

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06583

研究課題名(和文)アクチン繊維を極性揃えて配向させる植物ミオシンの新規機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a Novel Function of Plant Myosin in Orienting Actin Filaments with Polarity

研究代表者

伊藤 光二 (Ito, Kohji)

千葉大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：50302526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞は細胞内の物質拡散のため、原形質流動と呼ばれる「一方向性の細胞内の流れ」が起きている。原形質流動発生には、アクチン繊維が束化し、さらに一定の極性をもって配向することが鍵となる。最近の研究から、ミオシンXIとアクチン繊維との相互作用によって極性が揃ったアクチン繊維の束が自律的に形成されることが示唆されているが、その分子機構は不明であった。本研究により、1. ミオシンXIのN末端がアクチン繊維を束化する、2. アクチン繊維を一方向性に曲げることにより、極性を揃えたアクチン繊維束を形成する、との2つの方法で植物内でミオシンXIが極性の揃ったアクチン繊維束を形成することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞内では、原形質流動と呼ばれる一方向性の流動が起きている。原形質流動は250年前に発見されていたが、どのような分子機構により流動が一方向性となるかは謎であった。本研究により、一方向性の流動には2つの分子機構が関わっていることが明らかになった。また、この2つの分子機構にかかわるミオシンXIの特異的な領域も明らかにした。どちらもミオシンXIとアクチン繊維の相互作用のみより誘起されるのが興味深い。本研究の成果は植物生理学のみならず、自律的構築を駆動するアクティブマターの分野においても意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：Plant cells exhibit a "unidirectional intracellular flow" called cytoplasmic streaming to facilitate the diffusion of substances within the cell. The occurrence of cytoplasmic streaming is crucially dependent on the bundling of actin filaments and their alignment with a specific polarity. Recent studies have suggested that the interaction between myosin XI and actin filaments leads to the autonomous formation of bundles of actin filaments with aligned polarity, though the molecular mechanism behind this process remains unknown. This study has clarified that myosin XI forms bundles of actin filaments with aligned polarity within plant cells through two mechanisms: 1) the N-terminus of myosin XI bundles actin filaments, and 2) it bends actin filaments in a unidirectional manner to form actin filament bundles with aligned polarity.

研究分野：生物物理学、植物生理学

キーワード：ミオシン 分子モーター アクチン シロイヌナズナ 原形質流動 植物生理学 アクティブマター

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物細胞には原形質流動と呼ばれている「一方向性の細胞内の流れ」があり、これにより細胞内の物質拡散が促進されている。原形質流動発生には、アクチン繊維が束化して、さらに一定の極性をもって配向することが鍵となる(図1)。植物細胞のほとんどは液胞で占められ、細胞膜近傍のわずかな細胞質領域にアクチン繊維が一方向性の極性をもって並んでおり、小胞体に結合したミオシン XI が、一方向性に並んだアクチン繊維の上を動くので、「一方向性の細胞内の流れ」が生じている。植物細胞を用いた薬理実験や遺伝子欠失実験から、原形質流動装置における一方向性に極性を揃えて束化したアクチン繊維はミオシン XI とアクチン繊維との相互作用によって自律的に形成されることが示唆されている(図2)。しかし、タンパク質レベルでの実験が全く行われていないこともあり、その詳細な機構は不明であった。

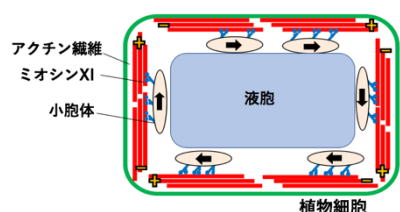


図1. 原形質流動をおこしている植物細胞の模式図。
植物細胞のほとんどは液胞で占められており、細胞質領域は細胞膜直下のわずかな領域である。この領域にアクチン繊維が極性を揃えて配向しているため、一方向性の原形質流動が生じる。



図2. 植物細胞内でアクチン繊維の配向が揃う機構 (モデル仮説)

最初にはアクチン繊維の極性はばらばらであるが、小胞体に結合したミオシンXIと相互作用することにより極性が揃う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、代表者が最近、*in vitro* の実験系により発見したシロイヌナズナのみオシン XI-2 モータードメイン (At XI-2 MD) および、ジャジクモのみオシン XI-4 モータードメイン (CbXI-4 MD) によるアクチン繊維の束化機構および極性を揃えた配向機構の分子レベルでの解明である。

3. 研究の方法

(1) ミオシン XI の N 末端サブドメインによるアクチン繊維の束化機構 : At XI-2 MD によるアクチン繊維の束化機構

シロイヌナズナのみオシン XI-2 モータードメイン (At XI-2 MD) はアクチン繊維の束化能が顕著である(図3)。一方、これと良く似たアミノ酸配列をもつジャジクモのみオシン XI モータードメイン (Ce XI MD) はアクチン繊維の束化能がほとんどない。この2つのみオシン XI MD の間で、様々な領域において分子生物学的手法により領域を置換した「キメラミオシン MD」を作製する。次に、作製したキメラミオシンを昆虫培養細胞で発現させ、精製する。精製したキメラミオシン MD を用いてアクチン繊維束化能を測定する。束化能の測定には、低速遠心によるアクチン繊維との共沈実験および二色の別の蛍光色素で標識したアクチン繊維を用いた蛍光顕微鏡観察の二通りの方法で行う。作製した様々な領域におけるキメラミオシン MD のアクチン束化能の逆転を指標としてアクチン繊維の束化活性をもつ領域を絞り込む。

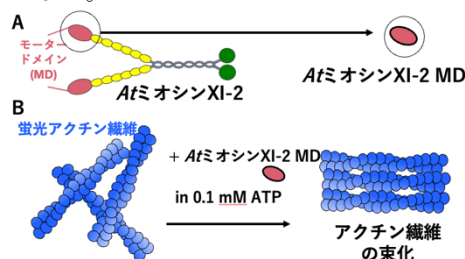


図3. A. At XI-2 MD と At XI-2 MD の模式図
B. At XI-2 MD は1つ頭に関わらずアクチン繊維を束化する。

(2) アクチン繊維を一方向性に曲げることにより、極性を揃えたアクチン繊維束を形成するキック機構 : CbXI-4 MD によるアクチン繊維の極性を揃えた束化機構

ジャジクモのみオシン XI-4 MD (CbXI-4 MD) は反時計回転方向にアクチン繊維を動かす。そして反時計回転方向に運動するアクチン繊維同士の相互作用により極性が揃ったリング束が形成される。つまり、CbXI-4 MD のアクチン繊維を反時計回転方向に運動させる活性により極性が揃ったアクチン繊維束が形成されると考えられる。そこで、CbXI-4 MD のアクチン繊維の反時計回転方向運動活性がどのアミノ酸領域にあるか同定を試みることにした。CbXI-4 のホモ

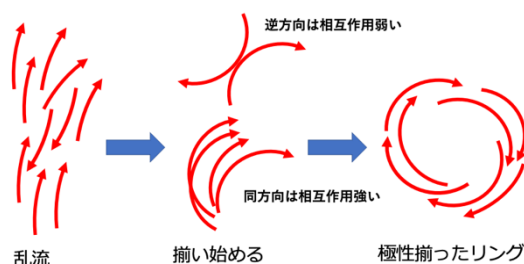


図4. CbXI-4によるアクチン繊維の極性を揃えた束化機構

ログでアミノ酸配列が良く似ている CbXI-3 はアクチン繊維の反時計回転方向運動活性がない。そこで、この2つのミオシン XI MD の間で、様々な領域において、分子生物学的手法により領域を置換した「キメラミオシン MD」を作製する。次に、作製したキメラミオシンを昆虫培養細胞で発現させ、精製する。精製したキメラミオシン MD を用いての反時計回転方向運動活性を *in vitro* 運動アッセイにより測定する。作製した様々な領域におけるキメラミオシン MD の反時計回転方向運動活性の逆転を指標として反時計回転方向運動活性領域を絞り込む。

4. 研究成果

(1) ミオシン XI の N 末端サブドメインによるアクチン繊維の束化機構 : At XI-2 MD によるアクチン繊維の束化機構

At XI-2 MD と Cc XI MD の間での分子生物学的手法を用いてサブドメイン置換したキメラミオシン解析により、At XI-2 MD によるアクチン繊維の束化能は N 末端サブドメインであるアミノ酸 1-185 領域に存在することが明らかになった。ミオシンの MD は Upper 50kD、Lower 50kD、Converter、N 末端の 4 つのサブドメインから構成されている。このうち、N 末端サブドメインはミオシン間におけるアミノ酸の保存性が低い。つまり、N 末端サブドメインの多様性は高い。この多様性の高さが At XI-2 MD と Cc XI MD の間のミオシン機能の多様性を担っていると考えられる。

次に N 末端サブドメインに存在するアクチン繊維束化能の絞り込みを行った。まず、X 線結晶構造から明らかになった At XI-2 MD の構造を元に、N 末端サブドメインの構造を前半と後半に二分し、それぞれについてキメラミオシン MD を作製し、アクチン繊維束化能が逆転するかどうか検証した。その結果、N 末端サブドメインの後半領域である At XI-2 のアミノ酸 121-185 領域にアクチン繊維の束化能があることが明らかになった。さらに、At XI-2 MD の X 線結晶構造を基に、この結合領域とアクチンとの結合を *in silico* で解析したところ、この領域とアクチンはぴったりと結合することが分かった(図 5)。すなわち、At XI-2 の N 末端サブドメインのアミノ酸 121-185 領域は新規アクチン結合領域として機能し、これによりアクチン繊維の束化を引き起こすことが示唆された。

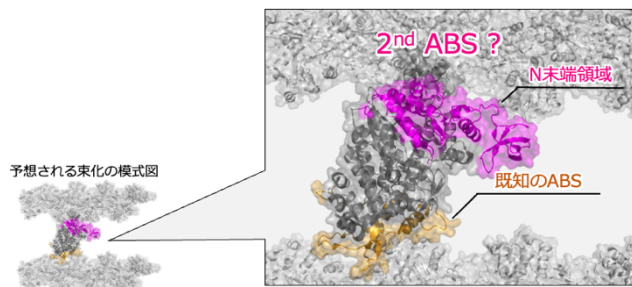


図5. AtXI-2 のN末端サブドメインによるアクチン繊維の極性を揃えた束化機構

(2) アクチン繊維を一方方向性に曲げることにより、極性を揃えたアクチン繊維束を形成するキツ機構 : CbXI-4 MD によるアクチン繊維の極性を揃えた束化機構

CbXI-4 MD と CbXI-3 MD の間で分子生物学的手法を用いてサブドメイン置換したキメラミオシン解析により、CbXI-4 MD によるアクチン繊維の極性を揃えた束化機構は Upper 50kD と Lower 50kD サブドメイン領域にあることがわかった。Upper 50kD と Lower 50kD サブドメイン領域には Loop2、Loop3、Loop4、CM loop、HTH loop の 5 つのアクチン結合領域がある。これらのいずれかにアクチン繊維の反時計回転方向運動活性があると考え、CbXI-4 MD と CbXI-3 MD の間でこれらの 5 つのループの置換実験を行い、反時計回転方向運動活性が逆転するかどうかを *in vitro* 運動アッセイで解析した。その結果、CbXI-4 の CM loop および HTH loop にアクチン繊維の反時計回転方向運動活性があることが明らかになった。

CbXI-4 MD と CbXI-3 MD の CM loop および HTH loop それぞれについて、CcXI(7kch) ベースのホモロジーモデリングによりアクチンとの結合を *in silico* で解析したところ、アクチン繊維の反時計回転方向運動活性が著しい CbXI-4 MD は、反時計回転方向運動活性がほとんどない CbXI-3 MD と比べて、アクチンとの結合力が弱いことが予想された(図 6)。次に CbXI-3 MD の CM loop および HTH loop をアクチンとの結合が弱くなるように遺伝子改変したところ、CbXI-3 MD によるアクチン繊維の反時計回転方向運動活性が有意に上昇した。このことから、アクチン繊維の反時計回転方向運動活性とこの活性によるアクチン繊維の極性を揃えた束化は CM loop および HTH loop とアクチンとの結合力が弱いことにより引き起こされることが示唆された。

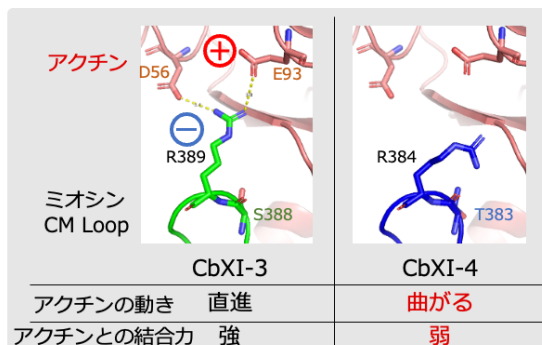


図6. CbXI-4とCbXI-3のCM loopとアクチンとの結合予測

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 伊藤光二, 原口武士, 玉那覇正典, 鈴木花野, 村田武士 | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 生物界最速のミオシンの構造 - 機能相関 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 生物物理 | 6. 最初と最後の頁 91-96 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.63.91 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Haraguchi Takeshi, Tamanaha Masanori, Suzuki Kano, Yoshimura Kohei, Imi Takuma, Tominaga Motoki, Sakayama Hidetoshi, Nishiyama Tomoaki, Murata Takeshi, Ito Kohji | 4. 巻 119 |
| 2. 論文標題 Discovery of ultrafast myosin, its amino acid sequence, and structural features | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2120962119 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Haraguchi Takeshi, Ito Kohji, Morikawa Takamitsu, Yoshimura Kohei, Shoji Nao, Kimura Atsushi, Iwaki Mitsuhiro, Tominaga Motoki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Autoregulation and dual stepping mode of MYA2, an Arabidopsis myosin XI responsible for cytoplasmic streaming | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-07047-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Duan Zhongrui, Tanaka Misato, Kanazawa Takehiko, Haraguchi Takeshi, Takyu Akiko, Era Atsuko, Ueda Takashi, Ito Kohji, Tominaga Motoki | 4. 巻 104 |
| 2. 論文標題 Characterization of ancestral myosin XI from <i>Marchantia polymorpha</i> by heterologous expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Plant Journal | 6. 最初と最後の頁 460 ~ 473 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14937 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Duan Zhongrui, Ito Kohji, Tominaga Motoki | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Heterologous transformation of <i>Camelina sativa</i> with high-speed chimeric myosin XI-2 promotes plant growth and leads to increased seed yield | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Plant Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 253 ~ 259 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0225b | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohj Ito |
| 2. 発表標題 Molecular and Functional Analysis of myosin with chiral activity |
| 3. 学会等名 Yamada Conference LXXV: Origin of left right asymmetry in animals (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 永井大生, 吉村考平, 伊美拓真, 原口武士, 伊藤光二 |
| 2. 発表標題 アクチンを非対称運動させるミオシンXIの分子機構の解析 |
| 3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西川優利, 吉村考平, 原口武士, 藤澤祐希, 伊藤光二 |
| 2. 発表標題 昆虫細胞培養系における骨格筋ミオシンの精製の検討 |
| 3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeshi Haraguchi, Masanori Tamanaha, Kano Suzuki, Kohei Yoshimura, Takuma Imi, Motoki Tominaga, Hidetoshi Sakayama, Tomoaki Nishiyama, Takeshi Murata, Kohji Ito |
| 2. 発表標題 Discovery of the fastest myosin, its amino acid sequence, and structural features |
| 3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 原口武士, 玉那覇正典, 鈴木花野, 吉村考平, 伊美拓真, 富永基樹, 坂山英俊, 西山智明, 村田武士, 伊藤光二 |
| 2. 発表標題 生物界最速のChara braunii (シャジクモ) のミオシンXIの発見 |
| 3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会, |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeshi Haraguchi, Masanori Tamanaha, Kano Suzuki, Kohei Yoshimura, Takuma Imi, Motoki Tominaga, Hidetoshi Sakayama, Tomoaki Nishiyama, Takeshi Murata, Kohji Ito |
| 2. 発表標題 Functional analysis of plant-specific myosin XIs |
| 3. 学会等名 ABA, APPA & TBS JOINT CONGRESS 2022, (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤光二, 原口武士, 吉村孝平, 伊美拓真, 山口明日香, 松野健治 |
| 2. 発表標題 ミオシンIDによるアクチン繊維のホモキラル運動の解析 |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高部晃宙、藤澤祐希、原口武士、吉村考平、富永基樹、上田晴子、伊藤光二 |
| 2. 発表標題 ミオシン11のアクチン束化機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本植物学会第85回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤 涼音, 玉那覇 正典, 原口 武士, 吉村 考平, 伊美 拓真, 富永 基樹, 伊藤 光二 |
| 2. 発表標題 単子葉植物ブラキポディウムへの超高速型ミオシンCbM1導入による植物の大型化解析およびCbM1の超高速運動機構解明へのアプローチ |
| 3. 学会等名 日本植物学会第85回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤 優成, 吉村 考平, 松田 恭平, 原口 武士, 山岸 雅彦, 須河 光弘, 伊藤 光二, 矢島 潤一郎 1 |
| 2. 発表標題 ミオシン 1c が駆動する F-アクチン回転運動の 3 次元観察 |
| 3. 学会等名 第59回生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉村考平, 原口武士, 伊美拓真, 山口明日香, 前田知那美, 松野健治, 伊藤光 二 |
| 2. 発表標題 ショウジョウバエの左右非対称性を制御する Myosin1C と Myosin1D の解析 |
| 3. 学会等名 第59回生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤 光二、原口 武士、吉村 孝平、伊美 拓真 |
| 2. 発表標題 Chiral orientation of actin filaments is autonomously formed by certain plant myosin |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉村 考平、伊美 拓真、原口 武士、玉那覇 正典、伊藤 光二 |
| 2. 発表標題 CbM4の持つ時計回りの運動活性の解析 |
| 3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊美 拓真、吉村 考平、原口 武士、伊藤 光二 |
| 2. 発表標題 植物ミオシンにおけるアクチン上での非対称運動の網羅的解析 |
| 3. 学会等名 日本植物学会第84回大会 |
| 4. 発表年 2020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 | 成田 哲博 (Narita Akihiro) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 豊岡 公德 (TOYOOKA KIMINORI) | | |
| 研究協力者 | 檜垣 匠 (Higaki Takumi) | | |
| 研究協力者 | 上田 晴子 (Ueda Haruko) | | |

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 | | |
|---------|-----------------------|--------------------|--|
| カナダ | Department of Biology | Queen's University | |