

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18370026

研究課題名（和文） 微小管分枝因子の解析による植物微小管構築分子機構の解明

研究課題名（英文） Unraveling molecular mechanism of microtubule organization by analyses of microtubule branching factor

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

研究成果の概要：

植物細胞においては、微小管の秩序だった構築は細胞の伸びる方向の制御や細胞分裂における細胞板形成に働く。微小管は中心体から生じると考えられているが植物細胞は中心体を持たないので、どのようにして微小管を構築するのかは謎だった。私は2005年に植物細胞の微小管が既存の微小管の上から枝状に伸び出すことを見だし、本研究を開始した。本研究では細胞板形成における微小管の形成機構とその役割を調べ、微小管の枝分かれが細胞板の発達に働くことを明らかにした。また、その後の微小管の再構築に働く遺伝子を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：微小管、植物細胞

## 1. 研究開始当初の背景

中心体を持たない植物細胞がどのようにして微小管を作るのかは長年の謎であった。我々は、表層微小管列の微小管は既存の微小管から斜め40°の枝分かれ状に伸び出すことにより生じることを見いだした（Murata et al. 2005, Nature Cell Biology）。この微小管の枝分かれ形成においては、微小管重合核として知られているγチューブリンが微小管に結合し、新たな微小管を作ることがわかっている。

細胞内で微小管の並ぶ方向は環境要因や内的因子により変わる。それでは、枝分かれによる微小管の供給は微小管の再編成にどのように関与しているのだろうか。また、微小管の供給が微小管の再編成に関与しているなら、γチューブリンの微小管への結合はどのようにして制御されているのだろうか。本研究計画においては、1) 微小管の再構築が起こる時の微小管およびγチューブリンの挙動を解析し、2) γチューブリン結合タンパク質の同定と解析を行うことにより、植

物微小管の構築機構の全貌に迫る。

## 2. 研究の目的

### (1) 微小管再構築時の微小管枝分かれの解析

細胞板構築を解析系として微小管枝分かれを基盤とした微小管再構築の全体像を明らかにする。細胞板は隔膜形成体と呼ばれる構造体の内部で作られる。隔膜形成体は微小管を大量に含み、微小管依存の輸送が細胞板構築に必須である。隔膜形成体中の微小管の再構築機構を微小管の枝分かれに注目して解析する。

### (2) $\gamma$ チューブリン複合体の微小管結合に必要な因子の同定

タグ付き $\gamma$ チューブリン複合体タンパク質を発現させた形質転換シロイヌナズナ培養細胞を用い、細胞質抽出液から $\gamma$ チューブリン複合体を単離し、結合タンパク質を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞板形成における微小管の形成とその後の再構築の分子機構の解析

#### ① タバコ培養細胞を用いたイメージング解析

タバコ培養細胞 BY-2 は細胞同調が可能であり、GFP 発現細胞を用いて顕微鏡下での微小管の詳細な観察が可能であることから、イメージング解析には好適な材料と考えられる。既存の GFP チューブリン発現細胞に加え、微小管プラス端マーカー GFP-EB1 発現細胞を作成し、細胞板構築時の微小管の挙動を詳細に解析する。また、マイクロインジェクション法を用いて抗 $\gamma$ チューブリン抗体を注入し、微小管枝分かれを阻害したときの微小管の挙動を調べる。

#### ② ヒメツリガネゴケを用いた微小管安定性を制御する因子の解析

連携研究者の日渡はヒメツリガネゴケの細胞板に局在する新規キネシン (KINIDs)、新規ユビキチン様タンパク質 (UBLs) をすでに発見している。これらの遺伝子の解析を通して形成後の微小管の再構築機構を明らかにする。

#### (2) $\gamma$ チューブリン結合タンパク質の同定

シロイヌナズナ培養細胞の細胞質抽出液調整法を確立し、抗 $\gamma$ チューブリン抗体を用いた免疫沈降法により $\gamma$ チューブリン結合タンパク質を同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞板形成における微小管の形成とその後の再構築の分子機構の解析

#### ① タバコ培養細胞を用いたイメージング解析

細胞質分裂における隔膜形成体発達時の微小管と $\gamma$ チューブリンの挙動を解析した。タバコ培養細胞から隔膜形成体を単離し、 $\gamma$ チューブリンの局在と微小管の枝分かれを電子顕微鏡で調べたところ、隔膜形成体は微小管枝分かれ構造を含み、枝分かれの場所には $\gamma$ チューブリンが局在していることがわかった。マイクロインジェクション法を用い、タバコ培養細胞に抗 $\gamma$ チューブリン抗体を注入することに成功した。抗 $\gamma$ チューブリン抗体は細胞板の拡大を阻害した。伸長中の微小管先端のマーカーである GFP-AtEB1b を用いて、抗 $\gamma$ チューブリン抗体の微小管伸長に対する効果を調べたところ、抗 $\gamma$ チューブリン抗体は伸長中の微小管の数を大きく減らすことがわかった。これらの解析により微小管枝分かれ形成が隔膜形成体の発達を介して細胞板の発達に働くことが示された。

枝分かれにより形成された微小管がその後どのように再配置され、細胞板の拡大に働くかを解析した。GFP チューブリンのライブイメージングにより、隔膜形成体を構築する微小管の側面から微小管が伸び出す様子が捉えられた。伸び出した微小管は互いに架橋し、隔膜形成体の表面に取り込まれた。

GFP-AtEB1b で標識される微小管は隔膜形成体内を様々な方向に伸長していた。微小管の安定性を GFP の退色を利用して調べたところ、隔膜形成体の外縁の微小管は他の微小管に比べて安定なことがわかった。隔膜形成体の外縁の微小管が内部に比べて安定なこと、隔膜形成体の微小管が微小管依存で形成されることの2つから、隔膜形成体の微小管が微小管の重合・脱重合に伴って隔膜形成体外側に集積することが考えられた。

GFP-AtEB1b 発現株の作成は東京大学大学院新領域創成科学科の佐野敏夫助教、馳澤盛一郎教授、マイクロインジェクションは名古屋大学大学院理学研究科の東山哲也教授、微小管先端の追跡と微小管安定性の解析は基礎生物学研究所の野中茂紀准教授との共同研究により行った。

#### ② ヒメツリガネゴケを用いた微小管安定性を制御する因子の解析

電子顕微鏡観察により、ヒメツリガネゴケの隔膜形成体は赤道面に微小管架橋が多数存在することがわかった。微小管架橋部には KINIDs の局在が見られ、遺伝子破壊株では約 2 割の細胞が多核となった。KINIDs は微小管の架橋を介して細胞板の正常な発達に働くものと考えられる。興味深いことに、シロイヌナズナのオーソログ遺伝子 PAKRP2 では API1 遺伝子破壊株を相補できないことがわかった。この結果を含め、Plant Cell 誌

に研究成果を発表した (Hiwatashi et al. 2008)。

UBLs(Ubiquitin-like proteins)はヒメツリガネゴケの細胞板領域に局在するタンパク質である。遺伝子破壊株を作成すると多核の細胞が増加するため、細胞質分裂の進行に役割を担っているものと考えられた。遺伝子破壊株の微小管を GFP チューブリンを用いて詳細に解析したところ、UBL 遺伝子破壊株は隔膜形成体内部の微小管架橋の解除が阻害されていることがわかった。遺伝子破壊株の細胞板は厚くなったことから、UBL 遺伝子産物は細胞板の形成を介して細胞質分裂の進行に働くのではなく、隔膜形成体の架橋微小管に直接作用し、架橋の解除を誘導するものと考えられた。

### (2) $\gamma$ チューブリン結合タンパク質の同定

形質転換可能なシロイヌナズナ培養細胞(系統名 Alex)を用い、細胞質抽出液調製の予備実験を行った。Alex からプロトプラストを調製し、脱液胞化处理してミニプロトプラストを単離することに成功した。一方、従来用いていたタバコ $\gamma$ チューブリンに対する抗体はシロイヌナズナ $\gamma$ チューブリンに反応しないことがわかった。そこで、シロイヌナズナ $\gamma$ チューブリンに対する抗ペプチド抗体を作成することにし、ウサギに免疫を行った。しかし、 $\gamma$ チューブリンに特異的に反応する抗体は得られなかった。Alex の安定的維持も難しく、培養中に細胞が細胞塊を形成するようになったため、研究方針を変更して(1)の研究に集中することにした。

### (3) 総括

本研究において、これまでほとんど不明であった細胞板形成時の微小管挙動を明らかにすることができた。また、微小管の枝分かれが細胞内で実際に大きな役割を担っていることを示すことができた。植物の細胞質分裂の進行に関与する因子はいくつか同定されているが、その具体的な役割はわかっていない。今回得られた知見をもとにして因子の解析を行うことにより、細胞質分裂の分子機構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3件)

- ① Hiwatashi, Y., Obara, M., Sato, Y., Fujita, T., Murata, T., Hasebe, M. Kinesins are indispensable for interdigitation of phragmoplast microtubules in the moss *Physcomitrella patens*. Plant Cell 20:

3094-3106, 2008 (査読有)

- ② Murata, T., Tanahashi, T., Nishiyama, T., Yamaguchi, K., Hasebe, M. How do plants organize microtubules without a centrosome? J. Integrat. Plant Biol. 49: 1154-1163, 2007 (査読有)
- ③ Murata, T., Hasebe, M., Microtubule-dependent microtubule nucleation in plant cells. J. Plant Res. 120: 73-78, 2007 (査読有)

[学会発表] (計8件)

- ① Murata, T., Nonaka, S., Sano, T., Hasezawa, S., Hasebe, M. Three-dimensional tracking of growing microtubule ends by two-photon microscopy. 48th Annual Meeting of American Society for Cell Biology (San Francisco, U.S.A.). 2008年12月16日
- ② 村田 隆 細胞板型細胞質分裂の分子機構 日本分子生物学会第31回年会(神戸) 2008年12月10日
- ③ 村田 隆 微小管構築のライブイメージ解析 日本植物生理学会2008年度年会(札幌) 2008年3月20日
- ④ Murata, T., Sano, T., Hasezawa, S., Hasebe, M. Branched microtubules drive plant cytokinesis. 47th Annual Meeting of American Society for Cell Biology (Washington, D. C., U.S.A.). 2007年12月5日
- ⑤ 村田 隆, 長谷部光泰 細胞質分裂機構の新しいモデル: モデルの再検討と検証 日本植物学会第71回年会(野田) 2007年9月7日
- ⑥ Murata, T., Sano, T., Hasezawa, S., Hasebe, M. Roles of microtubule nucleation and reorganization in cell plate expansion at cytokinesis. 第59回日本細胞生物学会大会(福岡) 2007年5月29日
- ⑦ 日渡 祐二, 小原 真理, 藤田 知道, 村田 隆, 長谷部 光泰 細胞質分裂を制御する2型ユビキチン様タンパク質 PUBLs の作用機作 日本植物生理学会2007年度年会(松山) 2007年3月29日
- ⑧ 村田 隆, 佐野敏夫, 馳澤盛一郎, 長谷部光泰 微小管の動態解析から見えてきた細胞質分裂の分子機構 日本植物生理学会2007年度年会(松山) 2007年3月28日

[図書] (計1件)

- ① Murata, T., Hasebe, M. (2006) Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics (ed. by T. Nagata, K. Matsuoka, and D. Inzé). Section I.3. Formation of

cortical microtubules in a cell-free system prepared from plasma membrane ghosts and a cytosolic extract of BY-2 cells.(分担執筆)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

長谷部光泰 (HASEBE MITSUYASU)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

(2006-2007 年度)

日渡祐二 (HIWATASHI YUJI)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教

研究者番号：10373193

(2006-2007 年度)

(3) 連携研究者

長谷部光泰 (HASEBE MITSUYASU)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

(2008 年度)

日渡祐二 (HIWATASHI YUJI)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教

研究者番号：10373193

(2008 年度)