明 (UMEDA, Masaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授

研究者番号：80221810