

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2023

課題番号：18KK0195

研究課題名（和文）微小管の力学的特性計測と再構成系による微小管切断装置の階層的理解

研究課題名（英文）Mechanical manipulation and in vitro reconstitution of microtubule severing

研究代表者

中村 匡良（Nakamura, Masayoshi）

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：40553409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：植物が発生や環境シグナルに応答して表層微小管を変化させるためには、カタニンによる微小管切断が重要な役割を果たす。微小管動態解析により、植物の間期表皮細胞における微小管切断部位や切断に要する時間は確認されているが、カタニンの局在性や切断活性の分子基盤は未解明のままであった。本研究では、従来の遺伝学および生化学的解析に加え、ライブセルイメージング法とin vitro再構築系を確立し、p60による微小管切断部位はp80サブユニットによって制御されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カタニンによる微小管切断は、発生過程や環境に応答しながら、動的な表層微小管の配向パターン形成において重要な役割を果たしている。微小管動態解析により植物体表面の間期表皮細胞における微小管切断は微小管形成部位と交差部位で引き起こされることが知られている。しかしながら、生命活動に重要なカタニンの局在性や切断活性制御の分子基盤は明らかとなっていなかった。本研究では、カタニンによる微小管切断が起こる場所に着目した国際共同研究を展開し、切断箇所の決定メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Microtubule severing through katanin activities plays a crucial role in the organization of cortical microtubules in plant cells in response to developmental and environmental cues. Analyses of microtubule dynamics have elucidated the sites of microtubule cleavage and the duration required for cleavage in interphase epidermal cells of plants. However, the molecular mechanisms underlying katanin localization and severing activity remain unresolved. In this study, alongside conventional genetic and biochemical analyses, we developed a live cell imaging method and an in vitro reconstruction system, demonstrating that the p80 regulatory subunit regulates the microtubule severing site by p60.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 細胞骨格 カタニン チュープリン シロイヌナズナ

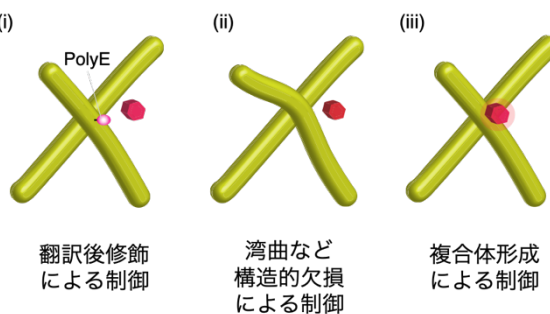
1. 研究開始当初の背景

微小管は、極性を持った生体ポリマーであり、細胞周期に応じてその構造を変化させることで、染色体の分離や細胞極性の制御、細胞の形態形成など生物の生存に必須な活動に寄与している。植物の間期細胞が持つ高度に組織化された表層微小管は、オルガネラの配置、細胞壁の形成といった様々な生命現象に関与する。近年の研究により、植物は環境シグナルやホルモンに応答して表層微小管の配向をダイナミックに変化させることで、絶えず変化する環境に順応することがわかってきた。しかしながら、植物の表層微小管配向のダイナミクスを制御する分子機構の全容は明らかになっていない。

申請者はこれまでに、ライブイメージング法や遺伝学的解析によって、環境に応答した植物が表層微小管方向を変更させるためにはカタニンによる微小管切断が重要であることを明らかにしてきた。しかし、植物体全体、特に深部の細胞層の微小管パターン形成や微小管切断の機能、カタニンの局在性やその切断活性制御因子は未解明のままであり、微小管切断の時間的空間的な制御機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

カタニンによる微小管切断は、発生過程や環境に応答しながら、動的な表層微小管の配向パターン形成において重要な役割を果たしている。微小管動態解析により植物体表面の間期表皮細胞における微小管切断は微小管形成部位と交差部位で引き起こされることが知られている。しかしながら、カタニンの局在性や切断活性制御の分子基盤は未だ明らかとなっていない。これまでの知見から、カタニンの局在を制御する機構として、i) チューブリンの翻訳後修飾が目印になっている、ii) 微小管の傷や構造的な歪みが目印となっている、iii) カタニンが複合体を形成することによりその局在を制御している、ことが考えられた (図1)。そこで、本研究では、従来の遺伝学や生化学的解析に加え、ライブセルイメージング法や *in vitro* 再構築系の確立を行うことで微小管切断装置を分子レベル、細胞レベルで理解することを目的とした。微小管切断因子であるカタニン (i) (ii) (iii) は切断活性を持つ p60 サブユニット、および切断部位や活性を制御する p80 サブユニットで構成される。表層微小管の時間的空間的な制御機構を明らかにするため、p80 および関連タンパク質のカタニン局在への機能を解析した。



3. 研究の方法

植物培養細胞からチューブリンを精製し、翻訳後修飾を解析した。また、*In vitro* 再構成系のための微小管切断タンパク質発現用ベクターの作製と発現精製、ライブセルイメージング用の植物体の作製を行った。微小管切断機構を生細胞で観察するため、赤色蛍光タンパク質 mCherry を付加したチューブリンタンパク質と緑色蛍光タンパク質 GFP を付加した p80 サブユニットまたは p60 サブユニットを発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製し、それぞれの局在解析を行なった。

p80 サブユニットの局在解析から、p80 も p60 と同様に微小管形成部位と微小管交差部位に現れることが明らかとなった。二つの特徴的な部位での微小管切断における p80 サブ

ユニットの機能を明らかにするため、CRISPR-Cas9 システムを用いて p80 サブユニットを欠損した変異体を作製した。シロイヌナズナはゲノム上に 4 つの p80 を有しているため 4 つの p80 を同時に欠損させた。

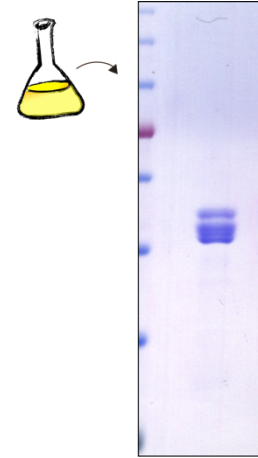


図 2. シロイヌナズナ培養細胞 MM2d からチューブリン精製

4. 研究成果

動物細胞では、カタニンはポリグルタミン酸化したチューブリンを認識することが知られている。そこで、植物培養細胞 MM2d からチューブリンを精製し、LC-MS/MS により翻訳後修飾を解析した (図 2)。その結果、すでに報告されている T349 のリン酸化などは確認されたが、C 末のポリグルタミル化は検出できなかった。

4 つの p80 を欠損したシロイヌナズナは p60 の機能欠損株と同様の表現型を示し、4 つの p80 と p60 を欠損した 5 重変異株も同様の表現型を示した (図 3)。

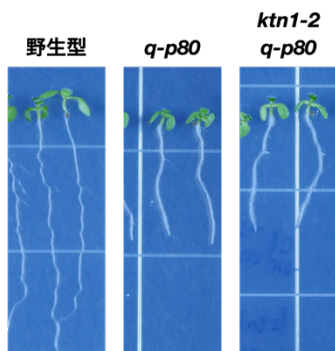


図 3. カタニン p80 欠損変異株と p60 欠損変異株
4 つの p80 を CRISPR-CAS9 システムにより欠損させた変異株 (*q-p80*) は、さらに p60 を欠損させても (*ktn1-2*) 表現型は同じであった。

この結果は、p60 の機能は p80 により制御されていることを示唆している。さらに、p60 欠損株における p80-GFP の動態解析から、微小管切断は見られないものの微小管形成部位や交差部位に p80 の局在が検出された。In vitro の解析からも、微小管交差部位へのカタニンの局在は p80 に依存することを示唆する結果を得ている (図 4)。これらの結果から、植物細胞におけるカタニンの微小管切断部位は p80 サブユニットによる切断活性を持つ p60 サブユニットのリクルートにより決定されていることが明らかとなった。今後は、p80 の機能欠損株の解析などを利用し、p80 がどのように微小管切断部位を決定しているかを明らかにしていく。

微小管切断の制御機構を理解するため、微小管形成因子や切断因子の相互作用因子の解析を行った。WDR8 と MSD1 が γ チューブリン複合体に相互作用する複合体として同定された。間期表層微小管における局在性や遺伝学的解析から、Wdr8-Msd1 複合体は、 γ チューブリン複合体から形成された微小管を形成部位から切り離すため、微小管切断因子カタニン p60 を形成部位にリクルートする役割を有していることを明らかにした (Yagi et al., 2021)。また、分裂期細胞では紡錘体のマイナス端側に偏ってカタニンが局在することが知られているが、遺伝学的解析から、このマイナス端側への局在性は Cortical microtubule disordering (CORD) 4/5 により制限されていることを明らかにした (Sasaki et al., 2019)。今後は、カタニン p80 サブユニットとこれら切断部位決定因子との関連性を解析していく必要がある。

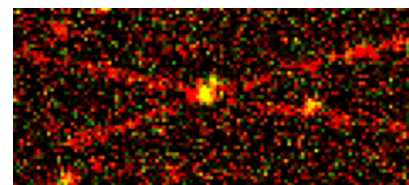


図 4. in vitro で p60/p80 の局在固定した微小管 (赤線) 上にカタニン p80 (赤ドット) と p60 (緑ドット) が確認できる。

<引用文献>

T. Sasaki et al., A novel katanin-tethering machinery accelerates cytokinesis. *Curr. Biol.* 29: 4060-4070 (2019)

N. Yagi et al., An anchoring complex recruits katanin for microtubule severing at the plant cortical nucleation sites. *Nat. Commun.* 12: 3687 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akira Yoshinari, Reika Isoda, Noriyoshi Yagi, Yoshikatsu Sato, Jelmer J. Lindeboom, David W. Ehrhardt, Wolf B. Frommer, Masayoshi Nakamura	4. 巻 -
2. 論文標題 Near infrared imaging of phytochrome derived autofluorescence in plant nuclei	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Plant Journal	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) 10.1111/tpj.16699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Masayoshi Nakamura, Noriyoshi Yagi, Takashi Hashimoto	4. 巻 3
2. 論文標題 Finding a right place to cut: How katanin is targeted to cellular severing sites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Quantitative Plant Biology	6. 最初と最後の頁 e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/qpb.2022.2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yagi N, Kato T, Matsunaga S, Ehrhardt DW, Nakamura M, Hashimoto T	4. 巻 12
2. 論文標題 An anchoring complex recruits katanin for microtubule severing at the plant cortical nucleation sites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3687-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24067-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshinari, A., Moe-Lange, J., Kleist, T.J., Cartwright, H.N., Quint, D.A., Ehrhardt, D.W., Frommer, W.B. and Nakamura, M.	4. 巻 2200
2. 論文標題 Using genetically encoded fluorescent biosensors for quantitative in vivo imaging.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arabidopsis Protocols Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 303-322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0880-7_14	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 該当する

1. 著者名 Iwatate, J.R., Yoshinari, A., Yagi, N., Grzybowski, M., Ogasawara, H., Kamiya, M., Komatsu, T., Taki, M., Yamaguchi, S., Frommer, W.B. and Nakamura, M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Covalent Self-labeling of Tagged Proteins with Chemical Fluorescent Dyes in BY-2 Cells and Arabidopsis Seedlings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 3081-3094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.20.00439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura, M. and Hashimoto, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Mechanistic Insights into Plant Chiral Growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Symmetry	6. 最初と最後の頁 2056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/sym12122056	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 -

1. 著者名 Lindeboom Jelmer J., Nakamura Masayoshi, Saltini Marco, Hibbel Anneke, Walia Ankit, Ketelaar Tijs, Emons Anne Mie C., Sedbrook John C., Kirik Viktor, Mulder Bela M., Ehrhardt David W.	4. 巻 218
2. 論文標題 CLASP stabilization of plus ends created by severing promotes microtubule creation and reorientation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 190-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201805047	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Noriyoshi Yagi, Masayoshi Nakamura
2. 発表標題 An anchoring complex stabilizes the association of daughter microtubule minus ends to their nucleation sites
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Plant and Microbial Cytoskeleton (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

The anchor and the sword:
https://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/en_backup/research/2021/06/post-35.php

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
研究分担者	吉成 晃 (Yoshinari Akira) (00829872)	名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教 (13901)	
研究分担者	橋本 隆 (Hashimoto Takashi) (80180826)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授 (14603)	

	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
研究協力者	八木 慎宜 (Yagi Noriyoshi) (80814912)	名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・博士研究員 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

米国	Carnegie Institution for Science			
チェコ	Institute of Biotechnology AS CR			