

平成21年 6月10日現在

研究種目：基盤研究（A）（一般）  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17207006  
 研究課題名（和文） 微小管端ダイナミクスとナノレベルの構造からみた陸上植物の微小管形成機構の進化  
 研究課題名（英文） Evolution of microtubule organizing system in land plants in terms of dynamics and nano-structures of microtubule ends  
 研究代表者  
 氏名：峰雪 芳宣（MINEYUKI YOSHINOBU）  
 所属研究機関・部局・職名：兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
 研究者番号：30219703

## 研究成果の概要：

動物は微小管形成の制御装置として中心体を持つが、植物は中心体なしで微小管形成を行っている。本研究では、微小管の重合開始に必要な $\gamma$ チューブリン分子と $\gamma$ チューブリンが作る微小管端のキャップ構造に注目して、植物特有の微小管形成システムは何かを調べた。その結果、被子植物ではキャップ構造が不安定なことが示唆できた。また、コケ・シダ・裸子植物で保存され、被子植物で変化する $\gamma$ チューブリン分子表面に存在する十数個のアミノ酸が見つかった。キャップ構造の安定性と $\gamma$ チューブリン構造の変化との関係は今後の課題となった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	18,300,000	5,490,000	23,790,000
2006年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	39,600,000	11,880,000	51,480,000

研究分野：生物学、植物形態学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：(1) 植物 (2) ナノマシン (3) 細胞・組織 (4) 生体分子 (5) ガンマチューブリン (6) 微小管形成中心 (7) 電子線トモグラフィー

## 1. 研究開始当初の背景

なぜ植物は中心体を持たないのに細胞分裂が正常に行われるのか？この古典的な細胞学の問題は未解決である。動物の中心体には、中心粒の周りに微小管形成の核になる $\gamma$ チューブリン・リング複合体が多数存在し、微小管のマイナス端は $\gamma$ チューブリン・リング複合体でキャップされている。植物でも $\gamma$ チューブリンが微小管形成中心(microtubule

organizing center: MTOC)として機能していると考えられているが、詳細は不明である。我々は加圧凍結法で組織を瞬時に凍結し、凍結置換・樹脂包埋後、電子線トモグラフィー法でナノレベルで立体的に観察し、高等植物の微小管端に $\gamma$ チューブリン・リング複合体と思われるキャップ構造を観察した。これは、高等植物でも $\gamma$ チューブリン・リング複合体が MTOC として働いていることを示唆して

いる。動物やカビの MTOC は 1 点に集中しているが高等植物では MTOC は分散して存在する。コケの仲間では、中心体を持つ動物型の MTOC から高等植物型の分散した MTOC まで、様々な MTOC が知られているが、これらの MTOC と思われる場所には、常に  $\gamma$  チューブリンが局在している。そのため、陸上植物の進化過程で見られる MTOC を  $\gamma$  チューブリンに注目して調べることで、高等植物特有の微小管形成システムはどのようなものか、また、どのように作られて来たかのヒントが得られる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ライブイメージング法と加圧凍結・電子線トモグラフィー法を併用した微小管端の解析と、 $\gamma$  チューブリン分子に注目した構造、機能解析を通じて“なぜ陸上植物は中心体なしの微小管形成システムを構築するようになったのか”という疑問に答えるヒントを得ることを目的とする。具体的には、(1) 高等植物特有の微小管形成の仕組みはどのようなものか、(2) 陸上植物の進化の過程で  $\gamma$  チューブリンの構造と進化がどのように変化して来たかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ナノレベルの構造解析：加圧凍結装置で組織を瞬時に凍結し、凍結置換後 Spurr 樹脂に包埋、250 nm 厚の切片を作製、コロラド大学と大阪大学の超高压電子顕微鏡あるいは加速電圧 300kV の電子顕微鏡を使って、+60 度から -60 度まで試料を傾けながら連続画像を取得し、IMOD ソフトでトモグラムを作製、解析した。

(2) ライブイメージング：微小管および関連分子のダイナミクスの観察には、共焦点レーザー顕微鏡システム (C1, Nikon) と TIRF 光学系システム (Nikon) を一つの倒立顕微鏡に装備した顕微鏡を使用した。対物レンズは N.A.1.2, x60 の水浸、あるいは N.A.1.49, x100 の油浸レンズを使用した。

(3)  $\gamma$  チューブリンの構造の解析：裸子植物 (イチョウ、ソテツ、スギ、マオウ)、シダ植物 (ホウライシダ)、緑藻 (オオシャジクモ) の  $\gamma$  チューブリン cDNA からアミノ酸配列を決定した。材料の提供などで二村典宏、篠原健司 (森林総合研)、岡田岳人、関田節子 (徳島文理大)、新免輝男 (兵庫県大)、嶋村正樹 (広島大)、紅朋浩 (名大)、三村敏郎 (神大)、和田正三 (九大) 博士から協力を頂いた。

(4)  $\gamma$  チューブリンの機能の解析：植物  $\gamma$  チ

ューブリンが分裂酵母  $\gamma$  チューブリンの機能をどの程度相補できるかを調べるため、分裂酵母の  $\gamma$  チューブリン遺伝子を破壊し、プラスミドで  $\gamma$  チューブリン遺伝子を発現させた分裂酵母株を用い、分裂酵母  $\gamma$  チューブリンの代わりにシロイヌナズナ、イチョウ、オオシャジクモ  $\gamma$  チューブリンを発現する株を作製し、成長速度と細胞形態を観察した。また、これらの株には、あらかじめ GFP を tubulin 遺伝子に導入しておき、GFP の蛍光で微小管の分布を観察した。

## 4. 研究成果

(1) 電子線トモグラフィー法による微小管端のキャップ構造の解析：蛍光ラベルした分子のライブイメージングの研究から、動物の中心体に存在する微小管端は比較的安定なものに対し、高等植物の間期表層微小管では、新しく重合した微小管のマイナス端は不安定で、すぐに重合・脱重合を開始することが報告されていた。そこでまず、加圧凍結したタマネギ子葉表皮を用い、電子線トモグラフィー法で比較的大きな領域の細胞表層がナノレベルで立体観察できるトモグラムを作製した (図 1)。これにより、一つのトモグラムで 30~50 個の微小管端の構造を区別できるようになった。これを使ってタマネギ子葉表皮の微小管端の構造を定量解析した結果、微小管端が  $\gamma$  チューブリン・リング複合体と思われる構造でキャップされているものは、間期表層微小管で 10% 弱であった。これは、植物微小管は両端で重合・脱重合しながら移動するという考えと一致していた。

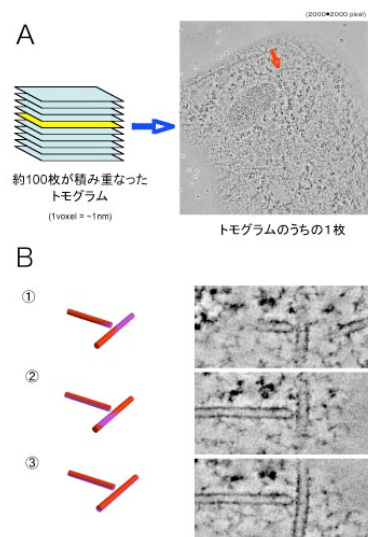


図 1. トモグラムからの微小管端の検出方法

(A) のトモグラムの切片像 (A 右) の矢印の部分拡大し、(B) に示す方法で立体的に回転して微小管端のキャップ構造を検出できる (B 右)。A 右図は 1 pixel が 1 nm で、2000 pixel x 2000 pixel の画像。

(2) 緑色植物 $\gamma$ チューブリンの構造と機能の比較：陸上植物、特に、進化の過程で中心体が消失する時期に当たる裸子植物に注目して、 $\gamma$ チューブリンの構造変化が陸上植物の微小管構築システムの変遷と関連あるのかどうか調べた。その結果、中心体のない植物（スギ、マオウ）も中心体のある植物（イチョウ、ソテツ）も、 $\gamma$ チューブリンのアミノ酸配列ではともに被子植物よりもシダ・コケ植物に近いことが分かった。コケ・シダ・裸子植物で保存され、被子植物で変化する $\gamma$ チューブリンのアミノ酸残基が十数個あった。これらのアミノ酸残基は分子表面に存在するため、これらのアミノ酸の変化が $\gamma$ チューブリン・リング複合体（キャップ構造）の安定性に影響を与える可能性が考えられた。一方、分裂酵母の $\gamma$ チューブリン遺伝子を高等植物シロイヌナズナの $\gamma$ チューブリン遺伝子と入れ換えた形質転換分裂酵母を作製すると、温度条件によってその生育速度と形態が変化し、高等植物 $\gamma$ チューブリンは完全には分裂酵母 $\gamma$ チューブリンの機能を相補することができないことが分かっている（図2左）。そこで、この手法を用いて、注目しているアミノ酸の変化から考えて、被子植物と構造が異なっていると予想できる裸子植物イチョウと緑藻シャジクモの $\gamma$ チューブリンが分裂酵母 $\gamma$ チューブリンの機能を相補できるかどうか調べた。その結果、分裂酵母の $\gamma$ チューブリン機能の一部が、陸上植物の進化の過程で徐々に失われて来たことが分かった（図2）。

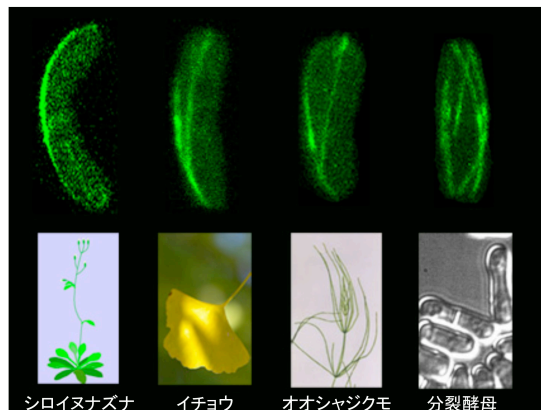


図2. 植物 $\gamma$ チューブリンを発現させた分裂酵母微小管 左から、シロイヌナズナ、イチョウ、オオシャジクモ、分裂酵母の $\gamma$ チューブリンを発現させた株。上段は発現株の間期微小管の様子を示す。分裂酵母の間期微小管は数本の束となって存在するが、左端の株では1本の太い束になり、先端成長が異常になり、細胞の形も変形する。下等植物になるほど、徐々にこの異常が少なくなる。

(3) ライブイメージング法の検討：微小管のダイナミクスを観察する目的で、共焦点レーザー顕微鏡とTIRF光学系システムを一つのソフトで制御するシステムの構築を試みた。その過程で、二つの光学系にズームレンズ等を組み込むことで、約5倍の大きさの異なる像を得られることが分かった。これらの像を交互に撮影して観察することを試みたが、実用化できる形にするには、更なる改良が必要なことが判明した。そこで、新たに本計画とは別のプロジェクトを立ち上げ、昨年度後半から開発を開始した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

- ① Karahara, I., Suda, J., Staehelin, L.A., and Mineyuki, Y. (in press). Quantitative analysis of vesicles in the preprophase band by electron tomography. *Cytologia*. 査読無
- ② Karahara, I., Suda, J., Tahara, H., Yokota, E., Shimmen, T., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelin, L.A., and Mineyuki, Y. (2009). The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. *Plant J.* 57, 819-831. 査読有 10.1111/j.1365-313X.2008.03725.x
- ③ Mineyuki, Y. (2007). Plant microtubule studies: past and present. *J. Plant Res.* 120, 45-51. 査読有 10.1007/s10265-006-0063-y
- ④ Suzaki, E., Nomura, R., Horio, T., Mineyuki, Y., and Kataoka, K. (2007).  $\gamma$ -Tubulin-like molecules in the mouse duodenal epithelium. *Histochem. Cell Biol.* 128, 175-182. 査読有
- ⑤ 唐原一郎, 須田甚将, 峰雪芳宣. (2007). 電子線トモグラフィーとは何か: ナノスケールでの3Dバイオイメージング. *細胞工学* 26, 696-701. 査読無
- ⑥ Mineyuki, Y., and Shimamura, M. (2005). Membrane-associated microtubule-organizing centers in basal land plants. *Cytologia* 70, i-ii. 査読無

〔学会発表〕(計17件)

- ① Miyamoto, Y., Horio, T., Yamauchi, D., Okada, T., Sekita, S., Futamura, N., Shinohara, K., Fujimoto, Y., Nakai, T., Shimmen, T., Shimamura, M., Akashi, T., and Mineyuki, Y. Changes in function and amino acid residues of  $\gamma$ -tubulin in the evolution of green plants. 第61回日本細胞生物学会大会 2009年6月2日~4日(名古屋市).
- ② Karahara, I., Suda, J., Tahara, H., Yokota, E., Shimmen, T., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelein, L.A., and Mineyuki, Y. Electron tomographic analysis of the plant cell cortex: The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis. Asia-Pacific Congress on Electron Tomography, Jan.31- Feb.4, 2009 (Brisbane, Australia).
- ③ Takeuchi, M., Karahara, I., Kajimura, N., Takaoka, A., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelein, L.A., and Mineyuki, Y. Electron tomographic analysis of microtubule-microfilament interactions in the epidermal cell cortex of high pressure frozen cotyledons. Asia-Pacific Congress on Electron Tomography, Jan.31- Feb.4, 2009 (Brisbane, Australia).
- ④ Karahara, I., Suda, J., Masuta, Y., Tahara, H., Yokota, E., Shimmen, T., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelein, L.A., and Mineyuki, Y. Preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase of onion cotyledon epidermis. 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Nov.2-7, 2008 (Jeju, Republic of Korea).
- ⑤ Miyamoto, Y., Yamauchi, D., Kuno, R., Nakai, T., Futamura, N., Shinohara, K., Shimmen, T., Shimamura, M., Akashi, T., Horio, T., and Mineyuki, Y. Plant  $\gamma$ -tubulins have gradually lost the function that is essential for unikonts cells during their evolution. 2nd International Symposium on Bio-nanosystems, Oct.31-Nov.2, 2008 (Tokyo).
- ⑥ 唐原一郎, 峰雪芳宣. 植物細胞表層の電子線トモグラフィ解析. 日本植物学会第72回大会 シンポジウム 2008年9月25日~27日(高知).
- ⑦ 峰雪芳宣, 唐原一郎. 加圧凍結・2軸電子線トモグラフィ法による微小管構築機構の解析. 第49回日本植物生理学会年会シンポジウム “植物細胞の内骨格と外骨格” 2008年3月20日~22日(札幌).
- ⑧ Mineyuki, Y. Analysis of Membrane/Cytoskeletal Systems in Plant Cell Cortex. International Symposium on Picobiology, Mar.18-19, 2008 (Kamigori, Hyogo).
- ⑨ 唐原一郎, 須田甚将, Staehelein, L.A., 峰雪芳宣. 電子線トモグラフィ-分裂準備帯における膜系の3次元微細構造解析-. 第48回日本植物生理学会年会 シンポジウム “植物細胞を観る-植物バイオイメージング最前線-” 2007年3月28日~30日(松山).
- ⑩ Mineyuki, Y., and Karahara, I. Electron tomographic analysis of preprophase band. Andrew Staehelein's Retirement Symposium, June 6, 2007 (Boulder, USA).
- ⑪ Mineyuki, Y., Karahara, I., Suda, J., and Staehelein, L.A. Electron tomographic analysis of cortical microtubule ends in plant interphase and prophase cells preserved by high-pressure freezing. The 16th International Microscopy Congress, Sept.3-8, 2006 (Sapporo).
- ⑫ Suda, J., Karahara, I., Staehelein, L.A., and Mineyuki, Y. Effects of cytochalasin D on vesicle transport at the preprophase band analyzed by electron tomography. The 16th International Microscopy Congress, Sept.3-8, 2006 (Sapporo).
- ⑬ Mineyuki, Y., Karahara, I., Suda, J., and Staehelein, L.A. Electron tomographic analysis of cortical microtubule ends in plant interphase and prophase cells preserved by high-pressure freezing. The 16th Gordon Research Conference Plant & Fungal Cytoskeleton, Aug.20-25, 2006 (Andover, New Hampshire, USA).
- ⑭ 峰雪芳宣. 細胞分裂パターン制御に関する細胞骨格・膜からなるナノシステムの解析. 第66回 京阪神地区 植物細胞生理学談話会 2006年3月25日(大阪市).
- ⑮ 峰雪芳宣, 唐原一郎. 加圧凍結・電子線トモグラフィを使った微小管端構造の解

析. 日本植物学会第 69 回大会 シンポジウム “微小管構築の分子機構解明への新展開” 2005 年 9 月 20 日～22 日(富山市).

⑩ 峰雪芳宣, 唐原一郎. 加圧凍結・2 軸電子線トモグラフィー法による微小管ダイナミクス制御ナノマシンの解析. 日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 シンポジウム 第 2 部 “電子線トモグラフィーと細胞生物学” 2005 年 6 月 1 日～3 日(つくば市).

⑪ Mineyuki, Y., and Shimamura, M. Membrane Associated Microtubule System in Lower Land Plants Holds Clues to Evolution of the Cytokinetic Apparatus of Division Site Determination in Flowering Plants. The Americal Society for Cell Biology 2004 Summer Meeting “Cytokinesis”, July 22-25, 2004 (Vermont, USA).

[図書] (計 3 件)

① Takeuchi, M., Takabe, K., and Mineyuki, Y. (in press). Immunoelectron microscopy of cryofixed and freeze-substituted plant tissues. In Immuno-electron Microscopy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology Series, S. Schwartzbach and T. Osafune, eds, (Totowa, NJ: The Humana Press Inc.)

② 唐原一郎, 須田甚将, 峰雪芳宣. (2008). 電子線トモグラフィーとは何か: ナノスケールでの 3D バイオイメージング. 電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ ナノワールドに迫るパワフル技術入門, 藤本豊士, 山本章嗣編 (東京: 秀潤社), pp. 77-82.

③ 峰雪芳宣, 唐原一郎, 須田甚将. (2006). 電子線トモグラフィー. 細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 22 植物の細胞を観る実験プロトコル, 福田裕穂, 西村幹生, 中野明彦編 (秀潤社), pp. 95-97.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

関連Webページ: <http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biosynth/index-j.html>

## 6. 研究組織 (1) 研究代表者

氏名: 峰雪 芳宣  
所属研究機関・部局・職名: 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
研究者番号: 30219703

## (2) 研究分担者

氏名: 唐原 一郎  
所属研究機関・部局・職名: 富山大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号: 60283058

氏名: 中井 朋則  
所属研究機関・部局・職名: 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教  
研究者番号: 60347531

## (3) 連携研究者

氏名: Staehelin L. Andrew  
所属研究機関・部局・職名: コロラド大学・MCD Biology・教授