

植物細胞の分裂面決定における表層アクチン繊維の機能解析

2011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 47-096313 湖城 恵 指導教員 馳澤 盛一郎 (教授) キーワード (アクチン繊維)

はじめに

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面方向の制御が重要な役割を果たす。分裂面方向の制御には、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preprophase band (PPB) を形成する。PPBは分裂期の核膜崩壊直後に消失するが、PPBの形成された位置に将来、分裂面が形成される。そのためPPBは分裂面を決定する構造と考えられている。また、分裂期中期の表層アクチン繊維は細胞中央部の両側に1対の密な帯状パターン (actin microfilament twin peaks: MFTP) を形成し、アクチン重合阻害剤によりアクチン繊維を崩壊させると分裂面が乱れることが報告されている。しかし、アクチン繊維の破壊はPPBの成熟阻害を伴うため、MFTPの分裂面決定における役割は必ずしも明確ではなかった。近年の研究により、アクチン束化誘導剤によってアクチン繊維を壊すことなく、細胞内における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可能になってきた。そこで本研究では、アクチン束化誘導剤を用いて分裂期のアクチン繊維パターンを変化させることで、アクチン繊維の分裂面決定における機能を明らかにすることを目的とした。

結果と考察

1. 分裂期のアクチン繊維に対するアクチン束化誘導剤の影響

アクチン繊維マーカーとしてGFP-ABD2を発現するタバコBY-2の形質転換細胞であるBY-GF細胞を用いて、分裂期のアクチン繊維に対するアクチン束化誘導剤である2,3,5-triiodobenzonic acid (TIBA) およびjasplakinolide (Jasp) の影響を検証した。その結果、アクチン繊維の顕著な束化は観察されなかったものの、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処理では90%以上の細胞で細胞中央部の両脇に1対の帯状のアクチン繊維パターン (MFTP) が形成されるのに対し (図1a, d)、5 μ M TIBAを処理した場合、およそ37%の細胞で中央部に1つのアクチン繊維量のピークが観察された (図1b, e)。また、Jaspを処理した場合、およそ37%の細胞の表層で3つの帯状のアクチン繊維パターンが形成された (図1c, f)。

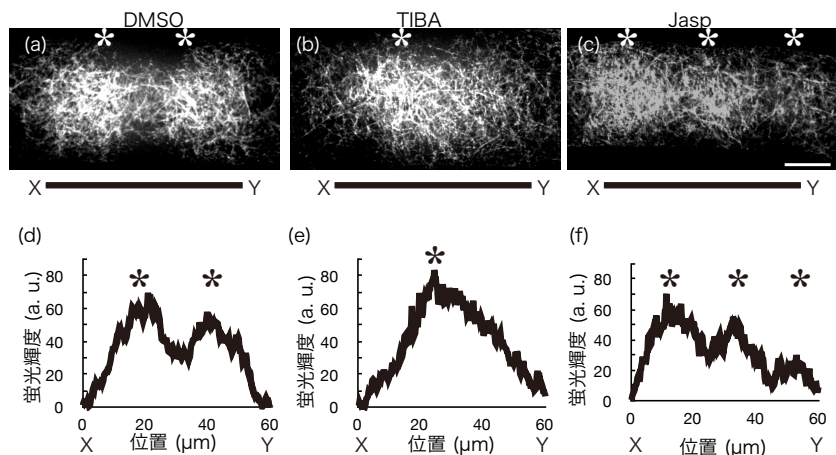


図1 アクチン束化誘導剤処理による分裂中期の表層アクチン繊維構造の変化 (a-c) コントロールとしてDMSO (a) を、アクチン束化誘導剤としてTIBA (b) およびJasp (c) を処理した場合の表層アクチン繊維の顕微鏡画像。(d-e) a-cにおけるX-Y軸に対して垂直方向に加算平均した輝度プロファイル。アスタリクス (*) で輝度のピークを示した。Bar: 10 μ m

に1対の帯状のアクチン繊維パターン (MFTP) が形成されるのに対し (図1a, d)、5 μ M TIBAを処理した場合、およそ37%の細胞で中央部に1つのアクチン繊維量のピークが観察された (図1b, e)。また、Jaspを処理した場合、およそ37%の細胞の表層で3つの帯状のアクチン繊維パターンが形成された (図1c, f)。

2. 表層アクチン繊維の局在に関する定量評価

MFTPは細胞分裂中期の細胞表層に出現するアクチン繊維パターンであるが、細胞膜直下にあるのか、それとも液胞膜に接しているのか、その詳細な局在は不明瞭であった。そこで、BY-GF細胞のG2期および分裂中期における細胞膜近傍と液胞膜近傍のアクチン繊維の局在の定量評価を試みた。アクチン繊維と液胞膜および細胞膜を同時に可視化するために、エンドサイトーシス経路の生体染色剤であるFM4-64をBY-GF細胞に処理した。FM4-64蛍光顕微鏡画像から細胞膜近傍および液胞膜近傍の領域を抽出し、これらの領域におけるGFP-ABD2輝度を測定した。その結果、G2期では細胞膜近傍よりも液胞膜近傍においてアクチン繊維が多く局在しているのに対

し、分裂期に移行すると細胞膜近傍においてアクチン繊維の局在が多くなることを見出した(図2)。また、5 μ M TIBAおよび30 nM Jaspを処理した場合でも同様の変化が認めら

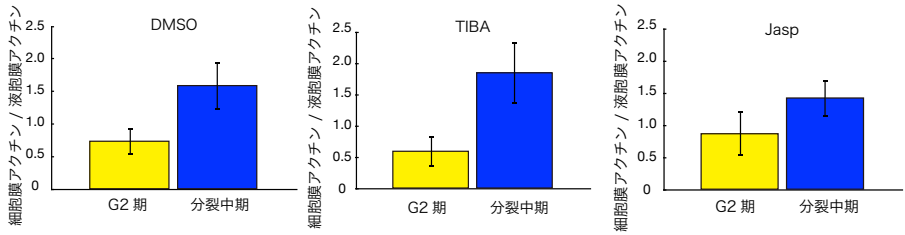


図2 G2期および分裂中期における液胞膜近傍に対する細胞膜近傍のアクチン繊維の局在の割合 (細胞膜アクチン / 液胞膜アクチン)

れた(図2)。この結果から、図1で示したTIBAおよびJaspを処理した場合の表層アクチン繊維パターンの変化は主に細胞膜近傍で起きていることが示唆された。

3. アクチン束化誘導剤の微小管構造への影響

微小管マーカーとしてG1期GFP-tubulinを発現するBY-GT細胞を用いて、微小管に対する阻害剤の影響を検証した。

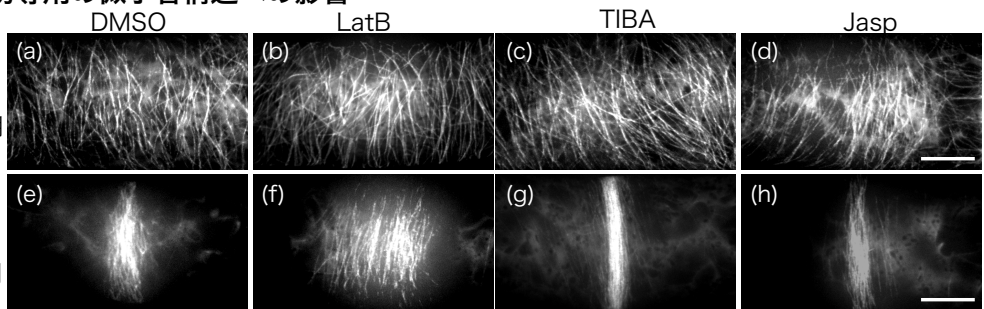


図3 表層微小管およびPPBに対する阻害剤の影響

G1期の表層微小管(a-d)とG2期のPPB(e-h)を示した。DMSO(a, e)およびLatB(b, f)、TIBA(c, g)、Jasp(d, h)をそれぞれ処理した。Bars: 10 μ m

は、表層微小管が細胞の長軸方向にほぼ垂直に配向しており(図3a)、この配向はアクチン重合阻害剤であるLatrunculin B (LatB)、TIBA、Jaspを処理した場合においても保たれていた(図3b-d)。次に、各阻害剤のG2期におけるPPBに対する影響を調べた。LatB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、幅の広いPPBが形成された(図3f)。一方、TIBAおよびJaspを処理した場合には、PPBの構造および方向性に顕著な変化は観察されなかった(図3g-h)。

4. アクチン束化誘導剤の分裂面決定への影響

これまでの結果から、アクチン束化誘導剤を処理した場合、PPBを変化させることなく、MFTPを変化させることが示唆された。そこで、アクチン束化誘導剤が分裂面決定にどのような影響を与えるのか調べた。

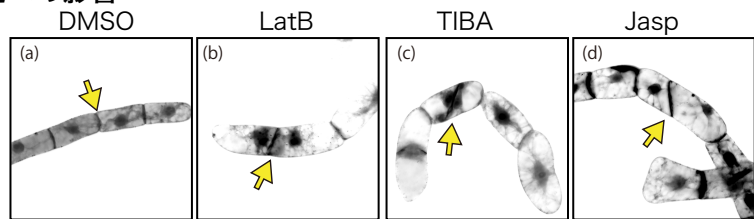


図4 細胞分裂面の方向に対する阻害剤の影響

BY-GF細胞の細胞板をアニリンブルー染色により可視化した。DMSO(a)およびLatB(b)、TIBA(c)、Jasp(d)をそれぞれ処理した。矢印で分裂面を示した。

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(G2期)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。その結果、LatBを処理した場合と同様に、TIBAおよびJaspを処理した場合にも傾いた分裂面が高頻度に観察された(図4b-d)。このことから、PPBが正常であってもMFTPが変化すれば分裂面が傾くことが明らかとなり、MFTPが分裂面決定に重要な役割を果たすことが示唆された。

まとめ

これまでのアクチン重合阻害剤を用いた研究では、アクチン繊維を破壊すると同時にPPBの成熟を阻害していたため、分裂面決定におけるPPBとMFTPの寄与を区別することは困難であった。本研究では、アクチン束化誘導剤を導入することで、PPBに変化を伴わずにMFTPを変化させることを実現した。その結果、MFTPが分裂面決定に重要な役割を果たすことを明確にした。