

植物微小管付随タンパク質による 微小管機能の制御

矢尾真樹

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科

植物遺伝子機能学講座

平成 20 年 5 月

目次

第 1 部 序論	5
1-1 植物の伸長方向	
1-2 シロイヌナズナのねじれ変異株	
1-3 微小管の性質	
1-4 微小管動態の測定法	
1-5 ねじれと微小管動態	
1-6 植物 MAPs	
1-7 シロイヌナズナ SPR2 と SPR2-LIKE(SP2L)	
1-8 シロイヌナズナ WAVE-DAMPENED2(WVD2)ファミリー	
1-9 本研究の目的	
第 2 部 SPR2 の微小管機能の制御	17
2-1 目的	17
2-2 方法	17
2-2-1 コンストラクションの作成	
2-2-2 植物の生育条件、変異株及び形質転換植物の作出	
2-2-3 SPR2 及び SP2L の遺伝子発現解析	
2-2-4 SPR2 及び SP2L の細胞内局在解析	
2-2-5 細胞内の表層微小管の配向及び動態解析	
2-2-6 in vitro 微小管動態解析	
2-2-7 in vitro 微小管結合実験	
2-2-8 微小管プラス端集積タンパク質との相互作用の検証	
2-3 結果	29
2-3-1 <i>spr2sp2l</i> 二重変異株	
2-3-2 SPR2 及び SP2L の細胞内局在と SPR2 の動態	
2-3-3 細胞内における SPR2 の表層微小管動態に与える影響	
2-3-4 in vitro における SPR2 及び SP2L の微小管動態に与える影響	
2-3-5 SPR2 の微小管結合領域の特定	
2-3-6 SPR2 と他の MAPs との関連	
2-4 考察	65
2-4-1 本研究の意義	
2-4-2 SPR2 と SP2L の機能重複性	
2-4-3 SPR2 の構造と微小管結合領域	
2-4-4 SPR2 の細胞内局在	
2-4-5 SPR2 の微小管に対する機能	

2-4-6	<i>spr2</i> 変異株における表層微小管の配向	
2-4-7	SPR2 と他の MAPs との関連	
第 3 部	WVD2 ファミリーの微小管機能の制御	77
3-1	目的	77
3-2	方法	77
3-2-1	コンストラクションの作成	
3-2-2	植物の生育条件、変異株及び形質転換植物の作出	
3-2-3	WVD2 ファミリーの遺伝子発現解析	
3-2-4	細胞内局在解析	
3-2-5	in vitro 微小管動態解析	
3-2-6	in vitro 微小管結合実験	
3-2-7	in vitro tubulin 結合実験	
3-3	結果	83
3-3-1	<i>wdl1</i> 、 <i>wdl4</i> 、 <i>wdl5</i> 変異株と WDL1 過剰発現株	
3-3-2	WVD2 ファミリーの遺伝子発現と WDL1 の細胞内局在	
3-3-3	in vitro における WDL1 の微小管動態に与える影響	
3-3-4	WDL1 の微小管及びチューブリン結合性	
3-3-5	WDL と他の MAPs との関連	
3-4	考察	96
3-4-1	WDL1 の構造と微小管結合領域	
3-4-2	WDL1 の微小管に対する機能	
3-4-3	WDL1 の細胞内での機能	
第 4 部	植物細胞からの組換えチューブリンの精製	
4-1	目的	99
4-2	方法	100
4-2-1	コンストラクションの作成	
4-2-2	タバコ BY-2 細胞の生育条件と発現解析形質転換細胞の作出	
4-2-3	組換えチューブリン精製法の検討	
4-2-4	細胞膜ゴーストを使った精製チューブリン取込み実験	
4-2-5	in vitro 微小管再構成系を使った精製チューブリン取込み実験	
4-3	結果と考察	104
4-3-1	組換えタンパク質の発現	
4-3-2	組換え変異型チューブリンの発現	
4-3-3	組換えチューブリン精製法の検討	

- 4-3-4 表層微小管での精製チューブリン重合能
- 4-3-5 in vitro 微小管再構成系での精製チューブリン重合能
- 4-3-6 今後の改良点

第 5 部 総括	117
5-1 MAPs による表層微小管の配向制御	
第 6 部 参考文献	118
第 7 部 謝辞	127

第 1 部 序 論

1-1 植物の伸長方向

多くの植物は、太陽を目指して背を高くするために、真っ直ぐに茎を伸ばす。また一方でつる植物などは自身の体をねじれさせることで他のものに巻きつきながら伸びる。この真っ直ぐに伸びたりねじれて伸びたりすることは、植物の生存戦略において非常に重要であると考えられる。植物細胞は、動物細胞とは異なり、硬い細胞壁に覆われており、とても頑丈である。これを利用して、茎や根などの伸長が盛んな器官においては、複雑な機構が必要な「分裂」によってではなく、個々の細胞が細長く「伸長」するだけで効率よく器官を生長させている。この伸長方向の決定には、厳密かつ巧妙な制御機構が必要であり、この機構を解明することによって、植物の「伸びる」戦略を明らかにすることができると考えられる。

1-2 シロイヌナズナのねじれ変異株

植物細胞の伸長方向の制御には、細胞骨格のひとつである微小管とその関連タンパク質が関わっていることが、モデル植物であるシロイヌナズナの遺伝子解析の結果から分かってきた。シロイヌナズナは、通常どの軸器官においてもねじれは見られない。しかし、*lefty1*、*lefty2*、*spiral1(spr1)*、*spiral2(spr2)*などの変異株では、根や茎や花弁などの伸長領域において一定方向にねじれた形質が見られた(Furutani et al., 2000, Thitamadee et al., 2002)。これら変異株では、微小管を構成する(α/β チューブリン)、もしくはそれに付随するタンパク質(微小管付随タンパク質; MAPs)などに変異が見つかった(Table 1, Nakajima et al., 2004, Sedbrook et al., 2004, Buschmann et al., 2004, Shoji et al., 2004)。これらの軸器官細胞の微小管の様子を観察すると、伸長領域の細胞表層に配向している微小管の束(表層微小管束)の配向が傾き、*lefty1* と *lefty2* は右巻きヘリックス、*spr1* は左巻きヘリックスといった細胞の伸長方向とは逆巻きのヘリックスを形成していた。また、別の MAP に変異のある *microtubule organization1(mor1)*変異株では、高温(29℃)下で生育させると微小管が分断し、伸長細胞ではまず左巻きにねじれ、次に横方向に肥大する(Whittington et al., 2001)。さらに、多数のチューブリン変異株の解析から根のねじれの向きと表層微小管ヘリックスの配向の向きは相関関係にあることも分かった(Ishida et al., 2007)。以上のことから、微小管の安定性が表層微小管の配向の向きに影響し、さらには植物体の伸長方向の決定に関わることが予想された。

これらの結果と細胞壁についての力学的地点から、微小管と植物細胞の伸長方向制御について次のようなモデルが考えられている。植物細胞は、セルロースなどで構成される硬い細胞壁に囲まれている。茎や根などの軸器官において細胞が盛んに伸長する際、細胞が内部の膨圧によって膨らもうとするのと同時に、細胞が細長く伸びるために伸長方向に対して垂直に細胞壁の最内層にあるセルロースの繊維(セルロース微繊維)が並んで、縦方向にのみ膨れることができるようになっている。このセルロースの微繊維は、表層微小管と平行に並んでいる。また、セルロース微繊維と表層微小管は互いに影響しあっていることも報告されていることから、表層微小管がセルロース微繊維の配向を介してもしくは直接的に細胞伸長の方向を制御しているのではないかと考えられている。つまり、「真っ直ぐ」に伸長する器官においては、表層微小管が伸長軸に対して垂直に配向することによって、細胞が「真っ直ぐ」に伸長するように制御されていると考えられている(Fig 1、Lloyd et al., 2004, Wasteney, 2004)。しかしながら、詳細な伸長方向の決定機構はまだ解明できていない。

以上のことから、シロイヌナズナのねじれ変異株の解析をきっかけに微小管による植物細胞の伸長方向の決定機構を解明することが期待された。

Table 1. シロイヌナズナの表層微小管制御に関与するとされるタンパク質

Protein	Cortical MT defect mutants (phenotype)	Predicted function for * ¹ MT	Homolog in Animal/yeast	Reference(s)
SPR1	<i>spr1, sku6</i> (Helical growth)	MT organization?	Plant specific	Furutani, 2000
SPR2	<i>spr2, tortifolia1</i> (Helical growth)	MT organization?	Plant specific	Furutani, 2000
WVD2 family	<i>wvd2</i> (Helical growth)	MT organization?	Plant specific	Yuen, 2003
MAP70-5	Overexpressor (Helical growth)	MT stabilizing	Plant specific	Korolev, 2007
MAP18	Overexpressor (Helical growth)	MT destabilizing	Plant specific	Wang, 2007
γ -tubulin complex	<i>spr3</i> (Helical growth)	MT nucleation?	γ -tubulin, Dgrip84, Dgrip91, Dgrip75 etc	Murata 2005, Nakamura unpublished etc
MOR1	<i>mor1, gem1</i> (Helical growth)	MT stabilizing	Dis1/XMAP215, TOGp	Whittington, 2001
PHS1	<i>phs1</i> (Helical growth)	Signaling?	MAPK phosphatase	Naoi, 2004
MAP65 family	* ² nd	MT bundling	Ase1	Smertenko, 2004 etc
Katanin	<i>botero, fra2, frc2, erh3, lue1</i> (Isotropic cell expansion)	MT severing	Katanin	Bouquin, 2003 etc
PLD* ³	nd	Linking MT to plasma membrane	PLD	Dhonukshe, 2003
CLASP	<i>atclasp</i> (Defect of cell elongation)	* ⁴ +TIP	CLASP	Ambrose, 2007, Kirik, 2007
EB1 family	<i>eb1a, eb1b, eb1c</i> (Defect of touch & gravity responses)	+TIP	EB1, Bim1	Bisgrove, 2008, Komaki, unpublished
Kinesin family	nd	MT destabilizing?		

*¹MT; microtubule *²nd; not determined, *³PLD; phospholipase D,

*⁴+TIP; microtubule plus-end tracking protein

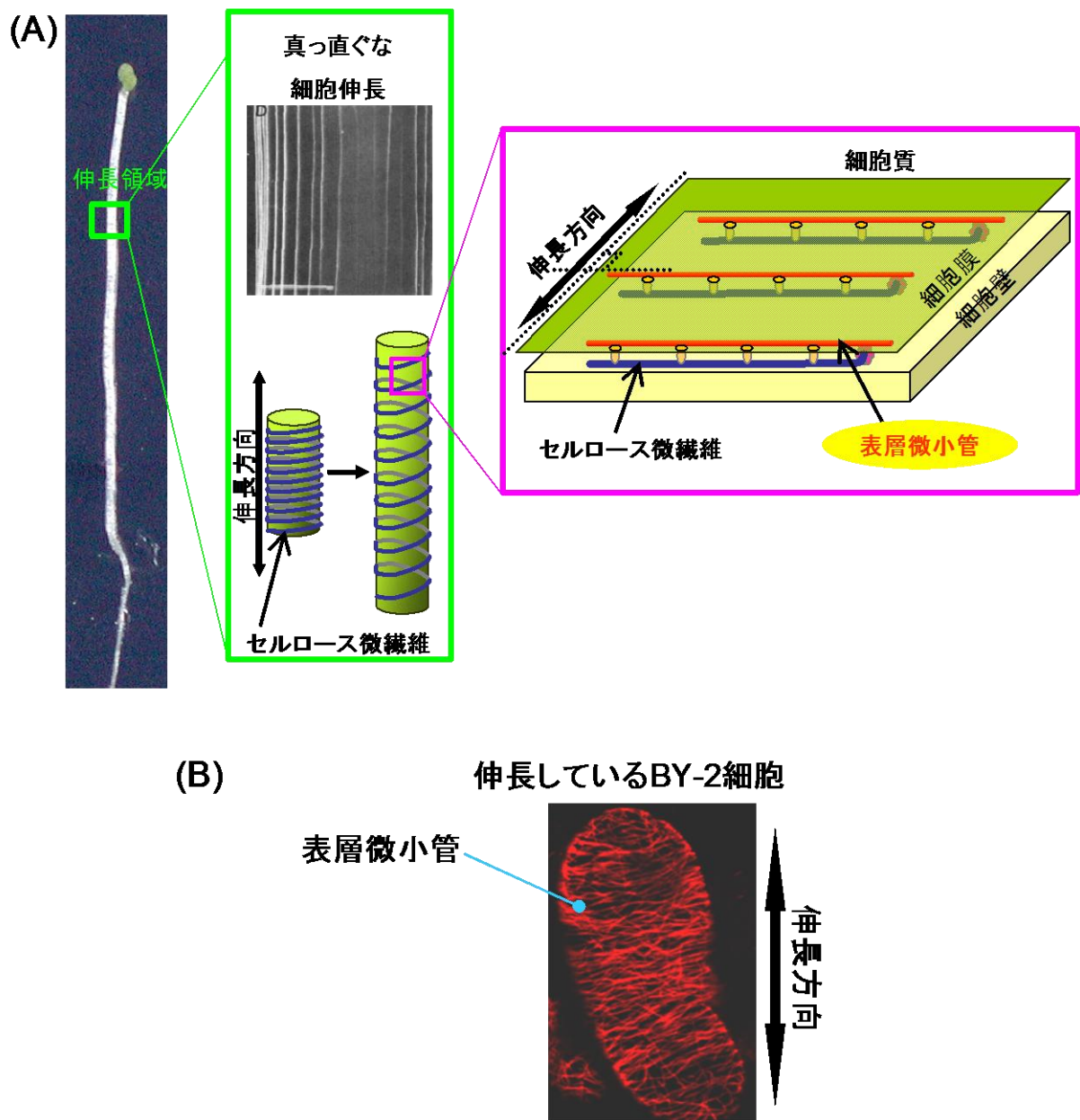


Fig 1. 表層微小管とセルロース微繊維による植物細胞の伸長方向制御

(A) 表層微小管とセルロース微繊維による細胞の伸長方向制御の機構を示すモデル図。

(B) 伸長方向に対して垂直に配向する表層微小管。伸長条件下でのタバコ BY-2 細胞において、抗 α チューブリン抗体による免疫染色により表層微小管を可視化した。

1-3 微小管の性質

ねじれの原因となる微小管の安定性は微小管の動態と構造によって決まると考えられる。微小管は、 α チューブリンと β チューブリンのヘテロ二量体が構成単位となり、それらが重合されることによって形成される、直径約 **25nm** の中空の管状構造物である。この構造物は、重合・脱重合を激しく繰り返す「動的不安定性」という動態に関する特性を持つ。 α 、 β チューブリンはグアニンヌクレオチド(**GTP** もしくは **GDP**)を 1 分子ずつ結合したタンパク質であり、 β チューブリンだけが **GTP** の加水分解及び **GDP-GTP** 交換を行う。そして、それ自身だけで重合及び脱重合する活性を持つ。微小管が重合している時には、 β チューブリンに **GTP** が結合した **GTP** 型のサブユニットが付加する。チューブリンの会合より **GTP** の加水分解がわずかに遅いため、微小管の伸長中の端には **GTP** を結合したサブユニットのキャップ(**GTP** キャップ)ができ、構造を安定化し、伸長をさらに促進する。しかしサブユニットの供給が減少したり、**GTP** の加水分解速度が上がったりすると、**GTP** キャップが消失し伸長速度よりも数百倍速い速度で急激に脱重合し、微小管が収縮する。これが動的不安定性である(Fig.2 , Mitchison et al., 1984)。さらに、その重合及び脱重合の制御には様々な **MAPs** が関わっていることも明らかになってきている。

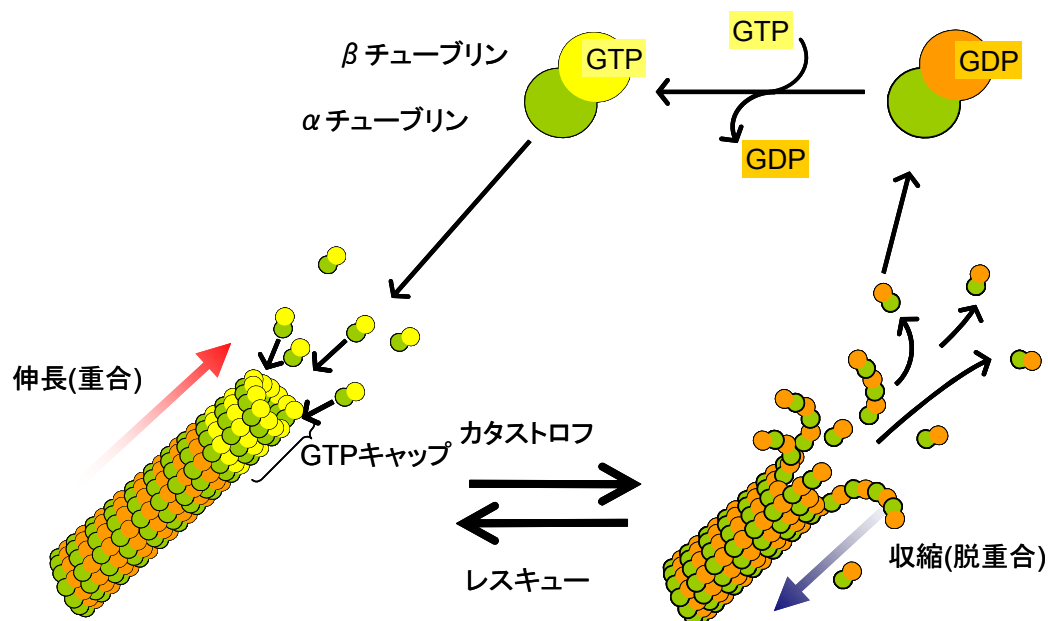


Fig 2. 微小管の動的不安定性

1-4 微小管動態の測定法

微小管の安定性を評価するためには、微小管の動態を測定する必要がある。この測定には細胞内及び *in vitro* で測定する方法が考えられる。細胞内での微小管の重合・脱重合の様子は、チューブリンタンパク質に GFP などの蛍光タンパク質を融合させたものを植物細胞に形質転換することによって観察でき、その動態を記録することができる(Shaw et al., 2003)。当研究室では現在までに、シロイヌナズナの β -tubulin 6 の N 末端側に GFP を融合させたもの(GFP-TUB6)を形質転換した植物体での細胞内の微小管動態測定の系が成立している(Nakamura et al., 2004, Abe et al., 2005)。

in vitro での微小管の動態測定法には、暗視野顕微鏡を用いて、精製したチューブリンから再構成された微小管の動態を記録する方法がある(Horio et al., 1986, Walker et al., 1988, Nakao et al., 2004)。

記録した細胞内及び *in vitro* での微小管動態は、画像解析ソフトを用いて時間経過による微小管の長さの変化として定量化することができる。そこから伸長及び収縮速度、伸長・収縮・停止時間、収縮から伸長に切り換わる頻度(レスキュー頻度)、伸長から収縮に切り換わる頻度(カタストロフ頻度)といった動的不安定性のパラメータを求めることができ、微小管の動態を評価することができる。

1-5 ねじれと微小管動態

ねじれ変異株では、微小管や MAPs の変異によって、表層微小管の配向が傾き、そのために細胞の伸長方向が傾き器官全体がねじれた形質を示したと考えられる。ねじれ変異株における微小管の安定性とねじれ変異をつなぐ分子機構はまだ完全には解明されていない。また、数々のねじれ変異株に共通して起こっている微小管動態の変化も見出されていない。しかしながら、いくつかのねじれ変異株においては微小管動態への影響が報告されている。

シロイヌナズナの α -tubulin 6 の N 末端側に HA や Myc などのタグを融合した改変 α チューブリンを形質転換した植物体では、地上部において右巻きのねじれ形質を示した。これらの植物体に微小管を蛍光標識する GFP-TUB6 を導入し微小管動態を測定した結果、コントロール(GFP-TUB6 のみを持つ形質転換体)に比べて収縮速度が大きく減少し、レスキュー頻度が大きく増加した。このことから、この右巻き変異を引き起こす形質転換体は、微小管が安定化されていることが示唆された。この場合、タグが付加されている位置は三次元構造上、 α チューブリンにある、 β チューブリンの GTP 加水分解を促進する領域の近くであった。そのことから、タグの付加により、チューブリンの GTP 加水分解活性が阻害され、微

小管の安定性が増大し、その結果右巻きねじれが起きたと考えられた(Abe et al., 2005)。この結果はさらに、他のねじれ変異株では、別の機構によって微小管の安定性が変化し、ねじれが引き起こされている可能性があることを示唆した。

1-6 植物 MAPs

微小管の配向は、様々な MAPs によって直接制御されており、その安定性や細胞内局在などが厳密に調節されている。

動物における微小管と MAPs の研究では、遺伝子抑制培養細胞を用いた *in vivo* における解析法と微小管の *in vitro* 再構成系を用いた解析法が確立されており、個々の MAP の機能と微小管の生理機能とのつながりが解明されつつある。微小管脱重合抑制タンパク質である MAP4 や微小管脱重合促進タンパク質である stathmin ファミリーの RB3 では、暗視野顕微鏡を用いて *in vitro* における微小管動態に与える影響が報告されている(Nakao et al., 2004, Permana et al., 2005)。動物 MAPs の *in vitro* での解析が盛んなことの原因としては、ウシまたはブタの脳からのチューブリンの大量精製が容易であることと、微小管重合核としての中心体の調製法が確立されているので、中心体を添加することにより低濃度の微小管でも容易に *in vitro* で重合させることができることが挙げられる。

しかしながら、植物では、その表現型から微小管機能に関わるとされる変異体は数多く発見され、原因遺伝子も明らかにされたが、それらが微小管機能に対してどのような調整をしているかはほとんど明らかになっていない(Table 1)。今までに機能が予想されている、表層微小管に関わる MAPs を Fig 3 に挙げた。これらは、動物や酵母にそのホモログが存在していたため、その微小管に対する機能を推測できた。しかしこれらの因子だけでは、表層微小管の厳密に制御された形成機構をすべて説明することはできなかった。

細胞分裂にできる植物特有の微小管構造である前期前微小管(Preprophase band)の形成には、その形成位置の決定などに、植物特有の微小管付随タンパク質である AIR9 や植物特有の配列が C 末端側に付加した EB1c が機能していることが分かってきた(Buschmann et al., 2006, Van Damme et al., 2007)。同様にして、表層微小管においても動物にはない形成機構が存在していると考えられた。そこで、当研究室で見出された植物特有の MAPs である SPR1 や SPR2 が、植物特有の表層微小管形成の重要な因子である可能性が考えられ、その微小管に対する機能を解明する必要がある。

また植物では、植物由来のチューブリンを大量精製するためには技術と労力が必要であることと、中心体に代わる重合核としての構造物は明確に分かっていないことから、*in vitro* で微小管と植物 MAPs の関連を解析した例は、タバコ

TMBP200(Hamada et al., 2004)やシロイヌナズナ MAP65(Smertenko et al., 2004, Mao et al., 2005)など数例しかなく、植物特有の MAPs の研究のためには、植物に合わせた *in vitro* での実験系を開発・確立する必要があった。そこで、これまでの解析法に加えて、植物に合わせた生化学的及び細胞生物学的手法を用いた実験系を確立し、解析する必要があった。

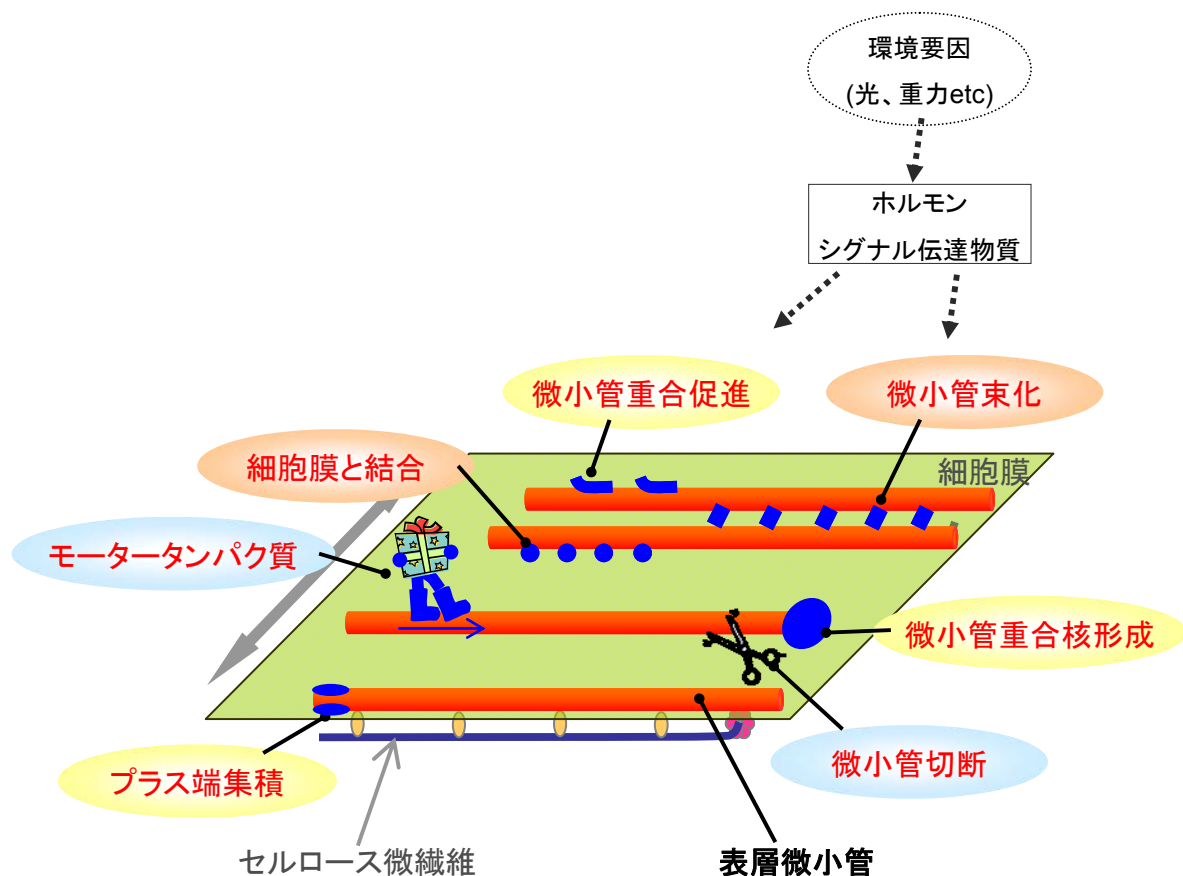


Fig 3. 表層微小管に関わる MAPs

今までに報告されている表層微小管制御に関わる MAPs の機能とその代表タンパク質 (引用は考察を参照)。

1-7 シロイヌナズナ **SPR2** と **SPR2-LIKE (SP2L)**

シロイヌナズナの **SPR2** は、伸長方向に異常のある変異株から単離された (Furutani et al., 2000)。*spr2* 変異株では、黄化胚軸などの伸長組織の表皮細胞において表層微小管が左巻きヘリックス状に配向する割合が増加していたため、細胞の伸長方向が右に「ねじれた」形質を示した。この原因遺伝子のコードするタンパク質である **SPR2** は、タンパク質間相互作用に参与する **HEAT** リピートモチーフ構造をとると考えられるモチーフをもつ (Shoji et al., 2004)。シロイヌナズナのタンパク質の中で **SPR2** と最も相同性の高い **SPR2-LIKE (SP2L)** は、**SPR2** と 53% の同一性があり、*spr2* 変異株内で過剰発現させることによって *spr2* の変異形質が一部回復させたことから、**SPR2** と同様の機能をもつことが予想された (Fig 10A)。また、シロイヌナズナ内の他の **SPR2** と似た配列をもつタンパク質 (At2g07170、At5g62580、At1g59850、At1g27210) は、*spr2* 変異株内で過剰発現させても *spr2* の変異形質が回復しなかったことから、これらのタンパク質には **SPR2** と同様の機能はないことが分かった (若松 (2005) 修士論文)。他種では、ゲノム解析によりポテト、ブドウ、イネ、トマト、ヒメツリガネゴケで、プロテオミクス解析によりタバコで、相同性の高いタンパク質の存在が明らかになっており植物には広く保存されている (Fig 4、Shoji et al., 2004)。しかしながら、全長として似た構造を持つ遺伝子が動物や酵母には存在しない植物特有のタンパク質であった。一方、**SPR2** 同様 **HEAT** リピートモチーフを持つ **MAPs** は多数報告されている。**XMAP215** や **CLASP** などがその例である。これらは、**HEAT** リピートモチーフ内で微小管と結合したり、他のタンパク質と相互作用したりすることから、**HEAT** モチーフを持つ一群の **MAPs** に共通した微小管制御機構の可能性が考えられた (Shoji et al., 2004)。

SPR2 は、*in vitro* において微小管に直接結合することから、植物特有の新規 **MAP** であると考えられた。また、**SPR2** に **GFP** を融合したものをシロイヌナズナやタバコの培養細胞、タマネギ細胞で過剰発現した結果、**SPR2** は表層微小管だけでなく、前期前微小管や紡錘体、フラグモプラストといった分裂期の微小管上にも局在することがわかった (Shoji et al., 2004, 庄司、未発表)。しかしながら、*spr2* 変異株の成長は阻害されていないことから、細胞分裂期における **SPR2** の寄与は小さいと考えられた。以上のことから **SPR2** は表層微小管の配向を介した細胞の伸長方向の決定に直接関与すると考えられた。

これらの結果から、**SPR2** の微小管構造や動態に与える機能を明らかにすることで、植物特有の表層微小管の配向制御に関する重要な知見を得ることができると考えられた。

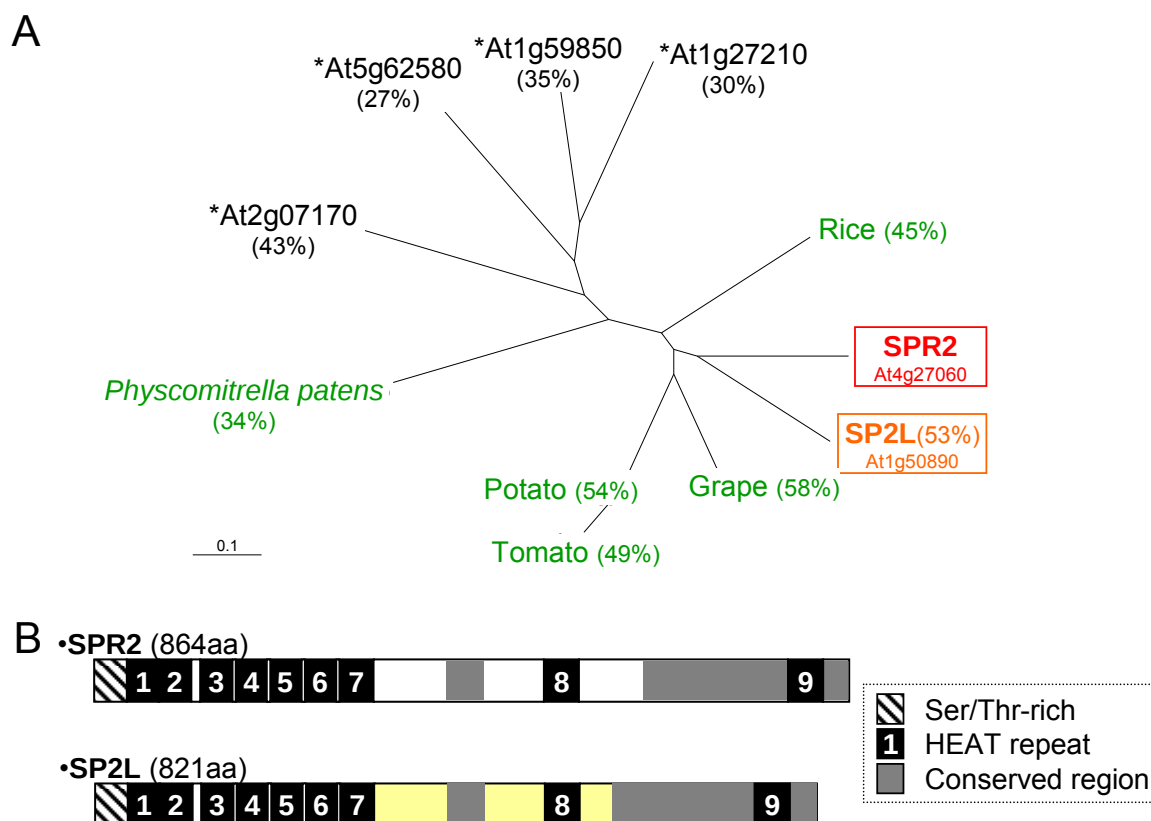


Fig 4. SPR2 のホモログと SPR2 及び SP2L タンパク質の構造

A: Blast search によりデータベースから同定された SPR2 と相同性の高いタンパク質群。ClustalW ソフトを使ってアライメントを作成した後、TreeView ソフトにより系統樹を作成した。()内は SPR2 との同一性。Asterisk(*)のついた遺伝子は、SPR2 と同機能をもたないと考えられた。Green はシロイヌナズナ以外の種のタンパク質で、各タンパク質の anotation・GeneBank ID number は、次の通り。

- Unnamed protein product・CAO38991[*Vitis vinifera*(grape)]
- Potyviral helper component protease-interacting protein 2(HIP2)・CAD45375 [Solanum tuberosum(potato)]
- Putative potyviral helper component protease-interacting protein・BAC19987 [Oryza sativa(rice)]
- CONSTANS interacting protein 7・AAS67375 [*Lycopersicon esculentum* (tomato)]
- Predicted protein・XP_001761528[*Physcomitrella patens*]

B: SPR2 及び SP2L タンパク質の構造。

1-8 シロイヌナズナ **WAVE-DAMPENED2(WVD2)**ファミリー

シロイヌナズナ **WAVE-DAMPENED2(WVD2)**もまた植物特有の微小管付随タンパク質である。**WVD2**は **Ds** タグラインからスクリーニングされ、過剰発現することで植物の成長が阻害され、弱ねじれ形質を示すという変異株から同定された (Yuen et al., 2003)。この変異株では表層微小管の配向が乱れており、微小管機能との関連が示唆された。この遺伝子は、機能未知であるが、シロイヌナズナゲノム内に相同性の高い遺伝子が 7 個あった。これら 8 個の遺伝子は、**KLEEK** という共通配列を含む特に相同性の高いドメイン(**KLEEK** モチーフ)持っていた (Fig 4)。このモチーフ周辺の配列は、タンパク質の二次構造予測ソフトにより、**coiled-coil** 構造を形成することが予想された。また、動物の紡錘体の形成時にはたらく **TPX2** の **C** 末端側の領域と **amino acid composition** の点で似ていることが分かった。**TPX2** は、紡錘体極で微小管を制御するタンパク質(**XKLP2**)の局在化にはたらくことがわかっている。このタンパク質はシロイヌナズナにもオルソログが存在するがその機能は未知であり、**WVD2** とのアミノ酸配列の相同性は低かった (Perrin et al., 2007)。

過剰にあることで表層微小管の配向や細胞の伸長方向に影響を与えたことから、**WVD2** は微小管の安定性を直接制御していることが予想された。このことから、表層微小管の配向制御機構を解明するためには、**WVD2** の微小管動態に与える影響を調べることが重要であると考えられた。

1-9 本研究の目的

本研究では、植物特有の微小管付随タンパク質の機能解析法の確立を目指し、**SPR2** 及び **WVD2** ファミリーの細胞内での局在と表層微小管に与える影響を調べ、その上で **in vitro** での微小管に対する直接的な機能を解明する。それらの結果から、植物特有の表層微小管配向に関する制御機構を明らかにすることを目的とした。

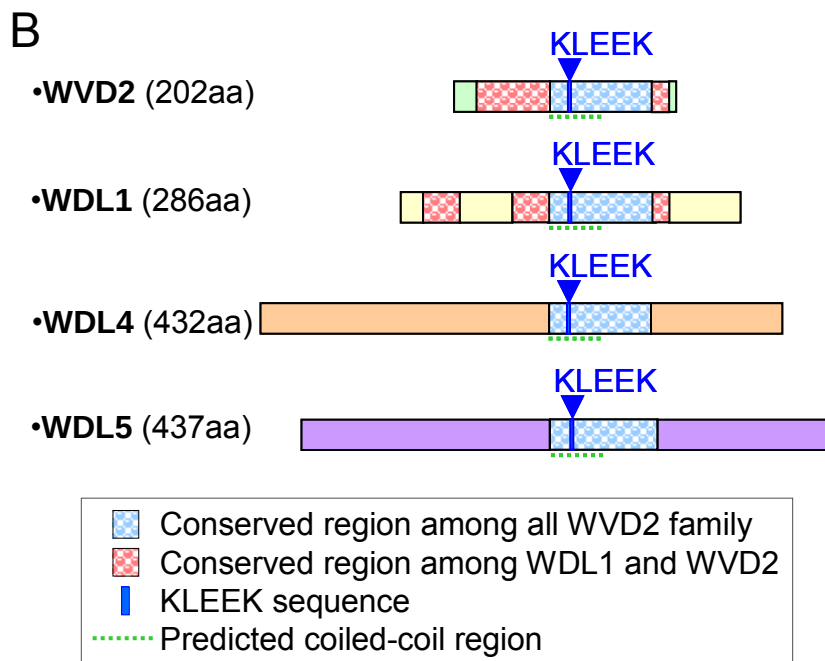
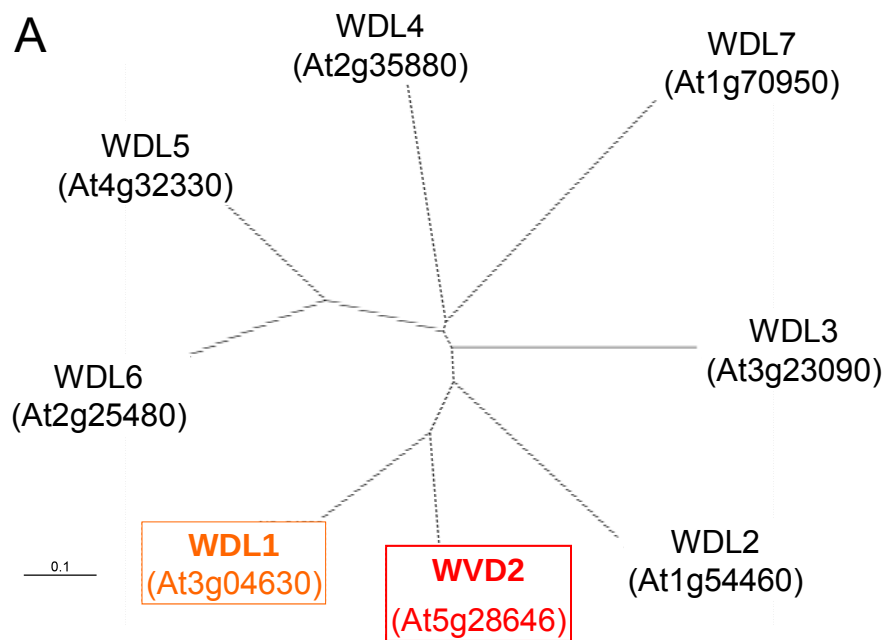


Fig 5. WVD2 ファミリーと WVD2 及び WDL1 タンパク質の構造

A: シロイヌナズナのタンパク質から同定された WVD2 タンパク質ファミリー。ClustalW ソフトを使ってアライメントを作成した後、TreeView ソフトにより系統樹を作成した。

B: 本研究で扱った WVD2、WDL1、WDL4 及び WDL5 のタンパク質の構造。

第 2 部 SPR2 の微小管機能の制御

2-1 目的

これまでの研究で、SPR2-GFP を過剰発現するシロイヌナズナの形質転換系統の解析より、SPR2 は細胞内で表層微小管をはじめとするすべての微小管構造に局在することが分かっている。また *in vitro* での精製組換えタンパク質の共沈実験により、SPR2 の全長配列は微小管と直接結合することが確認されている (Shoji et al., 2004)。以上のことから、SPR2 が微小管機能を制御していることは確かであるが、その機構は全く分かっていない。そこで本研究では、SPR2 の微小管結合領域の特定と、*in vitro* 及び細胞内における微小管動態に与える影響について調べ、SPR2 の微小管に対する機能を明らかにした。

2-2 方法

2-2-1 コンストラクションの作成

シロイヌナズナ、タバコ BY-2 形質転換用コンストラクションは、PCR により Table2A に示したプライマーセット、次に attB1adapter (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') と attB2adapter (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3')のプライマーセットで SPR2c DNA の各断片を増幅した後、Gateway system(Invitrogen)を用いてバイナリーベクター pGWB5 に挿入した。pGWB5 は、挿入遺伝子の C 末端側に GFP が融合し CaMV35S プロモータの制御によって発現するように設計されている (Nakagawa et al., 2007)。タマネギ細胞を用いた一過的発現には PCR により制限酵素認識配列を付加し、増幅した SPR2 及び mCherry cDNA 断片を CaMV35S プロモータと NOS ターミネータが組み込まれている pAN19 ベクターに挿入した。さらに、CaMV35Sp::SPR2-mCherry と CaMV35Sp::GFP-MAP4 の各断片をひとつの pBluescript(pBS)ベクターに組み込み、SPR2-mCherry と GFP-MAP4 が共発現するように設計したコンストラクションも作成した。

大腸菌での組換えタンパク質の発現には、THP-pET、GHP-pET(pET32b ベクター(Novagen)の XbaI-KpnI 間に Trx タグ(THP-pET)もしくは Gst タグ(GHP-pET)、6×His タグ(両ベクターとも)及び PreScission プロテアーゼ切断配列(両ベクターとも)が挿入された改変ベクター)、pGEX 6P-1(GE)及び pCold

TF(Takara)ベクターを用いた。

組換え SPR2 及び SP2L 発現用コンストラクション(GH-SPR2、TH-SPR2N、TH-SPR2M、TH-SPR2C、TH-SPR2N1、TH-SPR2N2、TH-SPR2N3、TH-SPR2N4、TH-SPR2N5、TH-SPR2N6、TH-SPR2N7、TH-SPR2N8、TF-SPR2、TF-SP2L)は、以下に示すように作成した。Table2B に示したプライマーとテンプレートの組み合わせによる PCR 反応により、制限酵素認識配列を付加したシロイヌナズナ SPR2(At4g27060)及び SP2L(At1g50890)の cDNA 全長及び部分長配列を増幅した。そして、制限酵素反応により、3'側を KpnI 切断配列、5'側を Sall、NotI もしくは BamHI 切断配列になった断片を作成した後、THP-pET もしくは GHP-pET ベクターの KpnI-Sall もしくは KpnI-NotI 間、もしくは pCold TF ベクターの KpnI-Sall もしくは KpnI-BamHI 間に挿入した。

組換え EB1 発現コンストラクションは過去に作成されたものを使用した(関(2006)修士論文及び阿部、未発表)。Gst-EB1full(1-293)は pGEX6P-1 にシロイヌナズナ EB1b(At5g62500) cDNA 全長を挿入したもの、GH-EB1ΔN(120-293)は GHP-pET に EB1b cDNA 部分長(120-293 アミノ酸配列)を挿入したもの、FH-EB1ΔN(120-293)は GH-EB1ΔN(120-293)の Gst タグを FLAG タグに置換したものである。

Table.2

植物細胞及び大腸菌発現用コンストラクションの作成に使用したプライマー

A. 植物発現用蛍光タンパク質融合 SPR2 及び MAP4

Construction	Primers	Template	Vector(s) (挿入位置)
•For transformation			
CaMV35Sp:: SPR2N-GFP	5'- AAAAAGCAGGCTCCATGAGCACACCTAC -3' 5'- AGAAAGCTGGGT AAGCACCATCGACATA -3'	Trx-SPR2	pGWB5
CaMV35Sp:: SPR2M-GFP	5'- AAAAAGCAGGCTCTATGTATGTCGATGGTG -3' 5'- AGAAAGCTGGGT TCTCTAGCTGCAACAAC -3'	Trx-SPR2	pGWB5
CaMV35Sp:: SPR2C-GFP	5'-AAAAAGCAGGCTCGATGGGATCCTTCACA-3' 5'- AGAAAGCTGGGTCCCTGTGCGAACTGTTGG -3'	Trx-SPR2	pGWB5
•For transient expression			
CaMV35Sp:: SPR2	5'- AGTCGACGGTATGAGCACACCTACAAC -3' 5'- GTGTCGACCTTGCGAACTGTTGGAG -3'	Trx-SPR2	pAN19(Sall-Sall)
CaMV35Sp:: SPR2-mCherry	5'- GTTGGTACCGACTCTAGAGGATCC-3' 5'- GTTGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCC -3'	mCherry-TUB6 (中村,未発表)	35Sp::SPR2 (KpnI-KpnI), 35Sp::GFP-MAP4 (NotI- NotI)*
CaMV35Sp:: GFP-MAP4	5'- GCCGGTACCTTGTACAAAAAGCAGGC- 3' 5'- GCCGGTACCTTTGTACAAGAAAGCTGG-3'	GFP-MAP4 in pDonr (石田,未発表)	pBS(KpnI-KpnI)*

B. 大腸菌発現用組換え SPR2・SP2L

Construction	Primers	Template	Vector (挿入位置)
GH-SPR2	5'-CAAGGTACCATGAGCACACCTACAAC -3' 5'- TGCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'	TH-SPR2 (Shoji,2004)	GHP-pET (KpnI-Sall)
GH- SPR2 ΔS/N	5'-ATAGGTACCGCAATGGTGGAGCTG-3' 5'- TGCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'	TH-SPR2	GHP-pET (KpnI-Sall)
GH-SPR2 ΔR1-8	5'-GAAGGTACCTATGTCGATGGTGCTTC -3' 5'- TGCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'	TH-SPR2	GHP-pET (KpnI-Sall)
GH- SPR2 ΔC	5'- CCTACGACCTGATGATATCGAAAG-3' 5'- TCTTGGAGTCAACAGCTGTTGG-3'	TH-SPR2	GHP-pET (KpnI-Sall)
GH-SPR2 ΔR8-9	5'-CAAGGTACCATGAGCACACCTACAAC -3' 5'-CATGTCGACACTTGTGAAGGATCC -3'	TH-SPR2	GHP-pET (KpnI-Sall)
TH/GH- SPR2 N	5'-CAAGGTACCATGAGCACACCTACAAC -3' 5'-GAAGCGGCCGCTCAAGCACCATCGACAT-3'	TH-SPR2	THP/GHP-pET (KpnI-NotI)
TH/GH- SPR2 M	5'-GAAGGTACCTATGTCGATGGTGCTTC -3' 5'-CATGTCGACACTTGTGAAGGATCC -3'	TH-SPR2	THP/GHP-pET (KpnI-Sall)
TH/GH- SPR2 C	5'-CAAGGTACCATGGGATCCTTCACAAG -3' 5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	TH-SPR2	THP/GHP-pET (KpnI-Sall)
GH- SPR2 N1	5'-ATAGGTACCGCAATGGTGGAGCTG-3' 5'-GCCGTCGACCTAACCAGTATTAGTC-3'	TH-SPR2	GHP-pET (KpnI-Sall)
GH- SPR2 N2	5'-GAAGGTACCGGTTTCAGCGTCGTTAG-3' 5'-GAAGCGGCCGCTCAAGCACCATCGACAT-3'	TH-SPR2	GHP-pET (KpnI-NotI)
TH- SPR2 N3	5'-ATAGGTACCGCAATGGTGGAGCTG-3' 5'-CACGTCGACTTAACCGCTTGAATGTG-3'	TH-SPR2	THP-pET (KpnI-Sall)
TH- SPR2 N4	5'-ATAGGTACCGCAATGGTGGAGCTG-3' 5'-GAAGTCGACTTACTGAGGTGCAATGGC-3'	TH-SPR2	THP-pET (KpnI-Sall)
TH- SPR2 N5	5'-ATAGGTACCGCAATGGTGGAGCTG-3' 5'-CACGTCGACTCAACTAGCAGCTGATTC-3'	TH-SPR2	THP-pET (KpnI-Sall)
TH- SPR2 N6	5'-ATAGGTACCTGCGATTTCGACGGCTGC-3' 5'-GAAGCGGCCGCTCAAGCACCATCGACAT-3'	TH-SPR2	THP-pET (KpnI-NotI)
TH- SPR2 N7	5'-GAAGGTACCGGTTTCAGCGTCGTTAG-3' 5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	TH-SPR2	THP-pET (KpnI-Sall)
TH- SPR2 N8	5'-GAAGGTACCGGTTTCAGCGTCGTTAG-3' 5'-GAAGTCGACTTACTGAGGTGCAATGGC-3'	TH-SPR2	THP-pET (KpnI-Sall)
GH- SPR2 Cs	5'-CGCGGTACCGATCTTTCGATATCATC-3' 5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	TH-SPR2	GHP-pET (KpnI-Sall)
TF-SPR2	5'-CAAGGTACCATGAGCACACCTACAAC-3' 5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	TH-SPR2	pCold TF (KpnI-Sall)
TF-SP2L	5'-CAAGGTACCATGCGATCACAACC-3' 5'-CCAGGATCCCTACGTGTCAAAATG-3'	TH-SP2L (庄司,未発)	pCold TF (KpnI-BamHI)

2-2-2 植物の生育条件、変異株及び形質転換植物の作出

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は、20%次亜塩素酸及び 2% Triton X-100 の溶液で滅菌処理した種子を、4℃の暗所に3日間放置して春化处理したものを、2%ショ糖と 1.5% Agar を含む *Arabidopsis* nutrient solution の寒天培地に蒔き、22℃の長日条件で(16時間明／8時間暗)下で培地を垂直に立て

て発芽させた。種を 22℃に移した日を 0 日目として日数を数えた。

微小管薬剤感受性調査には、微小管重合阻害剤である 3mM プロピザミド (Wako) のジメチルスルホキシド (DMSO) ストック溶液を作成し、使用濃度に希釈して寒天培地に加えた。春化処理後の種をこの寒天培地に蒔き、7 日目の幼植物を観察した。また、温度感受性調査には、春化処理後の種を蒔いた寒天培地を 29℃の長日条件下発芽させ、4 日目の幼植物を観察した。幼植物の写真は、実体顕微鏡 (OLYMPUS SXZ12) とカメラ (OLYMPUS DP70) もしくはデジタルカメラで撮影した。根の伸長角度や長さの測定は画像解析ソフト Image J ver. 1.37 (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) を利用した。

タバコ BY-2 細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow NO.2) は、BY-2 用液体培地 [0.46% ムラシゲ・スーク培地用混合塩類 (和光純薬)、3% sucrose、0.05% MES、0.02% KH₂PO₄、0.0002% Myo-inositol、0.01% Thiamine-HCl、1μM 2,4-D、pH5.7] 100ml (300ml 三角フラスコ内) で、Incubator shaker RLS-64R-135 (サンキ精機) を使い、110rpm、27℃、暗所で振盪培養した。7 日毎に増殖した BY-2 細胞懸濁培養液 1ml を新しい培地 100ml に移植して継代培養した。また細胞を長期間維持する際には、0.3% グランガムと適当な抗生物質を含む BY-2 固形培地で、28℃暗所にて培養した。

本研究で用いたシロイヌナズナ変異株とその変異の種類、引用を Table.3 に示した。また変異の挿入位置を Fig 6 に示した。

本研究で新たに作出したシロイヌナズナ及び BY-2 細胞の形質転換系統は、過去に報告された方法に従い、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) MP90 株もしくは EHA105 株を用いて作成した (シロイヌナズナ; Clough and Bent, 1998, BY-2 細胞; 矢尾 (2004) 修士論文)。

シロイヌナズナの SPR2-GFP genomic 形質転換系統 (*spr2-2* 変異株に導入) は、若松 (2005) 修士論文で作成されたものを用いた。また、SP2L-GFP genomic は、*sp2l-2* 株に導入 (若松 (2005) 修士論文) した系統の他に、*sp2l-1* 株、*sp2l-3* 株及び *spr2-2sp2l-1* 二重変異株に導入した系統を作成した。これらの導入遺伝子の構造を Fig.6 に示した。それぞれコード領域の開始コドン (ATG) の上流 2kb と終止コドンの下流 1kb を含む SPR2 及び SP2L のゲノム配列に終止コドンの手前に 2×rsGFP を挿入した遺伝子配列である (Fig 6)。

GFP-TUB6、GFP-EB1b 及び mCherry-TUB6 (全て Col background) は、過去に作成された株を使用した (Nakamura et al., 2004, Abe et al., 2005、中村未発表)。それぞれシロイヌナズナ β-tubulin6 の N 末端側に smrsGFP を融合し、CaMV35S プロモーター制御下で過剰発現するように設計されたコンストラクトを導入し微小管を標識する系統、シロイヌナズナ EB1b に GFP を融合し CaMV35S プロモーター制御下で過剰発現するように設計されたコンストラクトを

導入し伸長している微小管プラス端を標識する形質転換系統である。

Table 3. 本研究で使したシロイヌナズナ変異株

Mutant name	Gene(locus)	Mutation type	Reference
<i>spr2-1</i>	<i>SPR2</i> (At4g27060)	Frame shift (A1649△)	Shoji, 2004
<i>spr2-2</i>	<i>SPR2</i>	Splicing defect (3rd exon)	Shoji, 2004
<i>spr2-3</i>	<i>SPR2</i>	Stop (C1585T)	Shoji, 2004
<i>sp2l-1</i>	<i>SP2L</i> (At1g50890)	T-DNA insertion (UWBC stock, 1st intron)	本研究
<i>sp2l-2</i>	<i>SP2L</i>	T-DNA insertion (SALK 022516, 1st exon)	若松(2005)修論
<i>sp2l-3</i>	<i>SP2L</i>	T-DNA insertion (SALK_142747, 3rd exon)	本研究
<i>eb1a</i>	<i>EB1a</i> (At3g47690)	T-DNA insertion (WisDsLox481-484J12)	小牧、未発表
<i>eb1c</i>	<i>EB1c</i> (At5g67270)	T-DNA insertion (SALK 018475)	小牧、未発表
<i>mor1-1</i>	<i>MOR1</i>	Replace (T521C)	Whittington, 2001
<i>clasp-2</i>	<i>CLASP</i> (At2g20190)	T-DNA insertion (SALK 083034)	Kirik, 2007
<i>phs1-1</i>	<i>PHS1</i>	Replace (C190T)	Naoi, 2004
<i>spr2-2 spr2l-1</i>		Double mutant	本研究
<i>spr2-3 spr2l-3</i>		Double mutant	本研究
<i>spr2-2 spr2l-1 eb1a</i>		Triple mutant	本研究
<i>spr2-2 mor1-1</i>		Double mutant	本研究
<i>spr2-2 phs1-1</i>		Double mutant	本研究

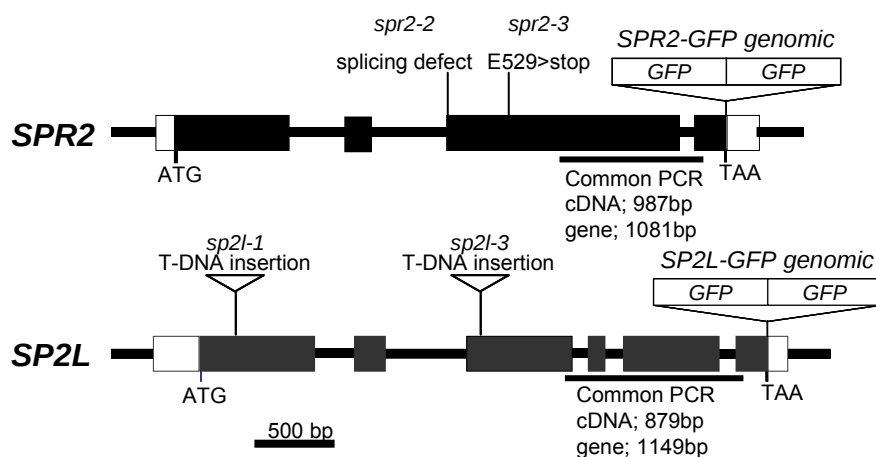


Fig 6. シロイヌナズナ *SPR2* 及び *SP2L* 遺伝子の構造

Box はエキソン、Black box はコード領域を示す。本研究で使した各変異株の変異の挿入位置、*SPR2*-GFP genomic 及び *SP2L*-GFP genomic の GFP 挿入位置、RT-PCR で検出される断片の位置を示した。

2-2-3 SPR2 及び SP2L の遺伝子発現解析

Rneasy Plant Mini kit(QIAGEN)を用いて、発芽 2 週間後のシロイヌナズナの野生株及び変異株の幼植物から全 RNA を抽出した。また、野生型の各器官(根、胚軸、子葉、ロゼット葉、カオライン葉、茎、花序及び鞘)の全 RNA も同様に抽出した。抽出した RNA 1µg を鋳型として、Oligo(dT)プライマー(Invitrogen)、スーパースクリプト II 逆転写酵素(Invitrogen)を用いて常法に従い逆転写反応を行った。さらに、その cDNA を鋳型にして以下に示した組成及び条件で Table 4 に示したプライマーセットを用いた PCR 反応を行い、アガロース電気泳動で導入した遺伝子の発現を確認した。この PCR から検出される DNA 断片の位置とサイズを Fig 6 に示した。Actin8cDNA の検出はコントロールとして利用した。発現量の定量解析には画像解析ソフト ImageJ.を使用した。

PCR 反応液の組成(10µl 中)

- D.W.
- 10×ExTaq buffer(Takara) 1.0µl
- 2.5mM dNTP(Takara) 1.0µl
- primer 各 0.2pmole
- cDNA 1.0µl
- ExTaq(Takara) 0.10µl

PCR 反応条件

94℃ 3min

→ [94℃ 30sec→55℃ 30sec→72℃ 60sec]×30cycles

→ 72℃ 3min→ 4℃

Table4. RT-PCR 解析に用いたプライマー

プライマーセット	配列	検出遺伝子 (検出サイズ(bp))
SPR2 RT	5'- TGGTGCAGTCCCTCGTCCAACC -3' 5'- GTTCCATTGGAAGTCCAAACGT -3'	SPR2cDNA (380)
SP2L RT	5'- CTGTGGAACATCAAGGAATAGG -3' 5'- ACTCCAACGGTATTCCCATAAA -3'	SP2LcDNA (386)
SPR2/SP2L common	5'- GCA <u>C/G</u> <u>T/C</u> T <u>G/A</u> GAGAGACAACAAAC -3' 5'- GG <u>A/C</u> GC <u>T/A</u> <u>A/G</u> GACCTTCCCAGTC -3'	SPR2cDNA(987)・ SPR2cDNA(879)
Actin8	5'- ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA-3' 5'- TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC -3'	

2-2-4 SPR2 及び SP2L の細胞内局在解析

シロイヌナズナの SPR2-GFP genomic 及び SP2L-GFP genomic 形質転換植物を用いて、発芽後 3 日目の子葉、胚軸、根における GFP 蛍光の局在を共焦点レーザー顕微鏡(Nikon C1)で観察した。

さらに、共焦点レーザー顕微鏡(横川 CSU10)を用いて、発芽後 3 日目の SPR2-GFP genomic 形質転換系統の根、胚軸及び子葉の表皮細胞における SPR2-GFP の経時的変化を観察した。記録は 4 秒間隔で 5 分間連続画像を撮影した。画像解析には、画像解析ソフト ImageJ を用いて SPR2-GFP の動きを示すキモグラフを作成した。また比較対象として GFP-TUB6 及び GFP-EB1b 形質転換系統の発芽後 3 日目の子葉の表皮細胞も行った。

2-2-5 細胞内の表層微小管の配向及び動態解析

微小管動態の観察には、GFP-TUB6 形質転換系統を用いた。交配により、*spr2-2*、*spr2-3*、*spr2-2sp2l-1*、*spr2-3sp2l-3*、SPR2ox; *spr2-2* 各変異株及び形質転換株に GFP-TUB6 を導入した。

まず共焦点レーザー顕微鏡(Nikon C1)を用いて GFP-TUB6 を導入した各 *spr2* 変異株の発芽後 4 日目の胚軸上部及び葉柄基部の表皮細胞の表層微小管の観察を行った。そして ImageJ を用いて微小管の配向角度の測定を行った。

また、共焦点レーザー顕微鏡(横川 CSU10)で発芽後 4 日目の胚軸上部及び子葉の表皮細胞の表層微小管の経時的変化を観察し、*spr2* 変異による微小管動態に与える影響を調べた。記録は 4 秒間隔で 5 分間連続画像を撮影した。画像解析には、画像解析ソフト Scion Image(Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA)と Dynamics マクロ(Nakamura et al., 2003)を用いて、微小管の長さの変化を定量化するためのヒストリープロットを作成した。各サンプル 15 本以上の微小管のプラス端、マイナス端についてそれぞれ 3 回測定した平均を数値とした。動態を評価するパラメータは、4 秒以上 1 μ m/min 以上の速度で動かなかった時を「停止」、それより長くなった時を「伸長」、短くなった時を「収縮」と定義してヒストリープロットの位置座標から算出した。

Table5. 動態を解析した微小管数と測定時間

Sample name	Hypocotyl				Cotyledon	
	Plus end		Minus end		Plus end	
	MT NO.	Total time (min)	MT NO.	Total time (min)	MT NO.	Total time (min)
Control	23	38.575	15	23.442	15	30.934
<i>spr2-2</i>	32	58.828	15	30.695	20	40.999
<i>spr2-2sp2l-1</i>	22	50.734	nd	nd	nd	nd
SPR2ox; <i>spr2-2</i>	22	36.800	nd	nd	nd	nd

MT; microtubule, nd; not determined

伸長している微小管プラス端の動態解析には、GFP-EB1b 形質転換系統を使用した。交配により、*spr2-2*、*spr2-3*、*spr2-2sp2l-1*、*spr2-3sp2l-3* 各変異株に GFP-EB1b を導入した。発芽後 4 日目の胚軸上部及び葉柄基部の表皮細胞の表層を共焦点レーザー顕微鏡(横川 CSU10)で観察し、2 秒もしくは 4 秒間隔で 5 分間連続画像を撮影した。画像解析には ImageJ を使用し、GFP-EB1 b 蛍光の軌跡の記録と、移動時間、移動距離の測定を行った。

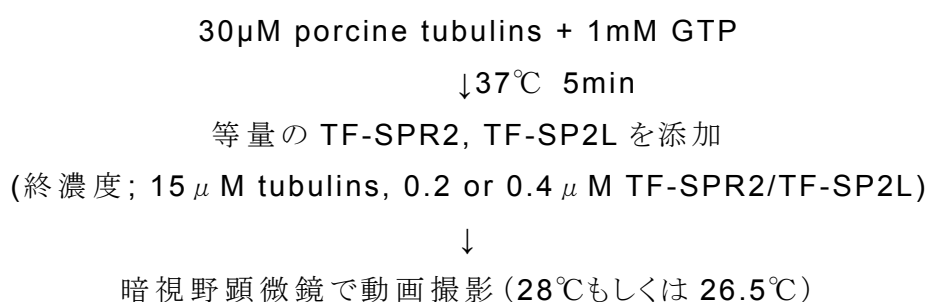
2-2-6 in vitro 微小管の動態解析

実験に使用したチューブリンはブタ脳から精製した。精製法は名古屋大学伊藤知彦助教授の方法(Ito et al., 1997) を採用し、ブタ脳は京都食肉市場内、いけだ食品で購入した。組換え TF、TF-SPR2、TF-SP2L 及び TH-SPR2N は、大腸菌 BL21(DE3)もしくは Rosseta(DE3)株に導入し、0.6mM IPTG を添加後、37℃、3 時間(TF、TH-SPR2N)もしくは 16℃、20 時間(TF-SPR2、TF-SP2L)で発現誘導した。発現誘導した菌を遠心により回収し、超音波処理により細胞を破壊、遠心によりライセートを得た。その後、Ni-NTA agarose (Qiagen)と Q sepharose (GE)を用いて、それぞれ Qiagen、GE のプロトコールに従い精製した。精製バッファーもプロトコールの推奨バッファーを用い、精製の最終段階に PD-10 カラム(GE)を用いて PEM バッファー[0.1M Pipes(pH7.0), 1mM EGTA, 1mM MgCl₂]に置換し、必要に応じて Amicon Ultra (Millipore)を用いて濃縮した。

Nakao et al., 2004 らの方法を参考にして、Chart 1.で示した手順で、微小管を再構成した後、精製 TF、TF-SPR2、TF-SP2L もしくは TH-SPR2N を

0.2 μ M もしくは 0.4 μ M 加え、暗視野用コンデンサ (Nikon Darkfield Condenser) を装置した暗視野顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E600) を使って 28℃もしくは 26.5℃で観察した。記録は、TF、TF-SPR2、TF-SP2L もしくは TH-SPR2N 添加後、約 2 分後から約 15 分間赤外 CCD カメラ(OLYMPUS TR-1000)を使ってビデオ撮影を行った。

Chart 1. 暗視野顕微鏡を用いた in vitro での微小管の動態解析



撮影したビデオ画像は、画像ソフト NIH Image と名古屋大学伊藤知彦助教授から頂いた Darkfield 用 dynamics マクロを使用し、微小管の長さの変化を定量化した。この実験系においては微小管のマイナス端はスライドガラスにはり付き長さの変化が少ないことから(Nakao et al., 2004)、長さの変化が激しい端をプラス端とし、プラス端とマイナス端を分けて測定した。

各サンプルの測定した微小管(MT)の数と総測定時間を Table 6.に示した。TF は、組換えタンパク質添加についてのコントロールとした。動態を評価するパラメータは、0.5 分以上連続して 0.16 μ m/min 以上の速度で動かなかった時を「停止」、それより長くなった時を「伸長」、短くなった時を「収縮」と定義してヒストリープロットの位置座標から算出した。

Table 6. 各サンプルの測定した微小管数と測定時間**A. 28℃で観察**

Sample name	Concentration (μM)	Plus end		Minus end	
		MT NO.	Total time (min)	MT NO.	Total time (min)
TF	0.2	16	136.89	14	134.77
	0.4	12	130.91	11	116.84
TF-SPR2	0.2	28	333.14	9	123.12
	0.4	17	204.52	11	136.47
TF-SP2L	0.2	20	245.43	10	111.83
	0.4	20	249.84	11	143.84

B. 26.5℃で観察

Sample name	Concentration (μM)	Plus end		Minus end	
		MT NO.	Total time (min)	MT NO.	Total time (min)
No addition	-	10	103.55		nd
TF-SPR2	0.4	11	109.23		nd
TH-SPR2N	0.4	8	110.33		nd

MT; microtubule, nd; not determined

濁度法を利用した微小管重合度の定量解析は、PEM バッファーに溶解した、ブタ脳精製チューブリンと大腸菌精製 TF-SPR2 組換えタンパク質を使用した。37℃、5 分間で前処理した 35 μM tubulin 37.5 μl に 1 μM TF-SPR2 を 37.5 μl 添加し、ピペットマンで 5 回ピペッティングした(終濃度は 17.5 μM tubulin、0.5 μM TF-SPR2)。その後、あらかじめ 37℃に保温しておいたキュベット(70 μl サイズ)に移し、温度制御マシン(CPS-240A, SHIMAZU)で 37℃に制御された分光光度計(UV-mini1240, SHIMAZU)を用いて、350nm の波長で 1 分毎に 30 分間、濁度を測定した。TF-SPR2 の代わりに等量の PEM バッファーを添加したものをコントロールとした。

2-2-7 in vitro 微小管結合実験

組換え SPR2 及び SP2L(TH-SPR2 Full、TH-SPR2 N、TH-SPR2 M、TH-SPR2 C、TH-SPR2 N3、TH-SPR2 N4、TH-SPR2 N5、TH-SPR2 N6、TH-SPR2 N7、TH-SPR2 N8、TF-SP2L)は、大腸菌 BL21(DE3)もしくは Rosseta(DE3)株に導入し、0.6mM IPTG を添加後、37℃、3 時間(TH-SPR2 N、M、C、N3、N4、N5、N6、N7、N8))もしくは 16℃、20 時間(TF-SPR2、TF-SP2L)で発現誘導した。発現誘導した菌を遠心により回収し、超音波処理

により細胞を破壊、遠心によりライセートを得た。その後、Ni-NTA agarose (Qiagen)と Q sepharose (GE)を用いて、それぞれ Qiagen、GE のプロトコールに従い精製した。精製バッファーもプロトコールの推奨バッファーを用い、精製の最終段階に PD-10 カラム(GE)を用いて PEM バッファーに置換し、必要に応じて Amicon Ultra (Millipore)を用いて濃縮した。

精製した組換え SPR2 及び SP2L とウシ脳チューブリン(Cytoskeleton)を用い、遠心による共沈殿法で微小管結合性を調べた。手順は Chart 2.に従って行った。微小管重合剤であるタキソールと保温(37℃)により形成した安定した微小管に組換え SPR2 及び SP2L を添加し、微小管が沈殿するような強さ(100,000g)で遠心することによって、微小管と微小管に結合するもの(沈殿画分)と結合しないもの(上清画分)にわけた。その後、各画分を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色もしくは抗 His tag 抗体を用いたイムノブロッティングにより確認し、微小管結合性を検定した。

Chart 2. in vitro 微小管結合実験



2-2-8 微小管プラス端集積タンパク質との相互作用の検証

GST Pull-down 解析は、精製した大腸菌由来組換えタンパク質及びブタ脳から精製したチューブリンタンパク質を用いて Table 7.で示した組み合わせで行った。アスタリスク(*)のついた組み合わせはコントロールとした。まず、1.2μM GST 融合タンパク質(GH、GH-SPR2、Gst-EB1full、GH-EB1ΔN)1.8ml と、洗浄バッファー(20mM Tris-HCl (pH7.4))で平衡化した Glutathione Sepharose 4B(GE)100μl bed-volume とを 2ml エッペンドルフチューブ内で 4℃、2 時間混合した。4℃、5000rpm、3 分間遠心し、上清を除いた後、洗浄バッファー1.5ml

を加え、4℃、5000rpm、5 分間洗浄し、遠心して上清を除いた。さらに、0.9μM Added protein(TF、TF-SPR2、TH-SPR2N、TH-SPRM、FH-EB1ΔN、Tubulin)を添加し、4℃、3 時間混合した。その後、洗浄バッファー1.5ml で 3 回洗浄した。最後に溶出バッファー(50mM Glutathione (pH8.0))100μl を加え、室温で 10 分間混合した後、4℃、5000rpm、5 分遠心し、上清を回収した(Eluted 画分)。添加したのタンパク質と同組、同濃度のタンパク質の混合物を Input 画分とし、Eluted 画分とともに、SDS-PAGE 電気泳動と CBB 染色でシグナルを確認した。Yeast two-hybrid 解析は過去に報告された方法に従って Table 8.で示した組合せで行った(安永(2003)修士論文)。アスタリスク(*) のついた組み合わせをコントロールとした。

Table 7. GST Pull-down 解析を行ったタンパク質の組合せ

		Column-coupled proteins			
		GH	GH-SPR2	Gst-EB1ful	GH-EB1ΔN
Added proteins	TF	nd	nd	nd	Determined*
	TF-SPR2	Determined *	Determined	Determined	Determined
	TH-SPR2N	Determined *	nd	nd	Determined
	TH-SPRM	Determined *	nd	nd	Determined
	FH-EB1ΔN	Determined *	Determined	nd	nd
	Tubulin	Determined *	Determined	nd	nd

nd; not determined

Table 8. Yeast two-hybrid 解析を行ったタンパク質の組合せ

		AD		
		pGAD	SPR2-pGAD	EB1ΔN-pGAD
B D	pGBK	nd	Determined*	Determined*
	SPR2-pGBK	Determined*	Determined	Determined
	EB1ΔN -pGBK	Determined*	Determined	nd
	CLASP-pGBK	nd	Determined	nd

2-3 結果

2-3-1 *spr2sp2l* 二重変異株

SP2L は、SPR2 と高い相同性を示すが、その機能は分かっていない。SPR2 の単一劣勢変異株 (*spr2-1*、*spr2-2*、*spr2-3*) は、特に地上部の器官でねじれ形質を示す。そこで、SP2L 遺伝子が T-DNA 挿入により機能欠損することが期待される *sp2l-1* 変異株を用いて、SPR2 と SP2L の遺伝学的な関係についても調べた。

RT-PCR 法を用いて *spr2* 及び *sp2l* 変異株における SPR2、SP2L 遺伝子の発現を調べた。*spr2-2* 変異株では SPR2 遺伝子のわずかな発現は見られるが、タンパク質はほとんど蓄積していないことが分かっている(Shoji et al., 2004)ことから、変異型 SPR2 は細胞内で機能していないと考えられた。SP2L 遺伝子については *sp2l-1* 及び *sp2l-3* 変異株では遺伝子発現が確認されず、*sp2l-2* 変異株では遺伝子が発現しており遺伝子が破壊されていないことが分かった(Fig 7、data not shown)。

spr2 変異株(*spr2-2* 及び *spr2-3*)は黄化胚軸で表皮細胞列が右ねじれを示し、葉柄、花などの地上部の組織において反時計回りのねじれ形質が見られた(Fig 8A)。根の伸長速度は野生株よりも若干遅く、伸長方向はわずかに右に傾いて伸長する程度で野生株(Col)に近い表現型を示した。一方、遺伝子破壊株である *sp2l-1* 及び *sp2l-3* 変異株は根においても地上部においても顕著な表現型は示さなかった。それらに対して各 *spr2sp2l* 二重変異株では、根の伸長方向が *spr2* 単一変異株よりも、右に傾く形質が現れた(Fig 9)。また地上部ではそれぞれの *spr2* 単一変異株よりも強いねじれが葉柄や茎などで見られた(Fig 8)。また、成熟した植物体においても、*spr2* 単一変異株を強調するようなねじれ形質が維持され、主茎が支柱にまきつくような表現型を示した(Fig 10)。

さらに、微小管重合阻害剤であるプロピザミド培地で生育させ、微小管薬剤による影響を調べた。 $3\mu\text{M}$ プロピザミド添加時において、*spr2-2* 変異株は野生型に対してやや高感受性を示し、根の伸長阻害が見られた。*sp2l-1* 変異株への影響は野生型とあまり変わらなかったが、*spr2-2sp2l-1* 二重変異株では *spr2-2* 変異株よりも強い根の伸長阻害が起き、高い感受性を示した(Fig 9)。

以上のことから *spr2-2sp2l-1* 二重変異株は *spr2-2* の形質を強調したことが分かり、SPR2 と SP2L は重複した機能を持っていると考えられた。

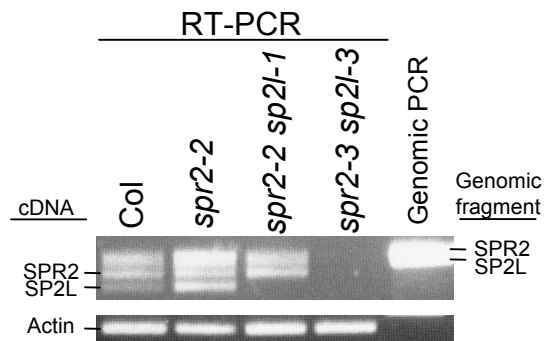


Fig 7. *spr2* 及び *spr2sp2l* 変異株における SPR2、SP2L の発現

Col、*spr2-2*、*spr2-2sp2l-1* 及び *spr2-3sp2l-3* の幼植物から cDNA を合成し、Fig 4 で示した common PCR プライマーを使った RT-PCR を行った。サイズの違いにより、SPR2 cDNA、SP2L cDNA、SPR2 genomic DNA、SP2L genomic DNA の各シグナルがアガロースゲル電気泳動で分離でき、各変異株における遺伝子発現の有無を検出した。Actin はコントロールとした。

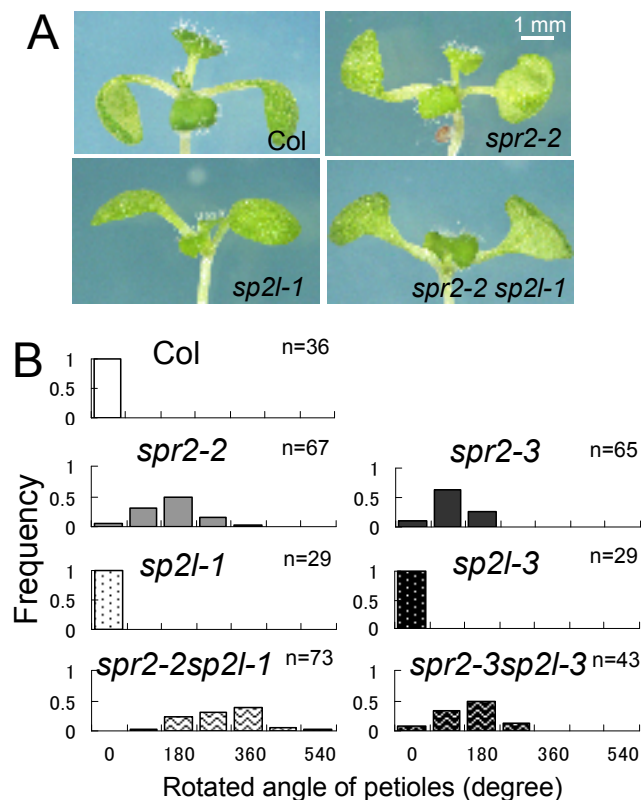


Fig 8. *spr2* 及び *spr2sp2l* における葉柄のねじれ

A: 発芽後 9 日目の幼植物。子葉の葉柄が、*spr2-2* では約 180°、*spr2-2sp2l-1* では約 360° 回転していた。

B: 発芽後 2 週間の幼植物における子葉の葉柄の回転角度。

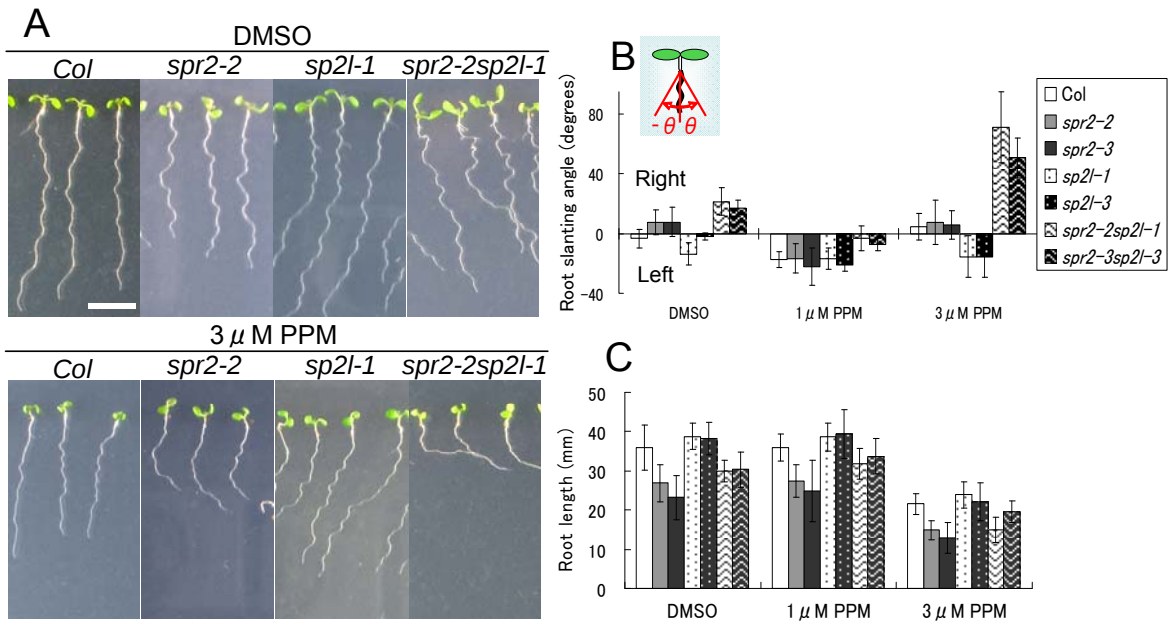


Fig 9. *spr2* 及び *spr2sp2l* における根の微小管薬剤に対する応答性

A: 微小管重合阻害剤プロピザミド非存在(upper)及び存在(lower) の、垂直に立てた寒天培地プレートで育てた発芽後 7 日目の幼植物。

BC: 垂直に立てた寒天培地プレートで育てた発芽後 7 日目の幼植物の根の伸長角度(B)及び根の長さ(C)。角度は重力方向と根に挟まれた角度を測定した。重力方向を 0° とし、それより左側が $\theta < 0$ 、右側が $\theta > 0$ とした。

PPM; propyzamide



Fig 10. 成熟した *spr2sp2l* 植物体

→の指す地点で竹軸に巻きついている様子が観察された。

2-3-2 SPR2 及び SP2L の細胞内局在と SPR2 の動態

シロイヌナズナの各器官における SPR2 と SP2L の発現量の比較を行った。SPR2、SP2L の cDNA 配列に共通して結合するが、電気泳動で検出されるサイズの違いによって SPR2 と SP2L を分離できるプライマーのセット(Fig 4; SPR2/SP2L common)を用いて、根、胚軸、子葉、ロゼット葉、カオライン葉、花序、鞘から精製した cDNA に対して RT-PCR を行った。その結果、全ての器官において SPR2 の発現量が SP2L の発現量を上回っていた(Fig 11)。

さらに、SPR2-GFP genomic 及び SP2L-GFP genomic 形質転換系統を用いて SPR2 及び SP2L の発現組織と発現量を GFP 蛍光シグナルによって調べた。SPR2-GFP genomic の導入により、*spr2-2* 変異株の器官がねじれるという変異形質が回復することから、SPR2-GFP genomic は植物体内で機能することが確認された(Fig 12B)。一方、SP2L-GFP genomic の導入により、*sp2l-1*、*sp2l-3* 各変異系統の形質に変化はなく、*sp2-2sp2l-1* 系統は *spr2-2* 単一変異株と同等の表現型を示した。このことから SP2L-GFP genomic は、植物体内で機能できることが推測された(data not shown)。これら形質転換系統の幼植物において、全体的に SPR2-GFP genomicの方が SP2L-GFP genomicよりもシグナルが強く、特に子葉、頂端分裂組織(SAM)の周辺部、根端で強い蛍光が観察された。SP2L-GFP genomic は、子葉の排水組織、根毛、根端でのみ蛍光が観察された。(Fig 12C)

また、SPR2 はマイクロアレイに基づくシロイヌナズナ遺伝子の器官ごとの発現プロファイルのデータベースである GeneAtlas (Genevestigator,; <https://www.genevestigator.ethz.ch/at/index.php?page=-1reason=inexistent>)を用いて SPR2 及び SP2L の発現プロファイルでも RT-PCR の結果同様、SPR2 は植物全体で発現し、SP2L は特に根毛と花粉でだけ発現が強いことが分かった。

次に SPR2 及び SP2L の細胞内局在を調べるため、SPR2-GFP genomic(以下、SPR2-GFP と省略する)及び SP2L-GFP genomic (以下、SP2L-GFP と省略する)形質転換植物の GFP 蛍光の局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、SPR2-GFP は、根や胚軸、葉などの組織の細胞表面で強い蛍光の「連続したドット」状及び弱い蛍光の「繊維」状として局在していた。これは、過去の研究で作成された SPR2-GFP を過剰発現した系統(CaMV35Sp::SPR2-GFP;*spr2-2*)と蛍光強度は異なるが、同様の局在様式であった(Shoji et al., 2004)。この局在は、表層微小管上で SPR2-GFP が何らかの複合体として局在していることを示唆した。また、SP2L-GFP は、根の表皮細胞や根毛においてドット状及び繊維状の局在を示した。このことから、SP2L が強

く発現している細胞において、SP2LはSPR2と同様の微小管局在様式であることが考えられた(Fig 13A)。

さらに、SPR2の細胞内での動態を調べるために、SPR2-GFP形質転換植物の時間経過によるSPR2-GFPの局在変化を観察した。胚軸及び根の表皮細胞表面において、SPR2-GFPのドット状の局在は、微小管上と考えられる線上で移動しているものと停止しているものが同時に存在していることがわかった。さらに停止しているドットは、2本の微小管が交差している位置で停止しているように見えた(Fig 13B)。また、動いているドットは微小管上と考えられる同一線上を移動し、その移動方向と速度から、次の3つのパターンに分類できた。

- 1, 遅い速度($10\ \mu\text{m}/\text{min}$ 未満)で一方向に移動した(Fig 13C;*1)。
- 2, 速い速度($10\ \mu\text{m}/\text{min}$ 以上)で一方向に移動した(Fig 13C;*2)。
- 3, 他のドットとの融合や二つのドットへの分離を起こしながら両方向に移動した(Fig 13D)。

この移動様式から、1は微小管の伸長している端に結合しているもの、2は微小管の収縮している端に結合しているもの、3は微小管の側面に結合し両方向に移動しているものであると推測された。

さらに、子葉の孔辺細胞におけるドットの移動を観察すると、内から外へ移動するドットが多く、調べたドットのうちの82%が内から外に向かって移動していた(Fig.15)。この蛍光シグナルの変化を、微小管全長を標識するGFP-TUB6マーカースystemと微小管の伸長しているプラス端のみを標識するGFP-EB1bマーカースystemの孔辺細胞での蛍光シグナルの動きと比較することで、SPR2の微小管局在位置を推測した。時間経過に伴う変化を示すキモグラフから、SPR2-GFPの局在は、微小管全体を標識しているGFP-TUB6よりも、伸長している微小管の端に濃縮されているGFP-EB1bの方がドット状の局在や細胞の内から外へという移動の方向性の点で似ていた。このことから、SPR2の中でも移動しているものの少なくとも一部は微小管のプラス端に局在している可能性が考えられた(Fig 14)。

最後に細胞内の表層微小管とSPR2の関連をさらに詳細に解析するため、微小管とSPR2の二重標識を一過的及び安定的な発現系を用いて試みた。まず、ボンバードメント法によるタマネギ一過的発現系では、動物の微小管付随タンパク質であるMAP4の微小管結合領域にGFPを融合させたCaMV35Sp::GFP-MAP4とCaMV35Sp::SPR2-mCherry及びを共発現させた。その結果、GFP-MAP4の太い繊維状の蛍光は観察されたが、mCherry-SPR2の蛍光は確認できなかった(data not shown)。次に、シロイヌナズナのCaMV35Sp::SPR2-GFP形質転換系統にSPR2とは別の波長の蛍光で微小管を標識するCaMV35Sp::mCherry-TUB6を交配により導入したが、

mCherry-TUB6 による表層微小管の明確な繊維状の配向を観察することができず、SPR2 の微小管上の局在部位はつきりと示すことはできなかった(Fig 15A)。タバコ BY-2 培養細胞を用いても同様の結果となった(Fig 15B)。

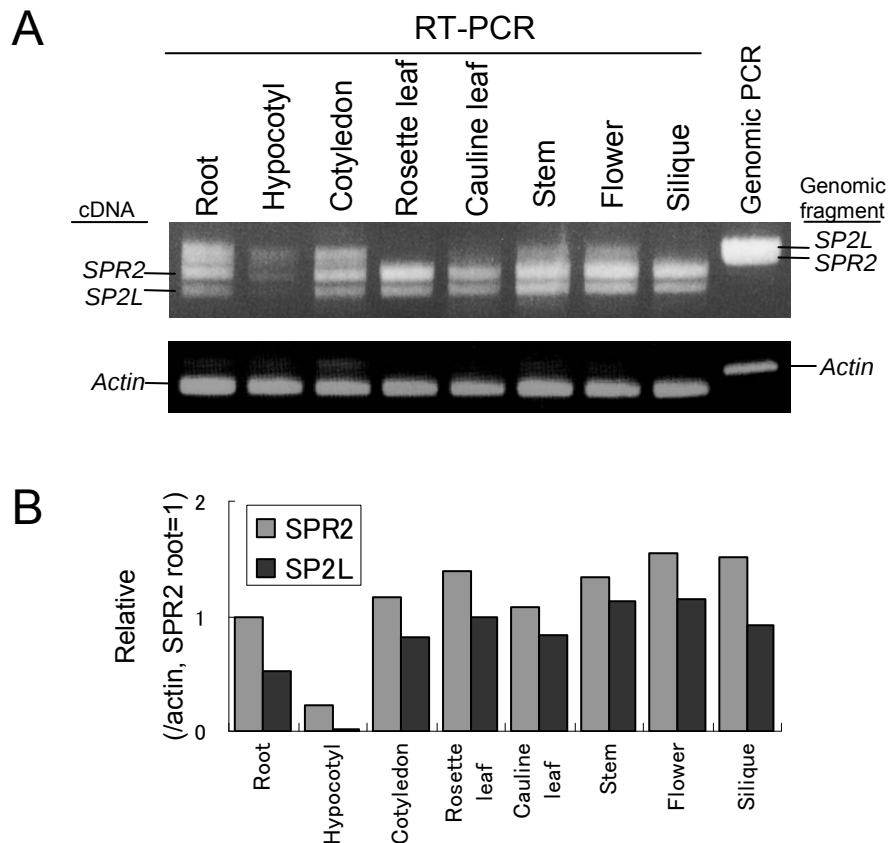


Fig 11. SPR2 及び SP2L 遺伝子の発現

野生型(Col)の様々な器官から cDNA を合成し、Fig 4 で示した common PCR プライマーの使用した RT-PCR により、各器官における SPR2 及び SP2L 遺伝子の発現パターンを比較した。

A: RT-PCR のアガロース電気泳動像。Actin はコントロールとした。

B: Image J ソフトを用いて A の電気泳動イメージから各シグナルの Plot profile を得ることで各発現量を定量化した。各器官の SPR2 及び SP2L 発現量の、Actin 発現量に対する割合をグラフに示した。

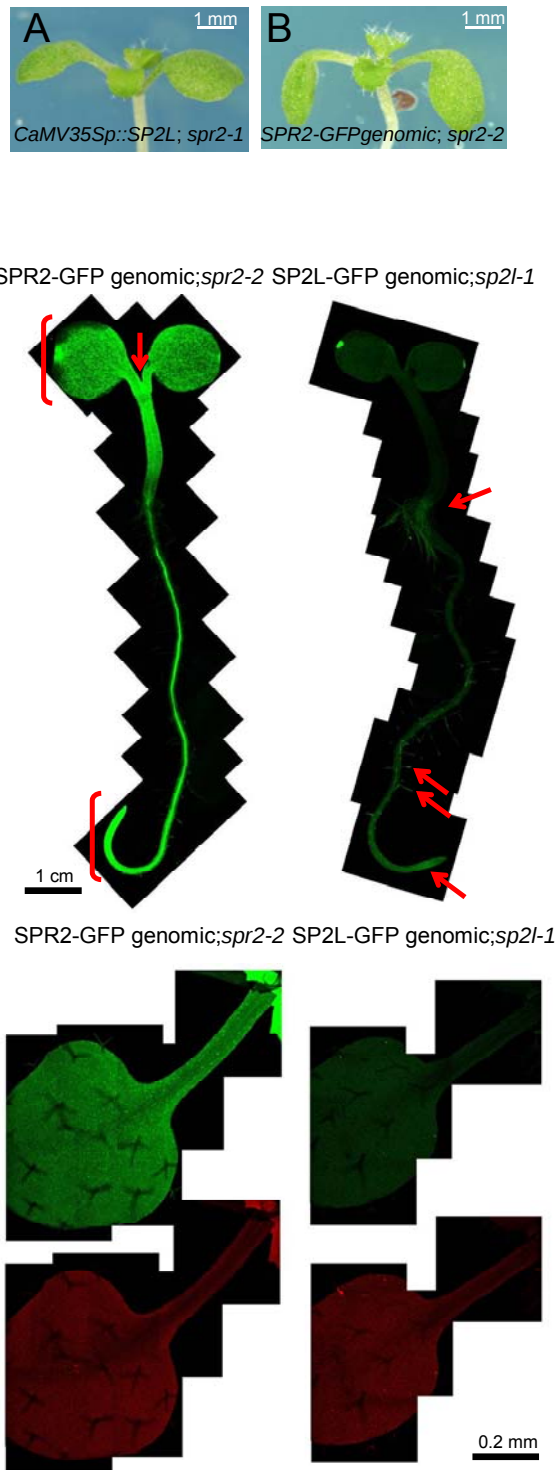


Fig 12. SPR2 及び SP2L の組織別発現パターン

AB: 発芽後 9 日目の *CaMV35Sp::SP2L; spr2-1*(A) 、 *SPR2-GFP genomic; spr2-2*(B)形質転換株。

C: *SPR2-GFP genomic; spr2-2*(left)及び *SP2L-GFP genomic; sp2l-1* (right) 形質転換株の GFP 発現。上は幼植物全体、下は第一本葉。緑色の像は GFP シグナル、赤色の像は葉緑素による自家蛍光を示す。

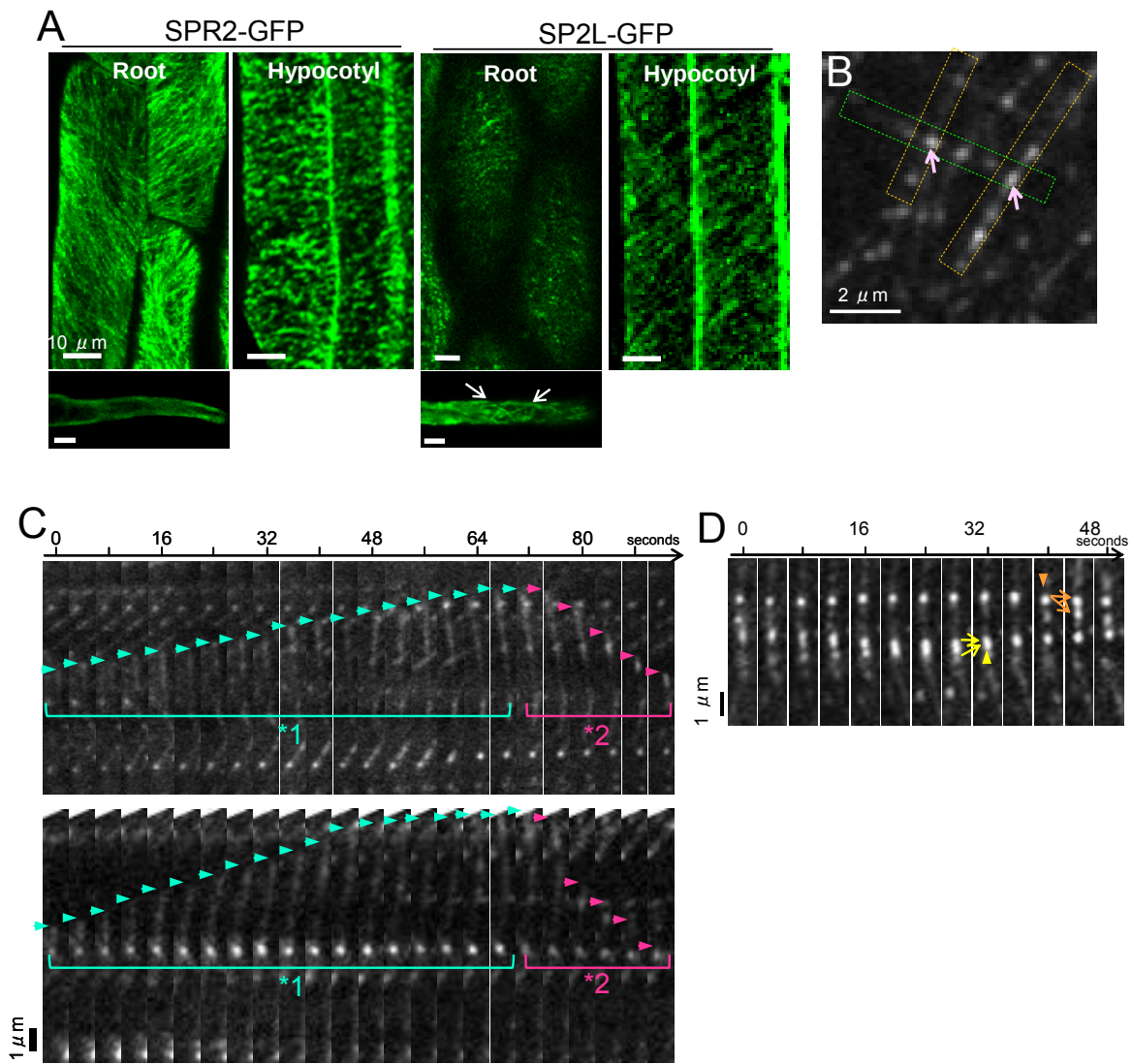


Fig 13. SPR2-GFP 及び SP2L-GFP の細胞内局在

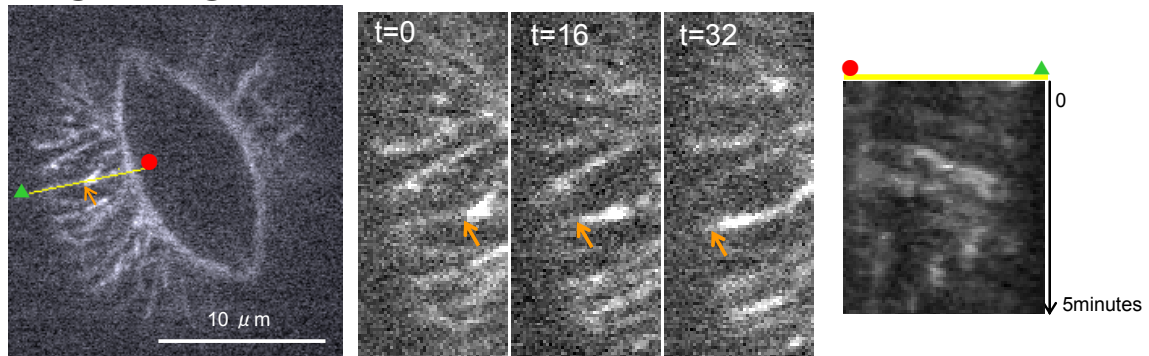
A: 根 (upper left)、根毛 (lower) 及び胚軸 (upper right) における SPR2-GFP 及び SP2L-GFP の細胞内局在。発芽後 7 日目の SPR2-GFP genomic; *spr2-2* 及び SP2L-GFP genomic; *sp2l-1* の根及び胚軸の表皮細胞の細胞表面を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

B: 一部の SPR2-GFP は、2 本の微小管 (□ & □) が交差する地点 (arrows) に存在した。

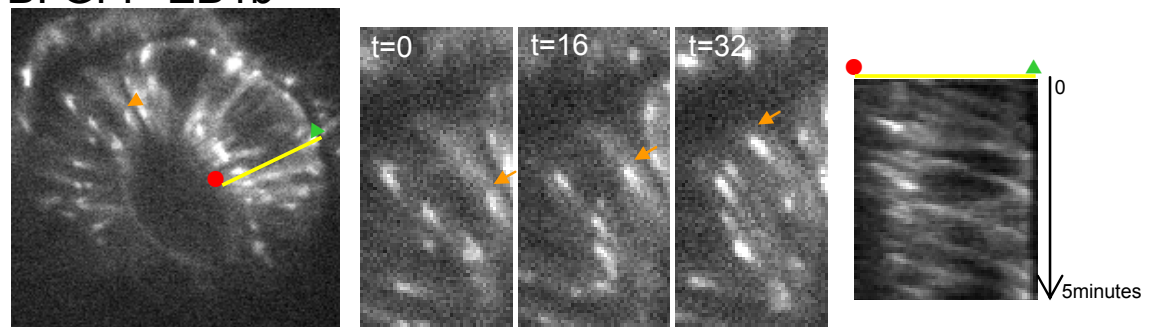
C: 一部の SPR2-GFP は、遅い速度 ($10 \mu\text{m}/\text{min}$ 未満) で一方向に移動したり (*1; blue arrow heads)、速い速度 ($10 \mu\text{m}/\text{min}$ 以上) で一方向に移動したりした (*2; pink arrow heads)。

D: 一部の SPR2-GFP は、他のドットとの融合 (yellow arrow head) や二つのドットへの分離 (orange arrow head) を起こしながら両方向に移動した。

A. SPR2-GFP



B. GFP-EB1b



C. GFP-TUB6

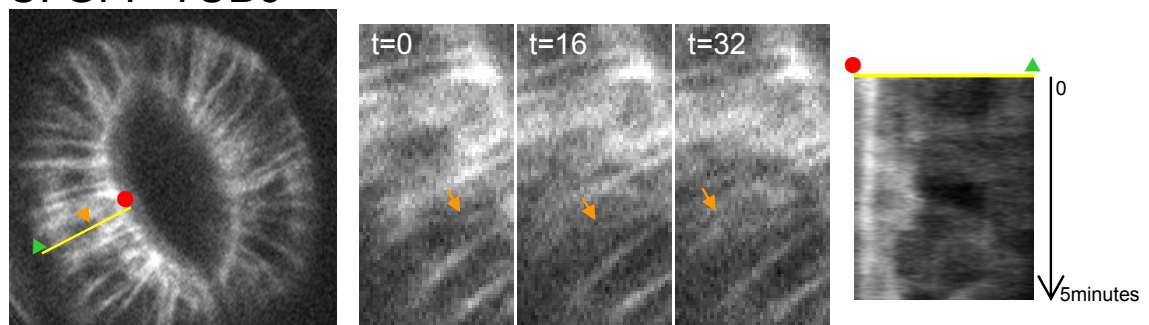


Fig 14. 孔辺細胞における **SPR2**、**EB1b** 及び微小管 (**TUB6**) の局在
 Left; SPR2-GFP(A)、GFP-EB1b(B)及び GFP-TUB6(C)の子葉の孔辺細胞表面に
 おける共焦点レーザー顕微鏡画像。
 Center; left で orange arrow で示した蛍光の 16 秒毎の経時的変化。
 Right; left で yellow line で示した部分のキモグラフ。

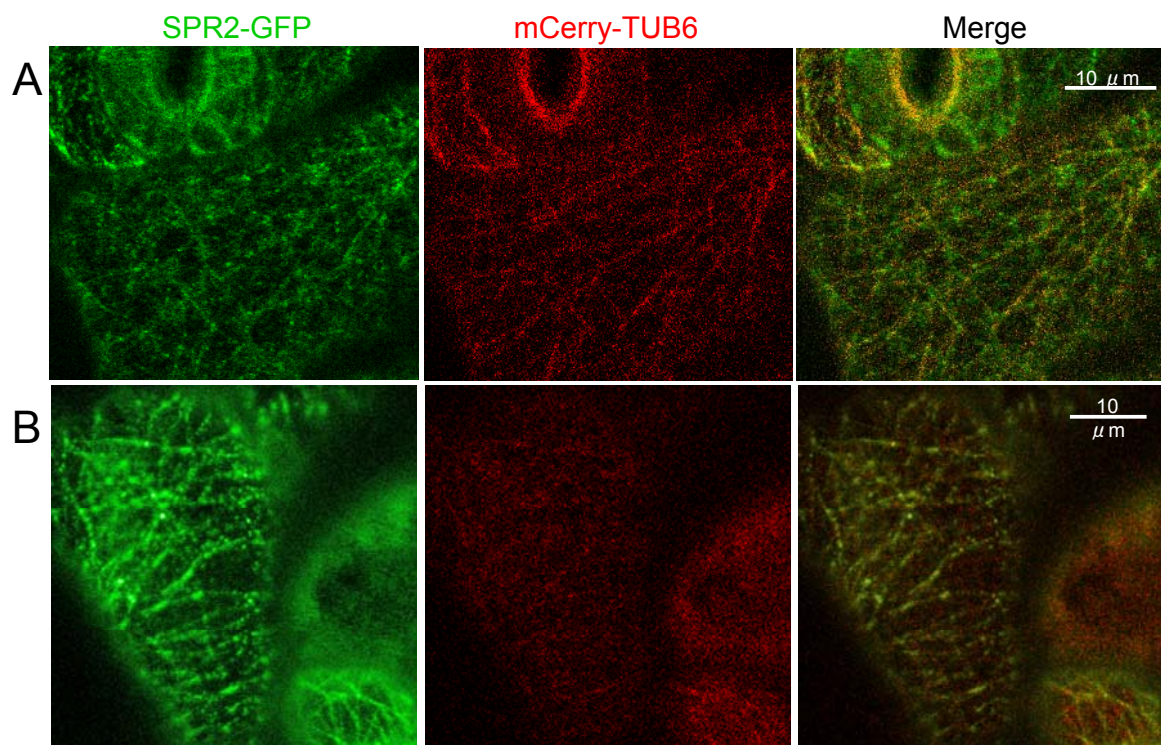


Fig 15. SPR2-GFP 及び mCherry-TUB6 の二重標識

A: CaMV35Sp::SPR2-GFP 及び CaMV35Sp::mCherry-TUB6 を共発現するシロイヌナズナ形質転換株幼植物の子葉の表皮細胞。green は SPR2-GFP の蛍光シグナル、red は mCherry-TUB6 の蛍光シグナルを示す。Merge は green と red の画像を重ね合わせた画像。

B: CaMV35Sp::SPR2-GFP 及び CaMV35Sp::mCherry-TUB6 を共発現する形質転換 BY-2 細胞。

2-3-3 細胞内における **SPR2** の表層微小管動態に与える影響

細胞内での **SPR2** 及び **SP2L** が表層微小管動態に与える影響を調べるために、**Control**と *spr2-2* 変異株の細胞内の表層微小管の配向と動態を比較した。

まず配向について調べた。*spr2* 変異株のように植物の伸長器官がねじれる形質を示すチューブリン変異株では、根の伸長領域において微小管の配向が傾いていることがわかっている。野生株では細胞の伸長方向に対して垂直に配向する微小管が、右巻きねじれのチューブリン変異株では左巻きの、左巻きねじれのチューブリン変異株では右巻きのヘリックスを形成していた。また、その伸長方向の傾きの強さは、微小管の傾きの強さと相関関係にあった(Ishida et al., 2007)。そこで、根が右巻きにねじれる *spr2sp2l* 二重変異株について、抗チューブリン抗体を用いた免疫染色により根の表皮細胞の表層微小管の配向を観察した。表層微小管の細胞の長軸方向に対する微小管の配向角度を測定しその分布を調べた結果、野生型との大きな違いは見出せなかった(Fig 16)。これは *spr2sp2l* 変異株の根における変異形質がチューブリン変異株に対して弱いことに反映していると考えられた。次に、*spr2* の変異形質が強く現れる地上部において、微小管を可視化する **GFP-TUB6** を導入し、微小管の配向を調べた。**GFP-TUB6** を導入した野生型 (**Control**)、*spr2-2*、*spr2-2sp2-1* 及び **SPR2ox;spr2-2** の胚軸上部や葉柄基部の表皮細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察すると、表層微小管が蛍光標識され、繊維状の配向を観察することができた。発芽後 4 日目と 7 日目の、細胞の長軸伸長方向に対する微小管の配向角度を計測すると、**Control** では根の伸長領域に比べて表層微小管の配向角度はばらついており、成長が進むにつれてそのばらつきはより大きくなった。しかし、平均するとほぼ伸長軸に対して垂直に近いことがわかった。一方 *spr2* 変異株の表層微小管では、ばらつきが大きいものの、左巻きのヘリックスを形成する傾向が見られた。さらに、*spr2sp2l* 二重変異株ではその傾向が強いことがわかった。また、**SPR2** が過剰発現することで *spr2* 変異形質を回復している **SPR2ox;spr2-2** 系統では、ほぼ伸長軸に対して垂直に近い配向を示すことがわかった(Fig 17,18)。以上の結果より、*spr2* 及び *spr2sp2l* 変異株の胚軸や葉柄では、表層微小管の配向が左巻きヘリックスに変化することで、器官のねじれを生じていることが示唆された。

さらに、各変異株の **GFP-TUB6** 発現系統を用いて表層微小管動態の変化を計測した。表層微小管の 4 秒毎の連続画像を撮影することで細胞内の表層微小管動態を観察することができた。この **Control** と *spr2* 変異株の表層微小管の動態を比較することで、細胞内において **SPR2** が微小管動態に与える影響を調べた。次に、動態を画像解析し表層微小管の長さの変化を定量化し、微小管の

長さの変化を示すヒストリープロットを得た。その後 4 秒間以上 $1\ \mu\text{m}/\text{min}$ 以上で動かなかった時を「停止」、それより速い速度で長さが増加した時を「伸長」、減少した時を「収縮」と定義して、微小管の動態を評価するパラメータ(伸長・収縮・停止の時間占有率、各事象の移行頻度、伸長・収縮速度及び微小管ダイナミクス)を求めた。その結果、胚軸上部の表皮細胞プラス端において、*spr2-2* 変異株と **Control** ではどのパラメータにおいても有意な差は見られなかったが、*spr2-2* と **SPR2ox;spr2-2** では、*spr2-2* に停止時間の増加が見られた(Fig 19A; Time spent)。これはそれ以外のパラメータに差がないことから、停止時間の増加が原因となってダイナミクスが減少したと考えられた。この停止が起こる機構についてさらに詳しく探るために、停止とその直前の事象との関連を調べた。伸長から移行して停止になった時と収縮から移行して停止になった時とを分離して停止の時間占有率を求めると、伸長から移行した停止の時間が特に *spr2* 及び *spr2sp2l* 二重変異株で増加していることがわかった。また、**SPR2ox;spr2-2** では **Control** に比べて減少していることがわかった(Fig 19C)。つまり、*spr2* 変異株では **SPR2** 過剰発現株 (**SPR2ox;spr2-2**) に比べて、伸長している微小管のプラス端が停止に移行しやすい状態になっており、その結果ダイナミクスが減少し安定な状態になっていることが示唆された。一方マイナス端では、変異株と **Control** もしくは過剰発現株との間に有意な差が見られず、*spr2* 変異によるマイナス端への影響は少ないと考えられた(Fig 19D)。また、子葉の表皮細胞でも同様に表層微小管動態を計測したが、胚軸の場合のような相関は見出せなかった(Fig 19B)。

次に、前述の **SPR2-GFP** の細胞内局在解析の結果と *spr2* 変異株における微小管動態の解析から **SPR2** が微小管のプラス端に局在し、**SPR2** がプラス端の動態を制御している可能性が示唆されたことから、伸長しているプラス端のみを標識する **GFP-EB1b** 発現系統を用いて *spr2* 変異株のプラス端の動態をさらに詳細に調べた。コントロールの **GFP-EB1b** では **EB1** のコメット状の蛍光は一定の速度で動いた。1 つ 1 つのコメットに対してその軌跡を描いてみると、緩やかな曲線をつくるものが多かった(Fig 20A;left)。一方、*spr2* 変異株内での **GFP-EB1b** のコメットは、一時的に停止する、また短時間に急角度で方向変化するという 2 つの特徴が見られた(Fig 20B;left)。これらの特徴を定量化するために、まず短時間(4 秒間毎)における **GFP-EB1b** の移動速度を測定し、その分布をヒストグラムで表した(Fig 21)。そして、コメットが停止する($<1\ \mu\text{m}/\text{min}$ の速度が 4 秒以上継続する)頻度と停止している時間を求めた。その結果、コントロールでは停止状態にあるコメットはほとんど観察されない(1%未満)のに対して、*spr2* 変異株では約 6%(胚軸細胞;5.5%、葉柄細胞;5.8%)のコメットが停止の状態にあった。さらにその 1 事象あたりの停止時間も増加していることが定量的に表された(Table 9)。次に、コメットの軌跡から 4 秒間で 15° 以上曲がる頻度を求めた。その結果

spr2 変異株では、急な方向転換の頻度も増加していた(Table 10)。さらに、コメント時間経過に伴う変化を示すキモグラフを作成し、停止と方向変換の関連を調べた。すると、*spr2* 変異株で見られる停止には方向変換を伴う場合が多いことが分かった。しかし、その逆は十分ではない。コントロールにおいても方向変換は見られるが、この際には一時的な停止が見られなかった。この方向変換は伸長している微小管が他の微小管にぶつかり、それをよけた、もしくは、その微小管の側面に沿ったために起きたと考えられる。そのため、*spr2* 変異株における停止を伴わない方向変換もこれに含まれると考えられた(Fig 20AB;right)。

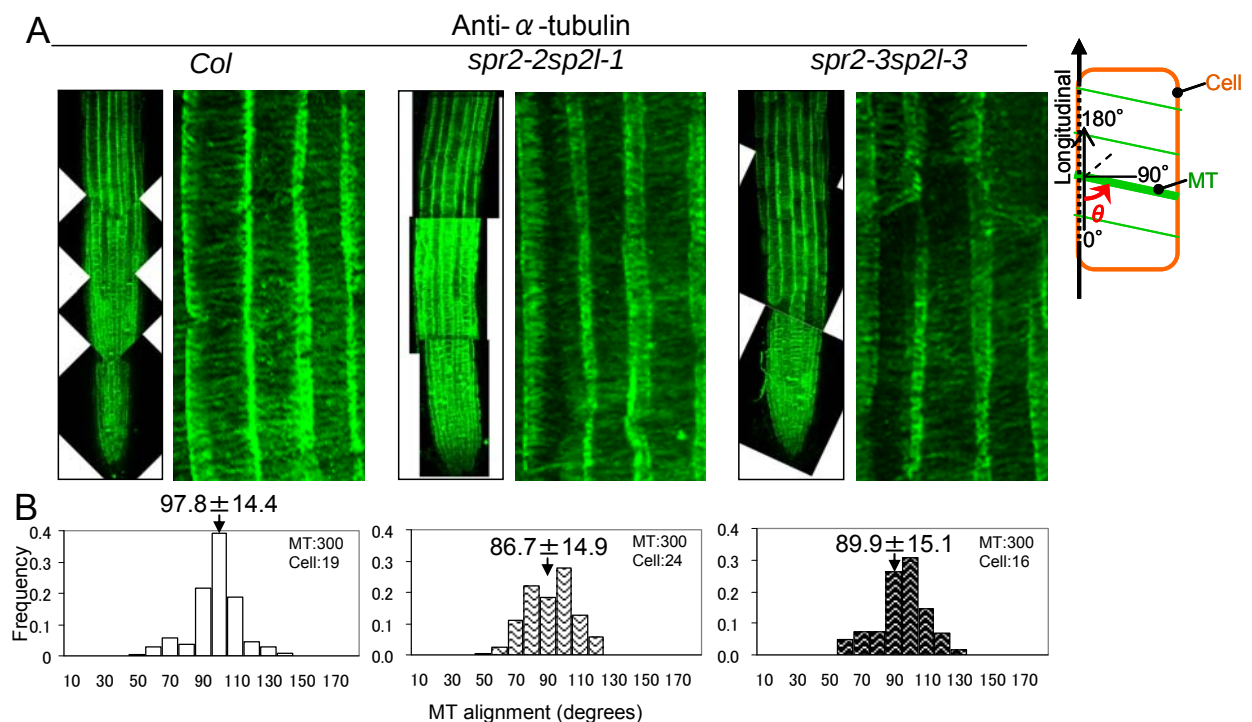


Fig 16. *spr2sp2l* 二重変異株の根の表皮細胞における表層微小管の配向

A: 抗 α -tubulin 抗体を用いた免疫染色法により標識した発芽後 4 日目の Col、*spr2-2sp2l-1* 及び *spr2-3sp2l-3* の根の表皮細胞の表層微小管像。観察は共焦点レーザー顕微鏡を使用した。right は伸長領域の細胞の拡大画像。

B: A の right で示した伸長領域の細胞における表層微小管の配向角度。細胞の長軸に対して左肩上がりを $0^\circ < \theta < 90^\circ$ 、右肩上がりを $90^\circ < \theta < 180^\circ$ として測定した。arrow は平均値を示す。

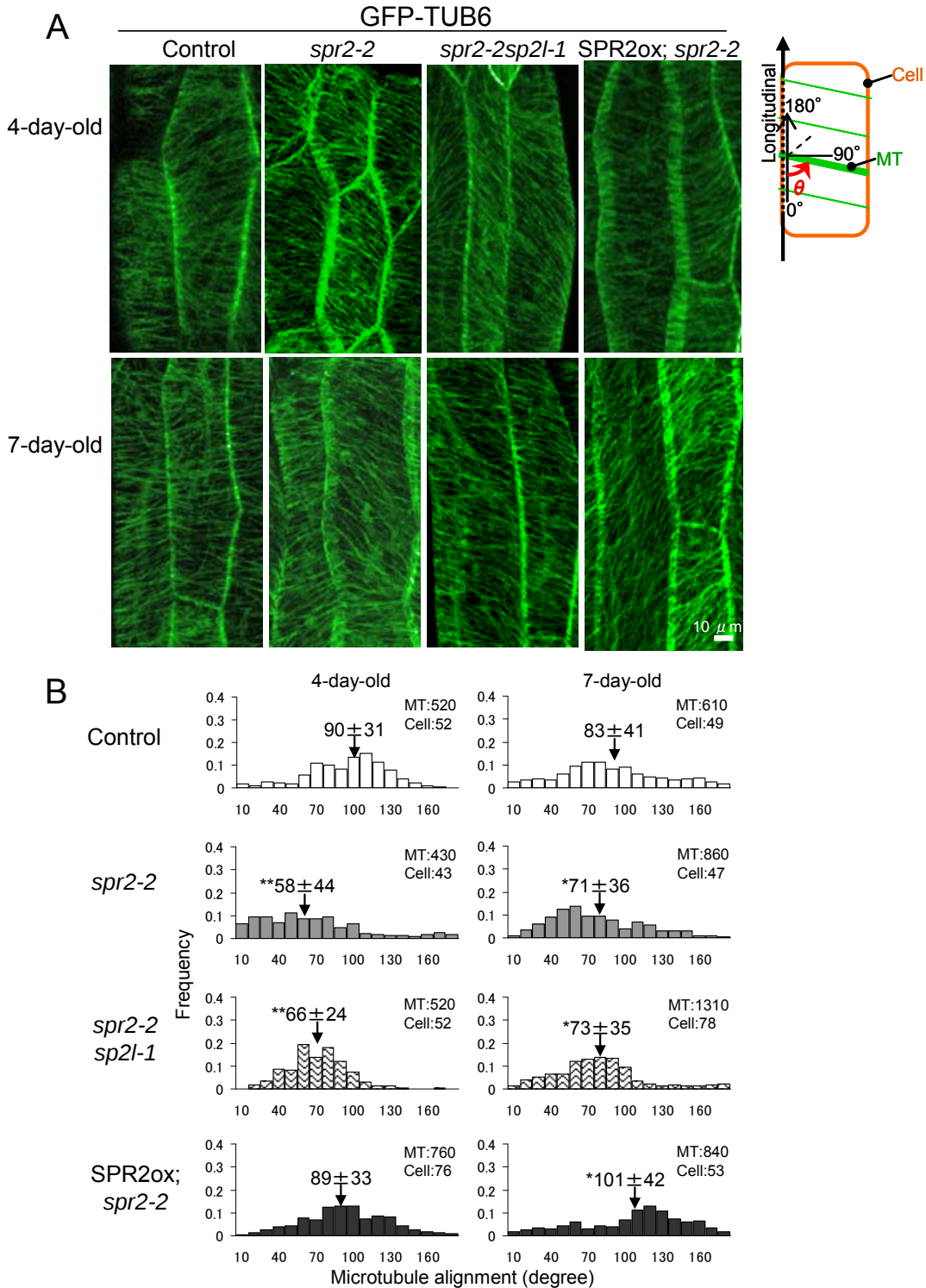


Fig 17. *spr2* 及び *spr2spr2l* の胚軸の表皮細胞における表層微小管の配向

A: GFP-TUB6 により標識した発芽後 4 日目の Col、*spr2-2*、*spr2-2spr2l-1* 及び SPR2ox;*spr2-2* の胚軸上部の表皮細胞の表層微小管像。

B: A で示した表層微小管の配向角度。細胞の長軸に対して左肩上がりを $0^\circ < \theta < 90^\circ$ 、右肩上がりを $90^\circ < \theta < 180^\circ$ として測定した。arrow は平均値を示す。

Asterisks(*); statistically significant differences from control (t-test; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

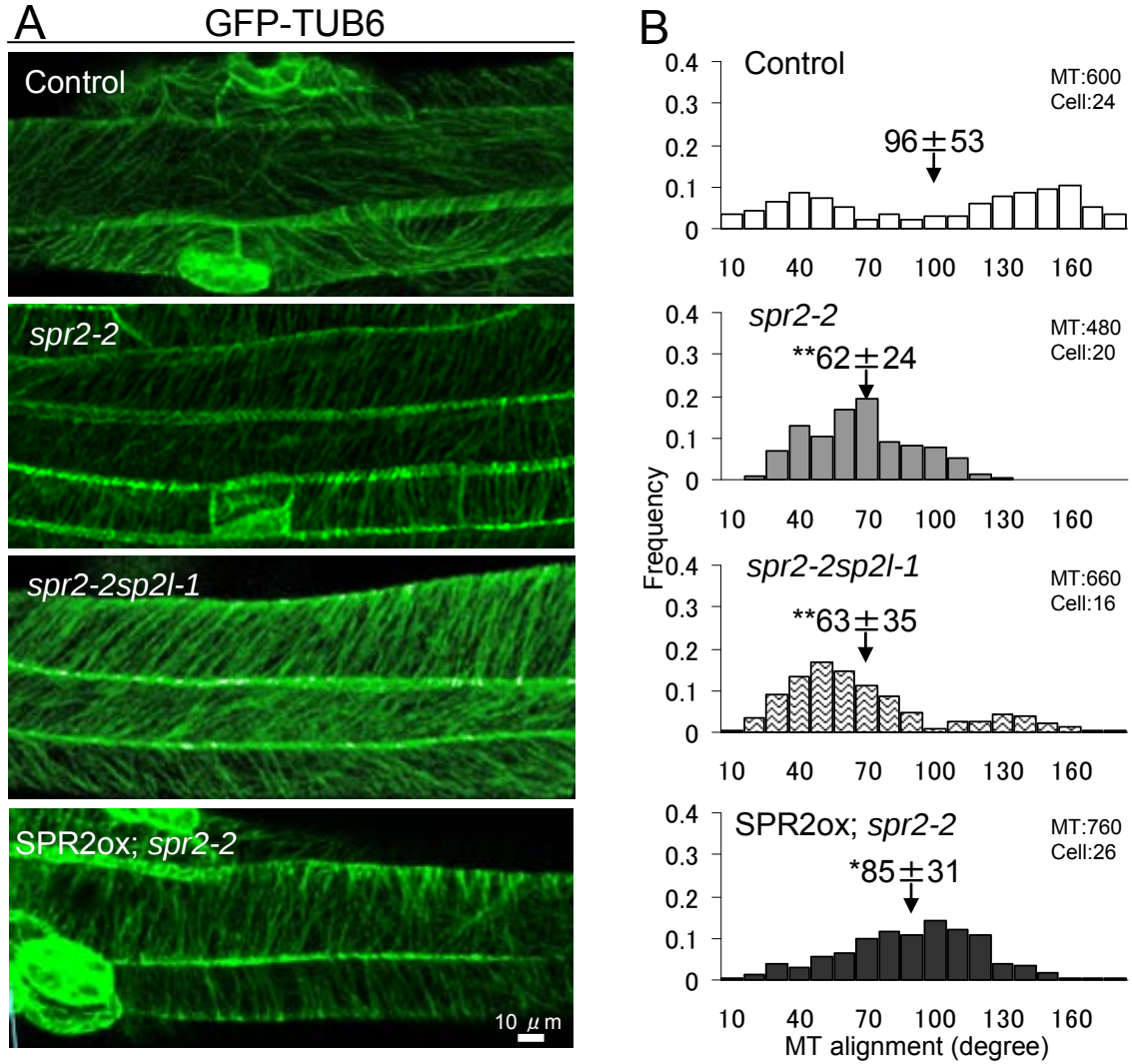
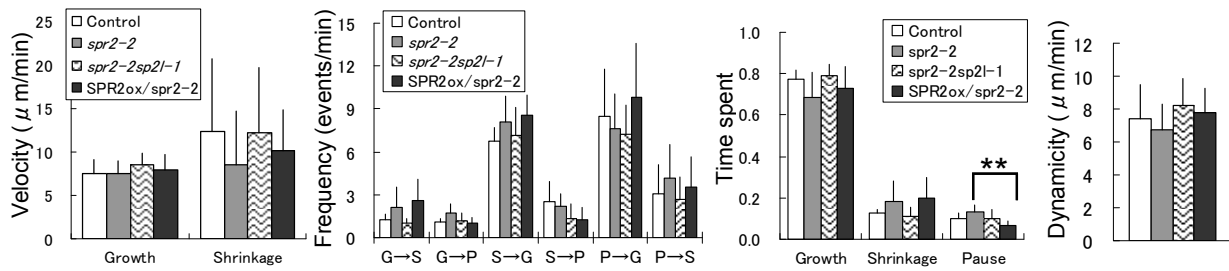
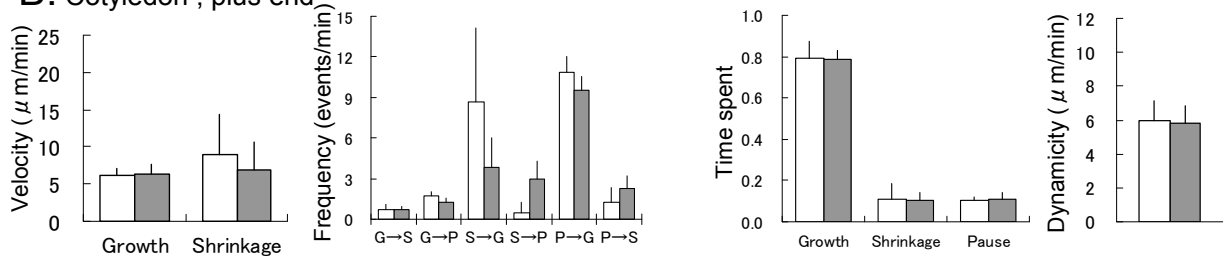


Fig 18. *spr2* 及び *spr2sp2l* の葉柄の表皮細胞における表層微小管の配向
A: GFP-TUB6 により標識した発芽後7日目の Col、*spr2-2*、*spr2-2sp2l-1* 及び SPR2ox;*spr2-2* の子葉の葉柄基部の表皮細胞の表層微小管像。
B: A で示した表層微小管の配向角度。細胞の長軸に対して左肩上がりを $0^\circ < \theta < 90^\circ$ 、右肩上がりを $90^\circ < \theta < 180^\circ$ として測定した。arrow は平均値を示す。
 Asterisks(*); statistically significant differences from control (t-test; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

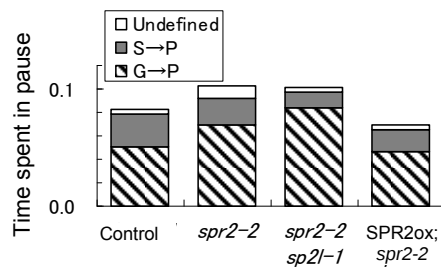
A. Hypocotyl, plus end



B. Cotyledon, plus end



C



D. Hypocotyl, minus end

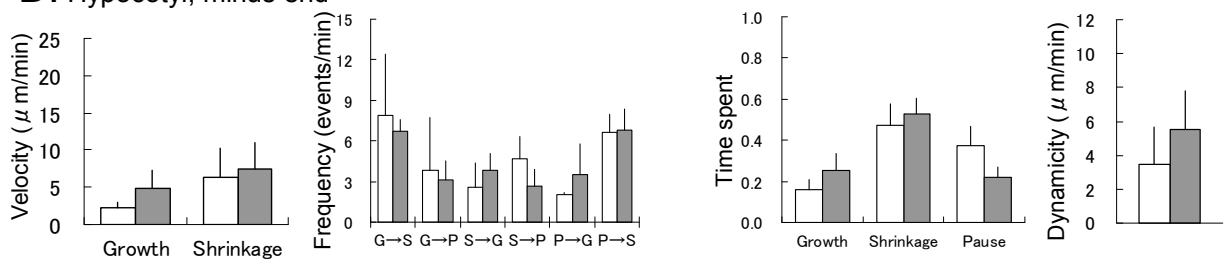


Fig 19. *spr2* 及び *spr2sp2l* の表層微小管動態

GFP-TUB6 により標識した発芽後 4 日目の Col、*spr2-2*、*spr2-2sp2l-1* 及び *SPR2ox/spr2-2* について胚軸上部及び子葉の表皮細胞の表層微小管を観察し、その微小管の動態を定量化した。

A: 胚軸上部の微小管プラス端動態。B: 子葉の微小管プラス端動態。C: 胚軸上部のプラス端の Pause の Time spent(A)の詳細。Pause の前の事象により分類した。D: 胚軸上部の微小管マイナス端動態。

**; Statistical significance between *spr2-2* and *SPR2ox/spr2-2* ($P < 0.005$)

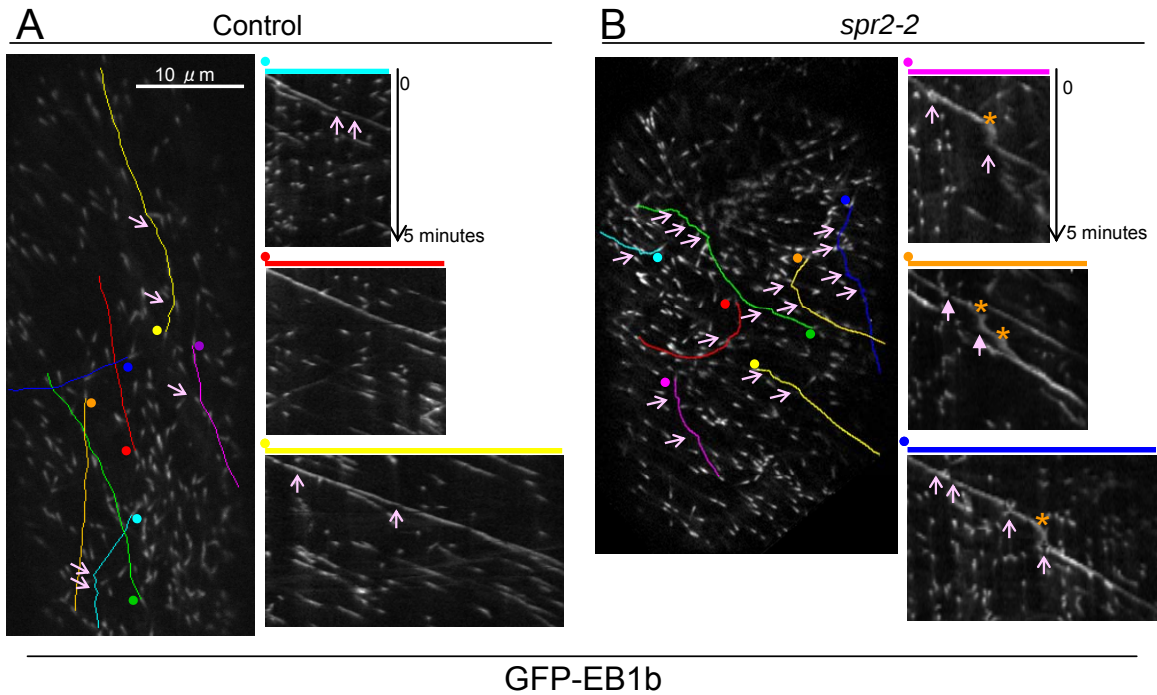


Fig 20. *spr2* における微小管プラス端の軌跡

Control と *spr2-2* 変異株の胚軸の表皮細胞内における GFP-EB1b コメットの移動した軌跡を示した(left)。軌跡上のコメットの変化をキモグラフで表した(right)。

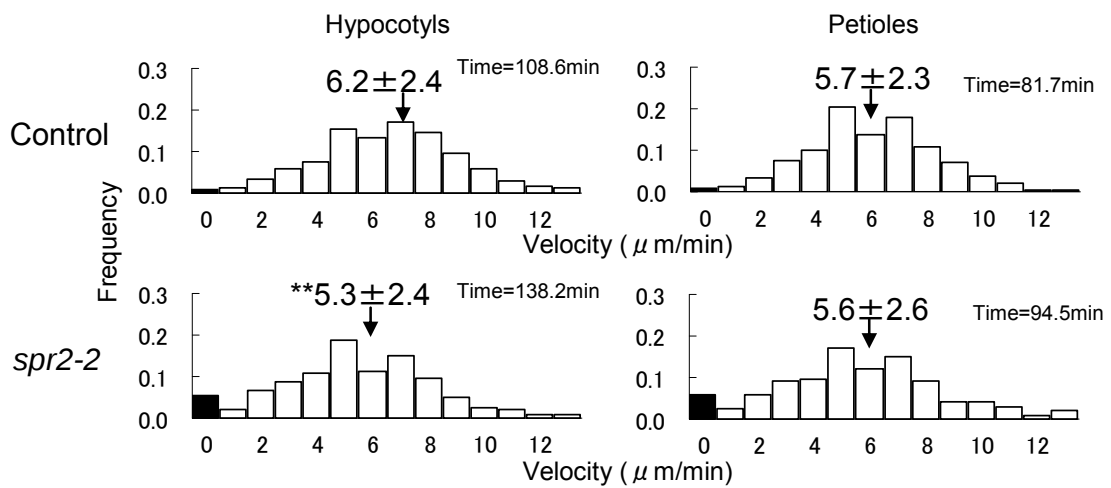


Fig 21. *spr2* における微小管プラス端の移動速度

GFP-EB1b コメットの 4 秒間毎の移動速度の分布を示した。v < 0 の頻度を black bars で示した。arrow は 1 μm/min 以上であったコメット(white bars)の平均速度を示した。Asterisks(*); statistically significant differences from control (t-test; **, P < 0.01)

Table 9. GFP-EB1b コメットの一時的な停止の起きる頻度

	MT No.	No. of pause events	Total MT length (μm)	Frequency (events/ 10μm MT length)			
				Duration of individual pauses in seconds			
				4	8	12	>12
Hypocotyl							
Control	45	36	659.5	0.55	ND	ND	ND
<i>spr2-2</i>	70	106	677.9	1.18	0.25	0.06	0.07
Petiole							
Control	40	21	456.7	0.44	0.02	ND	ND
<i>spr2-2</i>	45	89	484.3	1.51	0.27	0.02	0.04

MT; microtubule; ND; not detected

Table 10.

GFP-EB1b の急角度(>15° in 4 seconds)な方向変換の起きる頻度

	MT No.	No. of turns	Total MT length (μm)	Frequency (events/ 10μm MT length)
Hypocotyl				
Control	28	22	349.0	0.69 ± 0.44
<i>spr2-2</i>	35	58	475.1	1.18 ^{***} ± 0.28
Petiole				
Control	21	6	185.0	0.33 ± 0.08
<i>spr2-2</i>	21	25	212.7	1.19 ^{***} ± 0.85

MT; microtubule; Asterisks(*); statistically significant differences from control (t-test; ***, P< 0.0001)

2-3-4 in vitro における SPR2 及び SP2L の微小管動態に与える影響

in vitro での SPR2 及び SP2L が微小管動態に与える影響を調べるために、暗視野顕微鏡を用いて微小管動態を測定した。

暗視野顕微鏡は、専用のコンデンサを取り付けることにより顕微鏡の透過光をなくし、試料に当たって反射する散乱光のみで像を見る光学顕微鏡である。暗視野顕微鏡で見た微小管は、はっきりとした線維として見え、ビデオ撮影することによって時間の経過と共に、微小管が重合・脱重合によってその長さが変化しているのを観察することができた(Fig 22A)。ビデオ画像から、個々の微小管において微小管上の定点からの距離を時間経過とともに測定し、ヒストリープロットを作成した(Fig 22BC)。微小管の長さが変化していない時が「停止」、減少しているときが「収縮」、増加している時が「伸長」である(今回は、0.5 分以上連続して 0.3 μm 以上動かなかった時を「停止」、それより長くなった時を「伸長」、短くなった時を「収縮」と定義した)。また、伸長から収縮に移行する「カタストロフ」や収縮から伸長へと移行する「レスキュー」といった現象もこのプロットから抽出することもできた。これによって、TF-SPR2、TF-SP2L 及び実験のコントロールとして用いた TF の精製タンパク質を添加した際の個々の微小管の動態のヒストリープロットを作成し、微小管動態を評価するためのパラメータである伸長・収縮・停止の「時間占有率」、伸長・収縮・停止に移行する「頻度」、伸長・収縮「速度」及び微小管「ダイナミクス」(単位時間当たりの微小管の延べ移動距離)を算出し、添加していないときと比較した。測定は、プラス端とマイナス端を別々にして、各サンプル 9 本以上の微小管で述べ 110 分以上のヒストリープロットを作成した(Table.4)。0.2 μM TF、TF-SPR2 及び TF-SP2L 添加時のプラス端の代表的なプロットを 4 本選り Fig.9B,D に表した。

微小管のプラス端では、ヒストリープロットから、TF-SPR2 及び TF-SP2L の添加によって、TF 添加時よりも微小管がよく伸長するようになったことが予想された(Fig 22B)。また微小管動態を評価する各パラメータを比較すると、TF-SPR2 及び TF-SP2L の添加により伸長から停止(G→P)への移行頻度が減少していた。その結果、伸長する時間の割合と速度が増加し、停止時間が減少していた。そして、それらに伴い全体としてのダイナミクスが増加した。一方、収縮に関しては、添加した TF-SPR2 及び TF-SP2L の濃度と相関した有意な変化は見られなかった(Fig 23)。微小管のマイナス端の動態においても、TF-SPR2 及び TF-SP2L 添加による、伸長時間の増加と停止時間の減少の傾向を示したが、プラス端に

おける変化ほど強い影響を示さなかった(Fig 24)。

さらに別の条件下での微小管動態への影響を調べた。in vitro で重合させた微小管を 26.5℃に保つと、重合は止まり脱重合に向かいやすい状態になる。このような条件下で SPR2 全長を含む TF-SPR2 と次項で示した微小管結合領域を持つ TH-SPR2N を添加した時の in vitro における微小管動態を解析した。無添加時は、プラス端においても伸長している時間が 28℃で計測した時より約半分に減少し、それに対応して収縮時間、停止時間がそれぞれ約 3 倍、1.8 倍になった。一方、TF-SPR2 添加時のプラス端は無添加時に比べ、伸長から停止 (G→P) の移行頻度が減少、停止から伸長 (P→G) の移行頻度が増加し、脱重合に向かいやすい状況下にも関わらず、伸長になりやすい状態にした。また、TH-SPR2N は停止時間が増加し、ダイナミクスを約 1/8 に減少させ、微小管を超安定化した(Fig 25)。

また、分光光度計を用いて微小管の重合量を濁度として定量化する濁度法によって、SPR2 の微小管重合活性を評価した。TF もしくは TF-SPR2 存在下で、チューブリンを重合しやすい条件下 (37℃、1mM GTP 含) におくと、TF-SPR2 は TF 添加時よりも少し重合速度が速くなった(Fig 26)。

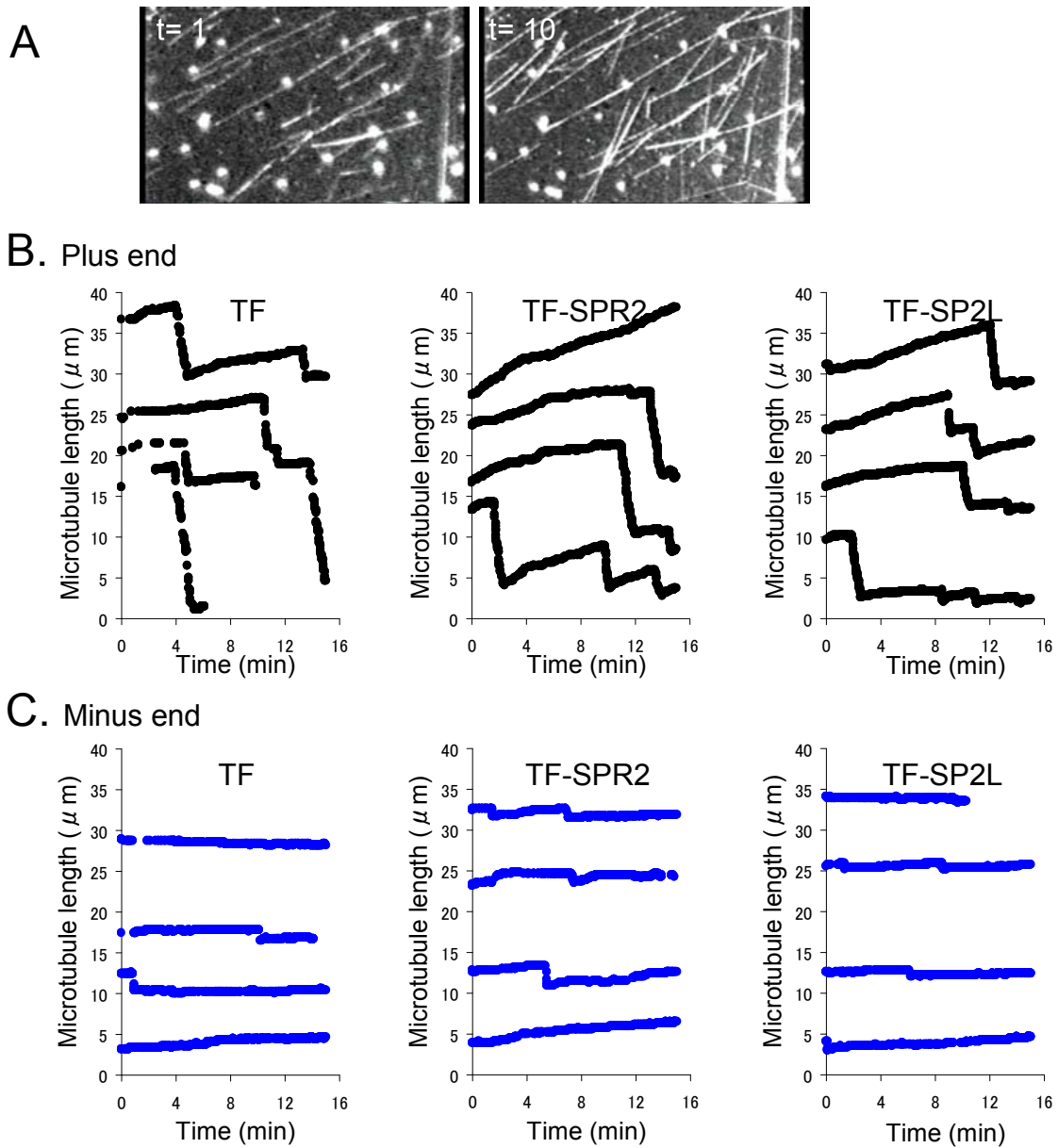


Fig 22. 暗視野顕微鏡を利用した微小管動態解析

A: 微小管を *in vitro* で再構成させた時の暗視野顕微鏡画像。

BC: 暗視野顕微鏡画像から得たプラス端(B)及びマイナス端(C)の長さの変化を示すヒストリープロット。

Plus end (28°C)

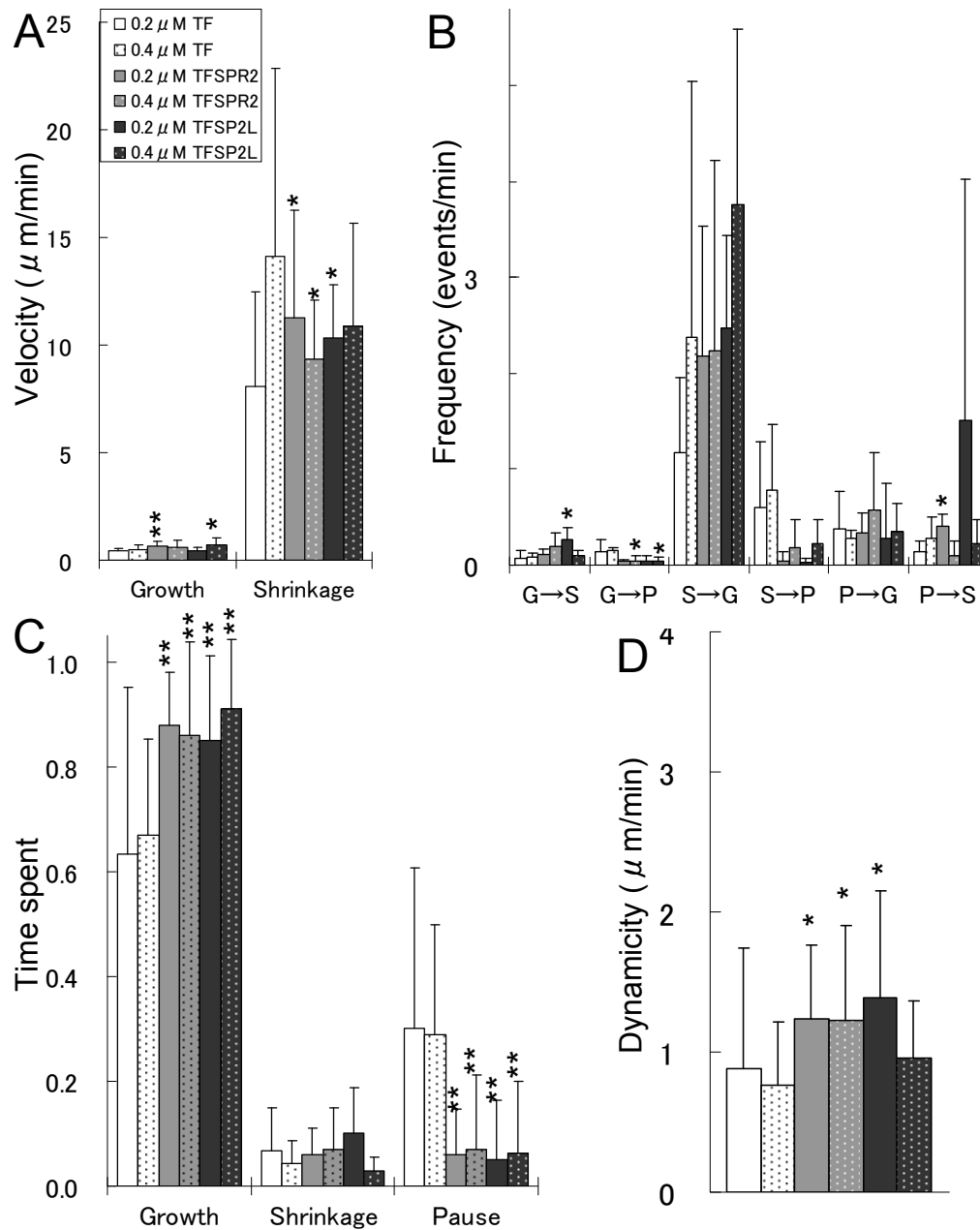


Fig 23. SPR2 及び SP2L の微小管プラス端の動態への影響

微小管プラス端のヒストリープロットから算出した各パラメータ。

A: 伸長・収縮速度。微小管 1 本ごとに平均伸長速度及び収縮速度を求めた。**B:** 各事象への移行頻度。伸長、収縮、停止に移行する頻度を、その前に起こった事象 1 分間あたりに起きた回数として求めた。**C:** 伸長・収縮・停止の総測定時間に対する時間占有率。**D:** 微小管ダイナミクス。1 分間あたりの微小管の長さの変化量を求めた。Asterisks(*); statistically significant differences from control (t-test; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

Minus end (28°C)

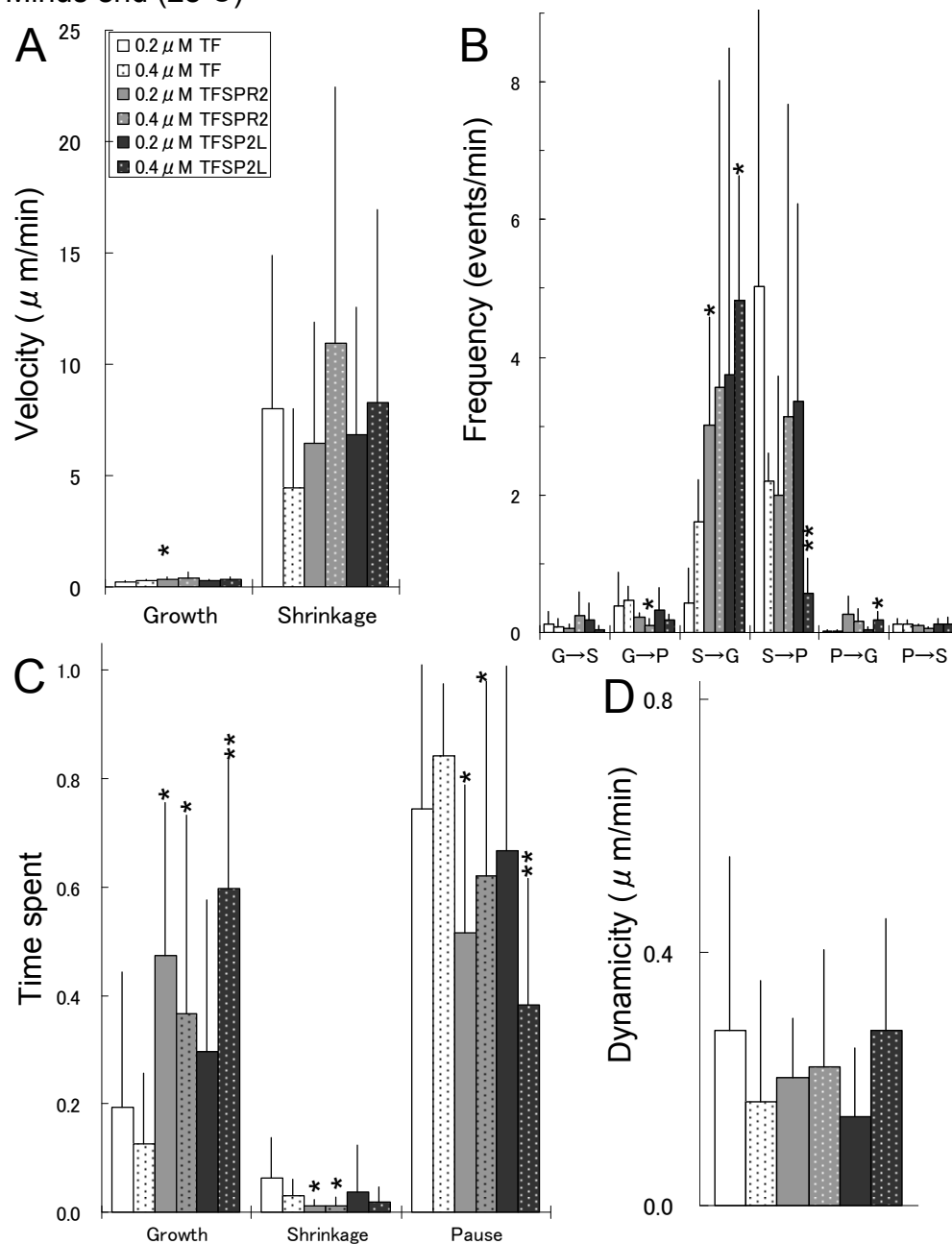


Fig 24. SPR2 及び SP2L の微小管マイナス端の動態への影響

微小管マイナス端のヒストリープロットから算出した各パラメータ。

A: 伸長・収縮速度。微小管 1 本ごとに平均伸長速度及び収縮速度を求めた。**B:** 各事象への移行頻度。伸長、収縮、停止に移行する頻度を、その前に起こった事象 1 分間あたりに起きた回数として求めた。**C:** 伸長・収縮・停止の総測定時間に対する時間占有率。**D:** 微小管ダイナミクス。1 分間あたりの微小管の長さの変化量を求めた。Asterisks(*); statistically significant differences from control (t-test; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

Plus end (26.5°C)

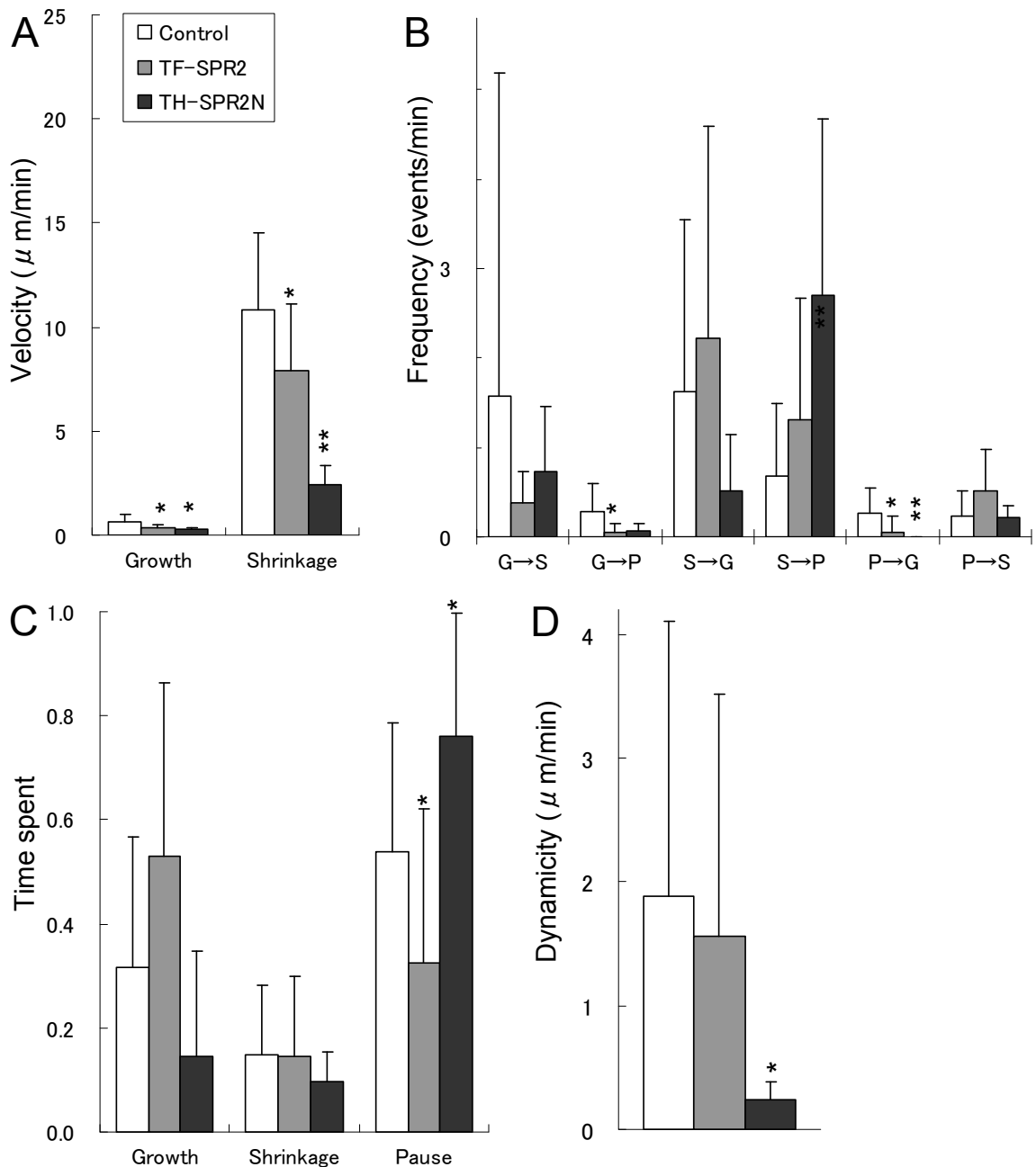


Fig 25. 26°C 状況下における SPR2 の微小管プラス端の動態への影響

26°C で測定した時の微小管プラス端のヒストリープロットから算出した各パラメータ。

A: 伸長・収縮速度。微小管 1 本ごとに平均伸長速度及び収縮速度を求めた。**B:** 各事象への移行頻度。伸長、収縮、停止に移行する頻度を、その前に起こった事象 1 分間あたりに起きた回数として求めた。**C:** 伸長・収縮・停止の総測定時間に対する時間占有率。**D:** 微小管ダイナミクス。1 分間あたりの微小管の長さの変化量を求めた。Asterisks(*); statistically significant differences from control (t-test; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

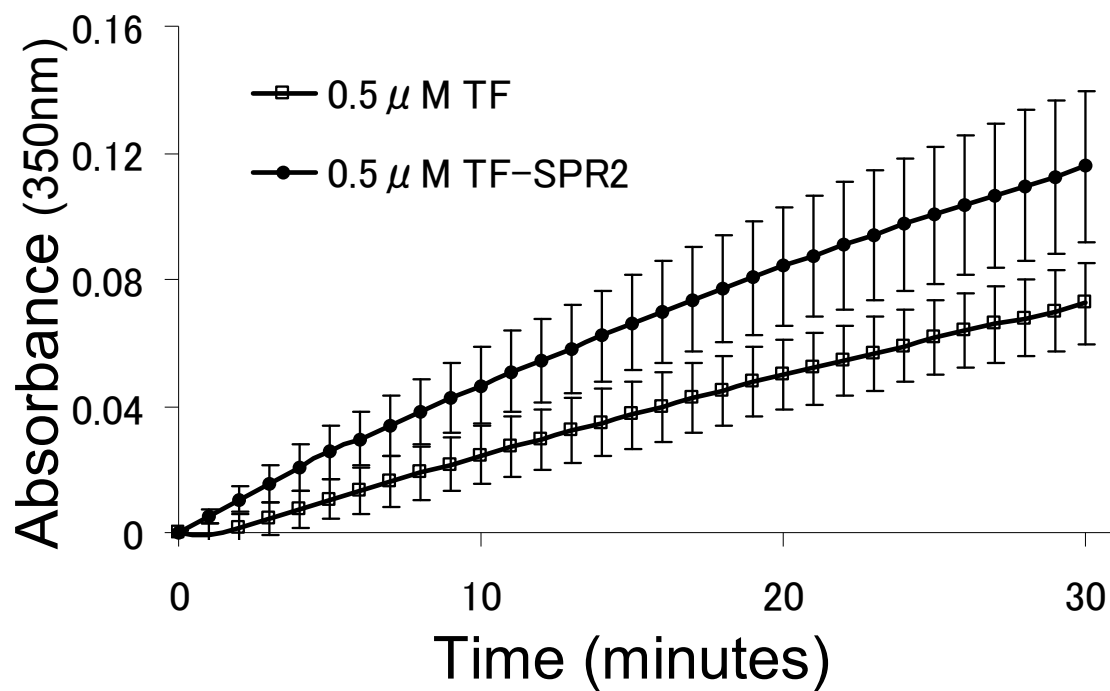


Fig 26. SPR2 の微小管重合促進活性

37℃、5 分間で前処理した精製 tubulin に TF-SPR2 を等量添加し(終濃度;17.5 μM tubulin,0.5 μM TF-SPR2)、混合してからの吸光度を 350nm の波長で 30 分間測定した。吸光度の値が高いほど、重合した微小管が多いことを示す。0.5 μM TF を添加した時をコントロールとした。

2-3-5 SPR2 の微小管結合領域の特定

SPR2 と SP2L について、*in vitro* での微小管との共沈実験を行うことにより、微小管結合性を検証した。

ある程度以上の濃度のチューブリンタンパク質は、微小管重合剤であるタキソール存在下、30～37℃で保温すると、全て重合して非常に安定な微小管を形成する。これを 100,000g 以上の強さで遠心すると、安定な微小管は全て沈殿する。この時、微小管に結合するタンパク質が含まれていると、そのタンパク質も微小管と共沈する。この方法を用いて、まず、SPR2 全長の組換えタンパク質 (TH-SPR2) が微小管と共沈するかを調べた。TH-SPR2 は、微小管との共沈実験によって得られた各画分の SDS-PAGE 及び CBB 染色の結果、沈殿画分からシグナルが検出された。これは、微小管非存在下では TH-SPR2 が上清画分から検出されたことから、自己凝縮などによるものでなく、微小管の存在によるものであることが示された。

同様に SPR2 の様々な長さの断片の組換えタンパク質について微小管結合性を調べた。その結果、まず TH-SPR2N と TH-SPR2C で微小管結合性が認められた。TH-SPR2M はチューブリンタンパク質と分子量が近かったので CBB 染色からは結合の有無が分からなかったが、付加したタグ (His tag) の抗体によるイムノブロッティングにより上清画分からシグナルが検出され、微小管結合性が認められなかった。SPR2N は SPR2 の N 末端領域にある連続して並ぶ 1～7 番目の HEAT リピートモチーフを含む。SPR2C は HEAT モチーフ構造をとると考えられる領域が 2 箇所とホモログ間で保存性の高い領域を含む領域である。また SPR2M は、SPR2N と SPR2C に挟まれる保存性の低い領域である (Fig. 7C)。このことから、SPR2 は N 末端領域及び C 末端領域で独立して微小管に結合することが分かった。特に N 末端領域は加えた TH-SPR2N 全てが沈殿画分から検出され、強く微小管に結合できると考えられた (Fig. 27)。

別の解析においても SPR2 の微小管結合性が示された。N 末端側に GST タグが付加された GH-SPR2 及び GH-SPR2N を、2-3-4 と同様、*in vitro* において再構成された微小管に添加したところ、無添加時と比べ両サンプルとも極端に長い微小管を形成した。さらに GH-SPR2N では微小管が束化されて非常に太くなった繊維が観察された (Fig. 28)。これは GST タグが二量体を形成することから、人為的に二量体化された 2 分子の SPR2 全長または SPR2N 部分長がそれぞれ別の微小管に結合し、微小管を束化したため起こったと考えられた。さらに、SPR2 及び SPR2N が持つ微小管重合促進もしくは安定化活性が働き、非常に安定化した微小管が形成された。特に、SPR2N では、微小管と強固に結合するので、その影響が強く出たと考えられた。

次に、**SPR2** の **N** 末端領域(**SPR2N**)の配列内においてさらに微小管結合領域を絞り込むために、**Fig 27A** で示した各断片(**N1-N8**)の組換えタンパク質を作成し、微小管結合性を調べた。その結果、**TH-SPR2N5** だけは微小管結合性が認められなかった。**TH-SPR2N5** は、**SPR2** の **HEAT** リピートの 1~4 番目の断片であり、5 番目を含んでいなかった。一方、その他の結合性を示した断片は全て **SPR2** の **HEAT** リピートの 4 と 5 番目を共に含んでいた。以上の結果から、**N** 末端領域では **HEAT** リピートモチーフの 4 番目と 5 番目の領域で結合していることが分かった(**Fig 27**)。

SP2L についても微小管結合性を調べた。**TF-SP2L** 組換えタンパク質を用いて微小管との共沈実験を行った結果、**SP2L** の全長配列も *in vitro* において微小管結合性があることが示唆された(**Fig 29**)。

SPR2 の各領域が細胞内でどのような機能を持っているのかを調べるために **C** 末端側に **GFP** を融合した **SPR2** の **N** 末端領域、中間領域、**C** 末端領域(**CaMV35Sp::SPR2N-GFP**、**CaMV35Sp::SPR2M-GFP**、**CaMV35Sp::SPR2C-GFP**)をシロイヌナズナ及びタバコ **BY-2** 細胞に形質転換した。まず、シロイヌナズナでは全長を導入した **SPR2-GFP genomic;spr2-2** 系統や **CaMV35Sp::SPR2-GFP;spr2-2** 系統(Shoji et al., 2004)と異なり、全ての系統で **GFP** の十分な発現が見られる株を選抜することができなかった(**data not shown**)。中には *spr2* 変異株と同様のねじれ形質を示す株もあり、内在性 **SPR2** 遺伝子の発現も共抑制されていると考えられた。このような共抑制は過去の研究で野生株に **SPR2** 過剰発現した際にも一部の株で見られた(Shoji et al., 2004)。また、*spr2* 変異株にこれらの **GFP** 融合型部分配列を導入しても形質の変化は見られなかった。同様に、**BY-2** 細胞にも **GFP** 融合型部分配列を形質転換した。その結果 **GFP** 蛍光を検出できる株を選抜することができたが、**CaMV35Sp::SPR2-GFP** 形質転換細胞で見られた、繊維状及びドット状の局在は部分長を導入した何れの系統でも確認できなかった(**Fig 30A**)。また、形質転換細胞からタンパク質を抽出し、微小管の重合・脱重合サイクルを利用した方法(Hamada et al., 2004)で微小管と微小管付随タンパク質を含む画分を精製しても、導入タンパク質は含まれておらず微小管と直接結合していないことが示された(**Fig 30B**)。以上のことから、細胞内では **SPR2** は全長ないと機能できないことが示唆された。

A	Construct		MT binding	
	Tag		TRX fusion	GSTfusion
Full	1	12 34567 8 9 864	++	++
ΔS/T	38	12 34567 8 9 864	nd	++
ΔR1-7	327	12 34567 8 9 864	nd	++
ΔC	1	12 34567 8 9 567 795 864	nd	++
ΔR8-9	1	12 34567 8 9 499	nd	++
N	1	12 34567 8 9 331	++	++
N1	38	12 34567 8 9 163 331	nd	—
N2	163	12 34567 8 9 285 331	nd	+
N3	38	12 34567 8 9 248 331	+	nd
N4	38	12 34567 8 9 204 331	+	nd
N5	38	12 34567 8 9 112 331	—	nd
N6	112	12 34567 8 9 163 248	+	nd
N7	163	12 34567 8 9 204 331	+	nd
N8	163	12 34567 8 9 248 331	+	nd
M	327	12 34567 8 9 499	—	—
C	498	12 34567 8 9 864	++	++
Cs	559	12 34567 8 9 864	nd	—

MT; microtubule, nd; not determined

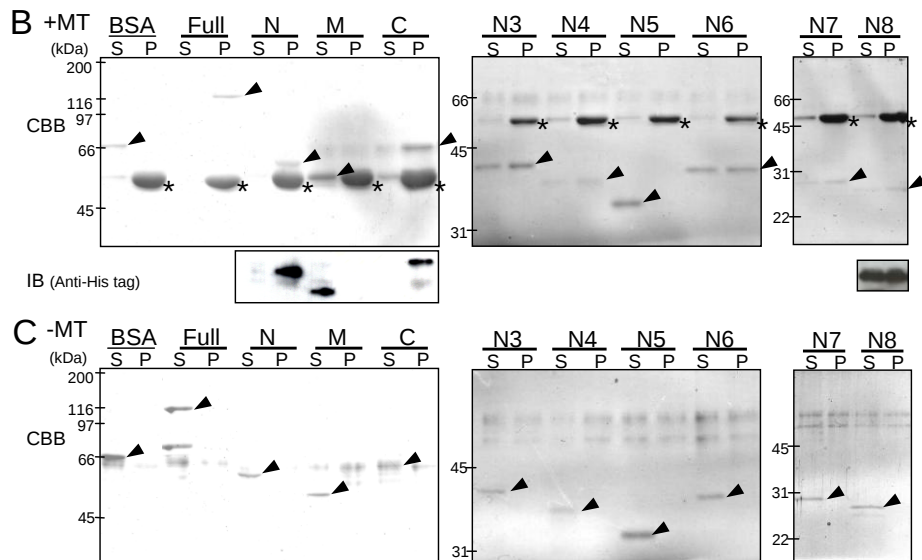


Fig 27. SPR2 の微小管結合領域の特定

A: in vitro での微小管との共沈実験に用いた各 SPR2 組換えタンパク質構造と微小管結合の強さ。SPR2 の Ser/Thr に富む領域を斜線のボックス、HEAT リピード領域を番号ついたボックス、SPR2とSP2Lで特に保存性の高い領域をグレーのボックスで示した。結合の強さは、加えた組換えタンパク質が全て微小管と共沈したものを「++」、一部が沈殿したものを「+」、全て上清に回収されたものを「-」とした。BC: 微小管存在下(B)、非存在下(C)における共沈実験の上清画分(S)、沈殿画分(P)の SDS-PAGE 電気泳動ゲル画像。ゲルは CBB 染色もしくは抗 His tag 抗体を用いたイムノブロッティングによりシグナルを確認した。Arrowheads;各組換えタンパク質, Asterisks(*); tubulin

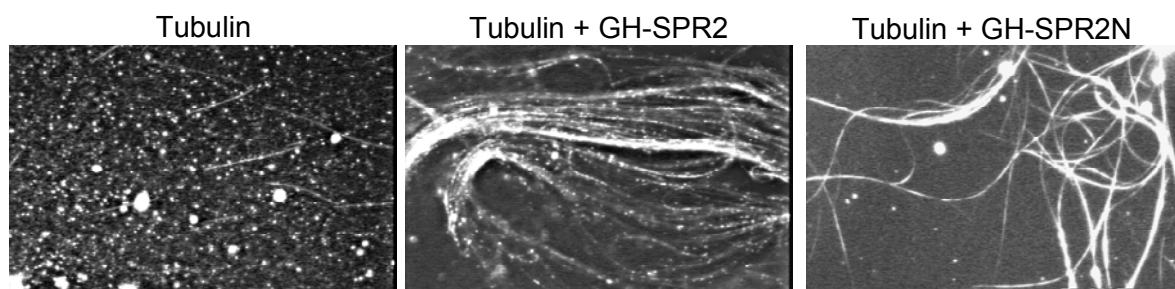


Fig 28. GH-SPR2 及び GH-SPR2N による微小管の束化

in vitro で再構成させた微小管に $0.7 \mu\text{M}$ GH-SPR2(center) 及び $0.7 \mu\text{M}$ GH-SPR2N(right)を加えてからそれぞれ 10 分後、5 分後の暗視野顕微鏡画像。PEM buffer のみを加えた時(left)と比べて微小管が長くなり、束化された。

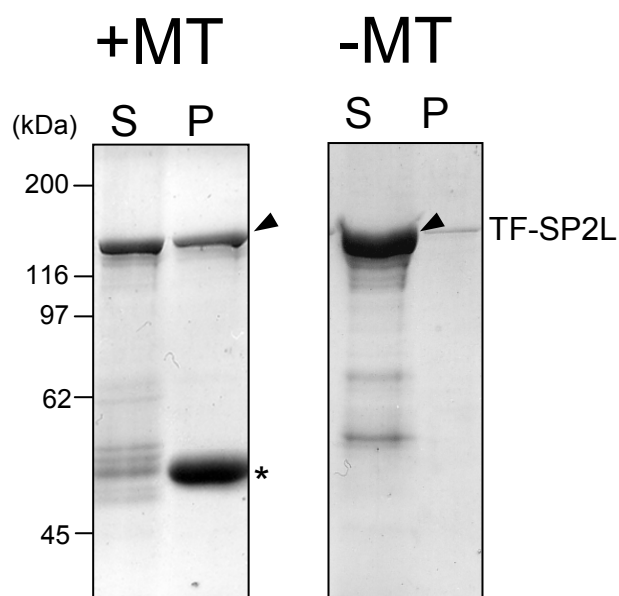


Fig 29. SP2L の微小管結合性

in vitro での SP2L と微小管との共沈実験。微小管存在下(+MT)、非存在下(-MT)における共沈実験の上清画分(S)、沈殿画分(P)の SDS-PAGE 電気泳動ゲル画像。ゲルは CBB 染色によりシグナルを検出した。Arrowhead が TF-SP2L のシグナル、asterisk が tubulin のシグナルを示す。

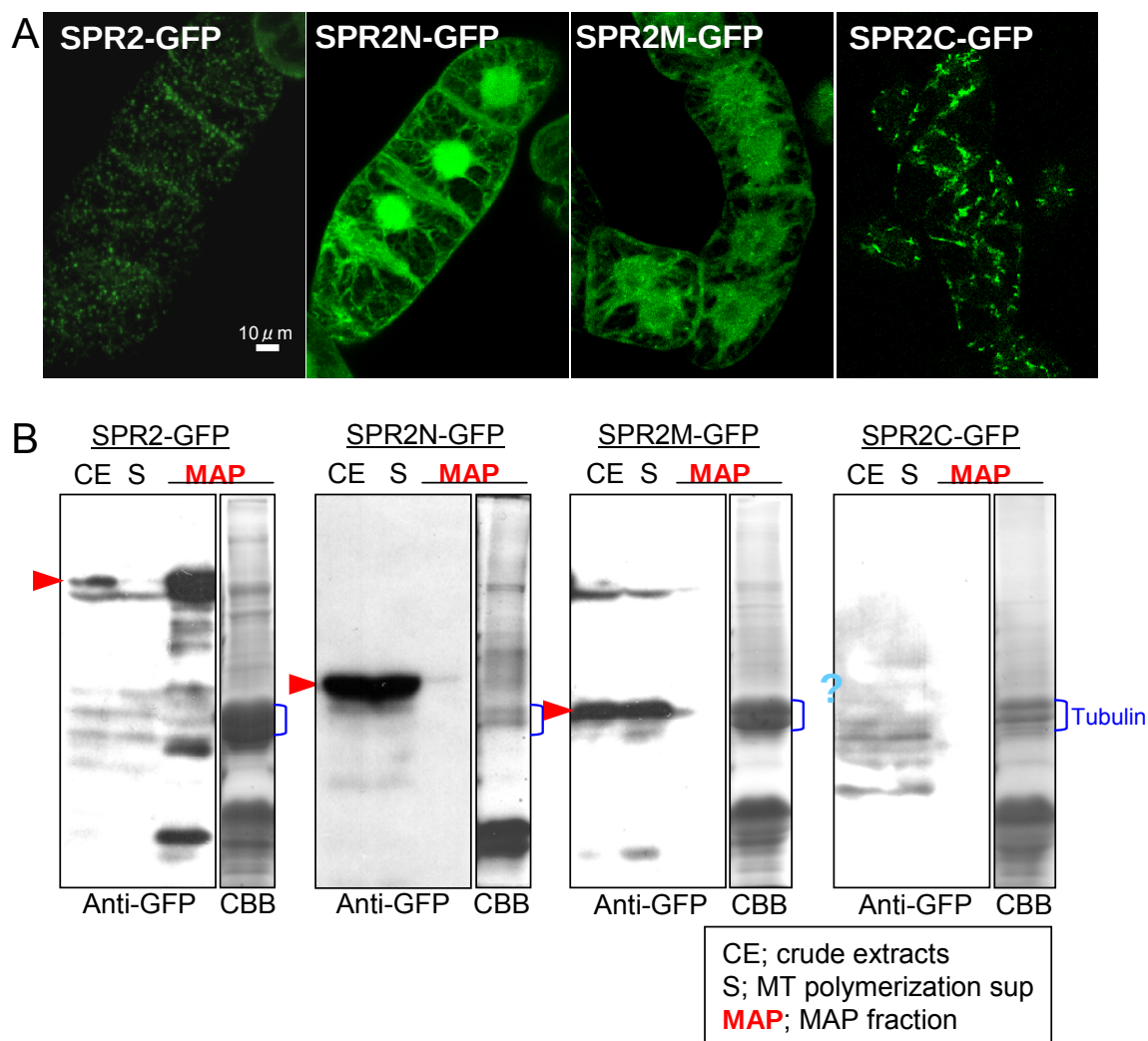


Fig 30. 細胞内における **SPR2** 部分長配列の微小管結合性の検証

A: CaMV35Sp::SPR2-GFP、CaMV35Sp::SPR2N-GFP、CaMV35Sp::SPR2M-GFP、CaMV35Sp::SPR2C-GFP)を形質転換したタバコ BY-2 細胞における GFP 蛍光。SPR2-GFP では細胞表層においてドット及び繊維状の局在が観察されたが、SPR2N-GFP 及び SPR2M-GFP では核及び細胞質に広がる局在しか観察されなかった。SPR2C-GFP は蛍光シグナルが弱く、細胞質の何らかの細胞小器官に蓄積したような顆粒状の局在が観察された。

B: 各形質転換細胞のタンパク質抽出液(CE)と、微小管及び微小管付随タンパク質を含む MAP 画分に含まれる導入タンパク質の検出。検出は CBB 染色と抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティングによる。Arrowheads; 導入タンパク質のバンド, Blue parentheses; tubulin のバンド。SPR2C-GFP では導入タンパク質の蓄積が確認できなかった。

2-3-6 SPR2 と他の MAPs との関連

GST pull-down 解析法を用いて SPR2 と他のタンパク質の関連を調べた。まず GlutathioneSepharose4B のカラムに EB1b 全長 (Gst-EB1b) 及び EB1b の N 末端領域を除いた領域 (GH-EB1b Δ N) を固定し、SPR2 全長 (TF-SPR2) を添加すると、GH-EB1b Δ N にだけ結合した。さらに、SPR2 の部分配列 (TH-SPR2N、TH-SPR2M) を GH-EB1b Δ N を固定したカラムに添加すると、SPR2 の N 末端領域である TH-SPR2N だけが GH-EB1b Δ N と結合した。逆に、カラムに SPR2 全長 (GH-SPR2) を固定し、EB1b の N 末端領域を除いた領域 (FH-EB1b Δ N) を添加しても、SPR2 と EB1b Δ N の結合が確認された。同様にして、カラムに固定した SPR2 全長 (GH-SPR2) には、微小管を形成していない遊離チューブリンも結合した。さらには、別のタグを付加した SPR2 全長 (TF-SPR2) も結合した (Fig 31)。以上のことから、SPR2 は微小管プラス端集積タンパク質である EB1b と直接結合することができ、また微小管だけでなく遊離のチューブリンとも結合する能力があることが示唆された。また、SPR2 同士でオリゴマーを形成している可能性も示唆された。以上の結果をさらに検証するため、Yeast two-hybrid 解析を用いて同様の組合せのタンパク質の相互作用を調べたが、相互作用は認められなかった (data not shown)。

次に、今までに報告されているシロイヌナズナの表層微小管に異常を示す変異株と *spr2* 変異株の二重変異株もしくは三重変異株を作成し、SPR2 と他の微小管関連タンパク質との遺伝的関係を調べた。

まず微小管プラス端集積タンパク質である EB1 タンパク質ファミリーとの関連について検証した。*spr2-2* 変異株において GFP-EB1b を過剰発現させると、2-3-3 の項で示したように、GFP-EB1b の動態に異常が起きた。それだけではなく、GFP-EB1b を過剰発現させた *spr2-2* 変異株では胚軸や葉柄細胞の肥大化が観察された (Fig 32A)。*spr2-2spr2l-1* 変異株で GFP-EB1b を過剰発現させた際には肥大化が見られた個体は少なかった (10%) が、GFP-EB1b のタンパク質の蓄積が著しく減少していた (Fig 32B)。これらの結果から、細胞内において SPR2 と EB1b が微小管のプラス端において何らかの相互作用をしていることが示唆された。しかしながら、SPR2 過剰発現株 (SPR2ox; Col) と EB1 過剰発現株 (GFP-EB1b) の交配により SPR2 と EB1 の両方を過剰発現した際には、明確な表現型は現れなかった (data not shown)。このことから、正常に EB1 が機能するには SPR2 の存在が必要であることが示唆された。さらに、EB1 の遺伝子破壊株との多重変異株を調べた。*eb1a* 変異株や他の EB1 遺伝子の変異株 (*eb1b*、*eb1c*) は、根の伸長方向が野生株よりもやや左に傾き、微小管薬剤に対する応答が野生株と異なることが分かっている (Bisgrove et al., 2008; 小牧、未発表)。

spr2-2spr2l-1eb1a 三重変異株では幼植物の成長が著しく阻害された(Fig 33)。

mor1-1 変異株は、高温下で表層微小管の配向が乱れることによって、細胞が肥大し、伸長が抑制される高温感受性変異株である(Whittington et al., 2001)。その原因遺伝子である *MOR1* は、アフリカツメガエル *XMAP215* やヒト *TOGp* のホモログであり、微小管を安定化する機能があるとされている MAP である。また、*SPR2* 同様、HEAT リピートモチーフを持つ。そこで、*SPR2* と *MOR1* の機能に関連があるのかを調べるために、*spr2-2mor1-1* 二重変異株を作出した。まず 22℃で生育させた時の表現型を観察した。*mor1-1* の根は、野生型よりも伸長速度が速く、ねじれはあまり観察されなかった。それに対して *spr2-2mor1-1* 二重変異株では、伸長速度は *mor1-1* 変異株のように速く、*spr2-2* のように右ねじれ形質を示した。また、*mor1-1* 変異株の胚軸の細胞列は野生型と同様真つすぐであるが、*spr2-2mor1-1* 二重変異株では細胞表面が波打ったようになった。次に、29℃で生育させて観察した。*spr2-2* 変異株も *mor1-1* 変異株に比べて程度は低いが、細胞伸長が抑制され細胞の肥大が観察された。一方、*spr2-2mor1-1* 二重変異株では、より強い細胞の膨張が観察された。さらに、成熟した植物体になると、地上部の成長が著しく遅延した。これらの結果から、*SPR2* と *MOR1* は一部において機能が関わりあっている可能性があることが予想された(Fig 34,35)。

phs1-1 変異株は、微小管重合阻害剤プロピザミドに対して高感受性を示し、表層微小管の配向が乱れることから単離された変異株である(Naoi et al., 2004)。原因遺伝子である *PHS1* は MAP キナーゼホスファターゼ様のタンパク質をコードしており、MAP キナーゼによるリン酸化経路が表層微小管制御に負深く関わっていることを示唆した。そこで、この経路と *SPR2* の関係を調べるために、*phs1-1* と *spr2* との二重変異株を作出した。*phs1-1* 変異株の根は、通常の寒天培地で左方向に伸長し、*spr2-2* 変異株の根はわずかに右に伸長する。また地上部は、*phs1-1* 変異株は、ロゼット葉でやや時計回りのねじれが見られ、*spr2-2* 変異株はロゼット葉が反時計回りにねじれるという表現型を示す。これらに対して *spr2-2phs1-1* 二重変異株の根は、左方向に傾いて伸長し、*phs1-1* 変異株と似た表現型を示した。また地上部のロゼット葉は、より強く時計回りにねじれた。これらの結果から、*spr2-2phs1-1* 二重変異株では *spr2-2* の表現型は打ち消され、*phs1-1* の表現型がやや強調されたことがわかった(Fig 35)。このことから、*PHS1* は *SPR2* に対して遺伝的上位にあることが示唆された。

さらに、*phs1* 及び *mor1* 変異体における *SPR2* タンパク質の蓄積量の変化を調べた。交配により *phs1-1* 及び *mor1-1* 変異株に *SPR2-GFP genomic* を導入し、その *SPR2-GFP* タンパク質の蓄積量を、抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッ

ティングによって検出した。*mor1-1* 変異株において若干の SPR2-GFP 蓄積量の増加が見られたが、顕著な変化を見出すことはできなかった(Fig 36)。

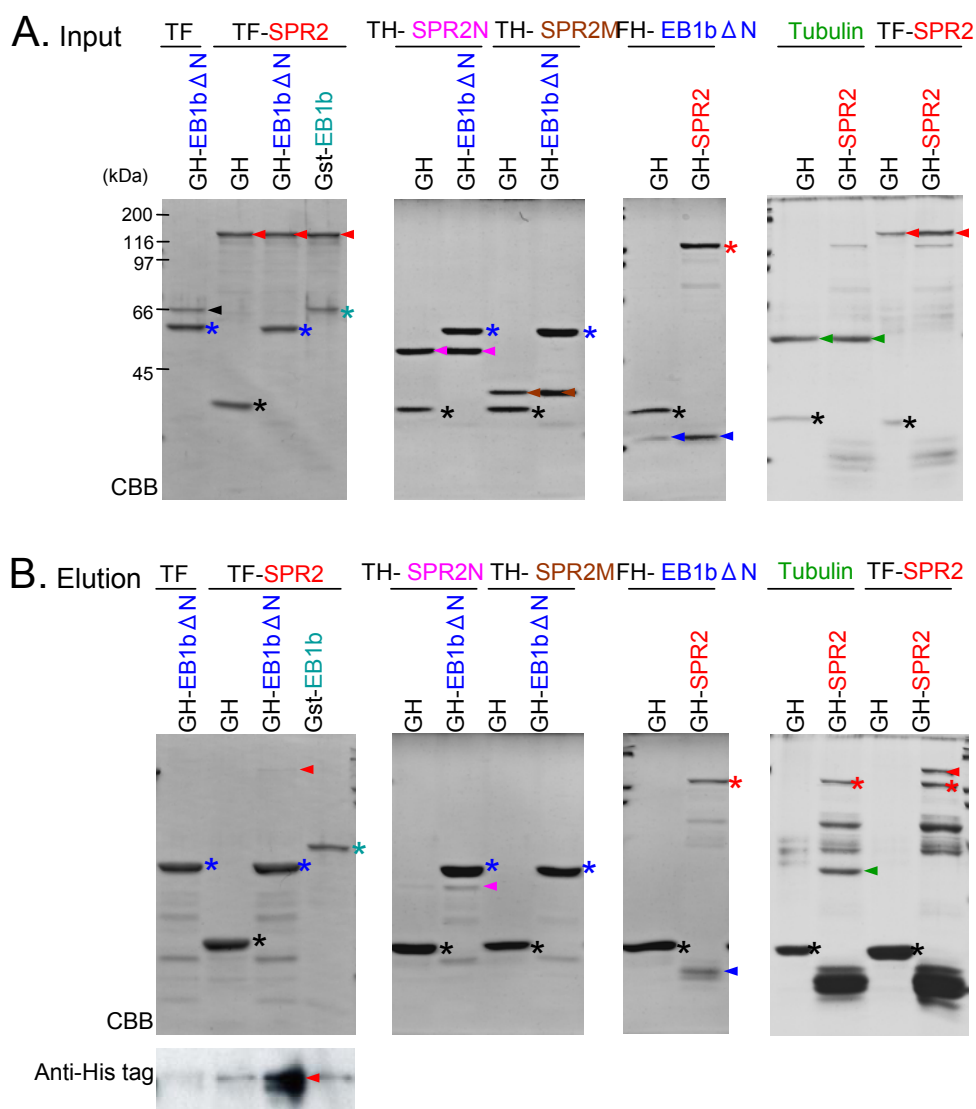


Fig 31. SPR2 と相互作用するタンパク質

GST pull-down 解析法を用いた SPR2 と EB1b、遊離 tubulin 及び SPR2 との相互作用の検証。input(A)はカラムに添加したそれぞれのタンパク質の混合物である。下側に記したタンパク質をカラムに固定した後、上側に記したタンパク質を添加し、反応させた。その後、カラムを洗浄し、溶出バッファーにより溶出した(B)。B で arrow heads で示されているタンパク質が asterisk で示された GST 融合タンパク質と結合したタンパク質である。CBB 染色もしくは抗 His tag 抗体を用いたイムノブロットングによりタンパク質を検出した。Asterisks(*); black:GH, green:GH-EB1b, blue:GH-EB1b Δ N, red:GH-SPR2; Arrow heads; black:TF, blue:FH-EB1b Δ N, red:TF-SPR2, pink:TH-SPR2N, green:tubulin

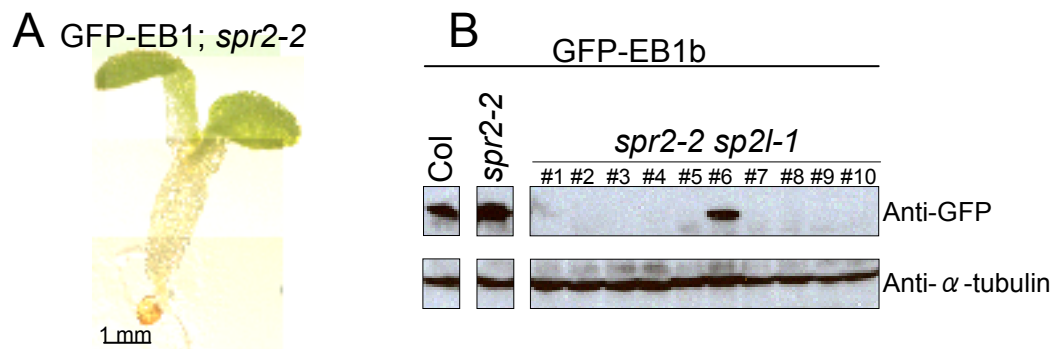


Fig 32. GFP-EB1b を導入した *spr2* 及び *spr2sp2l*

A: CaMV35Sp::GFP-EB1b を導入した *spr2-2* 変異株。胚軸や葉柄で細胞の肥大化が観察された。

B: CaMV35Sp::GFP-EB1b を導入した Col、*spr2-2* 及び *spr2-2sp2l-1* からタンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティングにより GFP-EB1b の蓄積を検出した。ほとんどの *spr2-2sp2l-1* 変異株では GFP-EB1b のタンパク質の蓄積が抑制されていた。抗 α チューブリン抗体で検出した α -tubulin の蓄積量をコントロールとした。

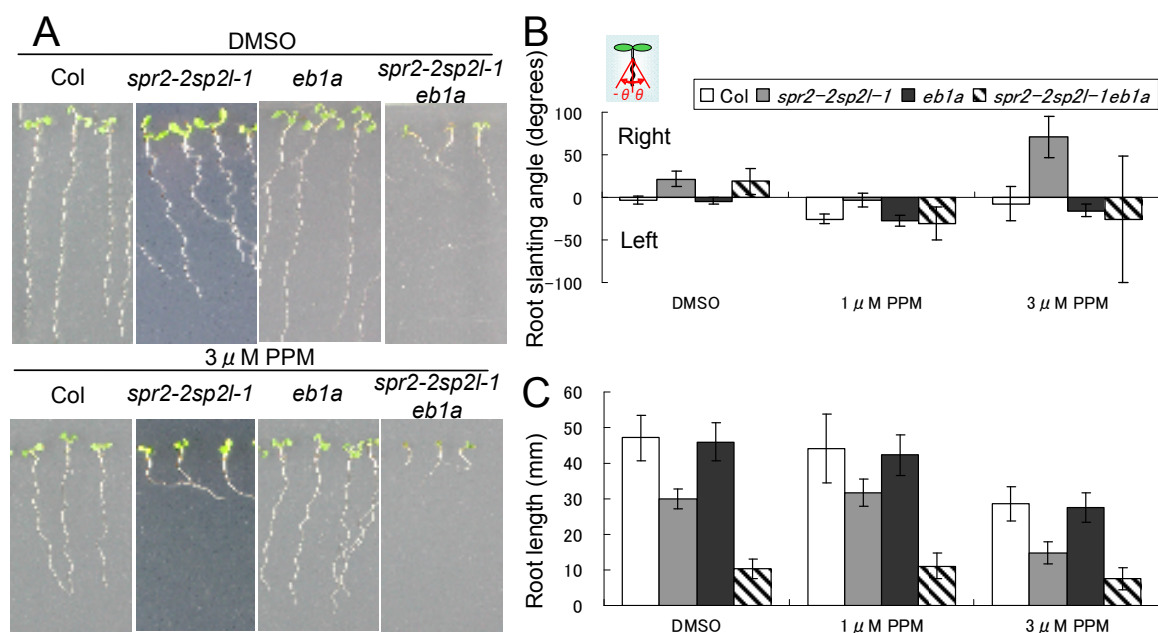


Fig 33. *spr2sp2leb1a* 三重変異株

A: 微小管重合阻害剤プロピザミド無添加 (upper) 及び添加 (lower) 培地で育てた発芽後 7 日目の幼植物。

BC: 発芽後 7 日目の幼植物の根の伸長角度 (B) と根の長さ (C)。

PPM; propyzamide

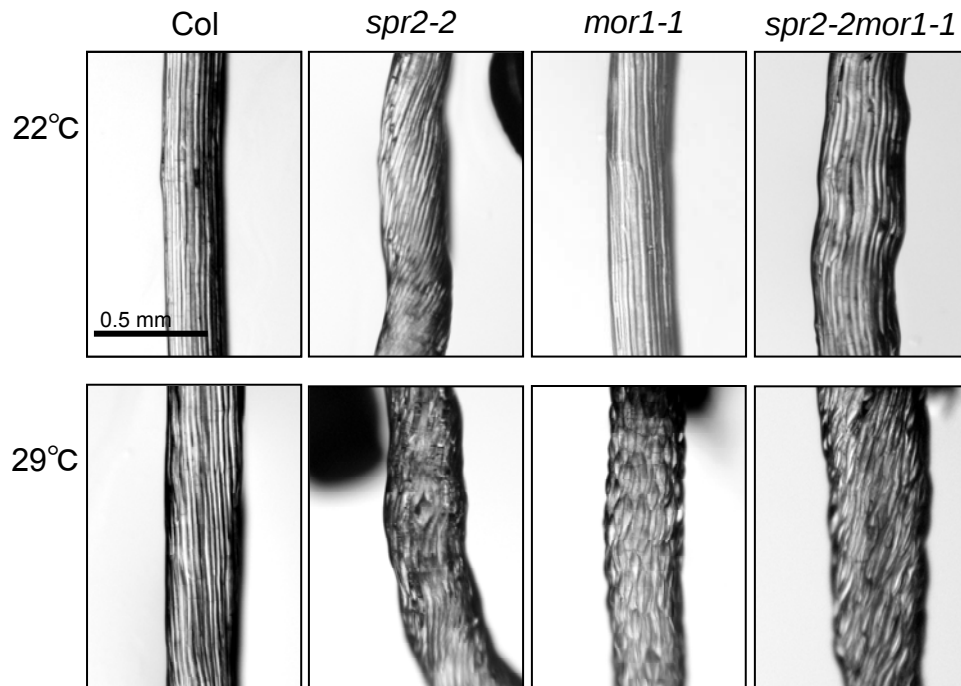


Fig 34. *spr2mor1-1* 二重変異株

22℃及び 29℃の条件下、通常培地上で育てた発芽後 4 日目の Col、*spr2-2*、*mor1-1* 及び *spr2-2mor1-1* の胚軸。

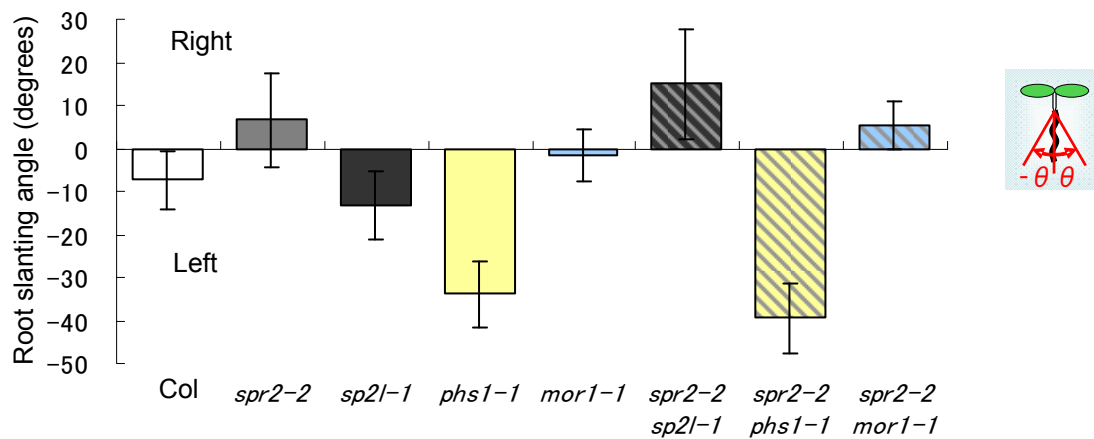


Fig 35. *spr2-2mor1-1* 及び *spr2-2phs1-1* 二重変異株の根の伸長角度

通常培地で育てた発芽後 7 日目の根の伸長角度を測定した。

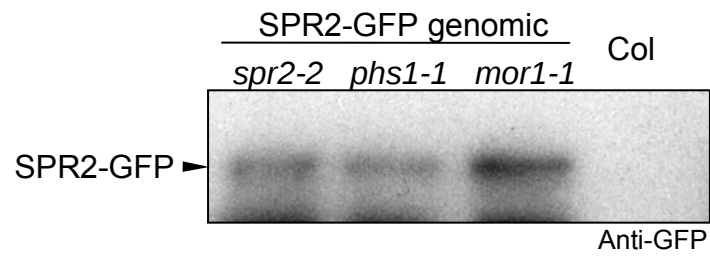


Fig.36 *phs1-1* 及び *mor1-1* 変異株における SPR2 タンパク質の蓄積量

SPR2-GFP genomic を導入した *spr2-2*、*phs1-1*、*mor1-1* の各変異株において、SPR2-GFP タンパク質の蓄積量を比較した。幼植物の全植物体から全タンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティングを行った。

2-4 考察

2-4-1 本研究の意義

植物細胞において、細胞表層にある微小管(表層微小管)は伸長方向に対して垂直に配向することにより、細胞壁の最内層にあるセルロース微繊維の配向を規定し、伸長方向の決定に重要な役割を果たしている。この微小管の配向は、様々な微小管付随タンパク質(MAPs)によって直接制御されている。現在までに報告されている MAPs から、表層微小管の形成及び維持には、次のような機構が考えられている(Fig 3, Hashimoto 2003)。細胞膜上、もしくは微小管上にγチューブリンや SPR3 が含まれる複合体によって重合核が形成される(Murata et al., 2005, 中村ら, 未発表)。そこから新しい微小管が形成される。EB1 などのプラス端集積タンパク質や、MOR1(シロイヌナズナ)/TMBP(タバコ)によってプラス端の重合を促進され、長く伸長した微小管は、Katanin によって重合核から切断されたり、Kinesin などのモータータンパク質に輸送されたりすることによって、厳密に規定された配向で細胞表層に並ぶ(Chan et al., 2003, Hamada et al., 2004, Burk et al., 2002, Stoppin-Mallet et al., 2006, Preuss et al., 2004)。そして、MAP65 によって別の微小管と束化されたり、PLD によって細胞膜に繋ぎ止められたりすることによってその配向を維持される(Smertenko et al., 2004, Gardiner et al., 2001, Gardiner et al., 2003, Hirase et al., 2006)。さらにそれぞれの MAPs は、PHS1 などが関わりとされる細胞伸長のシグナル伝達物質によって、リン酸化・脱リン酸化などによる活性化・不活性化制御も受けていると考えられている(Naoi et al., 2004)。

しかしながら、今までの知見からは表層微小管がなぜ伸長方向に対して垂直に並ぶのかを説明することはできず、これらのタンパク質が存在しても *lefty1* や *lefty2* 変異株のようなチューブリン変異による微小管の構造・動態の変化や、*spr1* や *spr2* 変異株のようなその他のタンパク質の変異により、表層微小管の配向が傾き、細胞の伸長方向も傾いてしまうことがある。そのため、表層微小管の配向を規定する新たな要因を探す必要があった。特に、表層微小管は植物特有の微小管構造であるので、植物特有の制御機構が存在している可能性が考えられ、植物特有の微小管機能に関与するタンパク質の機能解析が有効であると考えられた。

現在までに我々の研究室では、SPR1、SPR2という表層微小管の配向に関わる植物特有の MAPs が見つかっている(Nakajima et al., 2004, Shoji et al., 2004)。これらの MAPs の変異株は、表層微小管の配向が乱れたために細胞の伸長方向が傾いたことから、表層微小管の配向の規定に重要な役割を果たすと考

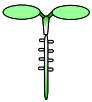
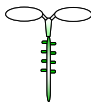
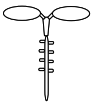
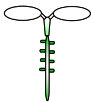
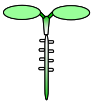
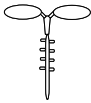
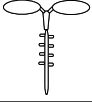
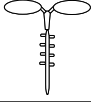
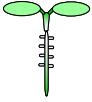
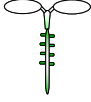
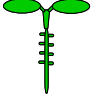
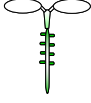
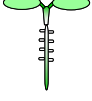
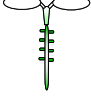
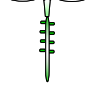
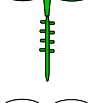
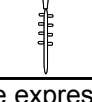
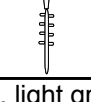
えられた。**SPR2**の欠損変異株である*spr2*変異株では、黄化胚軸などの伸長組織の表皮細胞において表層微小管が左巻きヘリックス状に配向する割合が増加していたため、細胞の伸長方向が右にねじれた形質を示した(Fig 6)。**SPR2**は、動物や酵母からホモログが見つからないことから、植物特有の新規MAPであった(Shoji et al., 2004)。しかしながら、変異株の解析からは**SPR2**の表層微小管に対する直接的な機能を解明することはできなかった。

そこで本研究では、細胞内と*in vitro*の両面から**SPR2**の微小管に対する機能を解析することで、**SPR2**のタンパク質の生理機能と、その機能を持った上で、細胞内で果たす役割を明らかにした。そして、本研究の方針は、未だ不明な部分が多い植物の表層微小管の配向制御の解明と、今後の微小管付随タンパク質研究分野における新たな研究法に繋がるものと期待される結果となった。

2-4-2 **SPR2**と**SP2L**の機能重複性

SPR2及び**SP2L**の発現と*spr2*変異形質の関連を(Fig.37)にまとめた。**SP2L**はシロイヌナズナゲノム内において**SPR2**と最も相同性が高いが、T-DNA挿入変異株(*sp2l-1*変異株, Fig.16)の表現型が野生型と変わらないことから、その機能は未知であった。本研究において、**SP2L**は**SPR2**と同じく細胞内で表層微小管上に局在し、*spr2sp2l-1*二重変異株は*spr2*変異株の変異形質を強調し、さらには*in vitro*において**SP2L**は、**SPR2**同様微小管と直接結合し、微小管の停止を阻害し伸長を促進する活性があることが判明した。また、*spr2*変異株において**SP2L**を過剰発現すると*spr2*変異形質を回復することも分かっている(Fig 12A, 庄司、未発表)。以上のことから、**SP2L**は**SPR2**と重複した生理機能を持っていることが示唆された。そのため、*spr2*単一変異株では根の変異形質が現れないのは、根において**SPR2**と**SP2L**の機能重複性があったためと考えられた。しかしながら、**SPR2**が全てのほとんどの組織で発現しているのに対し、**SP2L**の発現量は低く、根毛や葉柄などの一部の器官でのみ微小管との局在が確認されたことから、野生株では主に**SPR2**機能していると考えられた。

Fig.37 各変異株、形質転換株の遺伝子発現と表現型

	*Expression		**Growth	
	SPR2	SP2L		
Wild type				
Col				None
Mutants				
<i>spr2-1, spr2-2</i>				]
<i>sp2l-1</i>				None
<i>spr2-2sp2l-1</i>				]
Transgenic lines				
<i>SPR2-GFPgenomic; spr2-2</i>				Rescued
<i>CaMV35Sp::SPR2; spr2-2</i>				Rescued
<i>SP2L-GFPgenomic; sp2l-1</i>				None
<i>SP2L-GFPgenomic; spr2-2sp2l-1</i>				Rescued
<i>CaMV35Sp::SP2L; spr2-1</i>				Rescued
<i>CaMV35Sp::SP2H5 (At5g62580); spr2-2</i>				]

•*Expression; white: no detectable expression, light green: weak expression, dark green: strong expression

•**Growth; gray: no helical growth, green: right helical growth

2-4-3 SPR2 の構造と微小管結合領域

SPR2 はそのアミノ酸配列内にタンパク質間相互作用に関与する「HEAT リピート」構造をとると考えられるモチーフを 9 個持つ(Shoji et al., 2004)。そのうち 7 個は N 末端領域連続して並んでいる。本研究において、SPR2 はこの連続した 7 個の HEAT モチーフの 4 番目と 5 番目で微小管と結合することが分かった。さらに既知のモチーフは見つからないが、他の植物のホモログ(シロイヌナズナ SP2L やポテト HIP2 など)との保存性の高い C 末端領域においても微小管と直接結合できることが分かった。

HEAT リピートモチーフは、2 本の α ヘリックスを基本構造とし、このモチーフをタンパク質には、モチーフを 15 個持つ PP2A や 20 個持つ importin β があり、モチーフ全体で超らせん構造を作っていることが X 線結晶構造解析から分かっている(Xing et al., 2006, Cho et al., 2007, Cingolani et al., 1999)。また、微小管付随タンパク質では XMAP215 ファミリーや CLASP ファミリーのタンパク質がこのモチーフを持ち、連続した 6 個の HEAT リピート含む領域を TOG ドメインと呼び、それぞれ複数個の TOG ドメインを配列内に持つ。これらのタンパク質ファミリーは共に微小管のプラス端に局在するタンパク質であり、TOG ドメインでチューブリン分子やいくつかのチューブリン分子が連なったオリゴマーと結合することもわかっている(Slep et al., 2007)。また別のプラス端局在タンパク質である EB1 も α ヘリックス構造を 6 個含む CH ドメインでチューブリン結合することが分かっている。以上のことから、HEAT リピートモチーフや連続した α ヘリックス構造は、微小管のプラス端局在化タンパク質に共通した構造であり、SPR2 も構造上からプラス端局在タンパク質と似た部分があることが示唆された。

さらに pull-down 解析の結果から SPR2 の N 末端領域の HEAT リピートモチーフで EB1 との結合性が示唆された(Fig.31)。このことから、HEAT リピート領域が他のタンパク質との相互作用領域である可能性も示唆された。

2-4-4 SPR2 の微小管局在

シロイヌナズナ細胞内における SPR2-GFP の動態解析により、SPR2 は微小管上にドット状に局在し、移動したり、停止したりしていることが分かった。この動態から考えられる SPR2 の微小管上での局在位置をまとめると以下ようになる。

- 1, 微小管の交差する位置に集積し、停止する(Fig 13B)。
- 2, 微小管プラス端の伸長・収縮する端に局在する(Fig 13C;*1*2)。
- 3, 微小管の側面上で他のドットとの融合や二つのドットへの分離を起こしながら

ら移動する(Fig 13D)。

このドットは、**SPR2** がある程度集合した **SPR2** のオリゴマー、もしくは他のタンパク質を含めた複合体として構成されていると考えられる。また、1 の「停止」に関しては、シロイヌナズナの **MAP65-6** も、*in vitro* において複数の微小管の交差を繋ぐことで微小管の網目構造を作ることが分かっている(Mao et al., 2005)。しかし、**SPR2** においては *in vitro* での微小管動態観察の際にこのような微小管の網目構造の形成は見られなかった。このことから、微小管の交差位置での **SPR2** の停止には、**SPR2** を集合させる何らかの制御、もしくは、他の何らかのタンパク質の存在が必要である可能性が示唆された。

2,3 に関して **SPR2** のように、微小管の端だけでなく側面上でも粒子状で局在し、モーター活性を持たない **MAP** は他に、**XMAP215** ファミリーや **CLASP** ファミリーが知られている。これらのタンパク質は微小管側面にも局在するが、一部がプラス端にも集積する。その中でも **XMAP215** は、最近になって **EB1** などの他のプラス端集積タンパク質と異なるプラス端への局在様式をとることが分かってきた(Bouhard et al., 2008)。**EB1** は伸長中のプラス端において、チューブリン分子が微小管に取り込まれる度に新たな **EB1** 分子がプラス端に結合し、先に結合していた **EB1** 分子は微小管側面から離れていくという「treadmilling」という結合様式をとる。一方 **XMAP215** は、微小管が伸長すると、微小管側面を移動し、プラス端に結合する「surfing」様式をとる(Fig 38, Vaughan, 2004, Asbury, 2008)。植物細胞においても **XMAP215** のシロイヌナズナホモログである **MOR1** やタバコホモログである **TMBP200** も微小管上に粒子状に存在するのが観察されている(Kawamura et al., 2006; Hamada et al., 2004)。また、**CLASP** のプラス端結合様式は明らかになっていないが、シロイヌナズナ植物内において、微小管上に粒子状に局在すること、一部がプラス端に局在するが、同じくプラス端集積タンパク質の **EB1** とはプラス端での局在位置が少しずれていることが分かっている(Ambrose et al., 2007; Kirik et al., 2007)。

さらに、**SPR2** と **XMAP215** ファミリーや **CLASP** ファミリーは全て **HEAT** リピートモチーフを持つタンパク質である(Slep et al., 2007)。シロイヌナズナの *mor1-1* 変異株は、この **HEAT** リピート中の最初のモチーフ内に 1 塩基置換が起こった結果、高温条件下において表層微小管が断片化するという表現型を持つ(Whittington et al., 2001)。このことから **MOR1** の少なくとも N 末端側の **HEAT** モチーフは、表層微小管の制御に関わっていることが示唆された(Twell et al., 2002)。**MOR1/TMBP200** のアフリカツメガエルホモログである **XMAP215** は、*in vitro* の実験から、この N 末端領域が微小管に結合し微小管を安定化する活性があることや、遊離のチューブリンとも複合体を形成し、微小管の重合を促進

することも分かっている(Popov et al., 2001、Brouhard et al., 2008)。

以上のような SPR2 と XMAP215 や CLASP との共通性から、SPR2 もこれらのタンパク質とよく似たプラス端局在様式をとる可能性があると考え、Fig 39 のようなモデルを仮定した。今後、このモデルの検証のために SPR2 と微小管を二重標識し、両者の挙動を同時に解析する必要がある。本研究においては SPR2-GFP と mCherry-TUB6 の両方を導入した形質転換系統を作成したが、微小管を標識することができなかった。これは、植物内で複数の微小管関連タンパク質に蛍光タンパク質を融合することが微小管機能に影響するため、導入遺伝子の発現を抑制したと考えられた。そこで今後は、*in vitro* において SPR2 と微小管を二重標識し、SPR2 が微小管上を「surfing」するか否かを調べる必要があると考えられる。

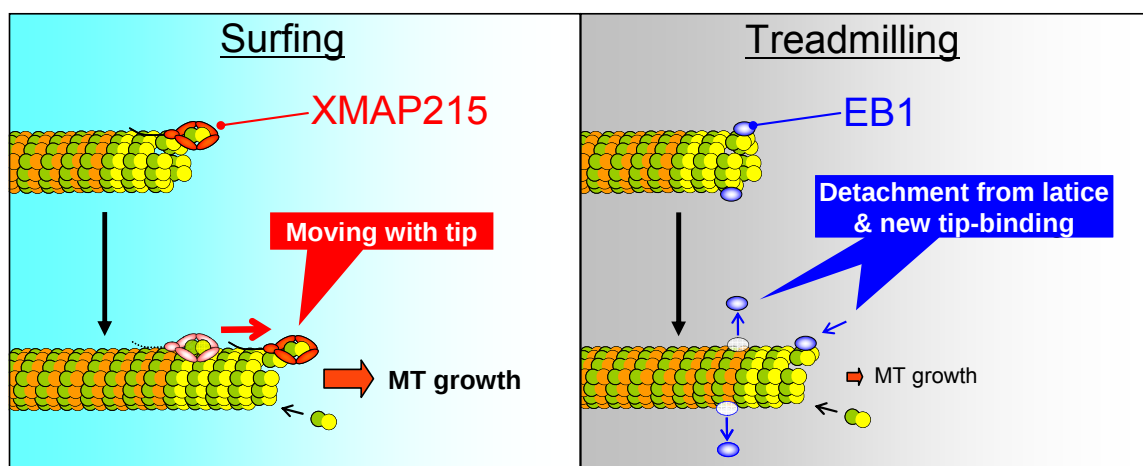


Fig.38 2 つの微小管プラス端局在様式

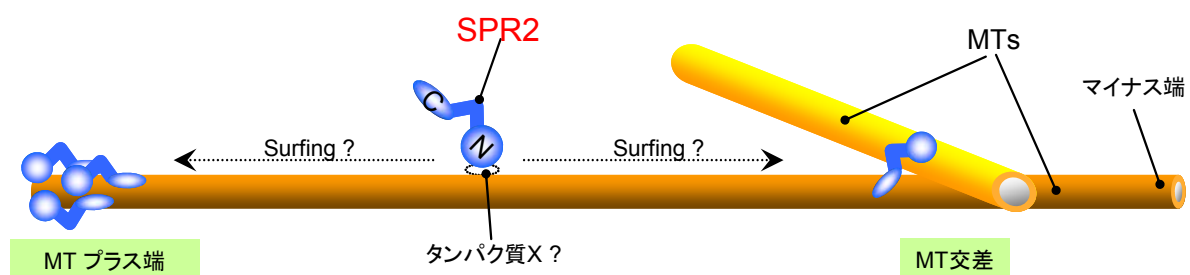


Fig.39 SPR2 の微小管局在モデル

2-4-5 SPR2 の微小管に対する機能

微小管標識マーカーである GFP-TUB6 を用いた微小管の動態解析から、*spr2* 変異株内では微小管プラス端の伸長から移行した停止の時間が増加していた(Fig 17)。さらに、暗視野顕微鏡を用いた *in vitro* における微小管の動態解析により、SPR2 及び SP2L は微小管プラス端の停止への移行を阻害することで、伸長時間・速度が増加させた(Fig 23)。しかしながら、伸長速度が極端に上昇することがなかったことから、SPR2 は直接的に微小管伸長を促進しているのではなく、停止を阻害することで間接的に微小管の伸長を促進する、「anti-pause」の活性がある可能性が考えられた。また、微小管との結合力の強い SPR2 の N 末端領域の部分配列では微小管動態を停止させ安定化したことや、細胞内で SPR2 全長がないと微小管局在できなかったことから、SPR2 全長が存在しないと「anti-pause」活性を持たないことが分かった(Fig 25, Fig 30)。

動物 MAPs の研究から、微小管の伸長を促進する MAPs には、A、カタストロフ促進因子、B、レスキュー促進因子、C、チューブリン活性化因子などがあることが報告されている。A は XMAP215 などがこれに含まれ、プラス端で GTP チューブリンの重合速度を上げてカタストロフを引き起こしにくくさせるカタストロフ抑制する (McNally, 2003, Popov et al., 2003)。B は MAP2 や MAP4 などに代表され、微小管の側面に結合し、微小管の脱重合を停止させることでレスキューを起こす (Ichihara et al., 2001, Kawachi et al., 2003)。C の CRMP2 は、遊離のチューブリンと複合体を形成して重合能を高め、微小管形成を促す (Fukata et al., 2002)(Fig.40)。

この中でも A の XMAP215 は、「anti-pause」活性を持っていることが報告されている。これは XMAP215 が GTP のアナログである GMPCPP の結合したチューブリンを含む微小管 (GMPCPP 微小管) を脱重合する活性があったことによる (Shirasu-Hiza et al., 2003)。GMPCPP 微小管は、GMPCPP が加水分解しないため、そのままでは脱重合しない超安定化した微小管をつくり、pause の状態を模倣しているとされている。そこに XMAP215 を添加すると微小管を脱重合したことから、XMAP215 の「anti-pause」活性が検証された。SPR2 についても同様の解析を行ったが、GMPCPP 微小管を壊す活性は認められなかった (data not shown)。しかしながら SPR2 は、HEAT リピートモチーフを持っていること、一部が微小管プラス端に局在すること、微小管に対して「anti-pause」活性をもっていることの 3 点で XMAP215 と性質が似ている。XMAP215 はまた、1 分子が遊離のチューブリン 1 分子と複合体を形成している。その状態で微小管との連続した結合・解離を繰り返しながら微小管プラス端に局在 (Surfing) し、プラス端へのチューブリン分子のリクルートに働いていることが分かっている (Fig 38, Brouhard et

al., 2008)。本研究では、pull-down 解析により、SPR2 が遊離チューブリンと結合出来得ることを示した。今後は、細胞内での SPR2 とチューブリンとの結合性などを検証することで、SPR2 と XMAP215 との微小管に対する性質の共通点と相違点を明らかにし、SPR2 のもつ微小管 anti-pause 活性の機構を解明する必要がある。

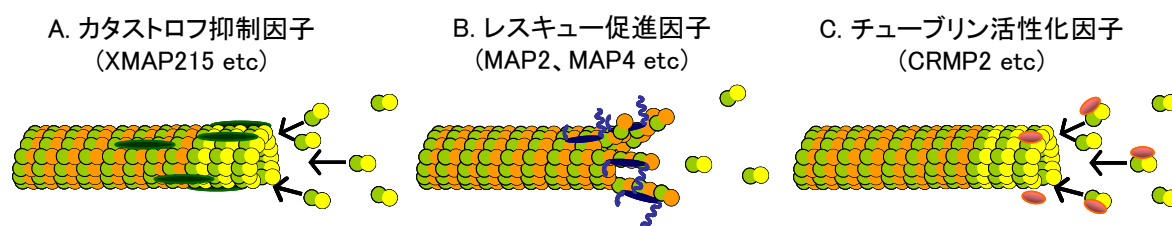


Fig.40 微小管の伸長を促進する MAPs

2-4-6 *spr2* 変異株における表層微小管の配向

根などの急速に長く伸長している細胞では表層微小管は伸長軸に対して垂直に配向する。一方、胚軸の伸長細胞では、縦長に伸長するが、表層微小管の配向は周期的に変化する。1つの細胞に注目すると、200-800分で1回転するような速度で、時計回りもしくは反時計回りに配向角度が変化し、再構成される(Hejnowicz et al., 2005; Chan et al., 2007)。これは、伸長方向を直接的に決定しているのはセルロース微繊維であるので、そのセルロース微繊維を合成するセルロース合成酵素を表層微小管の配向に従って運ぶことで、セルロース微繊維の配向を制御し、最終的に細胞の伸長方向を制御していると考えられた。特に、地上部の器官は地下部よりも光や接触などの環境要因の変化受けやすいので、その変化に応じて迅速に伸長方向を変換できなくてはならない。そこで、このような急速に再構成できる微小管を使った機構が存在すると考えられた(Chan et al., 2007)。

spr2 変異株では、地上部の胚軸や葉柄において顕著に表現型が現れた。また、地上部の表層微小管の配向角度は野生株が様々な角度をとりうるのに対し、*spr2* は左肩上がり角度に偏っていた。これは、微小管の再構成サイクルに異常が起きていることが考えられた。今後は、*spr2* 変異株において時間の経過に伴う表層微小管の配向変化を調べることで、配向角度の変化する速度を明らかにする必要がある。

現在までに、表層微小管が平行に並ぶ仕組みについてシミュレーションを用いた解析から考えられた説が報告されている(Dixit et al., 2004, Pastuglia et al., 2007)。この説では、微小管どうしの相互作用により配向が形成される。表層微小管では微小管上に決まった角度で新たな微小管が形成されることと、2本の微小管がプラス端の伸長により接触する時、その後の反応が元からある微小管に対して近付いて来る微小管の入射角度によって決まることという実験結果に基づいている(Fig 41A; Murata et al., 2005, Dixit et al., 2004)。入射角度が $0^\circ < \theta < 40^\circ$ の時は伸長してきた微小管は元からある微小管に沿うようにして伸長を続け(Zippering)、 $40^\circ < \theta < 90^\circ$ の時は収縮する(Catastrophic)。また、角度に関係なく交差する時もある(Crossover) (Fig 41B)。このような条件下でランダムに並んだ微小管から新しく微小管を形成させることをシミュレーションすると、最終的に微小管は並行に並ぶという結果となった(Fig 41C)。細胞内においても、伸長軸に対して垂直に配向している時は、そうでない時に対して Zippering の頻度が上昇している(Dixit et al., 2004)。さらに、微小管が実際の細胞内では、これ以外に数々の微小管付随タンパク質が機能している。微小管上での微小管の形成には重合核複合体(nucleation complex)、微小管の重合促進にはプラス

端局在タンパク質(+TIP complex)などである。*spr2* 変異株において現れた表層微小管の配向角度の変化は、**SPR2** がこの機構において作用していることを示唆することが考えられた。**GFP-EB1b** を用いた微小管プラス端の動態解析では、*spr2* 変異株内ではプラス端の伸長が止まったり、プラス端の伸長する方向が異常に屈曲したりする頻度の上昇が観察された。これは伸長が進んでいる時の速度には影響していなかった。また、これらの現象は *in vitro* での微小管動態解析では全く観察されなかったことから、**SPR2** は細胞内で微小管どうしの相互作用に関わっていると考えられた。さらに、**SPR2** 粒子が微小管上を両方に動いたり、微小管の交差位置に止まったりしていた。以上のことから、微小管が接触した際に **Zippering** や **Catastrophic**、**Crossover** の事象への移行に **SPR2** が関わっているのではないかと考えられた。

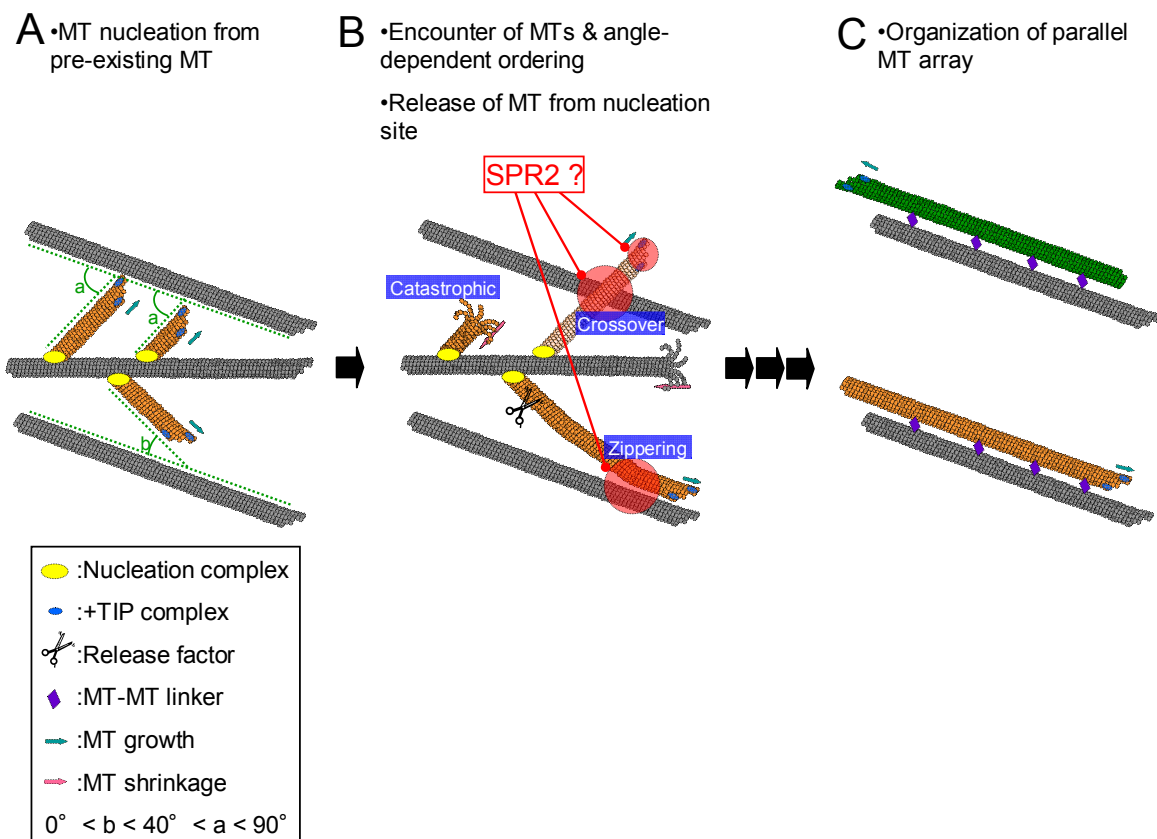


Fig 41. 表層微小管配向モデル

2-4-7 SPR2 と他の MAPs との関連

以前の研究から、同じ植物特有の MAP であり、共にその欠損変異株が右ねじれ形質を示す SPR2 と SPR1 は、その二重変異株の表現型が 2 つの変異形質を合わせたものだったことから、微小管に対してよく似た機能を持つが、別経路ではたらいっていると考えられた(Furutani et al., 2000)。本研究では、プラス端局在化タンパク質である EB1、SPR2 と生理的な活性がよく似ていると考えられる MOR1、表層微小管制御に関するシグナル伝達因子であると考えられている PHS1 について、それらの多重変異株の解析から SPR2 との相互作用の可能性について検証した。

二重変異株の表現型の解析の結果、*spr2* と *eb1a* 及び *mor1* との多重変異株はそれぞれの変異形質を強める表現型であった(Fig.42)。SPR2 と EB1 に関しては他に *spr2* 変異株において EB1 を過剰発現させると (CaMV35Sp::GFP-EB1;*spr2-2* 系統)形態異常が起こったこと、pull-down 解析において、SPR2 と EB1 の結合性が示唆されたことなどから、植物内で相互作用している可能性が考えられた(Fig.31、Fig 32)。しかしながら、シロイヌナズナ細胞内での EB1 の発現する器官が少なく、その機能は不明な部分が多いため、今後さらに解析する必要がある(小牧、未発表)。また MOR1 については、MOR1 のアフリカツメガエルホモログである XMAP215 と SPR2 の生理的機能について、いくつかの共通点が本研究において検証されたことから、MOR1 と SPR2 に関しても機能の重複性があることが考えられた。このことから、今後 MOR1 と SPR2 の相互作用についても検証する必要があると考えられた。

spr2-2phs1-1 二重変異株では、*phs1* 形質を強く示したことから SPR2 が PHS1 の下流に存在する可能性が示唆された(Fig.42)。しかしながら、*phs1-1* の変異株における SPR2 タンパク質の蓄積量に変化は見られず(Fig.36)、また、*phs1* 変異が表層微小管に対してだけではなく、植物の成長自体に大きな影響を与えた可能性もある。以上のことから、SPR2 が PHS1 の制御下にあるという確証を得ることはできなかったため、さらなる検証が必要である。

Fig.42 *spr2* と他の MAPs の変異株との多重変異株

*Growth		
Wild type		
Col		
Single mutants		
<i>spr2-2</i>		•right helical growth
<i>eb1a</i>		•No obvious phenotype •Slightly MT drug sensitive
<i>mor1-1</i>		•Slightly big seedling •Temperature-sensitive left helical growth
<i>phs1-1</i>		•Left helical growth •MT drug hyper sensitive
Double & triple mutants		
<i>spr2-2 spr2l-1</i> <i>eb1a</i>		•Small •Right helical growth
<i>spr2-2 mor1-1</i>		•Slightly big seedling and late growth of adult plant •Right helical growth
<i>spr2-2 phs1-1</i>		•Left helical growth

•*Growth; gray: no helical growth, green: right helical growth, orange: left helical growth

第 3 部 WVD2 ファミリーの微小管機能への寄与

3-1 目的

シロイヌナズナ WAVE-DAMPENED2(WVD2)ファミリータンパク質は植物特有の微小管付随タンパク質である。植物特有の微小管構造物である表層微小管の形成制御を明らかにするため、本研究では WVD2 ファミリーの細胞内及び *in vitro* において微小管に与える影響について調べた。特に、WVD2 と最も相同性の高い WDL1 を中心に、変異株の解析、細胞内局在、*in vitro* での微小管動態への影響、微小管との結合性について研究を行った。

3-2 方法

3-2-1 コンストラクションの作成

シロイヌナズナ、タバコ BY-2 形質転換用コンストラクションは、まず Table 11A のプライマーを用いた PCR により制限酵素認識配列を付加した smrsGFP cDNA を、CaMV35S プロモータを含む pBI121 バイナリーベクターに挿入し (CaMV35Sp::GFP)。次に、同様に制限酵素認識配列を付加した WDL1 cDNA の各断片を挿入した (CaMV35Sp::WDL1-GFP、CaMV35Sp::WDL1KL-GFP、CaMV35Sp::WDL1 ΔN-GFP)。

大腸菌での組換えタンパク質の発現には、GHP-pET(pET32b 改変ベクター及び pGEX 6P-1(GE)ベクターを用いた。

組換え Gst-WDL1full は、関(2006)修士論文で作成されたものを使用した。シロイヌナズナ WDL1(At3g04630)のcDNA 全長を pGEX6P-1 に挿入したものである。その他の組換え WDL1 及び WVD2 発現用コンストラクション(GH-WDL1KL、GH-WDL1ΔN、GH-WVD2KL、GH-WVD2ΔN)は、以下に示したプライマーとテンプレートの組み合わせによる PCR 反応と制限酵素反応により、3'側を KpnI 切断配列、5'側を BamHI 切断配列になった断片を作成した後、GHP-pET ベクターの KpnI-BamHI 間に挿入して作成した(Table 11B)。

Table 11.

植物細胞及び大腸菌発現用コンストラクションの作成に使用したプライマー

A. 植物形質転換用 GFP 融合 WDL1

Construction	Primers	Template	Vector (挿入位置)
CaMV35Sp::GFP	5'-AATTCCCGGGATGAGTAAAGGAGAAG -3' 5'-GCGGAGCTCTTATTTGTATAGTTCT -3'	smrsGFP-TUB6 (Nakamura, 2003)	pBI121 (SmaI-SacI)
CaMV35Sp::WDL1-GFP	5'-CTGGATCCGAATGGGAAGAGAAGTTGTTGAGGTGGC-3' 5'-CAATTCCCGGGAGCTTCTTCTGAGGACTC-3'	Gst-WDL1	CaMV35Sp::GFP (BamHI-SmaI)
CaMV35Sp::WDL1 KL-GFP	5'-CACGGATCCATGTTTAGGAGTGCTCAACG -3' 5'-CAATTCCCGGGCAGTTTTTGCGCACTTGG -3'	Gst-WDL1	CaMV35Sp::GFP (BamHI-SmaI)
CaMV35Sp::WDL1ΔN-GFP	5'-CACGGATCCATGTTTAGGAGTGCTCAACG -3' 5'-CAATTCCCGGGAGCTTCTTCTGAGGACTC -3'	Gst-WDL1	CaMV35Sp::GFP (BamHI-SmaI)

B. 大腸菌発現用組換え WVD2・WDL1

Construction	Primers	Template	Vector (挿入位置)
Gst-WDL1 full (関,修士論文)	5'-CTGGATCCGAATGGGAAGAGAAGTTGTTGAGGTGGC-3' 5'-CTGGATCCTCAAGCTTCTTCTGAGGACTCGTTAC-3'	Col cDNA	pGEX 6P-1 (BamHI -BamHI)
GH-WDL1 KL	5'-CCTGGTACCATGTTTAGGAGTGCTCAACG -3' 5'-CTTGGATCCTTACAGTTTTGGCGACTTGGG -3'	Gst-WDL1	GHP-pET (KpnI-BamHI)
GH-WDL1 N	5'-CCTGGTACCATGTTTAGGAGTGCTCAACG -3' 5'-CTGGATCCTCAAGCTTCTTCTGAGGACTCGTTAC -3'	Gst-WDL1	GHP-pET (KpnI-BamHI)
GH-WDL1 C	5'-CTTGGTACCATGCCCAAGTCGCCAAAACTG -3' 5'-CTGGATCCTCAAGCTTCTTCTGAGGACTCGTTAC -3'	Gst-WDL1	GHP-pET (KpnI-BamHI I)
GH-WVD2 KL	5'-CCTGGTACCATGTTTAGGAGTGCTCAACG -3' 5'-CTTGGATCCTTAGAGTTTCGGCGACTTAGG -3'	Col cDNA	GHP-pET (KpnI-BamHI)
GH-WVD2 ΔN	5'-CCTGGTACCATGTTTAGGAGTGCTCAACG -3' 5'-GTTGGATCCTCATTCTACCACAC -3'	Col cDNA	GHP-pET (KpnI-BamHI)

3-2-2 植物の生育条件、変異株及び形質転換植物の作出

シロイヌナズナ及びタバコ BY-2 細胞の生育条件とシロイヌナズナ及び BY-2 細胞の形質転換系統を作出方法は 2-2-2 と同一であった。本研究で利用したシロイヌナズナの変異株を Table 12 に変異箇所を Fig43 に示した。

GUS 染色による解析は、発芽後 5 日目の幼植物を GUS solution [1mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl -D-glucuronide (X-Gluc)、50mM K-Pi、1mM Fe solution*、0.2% Tween-20]に浸し、37℃で 16 時間処理したものを観察した。

*Fe solution [1mM Fe ferricamide、1mM Fe ferrociamide]

Table 12. 本研究で利用したシロイヌナズナ変異株

Mutant name	Gene (locus)	Mutation type	Reference
<i>wdl1</i>	<i>WDL1</i> (At3g04630)	T-DNA insertion (SALK_020938)	関(2006)修論
<i>wdl4</i>	<i>WDL4</i> (At2g35880)	T-DNA insertion (SALK_015615)	関(2006)修論
<i>wdl5-2</i>	<i>WDL5</i> (At4g32330)	T-DNA insertion (GABI_362D09)	本研究
<i>wdl1wdl4</i>		Double mutant	本研究

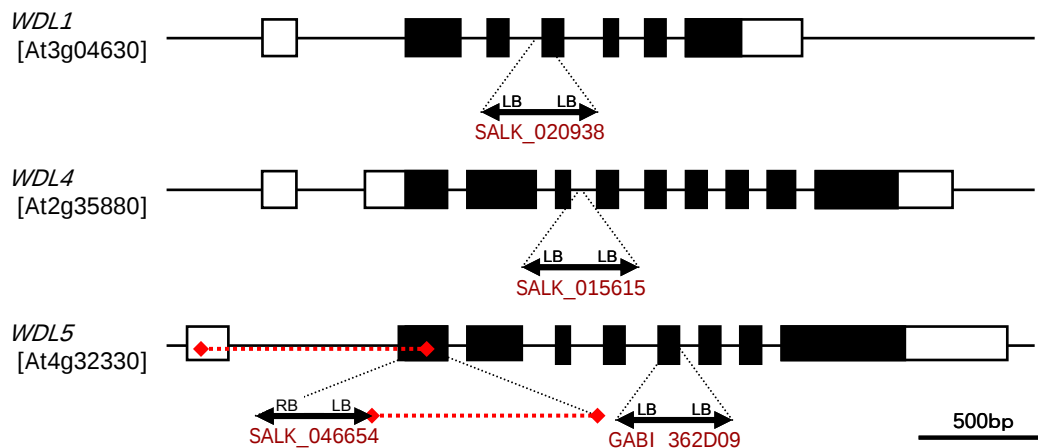


Fig 43. *WDL1*、*WDL4* 及び *WDL5* 遺伝子の構造と T-DNA 挿入箇所

Box はエクソン、Black box はコード領域を示す。各変異株の T-DNA 挿入位置を示した。

3-2-3 WVD2 ファミリーの遺伝子発現解析

シロイヌナズナの野生株及び変異株の幼植物や各器官からの全 RNA の抽出は 2-2-3 と同様の方法を用いた。また PCR は、以下の表に示したプライマーセットを使用し、2-2-3 と同様の反応組成、反応条件で行った。

Table 13. RT-PCR 解析に使用したプライマー

Primer set	Sequences	Detected cDNA (size(bp))
WVD2 RT	5'- GAATTTGGATGAAGAGGATGATTG -3' 5'- CACACTCTGGCGATTCTGTGAGTTC -3'	WVD2cDNA(421)
WDL1 RT	5'- GATAGCTGCAGAGGAGACTGATGAG -3' 5'- GTTCCTCTCAGCTTCAAGCGCTTGG -3'	WDL1cDNA(394)
WDL2 RT	5'- GCAACTTAGGAAGAACATGGCTTAC -3' 5'- CCTCCACAACACCAACGCCATTCTC -3'	WDL2cDNA(383)
WDL3 RT	5'- GCTAAATCAAGAACTGTTGTCAACCG -3' 5'- CAGCATTCCGTGTGGTTTCATCATC -3'	WDL3cDNA(406)
WDL4 RT	5'- GGTGGCAGATAAAGTATCTAACCCG -3' 5'- CCTAGCTTTGGAGACTTAGGACGAG -3'	WDL4cDNA(487)
WDL5 RT	5'- GGAGAAGGTGAAACCAAAGTCTCA -3' 5'- GTTGGCATAATTCCCTTTGCAGTTG -3'	WDL5cDNA(510)
WDL6 RT	5'- GGACAAGCCAAAAGTGAAGGAAAC -3' 5'- CCGGGTACACTTCCTTCAACAACC -3'	WDL6cDNA(513)
WDL7 RT	5'- GGAGGACAAAGGGTCTTCTTTAAG -3' 5'- CTGGTCGTGATCTTGATTGTGCTAC -3'	WDL7cDNA(465)

3-2-4 細胞内局在解析

シロイヌナズナ及び BY-2 細胞の CaMV35Sp::WDL1-GFP、CaMV35Sp::WDL1KL-GFP、CaMV35Sp::WDL1ΔN-GFP 形質転換体の GFP 蛍光の局在は、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon C1)で観察した。

3-2-5 in vitro での微小管の動態解析

実験にはブタ脳から精製したチューブリンを用いた。組換え Gst-WDL1full、GH-WDL1KL、GH-WDL1ΔN は、大腸菌 BL21(DE3)もしくは Rosseta(DE3) 株に導入し、0.6mM IPTG を添加後、37℃3 時間で発現誘導した。発現誘導し

た菌を遠心により回収し、超音波処理により細胞を破壊、遠心によりライセートを得た。その後、Gst-WDL1full は Glutathione Sepharose 4B (GE)、それ以外は Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いて、それぞれ GE、Qiagen のプロトコールに従い精製した。さらに、試験管内で Prescission protease (GE)を用いて Gst タグもしくは GH(Gst-His6)タグを切断した。そして、Glutathione Sepharose 4B (GE)でタグを除去し、Amicon Ultra (Millipore)を用いて濃縮し、最後に NAP-5 カラム(GE)を用いて PEM バッファーに置換した。

2-2-6 の Chart 1.で示した手順で微小管を再構成した後、タグを除去した WDL1full、WDL1KL、WDL1ΔN を 2.5μM もしくは 5.0μM 加え、約 28℃に保った状態で暗視野用コンデンサ (Nikon Darkfield Condenser) を装置した暗視野顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E600) で観察した。記録は、組換えタンパク質添加後、約 2 分後から約 15 分間赤外 CCD カメラ(OLYMPUS TR-1000)を使ってビデオ撮影を行った。

撮影したビデオ画像から、2-2-6 と同様に微小管の長さの変化を測定した。各サンプルの測定した微小管 (MT) の数と総測定時間を Table.14 に示した。Control は、組換えタンパク質を添加せず、チューブリンだけが存在する状況下である。動態を評価するパラメータは、0.5 分以上連続して 0.16μm/min 以上の速度で動かなかった時を「停止」、それより長くなった時を「伸長」、短くなった時を「収縮」と定義してヒストリープロットの位置座標から算出した。

Table 14. 各サンプルの測定した微小管数と測定時間

Sample name	Concentration (μM)	Plus end	
		MT NO.	Total time (min)
Control	-	20	198.9
WDL1full	2.5	14	177.1
	5.0	20	230.6
WDL1KL	2.5	11	139.6
	5.0	11	131.5
WDL1 Δ N	2.5	11	151.1
	5.0	10	138.6

3-2-6 in vitro 微小管結合実験

組換え Gst-WDL1full、GH-WDL1KL、GH-WDL1ΔN は、3-2-4 と同様の手順で大腸菌の発現誘導とタンパク質抽出を行った。その後、Gst-WDL1full は Glutathione Sepharose 4B (GE)、それ以外は Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いて、それぞれ GE、Qiagen のプロトコールに従い精製し、タグは切断せずに

解析に用いた。精製の最終段階に PD-10 カラム(GE)を用いて PEM バッファーに置換し、必要に応じて Amicon Ultra (Millipore)を用いて濃縮した。

精製した各組換え WDL1 とブタ脳 Tubulin を用い、遠心による共沈法で微小管結合性を調べた。2-2-7 で示した Chart 2.に従い、微小管重合剤であるタキソールと保温(37℃)により形成した安定した微小管に組換え WDL1 を添加し、遠心により微小管と微小管に結合するもの(沈殿画分)と結合しないもの(上清画分)にわけた。その後、各画分を SDS-PAGE による分離と CBB による染色を行い、微小管結合性を検定した。

3-2-7 in vitro tubulin 結合実験

GST Pull-down アッセイは、精製した GH、Gst-WDL1full、GH-WDL1KL、GH-WDL1ΔN、GH-WVD2KL、GH-WVD2ΔN とブタ脳から精製した Tubulin を用いて行った。まず、1.2μM GST 融合タンパク質 (GH、Gst-WDL1full、GH-WDL1KL、GH-WDL1ΔN、GH-WVD2KL、GH-WVD2ΔN)1.8ml を 2-2-8 と同様の方法で Glutathione Sepharose 4B(GE)100μl bed-volume に結合させた。さらに、0.9μM Tubulin を添加し、4℃、3 時間混合した。その後、洗浄バッファー1.5ml で 3 回洗浄した。最後に溶出バッファー(50mM Glutathione (pH8.0))100μlを加え、室温で 10 分間混合した後、4℃、5000rpm、5 分遠心し、上清を回収した(Eluted 画分)。添加したのタンパク質と同組、同濃度のタンパク質の混合物を Input 画分とし、Eluted 画分とともに、SDS-PAGE 電気泳動と CBB 染色でシグナルを確認した。

3-3 結果

3-3-1 *wdl1*、*wdl4*、*wdl5* 変異株と **WDL1** 過剰発現株

過去の研究において、**WVD2** を過剰発現する変異株や形質転換株は、伸長器官の表層微小管の配向が壊れ器官がねじれるという表現型を示した (Yuen et al., 2003)。また、遺伝子破壊株では野生型と変わらない表現型を示し、伸長器官における表層微小管の配向も野生型と同じであった (Perrin et al., 2007)。これらの結果から、**WVD2** は、微小管の安定性に影響し、表層微小管の配向に関与することが示唆された。

そこで、**WVD2** ファミリーの他のタンパク質の細胞内での機能を明らかにするために、*wdl1*、*wdl4*、*wdl5* 及び *wdl1wdl4* 二重変異株の表現型を解析した。まず、**T-DNA** の挿入による遺伝子破壊型変異株である *wdl1*、*wdl4*、*wdl5* について、**WVD2** ファミリーの各遺伝子の発現を調べた。それぞれ変異株の幼植物から抽出した **RNA** から **cDNA** を合成し、**RT-PCR** 解析を行った。その結果、*wdl1*、*wdl4*、*wdl5* 変異株の変異遺伝子の発現は検出されなかった。また、*wdl1* 変異株においては **WDL4** のシグナルが強くなり、発現が少し高くなっていることが示唆された(Fig 44)。

今まで見つかっている、表層微小管の制御に関わるタンパク質の変異株の多くは、微小管薬剤(プロピザミド、オリザリン、タキソールなど)に対する応答性に変化が見られた。そこで、*wdl* 各変異株の微小管薬剤に対する応答性を調べた。*wdl4*、*wdl5* 及び *wdl1wdl4* 変異株は野生株(**Col**)に比べてプロピザミド感受性が若干高く根の伸長方向が変化した。**3 μ M** プロピザミド添加培地上で育てた発芽後 7 日目の幼植物において、野生株や *wdl1* の根が平均してほぼ重力方向に伸長するのに対して、*wdl4*、*wdl5* 及び *wdl1wdl4* はそれぞれ約 **50.9°**、**42.7°**、**48.3°** 左に傾いて伸長した(Fig 45B)。

wdl1 は通常培地や微小管薬剤添加培地において明確な変異形質は見つけられなかった。しかしながら、*wdl1wdl4* は野生株や他の *wdl* 変異株よりも若干根の成長速度が速かった(Fig 45C)。そのため *wdl1* 変異株の細胞分裂や細胞伸長の活性を評価するため、細胞の分裂活性を評価できる **CyclinB1p::GUS** 遺伝子を交配により各変異株に導入し、**GUS** 染色を行った。その結果、**Control** に比べて根端における **CyclinB1p::GUS** の **GUS** 活性が若干弱まっており、**GUS** の染色が確認された範囲が **Control** に比べて約 **60%** に減少した(Fig 46)。また、高濃度のオーキシン(**IAA**、**NAA**)や糖(**Glucose**、**Mannitol**)、塩(**NaCl**)や、高温(**27°C**)、暗所、接触刺激に対する応答を調べてみたが、野生株に対する顕著な差は現れなかった(data not shown)。

さらに、過剰発現への影響を見るため、アグロバクテリウム法を用いて **CaMV35Sp::WDL1-GFP** を野生株(Col)に形質転換し(以下、**WDL-GFP;Col** と記す)、**GFP** の蛍光の強さから導入遺伝子の発現量の多い系統を選抜した。その結果、十分な蛍光を発する独立した 4 系統(**#1、#16、#17、#18**)を選抜することができた。そのうち、**#16** は特に蛍光が強かったが、成長が著しく阻害され、ホモ個体を作出することはできなかった(**data not shown**)。一方、それ以外の系統(**#1、#17、#18**)では野生型と変わらない形態を示した(**Fig 45A**)。これは、過去の研究で報告されていた、**WVD2** の発現量が多い系統ほど植物が小さくなった結果と同様であった(**Perrin et al., 2007**)。

次に、**WDL1** が **WDL4** と同様のタンパク質活性をもつかを調べるために、**wdl1wdl4** 変異株に **CaMV35Sp::WDL1-GFP** を形質転換し(以下、**WDL-GFP;wdl1wdl4** と記す)、**wdl4** 変異形質の回復を調べた。回復度合は、**3 μ M** プロピザミド添加培地上で育てた時の根の伸長角度の分布により評価した。その結果、独立した 12 系統の **T2** 世代において、4 系統で伸長角度が野生型に近づいた(**Fig 47**)。このことから、**WDL1** は **WDL4** の機能を相補できることが示唆された。

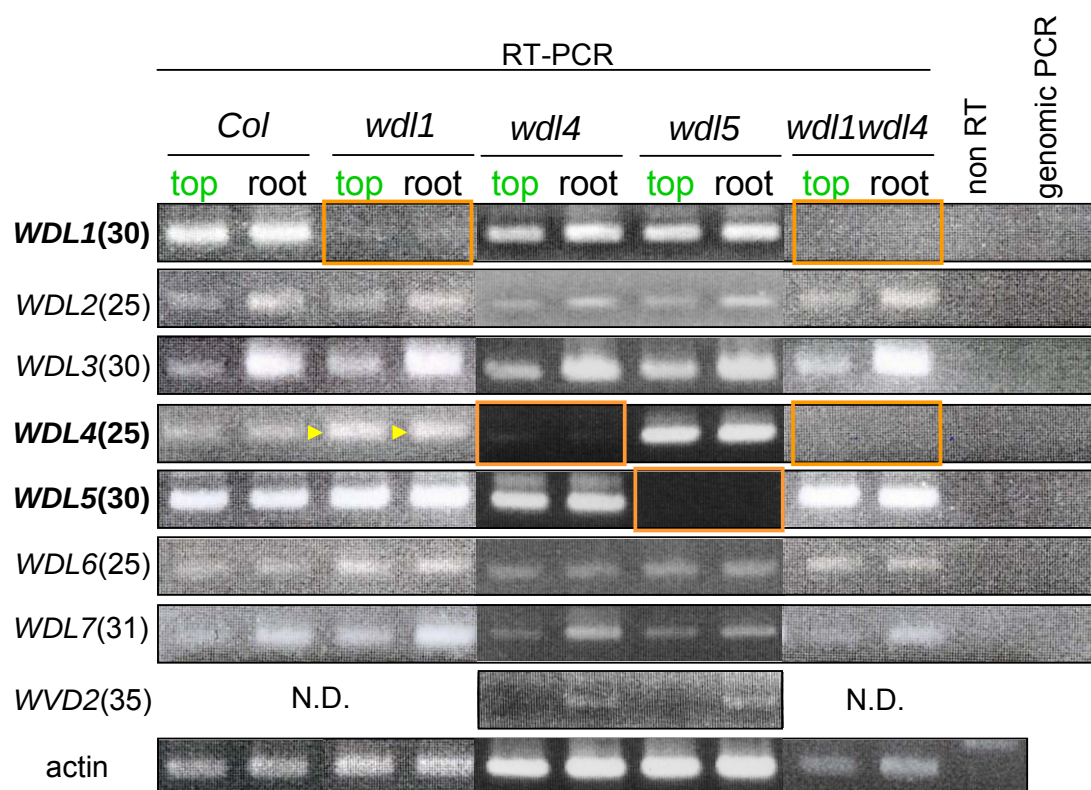


Fig 44. *wdl1*, *wdl4*, *wdl5* 変異株における **WVD2 遺伝子ファミリーの発現**

Col, *wdl1*, *wdl4*, *wdl5* 及び *wdl1wdl4* の幼植物から cDNA を合成し、Table 13 で示したプライマーセットを使った RT-PCR を行った。Actin はコントロールとした。

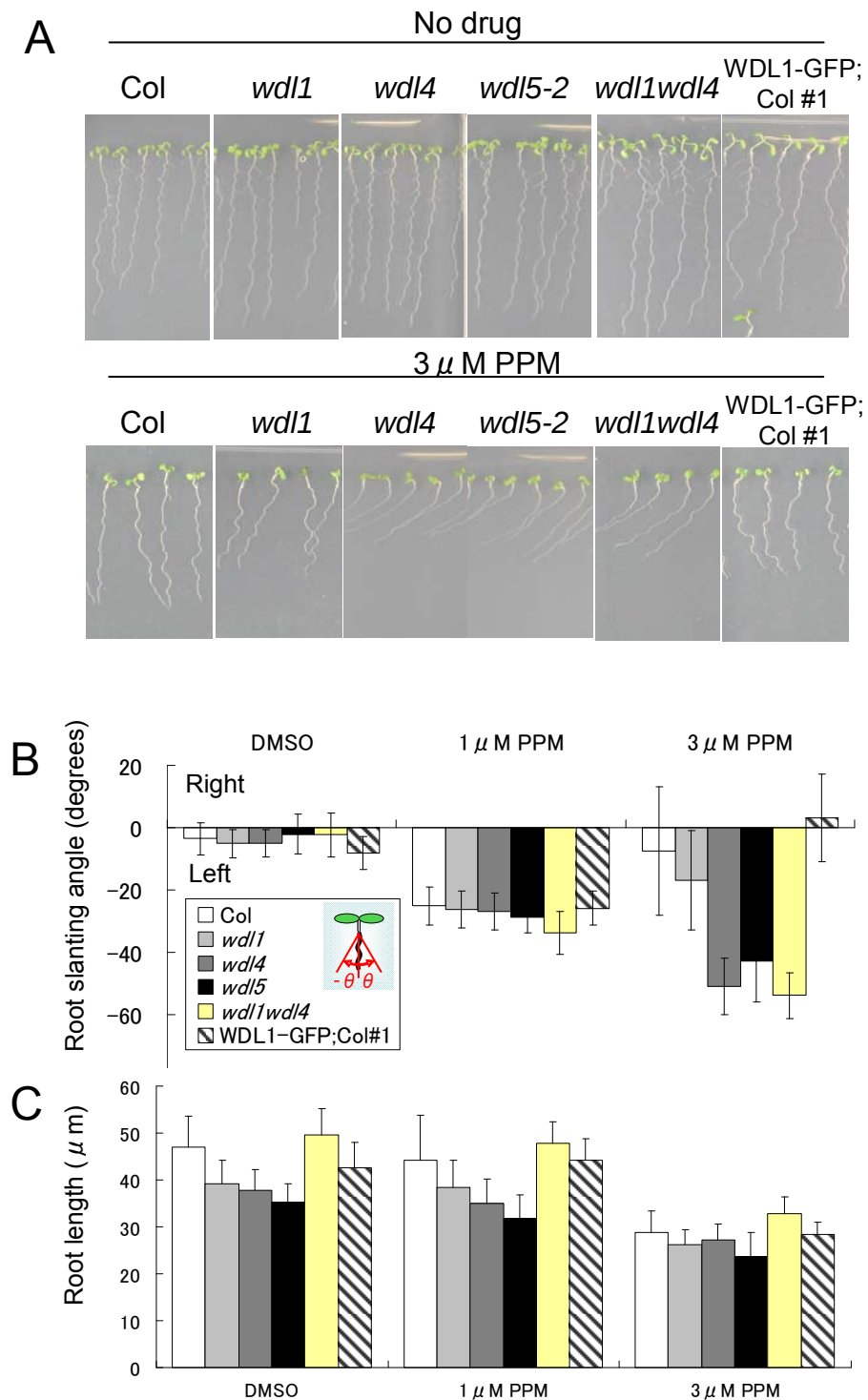


Fig 45. *wdl1*、*wdl4*、*wdl5* 変異株及び WDL1 過剰発現株の微小管薬剤に対する応答性

A: 微小管重合阻害剤プロピザミド非存在 (upper) 及び存在 (lower) の、垂直に立てた寒天培地プレートで育てた発芽後 7 日目の幼植物。

BC: 垂直に立てた寒天培地プレートで育てた発芽後 7 日目の幼植物の根の伸長角度 (B) 及び根の長さ (C)。角度は重力方向と根に挟まれた角度を測定した。重力方向を 0° とし、それより左側が $\theta < 0$ 、右側が $\theta > 0$ とした。

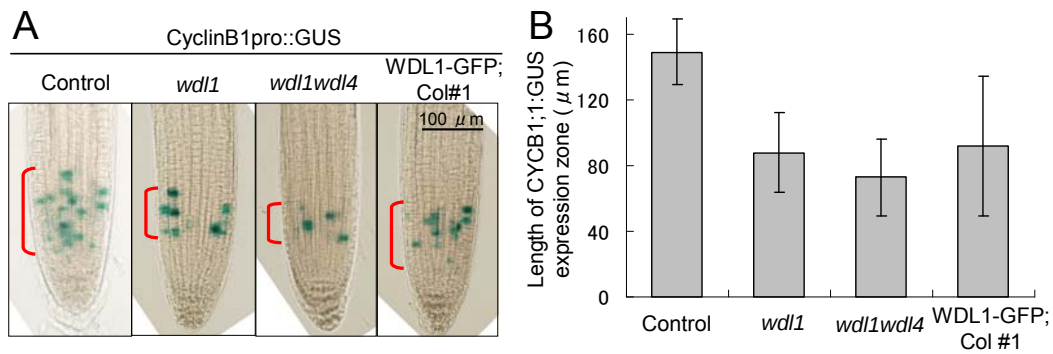


Fig 46. *wdl1*, *wdl4*, *wdl5* 変異株の CyclinB1p::GUS 活性

A: CyclinB1p::GUS を導入した各変異株の発芽後 5 日目の幼植物を GUS 染色した。

〔は GUS の活性が見られた範囲を示す。

B: A で示した GUS の活性が見られた範囲の長軸方向の長さを測定し、その平均を示した。

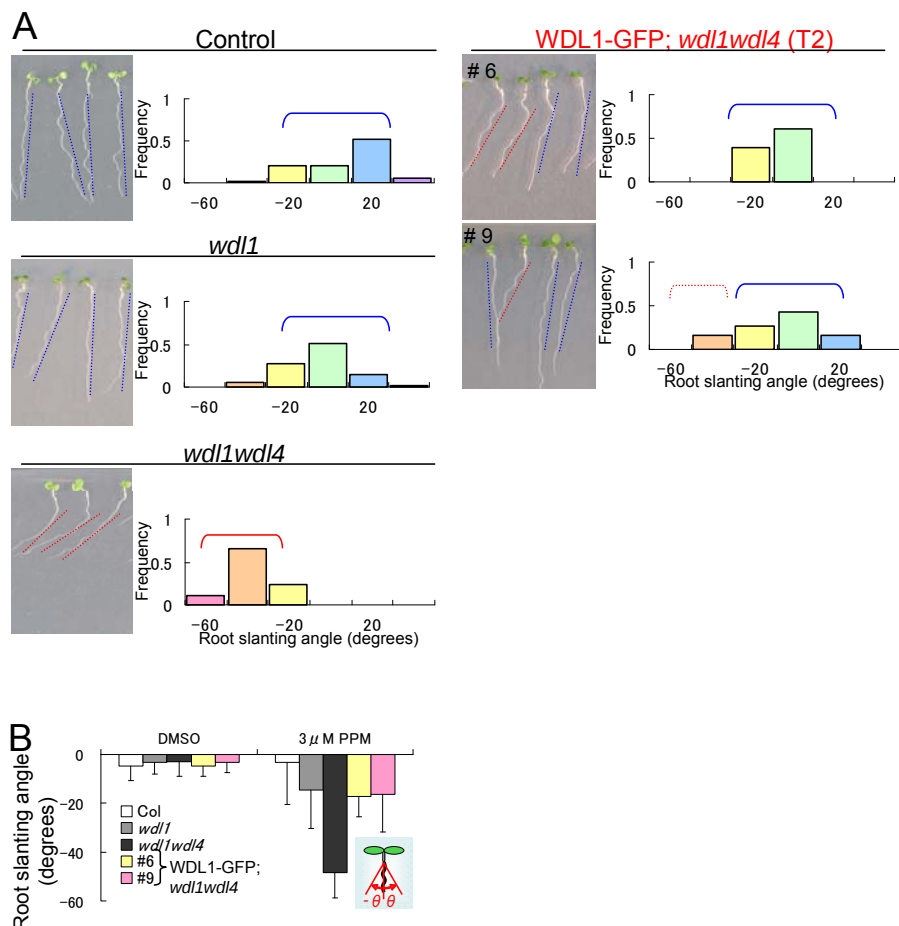


Fig 47. WDL1-GFP;*wdl1wdl4* 形質転換系統

A: 3 μM プロピザミド添加培地で育てた発芽後 7 日目の幼植物と根の伸長角度の分布。

B: A 及びプロピザミド非添加培地で育てた幼植物の根の伸長角度の平均。

3-3-2 WVD2 ファミリーの遺伝子発現と WDL1 の細胞内局在

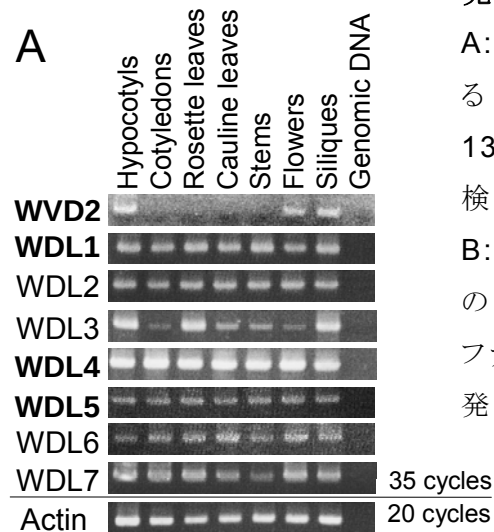
WVD2 ファミリーの各遺伝子の器官ごとに発現を比較した。胚軸、子葉、ロゼット葉、カオライン葉、茎、花序、鞘から抽出した RNA から cDNA を合成し、Table 13 のプライマーセットを用いて RT-PCR を行った。まず WVD2 は全体的に発現量が低く、胚軸、花序、鞘での発現しか確認できなかった。その他の遺伝子はどの器官の cDNA から検出され、植物全体で発現していることが予想された(Fig 48A) さらに詳細な器官ごとの発現プロファイルのデータベースである GeneAtlas (Genevestigator,; <https://www.genevestigator.ethz.ch/at/index.php?page=-1reason=inexistent>)では、WVD2 と WDL6 以外の遺伝子プロファイルが登録されている。このデータベースでは、各器官のさらに細かい構造物ごとの発現量が比較できる(花序であれば、心皮、子房、柱頭、花びら、がく片、雄しべ、花粉ごとの発現量が分かる)。また、遺伝子間のおおよその発現量を比較することもできる。それによると、WDL1 は WDL4 や WDL5 に比べて植物全体としての発現量は低いが、花粉での発現量は非常に高いことが分かった。一方、WDL4 は根毛での発現量が一番高かった。また、WDL5 は植物全体で同程度に発現していることがわかった(Fig 48B)。

WDL1 の細胞内局在と、局在を決定する配列を特定するために、WDL1 全長を含む CaMV35Sp::WDL1-GFP と、WVD2 ファミリー内の共通配列である KLEEK モチーフだけを含む CaMV35Sp::WDL1KL-GFP 及び N 末端領域を除いた CaMV35Sp::WDL1 Δ N-GFP を野生型シロイヌナズナ(Col)とタバコ BY-2 培養細胞に形質転換した。(以下、シロイヌナズナに形質転換したものを WDL-GFP;Col、WDLKL-GFP;Col、WDL Δ N-GFP;Col と記す。また BY-2 細胞は WDL-GFP;BY2、WDLKL-GFP;BY2、WDL Δ N-GFP;BY2 と記す。)その結果、WDL-GFP;Col、WDLKL-GFP;Col、WDL Δ N-GFP;Col は順に、独立した 18、25、25 系統の形質転換系統を得た。また、BY-2 細胞ではそれぞれ約 100 系統以上の形質転換細胞を得た。細胞内局在を観察した。

得られたシロイヌナズナ形質転換系統について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内の GFP の細胞内局在を調べた。WDL-GFP;Col は子葉、胚軸、根において表層微小管上に均一に局在した(Fig 49A)。しかしながら、WDLKL-GFP;Col と WDL Δ N-GFP;Col では GFP の十分な蛍光を発する系統がなく、細胞内局在を確認できなかった(data not shown)。次に、形質転換 BY-2 細胞の GFP の蛍光を観察したところ、全長を導入した WDL-GFP;BY2 では、シロイヌナズナの形質転換系統同様、均一な表層微小管上の局在を確認できた。一方、WDLKL-GFP;BY2 と WDL Δ N-GFP;BY2 では、細胞質と核に GFP 蛍光が観察され、表層微小管やその他の微小管構造物への局在は観察

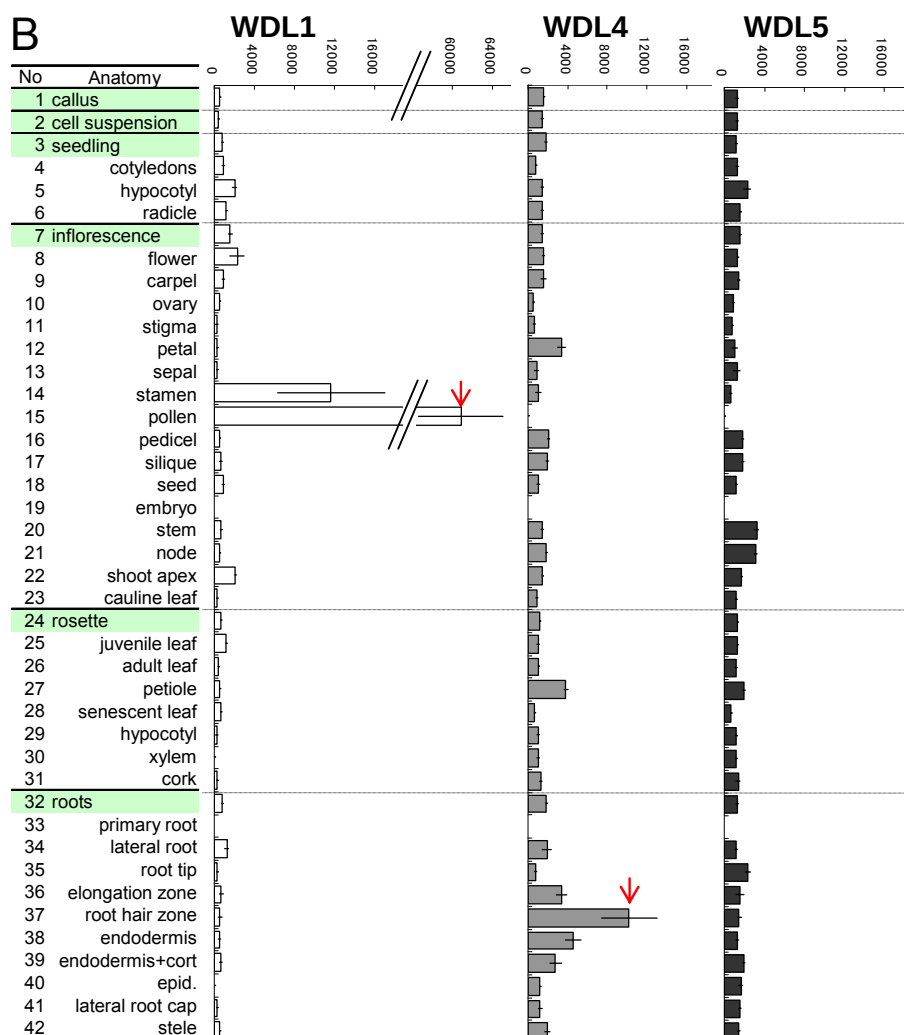
されなかった(Fig 49B)。以上のことから、WDL1の微小管局在には、WDL1全長が必要であることが示唆された。

Fig 48. WDL1、WDL4 及び WDL5 遺伝子の発現



A: RT-PCR による、野生型 (Col) の各器官における WDL2 遺伝子ファミリーの発現パターン。Table 13 で示したプライマーセットを用いて各遺伝子を検出した。Actin はコントロールとした。

B: 発現プロファイルのデータベースによる各器官の WDL1、WDL4 及び WDL5 遺伝子の発現プロファイル。WDL1 では花粉の、WDL4 では根毛の発現が特に高かった (red arrows)。



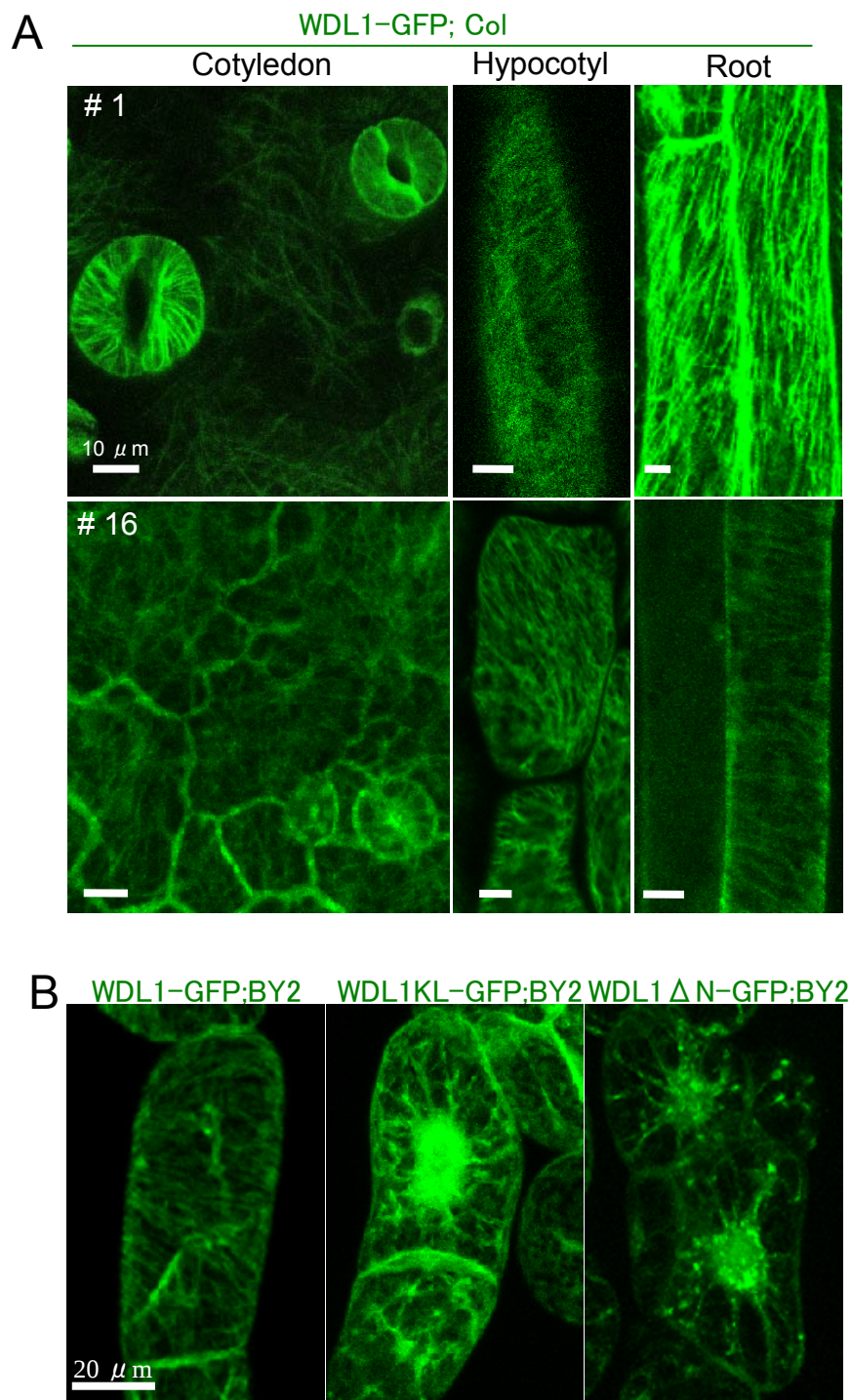


Fig 49. WDL1 の細胞内局在

A: WDL1 全長を含む CaMV35Sp::WDL1-GFP を形質転換したシロイヌナズナ細胞内での WDL1-GFP の細胞内局在。#16 系統は WDL1-GFP の発現量が高かったが、ホモ個体を作出できなかった。

B: CaMV35Sp::WDL1-GFP、CaMV35Sp::WDL1KL-GFP、CaMV35Sp:: WDL1 Δ N-GFP を形質転換したタバコ BY-2 細胞における GFP 蛍光。

3-3-3 in vitro における WDL1 の微小管動態に与える影響

以前の研究で、WVD2 タンパク質が in vitro において微小管を束化する活性があることが報告されている(Perrin et al., 2007)。そこで、WDL1 と微小管動態との関連を調べるために、暗視野顕微鏡を用いて in vitro での微小管動態への影響を測定した。

大腸菌から精製した WDL1 全長を含む組換えタンパク質 WDL1full と、KLEEK モチーフだけを含む WDL1KL、及び、N 末端領域を除いた WDL1ΔN を用いて、各 5.0 もしくは 2.5 μ M を in vitro で再構成させた微小管に添加し、暗視野顕微鏡で観察した。2-3-4 の項と同様にして、微小管の長さの変化のヒストリープロットから、微小管動態を評価する各パラメータ(伸長・収縮速度、各事象の頻度、時間占有率、ダイナミクス)を求めた。無添加時をコントロールとし、WDL1 の各組換えタンパク質を添加した時と比較した結果、WDL1full を添加した際に、伸長速度が増加した。しかしながら、その他の組換えタンパク質を添加した際には、コントロールと有意な差は出なかった(Fig 50)。

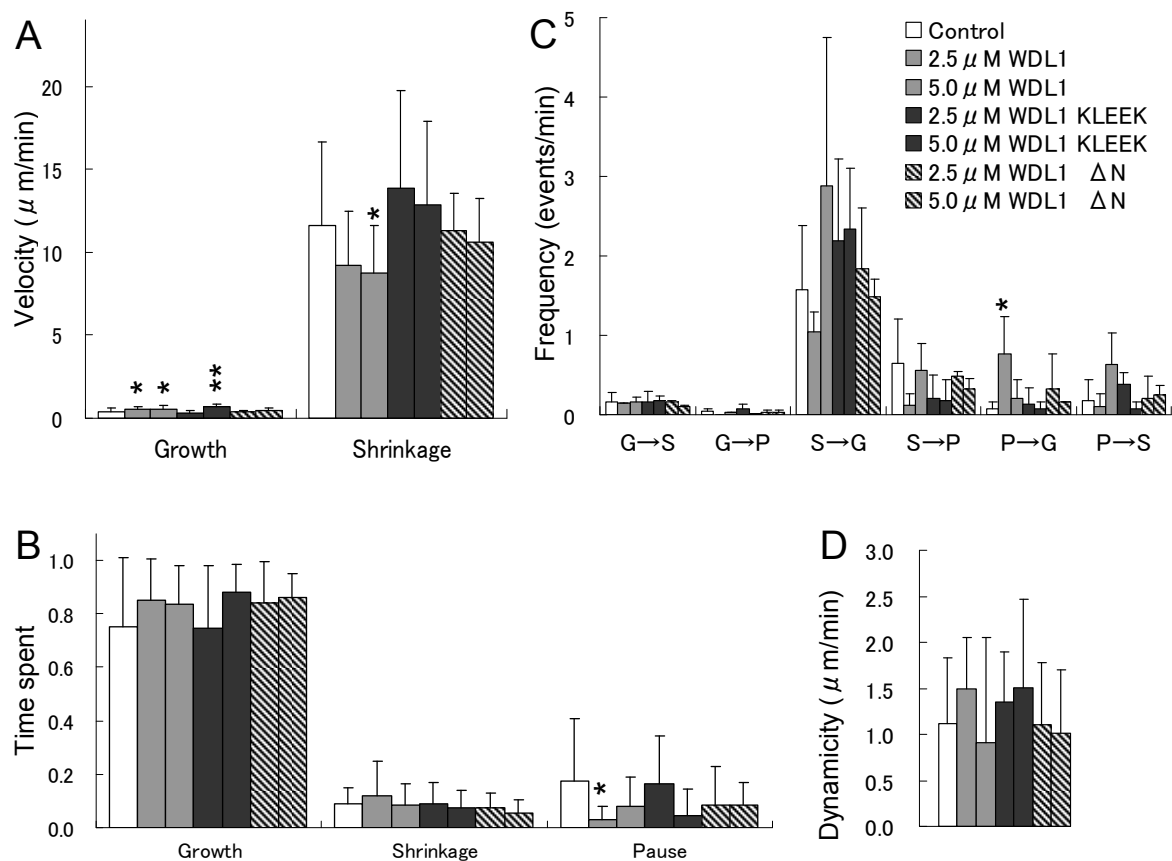


Fig 50. WDL1 の微小管プラス端の動態への影響

微小管プラス端のヒストリープロットから算出した各パラメータ。

A 伸長・収縮速度。微小管 1 本ごとに平均伸長速度及び収縮速度を求めた。

B 各事象への移行頻度。伸長、収縮、停止に移行する頻度を、その前に起こった事象 1 分間あたりに起きた回数として求めた。

C 伸長・収縮・停止の総測定時間に対する時間占有率。

D 微小管ダイナミクス。1 分間あたりの微小管の長さの変化量を求めた。

Asterisks; statistically significant differences from control (t-test; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

3-3-4 WDL1 の微小管及びチューブリン結合性

以前の研究で、WVD2タンパク質が *in vitro* において直接結合することが報告されている(Perrin et al., 2007)。そこで、WDL1 についても *in vitro* での微小管との共沈実験を行うことにより、微小管結合性を検証した。

解析には WDL1 全長を含む Gst-WDL1full、KLEEK モチーフだけを含む GH-WDL1KL、及び、N 末端領域を除いた GH-WDL1ΔN 及び KLEEK モチーフを含まない GH-WDL1C を使用した。2-3-5 の項と同様にしてタキソール安定化微小管と各組換えタンパク質を混合し、遠心により微小管を沈殿させた。その結果、添加したすべての WDL1 組換えタンパク質が微小管と共沈した。これは微小管を加えていない時には沈殿画分に回収されないことから、タンパク質の失活のためではないことが確認され、微小管と結合したことによると考えられた。特に GH-WDL1ΔN では、添加したタンパク質がほとんど沈殿画分に回収され、微小管と強く結合することが示唆された(Fig 51A)。

次に、微小管を形成していない遊離のチューブリンとの結合性を調べた。解析は GST pull-down 法を用いて行った。まず、Glutathione sepharose 4B カラムに GST タグを持つ Gst-WDL1full、GH-WDL1KL、GH-WDL1ΔN 及び GH-WDL1C を固定した。そこに、低温、低濃度にして微小管を形成できない条件化した tubulin タンパク質を添加し、混合した。そして、カラムを洗浄後、Glutathione で Gst-WDL1full、GH-WDL1KL、GH-WDL1ΔN、GH-WDL1C の各タンパク質を溶出した時に、tubulin がどれだけ共に溶出されるかで、チューブリン結合性を評価した。その結果、GH-WDL1C が最も多くの tubulin と共に溶出され、WDL1 の C 末端領域に tubulin 結合配列があることが示唆された。一方、Gst-WDL1full と GH-WDL1KL のカラムからは、tubulin がほとんど溶出されなかった(Fig 51B)。

同様にして、WVD2 の部分長の組換えタンパク質を用いてチューブリン結合性を調べた。その結果、WVD2 も ΔN でチューブリンと結合した(Fig 51B)。

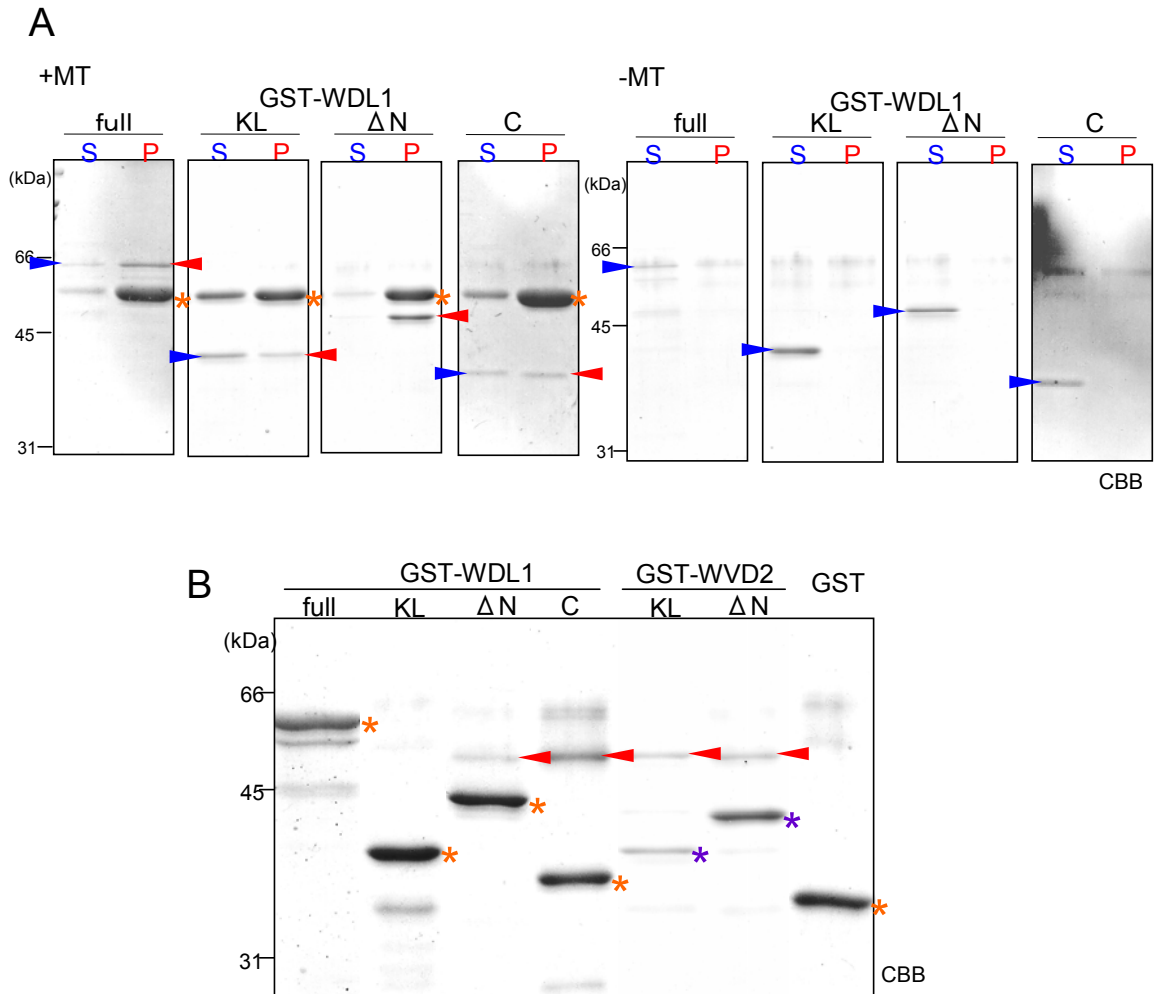


Fig 51. WDL1 の微小管及びチューブリン結合領域の特定

A: *in vitro* での WDL1 と微小管との共沈実験。微小管存在下(B)、非存在下(C)における共沈実験の上清画分(S)、沈殿画分(P)の SDS-PAGE 電気泳動ゲル画像。ゲルは CBB 染色もしくは抗 His tag 抗体を用いたイムノブロットングによりシグナルを確認した。Arrowhead が各組換えタンパク質のシグナル、asterisk がチューブリンのシグナルを示す。

B: WDL1 と tubulin の GST pull-down 解析。Asterisk が各組換えタンパク質のシグナル、Arrowhead が組換えタンパク質と共に溶出されたチューブリンのシグナルを示す。GST はネガティブコントロール。

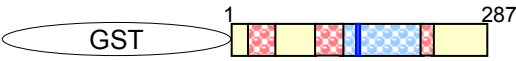
Construct		Microtubule binding	Tubulin binding
GST-WDL1F		+	-
GH-WDL1KL		+	-
GH-WDL1 ΔN		++	+
GH-WDL1C		+	++
GH-WVD2KL		nd	+
GH-WVD2 ΔN		nd	+

Fig 52. WDL1 の微小管及びチューブリン結合領域のまとめ

共沈実験に用いた各 WDL1 組換えタンパク質構造と微小管・チューブリン結合の強さ。WDL1 の KLEEK 配列を blue box、WVD2 ファミリー間で保存性の高い領域を blue polka-dotted box、WVD2 との相同性の高い領域を red polka-dotted box で示した。微小管結合の強さは、加えたタンパク質が全て微小管と共沈したものを「++」、一部が沈殿したものを「+」、全て上清に回収されたものを「-」とした。チューブリン結合の強さは、全て微小管と共に溶出したものを「++」、一部が溶出したものを「+」、全く溶出されなかったものを「-」とした。

3-3-5 WDL と他の MAPs との関連

WVD2 ファミリーと他の MAPs との関連を調べるため、WVD2 と同じく微小管の安定性の制御に関わると考えられる、*SPR2* の欠損変異株 *spr2-2* と、*wdl1wdl4* を交配し、三重変異株を作成した。そして、微小管薬剤添加培地及び無添加培地で生育させ、根の長さや伸長角度についての表現型を解析した。その結果、三重変異株の表現型に個体によるばらつきが見られた。 $3\mu\text{M}$ のプロピザミドを添加した培地で育てた際の、根の伸長角度を見ると、*spr2* 変異株同様に右に傾くもの(#8)も *wdl1wdl4* 同様に左に傾くもの(#15)も出現した(Fig 53)。

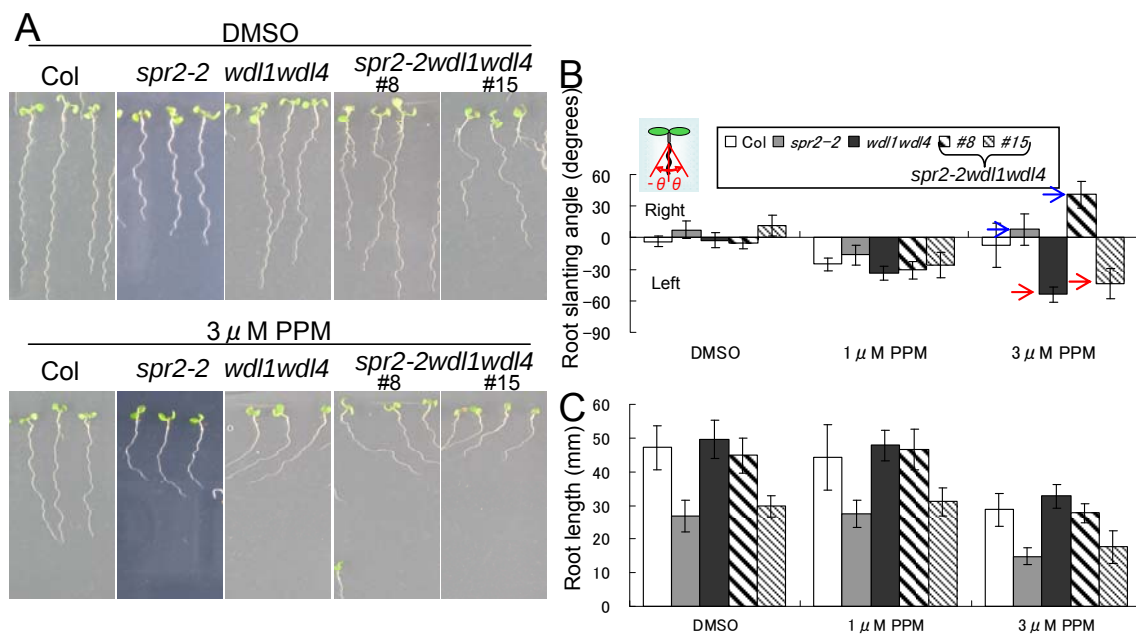


Fig 53. *spr2wdl1wdl4* 三重変異株

A: 微小管重合阻害剤プロピザミド無添加(upper)及び添加(lower)培地で育てた発芽後 7 日目の幼植物。

BC: 発芽後 7 日目の幼植物の根の伸長角度(B)と根の長さ(C)。

PPM; propyzamide

3-4 考察

3-4-1 WDL1 の構造と微小管結合領域

WVD2 タンパク質ファミリーは、共通して配列内に KLEEK 配列を含む保存領域を持っている(Yuen et al., 2003)。他の微小管付随タンパク質では MAP70-5 も KLEEK 配列を持つが、その周辺配列の相同性は低い(Korolev et al., 2007)。MAP70-5 もまた表層微小管の制御に関わると考えられており、過剰発現すると植物の細胞伸長方向の制御が狂い器官がねじれた。WVD2 ファミリー及び MAP70 ファミリー共に、植物特有の微小管付随タンパク質であり、WVD2 ファミリーではこの領域以外に保存性の高い領域がないことから、KLEEK 領域が微小管との相互作用に関連している可能性が考えられた。

in vitro での微小管結合実験により、WDL1 は KLEEK 領域(WDL1KL)と C 末端領域の少なくとも 2 箇所の微小管結合領域があることが示唆された(Fig 51A)。また C 末端領域で遊離チューブリンとも結合した(Fig 51B)。以上の結果と WDL1 及び WVD2 の配列の相同性から考えると、WDL1 は、KLEEK 配列の周辺と C 末端領域に 2 箇所の独立した微小管結合領域があり、そのうち C 末端領域はチューブリンとの結合能も有することが考えられた(Fig 52)。

3-4-2 WDL1 の微小管に対する機能

WDL1-GFP の細胞内局在性の解析から、WDL1 は表層微小管の側面上に均一に局在することが示された(Fig 49)。これは、ほぼプラス端のみ局在する EB1 や微小管の側面に連なった粒状で存在する SPR2 や CLASP の局在とは異なっており、これらのタンパク質とは異なった機構で微小管制御に関わっていることが示唆された(第 2 部、Kirik et al., 2007)。これは、*spr2wdl1wdl4* 三十変異株がそれぞれの変異形質を独立して示したことから支持された(Fig 53)。WVD2 が微小管の束化する活性があるという報告と、in vitro において微小管の伸長速度を増加させたという結果から、WDL1 もまたは微小管の構造の維持に関わっていることが示唆された(Perrin et al., 2007, Fig 50)。

WVD2 の抗体を使った免疫染色により、WVD2 は間期の表層微小管だけでなく、細胞分裂期の紡錘体極や核周辺部にも局在することが確認されており、紡錘体形成の制御にも関わることが示唆されている(Perrin et al., 2007)。WDL1 は、WDL1-GFP を過剰発現する形質転換株においても細胞分裂期の微小管への局在は確認できなかった。また、発現解析により WDL1 は花粉において特に強く発現していたことから、花粉の形成や花粉管伸長の際の形態形成に関わる

ことが示唆された(Fig 48)。

3-4-3 WDL1 の細胞内での機能

過去の研究において、Ds タグの挿入により WVD2 を過剰発現する変異株 *wvd2-1* や、WVD2 を過剰発現する形質転換株は、伸長器官の表層微小管の配向が壊れ器官がねじれるという表現型を示した (Yuen et al., 2003)。一方、遺伝子破壊株である *wvd2-2* 変異株は野生型と変わらない表現型を示し、伸長器官における表層微小管の配向も野生型と同じであった。また、*wvd2-1* 変異株の表層微小管を標識し、微小管どうしの相互作用に着目して調べると、交差しようとする 2 本の微小管間で起こる *crossover*、*catastrophic*、*zippering* という事象のうち、*zippering* の起こる頻度が上昇していた(Perrin et al., 2007)。*Zippering* は、2 本の微小管がプラス端の伸長により接触する時、伸長してきた微小管が元からある微小管に沿うようにして伸長を続ける事象である(Fig 54、Dixit et al., 2004)。さらに、*in vitro* において大腸菌から精製した WVD2 は微小管に直接結合し、微小管を束化した(Perrin et al., 2007)。

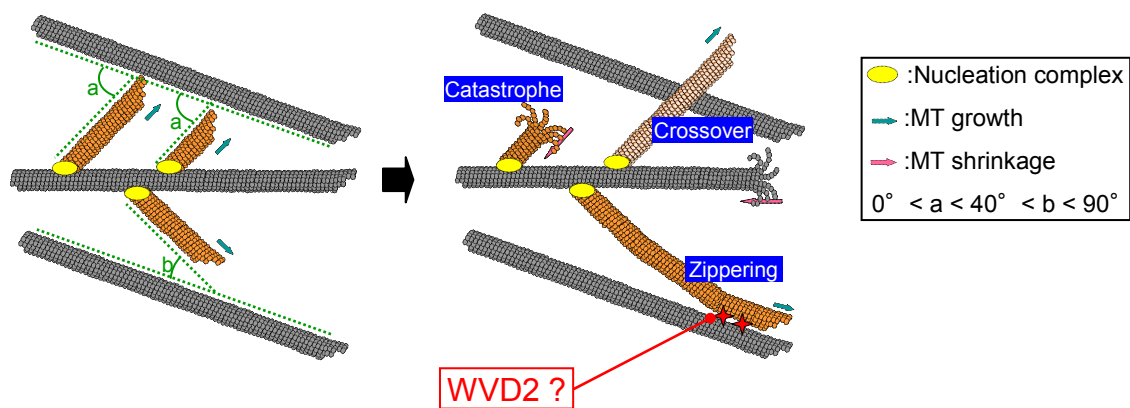


Fig 54. 2 本の微小管の相互作用

本研究において WDL1、WDL4、WDL5 の遺伝子破壊株 (*wdl1*、*wdl4*、*wdl5*) の表現型を解析した結果、*wdl4* と *wdl5* ではプロピザミドに対する応答性が高くなり、根の伸長方向が野生株より傾いた(Fig 45)。過去の研究より表層微小管の安定性と細胞の伸長方向とは強く関連していることが分かっている(Ishida et al., 2007)。このことから、WDL4 と WDL5 が表層微小管の安定性と関連している

ことが示唆された。また、*wdl1wdl4* 二重変異株の根においてプロピザミド応答性が *wdl4* 単一変異株と変わらなかったことから、WDL1 は野生型において根の細胞伸長の制御にあまり関わっていないことが示唆された(Fig 45)。しかしながら、*wdl1wdl4* 変異株で WDL1-GFP を過剰発現する形質転換株では、T2 世代の結果ではあるが *wdl4* の変異形質である根の伸長方向の傾きが一部回復した(Fig 47)。以上のことから、WDL1 と WDL4 の機能重複性が考えられた。

今後は、WVD2 ファミリーの他のタンパク質についても多重変異株や微小管との関連を調べ、WVD2 ファミリーの細胞内の機能や機能分化について解明する必要がある。

第 4 部 植物細胞からの組換えチューブリンの精製

4-1 目的

微小管は、 α/β チューブリンヘテロダイマーの重合体である。植物細胞では細胞表層にある微小管、表層微小管により細胞の伸長方向が制御されている。現在までに、チューブリン遺伝子のたった 1 アミノ酸の置換により細胞の伸長方向が傾いた変異株が多数単離されている(Ishida et al., 2007)。これらの変異株では細胞内の微小管動態が変化したために、表層微小管の安定性が変化し配向が乱れ、その結果、細胞の伸長方向に異常が生じたことが分かっている。しかしながら、1 アミノ酸置換のある変異型チューブリンがどのように微小管構造や動態に影響するかを示す知見はない。また、真核生物はそれぞれ複数のチューブリンアイソフォームを持っており、シロイヌナズナにおいても 6 個の α チューブリンと 9 個の β チューブリン遺伝子を持っているが、これらの機能分化を示す知見も少ない。以上のことから、表層微小管の配向制御を理解するためには、チューブリン変異による微小管の変化を調べる必要があった。

微小管の構造や動態を厳密に調べるためには、その構成成分であるチューブリンタンパク質を大量に精製し、*in vitro* 再構成系を用いて解析する必要がある。生物活性を持つチューブリンヘテロダイマーの形成には、真核生物特有のフォルディング・コファクターが必須であり、大腸菌の大量発現系を利用することはできず、真核生物における発現系を構築する必要がある。現在までに組換えチューブリンの発現及び大量精製の系として、出芽酵母を用いた系が報告されている(Gupta et al., 2002)。この系を用いて変異型チューブリンから *in vitro* で再構成された微小管の動態も測定された。出芽酵母は他の真核生物と比べて、チューブリンのアイソフォームの数が少なく、 α チューブリンが 2 つと β チューブリンを 1 つしか持たない。また 2 つある α チューブリンのうち 1 つを欠失させても生存することから、単一のチューブリンのみを発現させ、精製を行う系として適していると考えられる(Bode et al., 2003)。しかし、以前の研究で出芽酵母においてシロイヌナズナの α チューブリンを含む自立複製型プラスミドを導入した際には、組換えチューブリンの発現が確認できなかった(矢尾(2004)修士論文)。

そこで本研究では、増殖速度が非常に速く、組換えタンパク質の精製した報告もあるタバコ BY-2 細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow NO.2) を用いて組換えチューブリンタンパク質の大量発現系を構築することを目的とした。現在までに、精製のためのタグを付加した組換えチューブリンの BY-2 細胞での発現

には成功している。これは α チューブリンの C 末端側に精製のための Myc 及び His タグ、または His タグ及び FLAG タグを付加した組換えチューブリンであった。精製の結果、この組換え α チューブリンは内在性の β チューブリンとヘテロダイマーを形成しておらず、機能できない α チューブリンであった((Fig 55、矢尾(2004) 修士論文)。このため、新たな発現系の構築が必要となった。本研究では、機能のある組換えチューブリン発現系の構築のために、精製タグ及び精製法の検討と、変異型チューブリンの発現及び精製について報告する。

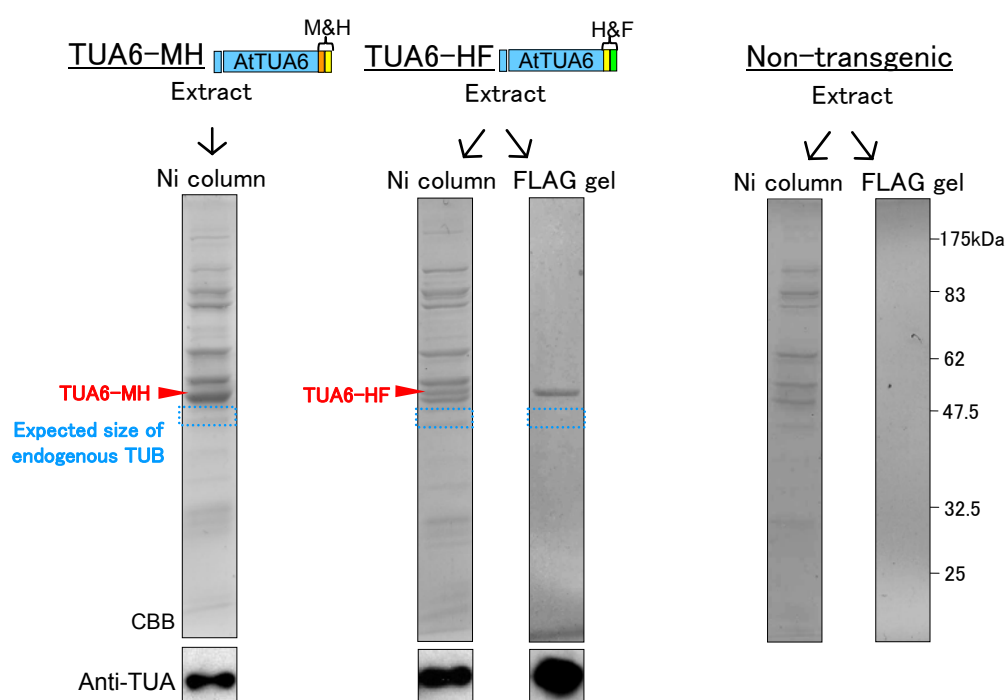


Fig 55. TUA6-MH 及び TUA-HF 系統における組換えチューブリンの精製

カラムクロマトグラフィにより精製した組換え α チューブリンのシグナルを Arrow head で示した。内在性 β チューブリンのサイズであると考えられる部分を $\square$ で示した。

4-2 方法

4-2-1 コンストラクションの作成

組換え野生型 α チューブリン及び β チューブリン発現用コンストラクション (TUA6^{WT}-FLAG、FLAG-TUB4^{WT}) 及び変異型 β チューブリン (FLAG-TUB4^{P287L}、FLAG-TUB4^{E288KL}、FLAG-TUB4^{S351F}) は、GATEWAY システム (Invitrogen) を利用して作成した。Table 15 に示したプライマーとテンプレートの組み合わせによる 4 もしくは 5 回の PCR 反応により、シロイヌナズナ α チューブリン 6 (TUA6; At4g27060) 及び β チューブリン 4 (TUB4; At1g50890) の cDNA 全長を増幅し、さらに TUA6 の C 末端及び TUB4 の N 末端に FLAG タグ (DYKDDDDK) と TEV プロテアーゼの認識配列 (ENLYFQG) を付加した (TUA6-F、F-TUB4)。そして、BP 及び LR 反応を介して pGWB2 の CaMV35S プロモーターの下流に挿入した。

Table 15. コンストラクションの作成に使用したプライマー

A. プライマー配列

Primer name	Sequences
TUA F	5'- AAAAAGCAGGCTCAATGAGAGAGTGCATTTTCG -3'
TUA R1	5'- ATCCTTGTAAGTCGGTGCCCTGGAAGTA -3'
TUA R2	5'- CTTGTCATCGTCATCCTTGTAAGTCGGT -3'
TUA R3	5'- AGAAAGCTGGGTTTCACTTGTCATCGTCATCC -3'
TUB F1	5'- GTACTTCCAGGGAGGTATGAGAGAGATCCT -3'
TUB F2	5'- ATGATAAGGAGAACCTGTACTTCCAGGGAG -3'
TUB F3	5'- GACTACAAGGACGACGATGATAAGGAGAAC -3'
TUB F4	5'- AAAAAGCAGGCTATGGACTACAAGGACGAC -3'
TUB R	5'- AGAAAGCTGGGTTTAAAGTCTCGTACTCCTC -3'
attB1adapter	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT -3'
attB2adapter	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT -3'

B. コンストラクションとプライマーの組合せ

	Template	PCR1	PCR2	PCR3	PCR4	PCR5
TUA6-F	TUA6-HF (矢尾 (2004) 修論)	TUA F TUAR1	attB1 adapter TUAR2	attB1 adapter TUR3	attB1 adapter attB2 adapter	— —
F-TUB4	TUB4-myc (金子 (2003) 修論)	TUB F1	TUB F2	TUB F3	TUB F4	attB1 adapter
F-TUB4 ^{P287L}						
F-TUB4 ^{E288KL}		TUB R	attB2 adapter	attB2 adapter	attB2 adapter	attB2 adapter
F-TUB4 ^{S351F}						

4-2-2 タバコ BY-2 細胞の生育条件と形質転換細胞の作出

タバコ BY-2 細胞の生育条件と BY-2 細胞の形質転換系統を作出方法は 2-2-2 と同一であった。各コンストラクションにつき独立した約 100 系統を選抜した。超音波による破碎により各系統のタンパク質を抽出し、抗 FLAG M5 抗体 (Sigma) を用いたイムノブロッティングにより導入遺伝子の発現を確認した。それぞれ最も組換えタンパク質の蓄積量の多かった系統を選び、以後の解析に用いた。

BY-2 細胞の伸長成長への移行は、Fisher and Cyr (1998) の方法に従った。enzyme solution [1% cellase (Onozuka RS; Yakuruto Honsha Co), 0.1% pectolyase (Y-23; Seishin Pharmaceutical Co), 0.4M mannitol, pH 5.5] でプロトプラスト化した細胞を $10^{-4}\%$ NAA 及び $10^{-5}\%$ BA を含む FMS 培地 [0.46% ムラシゲ・スーク培地用混合塩類 (和光純薬), 1% Sucrose, 0.3M mannitol, 0.02% KH_2PO_4 、 $0.20 \times 10^{-3}\%$ Myo-inositol、0.01% Thiamine-HCl, pH 5.8] に移し、28℃暗所にて培養した。

形質転換 BY-2 細胞の免疫染色は、Fisher and Cyr (1998) の方法に従った。ポリリジンコートしたカバーガラスに通常液体培地もしくは FMA 培地で育てた BY-2 細胞を固定し、detergent lysis buffer [50 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM MgSO_4 , 10 mM 3-[(cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonic acid (CHAPS)] に 5 分間おいた。次に固定液 [4% (w/v) formaldehyde, 0.1% (v/v) glutaraldehyde, 50 mM Pipes, pH 6.9, 5 mM EGTA, 2 mM MgSO_4 , 1% (v/v) glycerol, 0.30 M mannitol] で 30 分間処理した。その後、3% (w/v) BSA (in PBS) でブロッキングした後、抗 α チューブリン抗体 (YL1/2, Abcam)、抗 FLAG 抗体 (M2, Sigma) の各一次抗体と AlexaFluorR568 Anti-Rat IgG、AlexaFluorR488 Anti-Mouse IgG (ともに Molecular probes) の二次抗体を使用し、微小管と導入した組換えチューブリンの二重染色もしくは、抗 α チューブリン抗体だけの単一染色を行った。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C1) を使用した。

4-2-3 組換えチューブリン精製法の検討

BY-2 ミニプロトプラストからのタンパク質の抽出は過去の報告に従って行った (Igarashi et al., 2000, Hamada et al., 2004, Hamada et al., 2006, 矢尾 (2004) 修士論文)。抽出液は、抽出後すぐに FLAG M2 Agarose カラムにアプライする際には、TBS バッファー [50mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH 7.4)] を使い、Taxol による微小管重合脱重合サイクルによる MAPs 精製を経た後 FLAG M2

Agarose カラムで精製する際には、微小管重合バッファー [50mM Pipes-KOH(pH7.0)、10mM EGTA、15% sucrose、2mM MgCl_2 、1% casein、2 tablets/50ml buffer complete, EDTA-free(Roche)、1mM PMSF、4mM DTT]を用いた。Taxol による微小管重合脱重合サイクルによる精製は、Hamada et al.(2004)の方法に従い、内在及び組換えチューブリンを含む画分を精製した。2 回のサイクルの後、溶解したチューブリン溶液を PEM バッファー [0.1M PIPES(pH7.0)、1mM EGTA、1mM MgCl_2]で 5 倍に希釈し、FLAG M2 Agarose カラム(Sigma)にアプライした。FLAG M2 Agarose カラムによる精製の手順は、既存のプロトコールに従った。試料やバッファーの重量等は、4-3 の結果の項に示した。

4-2-4 細胞膜ゴーストを使った精製チューブリン取込み実験

細胞膜ゴーストの作成は、Sonobe and Takahashi (1994)の方法に従った。プロトプラスト化した BY-2 細胞をポリリジンコートしたカバーガラスに固定し、低張液である EMS solution [25mM Pipes (pH7.0)、5mM EGTA、2mM MgCl_2]に出し入れし、細胞を破裂させた。その結果、細胞膜だけをカバーガラスに残し、膜の細胞質側を露出させた。

カバーガラスに残った細胞膜ゴーストに 1mM GTP、1mM PMSF を含む以下の 1-8 の溶液各 100 μl を添加し、37°C、30 分処理した。

1, PEM Buffer

2, 野生型ミニプラスト粗抽出液

3, FLAG-TUB4^{WT} ミニプラスト粗抽出液

4, FLAG-TUB4^{P287L} ミニプラスト粗抽出液

5, FLAG-TUB4^{E288K} ミニプラスト粗抽出液

6, 20 μM ウシ脳チューブリン(Cytoskeleton)

7, 20 μM ウシ脳チューブリン+0.15mM FLAG-TUB4^{E288K}(精製画分)

8, 20 μM ウシ脳チューブリン+0.15mM FLAG-TUB4^{E288K}(精製画分) +20 μM Taxol

各サンプルは 3.7% formaldehyde で 30 分間固定し、その後 4-1-2 と同様の手順で、抗 α チューブリン抗体(YL1/2, Abcam)、抗 FLAG 抗体(M2, Sigma)の各一次抗体と AlexaFluorR568 Anti-Rat IgG、AlexaFluorR488 Anti-Mouse IgG (ともに Molecular probes)の二次抗体を用いて免疫二重染色を行った。そして、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon C1)で観察した。

4-2-5 in vitro 微小管再構成系を使った精製チューブリン取込み実験

BY-2 からの内在性チューブリンの精製は過去に報告された方法に従い、湿重量約 300g の野生型 BY-2 細胞より精製した(Igarashi et al., 2000)。

精製した組換えチューブリンに様々な濃度の BY-2 チューブリンもしくは 20 μ M ウシ脳チューブリン、1mM GTP 及び 20 μ M Taxol を混合し、37°C で処理した後、遠心 (37°C、100,000g、10 分) により、重合した微小管と遊離のチューブリンをそれぞれ沈殿画分と上清画分に分離した。その後、SDS-PAGE 電気泳動によりタンパク質を分離し、CBB 染色及び抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングによってシグナルを確認した。

4-3 結果と考察

4-3-1 組換えタンパク質の発現

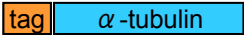
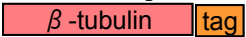
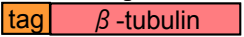
組換えチューブリン発現系には、シロイヌナズナ内で一般的に発現しており、変異株も多数報告されている α チューブリン 6(TUA6)と β チューブリン 4(TUB4)を使用することとした。

発現系構築のためにまず精製用タグの付加する位置について検討した。組換え変異型チューブリンを解析するためには、精製のために付加するタグによる微小管構築への影響を最小限に抑える必要がある。今までに作成された改変チューブリンを過剰発現するシロイヌナズナ形質転換系統では、 α チューブリンの N 末端側に何らかのタグを付加した際、伸長方向が乱れ、器官が右にねじれるという形質を示した。この形質転換系統では微小管のプラス端が非常に安定な状態になっていることが報告されている(Abe et al., 2005)。また、 β チューブリンの C 末端側にタグを付加した際には、導入タンパク質の十分な蓄積が確認できなかった(Fig 56)。以上の理由により、 α チューブリンの C 末端側と β チューブリンの N 末端側に精製用タグを付加することにした。

次に付加するタグの種類について検討した。過去の研究で作成した α チューブリンの C 末端側に Myc 及び His タグ、または His タグ及び FLAG タグを付加した系統(TUA6-MH、TUA6-HF)において、 β チューブリンとヘテロダイマーが作成できなかった原因を明らかにした。それぞれ粗抽出液もしくは精製した TUA6-MH、TUA6-HF の画分をゲルろ過カラムにより分画し、内在性及び組換えチューブリンを検出した。その結果、TUA6-MH、TUA6-HF の各シグナルは、内在性チューブリンよりも早く溶出されていた(Fig 57A)。また質量分析解析から、これらの画分には他に共通して含まれるタンパク質がないことが明らかになった(矢尾(2004)修士論文、Fig 57B)。以上のことから、TUA6-MH、TUA6-HF は正常なフォールディングができず、タンパク質の 3 次元構造に異常があると考えられた。その原因として共通に含まれる His タグの電荷によることが考えられた。そのため、電荷の影響が少なく精製度の高い FLAG タグのみを付加した系統を作成した。

CaMV35S プロモーターの下流に、 α チューブリンの C 末端もしくは β チューブリンの N 末端に FLAG タグを付加した遺伝子を挿入したコンストラクション(TUA6-F、F-TUB4)を BY-2 細胞に形質転換し、抗生物質による選抜と、タンパク質の蓄積量による選抜(抗 FLAG 抗体によるイムノブロッティング)によって、生育速度が野生型と変わらず、導入した組換えチューブリンの蓄積が最も多い系統をそれぞれ選抜した。これらの系統のミニプロトプラストからタンパク質の粗抽出

液を得、FLAG agarose によって精製を試みた。精製画分に含まれるタンパク質を、SDS-PAGE で分離後、CBB 染色と抗 FLAG 抗体、抗 α チューブリン抗体及び抗 β チューブリン抗体を使ったイムノブロッティングにより調べたところ、組換えチューブリン TUA6-F もしくは F-TUB4 と共に、内在性の β チューブリンもしくは α チューブリンが共精製されていることが確認された (Fig 58)。これにより、導入した組換え α 及び β チューブリンが内在性の β 及び α チューブリンとヘテロダイマーを形成できることが示唆された。

Modified tubulin	Tags	<i>Arabidopsis</i> Helical growth	Localization
TUA-tag 	Myc,GFP	-	MT
tag-TUA 	Myc,HA	+	MT
TUB-tag 	GFP	-	Not accumulated
tag-TUB 	GFP	-	MT

MT; microtubule

Fig 56. 改変チューブリンのタグの位置による影響

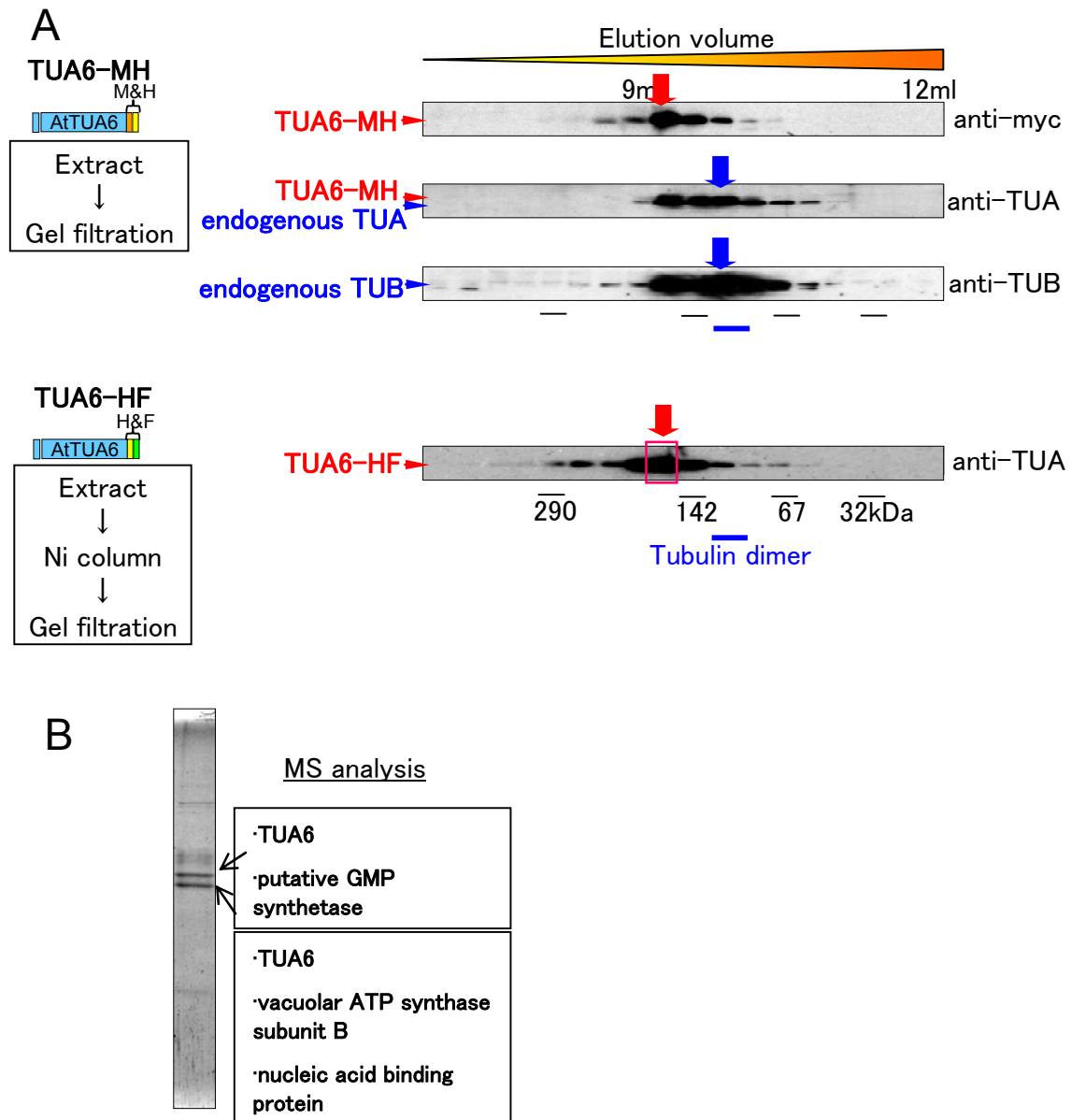


Fig 57. ゲルろ過による組換えチューブリンの分離

A: 組換え α チューブリン及び内在性 α/β チューブリンのシグナルのピークを **Arrow** で示した。

B: A で □ で示した TUA6-HF が最も多く含まれる画分について、質量分析解析により同定されたタンパク質を示した。

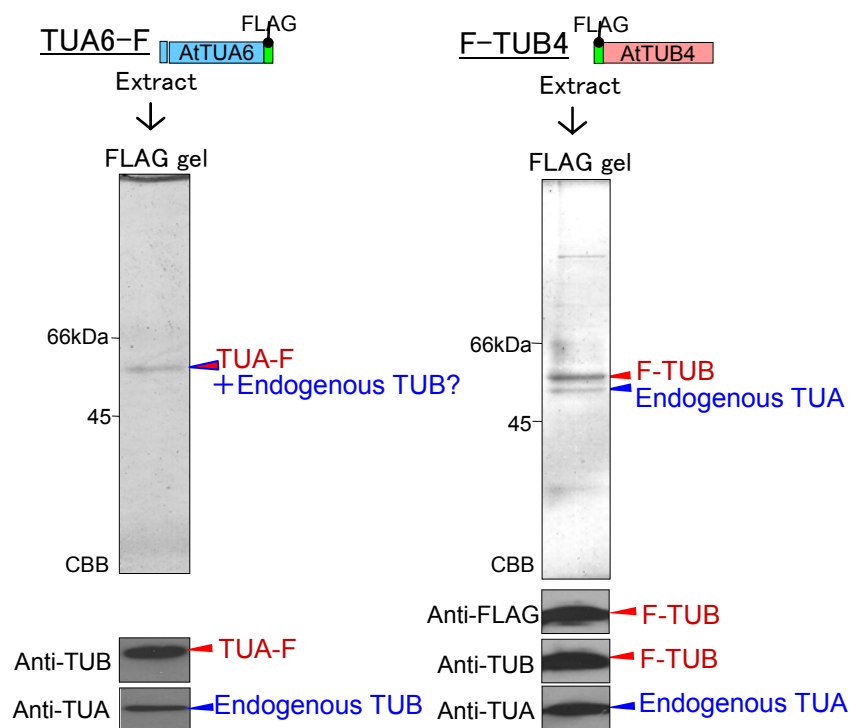


Fig 58. TUA6-F 及び F-TUB4 系統における組換えチューブリンの精製

新たに構築した TUA6-F 及び F-TUB4 系統からカラムクロマトグラフィにより精製した組換えチューブリンと、共精製したタンパク質。

4-3-2 組換え変異型チューブリンの発現

4-3-1と同様にして変異型チューブリンの精製も試みた。シロイヌナズナで器官の伸長方向に異常が現れた変異株から見つけられた、 β チューブリンの配列内の1アミノ酸置換の変異型チューブリンを3種類選択した。これらの変異箇所、変異株内での変異形質及びチュー布林三次元構造上での変異の位置をFig 59に示した。この中には、微小管の隣り合ったプロトフィラメントの接触部位に変異があるもの2つ($\text{TUB}^{\text{P287L}}$ 、 $\text{TUB}^{\text{P288K}}$)と、1本のプロトフィラメント内のチュー布林同士の接触部位に変異のあるもの1つ($\text{TUB4}^{\text{S351F}}$)が含まれていた。そして $\text{TUA6-F}\cdot\text{F-TUB4}$ 同様に精製に使用する系統を選抜し、精製を行った。その結果、チュー布林同士の接触部位の変異の $\text{TUB4}^{\text{S351F}}$ では精製のために十分な発現量のある系統を選抜することが出来なかった(Fig 60A)。これはチュー布林同士の接触部位の変異が微小管形成に大きな影響を与えてしまうため、植物体内で導入タンパク質の蓄積を抑制する何らかの機構がはたらいたと考えられた。 $\text{TUB}^{\text{P287L}}$ 及び $\text{TUB}^{\text{P288K}}$ の系統からは野生型組換えチュー布林である F-TUB 同様、組換え β チュー布林と内在性の α チュー布林を共精製することができた(Fig 60A)。

しかしながら、精製画分に含まれる組換え及び内在性チューブリンの量比は、組換えチュー布林の方が多くなっており、組換えチュー布林の一部はヘテロダイマーを形成できていないことが考えられた(Fig 60B)。そこで、精製法の改良により、正常にヘテロダイマーを形成できる組換えチュー布林のみを精製する必要があった。

この組換え野生型及び変異型チュー布林が細胞内で機能し、微小管に取りこまれているかを確認するため、抗FLAG抗体と抗 α チュー布林抗体による免疫染色を行った。その結果、表層微小管において抗FLAG抗体によって検出された組換えチュー布林が、抗 α チュー布林抗体によって検出された内在性及び組換えチューブリンのシグナルと重なっていることが確認された(Fig 61)。これにより細胞内で、導入した組換えチュー布林が微小管形成能を有し、微小管に取り込まれていることが示唆された。

次に、変異型チュー布林が微小管に取り込まれることによる細胞伸長への影響を調べた。BY-2細胞は通常2,4-Dを含む培地で生育し、活発な細胞分裂によって急速に増殖する培養細胞である。しかし、細胞をプロトプラスト化した後、NAA及びBAを含む培地に置換すると、分裂を停止し、細胞伸長を開始することが分かっている(Fisher et al., 1998)。この条件下で、 $\text{TUB}^{\text{P287L}}$ 、 $\text{TUB}^{\text{P288K}}$ 、 $\text{TUB4}^{\text{S351F}}$ の各系統の細胞伸長への影響を調べた。その結果、 $\text{TUB}^{\text{P288K}}$ では細胞が伸長せず、大きく膨らんだ細胞になった(Fig 62A)。これらの細胞を抗 α

チューブリン抗体で免疫染色し、表層微小管の配向を調べると、 TUB^{P287L} では微小管が伸長軸に対して垂直に配向しているのに対し、 TUB^{P288K} ではばらばらの配向を示した。この配向の乱れが、伸長阻害の原因となっていると考えられた (Fig 62B)。シロイヌナズナの $TUB4^{P288K}$ 変異株でも細胞が膨らむ変異形質が観察されている (Ishida et al., 2007)。

	Mutation point region	Plant helical growth
$TUB4^{P287L}$	Lateral contacts	Right
$TUB4^{E288K}$	Lateral contacts	Left
$TUB4^{S351F}$	Intradimer	Left

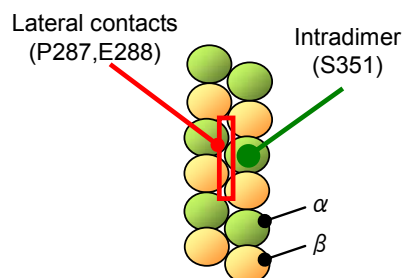


Fig 59. 発現系を構築した変異型チューブリンとその変異箇所

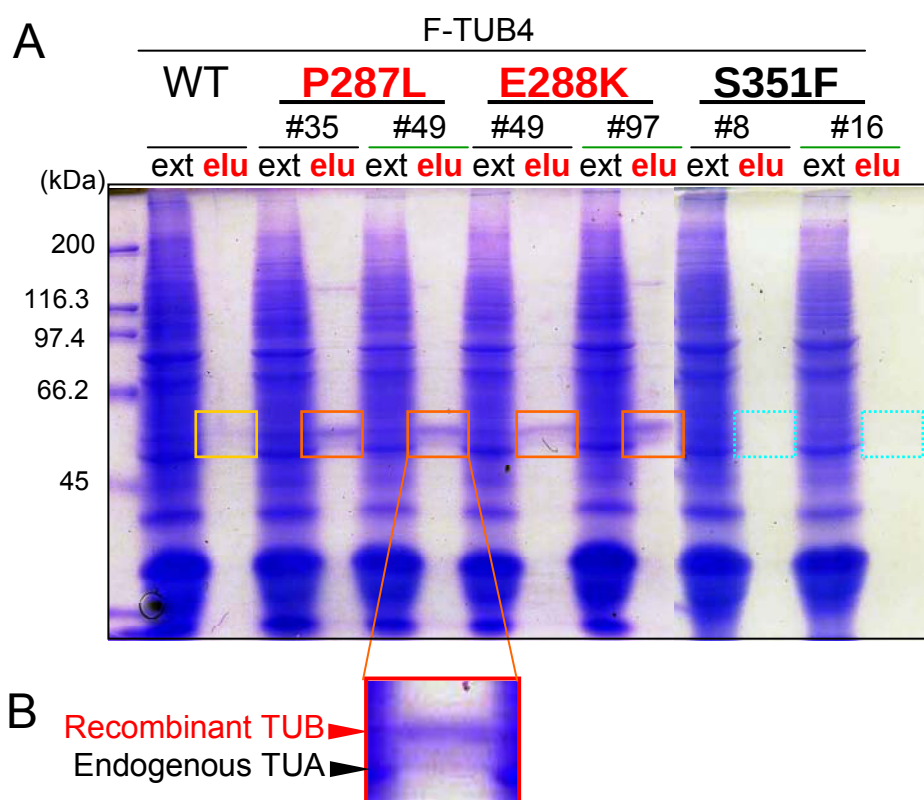


Fig 60. 組換え変異型チューブリンの精製

A: 組換え野生型及び変異型チューブリンのミニプロトプラスト抽出液 (ext) と FLAG カラムの溶出画分 (elu)。

B: A で示した溶出画分の拡大画像。

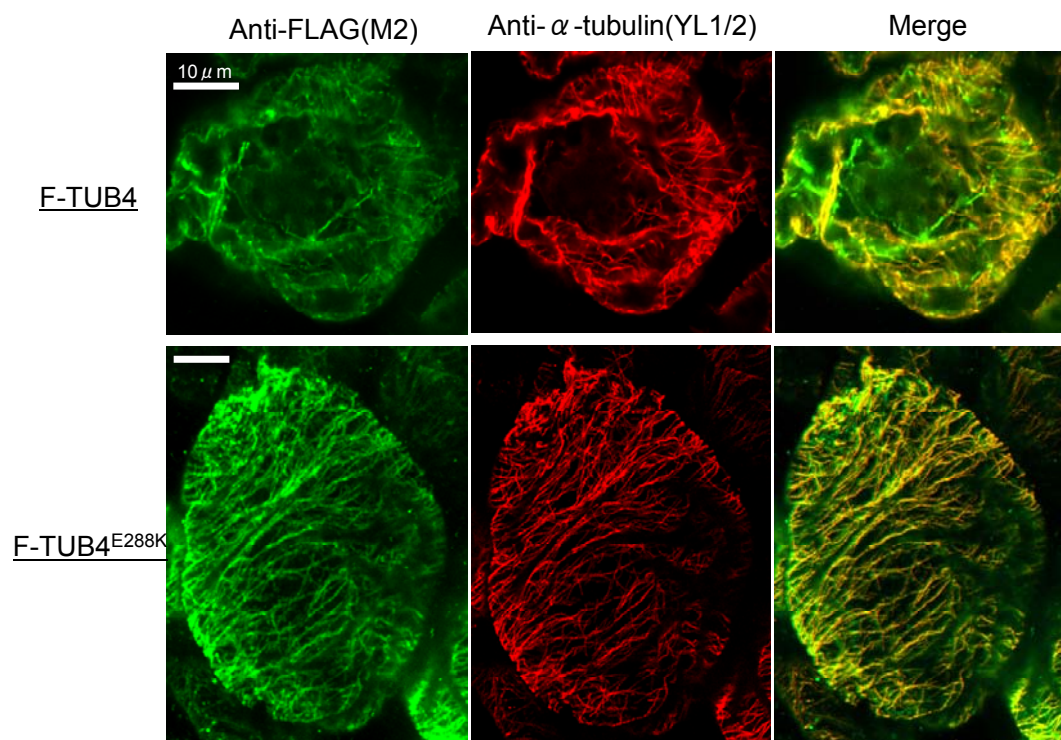


Fig 61. 組換えチューブリン形質転換細胞の免疫染色

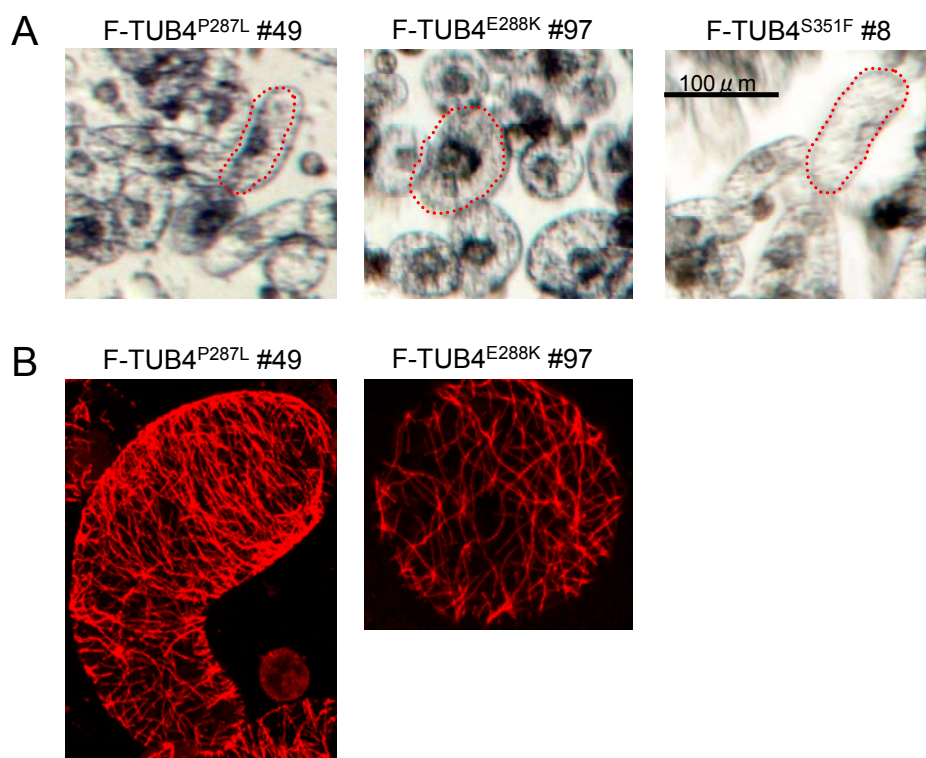


Fig 62. 伸長条件下における組換えチューブリン形質転換細胞

A: 伸長条件下で 3 日間培養した細胞の光学顕微鏡画像。

B: 抗 α チューブリン抗体による免疫染色によって表層微小管を標識した。

4-3-3 組換えチューブリン精製法の検討

精製法の改良として、1 段階目に微小管重合剤であるタキソールを用いて粗抽出液でまず微小管を形成させ、遠心により微小管画分を分離する。その後、2 段階目として **FLAG agarose** によって組換えチューブリンを精製するという方法を試みた。この方法は過去に報告された **BY-2** 細胞から全チューブリンタンパク質と微小管付随タンパク質を精製する方法に基づいて行った(Hamada et al., 2004)。これにより、1 段階目で内在性及び組換えチューブリンを共に含んだ、微小管重合能を有する全チューブリン精製することになり、重合できないチューブリンは除くことが出来ると考えられた。その結果、精製画分から検出された組換え及び内在性チューブリンの量はほぼ等しくなった(Fig 63)。この結果から、以下の解析に用いた組換えチューブリンはこの方法で精製したチューブリンを使用した。

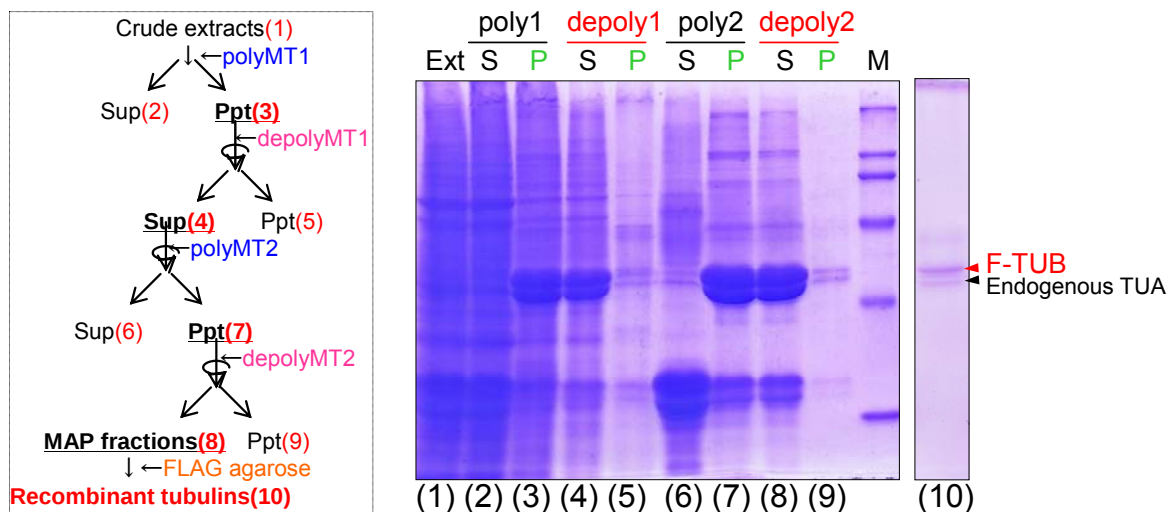


Fig 63. 精製法の改良

4-3-4 表層微小管での精製チューブリン重合能

組換えチューブリンが微小管を再構成する活性があるかを確認した。組換えチューブリンだけでは濃度が低く、それだけで重合できる濃度ではなかった。しかし、チューブリンは重合核が存在すれば低濃度でも微小管を形成することが出来る。そこで、細胞膜上に存在する微小管重合核を外に露出した細胞膜ゴーストを作り、その上でそこで微小管を形成できるかを確認した。細胞膜ゴーストは細胞膜の外側の表面をスライドガラスに貼り付け、その後細胞を破壊することで、細胞膜の内側を外に露出したものである。膜上には表層微小管を形成する際の重合核とそこから形成した表層微小管が存在すると考えられる(Sonobe et al., 1994)。

細胞膜ゴーストに、F-TUB、F-TUB^{P287L}、F-TUB^{P288K} の各系統のミニプラスト抽出液を添加・保温した後、固定し、組換えチューブリンを検出する抗 FLAG 抗体と全チューブリンを検出する抗 α -チューブリン抗体を使用して、免疫二重染色を行った。その結果組換えチューブリン抽出液を添加した際には、Buffer のみを添加した際には検出されない繊維状の抗 FLAG 抗体による緑のシグナルが、抗 α -チューブリン抗体による赤のシグナルを重ねていることが確認された(Fig 64A-E)。さらに、精製した組換えチューブリンのみを添加しても、新たな微小管はほとんど形成されない(data not shown)。しかし、ここにウシ脳チューブリンを添加し、チューブリン全体の濃度をあげることで微小管の形成が観察された(Fig 64G)。このことにより、重合核と内在性のチューブリンが存在する状態では、組換えチューブリンが重合能を有することが確認された。

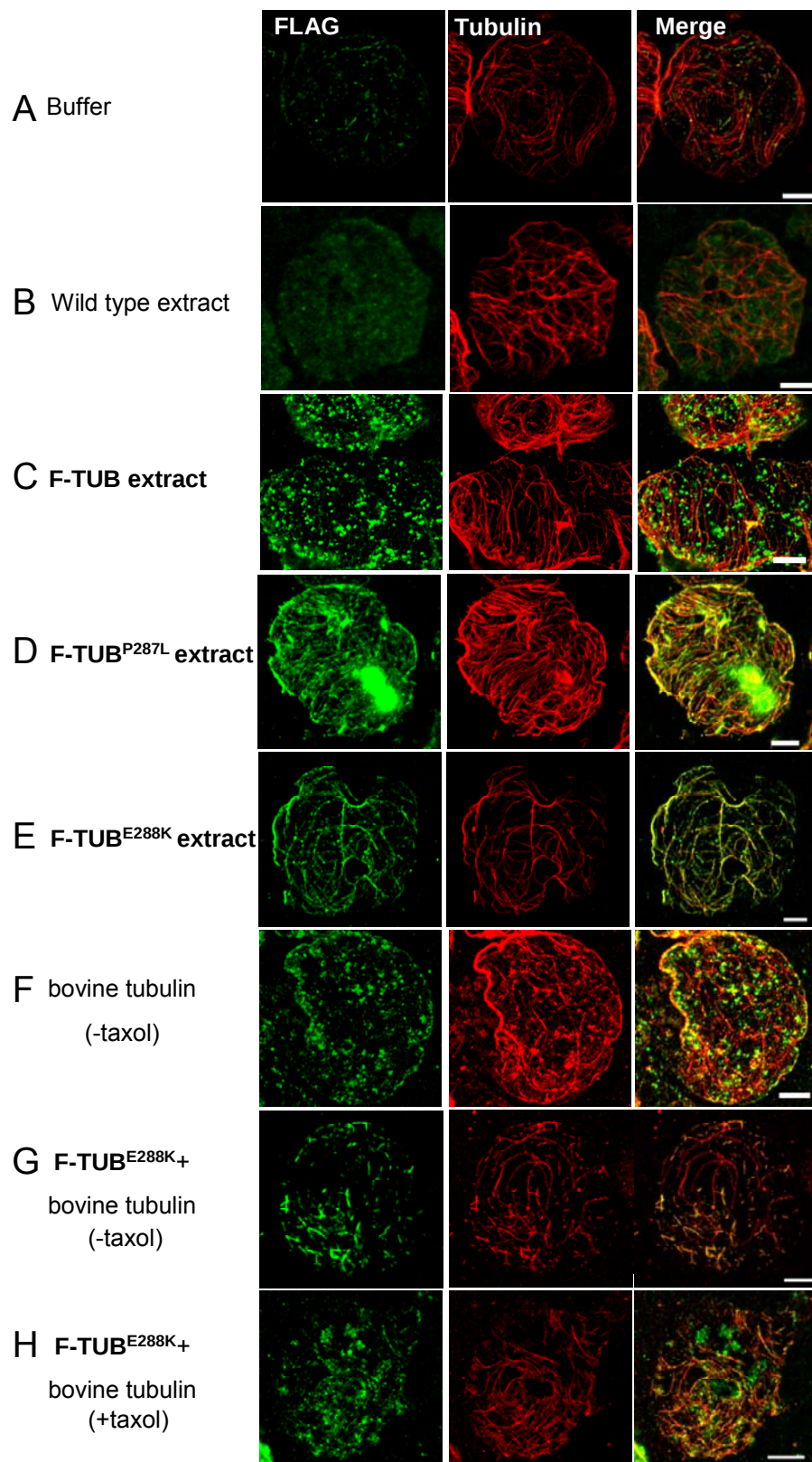


Fig 64. 表層微小管での精製チューブリン重合能

4-3-5 in vitro 微小管再構成系での精製チューブリン重合能

精製した組換えチューブリンについて in vitro での重合能を確認した。精製した組換えチューブリンだけでは濃度が低く、それだけで重合できる濃度ではなかったため、野生株の BY-2 細胞から精製した内在性チューブリンと混合し、チューブリンから再構成される微小管に組換えチューブリンがとりこまれるかを調べた。検出は形成した微小管を遠心により沈殿させることで、微小管に取り込まれたチューブリンを沈殿画分に、微小管に取り込まれなかったチューブリンを上清画分に分離することで行った(Fig 65A)。その結果、BY-2 由来のチューブリンが存在する際には、精製組換えチューブリンの約半量が微小管に取り込まれていることが確認された(Fig 65B)。また、動物由来であるウシ脳チューブリンを使用して同様の実験を行っても組換えチューブリンが微小管に取り込まれた(Fig 65C)。

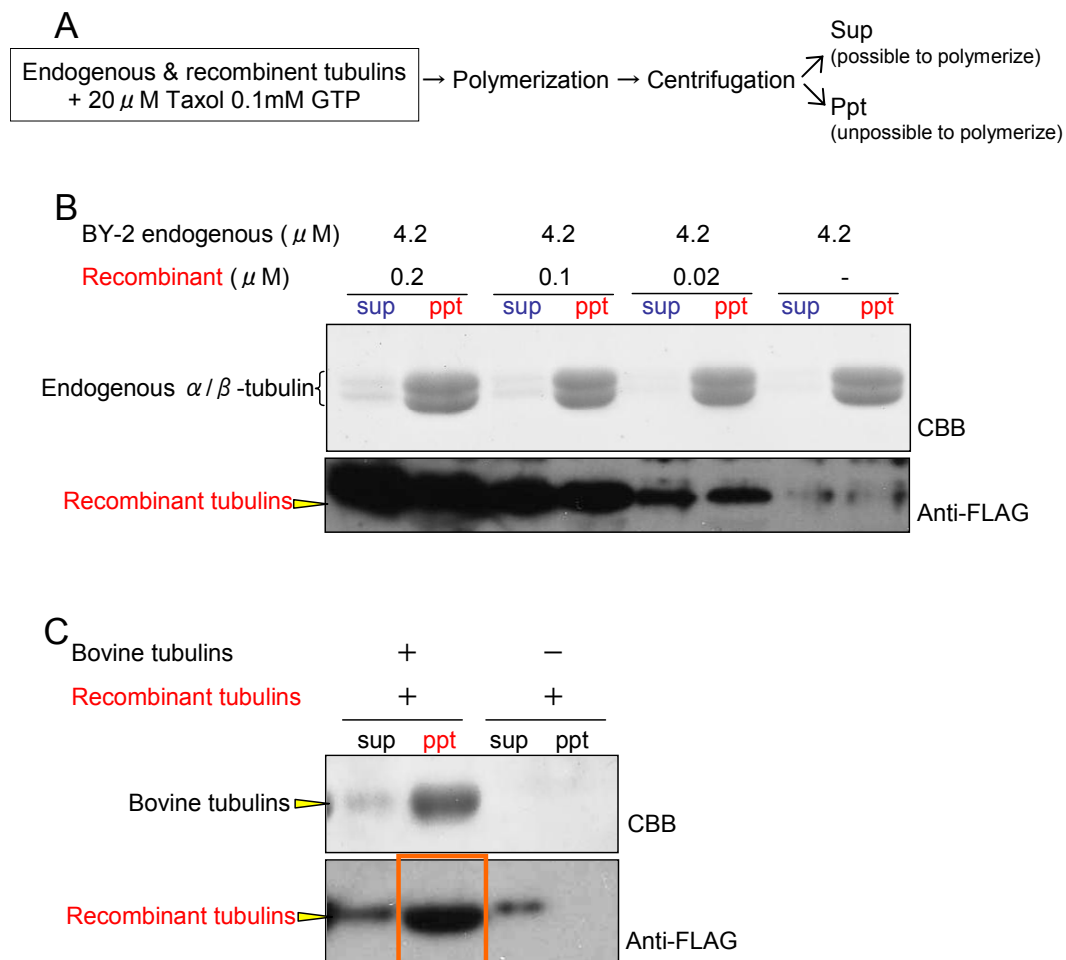


Fig 65. in vitro 微小管再構成系での精製チューブリン重合能

4-3-6 今後の改良点

今回行った開発した発現から微小管形成活性をもつ組換えチューブリンを精製することが出来た。しかしながら、この発現系を用いて精製できた組換えチューブリンが湿重量約 300g の BY-2 細胞からたったの 100 μ g であった。BY-2 細胞から内在性の全チューブリンを精製すると、同量の細胞から数 mg のチューブリンを精製することが出来た(data not shown)。また、チューブリンはそれだけで重合するのに最低 25 μ M(2.5mg/ml)の濃度が必要である。これらのことにより、今後は発現量の高い系の構築が必要である。そのために、プロモーターの選択や、細胞株の選択が必要であると考えられる。また、細胞内ではチューブリンタンパク質を一定量に保つよう制御されているという報告もあることから、組換えチューブリンの発現量を高めるために、内在性チューブリンの発現を抑える必要もあると考えられた。

第 5 部 総括

5-1 MAPsによる表層微小管の配向制御

現在までに、表層微小管に加えてフラグモプラストや前期前微小管束などを含めた、「植物特有」の微小管構造の制御に関わる因子が多数同定されている。これらは、**SPR1** や **SPR2** に代表されるシロイヌナズナの変異株の解析によるもの。他に、培養細胞から精製したタンパク質を用いた生化学的な解析 (**Chang-Jie et al., 1993, Igarashi et al., 2000, Hamada et al., 2004**) やプロテオミクスを用いた網羅的な解析によって発見されてきた (**Korolev et al., 2005, Hamada et al., 2006**)。最近の研究でも、プロテオミクスを元に同定された **AIR9** という新規 **MAP** が前期前微小管束の位置の認識に関わるという報告があった (**Buschmann et al., 2006**)。しかしながら、今までの研究法では、植物微小管構造に関わる全ての因子を同定することはできてないと考えられ、また、既知の因子間の相互作用についての知見も少ない。

本研究において、植物特有の微小管構造である表層微小管の配向制御に関わる、植物特有の **MAP** である **SPR2** についてその微小管に対する機能を解析し、有用な知見を得ることができた。今後はこの知見を元に、**SPR2** と相互作用する新たな表層微小管制御因子の探索や、既知の **MAPs** との関連を解析することで、**MAPs** がどのように関わりあって表層微小管機能を制御しているのかを明確にすることが必要であると考えられた。そして、このように既知の **MAP** の機能を元にして新規 **MAPs** の探索や他の **MAPs** との相互作用の解析を行うことが、新たな **MAP** の解析法の構築につながると期待される。

第 6 部 参考文献

1. Abe T, Hashimoto T. (2005) Altered microtubule dynamics by expression of modified alpha-tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic Arabidopsis plants. *Plant J.* 43:191-204
2. Ambrose JC, Shoji T, Kotzer AM, Pighin JA, Wasteneys GO. (2007) The Arabidopsis CLASP gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. *Plant Cell.* 19(9):2763-2775
3. Asbury CL. (2008) XMAP215: a tip tracker that really moves. *Cell.* 132(1):19-20.
4. Bisgrove SR, Lee YR, Liu B, Peters NT, Kropf DL. (2008) The Microtubule Plus-End Binding Protein EB1 Functions in Root Responses to Touch and Gravity Signals in Arabidopsis. *Plant Cell. in press*
5. Bode CJ, Gupta ML, Suprenant KA, Himes RH. (2003) The two α -tubulin isotypes in budding yeast have opposing effects on microtubule dynamics in vitro. *EMBO Rep.* 4(1):94-99.
6. Bouquin T, Mattsson O, Naested H, Foster R, Mundy J. (2003) The Arabidopsis lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *J Cell Sci.* 116(Pt 5):791-801.
7. Brouhard GJ, Stear JH, Noetzel TL, Al-Bassam J, Kinoshita K, Harrison SC, Howard J, Hyman AA. (2008) XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase. *Cell.* 132(1):79-88.
8. Burk DH, Ye ZH (2002) Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell.* 14: 2145-2160

9. Buschmann H, Fabri CO, Hauptmann M, Hutzler P, Laux T, Lloyd CW, Schäffner AR (2004) Helical growth of the *Arabidopsis* mutant *tortifolia1* reveals a plant-specific microtubule-associated protein. *Curr Biol* 14: 1515–1521
10. Buschmann H, Chan J, Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA, H. Doonan J, Lloyd CW (2006) Microtubule-associated AIR9 recognizes the cortical division site at preprophase and cell-plate insertion. *Curr. Biol.* 16: 1938–1943
11. Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW (2003) EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol.* 5: 967-971.
12. Chan J, Calder G, Fox S, Lloyd C (2007) Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. *Nat Cell Biol.* 9: 171-175
13. Cho US, Xu W. (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature.* 445:53-57
14. Cingolani G, Petosa C, Weis K, Muller CW. (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha, *Nature* 399: 221–229.
15. Clough SJ, Bent AF. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16(6):735-743.
16. Dhonukshe P, Laxalt AM, Goedhart J, Gadella TW, Munnik T. (2003) Phospholipase d activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell.* 15(11):2666-2679
17. Dixit R, Cyr R. (2004) Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through

- angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell*. 16(12):3274-3284
18. Fisher DD, Cyr RJ. (1998) Extending the Microtubule/Microfibril paradigm. Cellulose synthesis is required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells *Plant Physiol*. 116(3):1043-1051.
 19. Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol*. 4:583-591.
 20. Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T (2000) The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127:4443–4453
 21. Gardiner JC, Harper JD, Weerakoon ND, Collings DA, Ritchie S, Gilroy S, Cyr RJ, Marc J. (2001) A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell*. 13:2143-2158.
 22. Gardiner J, Collings DA, Harper JD, Marc J. (2003) The effects of the phospholipase D-antagonist 1-butanol on seedling development and microtubule organisation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 44:687-696.
 23. Gupta ML Jr, Bode CJ, Thrower DA, Pearson CG, Suprenant KA, Bloom KS, Himes RH. (2002) β -Tubulin C354 mutations that severely decrease microtubule dynamics do not prevent nuclear migration in yeast. *Mol Biol. Cell*. 13(8):2919-2932
 24. Hamada T, Igarashi H, Itoh TJ, Shimmen T, Sonobe S (2004) Characterization of a 200 kDa microtubule-associated protein of tobacco BY-2 cells, a member of the XMAP215/MOR1 family. *Plant*

25. Hamada T, Igarashi H, Yao M, Hashimoto T, Shimmen T, Sonobe S (2006) Purification and Characterization of Plant Dynamin from Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiol.* 47:1175 – 1181
26. Hashimoto T (2003) Dynamics and regulation of plant interphase microtubules: a comparative view. *Curr Opin Plant Biol.* 6:568-576
27. Hejnowicz Z. (2005) Autonomous changes in the orientation of cortical microtubules underlying the helicoidal cell wall of the sunflower hypocotyl epidermis: spatial variation translated into temporal changes. *Protoplasma.* 225(3-4):243-256
28. Hirase A, Hamada T, Itoh TJ, Shimmen T, Sonobe S. (2006) n-Butanol induces depolymerization of microtubules in vivo and in vitro. *Plant Cell Physiol.* 47:1004-1009.
29. Horio T, Hotani H. (1986) Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321:605-607.
30. Ichihara K, Kitazawa H, Iguchi Y, Hotani H, Itoh TJ (2001) Visualization of the stop of microtubule depolymerization that occurs at the high-density region of microtubule-associated protein 2 (MAP2). *J Mol Biol.* 312:107-118.
31. Igarashi H, Orii H, Mori H, Shimmen T, Sonobe S (2000) Isolation of a novel 190 kDa protein from tobacco BY-2 cells: possible involvement in the interaction between actin filaments and microtubules. *Plant Cell Physiol.* 41:920-931
32. Ishida T, Kaneko Y, Iwano M, Hashimoto T (2007) Helical microtubule arrays in a collection of twisting tubulin mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 8544-8549

33. Kawachi A, Ichihara K, Hisanaga S, Iida J, Toyota H, Hotani H, Itoh TJ. (2003) Different protofilament-dependence of the microtubule binding between MAP2 and MAP4. *Biochem Biophys Res Commun.* 305:72-78
34. Kawamura E, Himmelspach R, Rashbrooke MC, Whittington AT, Gale KR, Collings DA, Wasteney GO. (2006) MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the Arabidopsis root. *Plant Physiol.* 140(1):102-114.
35. Kirik V, Herrmann U, Parupalli C, Sedbrook JC, Ehrhardt DW, Hülskamp M. (2007) CLASP localizes in two discrete patterns on cortical microtubules and is required for cell morphogenesis and cell division in Arabidopsis. *J Cell Sci.* 120(Pt 24):4416-4425
36. Korolev AV, Buschmann H, Doonan JH, Lloyd CW. (2007) AtMAP70-5, a divergent member of the MAP70 family of microtubule-associated proteins, is required for anisotropic cell growth in Arabidopsis. *J Cell Sci.* 120(Pt 13):2241-2247.
37. Lloyd C, Chan J. (2004) Microtubules and the shape of plants to come. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:13-22
38. Mao T, Jin L, Li H, Liu B, Yuan M. (2005) Two microtubule-associated proteins of the Arabidopsis MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol.* 138:654-662.
39. McNally F. (2003) Microtubule dynamics: new surprises from an old MAP. *Curr Biol.* 13:R597-599
40. Mitchison T, Kirschner M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-242
41. Murata T, Sonobe S, Baskin TI, Hyodo S, Hasezawa S, Nagata T, Horio T, Hasebe M (2005) Microtubule-dependent microtubule

nucleation based on recruitment of γ -tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol* 7:961–968

42. Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T. (2007) .Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*. 104(1):34-41.
43. Nakajima K, Furutani I, Tachimoto H, Matsubara H, Hashimoto T (2004) SPIRAL1 encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding Arabidopsis cells. *Plant Cell* 16:1178–1190
44. Nakamura M, Naoi K, Shoji T, Hashimoto T (2004) Low concentrations of propyzamide and oryzalin alter microtubule dynamics in Arabidopsis epidermal cells. *Plant Cell Physiol* 45:1330–1334
45. Nakao C, Itoh TJ, Hotani H, Mori N. (2004) Modulation of the stathmin-like microtubule destabilizing activity of RB3, a neuron-specific member of the SCG10 family, by its N-terminal domain. *J Biol Chem*. 279:23014-23021.
46. Naoi K, Hashimoto T (2004) A semidominant mutation in an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase-like gene compromises cortical microtubule organization. *Plant Cell* 16(7):1841–1853
47. Pastuglia M, Bouchez D. (2007) Molecular encounters at microtubule ends in the plant cell cortex. *Curr Opin Plant Biol*. 10(6):557-563
48. Permana S, Hisanaga S, Nagatomo Y, Iida J, Hotani H, Itoh TJ (2005) Truncation of the projection domain of MAP4 (microtubule-associated protein 4) leads to attenuation of microtubule dynamic instability. *Cell Struct Funct*. 29:147-157

49. Perrin RM, Wang Y, Yuen CY, Will J, Masson PH. (2007) WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 49(6):961-971.
50. Popov AV, Pozniakovsky A, Arnal I, Antony C, Ashford AJ, Kinoshita K, Tournebize R, Hyman AA, Karsenti E. (2001) XMAP215 regulates microtubule dynamics through two distinct domains. *EMBO J.* 20:397-410.
51. Popov AV, Karsenti E. (2003) Stu2p and XMAP215: turncoat microtubule-associated proteins? *Trends Cell Biol.* 13:547-550.
52. Preuss ML, Kovar DR, Lee YR, Staiger CJ, Delmer DP, Liu B. (2004) A plant-specific kinesin binds to actin microfilaments and interacts with cortical microtubules in cotton fibers. *Plant Physiol.* 136:3945-3955.
53. Sedbrook JC, Ehrhardt DW, Fisher SE, Scheible W, Somerville CR (2004) The *Arabidopsis* SKU6/SPIRAL1 gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *Plant Cell* 16:1506–1520
54. Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW, (2003) Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science.* 300:1715-8
55. Shirasu-Hiza M, Coughlin P, Mitchison T. (2003) Identification of XMAP215 as a microtubule-destabilizing factor in *Xenopus* egg extract by biochemical purification. *J Cell Biol.*:161(2):349-358
56. Shoji T, Narita NN, Hayashi K, Asada J, Hamada T, Sonobe S, Nakajima K, Hashimoto T (2004) Plant-specific microtubule-associated protein SPIRAL2 is required for anisotropic growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136:3933–3944
57. Slep KC, Vale RD. (2007) Structural basis of microtubule plus end

- tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol Cell*. 27(6):976-91.
58. Smertenko AP, Chang HY, Wagner V, Kaloriti D, Fenyk S, Sonobe S, Lloyd C, Hauser MT, Hussey PJ. (2004) The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell*. 16:2035-2047
 59. Sonobe S, Takahashi S. (1994) Association of Microtubules with the Plasma Membrane of Tobacco BY-2 Cells in Vitro. *Plant Cell Physiol*. 35:451-460
 60. Stoppin-Mellet V, Gaillard J, Vantard M (2006) Katanin's severing activity favors bundling of cortical microtubules in plants. *Plant J*. 46:1009-1017.
 61. Thitamadee S, Tuchiara K, Hashimoto T (2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in Arabidopsis. *Nature* 417:128–129
 62. Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A, Hussey PJ. (2002) MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat Cell Biol*. 4:711-714.
 63. Van Damme D, Vanstraelen M, Geelen D. (2007) Cortical division zone establishment in plant cells. *Trends Plant Sci*. 12(10):458-464
 64. Vaughan KT. (2004) Surfing, regulating and capturing: are all microtubule-tip-tracking proteins created equal? *Trends Cell Biol*. 14(9):491-496
 65. Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboleiro MF, Voter WA, Erickson HP, Salmon ED. (1988) Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol*. 107:1437-1448
 66. Wang X, Zhu L, Liu B, Wang C, Jin L, Zhao Q, Yuan M. (2007) Arabidopsis MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in

- directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *Plant Cell*. 19(3):877-89.
67. Wasteneys GO. (2004) Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Curr Opin Plant Biol*. 7:651-660.
68. Whittington AT, Vugrek O, Wei KJ, Hasenbein NG, Sugimoto K, Rashbrooke MC, Wasteneys GO (2001) MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 411:610–613
69. Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y, Lin Z, Li Z, Strack S, Stock JB, Shi Y. (2006) Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*. 127:341-353.
70. Yuen CYL, Pearlman RS, Silo-suh L, Hilson P, Carroll KL, Masson PH (2003) WVD2 and WDL1 modulate helical organ growth and anisotropic cell expansion in Arabidopsis. *Plant Physiol* 131:493–506
71. 安永 みゆき (2003) 修士論文
72. 浅田 純子 (2004) 修士論文
73. 矢尾 真樹 (2004) 修士論文
74. 若松 巧倫 (2005) 修士論文
75. 関 智予 (2006) 修士論文

第 7 部 謝辞

本研究を進めるにあたり、たくさんの方々から多大な協力と助言を頂きました。

暗視野顕微鏡技術及びブタ脳からのチューブリン精製法は名古屋大学理学研究科の伊藤知彦先生の多大なるご指導とご助言により成功することができました。また、BY-2 細胞からのタンパク質の抽出法及びチューブリン精製法は兵庫県立大学生命理学研究科の園部誠司先生と濱田隆宏博士(現 奈良先端科学技術大学院大学)の多大なるご指導とご助言により行うことができました。

2 × rsGFP 遺伝子を譲っていただいた California 大学の Patricia Zambryski 先生、*mor1-1* 変異株を譲っていただいた British Columbia 大学の Geoffrey O. Wasteneys 先生、Gateway 用ベクターを譲っていただいた島根大学の中川強先生にも感謝いたします。

また、いつも新鮮なブタの脳を提供してくださった京都食肉市場内いけだ食品の社員の方々にも感謝いたします。

最後に、植物遺伝子機能学講座の橋本隆先生、中島敬二先生、庄司翼先生、加藤壮英先生をはじめとするスタッフの方々、先輩方、同輩や後輩の方々、技術補佐の皆様には、いつも自由にのびのびと研究を行わせて頂き、また、精神的かつ肉体的に強く育てていただいたことをとてもとても感謝します。

平成 20 年 5 月