

画像解析とシミュレーションを用いた M/G1 境界期における表層微小管再構築機構の研究

2010年3月修了 先端生命科学専攻 植物全能性制御システム解析学分野

学生証番号 47-086323 劔持 雅則

指導教員 馳澤 盛一郎 教授

キーワード：タバコ培養細胞 BY-2, 細胞骨格, 表層微小管, シミュレーション

序論

表層微小管は植物細胞で特徴的に観察される微小管構造の一つであり、細胞の肥大生長時のタガとなるセルロース微繊維の沈着方向を制御することで、植物細胞の伸長方向を決める重要な細胞内構造である。表層微小管は M 期が始まる前後に消失し、M/G1 境界期で再構築されることが分かっているが、その再構築機構には未だ不明な点も多い。植物細胞は堅い細胞壁に囲まれており、発生の過程で隣り合った細胞の位置関係は原則として変わらない。そのため、植物個体を形づくる上で、細胞一つ一つの形状は重要な要素であると考えられる。従って、表層微小管の再構築機構を明らかにすることは、植物細胞、ひいては植物の形態形成の研究上で重要と考えられる。

本研究では、微小管のプラス端に特異的に結合する EB1 タンパク質 (end binding 1 protein) を新たなプローブとして用い、タバコ BY-2 細胞を観察することで、表層微小管の再構築機構に関する新たな知見の発見を目的とした。また、顕微鏡観察から得られた知見に基づいた表層微小管シミュレーションを通して、表層微小管の再構築過程が進行するメカニズムについて新たな仮説を提起し、それをフィードバックして実際の細胞観察で検証することにより、表層微小管の再構築機構についての正確な理解を目指した。

結果と考察

一章 GFP 融合タンパク質を用いた表層微小管再構築過程の観察

微小管のプラス端に特異的に結合する EB1 タンパク質と GFP の融合タンパク質を恒常的に発現する BY-GEB (transgenic BY-2 cells expressing GFP-EB1 fusion protein) 細胞を作出し、微小管の伸長方向という観点から表層微小管再構築機構の解析を行った。

BY-GEB 細胞の経時観察により、表層微小管の再構築は大きく以下の 3 つの段階を経ることが分かった(図

1)。1) 細胞分裂面付近の細胞表層における、放射状の微小管伸長。2) 細胞全体での不規則な方向への微小管伸長。3) 細胞長軸方向に「垂直な」微小管伸長。

BY-GEB 細胞での観察結果を受け、微小管全体が見られる BY-GT16 (transgenic BY-2 cells expressing GFP-tubulin fusion protein) 細胞で検証を行ったところ、表層微小管再構築の初期段階では、細胞分裂面付近の表層の起点(*)から

「放射状に」配向する微小管が存在し(図 2 C),

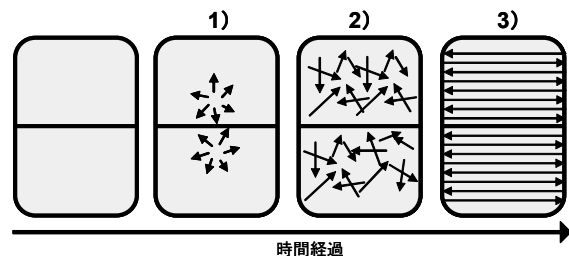


図1 M/G1境界期における表層微小管再構築モデル
矢印はEB1の移動による微小管の伸長を表す。

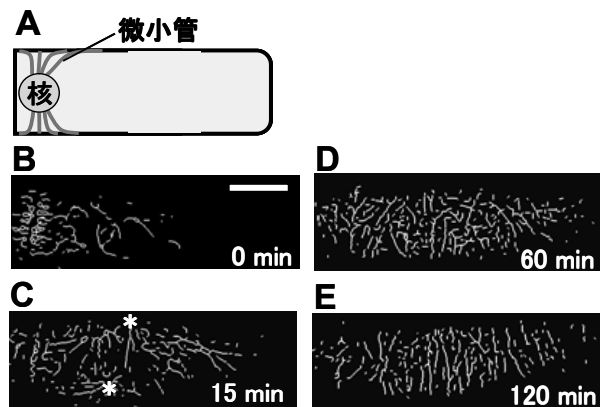


図2 BY-GT細胞における細胞表層の経時観察

A.細胞断面像の模式図. B-E.細胞表層の経時観察で取得した画像より、微小管の繊維抽出を行った。B.隔膜形成体の消失直前の細胞表層. C.図中の*から微小管が放射状に配向. D.不規則な配向. E.細胞長軸に対して「垂直な」微小管の配向. bar = 10 μ m

「不規則な」微小管の配向(図 2 D)を経て、細胞長軸方向に対して「垂直な」微小管の配向(図 2 E)に推移することが分かった。この結果は BY-GEB 細胞の観察によって得られた微小管の伸長方向から予想される配向であり、GY-GEB 細胞の観察から得られた 3 段階の微小管伸長パターンが BY-GT16 細胞の観察によって支持された。

二章 表層微小管シミュレーションソフトウェアの開発と数値実験

第一章で述べた現象と、現在までに報告されている微小管動態をコンピュータ上でシミュレーションすることにより、表層微小管再構築における微小管動態の解析と、再構築機構の予測を行った。開発したシミュレーションソフトウェアを実行した結果、表層微小管はシミュレーションソフトウェアに実装した一様な微小管動態のみでは細胞長軸方向に

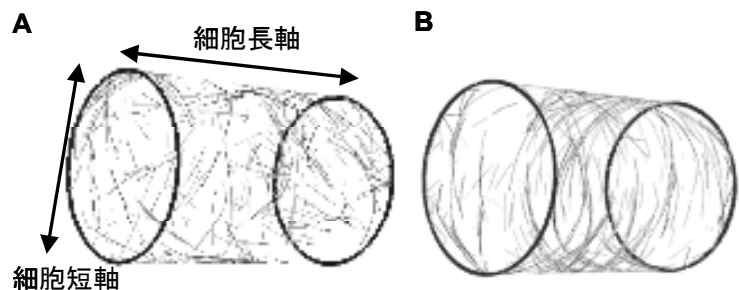


図3 シミュレーションの結果

A. 個々の微小管動態が細胞の形状によって影響を受けず、どの領域においても同様の動態を示すことを仮定したシミュレーション結果。 B. 細胞表層から細胞分裂面への微小管伸長を妨げたシミュレーション結果。

して「垂直な」表層微小管の配向をとらないことが分かった(図 3 A)。そこで、細胞表層から細胞板への微小管伸長が起こりにくいという仮定を導入し、新たなパラメタとして細胞表層から細胞板への微小管伸長率を加えて、細胞表層から細胞板への微小管の伸長を一部妨げるようにした。変更したシミュレーションソフトウェアを実行した結果、不規則な配向を経て、細胞長軸方向に対して「垂直な」表層微小管が構築された(図 3 B)。

三章 顕微鏡観察によるシミュレーション結果の検証

シミュレーションから得た着眼点である細胞表層から細胞板への微小管伸長動態をフィードバックして、BY-GT16 細胞の M/G1 境界期における細胞板付近の細胞表層の経時観察を行った。細胞板近傍の表層を「細胞板近傍領域」、表層微小管の分布域の端部を「端部領域」、それらの中間を「中央領域」とし、微小管のカタストロフ頻度を計測した。その結果、細胞板付近の細胞表層では他の領域と比較して、顕著に微小管のカタストロフが頻発していることが確認された(図 4)。この細胞板近傍の表層でのカタストロフ頻度の増加が、表層微小管の配向を細胞伸長方向に対して「垂直に」推移させる要因の一つであることが示唆された。

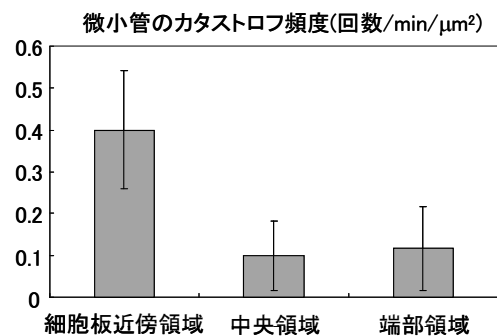


図4 各領域における微小管のカタストロフ頻度

まとめ

- ・ BY-GEB 細胞の観察により、表層微小管の再構築過程に 3 段階の微小管伸長パターンを見出し、新たなモデルを提案した。
- ・ シミュレーションにより、細胞板への微小管伸長を妨げることで、細胞長軸方向に「垂直な」表層微小管が再構築されることが示唆された。
- ・ 細胞板近傍の細胞表層では微小管のカタストロフ頻度が高いことを見出した。この微小管動態により細胞長軸方向に「垂直な」表層微小管が出現することが示唆された。