論文の内容の要旨

論文題目

Analysis of Cortical Actin Microfilaments in Determination of Plant Cell Division Plane
(高等植物の細胞分裂面決定における表層アクチン繊維のイメージング解析)

氏　名　　湖城　恵

序論

植物細胞は堅固な細胞壁に覆われているため、組織や器官の形態形成には個々の細胞の分裂様式の制御が重要な役割を果たす。細胞分裂面方向は、細胞分裂期の紡錘体および、細胞板を形成するフラグモプラストの方向により制御されている。高等植物の細胞分裂面決定では、細胞骨格である微小管とアクチン繊維の重要性が知られている。細胞膜直下に存在する表層微小管は分裂期直前になると細胞中央部に集積され、環状の構造 (preprophase band: PPB) を形成する。PPBは細胞周期の進行に伴ない幅の広い構造から狭い構造へと成熟する。PPBにはアクチン繊維が共局在していることが知られており、分裂期直前にアクチン重合阻害剤を処理した場合、PPBの幅が広い状態に留まり、成熟が阻害されることが報告されている。したがって、PPBの成熟にはアクチン繊維が重要だと考えられている。PPBは成熟した後、核膜崩壊直後に消失するが、PPBの形成された位置に将来、細胞分裂面が形成される。そのためPPBは細胞分裂面決定に関与する構造だと考えられている。また、分裂中期のアクチン繊維は特徴的な表層アクチン繊維パターンを形成する。PPBが消失した後、分裂中期の細胞中央部において表層アクチン繊維の局在が欠失し、アクチン欠失領域 (actin-depleted zone: ADZ) が形成されることが古くから報告されていた。ADZの中央に細胞分裂面が形成されるため、PPBと同様にADZも細胞分裂面決定に関与する構造だと考えられている。ADZの形成は様々な植物種において確認されているものの、BY-2細胞を用いた近年のイメージング研究により、分裂中期の細胞中央部においてもアクチン繊維は欠失していないことが明らかになった。加えて、細胞中央部の両側に1対の密な帯状アクチン繊維パターンが観察されることから、BY-2細胞で見出された分裂中期の表層アクチン繊維パターンは actin microfilament twin peaks (MFTP) と呼ばれている。アクチン重合阻害剤を用いて分裂中期のアクチン繊維を崩壊させると細胞分裂面が乱れることが報告されていることから、MFTPが細胞分裂面決定に関与すると考えられた。しかし、アクチン繊維の破壊はPPBの成熟阻害を伴なうため、アクチン重合阻害剤を用いたこれまでの研究では、細胞分裂面の異常がアクチン繊維の破壊によるものか、PPBの成熟阻害によるものかを区別することが困難であった。そこで、細胞分裂面決定におけるMFTPの役割を明らかにするために、PPBの成熟阻害を伴なわずにMFTPを変化させる必要があった。

近年の研究により、オーキシンの輸送阻害剤として知られていた2,3,5-triiodobenzonic acid (TIBA)を処理することにより、アクチン繊維の束化レベルや動態を人為的に変えられることが明らかにされた。また、アクチンの脱重合阻害剤であるjasplakinolideを低濃度で処理した場合にも、アクチン繊維の束化レベルが変化することが報告されている。しかし、これらの阻害剤の影響は主に間期の細胞でのみ検証されていた。そこで本研究では、分裂期のアクチン繊維に対するTIBAおよびjasplakinolideの影響を検証し、これらの阻害剤を用いてPPBの成熟阻害を伴なわずに分裂中期のMFTPを変化させることで、MFTPの細胞分裂面決定における役割を明らかにすることを目的とした。

結果と考察

1. TIBAおよびjasplakinolideのPPBへの影響

GFP-tubulinにより微小管が可視化されたタバコBY-2の形質転換細胞であるBY-GT細胞を用いて細胞周期の同調培養を行ない、アフィディコリン除去後3時間目にTIBAおよびjasplakinolideを処理し、PPBを観察した。また、細胞表層のGFP蛍光輝度プロファイルに基づきPPBの幅を定量的に評価した。アクチン重合阻害剤であるlatrunculin Bによりアクチン繊維を破壊したところ、過去の報告と同様にPPBの成熟が阻害され、コントロールの細胞に比べ幅の広いPPBが形成された (図1b, e) 。一方、TIBAおよびjasplakinolideを処理した場合には、PPBの幅に顕著な変化は観察されなかった (図1c-e) 。

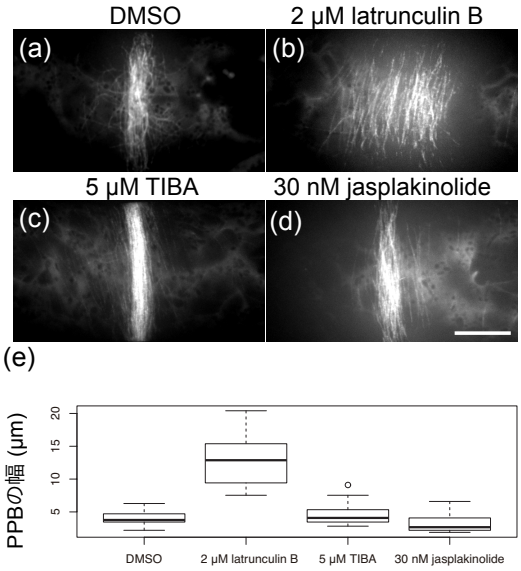


図1　PPBに対する各アクチン阻害剤の影響
(a-d) BY-GT細胞にコントロールであるDMSO (a) 、latrunculin B (b) 、TIBA (c) 、jasplakinolide (d) をそれぞれ処理し、PPBを観察した。(e) 細胞表層のGFP蛍光輝度プロファイルに基づき評価したPPBの幅 。Bar: 10 μm

2. 分裂中期のアクチン繊維に対するTIBAおよびjasplakinolideの影響

GFP-ABD2によりアクチン繊維が可視化されたBY-GF細胞を用いて、分裂期のアクチン繊維に対するTIBAおよびjasplakinolideの影響を検証した。細胞周期の同調培養を行ない、アフィディコリン除去後5時間目に各阻害剤を処理し、分裂中期のアクチン繊維を観察した結果、表層のアクチン繊維の分布が変化することを新たに見出した。コントロールであるDMSOを処理した場合では90%以上の細胞でMFTPが形成されるのに対し (図2a, d) 、TIBAを処理した場合、約37%の細胞表層で中央部に1つのアクチン繊維の局在ピークが観察された (図2b, e) 。また、

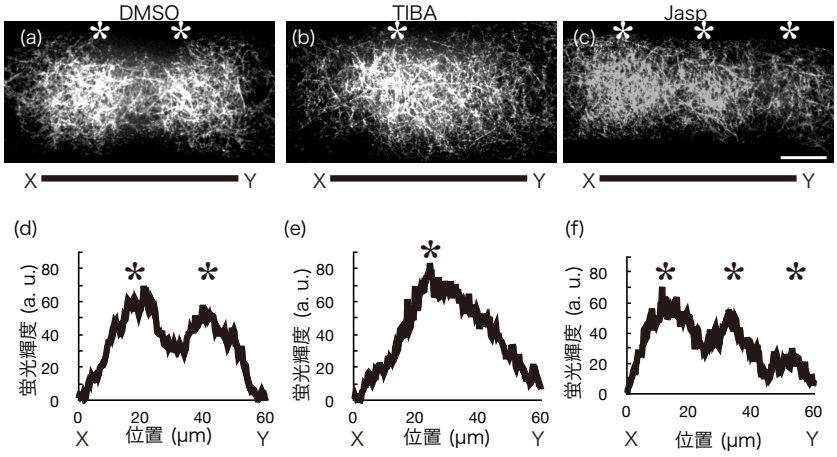


図2　TIBAおよびjasplakinolideによる分裂中期の表層アクチン繊維パターンの変化
(a-c) DMSO (a) 、TIBA (b) 、jasplakinolide (c) をそれぞれ処理した場合の表層アクチン繊維の顕微鏡画像。(d-f) a-cにおけるX-Y軸に対して垂直方向に加算平均した輝度プロファイル。アスタリスク (＊) で輝度のピークを示した。
Bar: 10 μm

jasplakinolideを処理した場合、約32%の細胞の表層で3つの帯状の表層アクチン繊維パターンが形成された (図2c, f) 。

3. TIBAおよびjasplakinolideの細胞分裂面決定への影響

以上の結果から、TIBAおよびjasplakinolideを処理した場合、PPBの成熟阻害を伴なうことなく、表層アクチン繊維パターンを変化できることが示唆された。そこで、MFTPの細胞分裂面決定への関与を調べるため、TIBAおよびjasplakinolideを処理した場合の細胞分裂面を検証した。同調培養したBY-GF細胞のアフィディコリン除去後5時間目にDMSOおよびlatrunculin B、TIBA、jasplakinolideを処理し、アフィディコリン除去後10時間目 (G1期初め) にアニリンブルー染色により細胞板を観察した。細胞の短軸方向に対し、挿入された細胞板が10度以上傾斜した細胞の割合を計測した結果、latrunculin Bを処理した場合と同様に、TIBAおよびjasplakinolideを処理した場合にも傾いた細胞板が高頻度に観察された (図3b-e) 。これらの結果から、表層アクチン繊維パターンが正常な細胞分裂面の形成に重要であることが示唆された。

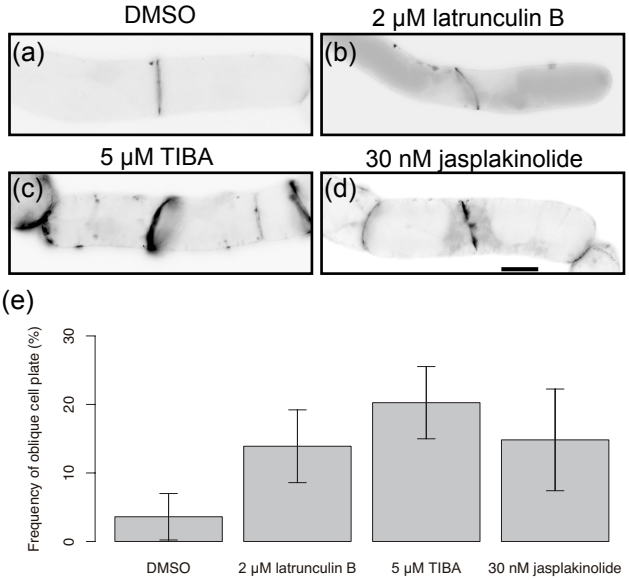


図3　BY-2細胞の細胞分裂面に対するTIBAおよびjasplakinolideの影響
(a-c) BY-GF細胞にDMSO (a) 、latrunculin B (b) 、TIBA (c) 、jasplakinolide (d) をそれぞれ処理し、アニリンブルー染色により細胞板を観察した。(e) 細胞板が細胞短軸に対して10度以上傾斜している細胞の割合。 Bar: 10 μm

4. 微小管とアクチン繊維の2重可視化による表層アクチン繊維パターンと紡錘体の観察

MFTPと紡錘体の関係を検証するため、分裂中期における微小管とアクチン繊維の2重可視化を試みた。YFP-tubulinにより微小管が、RFP-ABD2によりアクチン繊維が可視化されたBY-YTRF細胞にDMSOを処理した場合、細胞長軸方向に垂直な赤道面を持つ紡錘体が高頻度で観察された (図4a, d) 。TIBAおよびjasplakinolideを処理した結果、表層アクチン繊維パターンが変化した細胞において、傾斜した紡錘体が高頻度で観察されることを見出した (図4b, c, e, f, h, i) 。加えて、TIBAおよびjasplakinolideを処理した細胞であってもMFTPを持つ細胞であれば傾斜した紡錘体は観察されなかった

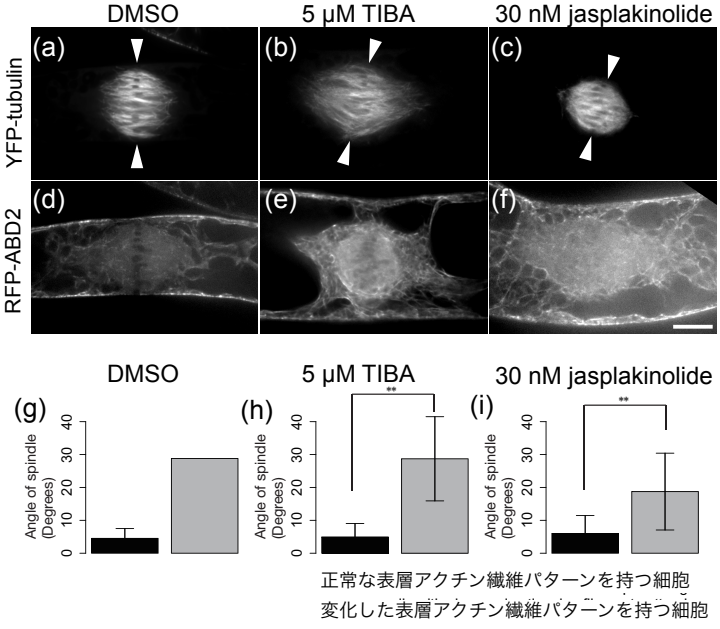


図4　BY-YTRF細胞を用いた表層アクチン繊維パターンと紡錘体の同時観察
DMSO (a, d) およびTIBA (b, e) 、jasplakinolide (c, f) をそれぞれ処理した。矢尻で赤道面を示した。(g-i) 正常 (黒) および変化した (灰色) 表層アクチン繊維パターンにおける紡錘体の傾斜角度。
Bar: 10 μm

(図4h, i) 。同様に、コントロールであるDMSOを処理した場合でも表層アクチン繊維パターンが変化した細胞が低頻度に観察され、そのような細胞では紡錘体が傾斜しており (図4g) 、表層アクチン繊維パターンの変化と紡錘体の傾斜が高度に相関することを見出した。これらの結果からMFTPは紡錘体の方向性を制御することが示唆された。

5. シロイヌナズナ根の細胞分裂面に対するTIBAおよびjasplakinolideの影響

細胞分裂面決定に対するTIBAおよびjasplakinolideの影響をBY-2細胞のみではなく、植物体においても検証するため、細胞膜マーカーとしてGFP-PIP2aを発現する発芽7日目のシロイヌナズナで根端の細胞分裂面を観察した。DMSOを処理した場合、重力方向に垂直な細胞分裂面が形成されることを確認した (図5a, e) 。また、latrunculin Bを24時間処理した場合、重力方向に対し10度以上傾斜した細胞分裂面が高頻度で観察された (図5b, e) 。同様に、TIBAおよびjasplakinolideを24時間処理した場合も傾斜した細胞分裂面が高頻度に観察された (図5c-e) 。これらの結果から、シロイヌナズナ根においてもTIBAおよびjasplakinolideを処理した場合、傾斜した細胞分裂面が形成されることが明らかになった。

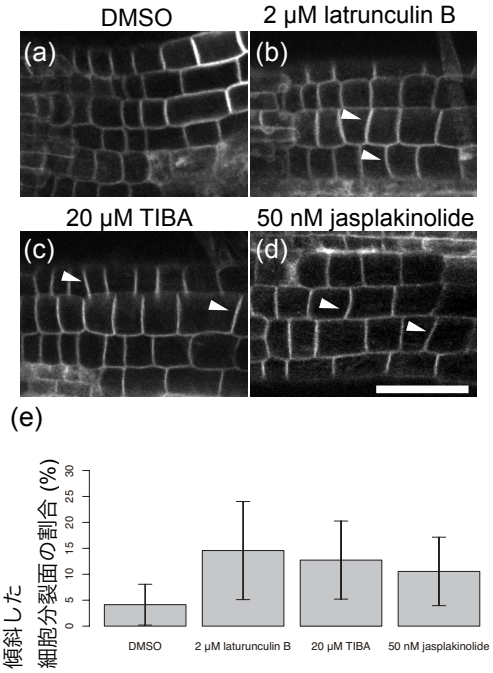


図5　シロイヌナズナ根の細胞分裂面に対するTIBAおよびjasplakinolideの影響
(a-d) GFP-PIP2aにより細胞膜が可視化されたシロイヌナズナの根端。DMSO (a) 、latrunculin B (b) 、TIBA (c) 、jasplakinolide (d) をそれぞれ処理した。矢尻で傾斜した細胞分裂面を示した。
(e) 傾斜した細胞分裂面の割合。 Bar: 50 μm

結論

本研究では、TIBAおよびjaspakinolideを処理することにより、PPBの成熟を阻害することなく、分裂中期の表層アクチン繊維パターンを変化させることを実現した。微小管とアクチン繊維が2重に可視化されているBY-YTRF細胞を用いて、分裂中期のMFTPと紡錘体の関係を検証した結果、表層アクチン繊維パターンの変化と紡錘体の傾斜が高度に相関することを見出した。これらの結果から、MFTPは紡錘体の方向性を制御することで細胞分裂面決定に関与することが示された (図6) 。

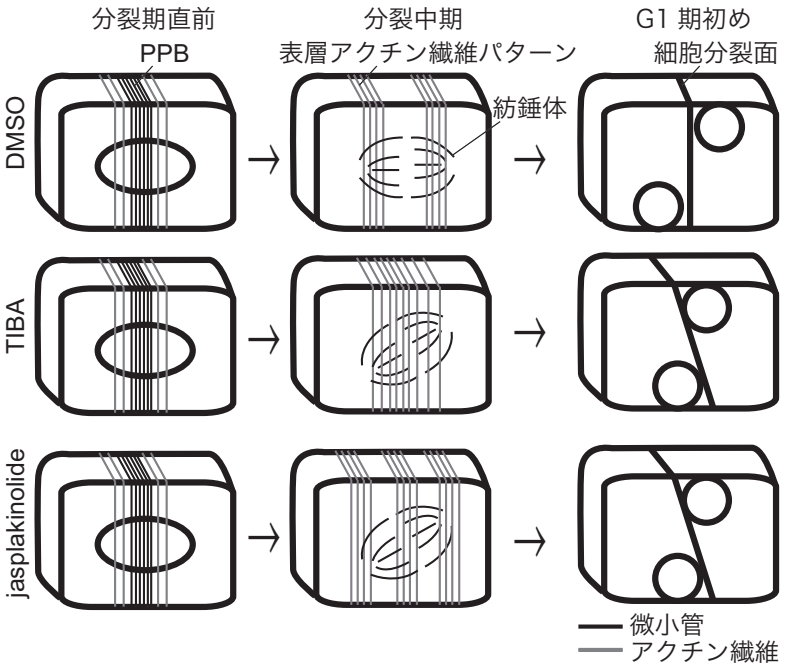


図6　分裂期前後におけるTIBAおよびjasplakinolideの細胞分裂面決定に対する影響のモデル図。