

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840095

研究課題名(和文)変異型チューブリンがもたらす植物のねじれ表現型発現の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)How do tubulin mutations result in the organ-twisting phenotype in Arabidopsis?

研究代表者

堀田 崇 (Hotta, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50644457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞は微小管という微細繊維を細胞内に構築し、その並び方を巧み制御することで細胞の伸びる方向を決定している。微小管を構成する最小単位であるチューブリンタンパク質に変異をもつシロイヌナズナ植物では微小管の並びが斜めになり、結果として細胞の伸びる方向が変わり、葉や茎、根といった植物の器官の形態がねじれてしまう。本研究では、異常チューブリンが微小管となる際になぜ正しい方向に並ばないのかを明らかにするために、植物からチューブリンだけを取り出す方法を確立した。取り出されたチューブリンが微小管となる様子を顕微鏡で観察することにより、植物の微小管は動物のものより活発に伸び縮みすることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Microtubules (MTs) are polymerized from tubulin dimers and play an essential role in the regulation of polarized cell elongation in plants. Tubulin mutations alter the orientation of MTs by unknown mechanisms, which results in organ-twisting phenotype in Arabidopsis. To unveil the molecular mechanisms, it would be important to reconstitute MTs in vitro using mutant version of tubulin. To this end, I established an easy method to purify particular tubulin isotypes from Arabidopsis culture cells. Engineered tubulin with internal 6xHis-tag was purified with tubulin purification column (TOG) and subsequent Ni column. Purified tubulin was polymerized under microscope and polymerization dynamics were measured. It was found that plant MTs are highly dynamic and unstable compared to those polymerized from pig brain tubulin. It is now feasible to purify mutated version of Arabidopsis tubulin and analyze the polymerization dynamics and ultrastructure of the MTs containing mutant tubulin.

研究分野：植物科学

キーワード：植物細胞骨格 微小管 チューブリン

1. 研究開始当初の背景

微小管は チュープリンの重合体で、植物の生長に必須の細胞骨格である。植物細胞の細胞膜直下に形成される表層微小管はセルロース微繊維の配向方向を規定することで結果的に細胞の伸長方向を決定づける。シロイヌナズナの チュープリンの α -アミノ酸置換・欠失変異は表層微小管の配向方向を変え、その結果細胞の伸長軸が傾くことで器官のねじれとして顕在化する。しかしながらここでチューブリン分子の変異が微小管配向に異常をもたらす原理・分子メカニズムは明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

植物材料からチューブリンを簡便に精製する方法を確立し、これを用いて植物の変異型チューブリンが微小管の重合動態や構造にどのような異常をもたらすのかを明らかにする。特に微小管を構成する原繊維の数に着目し、通常 13 本の原繊維からなる微小管が非 13 本型となることで微小管それぞれ自身が歪みねじれた構造をとる、とする「ねじれ植物のねじれ微小管」仮説の証明を試みる。

3. 研究の方法

変異型チューブリンの微小管重合や構造を調べるために、まず植物細胞からチューブリンを精製する方法を確立する。続いて精製チューブリンを蛍光標識し全反射照明蛍光 (TIRF) 顕微鏡下で重合させることで、その重合動態を経時的に観察する。最終的に重合した変異チューブリンを含む微小管をクライオ電子顕微鏡で観察することにより微小管を構成する原繊維の数を推定する。

(1) 植物チューブリン精製法の確立

植物チューブリンの精製は最近報告されたチューブリンカラム (TOG カラム、参考文献 1) を植物試料に最適化し実施する。TOG カラムは出芽酵母の Stu2 タンパク質のチューブリン結合ドメイン TOG1/2 を GST 融合タンパク質として大腸菌において発現・精製したものを担体上に固定化したアフィニティ精製カラムである。この TOG カラムを用いシロイヌナズナのチューブリン変異体から変異チューブリンを精製する。

(2) TIRF 顕微鏡を用いた微小管重合動態解析

微小管を蛍光観察するため精製した植物チューブリンに蛍光標識を導入する。また、これとは異なる蛍光波長の標識を行ったチューブリンを GTP の非加水分解アナログである GMPCPP 存在下で重合させることで安定な微小管の種として用いる。これをカバーガラス上に貼り付けたうえ、未重合のチューブリンを GTP とともに系に加え、重合を開始する。以後の過程を TIRF 顕微鏡を用いて経時的に観察・撮影し、得られたデータから微小管の動的不安定性のパラメータを定量化する。

(3) 電子顕微鏡を用いた微小管原繊維数解析

正しい微小管は 13 本の原繊維から構成され、このとき微小管はねじれを持たない直線構造をとる。13 本以外のいかなる原繊維数の微小管も直線構造をとることはなく、すべて原繊維が螺旋状に配向したねじれ構造をとる。このねじれ構造は電子顕微鏡で観察しうる。そこで、変異チューブリンを含む精製シロイヌナズナチューブリンを *in vitro* で重合させ、これをクライオ電子顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

従来、植物材料からチューブリンを精製するには長時間に渡る操作が必要で、この操作についても習熟を要した。本研究により、植物培養細胞を材料に TOG カラムを用いて植物チューブリンを迅速かつ簡単に精製する方法を確立した。さらに チューブリンに 6xHis タグを挿入することにより精製チューブリンの中から変異体など特定のチューブリン分子を選択的に取り出す方法を確立することができた。精製植物チューブリンを用いた微小管動態解析により、シロイヌナズナ培養細胞のチューブリンは従来よく用いられてきたブタ脳由来のチューブリンと比べて極めて活発に重合脱重合を行う (動的かつ不安定である) ことが明らかとなった。本研究の成果により、今後の植物チューブリンを用いた *in vitro* 実験の実施にあたり、植物由来のチューブリンを用いることが十分現実的な選択肢となったといえる。

ただし、これらの技術論の確立に予想以上の時間を要したため、当初計画していたシロイヌナズナの変異型チューブリンが正常なチューブリンに比していかなる重合動態および微小管構造の違いを示すのかについては解析には至らなかった。技術的課題は既に解決をみており、今後早期に当初計画した実験の実施が可能である。

(1) 植物チューブリン精製法の確立

TOG カラムを用いた植物チューブリン精製の予備実験段階で、培養細胞を用いることでシロイヌナズナ植物体を用いるよりもはるかに高い収率・収量でチューブリン精製が可能であることが明らかとなった。シロイヌナズナ MM2d、T87、タバコ BY-2 といった培養細胞がチューブリン精製の材料として適していることがわかった。また、対数増殖期にある細胞のほうが定常期のものよりチューブリンの収率が良いこともわかった。シロイヌナズナ MM2d 細胞や T87 細胞の場合、継代後 4 日目の懸濁液 200~300 ml から 0.7 mg 程度のチューブリンが回収された。カラム作業は極めて簡便であり、精製の正否は実験者の習熟度に依存しないと考えられる。また一連の作業に要する時間は 4-5 時間程度で (タンパク

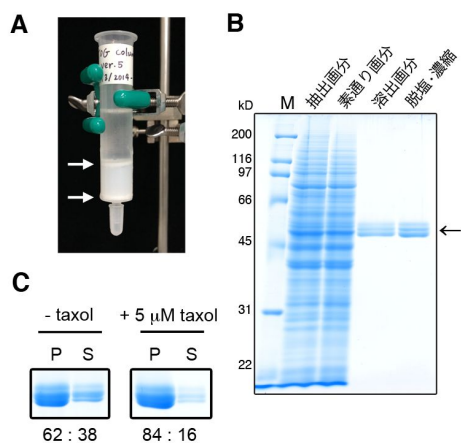


図1. TOGカラムを用いた植物チューブリン精製。A, TOGカラム外観。B, シロイヌナズナ培養細胞MM2dからのチューブリン精製 (M: 分子量マーカ、矢印: チューブリン)。C, 精製チューブリンの重合実験 (P: pellet=重合したチューブリン, S: supernatant=未重合のチューブリン)。

質抽出・カラム操作・脱塩に2時間半、濃縮に1時間半) 精製チューブリンサンプルを電気泳動しても一日で全ての操作を終えることができた。このように、本チューブリン精製法は簡便、迅速に大量のチューブリンが精製できる大変優れた方法であるといえる。また精製した植物チューブリンが重合能を有することも確認され、以降の実験に有用であることが確かめられた(図1)。

(2) 特定のチューブリンアイソタイプの選択的精製法の確立

TOGカラムの有用性が確かめられたので、続いて培養細胞に変異型チューブリンを過剰発現させ、これを材料に変異チューブリンを含む全チューブリンを精製し、これをもって変異チューブリンサンプルとして用いることを計画した。当初用いたシロイヌナズナMM2d培養細胞ではアグロバクテリアを用いた形質転換が成功せず、T87培養細胞に変更することでこの問題を解決した。内在性チューブリンと区別するため、変異型チューブリンにc-mycタグを導入したものを過剰発現プロモーター(カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター)を用いて発現させたが、精製チューブリン中に含まれるc-mycタグ付きチューブリンの量は極めて少なく、概算で1~3%程度に留まることがわかった。このことから、このサンプルを変異チューブリンサンプルと称して用いることを断念した。

そこで全チューブリンを精製した後、二段階目の精製を行うことでそこから特定のチューブリン分子(この場合は変異型チューブリン)だけを選抜することを検討した。この目的のため、最近酵母で報告された方法に倣い、シロイヌナズナのチューブリン(TUA6)分子の表面に露出した保存性の低いループ領域に6xHisタグを挿入し、精製二段階目のタグとして用いることにした(図2A, 参考文

献2)。これをT87培養細胞にて過剰発現させ、TOGカラムを用いて全チューブリンを精製したうえで引き続きニッケルカラムでHisタグ付きのチューブリンを選抜した(図2B)。得られたチューブリンサンプルには確かにHisタグ付きチューブリンが含まれることがウェスタンブロットで示された(図2C)。また内在性チューブリンの混入量を定量化するため等電点電気泳動とSDS-PAGEの二次元電気泳動を行い、チューブリンをタグの有無で分離したところ、最終フラクションへの内在性チューブリンの混入は検出限界未満であることがわかった(図2D)。

このようにHisタグ挿入と組み合わせた二段階精製法により特定のチューブリン分子(を有するチューブリンダイマー)が精製できたことから、今後Hisタグ付き変異型チューブリンの二段階精製を行うことで当初計画した変異チューブリンを用いた2つの実験(TIRF顕微鏡を用いた重合動態解析と電子顕微鏡を用いた微細構造解析)の実施の目処が立った。

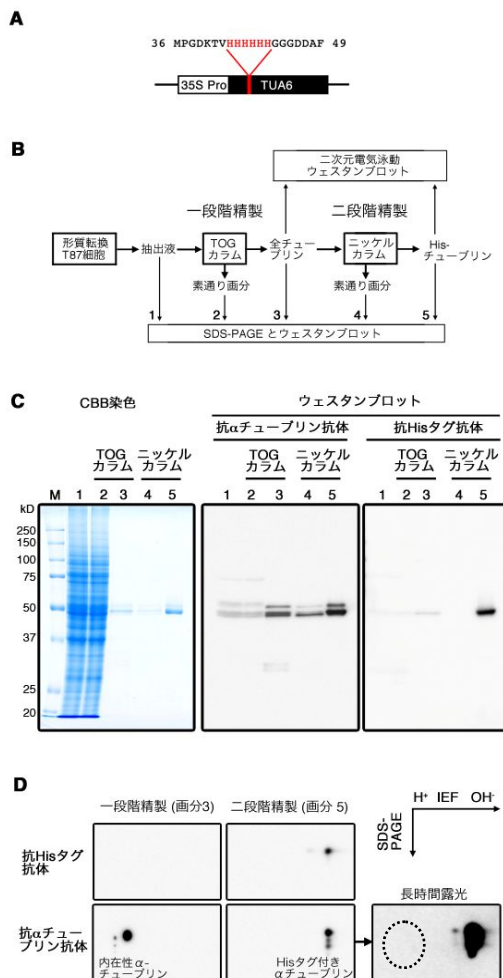


図2. 特定のチューブリンアイソタイプの選択的精製。A, α チューブリン内部への6xHisタグの挿入。B, TOGカラムとニッケルカラムを用いた二段階精製法のフロー。C, 二段階精製の各画分のSDS-PAGEおよびウェスタンブロット解析 (M: 分子量マーカ、レーン番号は図2Bの画分番号に対応)。D, 一段階精製サンプル(全チューブリン)と二段階精製産物(Hisチューブリン)の二次元電気泳動およびウェスタンブロット解析。長時間露光しても内在性 α チューブリンのスポット(破線内)は現れない。

(3) TIRF 顕微鏡を用いた微小管重合動態解析
上述の特定のチューブリン分子の選抜法の確立に時間を要する見込みとなったため、並行して重合動態解析の予備実験に着手することとした。

ここではひとまず二段階精製チューブリンではなく TOG カラムのみを用いた全チューブリンを MM2d 培養細胞より精製するとともに、従来便宜上使われてきたブタの脳を材料に TOG カラムを用いてチューブリンを精製し、これを対照実験として植物チューブリンの重合動態を解析することにした。GMPCPP 存在下でブタ脳チューブリン (HiLyte 488 標識 = 緑色蛍光およびピオチン標識チューブリンを含む) を重合させ安定な微小管の種とした。これを Neutravidin を介してシラン化コートしたカバーガラスに貼り付け、そこにロダミン標識 = 赤色蛍光のブタ脳あるいはシロイヌナズナ MM2d チューブリンを加え GTP 存在下で重合させ、その動態を TIRF で経時的に観察した。その結果ブタ脳チューブリンと比べて、シロイヌナズナのチューブリンは高頻度に重合と脱重合を繰り返す、すなわちより動的で不安定であることがわかった (図 3)。

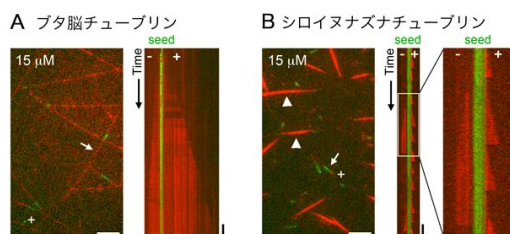


図3. 動物チューブリンと植物チューブリンの重合・脱重合の動態の違い。植物微小管は動的で不安定である。A. ブタ脳チューブリンからなる微小管 (左図) とその重合動態のキモグラフ解析 (左図矢印および右図)。B. シロイヌナズナチューブリンの微小管 (左図) とその重合・脱重合動態のキモグラフ解析 (左図矢印および右図)。スケールバー: 縦, 2分; 横, 5 μm 。

前項で述べた方法で変異型チューブリンを調製することが可能となったので、今後変異型チューブリンを一定割合含む植物チューブリンサンプルを用いて同様の重合動態の解析が実施可能である。また同様に変異型チューブリンを一定割合含むチューブリンを *in vitro* で重合させ、できた微小管の電子顕微鏡観察も実施可能となった。これにより、チューブリンの変異が微小管重合動態や微小管の構造、特に原繊維の構成にどのような影響をもたらすのかが間もなく明らかになるだろう。

参考文献

1. Widlund PO, Podolski M, Reber S, Alper J, Storch M, Hyman AA, Howard J, Drechsel DN One-step purification of assembly-competent tubulin from diverse eukaryotic sources. *Mol Biol Cell* 23: 4393–4401 (2012).

2. Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD Regulation of microtubule motors by tubulin

isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 16: 335–344 (2014).

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1件)

Hotta, T., Fujita, S., Uchimura, S., Noguchi, M., Demura, T., Muto, E. and Hashimoto, T. Affinity purification and characterization of functional tubulin from cell suspension cultures of Arabidopsis and tobacco *Plant Physiol.* 170: 1189-1205 (2016) 査読有. DOI: 10.1104/pp.15.01173

〔学会発表〕(計2件)

1. 精製植物チューブリンを用いた微小管の *in vitro* ダイナミクス解析
堀田 崇, 内村 誠一, 野口 真大, 出村 拓, 武藤 悦子, 橋本 隆
第 57 回日本植物生理学会年会
岩手大学 (岩手県盛岡市), 2016 年 3 月 19 日

2. TOG カラムを用いた植物培養細胞からのチューブリン精製
堀田 崇, 橋本 隆
第 56 回日本植物生理学会年会
東京農業大学 (東京都世田谷区), 2015 年 3 月 16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀田 崇 (Hotta, Takashi)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任助教
研究者番号: 50644457