

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22664

研究課題名(和文)植物の細胞壁形成におけるアクチンおよびアクチン-微小管相互作用の機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the functions of actin and actin-microtubule interaction in plant cell wall formation

研究代表者

貴嶋 紗久(Saku, Kijima)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・博士研究員

研究者番号：90879941

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):細胞壁は植物の個々の細胞の形を決定し、植物の形態形成に影響を与える重要な要素である。細胞壁の形成における微小管機能が分子レベルで明らかになっているが、アクチン繊維も細胞壁形成に関与することが示唆されている。本研究では、道管を細胞壁形成のモデルとして、細胞壁形成におけるアクチンおよびアクチン-微小管相互作用の機能解明を目指した。イメージングと遺伝学、薬理学的な解析を組み合わせることによって、アクチン繊維と微小管繊維が相互に影響し合うことで適切な細胞骨格ネットワークが形成され、細胞壁パターンが形成されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞骨格は細胞内における様々な機能を担う必須のタンパク質であることから、生命現象を分子レベルで紐解く際にその作用機構の理解は重要である。本研究では細胞壁形成に着目してアクチン繊維の機能と細胞骨格の相互作用の理解を目指した。細胞骨格マーカーを発現するアクチン遺伝子欠損株やアクチンと微小管を同時に観察するマーカーラインの樹立、機能的なアクチン修飾法など本研究を通して今後の細胞骨格研究に有用なツールを開発することができた。これらのツールは今後の本分野の発展に寄与するものである。

研究成果の概要(英文):Cell wall is one of the most important components for the morphogenesis, which decides individual various cell shapes in plant cells. The molecular functions of microtubules in cell wall formation are well understood. On the other hand, involvement of actin filaments in cell wall formation has been suggested while the specific function is unclear. The purpose of this study was to reveal the functions of actin filaments and the interaction between actin filaments and microtubules during cell wall formation by using xylem vessels as a model tissue of cell wall formation. By combining imaging, genetical and pharmacological analysis, it is suggested that proper cytoskeletal networks are formed by the influence of actin filaments and microtubules each other and following the proper cell wall pattern formation.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：細胞骨格 アクチン 微小管 細胞壁 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

動物と異なり移動能をもたない植物は変動する環境下で成長を続ける。植物の成長は一つ一つの植物細胞の形づくりに大きく依存している。植物の形づくりの仕組みを明らかにすることは、植物生理学上の重要課題である。植物細胞は細胞壁に覆われており、この細胞壁の沈着の仕方が細胞の形態に大きく影響する。植物細胞の形づくりを理解するには細胞壁の形成を制御する仕組みの解明が欠かせない。

細胞壁の形成において表層微小管の働きは極めて重要だ。表層微小管はセルロース合成酵素 (CesA) の足場として働き、細胞壁の合成位置を制御することにより、膨張する細胞の伸長方向を決定する (Paredez et al., 2006)。アクチン繊維の関与も示唆されている。薬剤処理によるアクチン重合阻害は、細胞膜における CesA の均一な分布を損ない (Gutierrez et al., 2009)、アクチン遺伝子欠損株では細胞壁成分の異所的な蓄積を生じる (Sampathkumar et al., 2013)。また、電子顕微鏡観察や免疫染色でアクチン繊維と微小管の共局在が観察されていることから (Takeuchi et al., 2017 他)、細胞壁の形成にアクチンと微小管が協調してはたらくことが示唆される。

しかし、アクチンがどのように細胞壁形成を制御しているのかは未知な点が多く、アクチンと微小管の相互作用の仕組みとその具体的な機能はほとんどわかっていない。本研究ではアクチンアイソフォームの振る舞い、微小管とアクチン繊維の相互作用に着目することにより、アクチンによる細胞壁形成の制御機構に迫ることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではアクチンアイソフォームに着目し、細胞壁形成におけるアクチンの役割を明らかにする。特にアクチンアイソフォームの特異的な機能と、微小管とアクチン繊維の相互作用に着目し、植物細胞の細胞壁形成における細胞骨格タンパク質の機能的なネットワークを明らかにする。細胞壁形成のモデルとして道管に着目した。道管の細胞は一次細胞壁に加えて二次細胞壁を局所的に急速に沈着し、特有の細胞壁パターンを形成する。所属研究室は胚軸組織を用いて道管を人為的に誘導するシステムを開発しており、その様子を顕微鏡下で詳細に解析することが可能である (Oda et al., 2010, Sasaki et al., 2017)。この道管形成に着目することにより、細胞壁形成の時空間的な制御にアクチン、さらにはアクチンと微小管の相互作用がどのように関わっているのかを詳細に解析することができると考えられる。そこで本研究では道管の細胞壁形成におけるアクチンアイソフォームの動態と機能、アクチンと微小管相互作用のはたらきを明らかにし、細胞骨格繊維による細胞壁形成制御機構の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナを用いて、細胞壁形成のモデルである道管に着目して下記の実験を行った。

(1) 蛍光タンパク質融合アクチンプローブの改良

道管細胞における ACT7 の動態を明らかにするために、研究代表者が確立した ACT7-GFP を用いて植物体や培養細胞の道管で ACT7 の局在を明らかにする。ACT7-GFP は細胞質の蛍光が強くアクチン繊維の観察には化学固定が必要だった。そこで化学固定せず生きた道管細胞で ACT7-GFP の繊維を観察するために、Split-GFP を用いたプローブの改良を試みた。Split-GFP は GFP の C 末側と N 末側の複合体断片をそれぞれ異なるサブユニットに融合し、サブユニットが相互作用するとこれらの GFP 断片が接近して蛍光を発するプローブである。そこでこの GFP の N 末、C 末の断片をアクチンの C 末に融合する。これにより繊維に取り込まれて近接したアクチン分子からのみ蛍光が検出され、細胞質の蛍光を排除することができると期待した。しかし、Split-GFP の結合は非可逆的であり、アクチンの重合・脱重合を阻害する可能性があるため、可逆的な結合が可能である Split-Fast (Tebo et al., 2019) を用いたコンストラクトも並行して作成した。

(2) 道管形成におけるアクチンアイソフォームの機能解析

道管細胞におけるアクチンアイソフォームの挙動を明らかにするために、アクチン変異株の道管の表現型および分化誘導系によって形成された道管の形態を野生型と比較する。また、アクチン変異株にアクチンおよび微小管のマーカーを発現させ、細胞骨格への影響を調べる。

(3) 道管形成におけるアクチンと微小管の相互作用の解析

道管におけるアクチンと微小管の相互作用を解析するために、アクチンと微小管の両方のマーカーを発現している植物体を作成し、細胞壁形成時の細胞骨格間の位置関係を詳細に観察する。さらに、アクチンまたは微小管の阻害剤を用いて一方の細胞骨格への影響が細胞壁パターンや他の細胞骨格にどのように影響を与えるのかを解析した。

4. 研究成果

(1) 蛍光タンパク質融合アクチンプローブの改良

Split-GFP または Split-Fast のタグ断片を ACT2 または ACT7 の C 末に融合した。タバコを用いた一過的発現系を用いて共焦点顕微鏡で観察を行ったところ、Split-GFP ではほとんど蛍光が観察されなかった。一方、Split-Fast タグではいくつかの細胞で蛍光が観察されたが、非常に短い繊維しか観察することができなかった (図 1)。

そこで、Split タグがアクチン分子にとって大きすぎる可能性が考えられたため、小さいタグで機能的なアクチン修飾法の確率を目指した。そこで、His や FLAG などの小さいペプチドタグをアクチンの N 末または C 末に融合して、*act2* 変異株の根毛形成

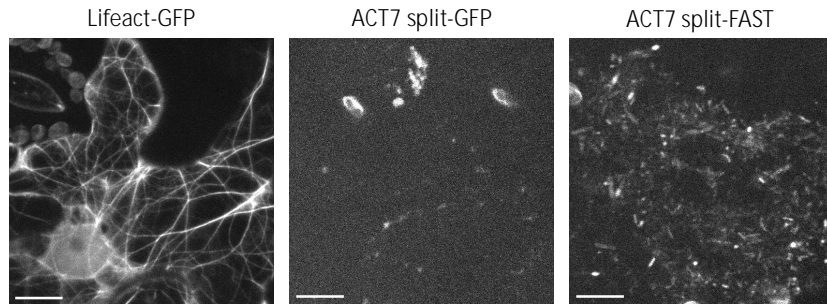


図 1 Split-GFP また Split-Fast タグを用いたアクチンイメージング法の検証

阻害の表現型をレスキューすることができるかを調べた。その結果、FLAG タグを含むいくつかのペプチドタグを直接融合させることによって根毛形成阻害の表現型を保管することができ、その機能性を確認することができた。今後はこの機能的なアクチン修飾法を基盤にさらなるアクチン繊維の直接観察法の改良を進めたい。

(2) 道管形成におけるアクチンアイソフォームの機能解析

シロイヌナズナの体細胞組織で強く発現している ACT2, ACT8, ACT7 の 3 つのアイソフォームをターゲットに *act2*, *act8*, *act2act8*, *act7* の変異株シリーズを樹立した。それぞれの変異株の道管を観察した結果、特に *act7* 変異株で拡大した壁孔や途切れた道管など顕著な道管形成への影響が観察された。*act2act8* の二重変異株ではところどころ野生型より大きい壁孔が観察された。次に、胚軸を用いた分化誘導系で形成される道管パターンの観察を行ったところ、*act2act8* および *act7* 変異株では異常に小さいピットが多くの細胞で観察された。また、30%の細胞で野生型では観察されない壁孔サイズにばらつきのあるパターンが観察された。

次に、根の道管で、*act2act8* および *act7* 変異株のアクチン繊維を Lifeact-GFP を発現して観察した。その結果、*act2act8* 変異株のアクチン繊維の局在は野生型とほとんど類似していたが、*act7* 変異株では縦方向の束化したアクチンケーブルが顕著に減少していた。同様の様子が、胚軸の分化誘導系でも観察された。このとき、*act7* 変異株で YFP-TUB6 を発現して微小管を観察した結果、微小管配向の乱れや、壁孔内部の微小管が一部残っている様子が観察された。従って、道管分化時にアクチン繊維の局在と微小管・細胞壁パターンに顕著な相関が見られない領域でも、アクチン繊維の減少が微小管配向および細胞壁パターンに影響を与えることが示唆された。

(3) 道管形成におけるアクチンと微小管の相互作用の解析

アクチン繊維マーカー-Lifeact-Scarlet と微小管マーカー-YFP-TUB6 の両方のマーカーを発現している植物体を作成した。根の道管を観察した結果、Metaxylem の壁孔内のアクチンの蓄積より前に微小管の壁孔内の排除が生じること、縦方向のアクチンケーブルは分化に伴い発達すること、分化が進んだ細胞において、壁孔縁および横配向の微小管の局在、壁孔縁・壁孔内の顕著なアクチンの蓄積、が観察された。微小管と近接した壁孔縁のアクチンの機能として、先行研究の壁孔縁の細胞壁蓄積の促進 (Sugiyama et al., 2019) が考えられる。次にアクチン繊維と微小管の相互作用の機能について、胚軸を用いた分化誘導系で薬剤処理によって解析した。アクチンの重合阻害剤である Latrunculin B を処理した結果、アクチンの壁孔局在が観察される分化後期においては微小管の局在はほとんど影響を受けなかったが、分化初期においては通常は横方向の微小管配向が縦方向に変化していた。一方、微小管の重合阻害剤である Oryzalin を処理した結果、通常は縦方向の長いアクチンケーブルが横向き短い繊維に変化していた。従って、アクチン繊維は分化に伴う微小管配向変化に影響を与え、微小管は縦方向のアクチンケーブルの形成に寄与している可能性が示唆された。また、道管分化過程において、Latrunculin B を処理した際に、微小管の局在パターンと細胞壁局在が一部の細胞で不一致であった。この結果はアクチン繊維がおそらく細胞壁成分の輸送を介して、細胞壁パターン形成に寄与していることを示唆する。

本研究によって、二次細胞壁のパターン形成にアクチン繊維が重要であること、微小管とアクチン繊維が相互に影響することによって適切な細胞骨格ネットワークが形成されることを明らかにした。今後は、細胞壁形成時の個々のイベントに着目することによってアクチン繊維のより

具体的な機能を明らかにしたい。また、アクチンと微小管の相互作用が仲介する相互作用タンパク質等の存在による積極的な強固なものであるのか、物理的相互作用による自然発生的なものであるのかを今後明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 貴嶋紗久、坂本真吾、光田展隆、小田祥久
2. 発表標題 直接的なアクチンイメージングを目指した機能的なアクチン修飾法の開発
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yosuke Yamazaki, Sam-Geun Kong, Saku Kijima, Masamitsu Wada, Taro QP Uyeda
2. 発表標題 Actin nucleation promoted by CHUP1 required for chloroplast movement
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 貴嶋 紗久, 光田 展隆, 小田 祥久
2. 発表標題 シロイヌナズナvegetativeアクチン変異株の表現型解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 貴嶋 紗久, 光田 展隆, 上田 太郎, 小田 祥久
2. 発表標題 アクチン・微小管相互作用の理解に向けたArabidopsis vegetativeアクチンアイソフォーム変異株の表現型解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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