

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370026

研究課題名（和文）植物細胞はどのようにして中心体なしで紡錘体を作るのか？

研究課題名（英文）How plant cells make a mitotic spindle, without involvement of centrosomes?

研究代表者

村田 隆（MURATA TAKASHI）

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授

研究者番号：00242024

研究成果の概要（和文）：細胞分裂において、中心体は紡錘体の形成に働く。中心体を持たない植物の細胞がどのようにして紡錘体を形作るのかは大きな謎である。我々は、植物の紡錘体は微小管の枝分かれの結果により構築されることを提唱した。この仮説を証明するため、中心体や微小管を標識する蛍光タンパク質をタバコ培養細胞に発現させ、紡錘体および類似の構造である隔膜形成体の微小管形成機構を調べた。中心体に局在して微小管形成に働くガンマチューブリンは紡錘体上に点在して動いていた。隔膜形成体形成においては、新しい微小管は既存の微小管から伸長することがわかった。

研究成果の概要（英文）：Centrosomes play a role on formation of a mitotic spindle. It has been a mystery how plant cells form a mitotic spindle in the absence of the centrosomes. We proposed that mitotic spindles in plants are formed by branching of existing microtubules. To evaluate the hypothesis, we examined mechanism of spindle formation by analyzing localization of markers of centrosomes and microtubules during cell division of tobacco suspension culture cells. Gamma-tubulin, which localizes in the centrosome and nucleate microtubules there, dispersed in the spindle and moved in the spindle. In phragmoplast formation, new microtubules were elongated from the existing microtubules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：植物形態学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：微小管、紡錘体、隔膜形成体

1. 研究開始当初の背景

微小管は $\alpha\beta$ チューブリンが重合した細長い円筒状のポリマーで、その機能の一つに細胞分裂における紡錘体の構築がある。細胞分裂が始まると、染色体周囲に微小管が重合し、その微小管が集まって紡錘体になる。完成した紡錘体は染色体を2つに分配し、染色体上の遺伝情報は娘細胞に引き継がれる。

動物細胞を含むほとんどの真核細胞の場合、紡錘体の両極には中心体が存在する。中心体は紡錘体中で微小管重合、極の決定に重要な役割を持つと考えられている。一方、顕花植物の細胞は中心体を持たないが、紡錘体が形成され、染色体は正常に分配される。では、どのようにして中心体なしに紡錘体が形成されるのだろうか？ 従来から信じられている説は、顕花植物の紡錘体には目に見える中心体はないものの、中心体の機能を持つ不可視の構造が存在し、微小管形成に働くというものである (Mazia 1984)。一方、申請者らは間期の植物細胞では微小管上で微小管が枝分かれ状に形成されることを示し (Murata et al. *Nature Cell Biol.* 7, 961-968, 2005)、紡錘体は既存の微小管の枝分かれの結果により生じることを提唱した (Murata and Hasebe 2007, Murata et al., 2007)。

どちらの仮説が正しいかを検証するためには、紡錘体における個々の微小管の動態を解析すること、動物の中心体タンパク質が植物の紡錘体極 (中心体機能を持つ領域) に存在して微小管重合に働くかを解析することが必要と考えられる。

2. 研究の目的

近年発達が著しいイメージング技術を用いれば、紡錘体中の動態は可視化可能と思われる。本研究においては、植物細胞における紡錘体の形成機構、および、類似した構造である隔膜形成体の形成機構をイメージング技術を用いて解析する。植物の紡錘体、および隔膜形成体には中心体機能を持つ領域が存在するの否か、微小管枝分かれは紡錘体および隔膜形成体形成にどのように関与するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 微小管マーカー蛍光タンパク質を発現する形質転換細胞の作製

微小管のマイナス端、プラス端を蛍光タンパク質で標識する形質転換細胞を作製した。プラス端マーカーとして GFP-EB1 融合タンパク質、マイナス端マーカーとして GFP-NEDD1、GFP-GCP5、GFP- γ チューブリンを試みた。アグロバクテリウムによる安定形質転換体を作製した。

(2) スペックル顕微鏡法

蛍光チューブリンを微量注入する方法、GFP- α -チューブリンを微量発現する形質転換体の選抜を試みた。

(3) 微小管2色標識細胞の作製

微小管の交換反応を定量的に解析するため、GFP- α チューブリン、tagRFP- α チューブリンを安定に発現する細胞株を確立した。

(4) 微小管の高分解能観察

蛍光ビーズや固定・染色したタバコ培養細胞を用いて、顕微鏡対物レンズの分解能評価を行った。試料を封入する溶液の最適化も行った。生きている細胞においては細胞をシリコーンオイル (KF-96、信越シリコーン) で封入し、シリコン浸レンズ (UPLSAPO 60XS、オリンパス社製) で観察するのが最も分解能が高かった。一方、固定細胞の場合、細胞を95%チオジェタノールで封入し、開口数1.4の油浸レンズで観察するのが最も分解能が高かった。当初計画の2光子顕微鏡による観察は、通常の共焦点観察に比べて解像度が悪かったため、採用しなかった。

(5) 中心体マーカータンパク質の局在解析

新規中心体因子 Msd2 の局在解析を、蛍光抗体法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) イメージング方法の確立

① 微小管マーカー発現ラインの作製

微小管のプラス端マーカーとして、GFP-EB1 発現細胞を作製した。EB1 は真核生物に保存された微小管プラス端結合因子で、伸びている微小管のプラス端のみに結合する。シロイヌナズナの EB1b 遺伝子と GFP 遺伝子が融合したコンストラクト (Mathur et al. 2003) をタバコ培養細胞に導入した。次に、微小管全体のマーカーとして、赤色蛍光タンパク質 tagRFP とシロイヌナズナ α チューブリン遺伝子が融合したコンストラクト (奈良先端大学・稲田のりこ博士より分譲) の導入を試みたが、形質転換体が得られなかった。そこで、方針を変更し、タバコ GFP- α チューブリンを発現する形質転換細胞 (Kumagai et al. 2001) に前述の EB1b-GFP コンストラクトを導入した。微小管プラス端と微小管全体を色分けすることはできなかったが、蛍光強度の違いにより、微小管全体と微小管プラス端を識別できる形質転換細胞ができた。

微小管のマイナス端マーカーとして、GFP-GCP5、GFP-NEDD1 を発現するラインの作製を試みた。GCP5、NEDD1 は微小管重合核となる γ チューブリン複合体の構成要素であ

る。コンストラクト構築は佐野俊夫博士（法政大）の協力により行った。シロイヌナズナ GCP5、NEDD1 と GFP を融合させた遺伝子を 35S プロモーターの下流で発現させた。得られた形質転換株は蛍光を発せず、マーカーとして使えるものは得られなかった。そこで、方針を変更し、GFP と γ チューブリンの融合遺伝子を発現させることにした。タバコ γ チューブリン遺伝子の 3' 端に GFP 遺伝子を融合させたコンストラクトを導入したところ、紡錘体や隔膜形成体を標識する細胞株を得ることができた。

② スペックル顕微鏡法の確立

スペックル顕微鏡法は、極微量の蛍光標識を細胞内に導入し、1 分子、あるいは数分子のクラスターの蛍光標識の動きを追跡することにより構造体内部での分子の移動を測定する方法である。市販の蛍光チューブリンをタバコ培養細胞に顕微注入する方法を試みたが、蛍光チューブリンが注入用の針中で重合し、針の先端が詰まってしまう、注入することができなかった。そこで、GFP- α チューブリンを発現する形質転換細胞 (Kumagai et al. 2001) を更に選抜し、蛍光チューブリンの発現量が少ない細胞株を確立することにした。親の培養株から蛍光の弱いクローンを選抜し、微小管上に蛍光 (スペックル) が点在する細胞を得ることに成功した。高感度カメラによるスペックルの検出には基礎生物学研究所の野中茂紀博士の協力を得た。

③ 微小管交換率の測定法の確立

微小管の交換率評価用に、タバコ GFP- α チューブリンを発現する形質転換細胞 (Kumagai et al. 2001) に赤色蛍光タンパク質 tagRFP とシロイヌナズナ α チューブリン遺伝子が融合したコンストラクトを導入した。タバコ培養細胞の微小管を GFP、tagRFP の 2 色で標識する形質転換株を得ることに成功した。この形質転換株を用い、共焦点顕微鏡の 561nm レーザーで tagRFP を光退色させ、tagRFP/GFP 蛍光比を測定することにより、微小管の交換率を評価することが可能になった。

(2) 隔膜形成体における微小管動態

予備的な観察の結果、紡錘体の微小管は比較的平行に並んでおり、微小管の枝分かれ構造の検出が難しそうに思われた。そこで、紡錘体に比べて微小管の配列が乱れている隔膜形成体を用いて微小管枝分かれの検討を行うことにした。隔膜形成体は紡錘体が消失後、細胞板形成の時に出現する微小管構造で、形成初期には紡錘体類似の樽型構造になる。

固定して抗 α チューブリン抗体で標識した隔膜形成体を 95% チオジェタノールで封入

し、開口数 1.4 の油浸レンズで観察した。野中茂紀博士 (基礎生物学研究所) の協力により、デコンボリューションソフトウェア Heugens でデコンボリューションを行ったが、分解能が不足しており、微小管の枝分かれがあるか否か、はっきりした結果を得ることはできなかった。

次に、生きている細胞で隔膜形成体の微小管を部分的に脱重合させ、微小管の再生過程を観察することにより微小管の枝分かれがあるか否かを調べた。EB1-GFP/GFP- α チューブリン標識細胞を用い、5 μ M プロピザミドで約 5 分処理した後にプロピザミド除去し、微小管再生過程を調べた。プロピザミド除去により EB1-GFP で標識される微小管プラス端がプロピザミド耐性微小管上に出現し、その後微小管が伸長した。隔膜形成体の微小管には微小管形成能があると結論された。

さらに、隔膜形成体の微小管形成に γ チューブリンが関与しているかを調べた。プロピザミド処理した隔膜形成体の微小管には γ チューブリンが局在していたことから、間期の細胞同様、 γ チューブリンは微小管上に結合し、微小管の枝分かれに働いている可能性が考えられた。そこで、微小管の枝分かれを阻害することがわかっている抗 γ チューブリン抗体を顕微注入すると隔膜形成体の微小管が減少した。EB1-GFP 標識細胞で微小管の伸長端の数を調べたところ、隔膜形成体内部の EB1-GFP が消失していることが明らかになった。 γ チューブリンは隔膜形成体微小管に結合し、新しい微小管を枝状に伸ばすことが明らかになった。

隔膜形成体はその内部で細胞板を形成する。隔膜形成体は徐々に細胞膜に向かって広がり、その結果として細胞板は細胞膜に向かって広がる。隔膜形成体の拡大機構を調べるため、隔膜形成体内外の微小管交換率を調べた。隔膜形成体の外縁 (細胞膜に近い側) では微小管の交換率が低かった。微小管枝分かれ後の安定性の違いにより隔膜形成体が広がる可能性が示唆された。

(3) 紡錘体微小管の微小管動態

隔膜形成体においては微小管の枝分かれにより微小管が形成されることが明らかになった。次に、紡錘体微小管における微小管枝分かれの関与を調べた。新規中心体マーカー Msd2 は微小管上に局在せず、マーカーとしての妥当性は不明であった。そこで、 γ チューブリン-GFP 融合タンパク質の挙動を調べた。 γ チューブリン-GFP は紡錘体上で一列に並び、紡錘体の極方向に移動した (図 1)。この動きは、スペックル顕微鏡法による紡錘体微小管の動きと同じものであった。 γ チューブリン複合体は紡錘体微小管と結合し、その移動と共に動いているものと思われた。

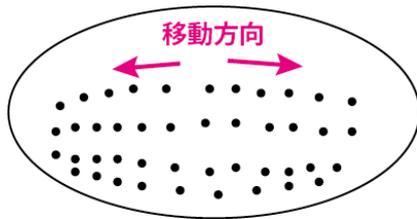


図1 紡錘体中の γ チューブリン移動の模式図。楕円は紡錘体輪郭を示す。

紡錘体微小管上から新しい微小管が伸長するかを検討するため、隔膜形成体微小管と同じ条件で微小管の脱重合後の再形成を検討した。紡錘体微小管は隔膜形成体微小管に比べて脱重合しやすく、大部分の微小管がプロピザミド処理後に消失してしまった。脱重合条件の再検討が必要と考えられた。

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 Wadsworth P, Lee WL, Murata T, Baskin TI, Variations on theme: spindle assembly in diverse cells, *Protoplasma*, 査読有、248巻、2011、439-446

[学会発表] (計9件)

- ① 村田 隆、野中茂紀、長谷部光泰、スベックル顕微鏡法による微小管の動きの可視化、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学(京都府)
- ② Murata T, Microtubule dynamics in plant cytokinesis as revealed by quantitative live imaging, 奈良先端大後援 GCOE シンポジウム “Microtubules: nucleation, dynamics, and regulation”, 2012年2月23日、奈良先端大学(奈良県)
- ③ 村田 隆、野中茂紀、佐野俊夫、馳澤盛一郎、長谷部光泰、微小管脱重合勾配と微小管枝分かれにより植物の細胞質分裂は制御される、2011年生体運動研究合同班会議、2011年1月8日、大阪市立大学(大阪府)
- ④ Murata T, Nonaka S, Sano T, Hasezawa S, Hasebe M, Uneven distribution of microtubule stability in a plant cytokinetic array, Annual Meeting of American Society of Cell Biology, 2010年12月12日、Pennsylvania Convention Center(米国)
- ⑤ Murata T, Mechanism of cell

partitioning as revealed by live cell imaging, *Plant Science Communications* 2010、2010年11月17日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

- ⑥ 村田 隆、植物の細胞骨格はRNA輸送に働くか?、日本植物学会第74回大会、2010年9月10日、中部大学(愛知県)
- ⑦ Murata T, Nonaka S, Hasebe M, High-resolution two-photon microscopy of cytoskeletons in living cells, 第62回日本細胞生物学会大会、2010年5月19日、大阪国際会議場(大阪府)
- ⑧ 村田 隆、細胞板拡大機構の新しいモデル、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑨ 村田 隆、細胞板の拡大機構のイメージングによる解析、第61回日本細胞生物学会大会、2009年6月2日、名古屋国際会議場(愛知県)

[図書] (計1件)

- ① Murata T, Hasebe M, Springer, *The Plant Cytoskeleton. Advances in Plant Biology*, 2011、81-94

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 隆 (MURATA TAKASHI)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授

研究者番号：00242024

(2) 連携研究者

長谷部 光 (HASEBE MITSUYASU)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

野中 茂紀 (NONAKA SHIGENORI)

基礎生物学研究所・時空間制御研究室・准教授

研究者番号：90435529