

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06311

研究課題名（和文）紡錘体の双極性維持機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the maintenance mechanism of bipolarity in the spindle

研究代表者

玉置 大介（Tamaoki, Daisuke）

富山大学・学術研究部理学系・助教

研究者番号：20793053

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）：植物細胞の紡錘体の双極性維持機構の解明を目的に、極小紡錘体様構造体（Minispindle）内の微小管動態の解析を行った。その結果、動原体微小管が微小管形成の足場となり、新規に形成された微小管は動原体微小管に束化することが示唆された。加えて、1Gとは異なる重力環境が植物の紡錘体形成及び細胞分裂に与える影響の解明を目的に、過重力または擬似微小重力下で培養したタバコ培養細胞とコレオケータにおける細胞分裂頻度、紡錘体形態について解析した。その結果、擬似微小重力環境は植物細胞の細胞分裂を促進することが明らかとなった。また、1Gとは異なる重力環境は、紡錘体形成に影響を与えない可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体の正常な分離には紡錘体における双極性の維持が必須であり、中心体のない植物細胞における紡錘体維持機構は不明であった。本研究の成果から、動原体微小管が紡錘体形成の骨組みになり、極方向に配向する過程で束化することが示唆されたことは、植物細胞における紡錘体維持機構の解明に寄与する結果である。加えて、本研究により、過重力・擬似微小重力が植物の細胞分裂及び紡錘体形成に与える影響を明らかにできたが、この結果は、将来における宇宙での作物栽培の基礎情報として必要不可欠であり、地球上においては効率的な植物の生産のための基盤技術創出に繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the maintenance mechanism of spindle bipolarity in plant cells, we analyzed microtubule dynamics in the minispindle. Our results suggested that kinetochore microtubules serve as scaffolds for microtubule nucleation and that newly formed microtubules bundle kinetochore microtubules. In addition, we analyzed the cell division frequency and spindle morphology of tobacco BY-2 cells and Coleochaete cultured under hypergravity or simulated microgravity to elucidate the effects of gravity environments different from 1G on spindle formation and cell division in plants. Our results showed that the simulated microgravity promoted cell division in plant cells and suggested the possibility that the gravity environment different from 1G may not affect the spindle formation.

研究分野：植物形態学，宇宙生物学

キーワード：微小管 紡錘体 細胞分裂 重力環境 植物細胞

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂により複製された遺伝情報(染色体)を二つの娘細胞に均等に分配することが生命の維持には必須である。染色体を娘細胞に均等に分配する装置は紡錘体であり、これが双極性を維持することで正常な細胞分裂が完遂される。動物細胞の中期紡錘体には中心体が存在し、明確な極を形成することで双極性が維持される。一方、植物細胞には中心体は存在しないが、中期紡錘体を形成する微小管が極方向に平行に配向し、双極性は維持され、正常に染色体は分配される。明確な極(中心体)を持たない植物細胞における紡錘体の双極性維持機構については明らかになっていない。

加えて、双極性を持った紡錘体の形成に対する  $1G$  とは異なる重力環境の影響も明らかになっておらず、植物細胞の細胞分裂に対する  $1G$  とは異なる重力環境の影響についても、先行研究で統一した見解が得られていなかった。また我々の予備的な実験から、液体培養したコレオケータの細胞分裂は過重力により促進することが示唆されていたが、擬似微小重力がコレオケータの細胞分裂に与える影響は不明であった。

### 2. 研究の目的

申請者は、個々の紡錘体微小管動態を直接観察できる極小紡錘体構造体(Minispindle) (図1)をタバコ培養細胞内で作成することに成功しており(日本植物学会第27回大会, P-015)、本研究では、Minispindleを構成する個々の紡錘体微小管を可視化し、動態解析することで、動原体微小管が紡錘体の骨組みとなり、動的微小管を新規に形成し、相互に束化することで極方向へ配向し、自己組織的に双極性が確立される」という仮説を証明することで紡錘体の双極性維持機構を明らかにする。

加えて、過重力または擬似微小重力環境で培養したタバコ培養細胞とコレオケータを用いて、 $1G$  とは異なる重力環境が植物の紡錘体形成および細胞分裂に与える影響を明らかにすることを目的とした。

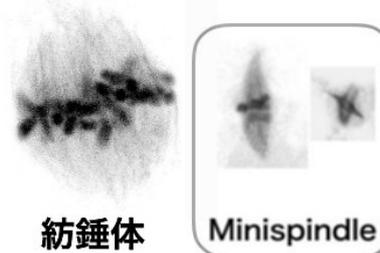


図1 植物細胞の紡錘体と Minispindle

Minispindle は1~数ペアの姉妹染色分体と微小管から成る。微小管と染色体を蛍光タンパク質で可視化した株の細胞内で作成した。画像は反転させている。

### 3. 研究の方法

#### (1) Minispindle 内で形成される微小管の形成部位の解析

EB1-mCitrine, mCherry-AtTUA6 を発現するタバコ培養細胞の微小管・EB1 可視化株を用いて、細胞内で Minispindle を作成し、それに対して propyzamide 処理を行い、動的微小管を脱重合させ、動原体微小管のみがのこる状態にした。その後、ドラッグフリーの培地で洗浄し、洗浄後 EB1 シグナルが発生する部位を調べた。

#### (2) Minispindle 内で形成される微小管配向角度の解析

微小管と染色体に加えて、微小管プラス端結合タンパク質 EB1 を同時に可視化したタバコ培養細胞 BY-2 株 (*Nicotiana tabacum* L. 'Bright Yellow 2') の3重可視化株を作成を試みた結果、mScarlet-TUB8, H2B-mCherry, EB1-mClover3 発現株(微小管・染色体・EB1 可視化株)を作成した。これを用いて、細胞内で Minispindle を作成し、それに対して propyzamide 処理を行い、動的微小管を脱重合させ、動原体微小管のみが残る状態にした。その後、ドラッグフリーの培地で洗浄し、洗浄後 1-3, 8-10 分後の EB1 シグナルのトラッキングから、染色体(赤道面)に対する進行角度を測定し、新規に形成される微小管配向角度とした。

#### (3) 分裂中期プロトプラストを用いたプロテオーム解析

タバコ培養細胞の微小管可視化株を用いて、プロトプラストを作成し、紡錘体を形成している中期の細胞をマイクロピペットを用いて蛍光顕微鏡下で 100 個以上回収し、液体窒素で凍結した。凍結サンプルからタンパク質を抽出後、nano LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行った。

#### (4) 過重力・擬似微小重力が植物の細胞分裂に与える影響の解析

タバコ培養細胞については、aphidicolin 処理で細胞周期を同調させたタバコ培養細胞の mCitrine-TUB8, H2B-mCherry 発現株(核・微小管可視化株)を、ibidi ディッシュに貼り付け、融解した低融点アガロース培地をディッシュ内に流し込み固化させることで細胞を固定した。その後、 $sim\ \mu G$ ,  $10G$  及び  $100G$  条件下で 24, 48 時間培養後、顕微鏡下で観察し、得られた画像から細胞核の数を計数することで細胞増殖率を評価した。また、同様の条件下で 24 時間重力処理したタバコ培養細胞の細胞壁挿入角度、48 時間重力処理したタバコ培養細胞

胞の分裂期の細胞を用いて、細胞長及び細胞投影面積について解析を行った。

コレオケータについては、遊走子をディッシュ底面に付着させ、ディッシュ内をC培地で満たし、クリノスタットによる擬似微小重力処理区と1G区で9日間明条件下で培養した。重力処理開始日から3日おきに顕微鏡を用いて藻体の画像を取得した。

#### (5) 過重力・擬似微小重力が植物の紡錘体形成に与える影響の解析

タバコ培養細胞については、タバコ培養細胞 YFP-TUB8, H2B-mCherry 発現株 (核・微小管可視化株) を、10G下で24時間培養し、4%ホルムアルデヒドで固定後、共焦点顕微鏡を用いて紡錘体を観察した。

コレオケータについては、クリノスタットによる擬似微小重力下で9日間液体培養した藻体を1.5%ホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒドで固定し、一次抗体: x100抗 $\alpha$ -tubulin抗体、二次抗体: x300抗ヒツジIgG CF488標識抗体による間接免疫蛍光染色により、微小管を可視化して、紡錘体の形態を共焦点顕微鏡を用いて観察した。

#### (6) 重力処理したタバコ培養細胞のオミクス解析

1G, 10G, 100G及びsim  $\mu$ G条件下で24時間培養したタバコ培養細胞野生型のカルスを重力処理後、直ちに液体窒素で凍結し、サンプリングした。プロテオーム解析の場合、凍結サンプルからタンパク質を抽出し、nano-LC-MS/MSを用いて解析を行った。また、分析結果から、重力処理により発現変動したタンパク質について、PANTHER 17.0 (<http://pantherdb.org/>)を用いたGO enrichment解析を行った。トランスクリプトーム解析の場合は、凍結サンプルからRNAを抽出し、受託解析サービス(マクロジェン)を利用し、RNA-seq解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) Minispindle 内で形成される微小管の形成部位の解析

EB1-mCitrine, mCherry-AtTUA6を発現する微小管・EB1可視化株を用いて、Minispindle内におけるEB1のシグナルの発生場所を調べた結果、80%を超えるEB1シグナルがMinispindleの動原体微小管上から生じていた。このことは動原体微小管が新規微小管形成の足場となっていることを示唆する。

#### (2) Minispindle 内で形成される微小管配向角度の解析

微小管・染色体・EB1可視化株を用いて、propyzamide処理から洗浄による回復後のMinispindle内の微小管の伸長角度の解析を行った。その結果、洗浄後1-3分間では染色体(赤道面)に対し80-90°の角度で伸長する微小管プラス端が全体の52%存在したのに対し、洗浄後8-10分間では全体の34%に減少した。この結果は、新規の動的微小管は微小管脱重合剤下からの回復直後は、極方向へ伸長するが、その後、様々な方向に伸長することを示唆している。(1)の結果から、新規の動的微小管形成は安定微小管を足場に行っていることが示唆されるので、微小管脱重合剤下からの回復直後は安定微小管に沿った伸長により、動原体微小管に積極的に束化する可能性が考えられる。

#### (3) 分裂中期プロトプラストを用いたプロテオーム解析

タバコ培養細胞の微小管可視化株のプロトプラストから分裂中期の細胞を集め、タンパク質を抽出後、nano LC-MS/MSによるプロテオーム解析を行った。予備的な結果であるが、532のタンパク質を同定することができた。その中にはチューブリンやMAPsなどの細胞骨格関連タンパク質も含まれていた。今後は、繰り返し実験を行い、双極性紡錘体形成に関わる因子を特定していきたい。

#### (4) 過重力・擬似微小重力環境が植物の細胞分裂に与える影響の解析

クリノスタットによる擬似微小重力環境下で培養したタバコ培養細胞において、細胞増殖率が増加することを明らかにした。一方、過重力環境下で培養したタバコ培養細胞においては細胞増殖率の変化は見られなかった。1Gとは異なる重力環境が紡錘体などの微小管構造体に与える影響についての洞察を得るため、過重力・擬似微小重力環境が細胞分裂の際の細胞分裂面挿入角度、分裂期の細胞の細胞長、細胞投影面積に与える影響を調べた。その結果、どのパラメーターにも過重力・擬似微小重力は影響を与えないことが明らかとなった。このことから、過重力・擬似微小重力はタバコ培養細胞の細胞分裂方向や分裂面の位置の制御に影響を与えない可能性がある。加えて、擬似微小重力環境下で液体培養したコレオケータの細胞分裂頻度を調べた結果、コレオケータにおいても擬似微小重力により細胞分裂が促進することが示唆された。

(5) 過重力・擬似微小重力が植物の紡錘体形成に与える影響の解析

過重力環境で培養したタバコ培養細胞において、紡錘体の形態を調べたところ、変化は見られなかった(図 2)。また、定性的な評価ではあるが、過重力環境下では紡錘体の細胞長軸に対する形成角度が 1 G に比べ傾いている様子がいくらか観察された(図 2)。今後は、定量的な解析を行い、過重力環境が紡錘体の形成角度に与える影響を明らかにする予定である。擬似微小重力が微小管構造体の形態に与える影響の解析については、クリノスタットが故障したこともあり、研究期間内で行うことができなかつたので、今後調査する予定である。加えて、重力環境を変化させた際の紡錘体の形態については、擬似微小重力下の液体培地中で生育させたコレオケーテについても調べたが、予備的な結果であるが変化は見られなかった(図 2)。

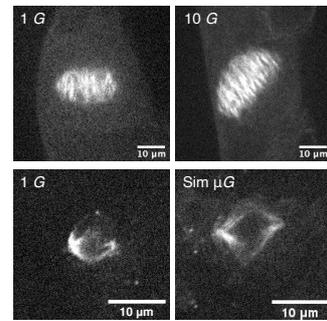


図 2 過重力・擬似微小重力下で形成されたタバコ培養細胞とコレオケーテの紡錘体  
上段がタバコ培養細胞、下段がコレオケーテの紡錘体

(6) 過重力・擬似微小重力が植物のタバコ培養細胞のプロテオーム・トランスクリプトームに与える影響の解析

過重力・擬似微小重力がタバコ培養細胞の細胞分裂及び微小管構造体形成を制御する機構に関与する因子を探るため、sim  $\mu$ G、10 G 及び 100 G 条件下で 24 時間培養したタバコ培養細胞のカルスを用いて、nano LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行った。その結果、sim  $\mu$ G では 138 個のタンパク質の発現が 1.5 倍以上に増加し、181 個のタンパク質の発現が 0.75 倍以下に減少した。10 G では 125 個のタンパク質の発現が 1.5 倍以上に増加し、179 個のタンパク質の発現が 0.75 倍以下に減少した。100 G では 197 個のタンパク質の発現が 1.5 倍以上に増加し、52 個のタンパク質の発現が 0.75 倍以下に減少した。Gene Ontology Enrichment 解析を行った結果、細胞分裂が促進した sim  $\mu$ G では、Biological process のカテゴリーで翻訳、タンパク質輸送及びゴルジ体内小胞輸送に関わるタンパク質群、Cellular component のカテゴリーでリボソームに関わるタンパク質群の発現の増加が示された。また、Molecular function のカテゴリーでピルビン酸脱炭素酵素活性に関わるタンパク質群の発現の減少が示された。10 G では、Biological process のカテゴリーで窒素化合物、芳香族化合物代謝、RNA プロセッシングに関わるタンパク質群、Cellular component のカテゴリーで核及び小胞体に関わるタンパク質群の発現の増加、Biological process のカテゴリーでアミドとペプチド合成・代謝、遺伝子発現、翻訳に関わるタンパク質群の発現減少が示された。100 G では、Biological process のカテゴリーでアミドとペプチド合成・代謝、翻訳、RNA 代謝に関わるタンパク質群、Cellular component のカテゴリーでリボソーム、ミトコンドリア、核に関わるタンパク質群の発現の増加が示された。また個々のタンパク質の発現変化を見てみると、細胞周期や細胞骨格に関わることが知られている 10 以上のタンパク質の発現が、過重力または擬似微小重力環境下で変化していた。

更に、sim  $\mu$ G、10 G 条件下で 24 時間培養したタバコ培養細胞のカルスを用いて、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。クラスター解析を行い、細胞分裂が促進する擬似微小重力により発現が変化する遺伝子を調べたところ、シロイヌナズナでモータータンパク質、細胞周期に関わることが知られているいくつかの遺伝子のタバコのオーソログの発現が擬似微小重力により増加することが明らかとなった。今後はこれらのタンパク質・遺伝子の機能解析から、過重力・擬似微小重力による微小管構造体形成、細胞分裂の制御に関わる因子を特定していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口直哉, 西内巧, 唐原一郎, 玉置大介
2. 発表標題 重力環境がタバコ培養細胞の細胞分裂に与える影響
3. 学会等名 北陸植物学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayuka Naruse, Ichirou Karahara, Daisuke Tamaoki
2. 発表標題 Effects of simulated microgravity on cell division and thallus formation in Coleochaete scutata
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 玉置大介
2. 発表標題 宇宙環境が植物の細胞分裂に与える影響
3. 学会等名 第41回 日本植物病理学会関西西部会若手の会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉置大介
2. 発表標題 宇宙環境が植物の細胞分裂に与える影響の解明- フィジビリティスタディの進捗状況の報告 -
3. 学会等名 スペース・モス 関連集会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉置大介
2. 発表標題 宇宙環境が植物の細胞分裂に与える影響の解明
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 直哉, 西内 巧, 唐原 一郎, 玉置 大介
2. 発表標題 重力環境がタバコ培養細胞の細胞分裂に与える影響
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎優香, 西内 巧, 唐原一郎, 玉置大介
2. 発表標題 タバコBY-2細胞の分裂中期プロトプラストにおけるプロテオーム解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田上慶一, 田口直哉, 唐原一郎, 玉置大介
2. 発表標題 過重力が植物の細胞分裂に与える影響
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎優香, 玉置大介
2. 発表標題 プロテオーム解析を目指した紡錘体単離の試み
3. 学会等名 第4回北陸線バイオサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎優香, 西内 巧 , 玉置大介
2. 発表標題 プロテオーム解析による紡錘体形成に関わる因子の同定を目指した紡錘体単離の試み
3. 学会等名 植物細胞骨格研究会 -PlantCytoskeleton2019-
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎優香, 西内巧, 唐原一郎, 玉置大介
2. 発表標題 分裂中期のプロトプラストにおけるプロテオーム解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 招待講演
2. 発表標題 ミニスピンドル内の微小管動態から考える紡錘体の双極性維持機構
3. 学会等名 2018 インターキャンパスセミナー in Toyama (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	村田 隆  (Murata Takashi)  (00242024)	神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授   (32714)	
研究協力者	唐原 一郎  (Karahara Ichirou)  (60283058)	富山大学・学術研究部理学系・教授   (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------