

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570046

研究課題名(和文) 高等植物のクラス VIII ミオシンの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of myosin VIII function in higher plants

研究代表者

横田 悦雄 (YOKOTA ETSUO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：80212299

研究成果の概要：植物細胞に特異的に発現しているミオシンの一つであるクラス VIII ミオシンの機能を、タバコ培養細胞 BY-2 を実験材料として用い解析を行った。間期の細胞では、ミオシン VIII のドット状シグナルが細胞質中に観察され、分裂期になると紡錘体の両極、そして細胞版に集積した。また BY-2 細胞からこのミオシンを部分精製して、in vitro 運動再構成系によって滑り活性を解析した。その結果、このミオシンも運動活性を有することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：ミオシン VIII・アクチン・タバコ培養細胞 BY-2・細胞版・in vitro 運動再構成系・ミオシン XI・細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

ミオシンは、ATPの加水分解エネルギーを使ってアクチン繊維上を滑る、あるいは動くモータータンパク質であり、重鎖と軽鎖の2種のサブユニットから構成されている。重鎖サブユニットは、アクチン繊維結合部位とATPase活性部位から成るモータードメインである頭部、軽鎖サブユニット結合部位であるネック、それと尾部の3つの領域から構成されている (Berg et al. (2001) Mol. Biol. Cell. 12;

780-794)。植物細胞からは、3つのクラスのミオシン、VIII、XI、XIIIが同定されている。その内、高等植物細胞内ではミオシンVIIIとXIが発現している。更にシロイヌナズナにおいては、ミオシンVIIIでは4、ミオシンXIでは13のアイソフォームの存在が確認されている (Julie Lee and Liu (2004) Plant Physiol. 136; 3877-3883)。ミオシンXIに関しては、テッポウユリ花粉管とタバコ培養細胞BY-2から生化学的に単離され、in vitro運

動再構成系においてアクチン繊維を滑らせる運動活性や、アクチン繊維によって活性化されるATPase活性を有し、それらの活性は軽鎖サブユニットであるカルモジュリンを介して μ Mレベルのカルシウムイオンによって抑制されることが明らかにされている。そしてミオシンXIは、原形質流動やオルガネラ輸送に関与することが示されている(Shimmen and Yokota (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.* 16; 68-72)。

もう一つのクラスのみオシンであるミオシンVIIIの生化学的あるいは生物物理学的性質は、全く解析されていない。このミオシンの重鎖サブユニットの一次構造やドメイン構造が推測されており、他のミオシンと同様にATPase活性部位等を含んだモータードメインから成る頭部、3から4つのIQモチーフを含んだネックと尾部領域から構成されていることが推定されている。またシロイヌナズナのみオシンVIIIであるATM1の重鎖に対する抗体を用いた免疫蛍光染色法により、このミオシンが細胞板やプラズモデスマータ(細胞間連絡)に集積することが明らかにされている。これらのことから、ミオシンVIIIは、プラズモデスマータにおいて孔の大きさをアクチン繊維と相互作用することにより調節していることが示唆されている(Baluska et al. (2001) *Plant Physiol.* 126; 39-46)。しかし、アクチン繊維を滑らせる、あるいは繊維上を滑る運動活性やATPase活性の有無、それらの調節機構、そして軽鎖サブユニットの組成等全く明らかにされていない。そのため、このミオシンが本当にモータータンパク質として機能しているのかどうかわかっていなかった。このような背景から、当研究を進めていった。

2. 研究の目的

高等植物細胞から、2つのクラスのみオシン、ミオシンVIIIとミオシンXIが同定されているが、ミオシンVIIIに関しては、運動活性などの生化学的あるいは生物物理学的性質は全く解析されておらず、本当にモータータンパク質として機能しているのか明らかになっていない。本研究は、タバコ培養細胞BY-2を実験材料として用い、ミオシンVIIIの滑り活性の有無を調べることを目的とする。またBY-2細胞は、細胞周期の同調法が確立している。それぞれの細胞周期におけるこのミオシンの局在も合わせて調べることによって、機能解析を行っていく。

3. 研究の方法

(1)ミオシンVIII重鎖に対する抗体の作製

既にクローニングしておいたシロイヌナズナのみオシンVIIIであるATM1重鎖の遺伝子を用いて、955Ser~1054Serまでの領域のN端にHisタグを連結させたコンストラクトを大腸菌に導入し、リコンビナントタンパク質を発現させてNi-カラムによって単離した。なおこの領域は、C端尾部-コイルドコイルドメインのC端下流領域に相当する。単離したリコンビナントタンパク質を電気泳動してバンドを切り出し、アジュバンドと混合したものをウサギに免疫した。抗血清は、ミオシンVIII調製時において、このミオシンを含むフラクションを検出する際に使用した。また、リコンビナントタンパク質を用いて、この抗血清からアフィニティー精製した抗体を免疫蛍光染色法に用いた。

(2)細胞同調法と免疫蛍光染色法

BY-2細胞は、DNA合成阻害剤であるアフィディコリンと微小管脱重合剤であるプロピザマイドを用いた二段階同調法によって、細胞分裂期に同調させた。また前前期分裂準備帯(pre-prophase band; PPB)に着目する場合には、アフィディコリンのみによる一段階同調法を行った。同調させた細胞は、パラフォルムアルデヒドによる化学固定し免疫染色した(Yokota et al. (2009) *J. Exp. Bot.* 60; 197-212)。なお細胞周期の時期を確認するために、抗ミオシンVIII抗体と抗チューブリン抗体による2重染色を行った。

(3)BY-2細胞からのミオシンVIIIの単離

細胞から、酵素処理によりプロトプラストを調製した。それをホモジェナイザーにより破碎して、高速遠心、超遠心によって粗抽出画分を調製した。それにニワトリ胸肉から単離したF-アクチンを加え、結合した成分を超遠心によって沈殿に回収した。なおニワトリ胸肉からのF-アクチンの単離は、小浜の方法に従って行った(Kohama (1981) *J. Biochem.* 90; 497-501)。回収した沈殿を、ATPを含む溶液で抽出して、大部分のみオシンXIを除いた。抽出後の沈殿を、更に0.3 M KClを含む溶液で抽出して、大部分のアクチン結合タンパク質であるピリンを除去した。その抽出後の沈殿を、ATPと0.3 M KClを含む溶液で抽出し、その抽出画分を、まずハイドロキシルアパタイトカラムにかけてミオシンVIIIを含むフラクションを回収した。それを更にDEAE-Sephacelイオン交換カラムにかけ、このミオシンを含むフラクションを回収して、運動活性等の解析を行った。なおそれぞれの単離段階におけるミオシンVIIIの検出は、先述した抗血清を用いたイムノプロットにより行っていった。BY-2細胞のみオシンXIである175-kDaミオシンに対する抗体は、重鎖C端100アミノ酸残基に対する抗体

(Tominaga et al. (2003) EMBO J. 22; 1263-1272) を用いた。

(4) in vitro 運動再構成系

運動活性は、ガラス表面にミオシンを付着させた in vitro 運動再構成系を用いて解析した (Yokota and Shimmen (1994) Protoplasma 177; 153-162)。

4 . 研究成果

(1) ミオシン VIII の BY-2 細胞における局在
ミオシン VIII である ATM1 の C 端領域に対する抗体は、シロイヌナズナ幼植物体や BY-2 細胞から調製した粗抽出画分中の、130-kDa 成分と特異的に反応する。この分子量は、ATM1 の一次構造から推測した値とほぼ一致する。まずこの抗体を用いた免疫蛍光染色法により、ミオシン VIII の BY-2 細胞内の局在を解析した。間期の細胞内では、核周辺 (図 1 A、矢印) や細胞質系などの細胞質内に、

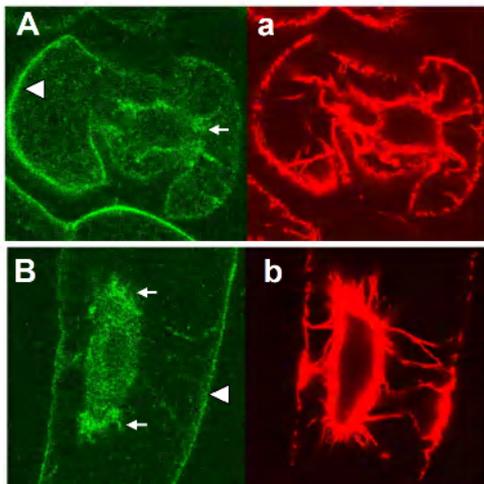


図 1 間期と前前期 BY-2 細胞内におけるミオシン VIII (A と B) と微小管 (a と b) の局在

ドット状のシグナルとして観察された。また細胞膜に、比較的強いシグナルも検出された (図 1 A、矢じり)。細胞周期が進行して分裂前前期になると、微小管の束状構造である pre-prophase band (PPB) が出現するが (図 1 b)、その周辺部や近傍にミオシン VIII が局在、あるいは集積することはなかった (図 1 B、矢じり)。しかし、将来紡錘体の極になると思われる核の両端にミオシン VIII のドット状シグナルが集積していた (図 1 B、矢印)。分裂前期には紡錘体が形成されるが (図 2 a)、その内部にはミオシン VIII のドット状シグナルは検出されず、両極に集積していた (図 2 A、矢印)。更に分裂が進み、分裂後期から終期にかけてフラグモプラストが形成される (図 2 b、c)、この形成初期には、既にミオシン VIII の赤道面への集積が起こ

っており (図 2 B、矢印)、更に発達して細胞版形成時になると、フラグモプラスト中央部の赤道面にシグナルが観察された (図 2 C、矢印)。この部位には微小管が検出されず (図 2 c)、合成されている細胞板に相当する。

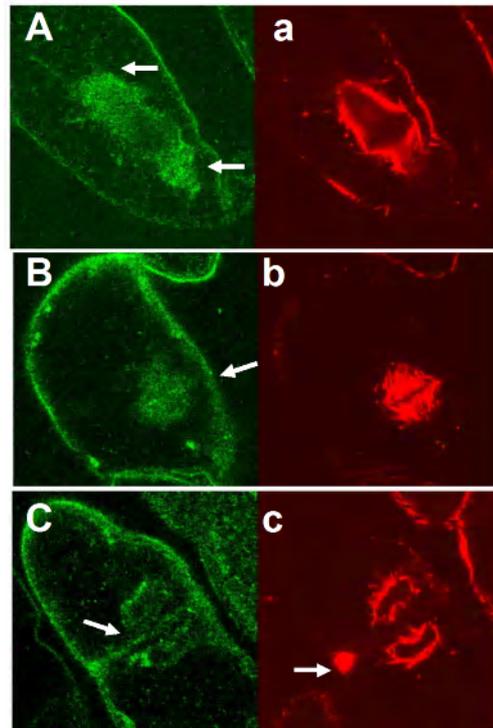


図 2 分裂前期から終期 BY-2 細胞内におけるミオシン VIII (A、B、C) と微小管 (a、b、c) の局在

(2) ミオシン VIII の単離と運動活性

BY-2 細胞から、ミオシン VIII の単離を試みた。プロトプラストから調製した粗抽出画分に F-アクチンを加えて、結合した成分を回収した。これを、ATP を含む溶液で抽出すると、ミオシン XI である 175-kDa ミオシン (Yokota et al. (1999) Plant Physiol. 121; 525-534, Tominaga et al. (2003) EMBO J. 22; 1263-1272) が F-アクチンから解離して超遠心後の上清に回収されたが、ミオシン VIII である 130-kDa 成分は F-アクチンから解離することはなかった。そこで ATP で抽出後の F-アクチン結合成分を、0.3 M KCl を含む溶液で抽出したところ、この処理でもミオシン VIII は F-アクチンから解離しなかった。この後、更に ATP と 0.3 M KCl の両方を含んだ溶液で抽出したところ、ミオシン VIII が F-アクチンから解離して、超遠心後の上清に回収された。このように他の多くのクラスのみオシンと同様、確かにミオシン VIII は ATP に依存して F-アクチンと相互作用するが、他のミオシン例えばミオシン XI と比較して、F-アクチンへの結合が強いことが示唆された。

次にミオシン VIII を含む画分をハイドロキシルアパタイトカラムにかけ、リン酸バッファの濃度勾配によって溶出させた。わずかに含まれていたミオシン XI は、低濃度のリン酸バッファによりカラムから溶出されたが、ミオシン VIII は高濃度のリン酸バッファにより溶出された。このミオシンを含むフラクションを、更に DEAE-Sephacel イオン交換カラムにかけ KCl の濃度勾配によって溶出して、ミオシン VIII を含むフラクションを回収した。

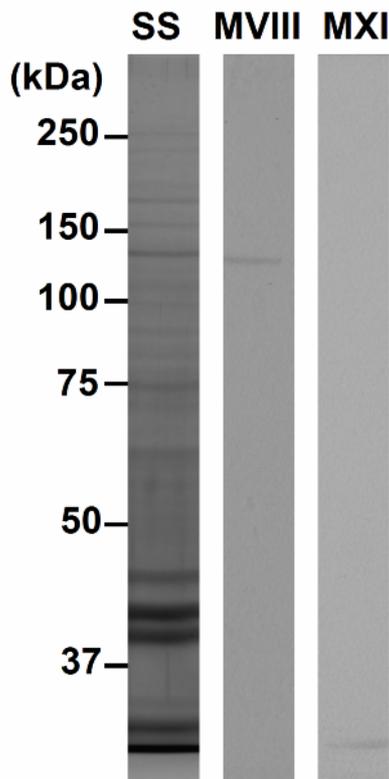


図3 ミオシン VIII を含むフラクション

図3 SS は、そのフラクションの電気泳動染色パターンを示す。そして、抗ミオシン VIII 抗体によってイムノプロットした結果を、図3 MVIII に示した。抗体と反応する 130-kDa 成分の他に、他の成分も存在しているが、抗ミオシン XI 抗体と反応する成分は含まれていない(図3 MXI)。

このフラクションを用いて、*in vitro* 運動再構成系により運動活性を解析した。ローダミン-ファロイジンで蛍光ラベルした F-アクチンが、ガラス表面上を滑るのが観察された。そして、その速度は 0.5~3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、平均 1.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ であった。前述したように、用いたフラクションにはミオシン VIII 以外の他の成分も含まれている。この運動活性がミオシン VIII によるのかを確かめるために、抗体による免疫沈降法でミオシン VIII の含有量を減少させ、運動活性を解析した。この免疫

沈降法によって、60~70%のミオシン VIII をフラクションから除くことができたが、そのようなサンプルではほとんど運動活性は検出されなかった。またコントロールとして、抗ミオシン XI 抗体を用いて同様な処理を行っても、ミオシン VIII 量が減少することも無く、顕著な運動活性が観察された。これらの結果から、ミオシン VIII にも F-アクチンを滑らせる運動活性を有することが示唆された。

以上が研究期間中に得られた結果である。ミオシン VIII の細胞分裂時における局在は、主に根端を形成する細胞で調べられ、細胞版に集積することが報告されていた (Baluska et al. (2001) *Plant Physiol.* 126; 39-46)。しかし、他の分裂装置におけるこのミオシンの局在等は明らかにされていなかった。BY-2 細胞は、細胞周期を高度に同調させることが容易であり、本研究では BY-2 細胞にもミオシン VIII が存在することを示し、分裂期に同調させた細胞内の局在を詳細に解析した。今まで明らかにされていなかった紡錘体の両極への集積、初期フラグモプラスト赤道面への集積が明らかになった。ミオシン VIII がプラズマデスマータに局在して、孔のサイズ調整を行っていることが推測されていた。しかし、本研究で示したミオシン VIII のドット状シグナルに関しては、全く着目されていなかった。このようなシグナルは、Golomb ら (Golomb et al. (2008) *BMC Plant Biol.* 8;3, 1-13) が示唆したように、おそらくエンドゾームかと思われる。今後、ミオシン VIII が局在するドット状構造、あるいはオルガネラの正体を明らかにする必要がある。

今までミオシン VIII の運動活性は、全く解析、あるいは報告されていなかった。本研究によりミオシン VIII が運動活性を有することが、初めて示唆された。今後更に、軽鎖サブユニットの同定と、滑り活性の調節機構を解明する必要がある。また、滑り活性そのものの生物物理学的性質、例えばミオシン XI で明らかにされたように (Tominaga et al. (2003) *EMBO J.* 22; 1263-1272) プロセッシブなモーター分子であるのか、また発生する力がどの程度であるのかを一分子計測法などによって明らかにしていくことも今後の課題である。これらの解析によって、ミオシン VIII の更なる細胞内機能が明らかになることが期待される。

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)

T. Hamada, H. Igarashi, R. Taguchi, M.

Fujiwara, Y. Fukao, T. Shimmen, E. Yokota, S. Sonobe. The putative RNA-processing protein, THO2, is a microtubule-associated protein in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 査読有 50, 2009, 801-811.

E. Yokota, S. Ueda, K. Tamura, H. Orii, S. Uchi, S. Sonobe, I. Hara-Nishimura, T. Shimmen. An isoform of myosin XI is responsible for the translocation of endoplasmic reticulum in tobacco cultured BY-2 cells. *J. Exp. Bot.* 査読有 60, 2009, 197-212.

I. Karahara, J. Suda, H. Tahara, E. Yokota, T. Shimmen, K. Misaki, S. Yonemura, T. Murata, L. A. Staehelin, Y. Mineyuki. The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. *Plant J.* 査読有 57, 2008, 819-831.

K. Hashimoto, H. Igarashi, S. Mano, C. Takenaka, T. Shiina, M. Yamaguchi, T. Demura, M. Nishimura, T. Shimmen, E. Yokota. An isoform of Arabidopsis myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region. *J. Exp. Bot.* 査読有 59, 2008, 3523-3531.

E. Nishihara, E. Yokota, A. Tazaki, H. Orii, M. Katsuhara, K. Kataoka, H. Igarashi, Y. Moriyama, T. Shimmen, S. Sonobe. Presence of aquaporin and V-ATPase on the contractile vacuole of *Amoeba proteus*. *Biol. Cell.* 査読有 100, 2008, 179-188.

S. Romagnoli, G. Cai, C. Faleri, E. Yokota, T. Shimmen, M. Cresti. Microtubule- and actin filament-dependent motors are distributed on pollen tube mitochondria and contribute differently to their movement. *Plant Cell Physiol.* 査読有 48, 2007, 345-361.

H. Tahara, E. Yokota, H. Igarashi, H. Orii, M. Yao, S. Sonobe, T. Hashimoto, P. Hussey, T. Shimmen. Clathrin is involved in the organization of mitotic spindle and phragmoplast as well as in endocytosis in tobacco cell cultures. *Protoplasma* 査読有 230, 2007, 1-11.

〔学会発表〕(計 2件)

上田晴子、横田悦雄、嶋田知生、新免輝男、西村いくこ。小胞体の流動機構の解明~ミオシンに着目して~。植物生理学会、2009年3月21日、名古屋大学

高松秀安、横田悦雄、新免輝男、高木慎吾。アクチンに依存した葉緑体のアンカー制御機構に対するピリンの関与。植物生理学会、

2008年3月20日、札幌コンベンションセンター

6. 研究組織
(1) 研究代表者

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者