

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247008

研究課題名(和文) 表層微小管パターンの構築機構の解明

研究課題名(英文) How cortical microtubule patterns are established?

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

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：80180826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,200,000円

研究成果の概要(和文)：中心体を持たない植物細胞では微小管は多様な高次元構造体を構築するが、こうした微小管パターンがどのように形成されるのかはよくわかっていない。本研究では、*in vitro*での微小管パターン再構築を目的として、モデル植物アラビドプシスから重合活性をもつチューブリンを効率よく精製する方法を確立するとともに、新規に同定した重合核複合体因子を用いてアラビドプシス表皮細胞における微小管重合様式の詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is not well known how microtubules are assembled into higher order structures and form diverse array patterns in acentrosomal plant cells. To ultimately construct ordered microtubule patterns *in vitro*, this study established an efficient purification method that purify polymerization-competent tubulins from the model plant *Arabidopsis thaliana*, and analyzed detailed nucleation patterns of cortical microtubules in *Arabidopsis* epidermal cells.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：微小管 チューブリン 重合 アラビドプシス

1. 研究開始当初の背景

間期の植物細胞の細胞膜直下には表層微小管束と呼ばれる微小管骨格ネットワークが張り巡らされており、セルロース合成酵素複合体が表層微小管束に沿って動きながらセルロース繊維を細胞壁に合成する。セルロース繊維は力学的強度をもち、膨圧に抵抗するために、セルロースの配向、すなわち表層微小管束の配向が細胞の伸長方向を決定する。根、胚軸、茎などの縦方向に細長く伸長する細胞では、表層微小管束は伸長方向に対して直角方向に配置している。また、葉表皮細胞のジグソーパズル様の形は、ネックと呼ばれる細い部分に微小管が束化することにより、作り出される。トライコームの枝分かれ形態にも、微小管の配置が重要である。

植物細胞の表層微小管がどのような分子機構で特定のパターンに分布・配置されるようになるのか、近年になって徐々に知見が蓄積されつつある。パターン形成に重要な因子として、「重合」、「プラス端動態」、「束化」が知られている。既存の微小管上で重合を開始した新生微小管は、最終的に重合開始部位で親微小管から切り離され、遊離の微小管となって細胞膜内側に張り付きながら、移動する。微小管のプラス端は動的不安定性により非常にダイナミックに重合と脱重合を繰り返しており、行く手に存在する他の微小管と浅い角度で衝突すると、束化し、安定な細胞骨格要素となる。セルロース合成酵素複合体が相互作用するのも、この束化した表層微小管と考えられている。

微小管のプラス端動態と束化過程を数値化し、上記の微小管形成モデルに当てはめることにより、微小管パターンの形成過程をコンピューター・シミュレーションすることが試みられるようになった。しかし、重合核活性化や植物細胞を立体として扱う点など、幾つかの重要な要素がモデル化されておらず、シミュレーションは部分的な成功に留まっている。微小管重合パラメーターの解析を含めた高次元の数値モデルの開発が必要であり、*in vitro*における微小管形成の再構築系が開発されれば、当分野における大きな飛躍が期待できる。

我々の微小管重合モデル(図1)では、細胞膜内側に張り付いた表層微小管の壁面に微小管重合核複合体が細胞質からリクルートされ、微小管との相互作用に伴い速やかに活性化されて、既存微小管に対し40度の角度を持つ枝分かれの形で、または既存微小管と平行に新規微小管が重合される。重合した娘微小管は微小管切断因子カタニンにより重合開始部位で切断され、遊離の微小管となって細胞膜内側を這ってゆく。娘微小管の切り離し、または娘微小管が重合開始点まで完全に脱重合することにより、重合核複合体は不安定になり、親微小管から離れ、細胞質に放たれる。

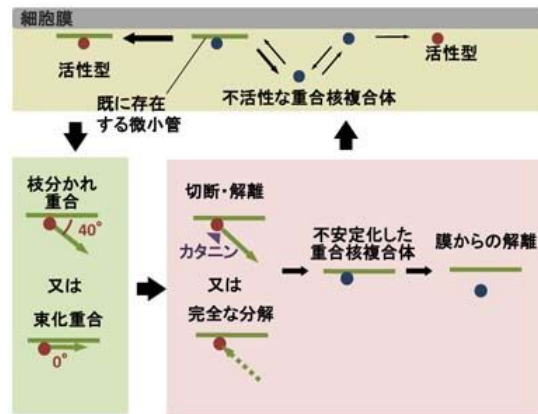


図1 微小管重合核からの新規微小管の誕生サイクル

この中心体に依存しない微小管重合様式には、3つの大きな特徴がある。1つ目は、重合核が細胞質から既存微小管に結合すると、未知のメカニズムにより重合活性が増大するかという点である。細胞質の重合核には含まれない重合制御因子が加わることで活性化されると想像されるが、そのような制御因子は同定されていない。2つ目は、枝分かれ重合と平行重合の2つの重合様式がどのようにコントロールされているかであり、これについても両者で異なる制御因子の関与が考えられる。3つ目は、カタニンはどのようにして娘微小管の重合開始点領域を認識して、どのようなタイミングで枝分かれ部位の娘微小管のマイナス端を切断するのか、という疑問である。カタニン活性の時間的・空間的制御は、動物細胞を含め、明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 微小管重合核複合体の新規制御因子を同定し、植物細胞から単離・精製した不活性の微小管重合核複合体を制御因子の添加により活性化する。この研究成果は、無細胞系における、微小管重合と微小管パターンの再構築系の開発に向けた第一段階となる。(2) 第一段階が早期に成功した場合には、調節サブユニットを含めたカタニン複合体を調整し、上記の実験系に追加することにより、枝分かれ娘微小管がカタニンによりマイナス端で切断される現象を詳細に解析する。これらの解析では、蛍光タンパク質で標識した制御因子の動態を微小管現象と同時に観察することにより、時間的・空間的な制御様式も解析する。

3. 研究の方法

タグタンパク質で標識した微小管重合核コアサブユニット因子を発現させたアラビドプシス植物体系統から、タグ抗体ビーズを用いて重合核複合体を精製する。この複合体は微小管重合能を保持していると期待できるが、制御因子が不足しているために植物特有の枝分かれ重合を行わない(特定の細胞内部位へのターゲティング機能や活性化機能、ま

たはその両方が欠如)と考えられる。未知の重合制御因子を同定し、それらの組換えタンパク質を調整する。In vitroでの微小管重合系を構築するために、アラビドプシス植物体または培養細胞から重合活性を保持したチューブリンを精製する方法を確立する。

In vitro実験系のみならず、植物体を用いた機能解析も平行して行う。

4. 研究成果

(1) 重合活性をもつチューブリンの精製

チューブリンヘテロ二量体に結合する微小管結合因子 TOG1 をカラムに充填したチューブリン精製カラムを作製し、植物細胞粗抽出タンパク質液から直接に一段階で内在性野生型チューブリンを精製することに成功した。アラビドプシスの植物体よりも培養細胞を用いた場合に効率よく精製することができた(図2)。精製したチューブリンの翻訳後修飾を市販の動物チューブリン修飾抗体を用いて調べたところ、植物チューブリンではC末端のチロシン残基の除去は見られず、ポリグルタミン化も起こっていなかった。K40 リジン残基のアセチル化は不明瞭な結果であった。また、ストレス処理した植物体から精製したリン酸化チューブリンは重合活性が低かった。さらに、ポリペプチド鎖内部にポリヒスチジンを挿入したチューブリンを発現させたアラビドプシス培養細胞から、組換えチューブリンを精製することにも成功した。

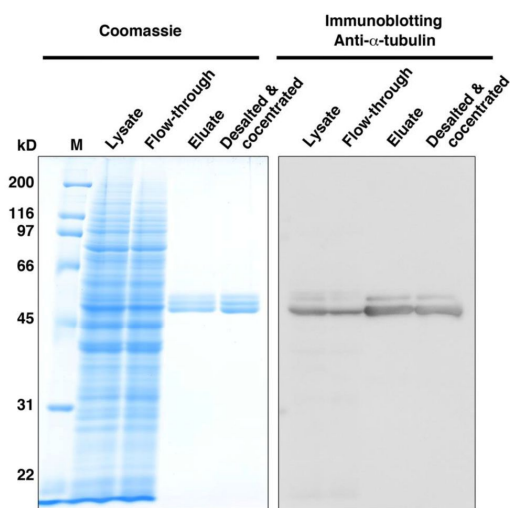


図2 アラビドプシス培養細胞からのチューブリン精製。(左)CBB染色による全タンパク質の検出。(右)αチューブリン抗体によるチューブリンの検出。

(2) 重合活性をもつ重合核複合体の精製

我々が Nature Cell Biol.論文 で報告した精製方法は、最終の精製段階で界面活性剤 SDS によりタンパク質変性させてアフィニティーカラムから脱離させたので、複合体は各構成成分に分離し、変性した状態で精製され

た。本研究では、まず、精製に用いる GCP2/3-GFP 融合タンパク質を改良して、プロテアーゼ処理により温和な条件で精製複合体をカラムから脱離させることを試みた。しかし、微量の native 複合体が回収されたものの、効率は非常に低かった。そこで、Strep-II ペプチドをタグとして用いて MZT1 (下記参照)-GFP を強制発現させたアラビドプシス植物体ならびに培養細胞を作出して、MZT1-GFP 含有重合核複合体を精製したところ、培養細胞から効率よく精製することに成功した。さらに、in vitroでチューブリンと精製複合体を混合したところ、GFP で標識された複合体から微小管が重合することが観察された。

(3) 微小管重合調節因子の解析

最近、ヒトの細胞分裂過程に關与するタンパク質の網羅的システム解析により、真核生物で保存された低分子タンパク質 MOZART1 (MZT1)が同定された。ヒト培養細胞では MZT1 の発現を低下させると、紡錘体の形成が異常になる。アラビドプシスには MZT1 相同遺伝子が2つ(MZT1a と MZT1b)あり、単独のヌル変異では微小管異常は見られないが、二重変異は胚性致死であった。

MZT1-GFP はアラビドプシス細胞において微小管重合核に局在し(図3)、重合核複合体因子の一員であった。興味深いことに、アラビドプシス細胞では MZT1 含有複合体は GCP2/3 含有複合体よりも、より重合活性が高かった。

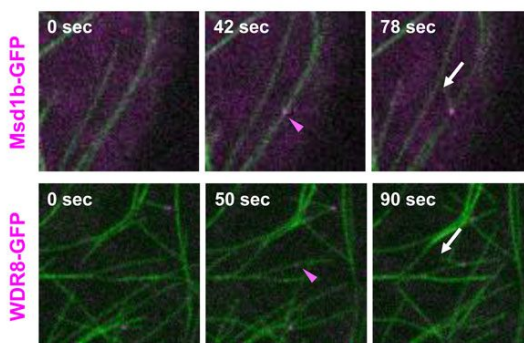


図3 Msd1とWDR8は微小管重合開始点に局在する。mCherry-TUB6で微小管を標識(緑)したアラビドプシス植物体にMsd1b-GFP(上)またはWDR8-GFP(下)を共発現させた。

植物特有の微小管重合調節因子を検索するために、アラビドプシス培養細胞から微小管付随タンパク質画分を高度に精製し、プロテオミクス法により新規の微小管付随タンパク質を多数同定した。これらのうち、2つの新規微小管関連因子(Msd1 と WDR8)がお互いに複合体を形成し、微小管重合核に共局在することが判明した(図4)。Msd1 単独で微小管局在を示すが(図3)、WDR8 単独では微小管に結合しない。Msd1a と Msd1b (アラビドプシスには2つの相同遺伝子が存在)の二重変異株、並びに WDR8 変異株では、親微小管に局在した重合核から娘微小管が誕生し

た後、重合核が乖離しにくいことがわかった。微小管切断因子カタニンによる娘微小管切り離しが阻害されている可能性が示唆された。

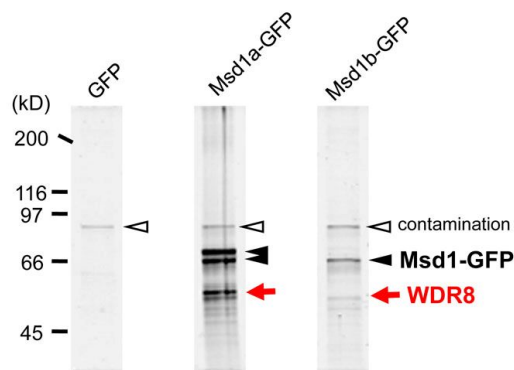


図4 Msd1とWDR8は複合体を形成する。Msd1-GFPを発現するアラビドプシス植物体からGFP抗体ビーズを用いて、Msd1と結合するタンパク質を精製した。

<引用文献>

M. Nakamura, D. Ehrhardt, and T. Hashimoto (2010) Microtubule and katanin dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the Arabidopsis cortical array. *Nature Cell Biol.* 12: 1064-1070.

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 7件)

A. Walia, M. Nakamura, V. Kirk, D. Moss, T. Hashimoto, and D. Ehrhardt (2014) GCP-WD mediates γ -TuRC recruitment and the geometry of microtubule nucleation in the acentrosomal interphase arrays of Arabidopsis. *Curr. Biol.* 24: 2548-2555. doi: 10.1016/j.cub.2014.09.013. 【査読あり】

T. Hamada, N. Nagasaki-Takeuchi, T. Kato, M. Fujiwara, S. Sonobe, Y. Fukao, and T. Hashimoto (2013) Purification and characterization of novel microtubule-associated proteins from Arabidopsis cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 163: 1804-1816. doi: 10.1104/pp.113.225607 【査読あり】

S. Fujita, J. Pytela, T. Hotta, T. Kato, T. Hamada, R. Akamatsu, Y. Ishida, N. Kutsuna, S. Hasezawa, Y. Nomura, H. Nakagami, and T. Hashimoto (2013) An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 23: 1969-1978. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.006 【査読あり】

T. Hashimoto (2013) A ring for all: γ -tubulin-containing nucleation complexes in acentrosomal plant microtubule arrays. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 : 698-703. doi:

10.1016/j.pbi.2013.09.002. 【査読あり】

Y. Ban, Y. Kobayashi, T. Hara, T. Hamada, T. Hashimoto, S. Takeda, and T. Hattori (2013) Alpha-tubulin is rapidly phosphorylated in response to hyperosmotic stress in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 54: 848-858. doi: 10.1093/pcp/pct065 【査読あり】

T. Hashimoto (2013) Dissecting the cellular functions of plant microtubules using mutant tubulins. *Cytoskeleton* 70: 191-200. doi: 10.1002/cm.21099 【査読あり】

M. Nakamura, N. Yagi, T. Kato, S. Fujita, N. Kawashima, D.W. Ehrhardt, and T. Hashimoto (2012) Arabidopsis GCP3-INTERACTING PROTEIN 1/MOZART1 is an integral component of the γ -tubulin-containing microtubule nucleating complex. *Plant J.* 71: 216-225. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04988.x. 【査読あり】

〔学会発表〕(計 10件)

Takashi Hashimoto, Stress-induced destabilization of cortical microtubules is mediated by tubulin kinase, Front Lines of Plant Cell Wall Research, 2015年3月21日、東大寺総合文化センター、奈良県奈良市

堀田崇、TOG カラムを用いた植物培養細胞からのチューブリン精製、日本植物生理学会年会、2015年3月16日、東京農業大学、東京都

高橋英之、ゼニゴケを用いたストレス誘導性の表層微小管脱重合機構の解析、日本植物生理学会年会、2015年3月16日、東京農業大学、東京都

八木慎宣、Functional analysis of novel Arabidopsis proteins that associate with microtubule nucleation sites、日本植物生理学会年会、2014年3月19日、富山大学(富山県富山市)

長崎菜穂子、シロイヌナズナ新規微小管結合タンパク質ファミリーの機能解析、日本植物生理学会年会、2013年3月21日、岡山大学、岡山県岡山市

加藤壮英、微小管形成開始部位に局在するシロイヌナズナ新規 MAPs の機能解析、日本植物生理学会年会、2013年3月21日、岡山大学、岡山県岡山市

八木慎宣、Dual labeling of microtubules and nucleation complexes reveals detailed array assembly processes in Arabidopsis cells、日本植物生理学会年会、2013年3月21日、岡山大学、岡山県岡山市

藤田智史、atypical kinase PHS1は高浸透圧条件下において微小管の脱重合を促

進する、日本植物生理学会年会、2013年
3月21日、岡山大学、岡山県岡山市
Takashi Hashimoto, Organization of
cortical microtubule arrays in
Arabidopsis, 10th International
Congress of Plant Molecular Biology,
2012年10月23日、Cheju, Korea
Takashi Hashimoto, Organization of
cortical microtubule arrays in
Arabidopsis, EMBO Workshop
“Microtubules”, 2012年5月23日、
Heidelberg, Germany

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/hashimoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 隆 (HASHIMOTO Takashi)

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：80180826

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし