

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：21301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891020

研究課題名(和文)植物先端成長に対する細胞骨格の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the roles of cytoskeleton in plant tip growth

研究代表者

日渡 祐二 (Hiwatashi, Yuji)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：10373193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の先端成長において、細胞骨格であるアクチン繊維と微小管が独立して機能しているのか、互いに作用しながら機能しているのかを解明するために、コケ植物の原糸体細胞の先端成長領域における細胞骨格のダイナミクス観察、先端成長に対する微小管・アクチン繊維結合タンパク質の機能解析を行った。その結果、微小管・アクチン繊維同時可視化システムを用いたライブイメージングと阻害剤実験により、微小管束の形成はアクチン繊維に依存していることが示唆された。また、アクチン重合促進因子classII forminが先端成長領域において微小管とアクチン繊維を制御し、伸長速度を調節するタンパク質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tip-growing cells display polarized cell growth. Microtubules (MTs) and actin filaments (AFs) have been implicated in regulating directionality and expansion. However, the regulatory interaction between MTs and AFs in tip-growing plant cells remains unclear. In this project, we showed that the proper generation of AFs was likely dependent on the existing MTs in the polarized expansion zone of caulonemal cells of the moss *Physcomitrella patens*. Moreover, the actin polymerizing factor formins, For2A and 2B, were involved in the regulation of the rate of cell growth. The live-imaging technique revealed that AF foci were generated in the existing MT foci in the expansion zone. The MT depolymerization led to the loss of the AF foci, suggesting that the AF foci are formed on the MT foci. The inducible RNAi screening of the putative MT-AF regulators indicated that For2A and 2B played roles on promoting the expansion rate.

研究分野：植物細胞生理学

キーワード：先端成長 微小管 アクチン繊維 コケ植物 フォルミン ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

極性成長は、細胞の形作りや細胞独自の機能を発揮する上で必要である。先端成長は細胞の極性成長の典型例で、菌類、植物、動物などの幅広い分類群で見られる。植物の先端成長は、コケ植物やシダ植物の原系体、種子植物の根毛や花粉管などで見られる。これらの細胞の伸長領域では、細胞壁や膜の構成成分を含む小胞が細胞骨格に沿って分泌され、膨圧により極性成長する。長年、コケ植物の原系体、種子植物の根毛や花粉管を用いて、細胞骨格、小胞の極性輸送、局所的細胞壁合成の制御機構が解析されている。

先端成長での細胞骨格の役割は、間接蛍光抗体法や蛍光タンパク質による局在解析、細胞骨格破壊剤を使った生理学的解析などにより明らかにされてきた。その結果、アクチン繊維は伸長および方向性制御に関与することが明らかとなり、蛍光タンパク質を用いたライブイメージングにより、伸長領域でのアクチン繊維ダイナミクスが解析されつつある。

一方、微小管については、被子植物の花粉管では微小管を破壊しても先端成長に影響しないが、裸子植物の花粉管では伸長が阻害されることが知られている。また、根毛と原系体では伸長方向が異常になることがわかっている。しかしながら、アクチン繊維に比べて、微小管の役割とダイナミクスは不明な点が多かった。

研究代表者は、ヒメツリガネゴケ原系体の先端成長において、(1)伸長領域中央部に微小管重合端が集合して微小管束 (MT foci) が形成され、分子モーターキネシン KIN1D1により維持されること、(2)この MT foci を介して伸長と方向性が制御されることを明らかにした。このように、アクチン繊維と微小管は、ともに先端成長の伸長や方向性の制御に関与することがわかってきた。

これまでに酵母や動物の研究例から、微小管とアクチン繊維はそれぞれ独立に機能する場合と協調的に機能する場合が知られている。さらに協調的に機能する場合には、これらの細胞骨格が間接的に相互作用する例と、アクチン繊維と微小管の両方に結合するタンパク質を介して、直接的に相互作用し機能する例がわかっている。しかしながら植物の先端成長では、これらの細胞骨格が伸長や方向性に対し、それぞれ独立して制御しているのか、あるいは互いに相互作用しながら制御しているのかは不明のままである。そのため、アクチン繊維と微小管が先端成長制御の点で等価の役割を持っているのか、また何らかの役割を分担しているかもわかっていない。

原系体の先端成長では、蛍光タンパク質を用いたアクチン繊維のイメージング解析により、伸長領域にアクチン繊維の集束点 (AF foci) が形成される。研究代表者は、微小管とアクチン繊維の同時可視化システムを作出し、

ライブイメージング解析をした結果、このアクチン繊維束 AF foci がキネシン KIN1D1により維持される MT foci と共局在することを見出した。

さらに、近年、植物においてもアクチン繊維と微小管の両方に結合するタンパク質が同定されつつある。これらのことから、研究代表者は、AF foci と MT foci はアクチン繊維・微小管結合タンパク質を介して相互作用しながら、原系体の先端成長の伸長と方向性を制御しているのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

(1)先端成長時の AF foci と MT foci のダイナミクス、(2)細胞骨格破壊剤による AF foci と MT foci のダイナミクスと先端成長の変化、(3)AF foci と MT foci のダイナミクスと先端成長へのアクチン繊維・微小管結合タンパク質の機能を明らかにすることにより、アクチン繊維束 (AF foci) と微小管束 (MT foci) がアクチン繊維・微小管結合タンパク質を介して相互作用し、先端成長の伸長と方向性を制御するという仮説を検証する。

3. 研究の方法

アクチン繊維と微小管が相互作用する場合には、両者のダイナミクスが一致し、かつ、それぞれの細胞骨格を薬剤で破壊すれば、もう一方の細胞骨格のダイナミクスが変化するはずである。そこで、ヒメツリガネゴケ原系体の先端成長でのアクチン繊維束 (AF foci) と微小管束 (MT foci) のダイナミクスを同時観察するとともに、薬剤処理でのダイナミクスの変化を調べる。さらに、アクチン繊維・微小管結合タンパク質の局在解析を行い、AF foci と MT foci に共局在する因子を選抜する。

(1)伸長領域における AF foci と MT foci のダイナミクスの同時経時観察

先端成長において AF foci と MT foci のダイナミクスがどのように一致するかを明らかにするために、アクチン繊維・微小管同時可視化システムを用いて、伸長領域での AF foci と MT foci のダイナミクスをタイムラプス観察する。高性能共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、AF foci、MT foci のダイナミクスを詳細に観察する。

(2)細胞骨格破壊剤投与時の AF foci と MT foci のダイナミクスと先端成長の検討

微小管破壊剤 (oryzalin)、アクチン繊維破壊剤 (latrunculin B) でアクチン繊維・微小管同時可視化システムを処理し、AF foci と MT foci のダイナミクス、先端成長の変化を観察する。

(3)MT foci と AF foci に共局在するアクチ

ン繊維・微小管結合タンパク質の選抜

既知の植物のアクチン繊維・微小管結合タンパク質について、ヒメツリガネゴケのオーソログを同定する。微小管可視化系統背景で遺伝子ターゲティングにより sGFP をノックインし、sGFP 融合タンパク質発現系統を作出する。この系統で、sGFP 融合タンパク質と MT foci を観察し、MT foci に共局在するタンパク質を選抜する。

(4) 細胞骨格ダイナミクスと先端成長に対するアクチン繊維・微小管結合タンパク質の遺伝子破壊による機能解析

アクチン繊維・微小管との結合が確かめられたタンパク質については、微小管可視化系統を背景に遺伝子ターゲティングにより遺伝子破壊を行い、AF foci と MT foci のダイナミクス、先端成長の表現型を観察する。あるいは、条件的に遺伝子ノックダウンを行い、AF foci と MT foci のダイナミクスと先端成長の表現型を観察する。これらの結果から、AF foci と MT foci ダイナミクスと先端成長に対するタンパク質の機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 新しい微小管・アクチン繊維同時可視化系統の作出

これまでの微小管・アクチン繊維同時可視化系統に異常形態を示していた。そこで、正常な形態をもつ細胞を使って微小管束形成に対するアクチン繊維束の作用を調べるために、新たに微小管・アクチン繊維同時可視化系統を作出した。

sGFP- α -tubulin 発現系統 GTU70 に Lifeact-mcherry 発現コンストラクトを導入し、安定形質転換系統 GTLA を得た。GTLA20、GTLA 39 では、野生型および GTU70 系統と比較して、茎葉体の形成率低下やカウロネマ細胞の形成不全が観察された。ヒメツリガネゴケにおいて、Lifeact-mcherry が高発現すると細胞形態が異常になることが報告されている (Vidali et al., 2009 PLoS ONE 4: e5744)。従って、GTLA20 および GTLA39 では Lifeact-mcherry の発現量が高くなったために形態が異常になったと考えられる。

GTLA49 の植物体は、野生型や GTU70 系統に比べて、茎葉体の形成率やカウロネマ細胞の形成がほぼ同じであった。そのため、アクチン繊維可視化系統として、有望であると考えられた。次に、アクチン繊維が可視化されているか観察したところ、間期の原系体細胞では mcherry の蛍光シグナル、sGFP の蛍光シグナルともに検出された。このシグナルは、それぞれ細胞質アクチン繊維と細胞質微小管を示していると考えられる。また分裂期の原系体細胞でもフラグモプラストに mcherry の蛍光シグナルおよび sGFP の蛍光シグナルが検出された。フラグモプラストは、アクチン繊維と微小管の両方の細胞骨格で構成されている (Otegui et al., 2005 Trends Cell

Biol. 15: 404-413) ため、GTLA49 では、フラグモプラストアクチン繊維とフラグモプラスト微小管が蛍光ラベルされていると考えられる。従って、GTLA49 はアクチン繊維と微小管が同時可視化されていることが判明した。この系統は、アクチン繊維と微小管のダイナミクスを同時に観察するための非常に有効なマーカー系統であると考えられる。

(2) 伸長領域における AF foci と MT foci のダイナミクスの同時経時観察

Lifeact-mcherry 発現コンストラクト導入安定形質転換系統 GTLA49 を用いて、伸長領域における微小管とアクチン繊維のダイナミクスを観察したところ、MT foci が形成されている場所にアクチン繊維が集積し、AF foci を形成しているように見えた。この結果から、MT foci と AF foci がそれぞれ伸長領域に集まっているのではなく、MT foci が形成される点に AF foci が形成されることで微小管とアクチン繊維は共局在を示す可能性が考えられた。MT foci が AF foci の足場となり、先端成長が起こっているのかもしれない。

アクチン繊維の動態は、1-2 秒で変化することがわかっている。(Vidali et al., 2009 PLoS ONE 4: e5744)。今回のタイムラプス観察は、3 秒間隔で画像を取得しているため、画像と画像の間に時間が空き、3 秒以下で変化する微小管とアクチン繊維の動態を捉えることができなかった。今後は、1 枚の画像を取得する時間を 1-2 秒に短縮することで時間分解能を向上させて、微小管、アクチン繊維の動態をより詳細に観察していくことが必要である。

(3) 細胞骨格破壊剤投与時の AF foci と MT foci のダイナミクスと先端成長の検討

Latrunculin B によるアクチン繊維の破壊では、100 nM の低い濃度で原系体細胞を処理すると、アクチン繊維の破壊が観察された。さらに、微小管は観察されたものの、先端領域における微小管束化が形成されず、先端成長の伸長速度の低下が見られた。このことから、アクチン繊維の破壊により、MT foci の形成が阻害される可能性が考えられる。さらに先端領域で伸長が低下した。このことから、アクチン繊維が伸長に必要であることが示唆される。また、Latrunculin B で処理した原系体では、無処理の原系体と比べ、カウロネマ細胞が減少し、ほとんどがクロロネマ細胞であった。これは、微小管、アクチン繊維ともに Latrunculin B によって正常な機能がかく乱されたため、原系体のクロロネマ細胞の先端成長が起こらず、クロロネマ細胞からカウロネマ細胞への分化が進行しなかったためであると考えられる。

微小管・アクチン繊維同時可視化系統 GTLA49 のライブイメージング解析から、カウロネマ細胞で MT foci の形成に伴って AF foci

が形成され、その結果、両者が共局在することが考えられた。100 nM の Latrunculin B 処理でカウロネマ細胞が観察できなかったため、カウロネマ細胞においてアクチン繊維のみを破壊するために、今後はさらに Latrunculin B の添加する濃度を下げていく必要がある。

微小管脱重合剤 Oryzalin を 100 nM 濃度で原系体を処理すると、原系体の伸長速度の低下および方向性の乱れが観察された。MT foci の形成は見られず、また AF foci の形成も検出されなかった。従って、AF foci の形成は、MT foci に依存的であることが示唆される。

以上の結果から、先端成長において微小管は伸長速度および方向性の制御、アクチン繊維は伸長速度の制御に作用しており、これらが相互作用しながら伸長を制御することが考えられる。

(4) MT foci と AF foci に共局在するアクチン繊維・微小管結合タンパク質の選抜

微小管・アクチン繊維結合タンパク質をスクリーニングした結果、微小管付随タンパク質 CLASP が選抜された。CLASPa-3xCitrine コンストラクトを挿入した安定形質転換系統では、カウロネマ頂端幹細胞の伸長領域において、MT foci に Citrine 蛍光が検出された。この結果から、先端成長にて MT foci を制御するタンパク質である可能性が考えられる。CLASP は微小管とアクチン繊維を架橋する機能が示唆されるため、先端成長における微小管束とアクチン繊維束の同所的形成に関与する可能性が考えられる。

また、スクリーニングにより、アクチン重合促進因子 Formin が選抜された。For2A-3xEGFP コンストラクトを挿入した安定形質転換系統では、カウロネマ頂端幹細胞の伸長領域において For2A-3xEGFP タンパク質が MT foci と共局在した。また、タイムラプス解析によって、For2A-3xEGFP タンパク質と MT foci のダイナミクスを調べた結果、微小管が束化するとき、For2A-3xEGFP のシグナルが強く検出された。このことより、For2A と微小管束の間に相互的な作用があると考えられる。また、双方のダイナミクスから、微小管形成に伴って、For2A が MT foci に蓄積する可能性が考えられる。今後は MT foci の形成を阻害した際の For2A のダイナミクスの変化や、微小管に対する For2A の結合性を明らかにする予定である。

(5) 細胞骨格ダイナミクスと先端成長に対するアクチン繊維・微小管結合タンパク質の遺伝子破壊による機能解析

2 つの Formin、For2A と For2B について、エストロゲン (beta-estradiol) 誘導 RNA 干渉による遺伝子機能解析実験 (ノックダウン実験) を行った。For2AB ノックダウンコンストラクトを sGFP-alpha-tubulin およびヒストン H2B-mRFP1 共発現 (GH) に導入した植

物体 For2AB-KD およびコントロールとして GH 系統を、1 μ M beta-estradiol を含む培地 (E2) と、含まない培地 (Mock) で 8 日間、16 日間培養し、植物体を比較した。その結果、For2A と For2B の同時ノックダウン系統でエストロゲン誘導的に原系体の成長が阻害された。このことから、For2A 遺伝子と For2B 遺伝子をノックダウンすることで、原系体の先端成長速度が低下することが示唆された。Bezaniilla らは、原系体の一過的 RNA 干渉実験により、For2A と For2B が原系体の伸長に不可欠であることを示している (Vidali et al., 2009 PloS ONE 4: e5744; van Gisbergen et al., 2012 J. Cell Biol. 198: 235-250)。今回の結果は Bezaniilla らの結果と一致しており、For2A と For2B は先端成長の速度を制御するタンパク質であることが示された。今後は、エストロゲン誘導的に For2A 遺伝子と For2B 遺伝子の発現が抑制されることを、RT-qPCR により mRNA を定量することにより確かめる必要がある。さらに、For2AB-KD ノックダウン系統において、For2A と For2B の発現が抑制されたとき微小管束のダイナミクスがどのように変化するかを観察すれば、微小管束の形成と維持に対する For2A と For2B の役割が明らかになると考えられる。このことにより、For2A、For2B がどのように微小管に作用して先端成長の成長速度に関与しているのか、また For2A、For2B を介して微小管とアクチン繊維がどのように相互作用するのか明らかになるだろう。

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)

[学会発表](計 4 件)

- (1) 日渡祐二, 清水祥登, 佐藤良勝, John H. Doonan 「微小管生成複合体オーグミンを構成する植物特異的サブユニット AUG8 の機能解析」 第 57 回日本植物生理学会年会委員会 平成 28 年 3 月 19 日 岩手大学 (岩手県盛岡市)
- (2) 日渡祐二, 清水祥登, 佐藤良勝, John H. Doonan 「ヒメツリガネゴケにおける微小管形成複合体オーグミンの植物特異的サブユニット AUG8 の機能解析」 第五回東北植物学会福島大会 平成 27 年 12 月 20 日 福島大学 (福島県福島市)
- (3) Yuji Hiwatashi, Yoshikatsu Sato, John H. Doonan “Plant-specific kinesins Have a Dual Function in Organizing Microtubules during Both Tip Growth and Cytokinesis” 第 56 回日本植物生理学会年会 平成 27 年 3 月 16 日 東京農業大学 (東京都世田谷区)
- (4) Yuji Hiwatashi, Yoshikatsu Sato, John H. Doonan “Plant-specific kinesins Have a Dual Function in Organizing Microtubules during Both Tip Growth

and Cytokinesis” 第37回日本分子生物
学会 平成26年11月25日 パシフィコ
横浜（神奈川県横浜市）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.myu.ac.jp/site/farm/hiwatashiyo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日渡 祐二 (HIWATASHI, Yuji)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：10373193