

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06743

研究課題名(和文)細胞分裂面挿入予定域形成の核シグナルで進行する素過程の制御機構

研究課題名(英文)Control mechanisms for the nuclear cycle-dependent processes in cortical division zone establishment

研究代表者

峰雪 芳宣 (Mineyuki, Yoshinobu)

兵庫県立大学・理学研究科・客員研究員(研究員)

研究者番号：30219703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物の細胞分裂面挿入位置はG2期に出現する微小管が帯状に並んだ分裂準備帯(preprophase band, PPB)の幅が狭くなる過程で決定される。本研究では、タマネギ根端分裂組織のRNA-seq解析と免疫蛍光抗体法による細胞内分布解析から、PPB形成過程に、CDKA1;1(cdc2)以外にCDKB1;1も関与していることを示すことができた。また、タバコ培養細胞のPPB形成過程の微小管とアクチンのライブイメージング解析から、PPB幅が狭くなる過程で、PPBの両端にアクチンが高密度に局在する時期があることを見つけた。このアクチンウォールがPPB端での微小管の拡散を防いでいる可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、PPBが狭くなる過程に新しいCDKの関与を示唆する事ができ、また、アクチンウォールが微小管帯の拡散を防ぐという新しい考えを示せた。植物の発生では、細胞分裂の際に新しい細胞分裂面がどこに挿入されたかで、娘細胞の将来の運命が左右される。幅の狭くなったPPBの領域が表層細胞分裂面挿入予定域(cortical division zone, CDZ)として細胞分裂の最後で細胞板の端が接続する場所になると考えられるため、PPBの幅が狭くなる過程の分子機構を明らかにすることは、植物の細胞レベルでの形態形成の最も重要な素過程の分子機構解明への新しい道を開くことにつながる。

研究成果の概要(英文)：The preprophase band (PPB) is a cytokinetic apparatus that determines the division site in plant cells. It appears in G2 phase as a broad cortical microtubule band and narrows to define the cortical division zone where cell plate will attach at the end of cytokinesis. Although the microtubule band narrowing process is an important step in the division site determination, its molecular mechanism remains unclear. In the present study, we examined the role of two types of proteins, cyclin dependent kinases (CDKs) and actins, in the microtubule band narrowing process. RNA-seq analysis and immunofluorescent microscopy of onion root tips revealed that not only CDKA1;1 (cdc2) but also CDKB1;1 is involved in the development of PPB. By live cell imaging analysis of microtubules and actin filaments of tobacco BY-2 cells, we found the presence of actin filaments at the boundary of narrowing PPBs. This actin wall may be involved in preventing the dispersion of cortical microtubules.

研究分野：植物形態学

キーワード：分裂準備帯 微小管 preprophase band cdk actin 核・細胞質相互作用

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂の際にどこで新しい分裂面が挿入されたかで、娘細胞の将来の運命が左右されるため、細胞分裂面挿入位置 (division site) 決定機構の解明は発生生物学の重要な課題の一つになっている。細胞の表面から求心的にくびれていく動物細胞と異なり、植物細胞では細胞の中央に細胞板が出現し、遠心的に成長して細胞分裂面が挿入される。そのため、植物では細胞板が親の細胞壁と接続する場所が植物の細胞分裂面挿入位置となる。最近の研究では、植物細胞では核分裂前に表層細胞分裂面挿入予定域 (cortical division zone, CDZ) と呼ばれる幅数 μm の細胞膜ドメインが完成し、細胞分裂の最後で細胞板の端は CDZ に向かって伸張していくと考えられている。CDZ は特異的にその領域に局在する分子と、逆にそこから排除される分子によって分子的に他の細胞表層と区別できる。G2 期から前期に出現する細胞表層に帯状に出現する構造である分裂準備帯 (preprophase band, PPB) が CDZ 形成の役割を担っている (文献①)。

PPB は G2 期に幅の広い微小管帯として出現し、前期の進行と共に微小管帯は狭くなり、最終的に数 μm 幅の帯になる。初期の PPB 形成過程にはアクチンも帯状に分布するが、徐々に PPB 領域から排除され、核分裂中の CDZ はアクチン排除域として認識できる。そのため、なぜ PPB が細胞分裂面挿入位置を裏打ちする形で並ぶのか、CDZ はどのようにして PPB の位置情報のメモリーとして働くのか、また、どのような仕組みで細胞板がその位置で親の細胞壁と接続するのか、これらの分子機構を解明することは、植物形態形成の重要な問題の一つである (文献②)。

PPB のアクチンは微小管帯を狭くする過程に働いている (文献③)。我々は電子線トモグラフィ解析で、微小管を束化していると想像できる 2 本の微小管を繋ぐアクチン繊維と思われるマイクロフィラメントの像を捉えることに成功した (文献④)。しかし、どのような分子がアクチン繊維と微小管を連結し、どのような力を発生させて 2 本の微小管を手繰り寄せているのか不明である。

タマネギ根端分裂組織細胞では、G2 期に PPB 形成は開始するが、DNA 合成を薬剤で阻害すると S 期の細胞でも PPB を持つ細胞が出現する (文献⑤)。我々は最近、この S 期の PPB は幅広 PPB で、DNA 合成阻害剤を除去することで幅狭 PPB 形成を同調的に誘導できることに気づいた。これは、この時期に核から何らかのシグナルが出て幅狭微小管帯形成を誘導していることを示唆している。また、前期の途中で核周期の進行を阻害しても細胞表層での PPB 形成は進行するが、2 極性紡錘体の

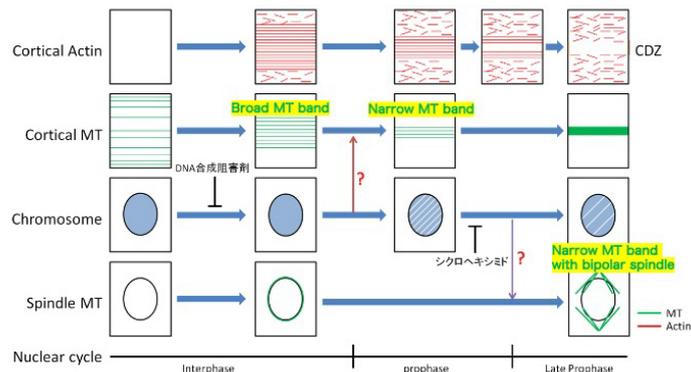


図1 タマネギ根端分裂組織細胞のPPB形成過程と阻害剤による核周期進行阻害上段から、表層アクチン (Cortical Actin)、表層微小管 (Cortical MT)、核 (Chromosome)、紡錘体 (Spindle MT) の様子を示す。赤はアクチン、緑は微小管、青は染色体を示す。"?"は核からシグナルが出ていると考えられるところを示す。

形成には別の核からのシグナルが必要なこともみつけている。これらのことから、G2 から前期に起こる CDZ 形成過程 (幅広 PPB が狭くなって CDZ の領域を決め、CDZ に特徴的な分子修飾がなされる) はいくつかの素過程に分かれ、その一つは、核からのシグナルで上述のアクチンが微小管を束ねることによって幅広 PPB が幅狭 PPB になる過程であると考えられるようになった (図 1)。

上記の仮説は主に分裂組織の細胞の研究結果を基にしているが、培養細胞などの様な細胞内の大部分を液胞が占めている細胞では少し様子が異なっている。例えば、液胞が発達していない細胞 (根端分裂組織の細胞、ムラサキツユクサの雄蕊の毛) の細胞分裂では PPB が狭くなり CDZ ができると考えられる時期に、PPB (あるいは CDZ) の領域で表層アクチン繊維が排除されたアクチン排除域 (actin depleted zone, ADZ) が観察される (文献⑥、⑦)。しかし、タバコ BY-2 振盪培養細胞では、twin peaks と呼ばれる原形質糸とその細胞表層にアクチン繊維が蓄積した 2 つの領域が中期に明確に確認でき、その谷間として ADZ が認識できるが、前期にすでに ADZ が形成されているかどうかについては曖昧である (文献⑧)。

2. 研究の目的

本研究では、核からのシグナルによって誘導される PPB が狭くなって CDZ の領域を決定する機構を解明することを目的とした。材料としては、液胞化していない分裂細胞の代表としてタマネギ根端分裂組織を、高度に液胞化している分裂細胞としてタバコ BY-2 振盪培養細胞を用いることにし、前者では PPB 形成過程に関与する核からの因子の候補としてどの様な Cyclin-dependent kinase (CDK) が関与しているのかを明らかにすることを、また、後者では G2 期から

前期での核周期の進行に注目しながら、微小管とアクチンのダイナミクスを詳細に観察し、分裂組織の細胞との挙動の違いについて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) タマネギの CDK の解析

タマネギ種子 (*Allium cepa* L. cv. ハイゴールド2号、サカタ種苗株式会社、神奈川) は開封後 4°C 暗所で保存したものを使用した。暗所 25°C で 4 日間育てたタマネギ実生を実験に使用した。CDK の細胞内局在の解析には、以前峰雪らが報告した方法 (文献⑨) に従って行った。

RNA の抽出は、液体窒素を入れた乳鉢で粉砕した試料から、RNeasy Power plant kit (Qiagen) を用いて行った。RNA-seq 解析用には 4 日目のタマネギ実生を子葉、シュート頂 (実際には使用の基部、一次根のすぐ上の部位)、根 (根端を除く)、根端の 4 箇所に分けて RNA 抽出を行った。RNA-seq には根端、子葉、茎頂から抽出した RNA を使用し、RNA-seq 受託解析サービス (株式会社ダナホーム) を利用しイルミナ株式会社製 HiSeq および NextSeq を用いて行った。この研究はタマネギの CDK/cyclin の遺伝子の研究を行っている山形大学の三橋渉博士との共同研究で行った。

(2) タバコ培養細胞のライブイメージング

ライブイメージングによる観察には目的の分子に蛍光タンパク質を融合した遺伝子が発現しているタバコ培養細胞 BY-2 株 (*Nicotiana tabacum* L. 'Bright Yellow 2') を使用した。微小管・アクチン可視化株として YFP- β -tubulin, H2B-tdCFP, Lifeact-mCherry 発現株 (関西大学の安原裕紀博士より譲渡) を、微小管・EB1 可視化株として EB1-Citrine mCherry-AtTUA6 発現株 (神奈川工科大学の村田隆博士より譲渡) を用いた。

顕微鏡システムとしては、Leica TCS SP-8 共焦点レーザー顕微鏡 (x63/N.A. = 1.20 W) (ライカマイクロシステムズ株式会社, 東京, 日本) あるいはスピニングディスク型の共焦点顕微鏡装置を装備した Global-local live imaging microscope (GLIM) システム (文献⑩) を目的に応じて使用した。画像取得、解析には、デコンボリューションソフト Lightning (ライカマイクロシステムズ株式会社, 東京, 日本)、Fiji-ImageJ を用いた。

4. 研究成果

(1) タマネギ根端分裂組織の PPB 形成を誘導する核由来因子の探索

CDK と cyclin の複合体は真核生物の細胞周期進行を制御するエンジンとして知られている。CDK として最初に発見された cdc2 キナーゼ (CDK1, 植物では CDKA1 と呼ぶ) は cyclin B と結合して M-phase promoting factor (MPF) として真核生物の前期から中期への移行に関与する因子である。植物細胞では MPF 活性によって PPB の微小管が消失する事が知られている (文献⑪)。タマネギの CDK の研究から、真核生物の全ての cdc2 で保存されているアミノ酸配列である PSTAIR 配列を認識する抗体ではウエスタンブロットで 34kD 付近に 2 本のバンドが検出でき、そのタンパク質は PPB に局在することを報告している (文献⑨)。我々は、タマネギ cdc2 に特異的な抗体を作製 (Onicdc2 抗体、Accdc2 抗体) し検証した結果、タマネギ cdc2 に特異的な抗体は PSTAIR 抗体で認識できる 2 本のバンドのうち一つしか認識できないこと、前者の抗体が認識する分子はほとんどの PPB との局在が確認できるが、後者の抗体では限られた PPB にしかその局在が確認できないことを見つけた。詳細な定量的な解析から、cdc2 は PPB 形成の後半で PPB に局在し、幅広 PPB は別の PSTAIR 抗体で認識できる分子が PPB に局在している可能性が出てきた。PSTAIR 抗体でしかウエスタンブロットで確認できないバンドが PPB 形成の途中で働いている可能性が考えられた。まず、このバンドを集めて生化学的に同定する方法と、PSTAIR 配列を持つ cdc2 でない遺伝子を分子生物学的に同定する方法で、未知のタマネギ CDK を探すことを試みてきたが、思う様な進展はなかった。そこで、タマネギの RNA-seq 解析を行い、分裂組織にどのような CDK と cyclin が発現しているか調べることにした。

タマネギ根端を使った RNA-seq 解析から、CDKA (タマネギ cdc2) を含め CDKB, CDKC, CDKD, CDKF, CDKG とホモログな配列を持つものが検索できた。そのうち CDKB と CDKG はそれぞれ 2 種類存在していたので、合計 8 種類の CDK が検索できた。CDKA, CDKB1, CDKB2 について、山形大学の三橋博士の研究室で行われたダイレクトシーケンスの結果も参考にして各々アミノ酸配列レベルで比較検討した。その結果、PSTAIR 配列を持つ CDK である A-type CDK に関しては、今回の検索では、タマネギですでに報告がある cdc2 kinase の遺伝子 (*CDKA1;1*, Accession# AB006033) しか見つからなかった。そのため、タマネギでは PSTAIR 配列を持つ CDK は CDKA1;1 のみである可能性が大きい。B-type CDK は CDKA の PSTAIR 領域のアミノ酸配列が PPTALR のものを CDKB1, PPTTLRE のものを CDKB2 と分類されている (文献⑫)。今回の解析では、二つの CDKB1 完全長 (開始コドンから終止コドンまで) のアミノ酸配列の情報が得られた。また、CDKB2 候補も見つかった。

たが、完全長の情報は得られなかった。

上述の研究からタマネギ CDKB1;1 の全体のアミノ酸配列が予想できたので、タマネギ CDKB1;1 の 92 番目から 108 番目までのアミノ酸配列 (LKKFTDVYRKGPNPRL) を抗原部位としてウサギで抗体を製作した。できた抗体を使用して免疫蛍光抗体法でタマネギ根端分裂細胞での細胞内局在を調べた結果、PPB にこの分子が局在している前期細胞が観察できた (図 2)。この CDKB1;1 が PPB 形成の過程で働く因子の候補の一つに考えられるので、今後、この分子が PPB に局在する時期などの特定を行い、PPB 形成における CDKB1;1 の役割について調べたいと考えている。また、タマネギ実生の子葉部分とシュート頂部分についても RNA-seq 解析を行ったので、それらと比較して分裂組織で働いている CDK/cyclin について調べていきたいと考えている。

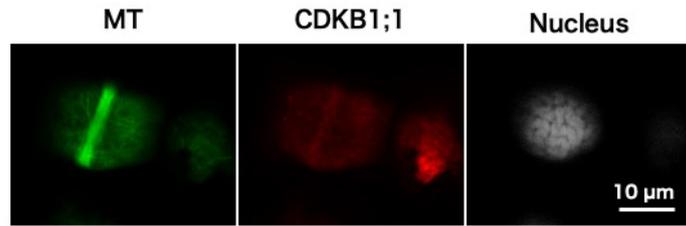


図2 タマネギ根端分裂組織前期細胞のCDKB1;1の細胞内分布
PPBを持つ前期細胞。緑：微小管 赤：CDKB1;1 白：染色体

(2) タバコ BY 2 培養細胞における PPB 形成過程での微小管・アクチンの挙動

・PPB 微小管の動態

まず、PPB 形成過程での微小管帯の幅の変化を追跡するため、微小管・アクチン可視化株を用い、PPB と核を含む細胞縦断面像を 5 分おきに撮影した (図 3A)。取得画像から PPB の幅を計測し、5 分間ごとの PPB 幅の変化を追跡したところ、微小管帯が徐々に短くなっている事が観察できた (図 3B)。次に、縦軸を PPB 幅の減少速度としてグラフにすると、PPB 幅の減少速度は前半 (-80 min ~ -45 min) では不安定で大きく変動していたが、後半 (-40 min ~ -5 min) では比較的一定の速度で PPB 幅が減少している事がわかった (図 3C)。このことから、PPB 幅の短縮過程は、幅が急速に短縮する過程 (phase1) と緩やかに短縮する過程 (phase2) の 2 つの過程に分かれている可能性が示唆された。

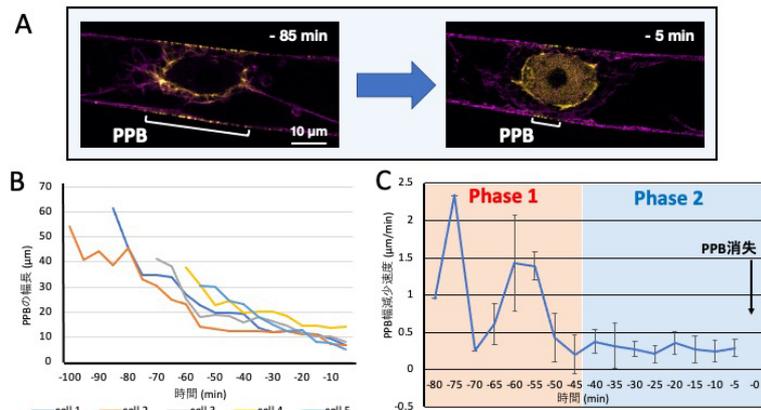


図3 タバコBY-2培養細胞のPPB形成過程における微小管帯幅の変化
(A) 微小管 (黄) とアクチン (マゼンダ) を蛍光ラベルした生細胞の中央縦断面像。Broad PPB (PPB消失85分前) からnarrow PPB (PPB消失5分前) に進行する。
(B) 5分間隔で追跡したPPB幅 (A)で白の鉤括弧で示した部分) の時間変化。各折れ線はそれぞれ1個の個体を示す。
(C) PPB幅の減少速度の時間変化。各点と棒は平均と標準偏差を示す。横軸はPPB消失 (矢印) を0分とした時間軸を示す。

Phase 2 で微小管帯が緩やかに短縮していく過程に注目し、phase 2 の初期と終期で PPB 微小管の配向に差があるかどうか、微小管のプラス端に存在する EB1 の挙動に注目して調べた。その結果、PPB 消失 5 分前では 40 分前に比べて、同じ方向に並んだ微小管が多いことが分かった。次に、PPB 消失 40 分前の PPB を、PPB の幅が狭くなる過程で PPB 消失直前まで微小管が残っている領域 (内側領域) と微小管がなくなる領域 (外側領域) に分け、各々の領域での微小管の配向について検討した。その結果、最終的に PPB が残る PPB 内側の領域では、PPB 外側の領域に比べ PPB 軸との角度差が小さい微小管が多かった事がわかった。

Phase 2 で微小管帯が緩やかに短縮していく過程に注目し、phase 2 の初期と終期で PPB 微小管の配向に差があるかどうか、微小管のプラス端に存在する EB1 の挙動に注目して調べた。その結果、PPB 消失 5 分前では 40 分前に比べて、同じ方向に並んだ微小管が多いことが分かった。次に、PPB 消失 40 分前の PPB を、PPB の幅が狭くなる過程で PPB 消失直前まで微小管が残っている領域 (内側領域) と微小管がなくなる領域 (外側領域) に分け、各々の領域での微小管の配向について検討した。その結果、最終的に PPB が残る PPB 内側の領域では、PPB 外側の領域に比べ PPB 軸との角度差が小さい微小管が多かった事がわかった。

・アクチンウォール

微小管・アクチン可視化株を使って PPB 形成過程での表層アクチン繊維の動態を調べた。PPB 形成が phase1 から phase 2 に移行する時期から、微小管帯の境界領域に周囲よりも

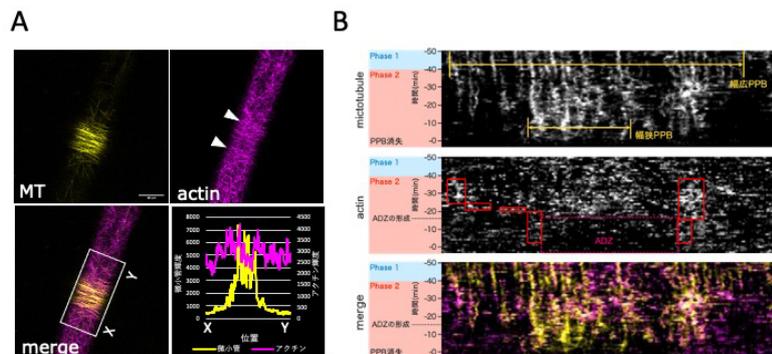


図4 タバコBY-2培養細胞のPPB形成過程における微小管とアクチンの動態
(A)細胞表層における微小管及びアクチンの画像とその輝度値。微小管 (黄)、アクチン (マゼンダ)。矢尻はアクチンの高密度な局在を示す。
(B)細胞表層の微小管およびアクチンのキモグラフ

アクチンの蛍光シグナルが強い領域が出現する事がわかった。やがてこの内側のアクチンの蛍光シグナルは消失し ADZ が見られた (図 4)。このアクチンが PPB の両端に蓄積される現象は、タマネギ根端分裂細胞の観察で見られた ADZ の端のアクチン繊維の束 (図 1) と同じ構造と考えられた。そこで、この構造をアクチンウォール (actin wall) と名付けた。この構造は前期の後半に見られる構造で、タバコ培養細胞の前中期から中期で報告されている twin peaks (文献⑧) とは別の構造と考えられる。

アクチンウォールの機能を考えるため、アクチン重合阻害剤でアクチンウォールがなくなった場合の微小管帯の挙動を調べた。PPB の両端にアクチンウォールが観察された後に、アクチン重合阻害剤である 20 μ M latrunculin B で処理した。その結果、薬剤処理すると急速に微小管帯の幅は 20%程度拡大し、それ以降少し縮小するものも見られるが、微小管が消失するまで幅広い帯の状態であることがわかった。これらの結果は、アクチンウォールが phase2 における PPB の微小管の拡散防止に寄与している可能性を示している。

今回の結果を元に PPB 形成過程での微小管とアクチンの動態についてまとめた (図 5)。PPB の微小管帯の形成過程は phase1 と phase2 の 2 つに分けることができる。Phase1 では PPB 外側領域で PPB に対し傾いた微小管が積極的に脱重合することで急速に PPB 幅が減少する。Phase2 では PPB 内側で PPB に平行に配向する微小管が増加し、アクチンウォールの出現によって微小管の横への拡散が妨げられ、PPB 幅は徐々に減少できると考えられる。

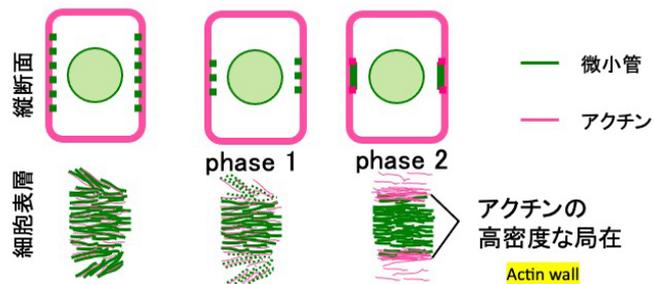


図5 PPB形成過程における微小管とアクチンの動態
PPBからアクチン繊維が排除されていく段階で、PPBの両縁にアクチン繊維が高度に局在し actin wall を形成する

<引用文献>

- ① Smertenko, A, Assaad F, Baluška F, Bezanilla M, Buschmann H, Drakakaki G, Hauser M-T, Janson M, Mineyuki Y, 他 17 名 (2017) Trends Cell Biol. 27:885-894.
- ② 峰雪芳宣 (2015) Plant Morphology. 27:33-42.
- ③ Mineyuki, Y and Palevitz B A (1990) J. Cell Sci. 97:283-295.
- ④ Takeuchi, M, 他 7 名 and Mineyuki Y (2016) Mol. Biol. Cell. 27:1809-1820.
- ⑤ Mineyuki, Y, 他 2 名 (1988) Planta. 174(4):518-526.
- ⑥ Liu, B., and Palevitz, B. A. (1992). 23(4):252-264.
- ⑦ Cleary, A. L., 他 3 名 (1992). J. Cell Sci. 103(4):977-988.
- ⑧ Sano, T., 他 3 名 (2005). The Plant Journal. 44(4): 595-605.
- ⑨ Mineyuki, Y, 他 2 名 (1991) Protoplasma. 162(2-3):182-186.
- ⑩ 玉置大介 and 峰雪芳宣 (2012) Plant Morphology. 24(1):13-17.
- ⑪ Hush, J., 他 4 名 (1996). Cell Biology International. 20(4):275-287.
- ⑫ Dudits, D., 他 3 名 (2008). In: Annual Plant Reviews, Cell Cycle Control and Plant Development, pp.1-30.

<謝辞>

本研究のうち、タマネギの細胞骨格の研究は大塚礼己氏 (兵庫県立大)、遺伝子解析は山内大輔博士 (兵庫県立大) と三橋渉博士 (山形大) の協力で行った。タバコ培養細胞の研究は飯塚俊作氏 (富山大学) の協力で行なった。また、安原裕紀博士 (関西大学) と村田隆博士 (神奈川工科大学) からはタバコ培養細胞の株や遺伝子プローブを譲渡していただいた。これらの皆様には、本研究の遂行に協力していただき感謝いたします。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚礼己、中井朋則、山内大輔、横田悦男、峰雪芳宣
2. 発表標題 PPBに局在するCDKの研究：PSTAIR抗体とタマネギcdc2抗体の比較
3. 学会等名 日本植物学会 83 回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚礼己、中井朋則、山内大輔、横田悦雄、峰雪芳宣
2. 発表標題 PSTAIR抗体とタマネギcdc2抗体を使ったタマネギPPBに局在するCDKの解析
3. 学会等名 第8回近畿植物学会講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯塚駿作、玉置大介、唐原一郎、峰雪芳宣
2. 発表標題 分裂準備帯形成過程における微小管とアクチン繊維の動態解析
3. 学会等名 日本植物学会85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯塚駿作、玉置大介、中井朋則、唐原一郎、峰雪芳宣
2. 発表標題 分裂準備帯成熟過程における微小管及びアクチン繊維の動態
3. 学会等名 日本植物形態学会第33回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯塚駿作, 玉置大介, 大塚礼己, 中井朋則, 山内大輔, 唐原一郎, 峰雪芳宣
2. 発表標題 植物細胞の分裂前期に微小管帯の拡散を防ぐアクチンウォールは存在するか?
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	玉置 大介 (Tamaoki Daisuke) (20793053)	富山大学・学術研究部理学系・助教 (13201)	
研究分担者	中井 朋則 (Nakai Tomonori) (60347531)	兵庫県立大学・理学研究科・助教 (24506)	

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
---------	---------