

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14728

研究課題名(和文)植物細胞における中間径フィラメントの働きの解明

研究課題名(英文)Study on the function of intermediate filaments in plant cells

研究代表者

金田 剛史(Kaneta, Tsuyoshi)

愛媛大学・理工学研究科(理学系)・講師

研究者番号：70301752

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):動物細胞では主要な細胞骨格の一種である中間径フィラメント(Intermediate Filament: IF)は植物細胞では存在の有無が確定していない。本研究では、IFの構造を維持するために不可欠な長いヘリックスとIFタンパク質モチーフを持つシロイヌナズナのタンパク質を植物細胞のIFを構成するタンパク質の候補として選別し、IF Motif Protein 1(IFMoP1)と名付けた。このIFMoP1をタバコの培養細胞で発現させて局在を調べると、間期にはIFMoP1は細胞骨格様の柔軟な線維構造を形成し、線維を形成しないときには微小管と共局在することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核細胞において細胞骨格は、細胞の形態維持や運動、輸送などを担う重要な構造体である。細胞骨格を形成する主要な3種類のタンパク質線維のうち、IFは、植物細胞ではその存在の有無が明確にされていない。本研究では、植物のIFを形成するタンパク質の候補としてIFMoP1を見出した。また、動物細胞でIFは細胞や組織の形態維持という重要な役割を担っている。しかし、植物では細胞の形態は堅い細胞壁によって維持されていることから、植物細胞のIFには、動物細胞のものとは異なる役割があると推測され、IFの新規の機能を見い出せる研究につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文): Intermediate filaments (IFs) are kinds of major cytoskeletons in animal cells. While, their existence in plant cells has not been definitively concluded. In this study, the Arabidopsis gene was selected as a candidate gene for a protein constituting IF in plant cells. This protein has a large α -helix as well as the IF protein motif indispensable for maintaining the structures of IF. Thus, we named this protein as Intermediate Filament Motif Protein 1 (IFMoP1). The localization of IFMoP1 was examined in IFMoP1-expressing tobacco BY-2 cells, this protein exhibited cytoskeleton-like flexible filamentous structures in plant cells and co-localized with microtubules, except for forming filamentous structures.

研究分野：植物形態学

キーワード：細胞骨格 中間径フィラメント 植物細胞 細胞周期 タバコBY-2細胞 シロイヌナズナ 微小管 タイムラプス解析

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、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の細胞骨格の一種である中間径フィラメント (IF) は、10 nm の直径をもつタンパク質線維の総称である。IF は、細胞骨格の中で最も構造的に安定なタンパク質線維であり、動物細胞においてはその優れた柔軟性と機械的強度により細胞あるいは組織の形態を維持する働きをもつことが知られている。一方、強固な細胞壁で形態が維持されている植物細胞においては IF の働きは必要ないと考えられており IF の存在の有無については確定していない。植物細胞から精製したタンパク質が *in vitro* で IF 様の線維状の構造物を形成することが報告されているなど、その存在を示唆する生化学的および免疫学的な証拠はいくつか挙げられているが、植物において、IF を構成するタンパク質 (IF タンパク質) をコードする遺伝子 (IF 遺伝子) は同定されていない。申請者は、シロイヌナズナの遺伝子群からスクリーニングを行い、植物細胞内で強制発現させると細胞骨格様の線維を形成するタンパク質をコードする遺伝子を 1 つ選抜し、Intermediate Filament Motif Protein 1 (IFMoP1) と命名して解析を行っている。

2. 研究の目的

真核細胞において細胞骨格は、細胞の形態維持や運動、輸送などを担う重要な構造体である。細胞骨格を形成する主要な 3 種類のタンパク質線維のうち、IF は、植物細胞ではその存在の有無が明確にされていない。本研究課題は、植物細胞に IF が存在することを証明し、植物細胞における IF の機能を明らかにすることを目的とする。シロイヌナズナの遺伝子群から選抜した IF タンパク質をコードしている可能性のある遺伝子である IFMoP1 について、この遺伝子がコードするタンパク質によって形成される線維構造が IF の定義にあてはまるものであるか否かを検証する。また、細胞壁で形態が保持されている植物細胞における IF の働きは、動物細胞と同様のものだと考えにくく、その働きも合わせて解明する必要がある。そこで、形質転換植物を用いて IFMoP1 の植物細胞での働きや挙動についても解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 植物の IF 遺伝子の候補のスクリーニング

長い ヘリックスおよび IF モチーフと呼ばれる共通配列をもつ動物の IF タンパク質の構造的な特徴に着目して、シロイヌナズナの全ゲノム配列のデータベース上より植物の IF 遺伝子の候補を絞り込み、さらに、これらの遺伝子がコードするタンパク質と緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質を生産させた形質転換タバコ培養細胞を作製した。蛍光顕微鏡による観察を行い、コードするタンパク質が細胞内において細胞骨格様の線維構造を形成するものを選抜した。

(2) IFMoP1 の動態観察

生きた細胞で観察可能であるという GFP の特性を利用し、IFMoP1 と GFP との融合タンパク質 (IFMoP1-GFP) を生産させたタバコ培養細胞において、細胞内での動態を調べた。タバコ培養細胞は、生きた細胞での観察が容易で、細胞周期を同調化させる方法も確立されており、この様な解析に適した材料である。継続的な観察を行い、IFMoP1 の細胞周期依存的な局在・構造の変化について調べた。また、IFMoP1 の細胞内での挙動と微小管との関連性を調べるために、IFMoP1-GFP および赤色蛍光タンパク質 (mCherry) と α -チューブリンとの融合タンパク質 (mCherry-TUB) の遺伝子を導入して発現させた二重形質転換タバコ BY-2 細胞を利用して経時的な観察を行った。

(3) 微小管とアクチンフィラメントの免疫染色

一般に異種の細胞骨格どうしが関連して機能する現象が細胞内において頻繁に見られることから、IFMoP1 と他の細胞骨格 (微小管、アクチンフィラメント) との局在関係について詳細に調べる必要があると考えられる。IFMoP1-GFP を生産させた形質転換タバコ培養細胞において、抗チューブリン抗体及び抗アクチン抗体を用いた間接蛍光抗体法によって微小管及びアクチンフィラメントの染色を行い、IFMoP1 との局在関係を調べた。

(4) 発現解析

シロイヌナズナ植物体において IFMoP1 遺伝子が発現している組織を特定するために、これらの遺伝子の上流域のプロモーター配列をゲノミック PCR 法によって単離し、その下流に β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子をレポーターとしてつないだコンストラクトを作製した。このコンストラクトをアグロバクテリアを介して flower dipping 法によってシロイヌナズナへ導入し、形質転換体を作製した。この形質転換シロイヌナズナを利用して、IFMoP1 の発現場所を調べた。

4. 研究成果

(1) 植物の IF タンパク質の候補

推定アミノ酸配列に IF の構造の維持に不可欠な長い ヘリックスをもち、IF モチーフと呼ばれる動物の IF タンパク質に共通の配列をもつタンパク質をコードする遺伝子をシロイヌナズナの全ゲノム配列のデータベース上より植物の IF 遺伝子の候補として選抜した。さらに、これらの遺伝子がコードするタンパク質と GFP との融合タンパク質を生産させた形質転換タバコ培養細胞を作製し、コードするタンパク質が細胞内において細胞骨格様の線維構造を形成するものを 1

つ選び出した。推定アミノ酸配列上に IF モチーフを持ち、植物細胞内で細胞骨格様の線維を形成するシロイヌナズナのこのタンパク質を植物の IF タンパク質の候補と考えて IFMoP1 と名付けた。

(2) 細胞周期依存的な IFMoP1 の挙動

IFMoP1-GFP を発現させた形質転換タバコ培養細胞において IFMoP1 タンパク質が間期の細胞の核周辺の細胞質において細胞骨格様の線維状の構造をとることが分かった。これらの繊維状構造は、間期の核の動きに伴って動いていた。また、IFMoP1 が形成する構造と局在を、DNA 合成阻害剤である aphidicolin と微小管破壊剤である propyzamide を用いて細胞周期が同期化された IFMoP1-GFP 発現タバコ BY-2 細胞を使用して調べると、細胞分裂期には IFMoP1-GFP が紡錘体と隔膜形成体の周囲に局在する様子がみられた。IFMoP1-GFP で形成される細胞骨格様の線維状構造を持つ細胞の割合は、細胞分裂を終えた細胞の増加に伴い増加し、数時間後に減少した。このことから IFMoP1 が形成する線維構造が、間期の比較的初期に形成され、その後、崩壊していることを示唆している。さらにこの IFMoP1 の細胞周期に依存した局在の変化は IFMoP1 が細胞周期に関連した機能をもつことを示唆している。

(3) 線維を形成していない IFMoP1 の微小管との共局在

IFMoP1-GFP を発現させた形質転換タバコ BY-2 細胞において、免疫蛍光染色により微小管を染色して観察を行うと、間期に線維構造を形成しているときには IFMoP1 は微小管と独立した局在を示すが、IFMoP1 が線維構造を形成していない分裂期には紡錘体および隔膜形成体の微小管と共局在していることが分かった。また、間期の細胞では細胞質表層微小管の一部と共局在している様子もみられた。

IFMoP1-GFP および mCherry-TUB の遺伝子を導入して発現させた二重形質転換タバコ BY-2 細胞を利用して生きた細胞で観察を行うと、IFMoP1 が有糸分裂期から細胞分裂の直後まで微小管と共局在している様子が確認された。これらのことは、線維構造を形成していない IFMoP1 が微小管と関連した機能をもつことを示唆している。

もう一つの主要な細胞骨格のアクチンフィラメントについても免疫蛍光染色による同様の観察を行ったが、IFMoP1 とアクチンフィラメントの局在には関連性が見られなかった。

(4) 微小管およびアクチンフィラメントと独立して形成される IFMoP1 線維構造

微小管破壊剤 colchicine 処理及びアクチンフィラメント破壊剤 latrunculin B 処理により、微小管あるいはアクチンフィラメントをそれぞれほぼ完全に破壊した細胞においても、IFMoP1 タンパク質が形成する線維状の構造物が観察されることが分かった。このことは、IFMoP1 タンパク質が単に微小管やアクチンフィラメントといった既知のタンパク質線維構造と結合することによって線維状の局在を示しているのではなく、独立して線維構造を形成しているということを示している。

(5) タバコの IFMoP1 ホモログの発現

遺伝子のデータベース解析から、様々な植物で普遍的に IFMoP1 のホモログが存在していることが分かった。IFMoP1 の発現と細胞周期との関連性について検討するために、タバコの IFMoP1 ホモログについて半定量的 RT-PCR により発現解析を行ったところ、タバコの IFMoP1 ホモログは植え継ぎ後の細胞増殖の盛んな細胞で発現が高く、定常期の細胞ではほとんど発現していないことが分かった。また、DNA 合成阻害剤 aphidicolin を用いて細胞周期を同調化した細胞で IFMoP1 ホモログの発現を調べたところ、S 期から分裂期までの時期の細胞では発現がほとんど検出されず、G1 期で主に発現している可能性があることが分かった。

(6) シロイヌナズナ植物体における IFMoP1 の発現

プロモーター-GUS 解析により、シロイヌナズナの植物体において IFMoP1 の遺伝子が茎頂や根端の分裂の盛んな組織で発現していることが分かった。これらの結果から、植物の IF タンパク質の候補である IFMoP1 が細胞周期に関連した役割をもつ可能性が示された。

動物細胞における IF の形態学的な定義は、その直径がおよそ 10 nm であるということである。今後、IFMoP1 が形成する線維についても微細構造の観察が必要である。また、植物細胞は強固な細胞壁を有するため、形態維持のためのタンパク質線維は必要なく、植物の IF が細胞形態の維持に働いているとは考えにくい。IFMoP1 の機能解析により動物では知られていない IF の新たな機能が見い出される可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hikaru Utsunomiya, Masayuki Fujita, Fumio Naito, Tsuyoshi Kaneta	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell cycle dependent dynamics of a plant intermediate filament motif protein with intracellular localization related to microtubules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 protoplasma	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） 10.1007/s00709-020-01512-1	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下瞳、宇都宮輝、金田剛史
2. 発表標題 形質転換タバコ培養細胞におけるシロイヌナズナ中間径フィラメントモチーフタンパク質の細胞周期依存的な局在変化とホモログの発現
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会（Japan-Taiwan Plant Biology JTPB 2019 合同開催・名古屋）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都宮輝、金田剛史
2. 発表標題 植物細胞において中間径フィラメントモチーフタンパク質の局在は細胞周期依存的に変化する
3. 学会等名 中国四国地区生物系三学会合同大会（中国四国植物学会第74回大会・高知）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇都宮輝、金田剛史
2. 発表標題 シロイヌナズナの間径フィラメントモチーフタンパク質が形成する構造の細胞周期依存的な変化 タバコBY-2細胞の細胞周期の同調法を利用した解析
3. 学会等名 中国四国地区生物系三学会合同大会（中国四国植物学会第73回大会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宇都宮輝、藤田真幸、金田剛史
2. 発表標題 細胞周期を同調化したタバコBY-2細胞における植物の中間径フィラメントモチーフタンパク質の局在の変化
3. 学会等名 第58回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学 理学部 生物学科 植物形態学研究室ホームページ内 http://bio.sci.ehime-u.ac.jp/morphol/
--

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