

論文内容の要旨

論文題目：

Mechanism of Cortical Microtubule Reorganization in Higher Plant Cells

~ Studies on Tubulin Recycle and Origin of Cortical Microtubules at the M/G₁ interface ~

(高等植物細胞における表層微小管再形成機構の解析

~M/G₁境界期におけるチューブリンのリサイクルと表層微小管の起源に関する研究~)

氏名： 米田 新

序論

高等植物細胞は、周囲を堅い細胞壁で覆われており、容易にその形を変えることが出来ない。細胞壁は主にセルロース微繊維により構成されており、細胞の伸長はセルロース微繊維の方向に対して垂直な方向に限定される。そのセルロース微繊維の配向は、細胞膜直下に存在する表層微小管によって制御されることから、表層微小管は高等植物細胞の形態形成において決定的な役割を果たすと言える。この表層微小管はM期に入ると消失し、M/G₁境界期に再形成されて、その後の細胞伸長の方向を決定付ける。そのため、M/G₁境界期において表層微小管が再形成される機構を明らかにすることは、高等植物の細胞周期と形態形成の観点から重要である。

これまでに、高等植物細胞の微小管の構造は、電子顕微鏡や間接蛍光抗体染色法を用いた蛍光顕微鏡による観察から研究されてきた。これらの技術により、高等植物細胞では、間期の表層微小管、G₂期終わりの前期前微小管束、M期前期から中期の紡錘体、M期後期から終期のフラグモプラストなどの特徴的な微小管構造が存在することが明らかにされてきた(図1)。しかし、これらの観察は固定した細胞でなされてきたため、それぞれの微小管構造の形成/移行期に短時間で起こる変化の過程を詳細に追跡することが出来なかった。そのため、生細胞内で微小管のダイナミクスをリアルタイムに観察できる実験系の確立が望まれた。

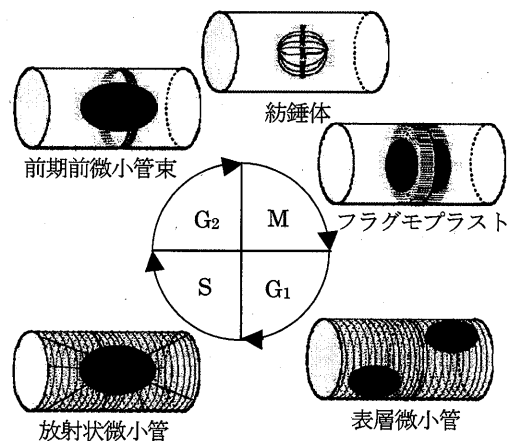


図1：高等植物細胞における細胞周期各期の微小管構造の模式図。細胞周期の進行に従い、微小管構造は非常にダイナミックな変化を示す

そこで本研究では、細胞周期の進行に伴う微小管のダイナミクス、特に M/G₁ 境界期における表層微小管の再形成過程を明らかにすることを目的とし、GFP (Green Fluorescent Protein) を用いた生細胞内での微小管構造の可視化と経時観察を行った。

1. GFP-チューブリンを恒常的に発現する形質転換株 BY-GT16 細胞の確立と微小管の可視化

微小管を可視化するため、微小管の主要な構成要素の一つである α -チューブリンと GFP の融合遺伝子を作成し、タバコ培養細胞 BY-2 にアグロバクテリウム感染法を用いて導入した。その結果、GFP-チューブリン融合タンパク質を恒常的に発現し、微小管構造の観察に適したタバコ培養細胞の形質転換ラインを選抜して確立することに成功し、BY-GT16 (transgenic BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin fusion protein clone 16) と名付けた。

BY-GT16 細胞は野生型 BY-2 細胞と比べて形状や大きさに差異は見られず、増殖率 (図 2A) や薬剤処理による細胞周期の同調率 (図 2B) においても遜色が無かった。このことから、GFP-チューブリン融合タンパク質の強制発現は細胞の活性に影響を与えておらず、増殖率が高く細胞周期の同調率も高いなどの BY-2 細胞の利点を引き継いでいた。

BY-GT16 細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 下で観察すると、微小管様の構造が生細胞内で観察できた (図 2C~G)。その GFP 蛍光は全ての微小管構造を間違いなく可視化していることが確認された。さらに、BY-GT16 細胞を経時観察したところ、M 期を通じた微小管の動態を追跡することが出来た。これらのことから、BY-GT16 細胞は細胞周期の進行に伴う微小管の挙動を明らかにするのに非常に有用なツールになると考えられた。

2. M/G₁ 境界期における表層微小管再形成過程の観察

そこで、M/G₁ 境界期における表層微小管再形成過程を明らかにするために、M 期終期のフラグモプラストが消失しつつある BY-GT16 細胞について経時的な観察を行った。

デコンボリューション顕微鏡を用いて、細胞表層から中央まで Z 軸方向に焦点面を変えながら撮影し、立体画像構築を行なった。その結果、フラグモプラスト崩壊後に、GFP 蛍光がフラグモプラストの残渣から娘核の核膜表面に移動して集積した (図 3A、8-12 分、arrow)。続いて、そのチューブリンの集積地点から最初の微小管が出現し、細胞表層へと伸長した (図 3A、16-18 分、arrowheads)。これは、フラグモプラスト崩壊後速やかな表層微小管再形成を可能にするため、フラグモプラストを構成していたチューブリンタンパク質が再利用されているものだと考えられる。このような M 期終期から G₁ 期初期におけるチューブリンの移動とリサイクルを提起したのはこの研究が初めてであり、繊維状の微小管構造のみならず遊離のチューブリンタンパク質をも GFP 蛍光として観察可能な BY-GT16 細胞の利点を活かしたものだと言える。

次に、BY-GT16 細胞の細胞表層を CLSM により経時観察した。その結果、娘核から伸長した微小管が細胞表層に達した地点で「蛍光輝点」を形成し (図 3B、9、15 分、arrow)、そこから最初の微小管が形成されることを発見した。 (図 3B、12-15 分、circle)。その微小管は細胞長軸にほぼ平行な方向に伸長し (図 3B、18 分、arrowheads)、それらの細胞長軸に平行な微小管が細胞の端に届いた頃、

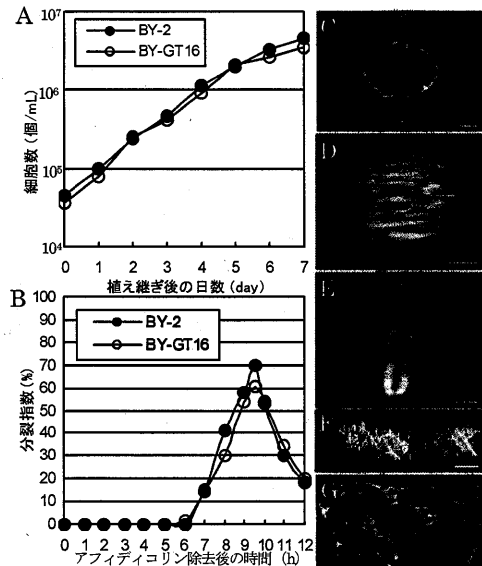


図 2: BY-GT16 細胞の特徴 細胞の増殖率 (A)、同調率 (B) のいずれも野生型 BY-2 と大きな差は無い。また、前期前微小管束 (C)、紡錘体 (D)、フラグモプラスト (E)、表層微小管 (F)、放射状微小管 (G) と、細胞周期における全ての微小管構造が GFP-チューブリンにより可視化されている。スケールバー: 10 μ m

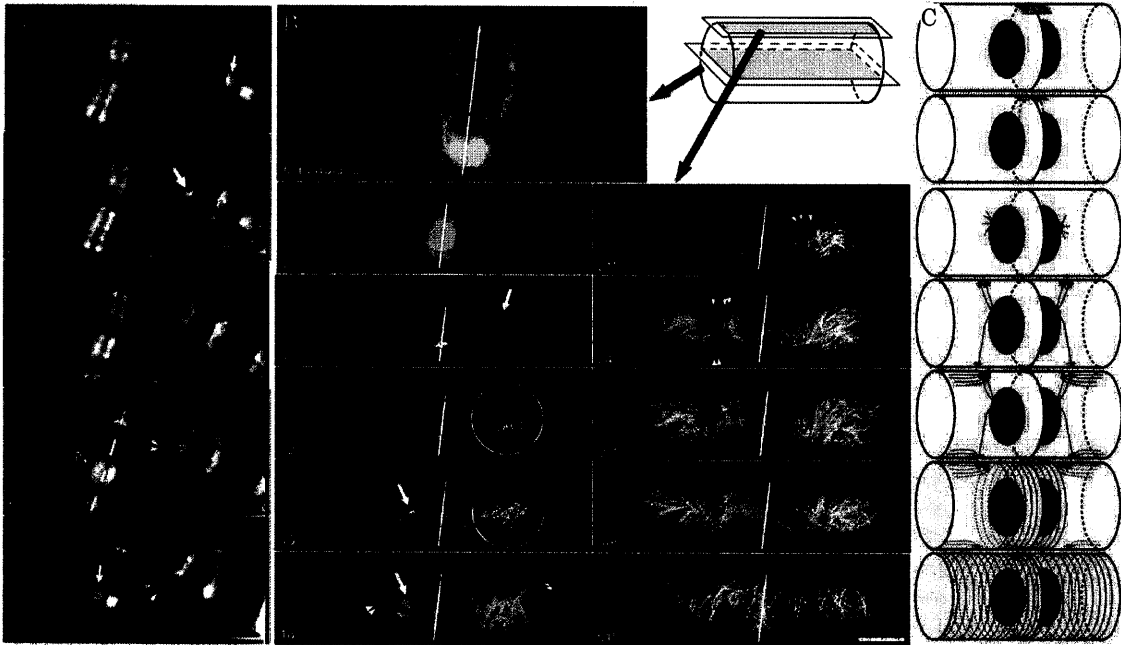


図 3: M/G₁境界期における表層微小管再形成過程 (A) M 期終期のフラグモプラストが崩壊すると、遊離状態になったチューブリンタンパク質が娘核の核膜上に集積し、そこから最初の微小管が出現した。(B) 娘核表面から伸長した微小管が細胞表層に達したところで蛍光輝点を形成し、そこから細胞長軸に平行な微小管が伸長し、続いてそれらと垂直な表層微小管が出現して細胞全体へと広がった。(C) これらの結果から M/G₁境界期における一連の表層微小管再形成過程が明らかになった。スケールバー: 10 μ m、N: 娘核、白線: 分裂面

細胞長軸と垂直な微小管が分裂面付近から出現し (図 3B、21-24 分、arrowheads)、その後平行な微小管が徐々に消失するに伴って、垂直な微小管が細胞表層全体へと広がって G₁ 期型の表層微小管が完成した (図 3B、51 分)。

これら一連の観察により、M/G₁ 境界期における表層微小管の再形成過程を明らかにすることが出来た (図 3C)。特に、娘核上における微小管形成や、細胞表層における「蛍光輝点」からの表層微小管再形成など、表層微小管の“起源”を明らかにする上でも重要な知見を得ることが出来た。

3. M/G₁境界期の表層微小管再形成におけるアクチン繊維の関与の解析

以上のような M/G₁ 境界期における表層微小管再形成過程は、何により制御されているのだろうか？私は、他の細胞骨格系であるアクチン繊維に着目し、M/G₁ 境界期におけるアクチン繊維の役割を明らかにするために、以下のような阻害剤実験を行なった。

BY-GT16 細胞をアクチン重合阻害剤であるビステオネライド A (BA) で処理すると、30 分以内にアクチン繊維は完全に崩壊する。そこで、M/G₁ 境界期の BY-GT16 細胞を BA 処理し、その後のチューブリンおよび微小管の動態を経時的に観察した。その結果、無処理の BY-GT16 細胞では、フラグモプラスト消失後 1 時間以内に表層微小管が再形成されるのに対し (図 4A, cortex)、BA 処理によりアクチン繊維を破壊した細胞では、3 時間経過しても表層微小管の形成は全く観察されなかった (図 4B, C, cortex)。このことから、アクチン繊維は表層微小管の再形成に必須であることが明らかになった。また、BA 処理した BY-GT16 細胞の約 80% では、フラグモプラスト崩壊後もチューブリンタンパク質が移動せず、分裂面付近に留まったままであった (図 4B, midplane)。従って、アクチン繊維は、フラグモプラストから遊離したチューブリンが娘核の表面へ移動して集積する挙動に関与していると考えられる。さらに興味深いことに、BA 処理した細胞の約 20% では、娘核上から微小管が形成されるが細胞表層へ伸長せず、核膜上で次第に本数を増やして、余剰のフラグモプラストが形成された (図 4C, midplane, 矢印)。このことから、アクチン繊維は、娘核上で形成された微小管が細胞表層へと正常に伸長することに関与していることが示唆された。また、この余剰のフラグモプラストは、

正常なフラグモプラスト (図 4C, arrowheads) とは独立して形成されており、これは核や紡錘体の位置と無関係にフラグモプラストが形成された初めての観察事例である。以上のことから、フラグモプラスト自体は核・紡錘体やアクチン繊維が存在しなくても形成されうることが示され、アクチン繊維は非特異的にフラグモプラストが形成するのを抑制することにも関与していると推察された。

結論

細胞周期の進行に伴う微小管のダイナミクスを明らかにするために、GFP-チューブリン融合タンパク質を恒常的に発現するタバコ培養細胞の形質転換株 BY-GT16 を確立し、生細胞内で微小管の動態を観察することが可能な実験系を確立した。

この BY-GT16 細胞を経時観察することにより、M/G₁ 境界期における表層微小管再形成過程の詳細を以下のように明らかにすることが出来た (図 5)。M 期終期のフラグモプラストが崩壊すると、それを構成していたチューブリンタンパク質が娘核上へ移動して集積する。そこから最初の微小管が形成され、細胞表層へと伸長する。その微小管が細胞表層に達したところで「蛍光輝点」を形成し、そこから細胞長軸に平行な表層微小管が伸長する。その後、分裂面付近からそれらと垂直な表層微小管が出現し、次第に細胞全体へと広がり G₁ 期型の表層微小管が完成する。

M/G₁ 境界期においてアクチン繊維を BA によって破壊すると表層微小管の再形成が起きず、チューブリンの移動や微小管の細胞表層への伸長が阻害される。このことから、この一連の表層微小管再形成の過程には、アクチン繊維が必要であることが明らかになった。さらに、アクチン繊維の破壊により、一部の細胞では余剰のフラグモプラストが形成されることを見出した。

これらの結果から、M/G₁ 境界期における表層微小管の再形成とアクチン繊維の役割についての統合的な理解が可能になった。

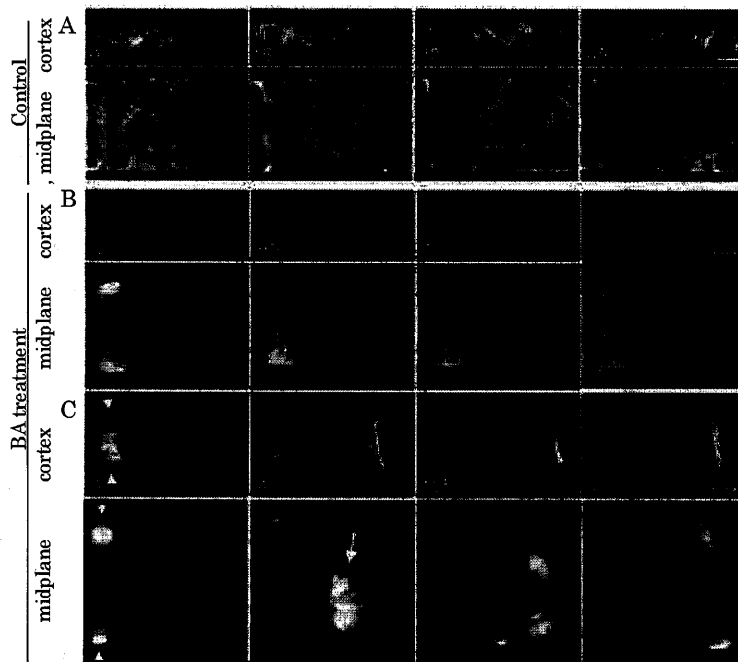


図 4: M/G₁ 境界期の表層微小管再形成過程におけるアクチン繊維破壊の影響 Control の細胞ではフラグモプラスト崩壊後 1 時間以内に表層微小管が形成されるのに対し (A, cortex)、BA 処理によりアクチン繊維を破壊した細胞では 3 時間経っても表層微小管が再形成されなかった (B,C, cortex)。BA 処理した細胞の約 80% ではチューブリンが分裂面から移動しないままだったが (B, midplane)、約 20% の細胞では余剰のフラグモプラストが形成された (C, 45 分, midplane, 矢印)。スケールバー: 10µm

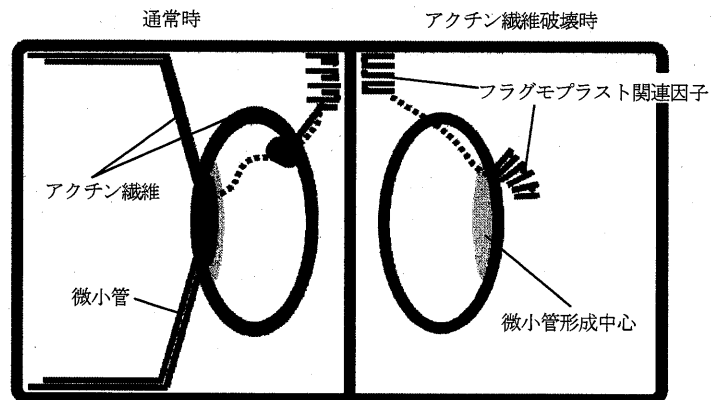


図 5: M/G₁ 境界期の表層微小管再形成過程とアクチン繊維の模式図 アクチン繊維は、チューブリンがフラグモプラストから娘核上へ移動して集積し、そこから微小管が細胞表層へ伸長する過程を制御している。