

修士論文

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～

2004 年度入学 植物全能性制御システム解析学分野

学籍番号 46543

桧垣 匠

目次

目次	1
略語表	2
序論	3-4
材料と方法	5-8
第1章 アクチン繊維の可視化細胞系の確立	
緒言	9
結果	9-11
考察	11-14
第2章 細胞分裂時のアクチン繊維の動態	
緒言	14
結果	14-16
考察	16-19
第3章 分裂面形成における MFTP の役割	
緒言	20
結果	20-22
考察	22-23
第4章 分裂直後の細胞質糸再形成におけるアクチン繊維の役割	
緒言	24
結果	24-27
考察	27-30
総括	31
謝辞	32
引用文献	32-39
図表	40-60

略語表

ADZ, actin depleted zone

BA, bistheonellide A

BDM, 2,3-butanedion monoxime

BY-GF11, BY-2 cells expressing GFP-Fimbrin line 11

CD, cytochalasin D

CLSM, confocal laser scanning microscopy

DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

FM4-64, *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)-pyridinium dibromide

GFP, green fluorescent protein

PBS, phosphate buffered saline

PMSE, phenylmethanesulfonyl floride

MBS, *m*-maleimidobenzoyl *N*-hydroxysuccinimide ester

MFTP, actin microfilament twin peaks

序論

アクチンは全ての真核生物に普遍的に存在するタンパク質であり、生理的なイオン条件下で ATP 依存的に重合して、アクチン繊維を形成する。このアクチン繊維は細胞骨格の主要なメンバーで、細胞の形態形成や運動に深く関与する。例えば、ヒト繊維芽肉腫細胞をはじめとする動物細胞の遊走はアクチン繊維の重合が主な物理的な原動力になっており、その過程は極めて詳細に調べられている (Pollard and Borisy 2003)。また、一般に運動性をもたない植物細胞においても、アクチン繊維が生み出す物理的な力はさまざまな細胞内活動に用いられている。原形質流動はその好例であり、細胞内にはりめぐらされたアクチン繊維と分子モーターであるミオシンによって原形質が盛んに循環する (Shimmen and Yokota 1994, Grolig and Pierson 2000)。また、アクチン繊維は束や網状といった高次の構造を形成し、細胞の分裂、伸長、分化にも重要な役割を果たす。例えば、花粉管や根毛の先端成長にアクチン繊維は必須であり、先端部に極性をもって局在する (Hepler et al. 2001)。また、トライコームの正常な発達にもアクチン繊維は不可欠であり、発達段階に応じてその繊維構造はダイナミックに変化する (Mathur et al. 1999)。管状要素分化過程においては、パッチ状のアクチン繊維構造が観察され、二次壁形成への関与が示唆されている (Kobayashi et al. 1987, Fukuda and Kobayashi 1989)。また、膜輸送 (Samaj et al. 2005)、シグナル伝達 (Staiger 2000, Smith 2003)、イオンチャネル活性の制御 (Stoeckel and Takeda 2002, Wang et al. 2004a) などへの関与も指摘されており、アクチン繊維はその多様な構造と同様に、多様な機能を担う。このように、細胞の生理的変化に応じてさまざまな変化をみせるアクチン繊維を研究するにあたり、その可視化技術は必要不可欠なものと考えられる。

アクチン繊維の可視化技術の中で最も一般的な手法は、化学固定した細胞において蛍光標識ファロイジンもしくは蛍光抗体で標識する固定染色法である。固定染色法によって、前述したようなアクチン繊維構造に関する多くの知見が得られてきた。しかしその一方で、固定染色法に関しては主に二つの問題点が指摘されていた。一つは、アクチン繊維は化学固定処理に弱く、その構造が人為的に変化し易い点である (Blancaflor and Hasenstein 2000)。実際、同様のサ

ンプルでも染色方法や実験者の技量によって、最終的に得られる染色像が変わってしまうことが認められている (Vicha et al. 2000)。もう一つは、化学固定された細胞は死んでいるため、アクチン繊維の構造変化を経時観察できない点である。近年、これらの問題を克服するため、蛍光ファロイジンをマイクロインジェクションする方法 (Schmit and Lambert 1990) や GFP 融合タンパク質を用いた方法 (Kost et al. 1998, Sheahan et al. 2004b) によって、生細胞での可視化が試みられている。これらの手法を用いて、従来の固定染色法では知り得なかった知見も得られはじめている。例えば、GFP とマウスのアクチン繊維結合タンパク質である talin のアクチン繊維結合領域の融合タンパク質 (GFP-mTn) を発現させたシロイヌナズナを用いて、花粉管先端部における細胞表層のアクチン繊維量がおよそ 110 秒間隔で変動していることが最近明らかになった (Hwang et al. 2005)。これは、生細胞における可視化系によって捉えられた、アクチン繊維のダイナミックな変化の一例と考えられる。

しかしながら、固定染色法による膨大な知見と比べて、アクチン繊維の生細胞での可視化技術は未だ発展途上の段階にある。これまで、生細胞で分裂期を通してアクチン繊維構造を観察した報告例はなく、分裂時におけるアクチン繊維の正確な局在や役割についても不明な点が多い。これは、細胞分裂の観察に適した材料でアクチン繊維の可視化系が確立していなかったことが主な原因と思われる。本研究ではこのような状況を踏まえ、細胞分裂時におけるアクチン繊維の動態と役割を明らかにすることを目的とした。まず、第 1 章ではアクチン繊維を可視化したタバコ BY-2 の形質転換体細胞系の確立について報告する。第 2 章では、この可視化細胞の経時観察から見出した新規のアクチン繊維構造 MFTP について述べ、MFTP が出現する過程で観察されたアクチン繊維の動態について画像処理技術を駆使した解析結果を示す。第 3 章では、分裂面形成における MFTP の機能解析について詳述する。さらに、第 4 章では、生細胞におけるアクチン繊維と液胞の観察から見出した、分裂期直後のアクチン繊維の細胞質系再形成への関与について議論する。

材料と方法

BY-2 細胞の培養

タバコ培養細胞 BY-2 は *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 の芽ばえから誘導したカルスより確立された細胞株で、改変 Linsmaier and Skoog (LS) 培地 (Linsmaier and Skoog 1965) 中で培養、維持している (Nagata et al. 1992)。改変 LS 培地は Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (Wako Co., Tokyo, Japan) に、200 mg/L リン酸二水素カリウム、1mg/L チアミン塩酸塩、100 mg/L myo-イノシトール、0.2 mg/L 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、3% (w/v) スクロースを加えて、pH 5.8 に調整したものである。7 日毎に約 1 mL の細胞懸濁液を 95 mL の培地に植え継ぎ、27 °C、暗所、130 rpm のロータリーシェイカーで振盪培養した。

細胞周期の同調

最終濃度 5 mg/L のアフィディコリン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) を含む改変 LS 培地 95 mL に継代 7 日目の細胞 10 mL を移植し、24 時間培養後、改変 LS 培地 1L で洗浄し、新たな改変 LS 培地に移植して培養した。分裂指数の測定は、2% (w/v) グルタルアルデヒドを含む PBS 溶液 (phosphate buffered saline: 150mM 塩化ナトリウムを含む 20mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH7.0) と 1 mg/L DAPI を含む NS 溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.25 mM スクロース, 1 mM 塩化マグネシウム, 0.1 mM 硫酸亜鉛(II), 0.1 mM 塩化カルシウム, 1 mM EDTA, 0.8 mM PMSF, 7 mM メルカプトエタノール) をサンプルに加えて 10 分間静置して細胞核および染色体を蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で計数することで行なった。

GFP-Fimbrin コンストラクトの作成

シロイヌナズナの cDNA からアクチン結合タンパク質のひとつである AtFim1 のアクチン結合領域 (amino acids 325-687; McCurdy and Kim, 1998) を PCR 法により増幅した。この断片を CaMV 35S プロモーター::GFP(S65T)-mTn ベクター (筑波大学の加川助教授より分与) の mTn と組換えることにより、CaMV 35S プロモーター::GFP(S65T)-Fimbrin ベクターを作成した。CaMV 35S プロモーター::GFP(S65T)-mTn ベクターは CaMV 35S プロモータ

ー::sGFP(S65T) (静岡県立大学の丹羽助手から分与) を改変したものである。

BY-GF 細胞の作出

CaMV 35S プロモーター::GFP(S65T)-Fimbrin のベクターをアグロバクテリウムに導入し、アグロバクテリウム法 (An 1985) に基づいて BY-2 細胞の形質転換を行なった。得られたカルスは径約 1 cm まで生長させてから液体の改変 LS 培地 20 mL 中に懸濁し、GFP 蛍光によってアクチン繊維がよく可視化されている複数の細胞種を選択した。これらの形質転換細胞を BY-GF (transgenic BY-2 cells stably expressing GFP-Fimbrin fusion protein) と名づけ、その培養と維持は BY-2 細胞に準じて行なった。

パーティクルガン法による一過的発現

ベクター約 2 μ g、2.5 mM 塩化カルシウム 7.5 μ L、0.1 mM スペルミジン 5.0 μ L、60 mg/mL 金粒子(径 1 μ m) in 50 %グリセロール 7.5 μ L を混合し、ボルテックスミキサーで 3 分間懸濁した。15000 rpm で数秒遠心し上清を除去後、75%エタノール 100 μ L を加えボルテックスミキサーで 1 分間懸濁した。15000 rpm で数秒間遠心し上清を除去後、100 % エタノール 15 μ L を加え、打ち込み用の金粒子を調製した。継代 3 日目の細胞 4 mL をザルトリウス濾過器でセルロース混合エステルメンブレン(Millipore Co. Bedord, MA, U.S.A.)上に濾過し、細胞の乗ったメンブレンを径 60 mm シャーレに乗せた。Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad Lab., California, U.S.A.)を用い、金粒子をシャーレ内のメンブレンに打ち込んだ。シャーレに新しい無添加 LS 培地を 3 mL 加え、27 $^{\circ}$ C、暗黒下に 6 時間静置後、観察を行った。

細胞染色

アクチン繊維の可視化のため、自然沈降させた細胞をPMEG溶液 (50 mM PIPES (pH 6.8) , 1 mM MgSO₄, 5mM EGTA, 1.5% グリセロール, 150 mM マンニトール) に懸濁し、これに最終濃度0.07 μ M ローダミン・ファロイジン (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を加え、室温で30分間放置した。また、液胞膜の可視化にはN-(3-triethylammoniumpropyl)

-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl) hexatrienyl)-pyridinium dibromide (FM4-64, Molecular Probes) によるパルスラベル法 (Kutsuna and Hasezawa 2002) に従い、以下のように行った。細胞懸濁液に終濃度 32 μM の FM4-64 を加えてゆるやかに攪拌し、2 分間インキュベーションした。さらに培地で3回洗浄し、通常の培養条件下でインキュベーションした。液胞膜の観察には10数時間インキュベーションした細胞を用いた。

顕微鏡観察

細胞の観察には共焦点レーザー顕微鏡システム (CLSM; 倒立顕微鏡 IX70, レーザースキャニングシステム GB-200, Olympus Co., Tokyo, Japan) と、CCDカメラ (DP-70, Olympus) を備えた蛍光顕微鏡 (BX-51, Olympus) を用いた。生細胞の経時観察 (X-Y-T)、複数の焦点面での観察 (X-Y-Z) は、径14mmカバーグラス付きの径35 mmガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan) に細胞懸濁液 0.5~1.0 mLを滴下して行った。画像の輝度およびコントラスト調整には画像処理ソフトウェア Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, U.S.A.) を用いた。

アクチン繊維の破壊

アクチン繊維を破壊するためには、細胞懸濁液に最終濃度 100 μM の cytochalasin D (CD) を加え、通常の培養条件下でインキュベーションした。アクチン繊維の一過的破壊時の影響を調べるためには、CD 処理した細胞を 30 倍量の培地で洗浄し、新たに培養した。また、迅速なアクチン繊維の破壊のためには、最終濃度 1 μM の bistheonellide A (BA) を用いた (Hishino et al. 2003)。

画像解析によるアクチン繊維と液胞膜の動きの定量

アクチン繊維と液胞膜の動きを定量するため、画像相関法を用いた。動きの指標として正規化相関係数 ($Corr_{norm}$: normalized correlation coefficient) を以下のように定義した。

$$Corr_{norm} = \frac{\sum_{x,y} (f(x,y) - \bar{f})(g(x,y) - \bar{g})}{\sqrt{\sum_{x,y} (f(x,y) - \bar{f})^2 \sum_{x,y} (g(x,y) - \bar{g})^2}},$$

上式における f は経時観察における一枚目の画像、 \bar{f} は $f(x,y)$ の空間輝度平均である。また、 g は経時観察における任意の画像であり、 \bar{g} は $g(x,y)$ の空間輝度平均である。 $Corr_{norm}$ は、経時観察中に画像が全く変化しなかった場合に 1 になり、画像が完全に変化した場合には 0 になる。 $Corr_{norm}$ の計算には画像解析ソフトウェア ImageJ 1.34p (Abramoff et al. 2004) を用いた。また、ノイズを軽減するため、 $Corr_{norm}$ を計算する前にガウシアンフィルターを適用した。

液胞構造の立体画像再構築

CLSM により $0.5\mu\text{m}$ 間隔で光学切片像を取得した。この連続光学切片像から立体画像再構築ソフトウェア REANT (Kutsuna and Hasezawa 2005) を用いて立体再構築を行った。

第1章 アクチン繊維の可視化細胞系の確立

緒言

細胞分裂時におけるアクチン繊維の動態を明らかにするためには、生きた細胞で経時的にアクチン繊維を観察できる実験系が必要である。生細胞におけるアクチン繊維の可視化系のひとつに、蛍光標識ファロイジンをマイクロインジェクションする方法がある (Schmit and Lambert 1990, Zhang et al. 1993)。このマイクロインジェクション法により、分裂時におけるアクチン繊維の構造変化について多くの知見が得られた。しかしその一方で、この手法は技術的に困難で、可視化できる生物や細胞の種類に限られるという欠点もあった。

近年になり、GFP とマウスのアクチン繊維結合タンパク質である talin のアクチン繊維結合領域の融合タンパク質 (GFP-mTn) がアクチン繊維の可視化プローブとして使われるようになった (Kost et al. 1998)。GFP-mTn は、特にシロイヌナズナ変異体の細胞レベルの表現型解析ツールとして汎用的に利用されてきたが (Fu et al. 2002, Mathur et al. 2003, Li et al. 2003, Basu et al. 2004, Brembu et al. 2004, Cheung and Wu 2004, Gu et al. 2005)、しばしばアクチン繊維構造への悪影響も指摘されていた (Jedd and Chua, 2002, Ketelaar et al. 2004)。そこで本研究では、新たなアクチン繊維のプローブとして、シロイヌナズナのアクチン繊維結合タンパク質 AtFim1 (McCurdy and Kim 1998) に着目し、アクチン繊維を可視化した培養細胞系の確立を試みた。

結果

GFP-Fimbrin はアクチン繊維を特異的に標識する

アクチン繊維を可視化するため、GFP によりアクチン繊維を蛍光標識するタバコ BY-2 の形質転換細胞株の作出を行なった。材料として BY-2 細胞を用いたのは、同調培養の実験系が確立していること、細胞形態学的な知見が多く蓄積していることなど、細胞周期を通じたアクチン繊維構造の研究に適した特徴を備えているからである。コンストラクトは GFP とシロイヌナズナのアクチン繊維結合タンパク質のひとつである AtFim1 のアクチン繊維結合領域

(ABD2) を融合したタンパク質 (GFP-Fimbrin) を恒常的に発現するように設計した。これを用いて得られた複数の形質転換体の中から、アクチン繊維の観察に最も適したものを選び、懸濁培養細胞とした。このようにして確立した形質転換細胞株を BY-GF11 (transgenic BY-2 cells stably expressing GFP-Fimbrin line 11) と名付けた。BY-GF11 細胞の細胞表層を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、表層アクチン繊維構造が観察された (図 1a)。また、細胞中央部では細胞質糸に添った繊維構造がみられた (図 1b)。同様の繊維構造は別の細胞株である BY-GF8 においても観察された (図 6m, n)。また、BY-2 細胞で GFP-mTn を一過的に発現させたところ、BY-GF11 細胞とよく類似した表層繊維構造が観察されたが (図 1c; Kost et al. 1998)、細胞質糸は消失し、細胞核内にも強い蛍光が確認された (図 1d)。さらに、BY-GF11 細胞のアクチン繊維をローダミン・ファロイジンによって染色し、GFP-Fimbrin 蛍光がアクチン繊維を特異的に標識していることを確認した (図 1e-j)。

アクチン繊維構造は細胞周期の進行にともなってダイナミックに変化する

本研究で確立した BY-GF11 細胞を用いて、細胞周期の進行に伴うアクチン繊維の役割を解明するために、その構造を観察した。G₁ 期の細胞では、比較的ランダムな配向をもつ表層繊維構造と細胞質糸に添ったアクチン繊維が観察された (図 2a-c)。また、S 期には核が細胞の中央付近に移動したが、繊維構造は G₁ 期のそれによく類似していた (図 2d-f)。G₂ 期になると、表層繊維は細胞長軸に対して垂直に配向し、細胞中央部で最も密になっていた (図 2g-i)。分裂中期においては特筆すべきことに、表層繊維の配向がメッシュ状に変化し、細胞中央部 (図 2l, 矢印) を挟むように一対の密な帯状繊維構造 (図 2l, *) が生じた (図 2j-l)。この表層繊維構造は BY-GF8 細胞や BY-2 細胞のローダミン・ファロイジン染色によっても確認された (図 6n,q)。分裂後期、終期においても類似の表層繊維構造は維持されていた (図 2m-r)。また、分裂終期に出現するフラグモプラストの位置にも GFP-Fimbrin の蛍光が強く観察された (図 2q)。

G₁ 期の細胞の液胞膜を FM4-64 により生体染色し、生細胞内におけるアクチン繊維の局在を詳細に解析したところ、アクチン繊維は主に細胞表層 (図 3a-c, 小矢印) と巨大液胞表層 (図

3a-c, 大矢印) に局在していた。巨大液胞表層と細胞表層の横断線における GFP-Fimbrin と FM4-64 の蛍光輝度プロファイルを作成したところ、細胞表層よりも液胞表層で GFP-Fimbrin の蛍光輝度が強くみられた (図 3d P-Q,e,g)。また、アクチン繊維は細胞質系の中央を貫くというよりはむしろ細胞質系を縁取るような局在がみられた (図 3d R-S,f,h)。一方、分裂中期に観察された一对の密な帯状繊維構造の詳細な局在を蛍光輝度プロファイルにより解析したところ、G₁ 期の場合と異なり、液胞表層よりも細胞表層で GFP-Fimbrin の蛍光輝度が強くみられた (図 4)。

考察

BY-GF11 により生細胞におけるアクチン繊維を可視化できる

GFP-Fimbrin 融合タンパク質によりアクチン繊維を可視化した細胞株を確立することができた (図 1)。これまで、アクチン繊維の可視化プローブとして GFP-mTn が広く用いられてきた (Kost et al. 1998)。しかしながら、GFP-mTn の過剰発現体では、細胞質や細胞核におけるバックグラウンド蛍光 (Kost et al. 1998, Hoffmann and Nebenfuhr 2004, Yu et al. 2005, 図 1d)、生育阻害や細胞死 (Sheahan et al. 2004b, Ketelaar et al. 2004b) といったアーティファクトがしばしば報告されてきた。また、talin のアクチン結合領域である I/LWEQ モチーフがアクチン繊維の脱重合因子である ADF (actin depolymerization factor) と競合することにより、アクチン繊維の脱重合を阻害する可能性も指摘されている (Ketelaar et al. 2004)。本研究においても、GFP-Fimbrin と同様の条件下で GFP-mTn を発現する BY-2 の形質転換細胞の作出を試みたが、安定した形質転換体の作出には至らなかった。ごく最近、GFP-mTn を恒常的に発現する BY-2 細胞が報告されたが、これは形質転換材料として液体培養細胞ではなく、カルスを用いた手法によって得られたものである (Yu et al. 2005)。また、mTn 形質転換細胞では若干の増殖率の低下がみられる (Yu et al. 2005)。以上の結果は、GFP-mTn の過剰発現は細胞増殖に悪影響を及ぼす可能性を示唆している。

一方、Fimbrin は真核生物において高度に保存されているアクチン繊維結合タンパク質であ

り、植物では AtFim1 が植物で初めて Fimbrin のホモログとして同定された (McCurdy and Kim, 1998)。AtFim1 には、カルポニンホモロジドメインの二回タンデム構造 (CH/CH'モチーフ; Adams et al. 1991) から成るアクチン繊維結合領域が二箇所 (ABD1, ABD2) あり、そのアクチン繊維結合能は *in vitro* で詳細に調べられている (Kovar et al. 2001)。アクチン繊維可視化における AtFim1 の有用性は、蛍光標識した AtFim1 をムラサキツユクサ雄蕊毛細胞にマイクロインジェクションすることにより、初めて示された (Kovar et al. 2001)。最近、GFP-Fimbrin を発現させたシロイヌナズナやタバコの形質転換体が次々と報告されるようになり (Sheahan et al. 2004a, Sheahan et al. 2004b, Ketelaar et al. 2004, Deeks et al. 2004, Wang et al. 2004b, Voigt et al. 2005a, Voigt et al. 2005b, Tamura et al. 2005)、GFP-Fimbrin はアクチン繊維の可視化ツールとして GFP-mTn に取って代わりつつある (Sheahan et al. 2004b)。シロイヌナズナとタバコの植物体において、形質転換株は野生株と同様の生育を示し、細胞形態においても異常は認められていない (Sheahan et al. 2004a, Sheahan et al. 2004b, Wang et al. 2004b)。本研究で確立した BY-GF11 においても、核や細胞質でバックグラウンド蛍光は検出されず (図 2)、野生株の BY-2 とほぼ同様の増殖率と同調率が確認された。この結果は、BY-GF11 がアクチン繊維の可視化系として利用できるだけでなく、細胞増殖についても GFP-Fimbrin の発現による影響が最小限に抑えられていることを示している。

この BY-GF11 細胞で観察された細胞周期各期におけるアクチン繊維構造は、これまでに報告されている固定染色法による知見とほぼ一致していた (Hasezawa et al. 1991, Hoshino et al. 2003)。しかし、固定染色法では *m*-maleimidobenzoyl *N*-hydroxysuccinimide ester (MBS) 前処理を行わないとしばしば人為的にアクチン繊維が束化するなどの問題点があった (Hasezawa et al. 1989, Sonobe and Shibaoka 1989)。これに対し、BY-GF11 細胞では細胞周期を通して、固定染色法では観察が困難であった非常に細かいアクチン繊維構造に至るまで観察することができた (図 2)。また、BY-GF11 細胞の液胞膜を FM4-64 により生体染色することで、アクチン繊維と液胞構造を同時に観察することができた (図 3,4)。液胞構造は化学固定により完全に崩壊するため (Wilson et al. 1990)、両者の局在は化学固定を要しない本研究の

手法によりはじめて明らかになったものである。このアクチン繊維と液胞構造の関係については第4章で詳述する。

アクチン繊維は紡錘体にはほとんど存在せず、フラグモプラストには多く存在する

BY-GF11 を用いることで、生細胞のアクチン繊維構造を細胞周期を通して観察することができた。分裂期特異的に出現する代表的な細胞内構造として、紡錘体とフラグモプラストが挙げられる。いずれの構造も、微小管が主な構成因子であることが明らかになっているが、アクチン繊維については、その局在について不明確な部分も多い。BY-GF11 細胞の分裂中期には、細胞中央部で分裂装置を取り囲む籠状の繊維構造が観察されたが、分裂装置内では GFP-Fimbrin 蛍光はほとんど観察されず、紡錘体にはアクチン繊維は局在しないと考えられる (図 2k)。同様の結果は、抗体染色やマイクロインジェクション法においても得られている (Cleary et al. 1992, Cleary 1995, Hasezawa and Kumagai 2002)。GFP-mTn を用いたところ、紡錘体で GFP 蛍光が観察されたという報告もあるが (Yu et al. 2005)、明瞭な繊維構造は捉えられておらず、GFP-mTn のバックグラウンドによる一種のアーティファクトと思われる。分裂終期には、フラグモプラスト中に GFP-Fimbrin の蛍光が強くみられた (図 2q)。フラグモプラスト中にアクチン繊維が存在することは様々な植物細胞で広く認められており (Kost and Chua 2002)、本研究でもこれは追認された。

細胞分裂時に表層アクチン繊維の配向はダイナミックに変化する

細胞表層のアクチン繊維に注目すると、G₁ 期～S 期では比較的まばらでランダムに配向していたが (図 2 a,d)、G₂ 期～M 期には密になった (図 2 g,j,m,p)。細胞表層と液胞表層における GFP-Fimbrin の蛍光輝度の解析結果からも、G₁ 期～S 期より G₂ 期～M 期にアクチン繊維が細胞表層に多く出現したことがわかる (図 3,4)。また、G₂ 期には細胞長軸に垂直であった配向が、分裂期に入るとメッシュ状へと著しく変化していた (図 2 g,j)。特に興味深いことに、G₂ 期には細胞中央部で表層アクチン繊維が最も密になっていたのに対して、分裂中期から細胞中央部を挟む一対の密な帯状繊維構造が出現した (図 2 g-l)。これらの観察結果から、特に G₂ 期～M

期において、表層アクチン繊維構造がダイナミックに再編成している可能性が示唆された。そこで、次章では分裂期における表層アクチン繊維の動態解析を行った。

第 2 章 細胞分裂時のアクチン繊維の動態

緒言

高等植物のアクチン繊維はこれまで適切な可視化系が不足していたため、もうひとつの主要な細胞骨格系である微小管に比べ、研究があまり進んでいないのが現状である。例えば、培養細胞を用いた分裂期を通した経時観察は、微小管では 5 年以上前に確立しているのに対し (Hasezawa et al. 2000, Granger and Cyr 2000)、アクチン繊維については本研究がはじめてである。また、微小管についてはすでにさまざまなプローブが充実しており、生細胞内で表層微小管が伸長、短縮、分岐するようすが捉えられ、その動態についての知見は年々蓄積している (Shaw et al. 2003, Ehrhardt 2003, Murata et al. 2005, Chan et al. 2005, Dixit et al. 2005)。これに対し、アクチン繊維の動態についてはほとんど知見が無いと言える。そこで本章では、BY-GF11 細胞によって経時観察が可能になった細胞分裂時の表層アクチン繊維の動態について解析した。

結果

分裂中期に actin microfilament twin peaks (MFTP) が出現する

まず、細胞周期の進行に伴ってダイナミックに変化するアクチン繊維構造の時空間的な解析のため、一細胞における分裂期を通した経時観察を行った。G₂ 期終りから分裂前中期には、細胞中央部に表層アクチン繊維構造が密に存在していたが (図 5 a-c, 矢印)、核膜の崩壊とほぼ同時に表層繊維が一对の密な構造に変化していった (図 5 d)。この一对の密な表層繊維構造は分裂後期に入るまで維持され (図 5e,f)、フラグモプラストの出現とほぼ同時にみられなくなった (図 5g-i)。

細胞分裂時の表層繊維構造の変化をより詳細に調べるため、G₂ 期～M 期の細胞表層部の蛍光輝度プロファイルを経時的に作成した。その結果、G₂ 期終りには GFP-Fimbrin の蛍光輝度のピークが細胞中央部にみられたが、分裂前中期にかけてこのピークは徐々に分離していき、分裂中期になると細胞中央部を挟むような GFP-Fimbrin の二つのピークが出現した (図 6 a-l)。

そこで、この分裂中期に出現する一対の密な表層繊維構造を **actin microfilament twin peaks (MFTP)** と名付けた。また、MFTP は BY-GF 11 以外の形質転換細胞株である BY-GF8 やローダミン・ファロイジン染色した BY-2 野生株においても確認された (図 6m·r)。

MFTP が形成される過程ではアクチン繊維は速くしなやかに動く

MFTP 構造の形成過程をより詳細に検討するため、CLSM を用いて表層繊維構造の経時観察を行った。その結果、G₂期の細胞長軸に垂直であった繊維構造がメッシュ状のMFTPへと再編成していくことがわかった (図7)。この観察結果から、G₂期~M期にアクチン繊維がダイナミックに動いている可能性が考えられた。そこで、より時間分解能の高い観察を行うべく、冷却CCDカメラを用いたストリーミング撮影を試みた。ストリーミング撮影は励起光を照射しつづけ、得られた蛍光を継続的に捉える手法であり、時間分解能の高い動画像を得ることができる。様々な条件検討を行った結果、1フレーム300ミリ秒露光で90秒間撮影する方法で、アクチン繊維の動きをよく捉えることができた。G₂期終りの表層繊維を観察したところ、非常に速くしなやかに動いていることがわかった (図8a, supplemental movie 1)。この表層繊維の動きを、画像相関法を用いて定量したところ (材料と方法を参照)、G₂期終りの表層繊維は分裂中期のそれよりも、約2倍動いていることがわかった (図9a,b)。さらに、ミオシンATPase阻害剤である 2,3-butanedion monoxime (BDM) で処理した細胞では、アクチン繊維の動きはほぼ完全に阻害されたことから、ミオシン依存的にアクチン繊維が動いていることが示唆された (図8b, 図9a,b)。

表層アクチン繊維は素早く屈曲する

上述のように詳細にアクチン繊維の動きを解析した結果、しばしば繊維が屈曲し、飛び移るような動きが観察された (図 8a)。このようなアクチン繊維の動きや移動は MFTP 形成の素過程である可能性が考えられた。そこで、図 10a に示したようにアクチン繊維の屈曲角度 θ_1 、 θ_2 を定義し、これを 300 ミリ秒ごとにプロットした (図 10b)。その結果、屈曲速度は常に一定ではなく、不連続であることがわかった (図 10b)。また、屈曲の速度は細胞ごとのばらつきが

大きかったが、平均して 10 秒間に 20~60 度屈曲した。さらに、観察中にみられた最大屈曲角度を G₂ 期終りと分裂中期について調べたところ、G₂ 期終りのほうが最大屈曲角度が大きく、G₂ 期終りのアクチン繊維の方がよく屈曲することがわかった (図 10c)。

考察

MFTP はアクチン欠失領域(ADZ) を含んだ広義の概念である

アクチン欠失領域 (actin depleted zone; ADZ) は、分裂中期以降に細胞表層の中央部に出現するアクチン繊維が欠失した領域のことを指し、マイクロインジェクション法や固定染色法により 10 年以上前に報告されている (Cleary et al. 1992, Liu and Palevitz 1992, Cleary 1995)。BY-GF11 細胞を観察したところ、分裂中期の細胞中央部における表層アクチン繊維は、疎になっており、これは ADZ の位置と一致していた (図 6,7)。しかし、細胞表層における GFP-Fimbrin の蛍光輝度測定により、(1) 細胞中央部のアクチン繊維は必ずしも欠失しておらず、細胞両端部に比べればむしろ密に存在していたこと、(2) アクチン繊維が疎になっている明確な領域はなく、細胞中央部に近づくにつれてアクチン繊維の密度が減少するという勾配が生じていたこと、を見出した (図 6)。以上の点から、むしろ細胞中央部を挟むように出現する二つの帯状表層繊維構造に注目し、ADZ とは異なる概念として、これを MFTP と呼ぶことにした (Sano et al. 2005)。しかし、MFTP 中央部の谷はまさしく ADZ に相当し、その意味で MFTP は ADZ を含めた広義の概念として、本研究において提唱するものである。また、従来報告の蛍光染色像をよく見直すと、細胞中央部の表層アクチン繊維は必ずしも欠失しておらず、薄く染色されているものも多い (Hasezawa et al. 1991, Valster et al. 1997, Mineyuki 1999, Hoshino et al. 2003)。つまり、本研究の結果はこれまでの知見と矛盾することはなく、むしろより詳細な分裂時のアクチン繊維構造を明らかにしたことで、従来知見を包括する概念を確立したと考えられる。

ミオシン依存的なアクチン繊維の動きによって MFTP が形成される

これまで、ADZ の出現過程について明らかにした報告は無いが、Mineyuki (1999) は G₂

期に細胞中央部の表層アクチン繊維が徐々に欠失して、ADZ が形成される可能性を示唆している。本研究では、細胞表層における GFP-Fimbrin 蛍光が G₂ 期～M 期において徐々に分離していき、MFTP が形成されることを直接的に証明した (図 6)。さらに、表層アクチン繊維を経時的に観察したところ、G₂ 期の細胞長軸に垂直な表層繊維構造がメッシュ状の MFTP へと変化することを見出した (図 7)。これは G₂ 期～M 期に表層繊維が単純に分離するのではなく、配向の変化をともなうアクチン繊維構造の再編成が行われていることが示唆される。

時間分解能を高めた観察の結果、MFTP が形成される過程においてアクチン繊維が屈曲し、飛び移るような動きをみせることを見出した。*in vitro* のアクチン繊維観察系において、ミオシン活性依存的にアクチン繊維が屈曲する運動性を示すことが 20 年以上前に報告されているが (Nagashima and Asakura 1980, Yanagida et al. 1984)、*in vivo* でアクチン繊維が屈曲するようすを捉えた報告は動植物を通じて無く、本研究がはじめてと考えられる。このアクチン繊維の屈曲の機構については *in vitro* の実験系においても未だに不明な点も多いが、アクチン繊維に結合したミオシン ATPase が ATP を分解する際に局所的なアクチン繊維のコンフォメーション変化をもたらすためと考えられている (Hatori et al. 1996)。本研究で見出された屈曲運動も、(1) 屈曲速度が *in vitro* で報告されているものと酷似していること、(2) ミオシン ATPase 阻害剤である BDM によって阻害されたこと (図 9) から、基本的には *in vitro* の実験系と同様の機構によるものと考えられる。また、分裂中期よりも G₂ 期終りの方が表層アクチン繊維が盛んに屈曲することから (図 9)、G₂ 期終りにミオシン活性が亢進されている可能性も考えられ、これを明らかにすることは今後の課題である。

アクチン繊維の動きはそのやわらかな物性に依存する

本章の冒頭でも述べたように、表層微小管に関してはさまざまなプローブを用いて観察がなされ、その構造や動態について多くの知見が蓄積している。しかし、表層アクチン繊維で観察されたような屈曲運動は、表層微小管では観察されていない。これは、両者の物性の違いによるところが大きいと考えられる。微小管の曲げヤング係数 (弾性係数) は $2.1 \times 10^{23} \text{ Nm}^2$ 、アク

チン繊維の曲げヤング係数は $7.3 \times 10^{-26} \text{ Nm}^2$ であり、アクチン繊維は微小管よりも 100 倍以上曲がりやすいことがわかっている (Gittes et al. 1993)。

この物性の違いは、繊維が形成される様式の違いにも関与する可能性が考えられる。微小管を可視化した細胞系では、表層微小管が伸びたり縮んだりするようすを容易に観察することができる (Ehrhardt 2003, Murata et al. 2005, Dhonukshe et al. 2005, Chan et al. 2005, Dixit et al. 2005)。最近、この微小管形成の機構として、既存の微小管上に微小管形成中心である γ -tubulin が結合し、そこから新たな微小管が伸長していくモデルも提唱されている (Murata et al. 2005)。その一方で、アクチン繊維に関しては Arp2/3 複合体と Formin 二量体がアクチン繊維の重合核活性をもつ因子としてシロイヌナズナで同定されたものの (Frank et al. 2004, Inogouff et al. 2005)、細胞内でのアクチン繊維の伸長過程は捉えられていない。GFP-Fimbrin を用いた本研究の観察においても、細胞内におけるアクチン繊維の伸長や脱重合の過程はもちろん、アクチン繊維の明確な端点も観察することはできなかった。これは、一本の微小管は水溶液中で最大で $5200 \mu\text{m}$ まで長くなれるのに対し、一本のアクチン繊維は $17.7 \mu\text{m}$ の長さまでしか維持できない非常に不安定な構造であるためと考えられる (Gittes et al. 1993)。すなわち、微小管のように一本の繊維として細胞質中に存在することがアクチン繊維では困難である。ところが、アクチン繊維が束化すると曲げヤング係数は飛躍的に増して安定化する (Wachsstock et al. 1994)。そのため、新たなアクチン繊維は既存のアクチン繊維に添って伸長して形成され、伸長中のアクチン繊維の端点は既存の繊維にマスクされて観察できなかった可能性も考えられる。アクチン繊維の伸長や脱重合過程の観察には、アクチン繊維のプラス端マーカなどの新たなプローブの開発が必要と考えられる。

第3章 MFTP の分裂面形成における役割

緒言

高等植物の細胞質分裂は、二つの娘核の中央部に円板状に出現する細胞板が遠心的に発達し、既存の細胞壁と癒合することによって完了する (Samuels et al. 1995)。高等植物細胞は一般に運動性を持たないため、分裂面が形成される方向は組織や器官の形成に関して重要である。その例として、根組織の形成が挙げられる。根組織を構成する細胞は根端分裂組織から出現するが、根端分裂組織においては、常に重力方向に対して垂直に分裂面が形成される (Dolan et al. 1993)。この一定の細胞分裂様式が繰り返された結果、根組織は重力方向に整然と並んだ細胞列として構築される。この分裂面が形成される方向の制御機構については、微小管やアクチン繊維が重要な役割を果たすことが知られているが、未解明の部分も多い。本章では、BY-GF11 細胞を用いて細胞板形成におけるアクチン繊維の役割の解明を行った。

結果

MFTP の中央部と分裂面の位置は一致する

MFTP と分裂面との位置関係を調べるため、顕微鏡画像解析を用いて、両者の位置関係の解析を試みた。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 (図 11a,b)。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距離を l_1 ($\geq l_2$) と定義し (図 11c)、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たことから、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)。

分裂面形成まで MFTP は維持される

分裂面が形成されるまでの MFTP の挙動を調べるため、分裂中期から G_1 期初めまでの経時観察を行った。分裂中期には細胞表層部で GFP-Fimbrin の二つのピークが確認されたが (図 12a,b, 0 min)、フラグモプラストが出現して細胞板形成が始まると、MFTP は維持されている

ものの細胞表層全体で蛍光輝度が減少した (図 12a,b, 40 min)。細胞板が細胞壁に完全に癒合して G₁ 期に入ると、MFTP は完全に消失した (図 10a,b, 65 min)。細胞表層の GFP-Fimbrin 蛍光輝度を経時的に測定したところ、分裂中期から終期にかけて細胞表層部の GFP-Fimbrin 蛍光量が減少していることがわかった (図 10c)。以上の結果から、MFTP は分裂中期に完成され、分裂終期の終わりまで MFTP は維持されているものの減衰していくことがわかった。

MFTP 破壊により異常な分裂面が形成される

分裂面形成における MFTP の役割を調べるために、まず、アクチン重合阻害剤を用いて MFTP が形成される時期特異的にアクチン繊維を破壊する実験系の確立を試みた。さまざまな阻害剤を検討した結果、cytochalasin D (CD) が本研究の目的に適していた。まず、アフィディコリンを用いて BY-GF11 細胞を同調培養したところ、アフィディコリン除去後 6-8 時間目に MFTP を持つ細胞が同調的に出現した (図 13c)。そこで、アフィディコリン除去後 6 時間目の細胞懸濁液を CD で処理したところ、その 2 時間後 (アフィディコリン除去後 8 時間目) にはほとんどの細胞でアクチン繊維構造は破壊された (図 13a)。この時点で CD を培地で洗浄して除去すると、さらにその 2-3 時間後 (アフィディコリン除去後 10-11 時間目) にはほとんどの細胞で繊維構造が回復した (図 13a, 図 13e GFP-Fimbrin 6-8 h)。アフィディコリン除去後 11 時間目にはプラグモプラスト出現のピークは過ぎており、ほとんどの細胞で分裂面が形成されていた (図 13c)。また、CD 処理の細胞周期進行への影響はほとんどないことが分裂指数により確かめられた (図 13b)。以上の結果から、アフィディコリン除去後 6-8 時間目に CD をパルス処理することにより、MFTP が形成される時期特異的にアクチン繊維構造を破壊することが可能であると考えた。

そこで、分裂面形成における MFTP の役割を調べるため、コントロール、アフィディコリン除去後 6-11 時間目に CD 処理した場合、6-8 時間目に CD パルス処理した場合、9-11 時間目に CD 処理した場合のそれぞれについて、形成された分裂面の形状をアニリンブルー染色により観察した。その結果、コントロールと 9-11 時間目に CD 処理した場合には平滑な細胞板が観察されたが、6-11 時間目と 6-8 時間目に CD 処理した場合には、いずれも約 25% の細胞で著しく歪んだ細胞板が形成

された(図13d,e)。以上の結果から、MFTPの破壊により分裂面が異常になることが示唆された。

考察

MFTP は分裂面形成を制御する

高等植物細胞の分裂面の決定については、細胞骨格系が重要な役割を担うことが知られている。従来より提唱されてきた分裂面を決定する構造としては、プリプロフェーズバンド (PPB; preprophase band) および ADZ が挙げられる。PPB は表層微小管が細胞核を取り巻くように並んだ帯状の構造であり、G₂ 期終りに出現する。PPB がかつて出現した位置に細胞板が癒合することなどから、PPB は分裂面予定位置を決定する構造であるといわれている。この PPB は分裂中期までに崩壊するが、この時期に PPB が位置していた部位に入れ替わるように ADZ が出現し、ADZ は分裂終期の終わりまで維持されることがわかっている (Hoshino et al. 2003)。このため、ADZ は PPB の位置情報を受け継いでいる可能性があると考えられている。PPB と分裂面の位置が一致することは、微小管の可視化系を用いて直接的に証明されているが (Hoshino et al. 2003)、ADZ と分裂面の関係を直接示した報告は無かった。本研究では、BY-GF11 細胞のアクチン繊維を経時観察することで、分裂面が MFTP の中央部である谷の部分に形成されることを直接的に証明した(図 11、表 1)。また、フラグモプラストが形成されると MFTP は減衰するものの、分裂終期まで維持されることが明らかになった(図 12)。この結果は、ADZ は細胞板が細胞壁に癒合する時期まで維持されるという従来知見とも矛盾せず (Hoshino et al. 2003)、固定細胞でみられた ADZ の挙動よりはるかに微細な MFTP の変化をも捉えることができた。MFTP が減衰する機構は不明であるが、MFTP の減衰時期とフラグモプラストのアクチン繊維の出現時期はよく一致することから、細胞内のアクチン繊維量がほぼ一定に保たれるような機構が存在するため、細胞表層部のアクチン繊維が減少した可能性も考えられる。

また、アフィディコリン同調 6-8 時間目の細胞を CD でパルス処理したところ、歪んだ分裂面をもつ細胞が出現した(図 13)。別のアクチン重合阻害剤である bistheonellide A (BA)を用い

た実験でも、アフィディコリン同調 6-11 時間目のアクチン繊維を破壊すると歪んだ分裂面をもつ細胞が出現することが報告されている (Hoshino et al. 2003)。これらの結果は、MFTP が分裂面の形成に重要な役割を果たすことを明確に示すものと考えられる。

アクチン繊維構造が細胞板を直接的に牽引して分裂面の制御を行うわけではない

以前の報告では、固定染色法とマイクロインジェクション法による観察から、フラグモプラストと分裂面をつなぐアクチン繊維構造が報告されており、このアクチン繊維構造が細胞板を直接的に牽引することで正しい分裂面が形成される可能性が指摘されている (Lloyd and Traas 1988, Valster and Hepler 1997)。しかし、BY-GF11 細胞を用いて観察したところ、類似の構造は見出されたが、(1) 必ずしも分裂面とのみつながっているわけではなく、むしろ分裂面を含む細胞表層のさまざまな部位とつながっていること (図 2q)、(2) 極度に液胞化した細胞ではフラグモプラストと分裂面をつなぐ薄い細胞質領域はみられるものの、アクチン繊維は必ずしもその部位で観察されないこと (data not shown) (3) 大部分の細胞が分裂終期であるアフィディコリン除去 9-11 時間目に CD 処理した場合にはほぼ正常な分裂面が形成されること (図 13) から、分裂終期のアクチン繊維が直接的に細胞板を牽引して分裂面制御を行う可能性は低いと考えられる。また最近、G₂ 期から分裂終期におけるエンドサイトーシスが分裂面決定に重要な役割を果たす可能性が示された (Dhonukshe et al. 2005)。分裂時に細胞表層に出現するアクチン繊維がこのような膜輸送系に関与している可能性は十分にあり、今後は細胞分裂時における膜輸送系とアクチン繊維の相互関係についての検討が必要と考えられる。

第4章 分裂直後の細胞質系再形成におけるアクチン繊維の役割

緒言

前章まで、G₂期終りから細胞分裂時におけるアクチン繊維構造の挙動と役割について詳述した。続いて本章では、細胞分裂が完了した直後のアクチン繊維構造の挙動と動態について解析した。この時期に特徴的な細胞内構造の変化のひとつに細胞質系 (transvacuolar strand) の再形成が挙げられる。細胞質系は分裂期に入るとその数を減少させるが、G₁期初めに形成される (Hasezawa and Kumagai 2002)。細胞質系は明視野顕微鏡でも容易に観察できるため、巨大液胞を貫通する細胞質領域として以前よりその存在が知られていた。しかし、GFP や生体染色試薬を用いた液胞膜の可視化技術の向上により、巨大液胞に陥入した液胞膜構造が存在することが見出され、近年では細胞質系の定義については諸説粉々である。例えば、Uemura ら (2002) は液胞膜マーカーである GFP-AtVam3p を発現したシロイヌナズナを用いて巨大液胞に陥入したシート状の液胞膜構造 (intravacuolar sheet) を見出したが、これを細胞質系と区別していない。一方、Ruthardt ら (2005) はシート状の液胞膜構造からチューブ状の細胞質系が形成される過程を三次元的に解析し、両者を構造的な観点から明確に区別している。いずれにせよ、細胞質系をはじめとする液胞膜構造の維持や動態にアクチン繊維が重要な役割を果たすことが間接的な証拠から示唆されてきたが、適切な観察系が無かったため、両者の関係について不明な点も多かった。そこで、本研究で開発された生細胞における実験観察系を用いて、分裂直後に起こる細胞質系の再形成過程におけるアクチン繊維と液胞膜構造の動態と役割について解析した。

結果

アクチン繊維構造の変化とともに細胞質系が再形成される

G₁期初めの細胞質系の再形成過程におけるアクチン繊維と液胞膜の挙動を調べるために、FM4-64 を用いて液胞膜を生体染色した BY-GF11 細胞を分裂終期から G₁期初めまで経時観察した。分裂終期には、巨大液胞内に形成されていたシート状の液胞膜構造内に若干のアクチン繊

維が観察された (図 14 0 min)。G₁ 期初めになると、娘核は新たに形成された分裂面近傍から細胞中央部へ移動した。また、娘核の移動と並行してシート状の液胞膜構造に添ってアクチン繊維構造が発達していき (図 14 15-25 min 矢じり)、やがて、アクチン繊維で縁取られる細胞質系が出現した (図 14 30 min 矢印)。また、G₁ 期初めの細胞の巨大液胞表層を観察したところ、溝のように陥入した液胞膜構造が観察され、この溝状の液胞膜に添って束化したアクチン繊維が観察された (図 15a, b, c 矢印)。

BA 処理、BDM 処理により細胞質系の再形成と娘核の移動が妨げられた

細胞質系の再形成におけるアクチン・ミオシン系の役割を調べるため、分裂終期でアクチン重合阻害剤である bistheonellide A (BA) もしくはミオシン ATPase 阻害剤である BDM で処理し、アクチン繊維と液胞膜を同時に経時観察した。コントロールでは、観察を開始した分裂終期から 30 分後には娘核の移動と細胞質系の再形成がほぼ完了した (図 14, 図 16c, d)。一方、BA 処理した場合には観察開始時から 30 分経過しても、娘核は細胞板の近傍に位置したまま、細胞質系も再形成されなかった (図 16a, c, d)。また、BDM で処理した場合にも、娘核の移動と細胞質系の再形成は完全に妨げられた (図 16b, c, d)。以上の結果から、G₁ 期初めの娘核の移動と細胞質系の再形成にアクチン・ミオシン系が関与することが示された。

アクチン繊維の破壊と並行して細胞質系が崩壊した

G₁ 期初めに再形成された細胞質系とアクチン繊維の関係をより詳細に検討するため、顕微鏡下で BA 処理し、細胞質系におけるアクチン繊維と液胞膜の構造変化を経時観察した。G₁ 期の細胞では BA 添加前は、巨大液胞を貫通する細胞質系と液胞膜に添ったアクチン繊維が観察された (図 17a 0 min 矢印)。BA を添加したところアクチン繊維構造は短くなっていき、それに伴ない、細胞質系も薄く短くなっていった (図 17a 0-30 min)。BA 添加 45 分後にはアクチン繊維は断片化し、細胞質系はほぼ完全に消失した (図 17a 45 min)。また、細胞質系の崩壊直後に、液胞膜が集積した部位から小胞状の構造が多数出現した (図 17a 45-60 min 矢じり)。アクチン繊維が破壊された細胞の液胞構造を立体構築したところ、これらの小胞状構造は巨大

液胞とは分離していることがわかった (図 17b)。さらに、液胞膜が GFP-AtVam3p により可視化された BY-GV 細胞 (Kutsuna and Hasezawa 2002) を用いて、コントロール、BA を処理した場合、微小管重合阻害剤であるプロピザミドを処理した場合について、細胞質糸をもった細胞と小胞状構造をもった細胞の数を計測した。その結果、コントロールとプロピザミド処理をした場合ではほとんどの細胞で細胞質糸が観察されたが、BA を処理した場合には細胞質糸をもつ細胞の頻度は著しく減少していた (図 17c)。また、コントロールとプロピザミド処理した場合には観察されなかった小胞状構造が、BA 処理の場合のみ高頻度で出現した (図 17d)。同様の結果は、CD によるアクチン繊維破壊時においてもみられた (data not shown)。

細胞質糸と並行してアクチン繊維が動いていた

細胞質糸が高い運動性を示すことは、様々な植物細胞を用いた観察結果から広く認められている (Emans et al. 2002, Uemura et al. 2002, Hoffmann and Nebenfuhr 2004, Ruthardt et al. 2005)。そこで、細胞質糸の動きとアクチン繊維の関係を調べるため、BY-GF11 細胞の細胞質糸とアクチン繊維を同時に観察した。細胞質糸は巨大液胞内を揺れるように動いており、この細胞質糸の動きと並行して、アクチン繊維も細胞質糸を縁取ったまま盛んに動いていた (図 18 矢印, supplemental movie 2)。また、巨大液胞表層において、GFP-Fimbrin の蛍光輝点が観察され、液胞の表層を滑るように動いていた (図 18 矢じり, supplemental movie 2)。以上の観察結果から、細胞質糸の運動を含む液胞膜の短時間の運動にアクチン繊維が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

BA 処理、BDM 処理により液胞膜の運動が阻害された

液胞膜の短時間の動きに対するアクチン繊維の寄与を調べるため、経時観察と画像相関法により液胞の運動性の評価を試みた。コントロールでは、巨大液胞表層と細胞質糸の液胞膜はいずれも盛んに動いていた (図 19a, d, g)。BA 処理によりアクチン繊維を破壊した場合、細胞質糸は消失し (図 19b)、巨大液胞表層の液胞膜の動きは阻害された (図 19e, g)。また、BDM を処理した場合、細胞質糸構造は保たれたが (図 19c)、細胞質糸と巨大液胞表層の液胞膜の動き

は BA 処理した場合とほぼ同程度に、阻害された (図 19f, g)。以上の結果から、液胞膜の短時間の動きにアクチン・ミオシン系が重要な役割を果たすことが示された。

考察

BY-GF11 細胞の FM4-64 染色によりアクチン繊維と液胞膜構造を同時に経時観察して解析することが可能になった

巨大液胞は高等植物の細胞体積の大半を占める巨大なオルガネラである。液胞内腔のイオン環境は細胞質の場合と大幅に異なり、細胞質の恒常性維持のためのバッファーとして機能している(Wink 1993, Marty 1999)。また、液胞の崩壊は細胞死に直結することが広く認められており(Obara et al. 2001, Hatsugai et al. 2004)、液胞は「内なる外」としての側面を持つ(Lam 2005)。そのため、生命活動を反映した細胞質の動きや形態形成を考える上で、液胞膜構造の制御は細胞膜構造の制御と同様に重要である。そこで本章では、アクチン繊維の液胞膜構造への関与について詳しく検討した。両者の関係については、間接的な証拠が幾つか報告されている。例えば、単量体アクチン結合タンパク質である *profilin* をムラサキツユクサ雄ずい毛細胞にマイクロインジェクションすると細胞質系が崩壊する (Staiger et al. 1994, Valster et al. 1997)。また、アクチン繊維結合タンパク質である *villin* のホモログである 135-kDa のアクチン繊維束化タンパク質をヒバマタの根毛にマイクロインジェクションすると、アクチン繊維構造と細胞質系が破壊される (Tominaga et al. 2000)。さらに、シロイヌナズナ表皮細胞の液胞膜の運動がアクチン繊維阻害剤により抑えられる (Uemura et al. 2002)。ところが、以上のような知見が得られていたにも関わらず、従来の化学固定を伴うアクチン繊維の可視化系では液胞構造が破壊されるため (Wilson et al. 1990)、アクチン繊維と液胞構造を同時に観察することは不可能であり、両者の関係には不明な点も多かった。Kutsuna ら (2003) により、GFP-AtVam3p とローダミン・ファロイジン染色によってこれらの二重可視化が試みられたが、細胞染色の際に用いる界面活性剤の影響のため、この手法を用いても若干の液胞構造の変形が認められた (Kutsuna et al. 2003)。本研究では、BY-GF11 細胞の液胞膜を FM4-64 で生体染色すること

で、生きた細胞でのアクチン繊維と液胞膜の同時観察を実現した。その結果、液胞膜に隣接したアクチン繊維の局在を見出した (図 3,4)。特に、細胞質糸の中心を貫くというよりは、むしろ細胞質糸を縁取るようなアクチン繊維の局在は、細胞固定や界面活性剤処理を一切要しない本研究の手法によって得られた新知見である。

細胞質糸は巨大液胞に陥入したシート状の液胞膜構造と巨大液胞表層から形成される

G₁ 期初めにおいて、巨大液胞内に陥入したシート状の液胞膜構造からチューブ状の細胞質糸が形成された (図 14)。この結果は Ruthardt ら (2005) の結果と一致するものであったが、本研究では、シート状の液胞膜構造に添ったアクチン繊維は薄く存在し、これが伸長し液胞膜を押し広げるようにしてチューブ状の細胞質糸が形成されることを新たに見出した (図 14)。この結果は液胞膜構造のシートからチューブへの変化にアクチン繊維が重要な役割を担うことを示すものである。また、巨大液胞表層に局在するアクチン繊維が G₁ 期初めには束化し、溝状の液胞膜構造を出現させることを見出した (図 15)。この溝状の液胞膜構造は巨大液胞表層から細胞質糸が形成される過程に見られる中間段階の構造である可能性が考えられる。巨大液胞表層から細胞質糸が再形成される過程については、その制御機構も交え、本章末で議論する (図 20)。

細胞質糸構造の維持にアクチン繊維は必須である

アクチン繊維の崩壊過程における観察結果から、アクチン繊維の崩壊と細胞質糸構造の崩壊が並行して起こることが明らかになった (図 17a)。この結果は、アクチン繊維が細胞質糸構造の維持に必須であることを直接的に証明するものである。また、アクチン繊維を破壊したところ、細胞質糸が崩壊しただけではなく、液胞膜が集積した部位から巨大液胞とは独立した小胞状の構造が出現した (図 17b, d)。同様の小胞状構造は、アクチン繊維を破壊した分裂期の BY-2 細胞 (Kutsuna et al. 2003)、アクチン関連遺伝子 *arp2* を欠損したシロイヌナズナ変異体のトライコーム (Mathur et al. 2003) において報告されている。この小胞状構造は (1) BA 処理前には FM4-64 蛍光は液胞膜に制限されていること (図 17a 0 min)、(2) 小胞状構造の出現は

細胞質系崩壊の直後に起こること (図 17a 45-60 min) から、細胞質系構造が崩壊して生じた、余剰な液胞膜に由来する構造と考えられる。

液胞膜構造の変化にはアクチン・ミオシン系が必須である

BY-GF11 細胞の経時観察から、細胞質系辺縁部と巨大液胞表層に添って動くアクチン繊維が観察された (図 18)。また、BA と BDM のいずれの処理においても、液胞膜の運動は抑制された (図 19e, g)。これらの結果から、液胞膜の運動にはアクチン・ミオシン系が必須であることが明らかになった。また、G₁ 期初めにおける細胞質系の再形成と娘核の移動についても、BA と BDM のいずれの処理でも阻害された (図 16a-c, e)。巨大液胞は細胞体積の大部分を占めるので、娘核を移動させるためには必然的に液胞構造の変化が必要になる。そのため、娘核の移動は細胞質系の再形成と同様に液胞膜構造の変化を反映した現象と考えられる。本研究では、このような液胞膜構造の変化にアクチン・ミオシン系が必要であることが示された。一方、興味深いことに、BDM 処理した場合、アクチン繊維を破壊した場合と異なり細胞質系の構造は保たれた (図 19f, g)。この結果から、ミオシンは液胞膜構造の変化には関与するが、液胞膜構造の維持にはほとんど関与しないと考えられる。以上の結果を踏まえ、図 20 に示した巨大液胞表層からの細胞質系再形成機構の作業仮説について述べる。まず、巨大液胞表層に添ったアクチン繊維はミオシン依存的に動いており、この運動により液胞膜も揺り動かされる (図 20 左)。G₁ 期初めには液胞表層のアクチン繊維が束化され、これがミオシン依存的に液胞膜を押し込むようにして巨大液胞内部へ陥入し、溝状の液胞膜構造が形成される (図 20 中央)。やがて、溝の両側にあたる液胞膜の融合を介して、巨大液胞を貫通する細胞質系が形成される (図 20 右)。ミオシンは形成された細胞質系の動きには必要であるが、その構造の維持には必要ない。

出芽酵母では、液胞とアクチン・ミオシン系のリンカータンパク質として Vac17p が同定されており、これを欠損する変異体では分裂時の液胞の輸送が阻害される (Tang et al. 2003, Ishikawa et al. 2003)。最近、シロイヌナズナにおいてゴルジ体とアクチン繊維のリンカータンパク質として KAM1/MUR3 が同定され、欠損変異体ではゴルジ体の形態異常のほか、アク

チン繊維構造の異常も報告されている (Tamura et al. 2005)。しかし、高等植物の液胞とアクチン繊維とを繋ぐ分子実体については未だに明らかではなく、今後の重要な課題のひとつと考えられる。

総括

本研究では、GFP-Fimbrin によってアクチン繊維を可視化した BY-2 細胞の形質転換細胞系を確立し、アクチン繊維の観察に最も適した細胞株を BY-GF11 と名付けた。この BY-GF11 細胞を用いて、細胞分裂期を通じたアクチン繊維構造の変化を経時観察することにはじめて成功した。CLSM による詳細なアクチン繊維構造の観察と画像解析技術を駆使し、分裂中期に出現する一対の表層アクチン繊維構造 MFTP を見出した。冷却 CCD カメラを用いて時間分解能を高めた観察の結果、MFTP の形成過程でアクチン繊維が屈曲し、飛び移るといったアクチン繊維の特徴的な運動を *in vivo* ではじめて捉えることができた。また、MFTP の分裂面形成における役割を検討した結果、MFTP は分裂面形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、アクチン繊維と液胞膜を同時に経時観察し、分裂直後に起こる細胞質糸の再形成にアクチン-ミオシン系が重要な役割を担うことを見出した。

今後は、G₂ 期終りから分裂期における表層アクチン繊維の動態についてさらに詳細な解析を行うとともに、表層アクチン繊維に関して動きの制御機構や分裂面形成に対する寄与についても明らかにしていきたい。また最近、GFP-tubulin と RFP-Fimbrin による、微小管とアクチン繊維の二重可視化にも成功しつつあり、実現すれば表層アクチン繊維と表層微小管が同時に観察できるため、これらの相互作用を解析するための新たなツールとなることが期待される。

謝辞

本研究の機会を与えて頂きました東京大学新領域創成科学研究科の馳澤盛一郎教授に心から感謝申し上げます。様々な実験技術を丁寧に御指導頂きました東京大学新領域創成科学研究科の佐野俊夫助手に心からお礼申し上げます。CaMV 35S-GFP ベクターを分与して頂きました静岡県立大学の丹羽康夫助手、GFP-mTn のコンストラクトを分与して頂きました筑波大学生命環境科学研究科の加川貴俊助教授と基礎生物学研究所生物進化研究部門の佐藤良勝博士に深くお礼申し上げます。本研究の方針について、ご助言頂きました帝京科学大学バイオサイエンス学科の近藤矩朗教授に感謝致します。投稿論文の方向性について、様々なご助言を頂きました群馬大学教育学部の佐野史助教授に心から感謝致します。アクチンの生化学を基礎からご教授頂きました兵庫県立大学生命理学研究科の園部誠司助教授、理化学研究所植物科学研究センター形態形成研究グループの五十嵐久子博士に心からお礼申し上げます。研究生活を送るにあたり、数々の助言と激励を頂きました東京理科大学ゲノム創薬研究センター細胞シグナル制御部門の賀屋秀隆博士に感謝申し上げます。公私にわたり、さまざまな場面で親身に相談に乗っていただき、また、常に的確な助言を頂きました理化学研究所植物科学研究センター植物免疫研究グループの門田康弘博士に心から感謝申し上げます。本研究の先行研究をなされた長野県佐久農業改良普及センターの星野英正さんに感謝致します。そして、本研究室のメンバーである米田新博士、田中洋子博士、五百城幹英さん、朽名夏麿さん、小田祥久さん、大窪恵美子さん、林朋美さん、半田耕一さんには、最高の研究環境を与えていただきました。心から感謝致します。最後に、陰ながら私を支えてくれた家族と友人に心から感謝致します。本当にありがとうございました。

引用文献

- Abramoff MD, Magelhaes PJ and Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, volume 11, issue 7, pp. 36-42
- An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79:568-570
- Basu D, El Assal Sel D, Le J, Mallery EL and Szymanski DB (2004) Interchangeable functions of Arabidopsis PIROGI and the human WAVE complex subunit SRA1 during leaf epidermal development.. *Development* 131:4345-4355
- Blancaflor EB and Hasenstein KH (2000) Methods for detection and identification of F-actin in fixed and permeabilized plant tissues. In: Staiger C, Baluska F, Volkmann P, Barlow P (eds) *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 601-618
- Brembu T, Winge P, Seem M and Bones AM (2004) *NAPP* and *PIRP* encode subunits of a putative Wave regulatory protein complex involved in plant cell morphogenesis. *Plant Cell* 16:2335-2349
- Chan J, Calder G, Fox S and Lloyd C (2005) Localization of the microtubule end binding protein EB1 reveals alternative pathways of spindle development in Arabidopsis suspension cells. *Plant Cell* 17:1737-1748
- Cheung AY and Wu HM (2004) Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell* 16:257-269
- Cleary A.L, Gunning BES, Wasteneys GO and Hepler PK (1992) Microtubule and F-actin dynamics at the division site in living *Tradescantia* stamen hair cells. *J Cell Sci* 103:977-988
- Cleary AL (1995) F-actin redistributions at the division site in living *Tradescantia* stomatal complexes as revealed by microinjection of rhodamine-phalloidin. *Protoplasma* 185:152-165
- Deeks MJ, Kaloriti D, Davies B, Malho R and Hussey PJ (2004) Arabidopsis NAP1 Is Essential for Arp2/3-Dependent Trichome Morphogenesis. *Curr Biol* 14:1410-1414
- Dhonukshe P, Mathur J, Hulskamp M and Gadella TW Jr (2005) Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biol* in press.
- Dixit R, Chang E and Cyr R (2005) Establishment of Polarity during Organization of the Acentrosomal Plant Cortical Microtubule Array. *Mol Biol Cell* in press.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K and Scheres B (1993) Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* 119:71-84
- Ehrhardt D (2003) GFP technology for live cell imaging. *Curr Opin Plant Biol* 6:622-628
- Eleftheriou EP and Palevitz BA (1992) The effect of cytochalasin D on preprophase band organization in root tip cells of Allium. *J Cell Sci* 103:989-998
- Emans N, Zimmermann S and Fischer R (2002) Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive

to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell* 14:71-86

Frank M, Egile C, Dyachok J, Djakovic S, Nolasco M, Li R and Smith LG (2004) Activation of Arp2/3 complex-dependent actin polymerization by plant proteins distantly related to Scar/WAVE. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16379-16384

Fu Y, Li H and Yang Z (2002) The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis. *Plant Cell* 14:777-794

Fukuda H, and Kobayashi H (1989). Dynamic organization of the cytoskeleton during tracheary-element differentiation. *Dev Growth Differ* 31:9-16

Gittes F, Mickey B, Nettleton J and Howard J (1993) Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* 120:923-934

Granger CL and Cyr RJ (2000) Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. *Planta* 210:502-509

Grolig F and Pierson ES (2000) Cytoplasmic streaming: from flow to track. In: Staiger C, Baluska F, Volkmann P, Barlow P (eds) Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 165-190

Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S and Yang Z (2005) A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol* 169:127-138

Hasezawa S, Hogetsu T and Syono K (1989) Changes of actin filaments and cellulose fibrils in elongating cells derived from tobacco protoplasts. *J Plant Physiol* 134:115-119

Hasezawa S and Kumagai F (2002) Dynamic changes and the role of the cytoskeleton during the cell cycle in higher plant cells. *Int Rev Cytol* 214:161-191

Hasezawa S, Marc J and Palevitz BA (1991) Microtubule reorganization during the cell cycle in synchronized BY-2 tobacco suspensions. *Cell Motil Cytoskeleton* 18:94-106

Hasezawa S, Ueda K and Kumagai F (2000) Time-sequence observations of microtubule dynamics throughout mitosis in living cell suspensions of stable transgenic Arabidopsis: direct evidence for the origin of cortical microtubules at M/G1 interface. *Plant Cell Physiol* 41:244-250

Hatori K, Honda H and Matsuno K (1996) ATP-dependent fluctuations of single actin filaments in vitro. *Biophys Chem* 58:267-272

Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M and Hara Nishimura I (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305:855-858

Hepler PK, Vidali L and Cheung AY (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:159-187

Higaki T, Kutsuna N, Okubo E, Sano T, and Hasezawa S Actin microfilaments regulate vacuolar

structures and dynamics: dual observation of actin microfilaments and vacuolar membrane in living tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* submitted.

Hoffmann A and Nebenführ A (2004) Dynamic rearrangements of transvacuolar strands in BY-2 cells imply a role of myosin in remodeling the plant actin cytoskeleton. *Protoplasma* 224:201-210

Hoshino H, Yoneda A, Kumagai F and Hasezawa S (2003) Roles of actin-depleted zone and preprophase band in determining the division site of higher-plant cells, a tobacco BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Protoplasma* 222:157-165

Hwang JU, Gu Y, Lee YJ and Yang Z (2005) Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes. *Mol Biol Cell* 16:5385-5399

Ingouff M, Gerald JN, Guerin C, Robert H and Sorensen MB, (2005) Damme DV, Geelen D, Blanchoin L, Berger F: Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis.. *Nat Cell Biol* 7:374-380

Ishikawa K, Catlett NL, Novak JL, Tang F, Nau JJ and Weisman LS (2003) Identification of an organelle-specific myosin V receptor. *J Cell Biol* 160:887-897

Jedd G and Chua NH (2002) Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals acto-myosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. *Plant Cell Physiol* 43:384-392

Ketelaar T, Anthony RG and Hussey PJ (2004) Green fluorescent protein-mTalin causes defects in actin organization and cell expansion in Arabidopsis and inhibits actin depolymerizing factor's actin depolymerizing activity in vitro. *Plant Physiol* 136:3990-3998

Kobayashi H, Fukuda H, and Shibaoka H (1987). Reorganization of actin filaments associated with the differentiation of tracheary elements in *Zinnia* mesophyll cells. *Protoplasma* 138:69-71

Kost B and Chua NH (2002) The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell* 108:9-12

Kost B, Spielhofer P and Chua NH (1998) A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and visualize the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J* 16:393-401

Kovar DR, Gibbon BC, McCurdy DW and Staiger CJ (2001) Fluorescently-labeled fimbrin decorates a dynamic actin filament network in live plant cells. *Planta* 213:390-395

Kutsuna N and Hasezawa S (2002) Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 43:965-973

Kutsuna N and Hasezawa S (2005) Morphometrical study of plant vacuolar dynamics in single cells using three-dimensional reconstruction from optical sections. *Microsc Res Tech* 68:296-306

Kutsuna N, Kumagai F, Sato MH and Hasezawa S (2003) Three-dimensional reconstruction of tubular structures of vacuolar membrane throughout mitosis in living tobacco cells. *Plant Cell Physiol*. 44:1045-1054

Lam E (2005) Vacuolar proteases livening up programmed cell death. *Trends Cell Biol* 15:124-127

- Li S, Blanchoin L, Yang Z and Lord EM (2003) The putative Arabidopsis arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiol* 132:2034-2044
- Linsmaier EM and Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18:100-127
- Liu B and Palevitz BA (1992) Organization of cortical microfilaments in dividing root cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 23:252-264
- Lloyd and Traas (1988) The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. Drug studies. *Development* 102:211-221
- Marty F (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* 11:587-600
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B and Hulskamp M (2003) Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. *Plant Cell* 15:1632-1645
- Mathur J, Spielhofer P, Kost B and Chua NH (1999) The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 126:5559-5568
- McCurdy DW and Kim M. (1998) Molecular cloning of a novel fimbrin-like cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 36:23-31
- Mineyuki, Y. (1999) The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int Rev Cytol* 187:1-49
- Mineyuki Y and Palvitz BA (1990) Relationship between preprophase band organization, F-actin and the division site in Allium. Fluorescence and morphometric studies on cytochalasin treated cells. *J Cell Sci* 97:283-295
- Murata T, Sonobe S, Baskin TI, Hyodo S, Hasezawa S, Nagata T, Horio T and Hasebe M (2005) Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol* 7:961-968
- Nagashima H and Asakura S (1980) Dark-field light microscopic study of the flexibility of F-actin complexes. *J Mol Biol* 136:169-182
- Nagata T, Nemoto Y and Haswzawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132:1-30
- Obara K, Kuriyama H and Fukuda H (2001) Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiol* 125:615-626
- Pollard TD and Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465
- Ruthardt N, Gulde N, Spiegel H, Fischer R and Emans N (2005) Four-dimensional imaging of transvacuolar strand dynamics in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 225:205-215

- Sano T, Higaki T, Oda Y, Hayashi T and Hasezawa S (2005) Appearance of actin microfilament 'twin peaks' in mitosis and their function in cell plate formation, as visualized in tobacco BY-2 cells expressing GFP-Fimbrin. *Plant J* 44:595-605
- Samaj J, Read ND, Volkmann D, Menzel D and Baluska F (2005) The endocytic network in plants. *Trends Cell Biol* 15:425-433
- Samuels AL, Giddings TH Jr and Staehelin LA (1995) Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *J Cell Biol* 130:1345-1357
- Schmit AC and Lambert AM (1990) Microinjected fluorescent phalloidin in vivo reveals the F-actin dynamics and assembly in higher plant mitotic cells. *Plant Cell* 2:129-138
- Shaw SL, Kamyar R and Ehrhardt DW (2003) Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science* 300:1715-1718
- Sheahan M.B, Rose RJ and McCurdy DW (2004a) Organelle inheritance in plant cell division: the actin cytoskeleton is required for unbiased inheritance of chloroplasts, mitochondria and endoplasmic reticulum in dividing protoplasts. *Plant J* 37:379-390
- Sheahan MB, Staiger CJ, Rose RJ and McCurdy DW (2004b) A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of *Arabidopsis* fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiol* 136:3968-3978
- Shimmen T and Yokota E (1994) Physiological and biochemical aspects of cytoplasmic streaming. *Int Rev Cytol* 155:97-139
- Smith LG (2003) Cytoskeletal control of plant cell shape: getting the fine points. *Curr Opin Plant Biol* 6:63-73
- Sonobe S and Shibaoka H (1989) Cortical fine actin microfilaments in higher plant cells visualized by rhodamine-phalloidin after pre-treatment with *m*-maleimidobenzoyl *N*-hydroxysuccinimide ester. *Protoplasma* 148:80-86
- Staiger CJ (2000) Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:257-288
- Staiger CJ, Yuan M, Valenta R, Shaw PJ, Warn RM and Lloyd CW (1994) Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Curr Biol* 4:215-219
- Stoeckel H and Takeda K (2002) Plasmalemmal voltage-activated K(+) currents in protoplasts from tobacco BY-2 cells: possible regulation by actin microfilaments? *Protoplasma* 220:79-87
- Tamura K, Shimada T, Kondo M, Nishimura M and Hara Nishimura I (2005) KATAMARI1/MURUS3 Is a novel golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in Arabidopsis. *Plant Cell* 17:1764-1776
- Tang F, Kauffman EJ, Novak JL, Nau JJ, Catlett NL and Weisman LS (2003) Regulated degradation of

a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature* 422:87-92

Tominaga M, Yokota E, Vidali L, Sonobe S, Hepler PK and Shimmen T (2000) The role of plant villin in the organization of the actin cytoskeleton, cytoplasmic streaming and the architecture of the transvacuolar strand in root hair cells of *Hydrocharis*. *Planta* 210:836-843

Ueda K and Matsuyama T (2000) Rearrangement of cortical microtubules from transverse to oblique or longitudinal in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 213: 28-38

Uemura T, Yoshimura SH, Takeyasu K and Sato MH (2002) Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells* 7:743-753

Valster AH and Hepler PK (1997) Caffeine inhibition of cytokinesis: effect on the phragmoplast cytoskeleton in living *Tradescantia* stamen hair cells. *Protoplasma* 196:155-166

Valster AH, Pierson ES, Valenta R, Hepler PK and Emons A (1997) Probing the plant actin cytoskeleton during cytokinesis and interphase by profilin microinjection. *Plant Cell* 9:1815-1824

Vicha S, Baluska F, Jasik J, Volkman D and Barlow PW (2000) Methods for detection and identification of F-actin in fixed and permeabilized plant tissues. In: Staiger C, Baluska F, Volkman P, Barlow P (eds) *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 619-636

Voigt B, Timmers AC, Samaj J, Muller J, Baluska F and Menzel D (2005a) GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *Eur J Cell Biol* 84:595-608

Voigt B, Timmers AC, Samaj J, Hlavacka A, Ueda T, Preuss M, Nielsen E, Mathur J, Emans N, Stenmark H, Nakano A, Baluska F and Menzel D (2005b) Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs. *Eur J Cell Biol* 84:609-621

Wachsstock DH, Schwarz WH and Pollard TD (1994) Cross-linker dynamics determine the mechanical properties of actin gels. *Biophys J* 66:801-809

Wang YF, Fan LM, Zhang WZ, Zhang W and Wu WH (2004) Ca²⁺-permeable channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* pollen are regulated by actin microfilaments. *Plant Physiol* 136:3892-3904

Wang YS, Motes CM, Mohamalawari DR and Blancaflor EB (2004) Green fluorescent protein fusions to *Arabidopsis* fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots. *Cell Motil Cytoskeleton* 59:79-93

Wilson TP, Canny MJ, McCully ME and Lefkovitch LP (1990) Breakdown of cytoplasmic vacuoles: A model of endoplasmic membrane rearrangement. *Protoplasma* 155:144-152

Wink M. (1993) The plant vacuole: a multifunctional compartment. *J Exp Bot Suppl* 44:231-246

Yanagida T, Nakase M, Nishiyama K and Oosawa F (1984) Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature* 307:58-60

Yu M, Yuan M and Ren H (2005) Visualization of actin cytoskeletal dynamics during cell cycle of Tobacco BY-2 cells. *Biol Cell in press*.

Zhang D, Wadsworth P and Hepler PK (1993) Dynamics of microfilaments are similar, but distinct from microtubules during cytokinesis in living, dividing plant cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 24:151-155

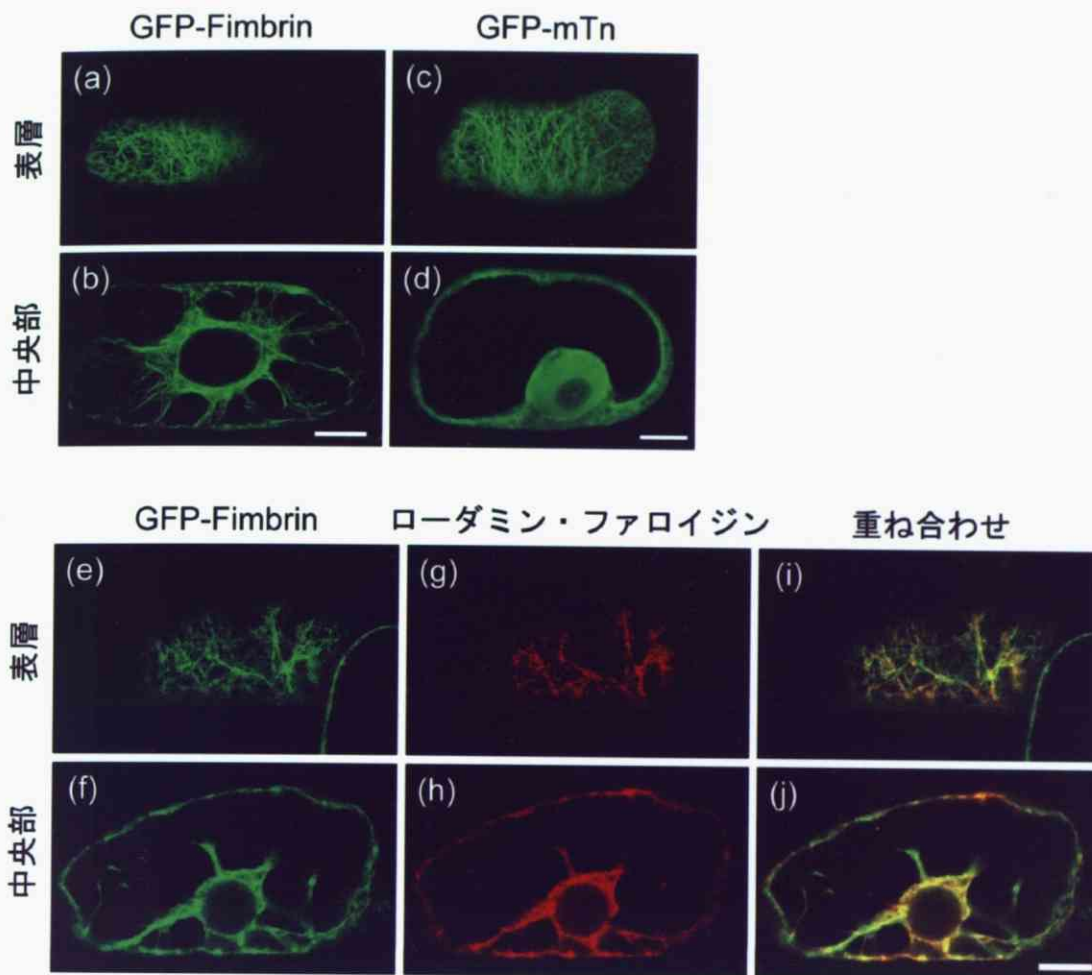


図1 GFP-Fimbrin によるアクチン繊維の可視化

(a,b) GFP-Fimbrin を恒常的に発現した BY-2 の形質転換細胞 (BY-GF11) の細胞表層 (a) と細胞中央部 (b) における GFP 蛍光像。(c,d) GFP-mTn を一過的に発現した BY-2 細胞の細胞表層 (c) と細胞中央部 (d) における GFP 蛍光像。

(e-j) ローダミン・ファロイジン染色した BY-GF11 細胞の細胞表層 (e, g, i) と細胞中央部 (f, h, j) における GFP 蛍光像 (e, f)、ローダミン・ファロイジン染色像 (g, h)、GFP 蛍光像とローダミン・ファロイジン染色像の重ね合わせ (i, j)。 Bar: 10 μ m

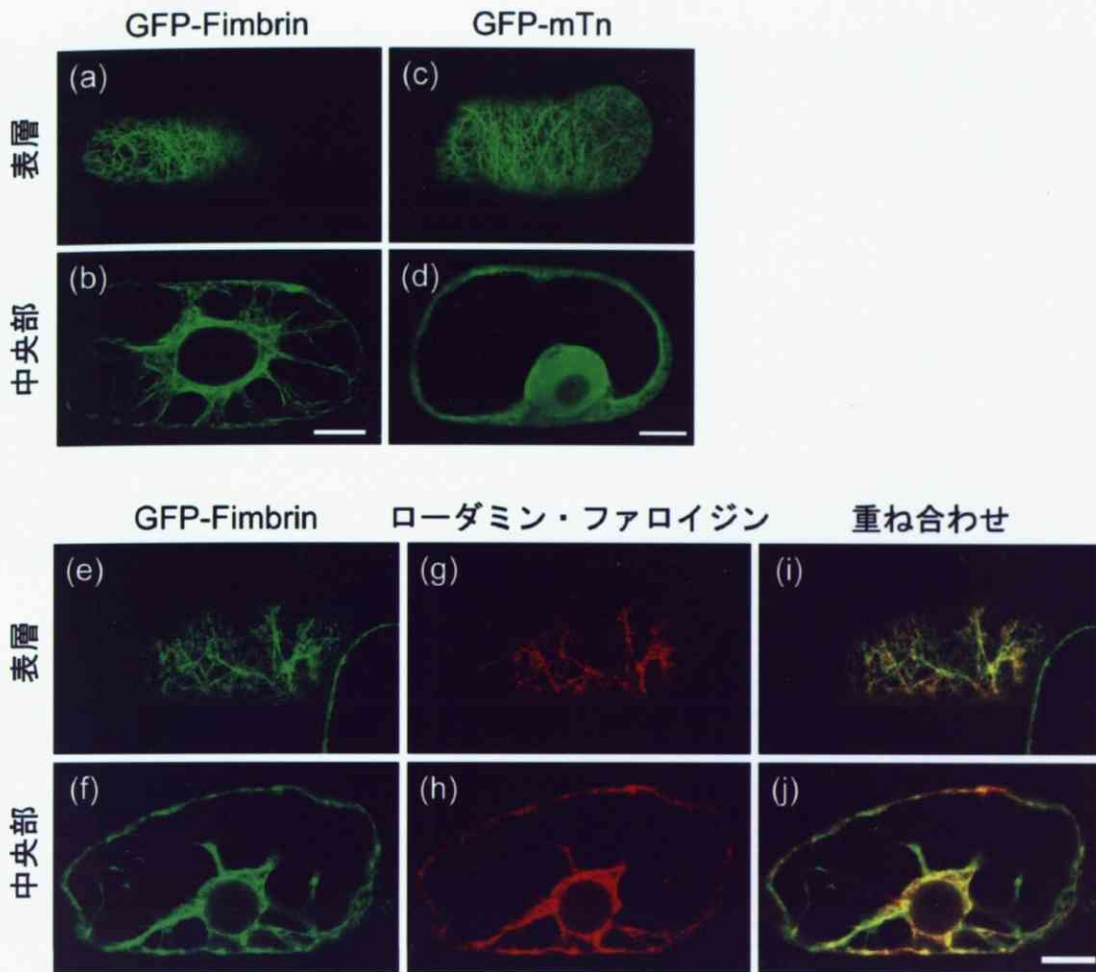


図1 GFP-Fimbrin によるアクチン繊維の可視化

(a,b) GFP-Fimbrin を恒常的に発現した BY-2 の形質転換細胞 (BY-GF11) の細胞表層 (a) と細胞中央部 (b) における GFP 蛍光像。(c,d) GFP-mTn を一過的に発現した BY-2 細胞の細胞表層 (c) と細胞中央部 (d) における GFP 蛍光像。

(e-j) ローダミン・ファロイジン染色した BY-GF11 細胞の細胞表層 (e, g, i) と細胞中央部 (f, h, j) における GFP 蛍光像 (e, f)、ローダミン・ファロイジン染色像 (g, h)、GFP 蛍光像とローダミン・ファロイジン染色像の重ね合わせ (i, j)。 Bar: 10 μ m

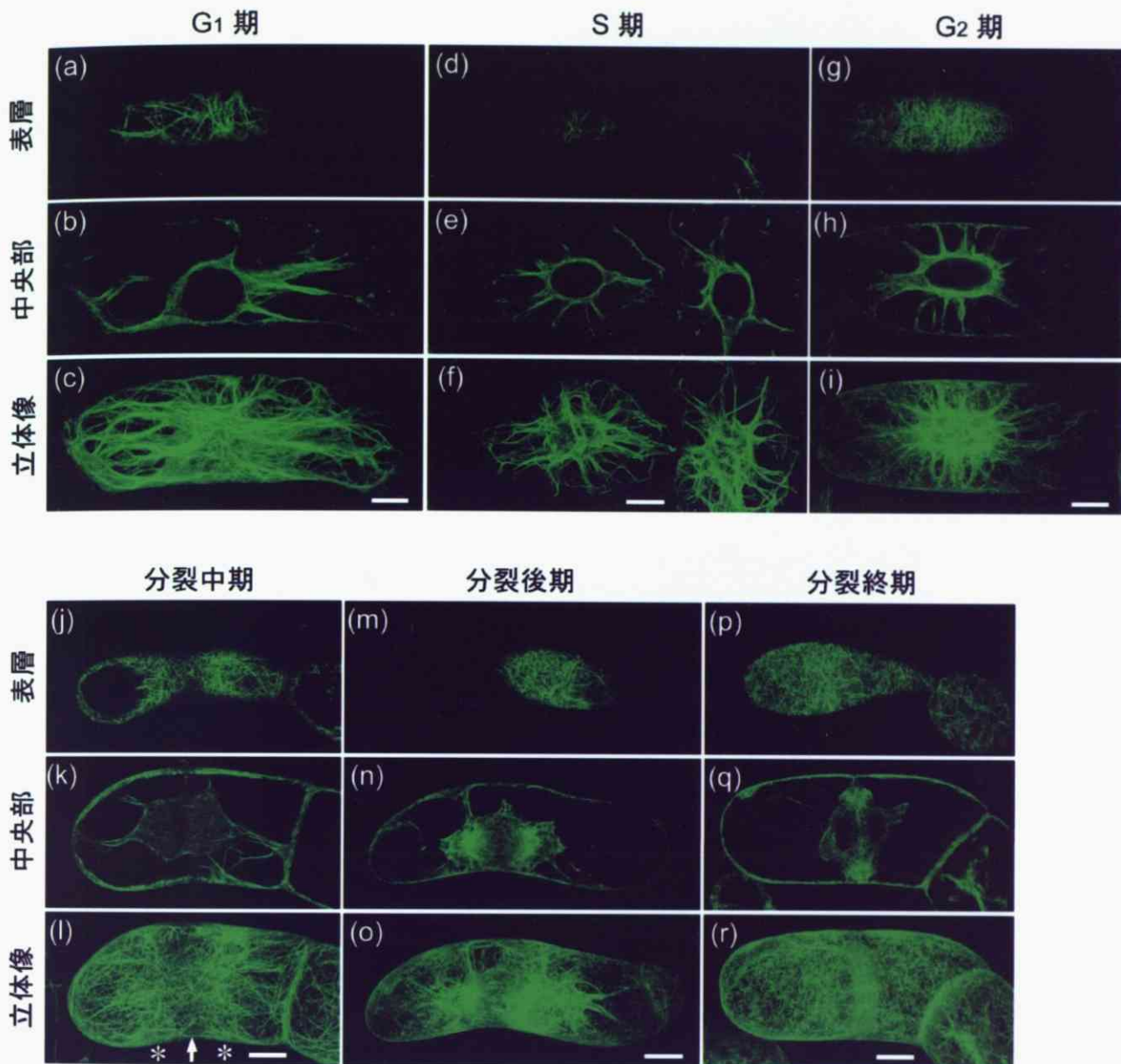


図2 細胞周期の進行にともなうアクチン繊維の動態

G₁ 期 (a-c)、S 期 (d-f)、G₂ 期 (g-i)、分裂中期 (j-l)、分裂後期 (m-o)、分裂終期 (p-r) の BY-GF11 細胞の GFP 像を示す。a, d, g, j, m, p は細胞表層部の光学切片像、b, e, h, k, n, q は細胞中央部の光学切片像、c, f, i, l, o, r は立体像を示す。l の * は一対の密な繊維状構造、矢印は細胞中央部を示す。 Bars: 10 μm

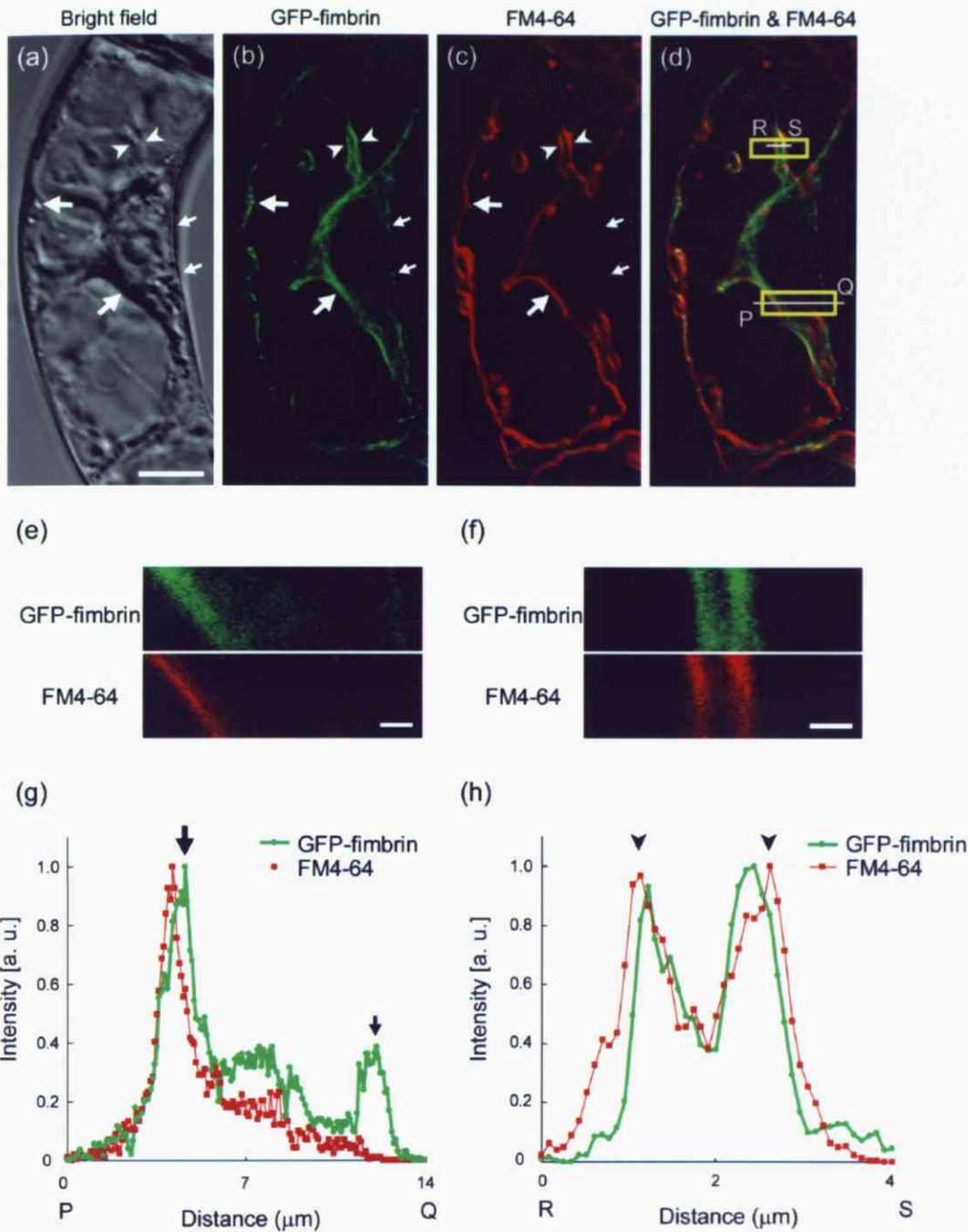


図3 G_1 期におけるアクチン繊維と液胞膜の局在

G_1 期のBY-GF11細胞の液胞膜をFM4-64により染色し、アクチン繊維の細胞内局在を詳細に検討した。(a) 明視野像、(b) GFP-Fimbrin像、(c) FM4-64像、(d) GFP-Fimbrin像とFM4-64像の重ね合わせ像。Bar:10 μm (e) dにおける大きい四角の拡大図、(f) dにおける小さい四角の拡大図。Bars: 2 μm (g) dにおける線分PQ(液胞表層と細胞表層の横断線)上のGFP-FimbrinとFM4-64の蛍光輝度プロファイル、(h) dにおける線分RS(細胞質糸の横断線)上の蛍光輝度プロファイル。小矢印、大矢印、矢じりはそれぞれ細胞表層、巨大液胞表層、細胞質糸の縁を示す。

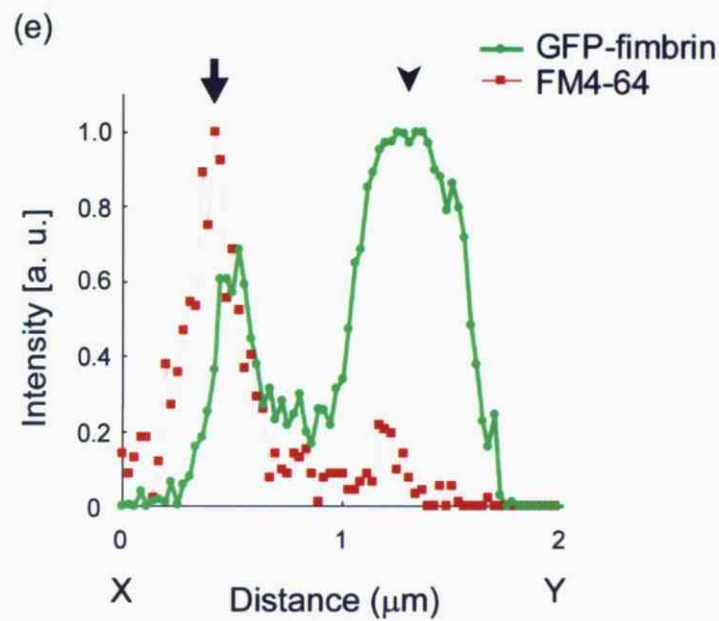
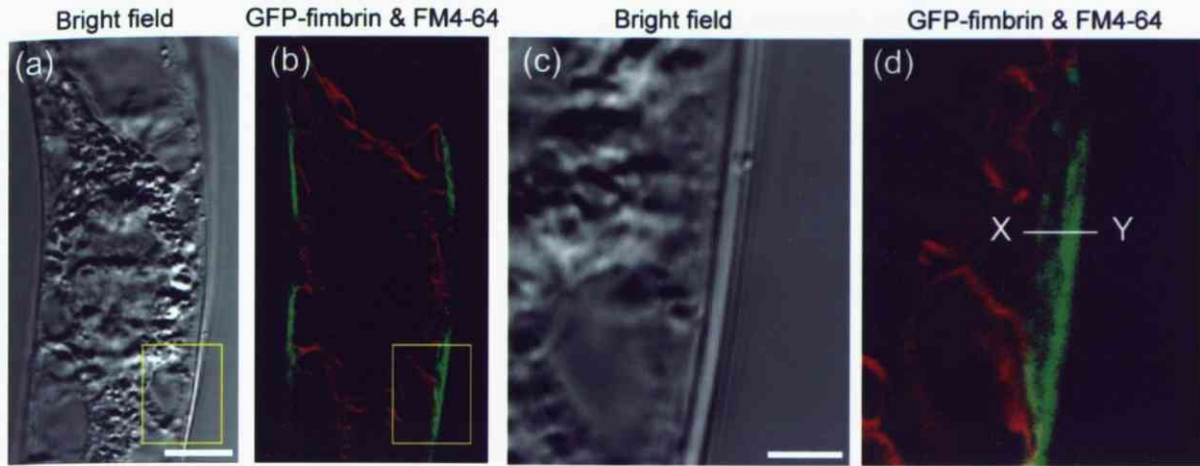


図4 分裂中期におけるアクチン繊維と液胞膜の局在

分裂中期のBY-GF11細胞の液胞膜をFM4-64により染色し、アクチン繊維の細胞内局在を詳細に検討した。(a)明視野像、(b) GFP-Fimbrin像とFM4-64像の重ね合わせ像。 Bar:10 μm (c) aにおける四角の拡大図、(d) bにおける四角の拡大図。 Bar:2 μm (e) dにおける線分XY(液胞表層と細胞表層の横断線)上のGFP-FimbrinとFM4-64の蛍光輝度プロファイル。矢印は巨大液胞表層、矢じりは細胞表層を示す。

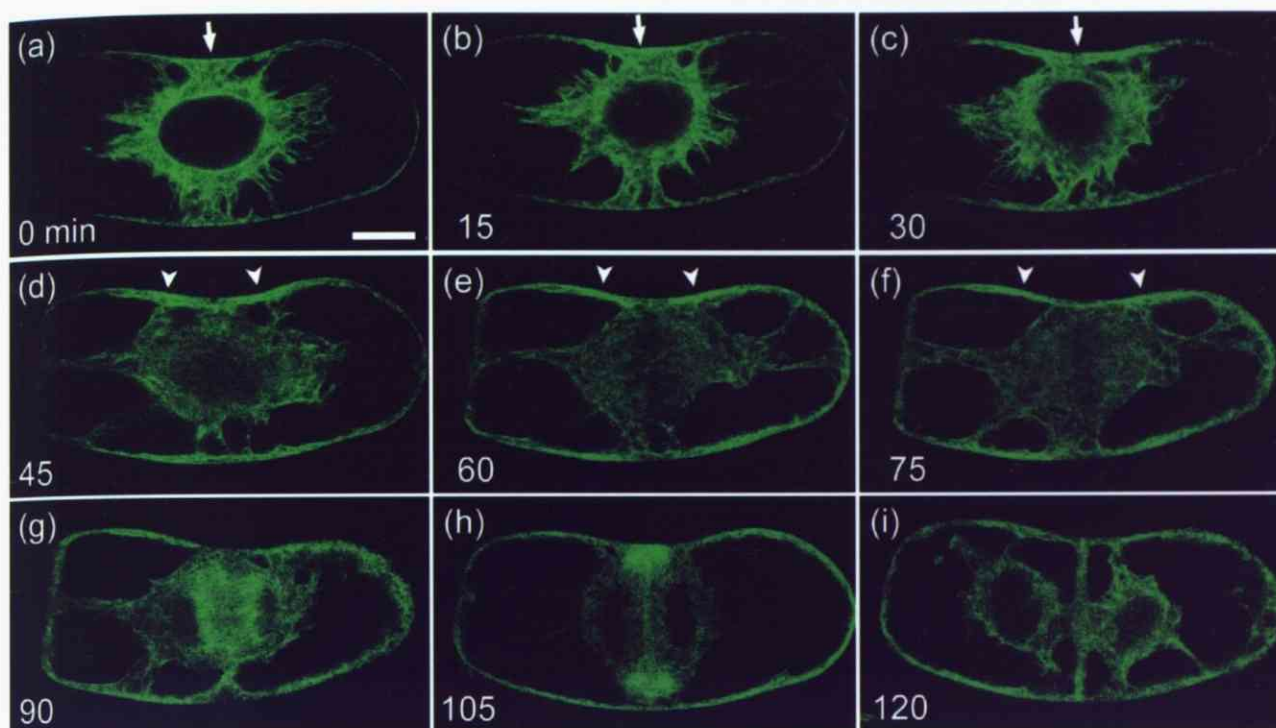


図5 細胞分裂時のアクチン繊維構造の動態

BY-GF11 細胞を用いて分裂期を通したアクチン繊維構造の変化を 15 分毎に観察した。細胞周期は G_2 期終り (a, 0 min)、分裂前期 (b, 15 min)、分裂前中期 (c,d, 30-45 min)、分裂中期 (e,f, 60-75 min)、分裂後期 (g, 90 min)、分裂終期 (h, 105 min)、 G_1 期初め (i, 120 min) と進行した。矢印は細胞中央部を、矢じりは一対の密な表層繊維構造を示す。Bar:10 μm

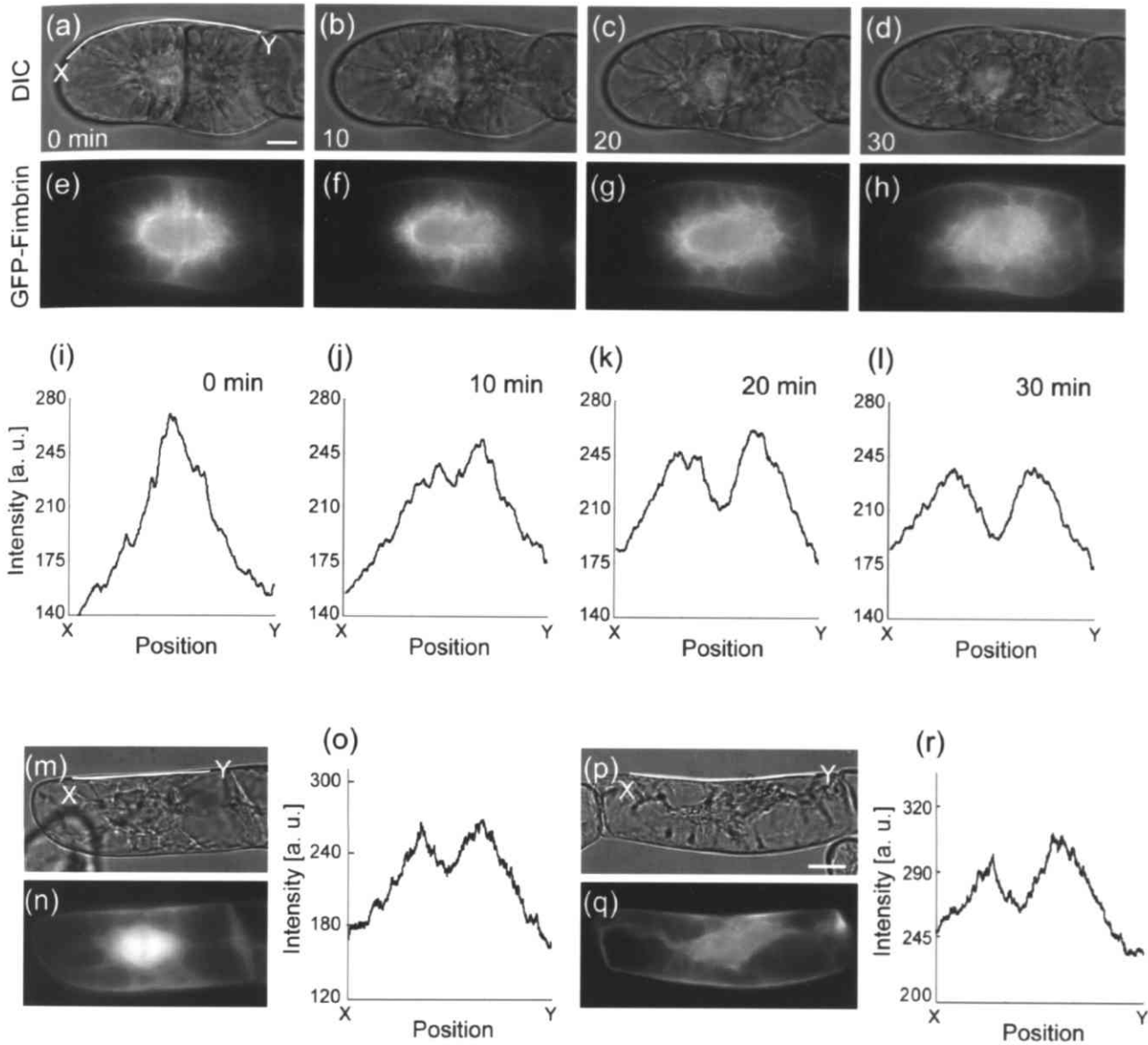


図6 G_2 期～M期中期の細胞表層部における GFP-Fimbrin 蛍光輝度プロファイルの変化

BY-GF11 細胞の G_2 期終り (a,e, 0 min)、分裂前期 (b,f, 10 min) 分裂前中期 (c,g, 20 min)、分裂中期 (d,h, 30 min) における DIC 像 (a-d) と GFP-Fimbrin 蛍光像 (e-h)。(i-l) a の線分 XY (細胞表層部) における GFP-Fimbrin 蛍光輝度プロファイルの時間変化。 G_2 期終りには細胞中央部にひとつのピークがみられたが (i, 0 min)、徐々に分離し (j,k, 10-20 min)、分裂中期には MFTP が出現した (l, 30 min)。

BY-GF8 細胞の分裂中期における DIC 像 (m)、GFP-Fimbrin 蛍光像 (n)、線分 XY (細胞表層部) における GFP-Fimbrin 蛍光輝度プロファイル (o)。

ローダミン・ファロイジン染色した BY-2 細胞の分裂中期における DIC 像 (p)、ローダミン・ファロイジン蛍光像 (q)、線分 XY (細胞表層部) におけるローダミン・ファロイジン蛍光輝度プロファイル (r)。Bars: 10 μ m

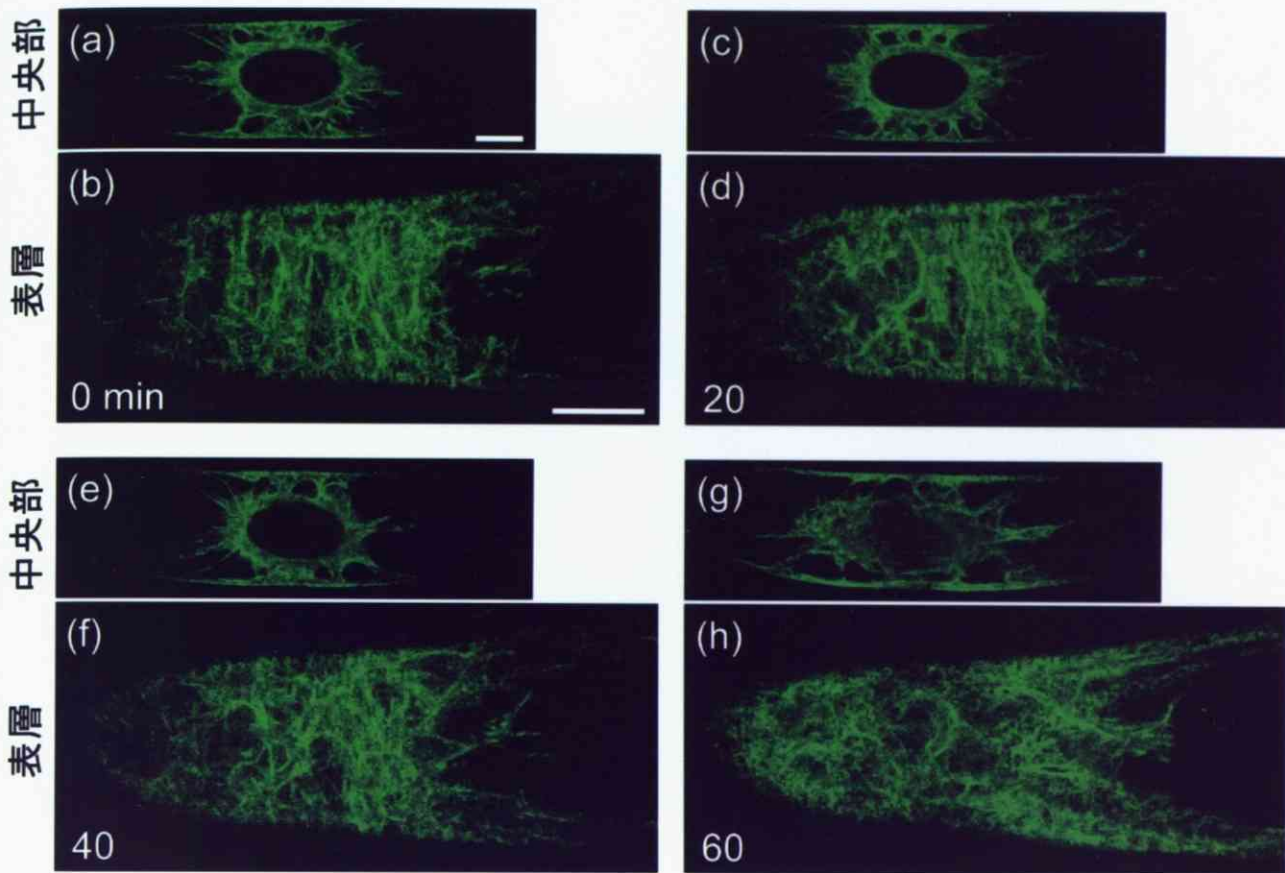
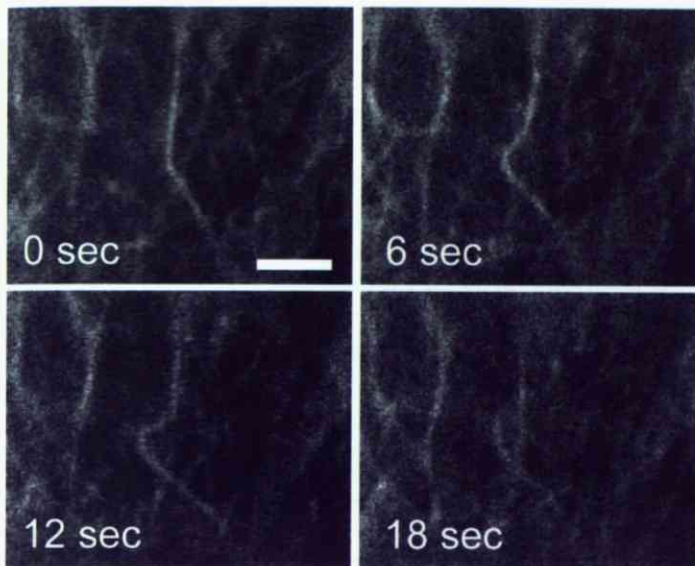


図7 G_2 期～M期の細胞表層部におけるアクチン繊維構造の変化

G_2 期 (a,b, 0-20 min) から分裂中期 (g,h, 60 min) までのアクチン繊維構造の変化を20分毎に観察した。(a, c, e, g) 細胞中央部における GFP-Fimbrin 像、(b, d, f, h) 細胞表層部における GFP-Fimbrin 像。Bar:10 μ m

(a)



(b)

0 sec + 6 sec + 12 sec

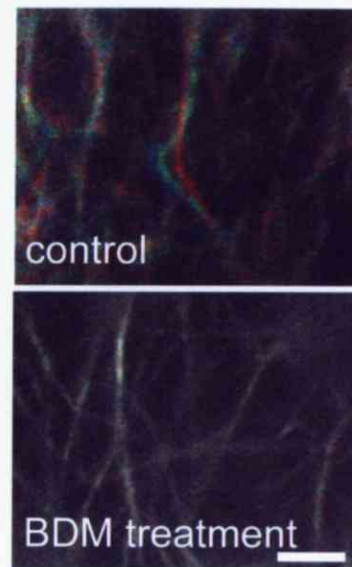


図8 表層アクチン繊維の屈曲運動

(a) G_2 期終りの BY-GF11 細胞の表層アクチン繊維を 6 秒毎に観察した。(b) コントロール (上図)、BDM 処理した場合 (下図) における 6 秒毎に得た表層アクチン繊維の画像 (赤; 0 sec、青; 6 sec、緑; 12 sec) の重ね合わせ。動いた繊維には色が付き、動かない繊維は白く表示されることで識別される。 Bar:2 μm

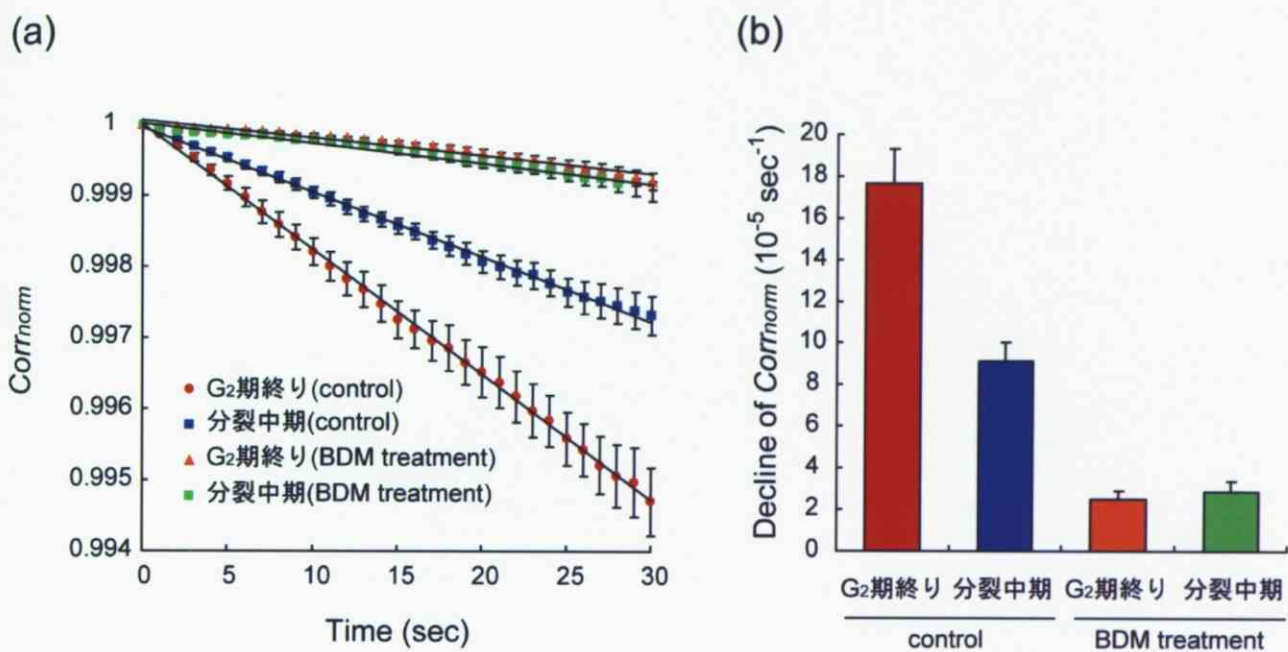


図9 画像相関法による表層アクチン繊維の動きの定量解析

(a) G₂期終り、分裂中期、G₂期終り (BDM 処理)、分裂中期 (BDM 処理) における表層アクチン繊維の顕微鏡画像に対する正規化相関係数($Corr_{norm}$; 材料と方法を参照)の経時変化。(b) a から得られた近似曲線の傾き。アクチン繊維がよく動くほど $Corr_{norm}$ の減少速度は大きくなる。Bar:SE, n=10

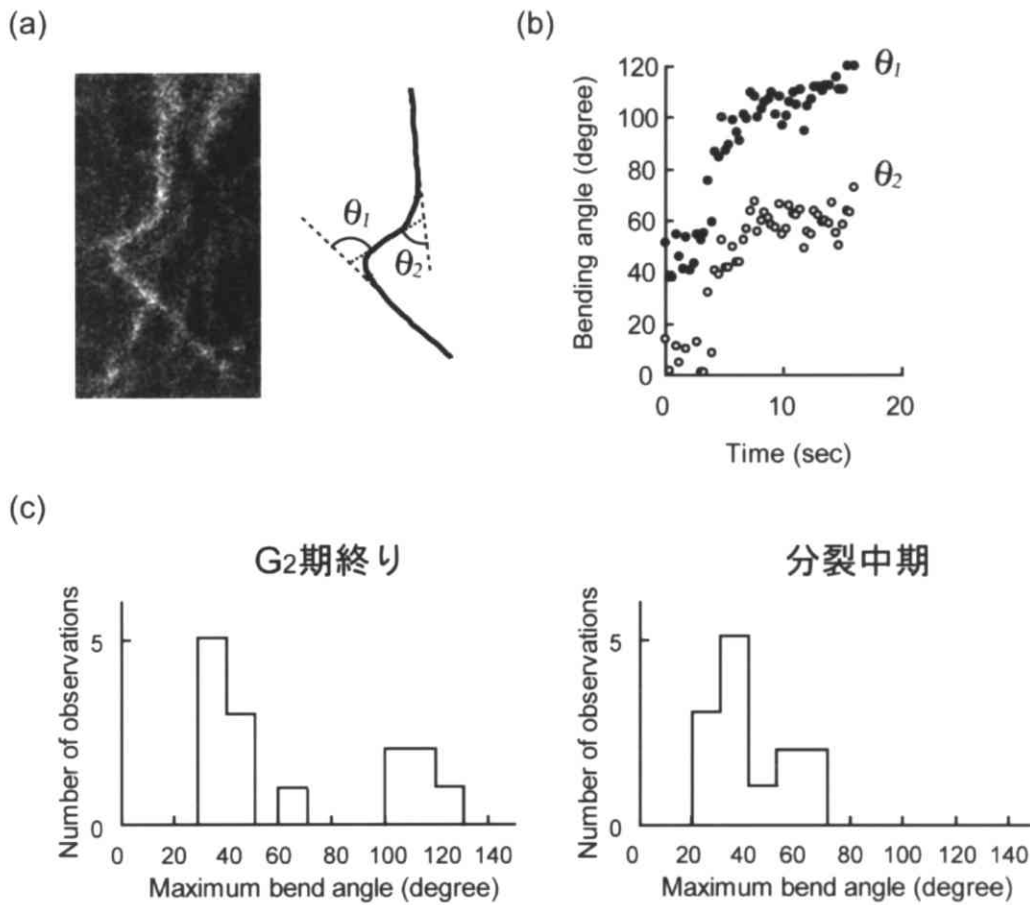


図 10 表層アクチン繊維の折れ曲がり角度の定量解析

(a) 屈曲したアクチン繊維について屈曲角度 θ_1, θ_2 を定義した。(b) G_2 期終りにおける屈曲角度 θ_1, θ_2 の経時変化の代表例。(c) G_2 期終りと分裂中期における最大屈曲角度のヒストグラム。一細胞当たり 5~10 本の繊維の屈曲運動を経時観察し、その中での最大屈曲角度を調べた。

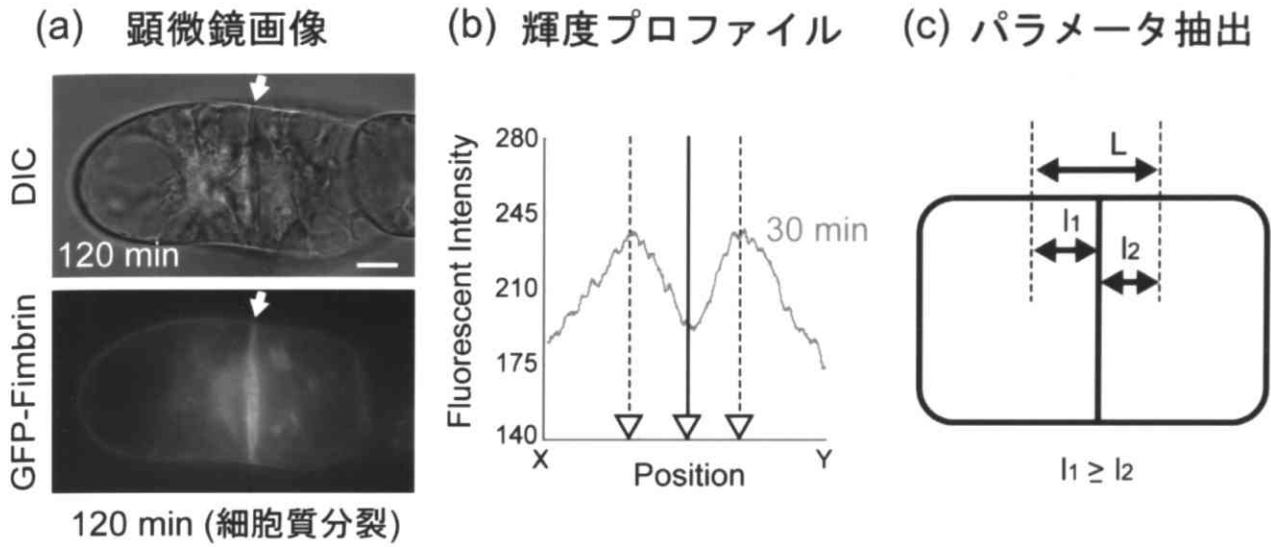


図 11 MFTP と分裂面の位置関係の解析過程

(a) 図 6 (a-h) と同一細胞の細胞質分裂期の顕微鏡画像。分裂面の位置 (矢印) は DIC 像から判断した。(b) a で判断した分裂面の位置 (実線) を特定した。また、MFTP の位置 (破線) を分裂中期に得た蛍光輝度プロファイルから特定した。(c) MFTP と分裂面の位置関係を統計的に調べるため、MFTP 間の長さを L 、MFTP と分裂面の長さを l_1 、 l_2 と ($l_1 \geq l_2$) と定義し、測定した。Bar:10 μm

Experiment number	L (μm)	l_1 (μm)	l_1/L
1	28.6	15.3	0.53
2	25.9	14.0	0.54
3	22.4	11.3	0.50
4	22.2	11.3	0.51
5	19.5	10	0.52
6	19.1	10.8	0.56
7	17.9	9.2	0.51
8	15.0	8.8	0.59
9	13.8	7.7	0.56
10	10.9	5.0	0.54
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

図 11 で定義した L と l_1 の測定値。 l_1/L は 0.5 に近い値を示すことから、分裂面は MFTP の中央部に形成されることがわかった。

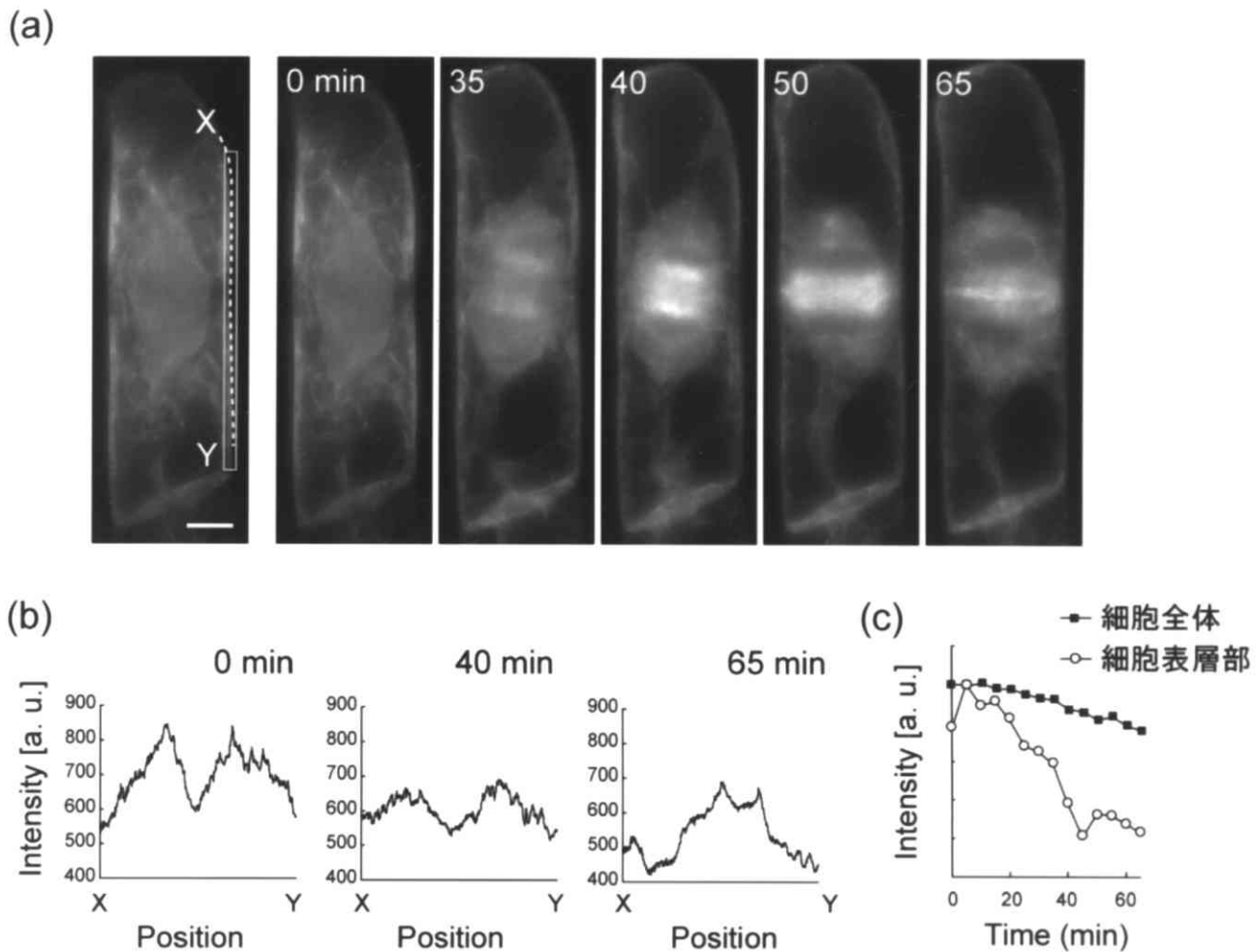


図 12 分裂中期から G_1 期初めまでの細胞表層部における GFP-Fimbrin 蛍光輝度プロファイルの変化

(a) 分裂中期から G_1 期初めまでのアクチン繊維構造の経時変化。細胞周期は分裂中期 (0 min) から分裂後期 (35 min)、分裂終期 (40 min)、細胞質分裂期 (50 min)、 G_1 期初め (65 min) へと進行した。(b) a における分裂中期 (0 min)、分裂終期 (40 min)、 G_1 期初め (65 min) の点線分 XY (細胞表層部) 上の GFP-Fimbrin 蛍光輝度プロファイル。(c) a における点線分 XY (細胞表層部) と画像全体 (細胞全体) の GFP-Fimbrin 蛍光輝度の経時変化。Bar: 10 μm

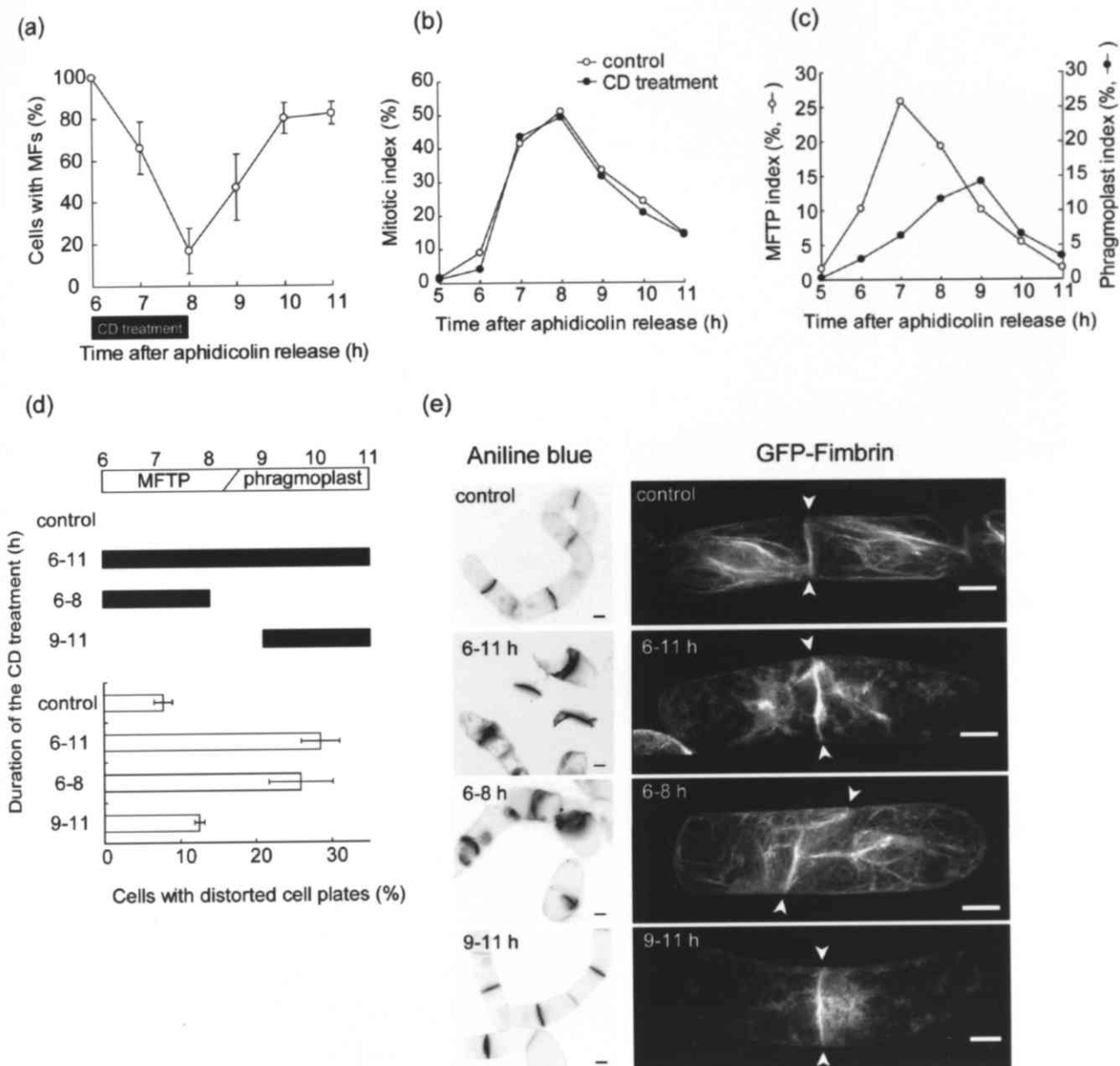


図 13 MFTP 破壊時の分裂面形成への影響

(a) アフィディコリン洗浄 6-8 時間目に 100 μ M CD でパルス処理した場合のアクチン繊維を持つ細胞の頻度の経時変化。Bar:SE, n=300 (b) コントロール (白丸) と CD 処理下 (黒丸) における分裂指数の経時変化。 (c) MFTP (白丸) とフラグモプラストのアクチン繊維 (黒丸) を持つ細胞の頻度の経時変化。 (d) コントロール、6-11 時間目に CD 処理、6-8 時間目に CD パルス処理、9-11 時間目に CD 処理した場合の歪んだ分裂面をもつ細胞の頻度。分裂面は G₁ 期初め (アフィディコリン洗浄 11 時間目) にアニリンブルーを用いて染色し、観察した。Bar:SE, n=300 (e) G₁ 期初め (アフィディコリン洗浄 11 時間目) のアニリンブルー染色による分裂面の形状と GFP-Fimbrin によるアクチン繊維構造の代表例。矢じりは分裂面を示す。Bars:10 μ m

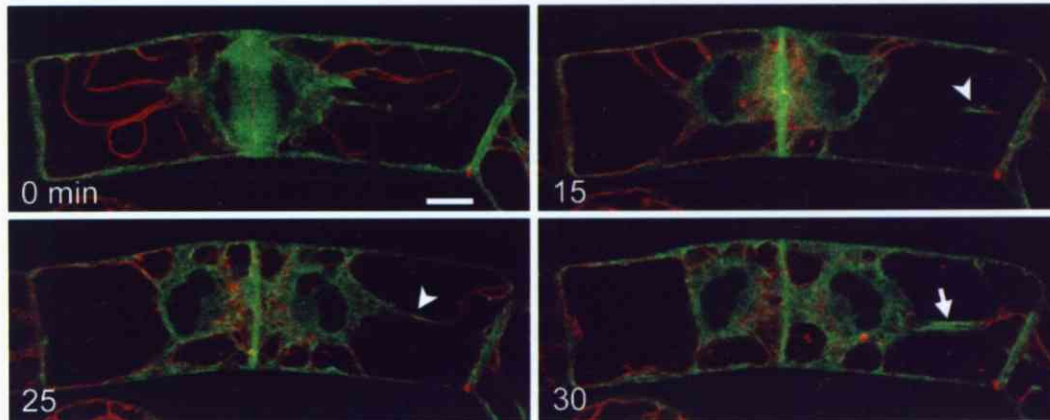


図 14 G_1 期初めにおける細胞質糸の再形成と娘核の移動

分裂終期 (0 min) から G_1 期初め (30 min) までのアクチン繊維構造 (緑 : GFP-Fimbrin) と液胞構造 (赤 : FM4-64) を 15 分毎に経時観察した。矢じり: シート状の液胞膜構造 矢印: 再形成されたチューブ状の細胞質糸。 Bar: 10 μm

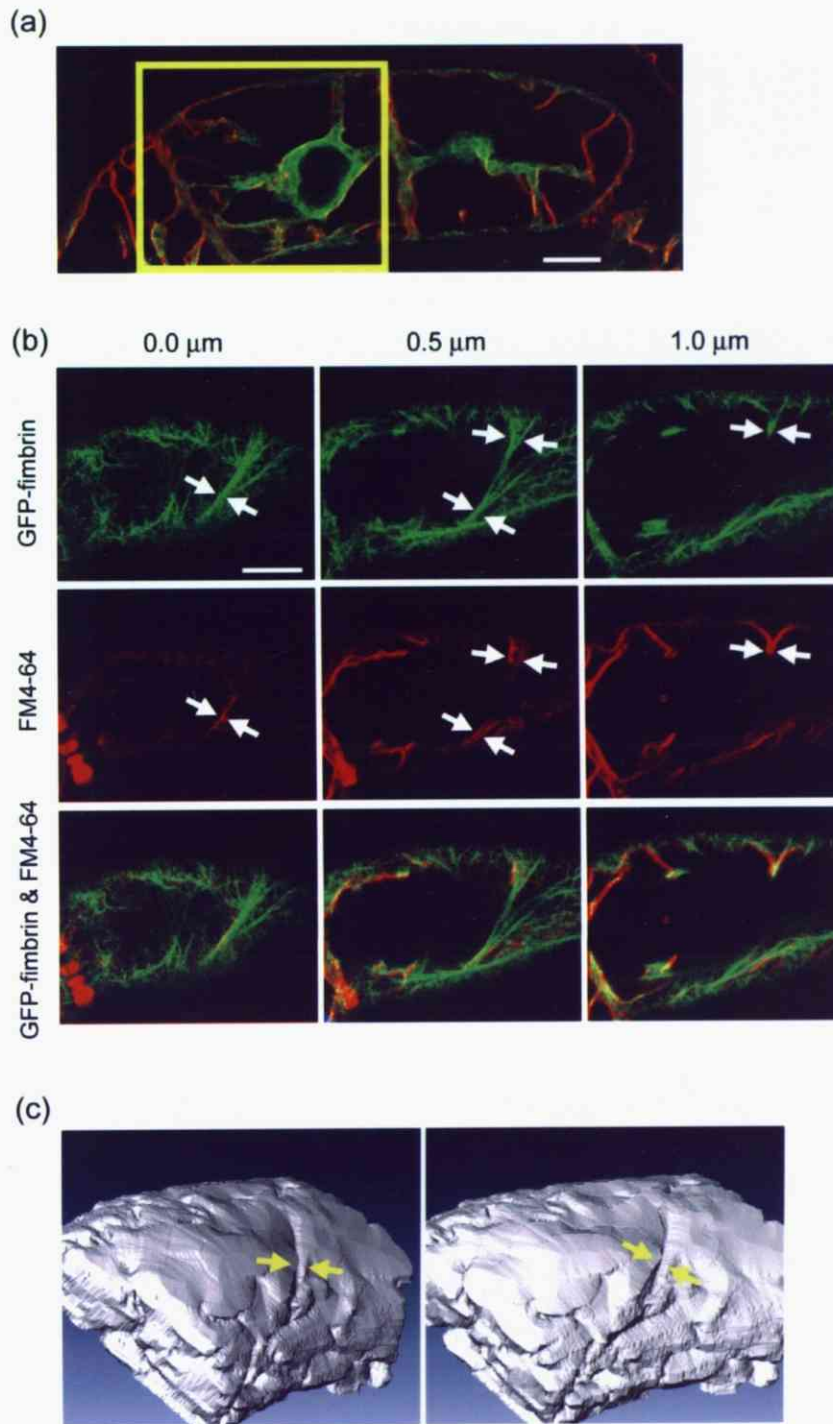


図 15 G_1 期初めにおける溝状の液胞膜構造

(a) G_1 期初めにおける BY-GF11 細胞。緑色: GFP-Fimbrin (アクチン繊維)、赤色: FM4-64 (液胞膜)。(b) a と同一の細胞の表層から中央部に向かって $0.5\mu\text{m}$ 間隔で取得した連続光学切片。液胞膜に添って束化したアクチン繊維が観察された (矢印)。(c) a と同一の細胞における液胞構造の立体像。溝状の液胞膜構造が観察された (矢印)。左右の画像は観察角度を変えて表示したものである。 Bar: $10\mu\text{m}$

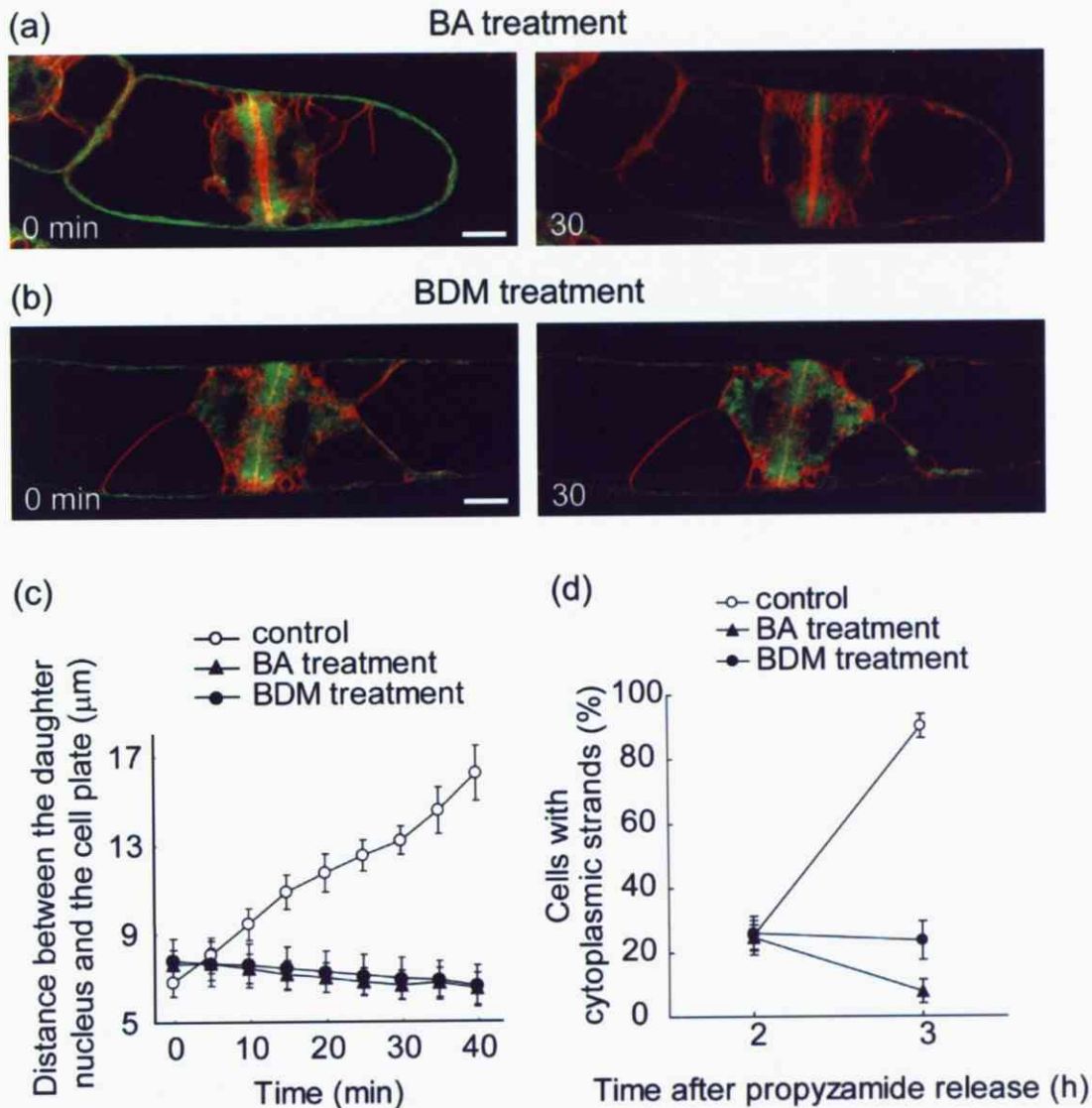


図 16 G_1 期初めにおける液胞構造変化に対する BA と BDM の影響

(a) 分裂終期に BA を用いてアクチン繊維を破壊した場合のアクチン繊維構造 (緑 : GFP-Fimbrin) と液胞構造 (赤 : FM4-64) の経時変化。 Bar: $10\ \mu\text{m}$ (b) 分裂終期に BDM 処理した場合のアクチン繊維構造と液胞構造の経時変化。 Bar: $10\ \mu\text{m}$ (c) 娘核と細胞板との距離の経時変化。観察開始時 (分裂終期、阻害剤処理 30 分後) を 0 分とした。 Bar: SE $n=3$ (d) 細胞質糸がみられる細胞の頻度の経時変化。アフィディコリンとプロピザミドによる二段階同調法 (Nagata et al. 1992) を用いて細胞周期を高度に同調させ、分裂終期 (propyzamide 除去 2 時間目) に阻害剤処理し、細胞数を計測した。 Bar: SE $n=3$

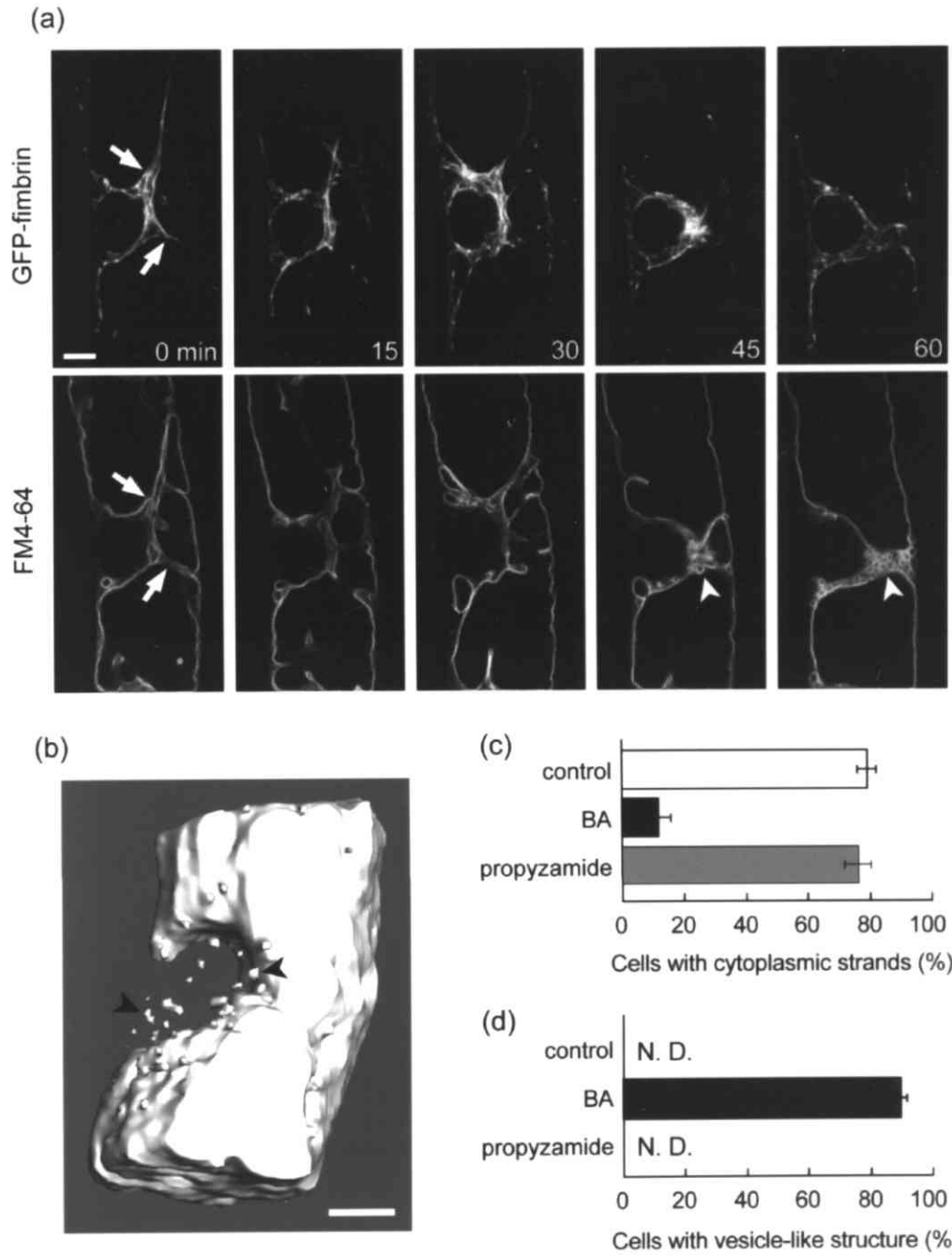


図 17 アクチン繊維の破壊による液胞構造の変形

(a) G_1 期の BY-GF11 細胞のアクチン繊維構造 (GFP-Fimbrin) と液胞膜構造 (FM4-64) の BA 処理下における経時変化。顕微鏡下で BA を処理し (0 min)、15 分毎に観察した。細胞質糸 (矢印) はアクチン繊維の崩壊と並行して崩壊し、液胞膜が集積した部位から小胞状の構造が出現した (矢じり)。 Bar : 10 μ m (b) アクチン繊維が崩壊した BY-GV7 細胞における液胞の立体構造。アクチン繊維破壊により出現した小胞状の構造は巨大液胞と分離していた (矢じり)。 Bar : 10 μ m (c) コントロール、BA 処理、プロピザミド処理した場合における細胞質糸をもつ BY-GV7 細胞の頻度。 Bar : SE n=300 (d) コントロール、BA 処理、プロピザミド処理した場合における小胞状の構造をもつ BY-GV7 細胞の頻度。 Bar : SE n=300

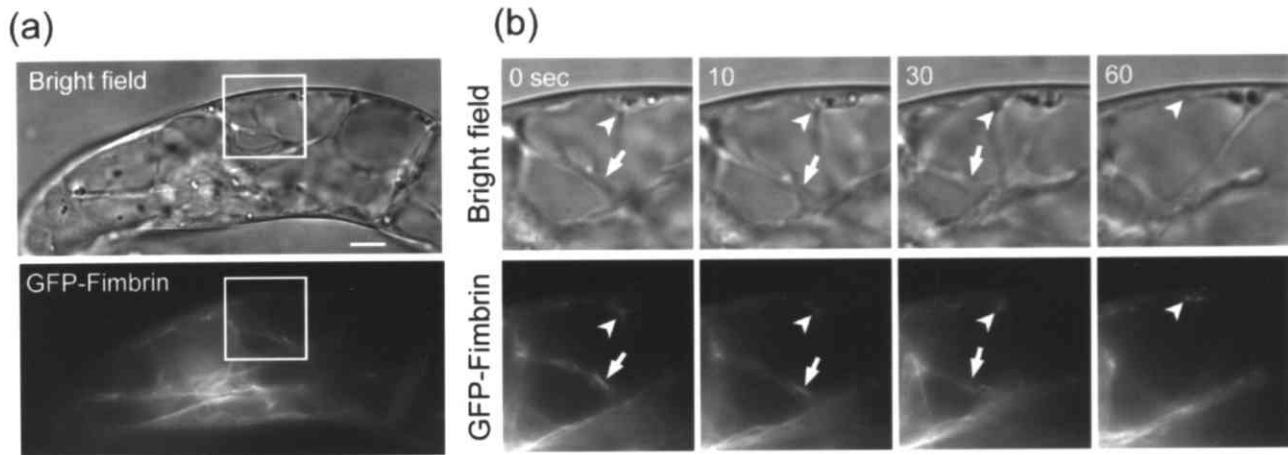


図 18 細胞質糸と並行したアクチン繊維構造の動き

(a) G₁期のBY-GF11細胞の明視野像(上図)とGFP-Fimbrin像(下図)。(b) aにおける四角の経時観察像。細胞質糸と細胞質糸を縁取るアクチン繊維は盛んに動いており(0-30 sec, 矢印)、巨大液胞表層ではGFP-Fimbrinの蛍光輝点のスポットが液胞表層を滑るように動いていた(0-60 sec, 矢じり)。 Bar: 10 μm

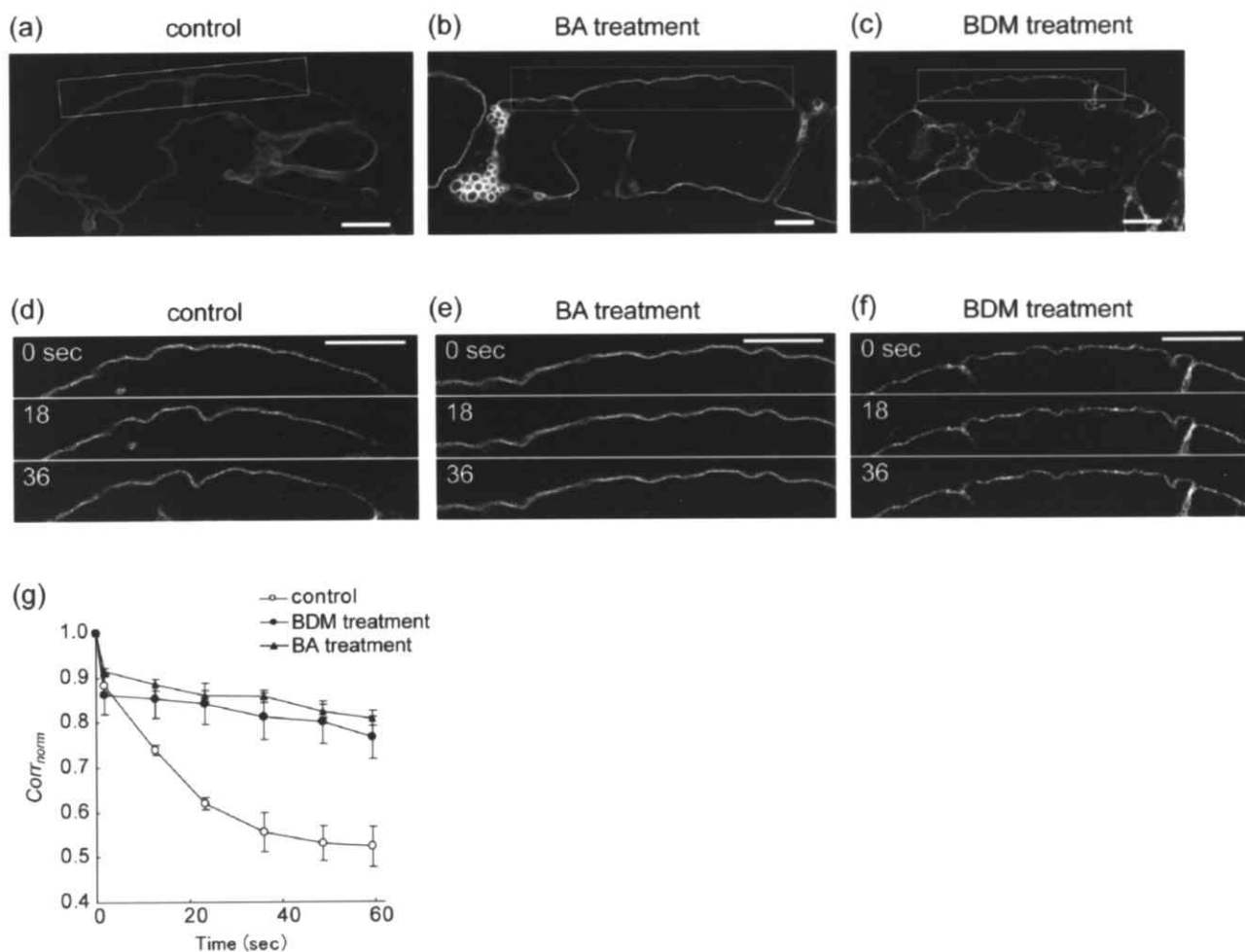


図 19 画像相関法を用いた液胞膜の動きの定量解析

コントロール (a)、BA 処理した場合 (b)、BDM 処理した場合 (c) における G1 期の BY-GV7 細胞の液胞構造。Bars: 10 μm (d, e, f) (a, b, c) の四角で囲った領域の 18 秒毎の経時観察像。Bars: 10 μm (g) コントロール、BA 処理、BDM 処理した場合の画像相関係数 ($Corr_{norm}$; 材料と方法を参照) の経時変化。 Bar. SE n=3

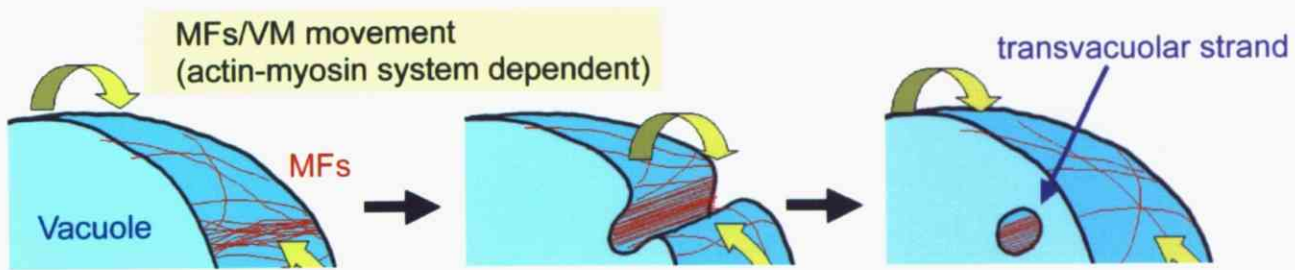


図 20 G₁期初めにおける細胞質系の再形成機構の作業仮説

巨大液胞表層部において液胞膜に添ったアクチン繊維がミオシン依存的に動く。このため、液胞膜も絶えず揺れ動いている。G₁期初めには巨大液胞表層のアクチン繊維が束化し（左図）、このアクチン繊維の束がミオシン依存的に巨大液胞内部へと陥入していく。このときに溝状の液胞構造が観察される（中央図）。やがて、溝の両側の液胞膜の融合を介して細胞質糸（transvacuolar strand）が形成される（右図）。