

令和元年6月5日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14762

研究課題名(和文) オプトジェネティクスによる細胞分裂方向の制御方法の開発

研究課題名(英文) Controlling orientation of cell division by optogenetics in plant cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞の分裂、伸長の方向は細胞表層の微小管の並びの向きによって決定される。従来、微小管の並びの向きは細胞の縁の微小管安定化作用によって決まるとされてきた。微小管の並びの向きを制御する研究の過程で、微小管の並び方向は細胞の縁により制御されるのではなく、細胞の形状そのものに影響されることを明らかにした。さらに、細胞全周3Dタイムラプスイメージングにより、細胞分裂後に微小管が並ぶ過程の可視化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の個体では個々の細胞が細胞壁によって繋がっているため、個々の細胞の分裂と伸長がどの方向で起こるかは、個体全体の形を決める重要な因子である。本研究の成果により、細胞の伸長、分裂方向の決定機構の基本原則を根本的に見直す必要があることがわかった。本研究の成果は植物の形がどのように決まるかを理解することにつながる。将来、観賞用の植物や工業材料としての木材の性質のデザインを行う上で必要な基礎研究である。

研究成果の概要(英文)：Orientation of plant cell growth and division is determined by microtubule arrays along the plasma membrane. The widely accepted idea is that stabilization of microtubules at the corners of the cell determine orientation of microtubules in a whole cell. During experiments for controlling microtubule orientation, I found that microtubule orientation is not controlled by the cell corners but by the cell shape. Furthermore, I demonstrated course of microtubule organization after cell division by whole cell 3D timelapse imaging.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：微小管 細胞分裂 細胞伸長 植物細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞質分裂は細胞板が細胞を2つに仕切る過程で、細胞表層におけるシグナルの形成と、細胞板がシグナルに向かって伸長する過程に分けられる。どちらの過程にも微小管が大きく関わっている。細胞表層におけるシグナルは分裂開始前にプレプロフェーズバンド (PPB) と呼ばれる微小管の帯により形成される。PPBは細胞膜上にシグナル分子を残す。染色体分離の後に出現する細胞板はシグナル分子に誘導されて伸長する (Smertenko et al. 2017)。この誘導メカニズムは不明だが、細胞板側から伸びる微小管が細胞膜側に存在するモータータンパク質 (キネシン) と相互作用することにより細胞板ガイダンスは起こるとのモデルが提唱されている。しかしながら、細胞板ガイダンスにおける微小管の役割はシロイヌナズナ突然変異体の形質とタンパク質局在からの推測であり、証明はできていない。

プレプロフェーズバンドの形成位置は間期の細胞質表層微小管の配列に依存する。間期の細胞質表層微小管はどのようにして並ぶのだろうか? 研究開始当初、細胞の縁の微小管安定性の違いにより表層微小管の並びが決まると考えられていた。微小管が細胞の縁を越えて伸長する時、微小管の脱重合が誘導されると、縁に直角な微小管は減少する。一方、縁を通過する微小管が安定化されると縁に直角な微小管が増加する。微小管安定性を持つ縁の作用が細胞全体に伝わり、結果として細胞全体の微小管の並び向きが決まると考えられていた。実際、コンピュータシミュレーションで縁を通過する微小管の通過率を制御すると、細胞全体の微小管配列が変わった (Ambrose et al. 2011, Eren et al. 2010)。そのため、細胞の縁の微小管安定性を制御すれば間期の微小管配列が変わり、結果としてプレプロフェーズバンドの向きが変わると考えた。

そこで、オプトジェネティクスにより微小管の安定性を制御し、プレプロフェーズバンドの位置や向きを改変する研究を考案した。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、植物の細胞板ガイダンスの分子機構の基礎的知見を得ることである。このために、細胞板の伸長方向の人為的制御を行う。まず、微小管の安定性を改変する分子ツールを作製し、開発したツールで間期の表層微小管の配列を制御することにより分裂面を人為的に制御する。また、微小管の切断を誘導するツールも開発し、細胞板のガイダンス過程で微小管を切断することにより分裂面の直接制御も目指す。

3. 研究の方法

微小管は13本のプロトフィラメントからなる中空の管で、それぞれのプロトフィラメントはチューブリンヘテロダイマーからなる。微小管が脱重合する時はプロトフィラメント間の相互作用が失われて微小管末端が開裂し、ヘテロダイマーが解離する。細胞内で発現する微小管結合タンパク質の多くは複数の微小管結合ドメインを持ち、微小管を表面で架橋することにより微小管末端の開裂を防いで安定化する。このため、微小管結合タンパク質による架橋を人為的に起こせば、微小管が安定化できると考えられる。

人為的な架橋の方法として、改変 Lov ドメインと ePDZ の青色光依存的結合を利用した TULIPs システム (Strickland et al. Nat. Methods 9:379-384, 2012) に着目した。植物微小管の蛍光イメージングに使われる GFP-MAP4 は単一の微小管結合ドメインを持つ。このコンストラクトの蛍光標識を緑色光で励起できる mCherry に変更し、末端に青色光照射で架橋する改変 LOV ドメインを接続する (mCherry-MAP4-Lov)。この Lov ドメインに結合するペプチド配列 (ePDZ) と MAP4 を接続した ePDZ-MAP4 を発現させ、MAP4 2 つが微小管表面を架橋することにより微小管を安定化する。

微小管の安定性を変化させる実験と並行して、実験に使用するタバコ培養細胞の細胞隅部の微小管配列を可視化する。これまで、タバコ培養細胞の微小管配列を 3D で詳細に解析した報告はなかった。そこで、ABIS の支援により北海道大学の 2 光子共焦点スピニングディスク顕微鏡を用いて表層微小管配列の 3D 解析を行う。

もう一つの実験として、微小管切断タンパク質カタニンと ePDZ を接続した改変カタニンを発現させ、光誘導でカタニンを微小管上に局在させて微小管を人為的に切断することを目指す。

4. 研究成果

(1) 光照射により微小管上に GFP を局在させることに成功した

研究の第一段階として、mCherry-MAP4-Lov を発現する細胞に ePDZ-GFP を発現させ、青色光照射により GFP が微小管に結合するかを調べた。GFP イメージング用の 488nm 照射を行うと照射時間に応じて微小管上に GFP が蓄積する様子が観察された (図 1)。これは、TULIPs システムが植物細胞でも働くことを示した初めての結果である。

しかしながら、mCherry-MAP4-Lov 発現量の

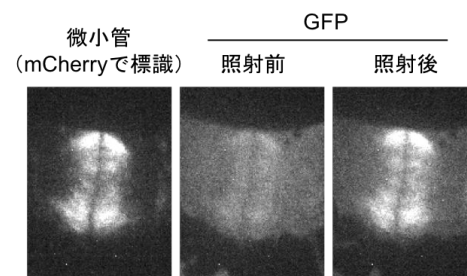


図 1 青色光照射による GFP の微小管上への誘導。

多い細胞では細胞形状が異常になったことから、使用した MAP4 配列は微小管結合ドメインを 1 つしか持たないにも関わらず、微小管の安定性に影響を及ぼすと推測された。また、mCherry-MAP4-Lov を 1 回目の形質転換で導入し、ePDZ-GFP を 2 回目の形質転換で行ったため、mCherry-MAP4-Lov の発現が不安定であった。そこで、プロモータを P35s から Pnos に変更し、ePDZ と Lov を 1 つの分子中に持つ ePDZ-mCherry-MAP4-Lov を発現させた。しかし、この融合タンパク質を発現する細胞では、光依存的な mCherry の微小管上への結合は見られなかった。また、隔膜形成体を持つ細胞に青色光照射しても細胞質分裂の速度に影響はなかった。発現系の更なる検討が必要と考えられた。

(2)細胞隅部の微小管並びは細胞全域に伝わらなかった

(1)の実験と並行して、タバコ培養細胞の間期の微小管を 2 光子スピニングディスク共焦点顕微鏡により細胞全体を撮影して 3D 再構築した。驚いたことに、円筒状の細胞の大部分は円周に沿った微小管配列が見られるが、細胞の上下隅近傍は縁を通過する微小管が多数を占めていた。さらに、細胞縁で微小管を安定化させる因子である CLASP の局在を確認したところ、CLASP は縁の微小管上に局在していた(図 2)。これらの観察結果は、タバコ培養細胞の細胞縁は微小管を安定化させる性質を持っているにも関わらず、縁の微小管安定化効果は細胞全域に伝わらないことを意味する。

上記の観察結果は従来の常識を覆す新発見であり、微小管の配列メカニズムの解明は細胞板ガイダンスの分子機構の基礎的知見につながるので、どのようにして微小管が円周に沿って並ぶのかを更に解析した。植物の表層微小管は細胞分裂に伴って消失し、分裂終了後に再構築されるため、この過程を 2 光子スピニングディスク共焦点顕微鏡で 3D タイムラプス解析した(村田 2018)。細胞分裂が終了すると細胞核の表面から微小管が表層に到達した。核の位置は細胞隅部から離れた円筒部であった。微小管は円筒部の表面に到達すると表層中で伸長を続け、最終的に細胞全域に広がった。円筒部の微小管は徐々に配列を変化させ、円周方向に並んだ。隅部においては微小管は隅を直角に通過し、そのまま残って隅に直角な微小管となった。これらの結果は、円筒部の微小管は隅部と独立に自己組織化し、ひとたび配列が完成すれば隣接する隅部の影響を受けないことで説明できる。この研究成果を日本植物学会第 81 回大会シンポジウムにて学会発表した。

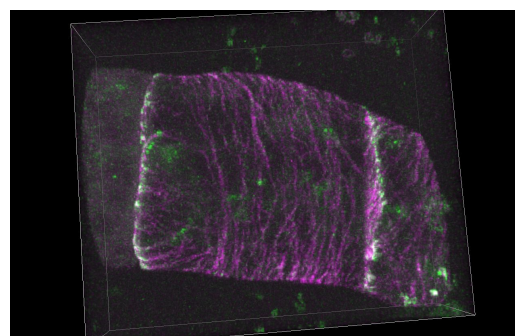


図 2 タバコ CLASP は細胞縁に局在するが微小管は円周に沿って並んだ。
マゼンタ：微小管 緑：CLASP

(3)微小管切断タンパク質カタニンの可視化に成功した

切断タンパク質カタニンを局在させて微小管を切断するため、カタニン融合タンパク質の局在を検討した。まず、カタニン(KTN) cDNA の 3' 端に蛍光タンパク質 mCitrine 遺伝子配列を接続して KTN-mCitrine を構成的プロモーターで発現させたところ、細胞内の微小管配列が網目状になり、細胞形態が異常になった。これは、発現させた KTN-mCitrine が内生のカタニンに対してドミナントネガティブ効果を持ったためと考えられる。そこで、カタニンのプロモーターとコード領域を含む約 10Kb のゲノム DNA のクローニングを行い、コード配列先頭に mClover3 遺伝子を挿入して細胞形態と融合タンパク質の局在を調べた。細胞形態は正常で、既に報告のある通り mClover3 の蛍光は隔膜形成体の細胞板から離れた側に検出された(図 3)。しかしながら、mClover3 の蛍光は微弱だったため、mScarlet で微小管を標識した細胞では mClover3 蛍光が mScarlet 蛍光に隠されてしまい検出することができなかった。今後、光誘導で局在を制御する前に、発現量を増やす工夫が必要と考えられる。

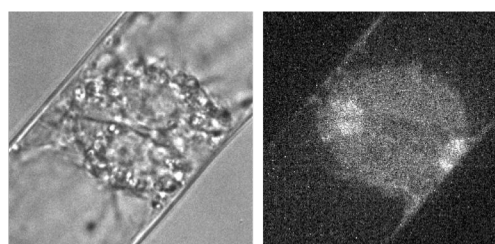


図 3 タバコ培養細胞におけるカタニンの可視化。隔膜形成体上に蛍光が検出された。

まとめ

本研究では、研究開始時に信じられていた「細胞隅部の微小管安定性が細胞全域の微小管並びを決める」との仮定が誤りであることがわかったため、隅部の微小管の安定性を制御することによる細胞分裂面の制御を行うことはできなかった。しかしながら、隅部が細胞全域の微小管並びに決定的な役割を持たないという発見は、プレプロフェーズバンドの方向を決める機構

の理解にとって非常に重要と思われる。本研究の最終的な目的に沿った研究を遂行できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

村田隆(2018) 表層微小管「列」:自己組織化する繊維. 植物科学の最前線(BSJ-Review) 111-119. 査読あり DOI: 10.24480/bsj-review.9c2.00141
Smertenko, A. et al., Murata, T. (22人中12番目、第一著者以外はアルファベット順)
(2017) Plant Cytokinesis: Terminology for Structures and Processes. Trends in Cell Biology. 885-894. 査読あり DOI: 10.1016/j.tcb.2017.08.008

〔学会発表〕(計 2 件)

村田隆(2017)分裂期から間期にかけての細胞骨格ダイナミクス. 日本植物学会第81回大会シンポジウム(招待講演)
Takashi Murata, Kohei Otomo, Hitoshi Nakayama, Tomomi Nemoto, Mitsuyasu Hasebe (2017) 3-Dimensional analyses of microtubule orientation in cortical arrays of plant cells. The 1st ABiS symposium: Towards the future of advanced bioimaging for life sciences.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/evodevo/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。