

# 高等植物の細胞分裂におけるアクチン繊維の機能解析

## ～可視化細胞系の確立と画像処理によるアプローチ～

植物全能性制御システム解析学分野 学生証番号 46543 梶垣 匠

指導教員 馳澤 盛一郎

### 序論

アクチンは真核生物に普遍的に存在するタンパク質であり、生理的な条件下で重合してアクチン繊維を形成する。アクチン繊維は束や網状のような高次の構造を形成し、細胞の分裂、伸長、分化など細胞の形の変化をともなう現象に重要な役割を果たす。これまで、高等植物細胞の分裂時をはじめとする様々な現象下でのアクチン繊維の構造と役割を検討するアプローチとしては、化学固定した細胞においてアクチン繊維を染色する固定染色法が主流であった。しかし、アクチン繊維は化学固定処理に弱く、構造が人為的に変化しやすいという問題点が指摘されていた。また、固定染色法では死んだ細胞を観察しているため、生きた細胞におけるアクチン繊維の動態を観察することは不可能であった。このため、細胞分裂時におけるアクチン繊維の構造や機能については不明な点も多く、適切な観察系の開発が待望されていた。このような状況を踏まえ、本研究では、GFPによりアクチン繊維を可視化したタバコBY-2の形質転換細胞系の確立を試み、この可視化細胞の観察から得られた顕微鏡画像の解析により、細胞分裂時におけるアクチン繊維の動態と役割を解明することを目的とした。

### 結果と考察

#### 1. アクチン繊維可視化細胞系の確立

生細胞でアクチン繊維を可視化するため、アクチン繊維結合タンパク質のひとつであるFimbrinに着目し、シロイヌナズナAtFim1のアクチン繊維結合領域にGFPを融合したタンパク質(GFP-Fimbrin)を恒常的に発現するタバコBY-2の形質転換細胞を作成した(図1)。得られた細胞株の中から観察に最も適した株を選抜し、これをBY-GF11(BY-2 cells stably expressing GFP-Fimbrin line 11)と名付けた。

#### 2. 細胞分裂期におけるアクチン繊維構造の動態

BY-GF11細胞を用いて、細胞周期各期におけるアクチン繊維構造の経時観察を行った。その結果、分裂中期において細胞表層に細胞中央部(図1 矢印)を挟むような一対の密な帯状繊維構造(図1 \*)が現れることを見出した。この繊維構造をより詳細に検討するため、冷却CCDを用いて分裂中のBY-GF11細胞を経時観察し、得られた顕微鏡画像から細胞表層部(図2, X-Y)におけるGFP-Fimbrin蛍光輝度プロファイルを作成した。その結果、G<sub>2</sub>期の終りには蛍光輝度のピークは細胞中央部にみられたが(図2, 0 min)、分裂前中期にかけてこのピークは徐々に分離してゆき(図2, 10-20 min)、分裂中期には二つの蛍光輝度のピークが出現した(図2, 30 min)。

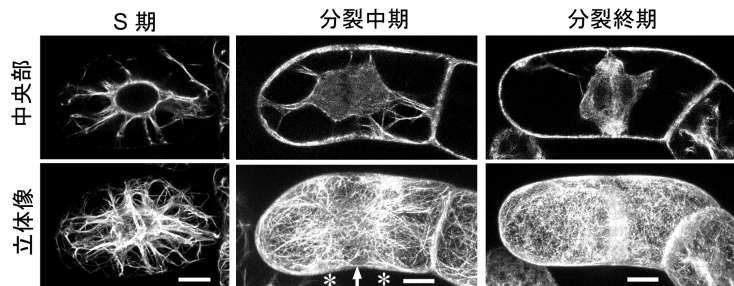


図1. BY-GF11細胞におけるアクチン繊維の可視化 Bar: 10 μm

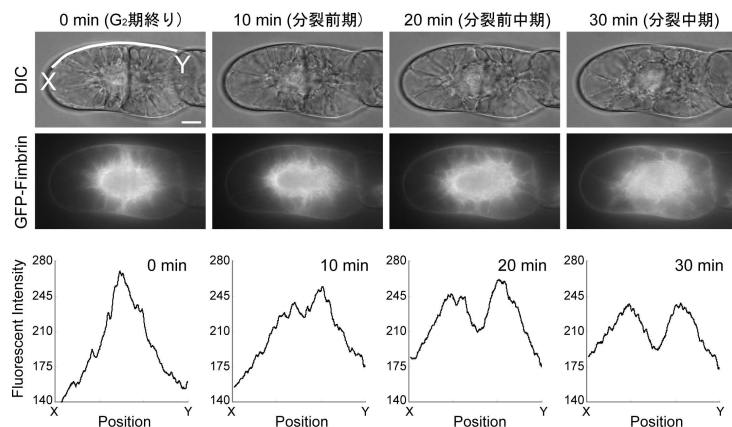


図2. 細胞表層部におけるGFP-Fimbrin蛍光輝度の経時変化 Bar: 10 μm

そこで、この対をなす密な帯状繊維構造をMFTP (actin microfilament twin peaks)と名付けた。

### 3. 分裂面形成におけるMFTPの役割

BY-GF11 細胞を分裂期を通して経時観察したところ、MFTP の中央部に当たる谷の位置に分裂面が形成される可能性が示唆された。そこで、MFTP と分裂面の位置関係を定量的に検討するため、顕微鏡画像処理を用いて、両者の位置関係の解析を試みた(図3)。まず、分裂中のBY-GF11 細胞の顕微鏡画像を経時的に取得し、蛍光輝度プロファイルからMFTP と分裂面の位置を特定した。さらに、GFP-Fimbrin 蛍光輝度の二つのピーク間の長さをL、蛍光輝度ピークと分裂面との長さを $l_1$ 、 $l_2$  ( $l_1 \geq l_2$ )と定義し、これらを10細胞について測定した。その結果、 $l_1$ は再現性よくLの約半分の値を示し、分裂面がMFTPの中央部に形成されることが明らかになった(表1)。また、分裂面形成におけるアクチン繊維構造の役割を調べるために、DNA合成阻害剤であるアフィディオリンを用いて細胞周期を同調させ(図4a)、G<sub>1</sub>期初め(アフィディオリン除去後11時間目)の分裂面をアニリンブルー染色により観察した。その結果、コントロールではほとんどの細胞で平滑な分裂面が形成されていたが(図4b,c control)、サイトカラシンDを用いてアクチン繊維を破壊したものでは、歪んだ分裂面をもつ細胞が高頻度で出現した(図4b,c 6-11 h)。また、MFTPをもつ分裂中期の細胞が多い時期特異的にアクチン繊維を破壊したところ、歪んだ分裂面をもつ細胞が同様に高頻度で出現した(図4b,c 6-8 h)。一方、フラグモプラストをもつ細胞質分裂期の細胞が多い時期にアクチン繊維を破壊した場合には、歪んだ分裂面をもつ細胞の割合はコントロールに近い値を示した(図4b,c 9-11 h)。これらの結果から、MFTPが分裂面形成に重要な役割を果たすことが示された。

#### まとめ

1. アクチン繊維を可視化したタバコBY-2の形質転換細胞株BY-GF11を確立した。
2. 分裂期を通じたアクチン繊維の経時観察に成功し、分裂中期の表層繊維構造MFTPを見出した。
3. MFTPが分裂面形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。

#### 発表論文

1. Sano T\*, Higaki T\*, Oda Y, Hayashi T, Hasezawa S (2005) *The Plant Journal* 44:595-605. (\*equal contribution)
2. Sano T, Higaki T, Handa K, Kadota Y, Kuchitsu K, Hasezawa S, Hoffmann A, Endter J, Zimmermann U, Hedrich R, Roitsch T (2006) *FEBS Letters* 580:597-602.
3. Yoneda A, Kutsuna N, Higaki T, Oda Y, Sano T, Hasezawa S (2006) *Protoplasma in press.*
4. Higaki T, Kutsuna N, Okubo E, Sano T, Hasezawa S *Plant and Cell Physiology submitted.*

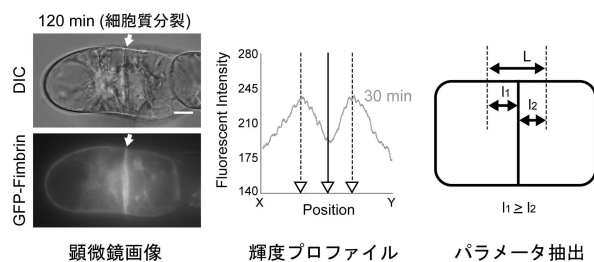


図3. MFTPと分裂面の位置関係の解析過程  
白矢印: 分裂面 Bar: 10  $\mu$ m

	L ( $\mu$ m)	$l_1$ ( $\mu$ m)	$l_1 / L$
平均	19.6	10.4	0.53
標準誤差	1.7	0.9	0.009

表1. MFTPと分裂面の位置関係 n=10

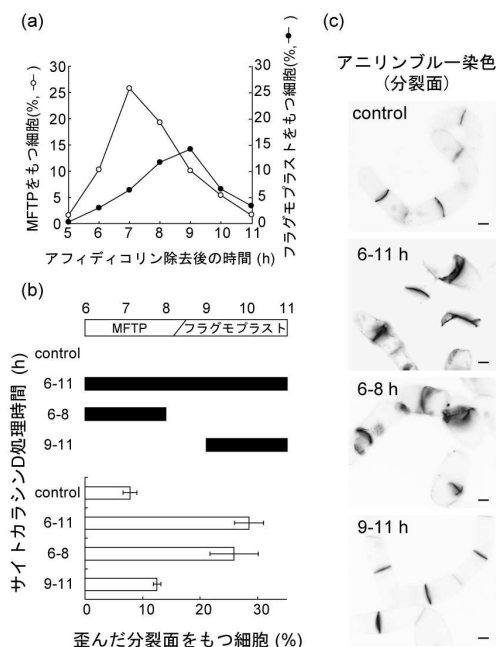


図4. アクチン繊維破壊による分裂面形成への影響  
(a)BY-GF11の同調培養系, (b)アクチン繊維破壊による分裂面異常 Bar: SE, (c)分裂面構造 Bar: 10  $\mu$ m