

博士論文番号：0581016

植物細胞における表層微小管の形成機構

中村 匡良

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

(橋本 隆 教授)

平成 21 年 1 月 26 日提出

目次

1. 序論	1
1-1. 微小管と微小管形成	
1-2. γ チューブリン複合体	
1-3. 植物細胞における微小管形成機構	
1-4. セルロース微繊維と表層微小管束	
1-5. 表層微小管の配向	
2. 材料と方法	9
2-1. 植物体と生育条件	
2-2. <i>SPR3</i> クロニングと相補試験	
2-3. 酵母菌株及び形質転換と酵母 Two-Hybrid 法	
2-4. 植物体の観察	
2-5. シロイヌナズナ配偶体の観察	
2-6. 微小管の観察	
2-7. <i>AtGCP2</i> と微小管の動態観察	
3. 結果	17
3-1. シロイヌナズナ新規右巻き変異株 <i>spiral3</i>	
3-2. <i>spr3</i> 変異株における表層微小管	
3-3. <i>spr3</i> 変異株の原因遺伝子	
3-4. <i>spr3</i> 変異株での微小管形成の頻度と微小管動態	
3-5. 表層微小管形成角度	
3-6. <i>spr3</i> 細胞で見られた表層微小管の動態変化の評価	
3-7. <i>AtGCP2</i> の T-DNA 挿入変異株 <i>atgcp2-1</i>	
3-8. <i>AtGCP2</i> の細胞内局在解析	
3-9. 新規微小管の形成部位からの切り離しにおける <i>AtGCP2</i>	
4. 考察	50
4-1. <i>AtGCP2</i> の T-DNA 挿入株 <i>atgcp2-1</i> の解析	
4-2. <i>AtGCP2</i> 一アミノ酸置換変異株 <i>spr3</i> 変異株	
4-3. 右巻きねじれ伸長と微小管形成	
4-4. 植物細胞における微小管形成機構	
5. 参考文献	62
6. 謝辞	72

1. 序論

1-1. 微小管と微小管形成機構

微小管は全ての真核生物に見られる細胞骨格の 1 つである。微小管構造は細胞分裂、細胞内輸送、細胞の形や極性など様々な機能において重要な役割を持つ。 α チューブリン、 β チューブリンのヘテロダイマーを構成単位とし、長軸方向に規則的に並んだ原繊維を基本構造とする。この原繊維が側面どうしで結合し、直径約 25 nm の中空の円筒状の微小管を形成している。 β チューブリン側をプラス端、 α チューブリン側をマイナス端といい、微小管の両端では絶えずヘテロダイマーの重合による伸長 (growth) と脱重合による短縮 (shrinkage) が繰り返されている。重合状態から脱重合状態への移行をカタストロフ (catastrophe) と呼び、脱重合から重合への移行をレスキュー (rescue) と呼ぶ。この性質は微小管の動的不安定性と呼ばれ (Fig. 1)、伸長と短縮の速度やカタストロフとレスキューの頻度といったパラメーターにより微小管動態は評価される (Michison and Kirschner, 1984)。

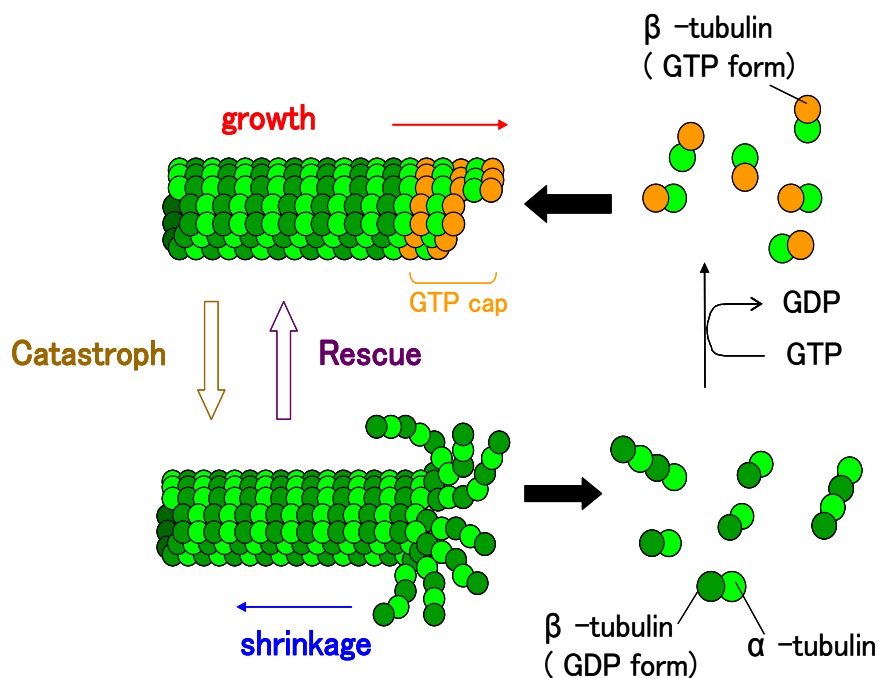


Figure 1. 微小管の動的不安定性

精製した遊離の α/β チューブリンヘテロダイマーは、濃度が高ければ、試験管内で自然に重合することができる。しかし、細胞内ではチューブリンの濃度が薄いため、微小管形成の核となる最初のチューブリンの会合が動力的に制限されてしまう。真核細胞ではこの動力的な問題を解決するために、微小管形成中心 (microtubule organizing centers: MTOC) によって、生体内における新しい微小管の形成が時間・空間的に制御されている。動物細胞では、1対の中心小体と中心体周辺物質 (PCM) からなる中心体が MTOC の役割を果たしている。出芽酵母においては、三層からなる紡錘体極 (Spindle pole body: SPB) が MTOC として機能している。分裂酵母では核膜に存在する SPB の他に interphase MTOC、equatorial MTOC というように、細胞周期によって MTOC の存在する場所は変化する (Heitz et al., 2001; Tran et al., 2001)。また、*Dictyostelium discoideum* の MTOC は SPB と中心体の特徴を合わせ持つことなど、MTOC は種間で形を大きく変えて存在している。

1-2. γ チューブリン複合体

γ チューブリンは、糸状菌 *Aspergillus nidulans* β チューブリン変異の遺伝子外抑圧突然変異株の研究で単離、同定されたチューブリンスーパーファミリーの α チューブリン β チューブリンに次ぐ 3 番目のメンバーである (Oakley and Oakley, 1989)。 γ チューブリンは現在すべての真核生物の微小管の形成や組織化に寄与する MTOC の必要不可欠な構成因子として認識されている (Job et al., 2003)。広く生物種に保存されている γ チューブリンは、その生物細胞内で他のタンパク質と γ チューブリン複合体を形成しており、 γ チューブリンと複合体を形成するタンパク質も生物種間で保存されている。

γ チューブリン複合体は様々な生物種細胞から単離されている。*Xenopus* eggs から単離された γ チューブリン複合体は、電子顕微鏡による観察でリング状の構造をしていたことから γ -tubulin Ring Complex (γ TuRC) と名付けられた (Zheng et al., 1995)。*Xenopus* eggs に続いて *Drosophila* の初期胚やヒトの培養細胞からも γ TuRC が精製されており (Oegema et al., 1999; Murphy et al., 1998)、現在では γ -TuRC サブユニットの命名法として、主に Grips (γ -tubulin ring protein) と GCPs (γ -tubulin complex protein) が利用されている (Table 1)。

Table 1. γ tubulin complex components in various species

Arabidopsis thaliana	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Xenopus</i>	Human	<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.pombe</i>
gtublin (At3g61650, 474aa)	gtublin 23C	gtublin	TUBG1	Tub4p	Tubg1 / Gtb1
(At5g05620, 474aa)	gtublin 37DC		TUBG2		
AtGCP2 (At5g17410, 678aa)	Dgrip84	Xgrip110	GCP2	Spc98p	Alp4p
AtGCP3 (At5g06680, 838aa)	Dgrip91	Xgrip109	GCP3	-	Alp6p
AtGCP4 (At3g53760, 745aa)	Dgrip75	Xgrip76	GCP4	-	GFh1p
AtGCP5 (At1g20570, 976aa)	Dgrip128	Xgrip133	GCP5	-	?
(At1g80260, 995aa)					
AtGCP6 (At3g43610, 1120aa)	Dgrip163	Xgrip210	GCP6	-	Alp16p
AtGCP-WD (At5g05970, 782aa)	Dgrip71WD	X-Nedd1	GCP-WD / NEDD1	-	?

Drosophila の γ チューブリンは γ -tubulin Small Complex(γ TuSC)と呼ばれる γ TuRC よりも小さい複合体を形成しており、さらに出芽酵母の Tub4p(γ チューブリン)複合体と相同性を示していた(Oegema et al., 1999)。 γ TuSC は 2 つの γ チューブリンと Dgrip91(出芽酵母では Spc98、ヒトでは hGCP3)、Dgrip84(出芽酵母では Spc97、ヒトでは hGCP2)で構成され、弱いながらも微小管形成活性を有していた(Oegema et al., 1999)。 γ TuSC は γ TuRC の構成因子であり、 γ TuSC 以外のタンパク質として Dgrip128、Dgrip163、Dgrip75、Dgp71WD が同定されている(Gunawardane et al., 2003)。動物細胞においても hGCP4、hGCP5、hGCP6、hGCP-WD が γ チューブリン複合体構成因子として単離、同定されている(Wiese and Zheng, 2006; Table 1)。

これらのタンパク質は γ TuRC の会合する際に、キャップのように働いて γ TuSC を会合すると考えられている(Gunawardane et al., 2003, Fig. 2)。 γ TuRC サブユニットは種を通して高度に保存されているだけでなく、少なくとも 1 つないし 2 つの保存された gamma ring protein(grip)モチーフを持つ。Grips の高度に保存された配列は、動物細胞での γ TuRC が進化的に保存された構造を持つこと

を示している (Gunawardane et al., 2000、Murphy et al., 2001、Gunawardane et al., 2003)。

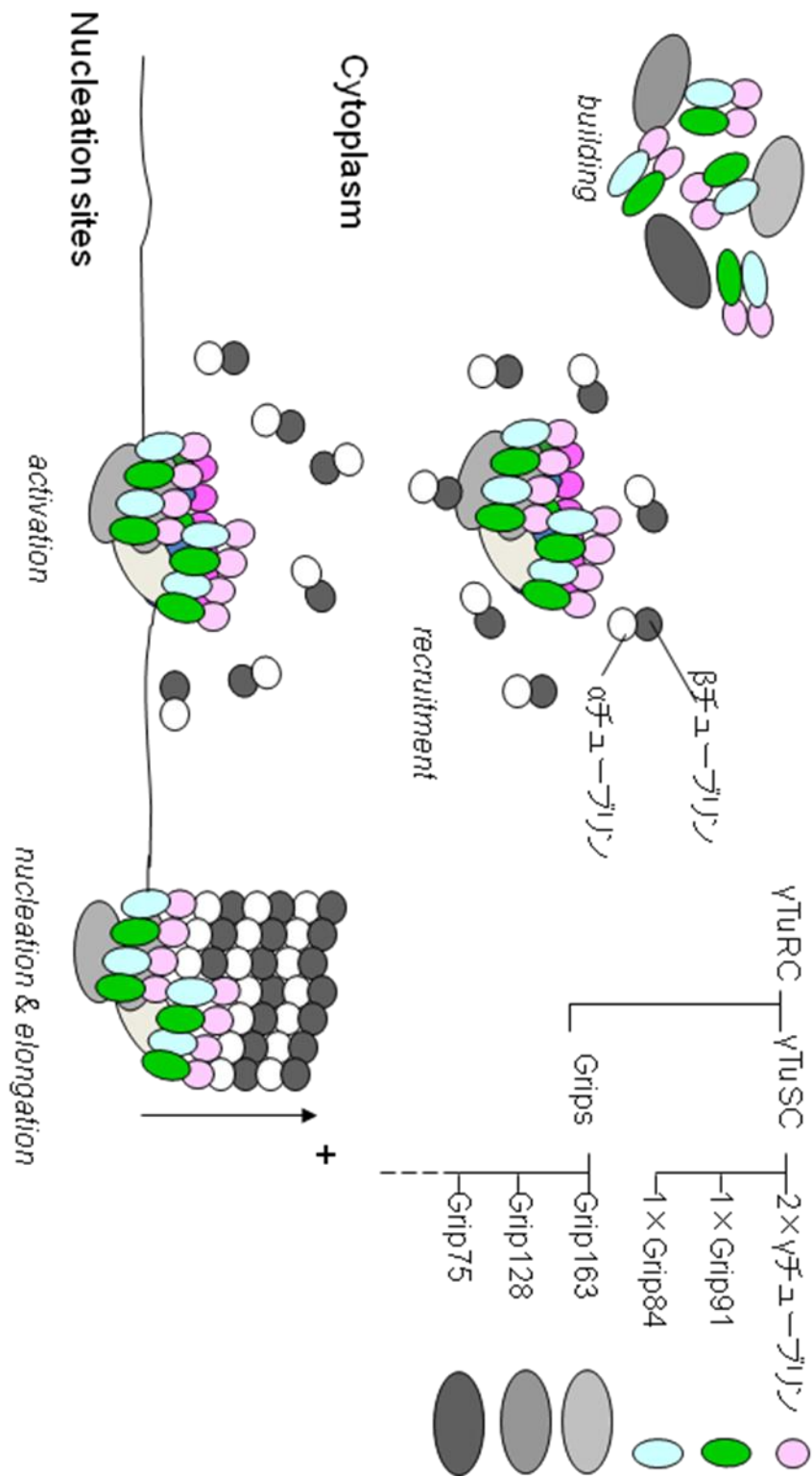


Figure 2. γ -TuRC と微小管形成のモデル

1-3. 植物細胞における微小管形成機構

植物細胞における微小管は細胞周期に沿って、その構造を再構成し、特徴的な間期表層微小管束、前期前微小管束、紡錘体微小管、隔膜形成体微小管を構築する。微小管構造の再構築には新規微小管の形成は欠かすことができない。間期表層微小管束は細胞の伸長方向の決定に、前期前微小管は細胞の分裂面の決定に、紡錘体微小管は染色体の分離に、隔膜形成体微小管は細胞板の形成に関与していると考えられ、動物細胞に比べてはるかに多様な構造変化を示す (Fig. 3; Wasteneys, 2002)。

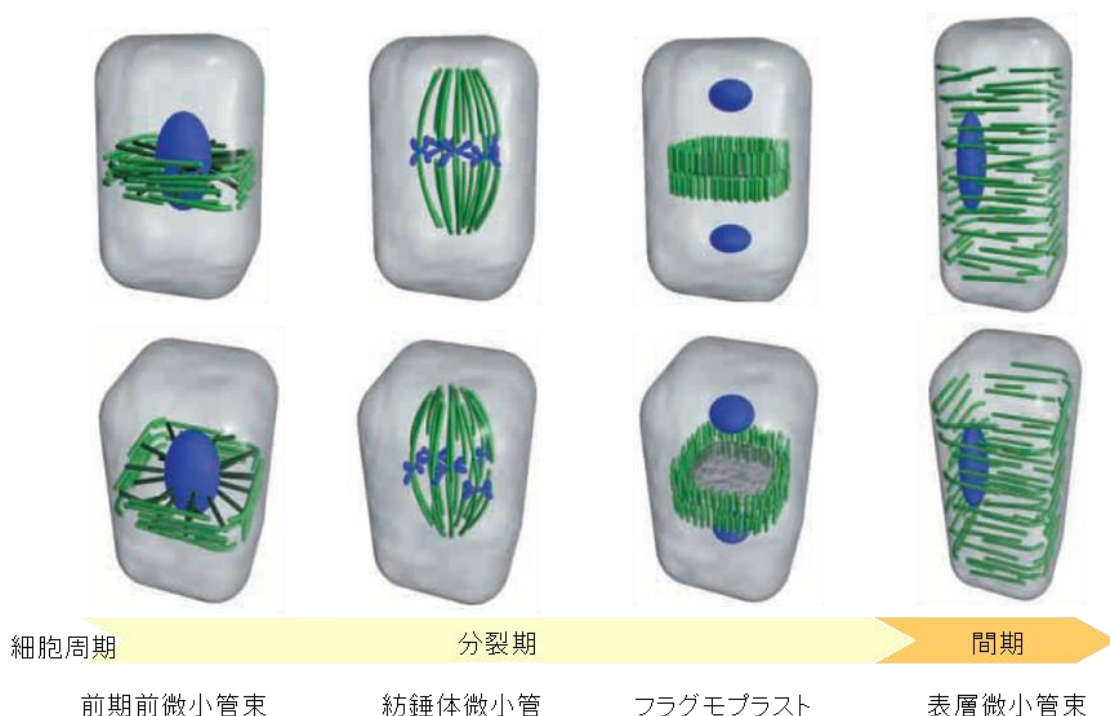


Figure 3. 細胞周期に沿って微小管は特徴的な構造に再構築される

植物細胞にも γ チューブリンが存在し (Liu et al., 1993)、ゲルろ過クロマトグラフィーの実験から γ チューブリンは大きさや性質の異なる複合体を形成していることが報告されている (Drykova et al., 2003)。シロイヌナズナの γ チューブリンをRNAiでノックダウンすると表層微小管の配向性が失われる (Binarova et al., 2006)。同様に、シロイヌナズナの2つの γ チューブリンの二重変異体において表層微小管の無秩序な配向や脱重合が観察されている (Pastuglia et al., 2006)。植物においても、 γ チューブリンは複合体を形成し微小管重合開始

に働いていると考えられている (Marc, 1997)。植物では γ チューブリン複合体がリング状構造をとっているかは観察されていない為、ここでは複合体構成因子を Grip ではなく、GCP と呼ぶことにする。シロイヌナズナでは AtGCP2 と AtGCP3 を含む γ チューブリン複合体が精製され、それらが植物細胞内で同じ複体内に存在することが示唆されている (Seltzer et al., 2007)。高等植物のゲノム上には動物 γ チューブリン複合体に知られている付随 GCP タンパク質のホモログが存在する (Pastuglia and Bouchez, 2007)。このことから植物の微小管形成重合核の基本組成が動物のものと類似していると考えられる。

タバコ培養細胞の研究から、G2 期の終わりや細胞分裂の直後に、微小管は核周辺から細胞表層に向かって伸長することが報告されており (Kumagai et al., 2001)、さらに単離した核から微小管が重合するため、重合核の形成が核表面で生じていると考えられている (Erhardt et al., 2002)。また、 γ チューブリンの局在からは微小管形成部位として、核膜表面のほか、細胞表層、フラグモプラストが考えられている (Lambert, 1993)。近年、シロイヌナズナやタバコ BY-2 培養細胞の間期細胞の微小管の動態観察の研究から、新しい微小管は細胞表層で形成されていることが確認された (Shaw et al., 2003, Chan et al., 2003)。

植物 γ チューブリン複合体の構成成分として同定された AtGCP3 (AtSpc98) は核膜や細胞表層に γ チューブリンと同様の分布が確認されている。また、植物からの精製核と神経微小管を用いた微小管形成反応において抗 γ チューブリンペプチド抗体と抗 AtGCP3 ペプチド抗体存在下では微小管の形成が阻害されたことから、ともに微小管形成に関わっていることが示唆されている (Erhardt et al., 2002)。よって、AtGCP3 と γ チューブリンを含む複合体は細胞周期間期の時期特異的に細胞質から核表面と細胞表層にリクルートされ、その活性は核表面と細胞表層に散在していると考えられる。また、間期の新しい微小管は既存の微小管から一定の角度を持って分岐するように形成し、その分岐点に γ チューブリンが局在していることが示されている (Murata et al., 2005)。細胞質中の γ チューブリン複合体が細胞質と表層微小管の間を往来し、既存の表層微小管に結合した時に微小管形成活性を持つと考えられる。これまでの結果からこのように推測されてはいるが、実際に微小管重合核を介した植物の微小管形成機構は未だ明確には示されていない。

1-4. セルロース微繊維と表層微小管束

植物細胞では細胞壁の力学的性質は異方性を持っており、反応の程度は力が加わる方向によって異なる。そして、成熟の過程においてその大きさや形態な

どを多様に変化させ、最終的にその機能に適した形を作り上げる。細胞の肥大は膨圧によって起こるが、それ自体に極性はなく、これらの現象はセルロース繊維の方向性によってもたらされるものである。細胞の伸長軸に対して直行するようにセルロース微繊維が並ぶことで横方向への伸長を制限する「たが」となり、伸長方向を規定すると考えられている (Fig. 4; Baskin, 2005)。新たに合成されたセルロース繊維が細胞壁内層に付加される際にどのようにしてその向きが決まるかは長く議論されてきている。組織学的な手法により、セルロース繊維と同じくして、伸長する細胞では特徴的に垂直な表層微小管を形成していることが示されている (Gunning and Hardham, 1982)。遺伝学的手法も多くとられており、多数の変異体が単離されている。中でも、セルロース繊維の配向がおかしくなり矮性な表現型を示す *fra2* 変異株では、微小管切断タンパク質であるカタニンの p60 サブユニットをコードする遺伝子に変異が起きており、表層微小管の配向に異常が見られる (Burk and Ye, 2002)。また、セルロース合成酵素は直接か間接的に微小管に結合し、その配向が微小管に依存するモデルが 1974 年 Brent Heath により提唱されており (Heath, 1974)、多くの教科書では、この仮説を用い、表層微小管の配向化機構がセルロース微繊維沈着の「ルール」として働いていると示唆している (Alberts et al., 2008)。近年、シロイヌナズナの胚軸で機能的に働く蛍光標識したセルロース合成酵素 (CESAs) の解析から、これらのセルロース合成酵素が同時に標識された微小管が規定する「ルール」に沿って細胞膜上を動くことが示された (Paredez et al., 2006)。このことから、表層微小管の配向が植物組織や器官のかたちを規定する上で非常に重要な因子であることが強く示唆される。

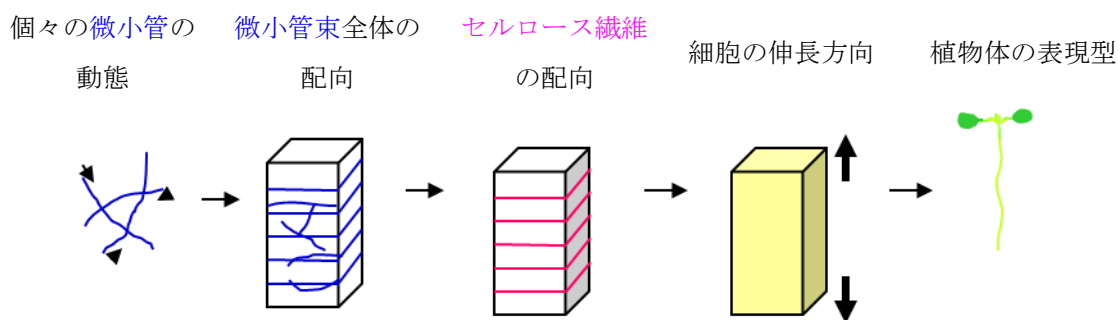


Figure 4. 表層微小管とセルロース微繊維と細胞の伸長方向

1-5. 表層微小管の配向化

表層での特徴的な配向パターンに微小管がどのように組織されるかは未だわからないところが多い (Ehrhardt and Shaw, 2006)。遺伝学的なスクリーニングによりシロイヌナズナの右や左へねじれる変異体のいくつかが単離され表層微小管の配向化が器官の伸長方向に重要であることが示されている (Ishida et al., 2007b)。これらのねじれ変異株には α や β チューブリンを変異させることによって起こっているものや (Thitamadee et al., 2002; Ishida et al., 2007a)、*SPR1* や *SPR2* などの微小管付随タンパク質の変異によって起こっているもの (Sedbrook et al., 2004; Nakajima et al., 2004; Shoji et al., 2004; Perrin et al., 2007; Korolev et al., 2007)、微小管を制御すると考えられる MAP キナーゼフォスファターゼ様タンパク質の変異によって起こっているものがある (Naoi and Hashimoto., 2004)。伸長軸に対して通常は垂直な微小管配向が、ねじれ変異株においてどのようにねじれ配向をとるかは正確にはよくわかっていないが、微小管の安定性やプラス端とマイナス端における微小管動態が適切な表層微小管構造を編成するために必要であると考えられている (Ishida et al., 2007b; Yao et al., 2008; Fig 4)。

細胞表層において新たに伸長を始めた微小管は、伸長が始まった形成部位から離れてトレッドミリングによって移動していくものもあれば繋がったままで伸長や短縮を繰り返すものもあるが、大部分の微小管は細胞内部には入り込まず細胞表層のほぼ平面といえる 2 次元の空間に存在している (Shaw et al., 2002; Dixit and Cyr, 2004)。このことから、微小管の動態に加え微小管同士の衝突や束化など個々の微小管同士の相互作用も表層微小管の配向形成に重要であると考えられている。

高等植物では、特徴的な微小管構造の構築のために、新しい微小管が中心体のような決まった形成中心の存在なしに重合開始されその特徴的な配向に編成される必要があるが、微小管形成機構の詳細は未だ理解されていない。本研究では、植物微小管重合核因子と考えられるシロイヌナズナ *AtGCP2* の変異株の解析や局在性を評価することで、植物微小管形成機構における *AtGCP2* の役割を明らかにし、微小管形成機構と表層微小管配向化の関係性に関する知見を得ることを目的とする。

2. 材料と方法

2-1. 植物体と生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) Wassilewskija (WS) エコタイプ *spr3* 変異株と T-DNA 挿入ライン (FLAG467F07, FLAG412F07) はそれぞれ ABRC (Columbus, OH, USA) と INRA (Versailles, France) から得られた。 *spr3* 変異株は劣勢変異株である (小宮修論, 2004; 中村修論, 2005)。

個々の微小管を観察するために、植物体には smRS-GFP (David and Vierstra, 1998) を N 末端に付加した α -チューブリン 6 (At5g12250) を CaMV35S プロモーターを用いて構成的に発現させた形質転換シロイヌナズナ GFP-TUB6 (エコタイプ WS) を用いた。

カタニン (At1g80350) 変異株は EMS 処理により得られた劣勢変異株である (LEHLE SEEDS, TX, USA)。

シロイヌナズナ 種子は 5% 次亜塩素酸ナトリウム、1% Triton-X100 溶液で 5 分間滅菌処理し、シロイヌナズナ培養用寒天培地 (2.5 mM KNO₃, 1.25 mM KPO₄, 1.0 mM Ca(NO₃)₂, 1.0 mM MgSO₄, 35 μ M Fe/EDTA, 7 μ M MnCl₂, 5 μ M NaCl, 0.5 μ M ZnSO₄, 0.25 μ M CuSO₄, 0.1 μ M NaMoO₄, 0.005 μ M CoCl₂, 1.5% (w/v) Agar, 2.0% (w/v) Sucrose) に播種した。2 日間、暗所 4°C で春化处理を行った後、23°C、長日条件 (明所 16 時間、暗所 8 時間) でプレートをほぼ垂直にして育成させた。また、必要に応じて、植物体は土 (サカタスーパーミックス A 2: 赤玉 1: パーライト小粒 0.5 マグアンプ K 少量) に植え替えて生育させた。

2-2. *SPR3* クローニングと相補試験

spr3 変異体 (Wassilewskija エコタイプ) と野生型 (Columbia エコタイプ) を交配した F₂ 世代をマッピングに用いた。*SPR3* 遺伝子座は Arabidopsis Information Resource Data Base (<http://www.arabidopsis.org>) から得られる DNA マーカーと新たに作成した DNA マーカーを使用してマッピングした。*SPR3* 遺伝子座の最も近傍の 2 つのマーカーを以下に示す。これらのマーカーを使用し、第 5 染色体の 30-kb の領域に絞った。この領域に含まれる 7 つの ORF をシーケンスにより確かめた。

Primer for	5' - TGAACCGAGTCCATTTACAGA -3'
T10B6	5' - TGAGACCTACGCAACCTTGT -3'
制限酵素	<i>Alu</i> I

primer for K3M16	5' - GCGAGTAGAAAGAAGATTTTGTGATC -3' ----- 5' - CAACTAGGAAACTAAATGACATAACCCA -3'
制限酵素	<i>Hinf</i> I

相補試験のためのコンストラクト作成には Invitrogen のプロトコールに従い Gateway 形質転換を行った (Appendix 1)。SPR3 ゲノム領域 (ATG コドンから 1058-bp 上流、すべてのエキソンとイントロン、ストップコドンから 1908-bp 下流を含む) と attB1 と attB2 領域を含むプライマー

Primer for first reaction	SPR3-g-F1: 5' -AAAAAGCAGGCTTCCGGGTCCGCGCATAATCC-3' ----- SPR3-g-R1: 5' -AGAAAGCTGGGTCCGGGCGCCGAGAAAAG-3'
primer for second reaction	AttB1: 5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3' ----- AttB2: 5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

を用いて BAC クローン T10B6 (ABRC) を polymerase chain reaction (PCR) で増幅しゲル精製 (QIAGEN) を行った。精製 DNA 断片を BP 反応により pDONR201 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に挿入しエントリークローンを作製した。エントリークローンをシークエンスによる確認の後、LR 反応により pGWB1 (島根大学の中川強博士に譲っていただいた destination vector; Nakagawa et al., 2007) に挿入し Genomic GCP2/pGWB1 プラスミドを精製した。形質転換には大腸菌 DH5 α 株を用いた。作成したバイナリーベクターは *Agrobacterium tumefaciens* MP90 に導入し、*spr3* 変異株、*atgcp2-1/+* 変異株に形質転換した。

2-3. 酵母菌株及び形質転換と酵母 Two-Hybrid 法

・DNA コンストラクト (Appendix 2)

AtGCP3 (At5g06880), AtGCP2 (At5g17410) の cDNA を GAL4 DNA Binding Domain (BD) をもつ Bait plasmid である pGBKT7 と GAL4 Activation Domain (AD) を持つ Prey prasmid である pGADT 7 に以下に示す基本的な分子生物学的手法でそれぞれ導入し、BD-AtGCP3, AD-AtGCP3, BD-AtGCP2, AD-AtGCP2 を作出した。*AtGCP2*cDNA は全長 cDNA U09204/pUNI51 (ABRC) を鋳型にして 5' 末端に *EcoR* I 制限酵素サイトを 3' 末端に *Sma* I 制限酵素サイトを付加し PCR を行った。*AtGCP3*cDNA は全長 cDNA U25017/pUNI51 (ABRC) を鋳型に 5' 末端に *Sma* I 制限酵素サイトを 3' 末端には *Bam*H I 制限酵素サイトを付加し PCR を行った。プライマーは以下に示す。

Primer for <i>AtGCP2</i> cDNA	5' -CGGAATTCATGGAATCAATGACGCCAAT-3' ----- 5' -TCCCCGGGCTATTCTTTCGAAACACCAAGG-3'
----------------------------------	---

Primer for <i>AtGCP3</i> cDNA	5' -TTCCCCGGGATGGAAGACGACGATCAGCA-3' ----- 5' -CGGGATCCCTTATCCTTTGGAATGCAATCG-3'
----------------------------------	--

PCR産物をそれぞれ適当な制限酵素 (*EcoR* I と *Sma* I (レッドライン)、もしくは *Sma* I と *Bam*H I (オレンジライン)) で切断し、同様 (レッドかオレンジ) の制限酵素で処理したベクター (pGBKT7、pGADT7) に挿入した。

spr3 変異型 *AtGCP2* cDNA は *AtGCP2* cDNA に変異を入れ調整した。

Primer for 変異型 <i>AtGCP2</i>	<i>spr3_d</i> : 5' -GGAAATATCTAAACGTTATGAGAGAATG- 3' ----- <i>spr3_u</i> : 5' -TTGTGGTCAATATTGTTGCAGCAATG- 3'
---------------------------------	---

そして *AtGCP2* と同様に BD-*AtGCP2* (G305R)、AD-*AtGCP2* (G305R) を作出した。PCR を用いて作出したコンストラクトはシーケンスにより確認した。

・Two-Hybrid 解析

Two-Hybrid 解析には AH109 (*MATa*, *ura3-52*, *his3-D200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*) 酵母菌株を用いた。酵母細胞の成長とプラスミドの選抜維持のために YPD 培地 (20 g/L Difco ペプトン, 10g/L 酵母エキストラクト, 2% グルコース) とロイシンとトリプトファンを含まない (-Lue, -Trp) 適切なアミノ酸を含む合成ドロップアウト (SD) 培地 (アミノ酸を含まない酵母窒素ベース (BD, Biosciences), 2% グルコース) をそれぞれ作製し使用した。ヒスチジンとアデニンによる選択のためにはロイシンとトリプトファンのほかヒスチジンとアデニンを含まない SD 培地 (-Lue, -Trp, -His, -Ade) を作製し用いた。酵母の形質転換は CLONTECH 社の Yeast Protocols Handbook に従い酢酸リチウム法により行った。

まず、AH109 酵母コンピテント細胞を作製した。直径 2~3 mm のコロニーをいくつか取り YPD 液体培地に懸濁し、250 rpm, 30°C で一晩振盪培養する。YPD 液体培地 150ml に一晩培養液を OD₆₀₀ が 0.2~0.3 になるように加え、230 rpm, 30 °C で約 3 時間振盪培養し OD₆₀₀ を 0.4~0.6 とする。細胞を 50ml ファルコンチューブに入れ、1000×g, 室温で 5 分間遠心し、細胞ペレットを滅菌 TE バッファー (pH7.5) で再懸濁した。再び 1000×g, 室温にて 5 分間遠心し、上清を捨て、ペレットを 1×TE/1×LiAc 1.5 ml に懸濁し完成。そして、作製したコンピテント細胞 0.1 ml、プラスミド DNA 0.5 μg、ニシン精子キャリアー DNA (和光純薬) 0.1 mg を 1.5 ml エッペンチューブに入れて混和し、滅菌 PEG/LiAc 溶液 (40% PEG4000, 1×TE バッファー, 1×LiAc) 0.6 ml を添加した。さらにボルテックスで 10 秒間高速で攪拌

混和した後、200 rpm, 30°Cで30分インキュベーションした。DMSO 70 μ lを添加したあと穏やかに転倒混和し42°Cで15分ヒートショックを与えた。そして細胞を氷上で2分間冷却した後、14000 rpmで5分間遠心し上清を破棄した。得たペレットを1×TEバッファー0.5 mlに懸濁、そのうちの0.1 mlを形質転換体を選択するSD寒天培地 (-Lue, -Trp) に塗布し培養した。ヒスチジンとアデニンによる選択は、コロニーを取り液体SD培地 (-Lue, -Trp) で一晚培養した後、SD培地 (-Leu, -Trp, -His, -Ade) に塗り培養した。

・ β ガラクトシダーゼ活性測定 (ONPG assay)

酵母形質転換体を 2ml の SD 培地 (-Lue, -Trp) で $OD_{600} = 1.0$ となるまで本培養する。1 ml を酵素液としてとりエッペンに分注する。集菌し上清をのぞき、1 ml の Z バッファー ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 22.2g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 5.9g, KCl 0.75g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.246g / 1 L, オートクレーブ後にメルカプトエタノール 2.7 ml を加える) で懸濁後、遠心で再び上清を捨てる。1 ml の Z バッファーに懸濁し、酵素液とする。28°Cのウォーターバスで 5 分間保温した後、すべてのエッペンのふたを開け、順にクロロホルムを加える。速やかに 0.1% SDS 70 μ l を加え、ボルテックスし、さらに 5 分間 28°Cのウォーターバスで保温する。10~15 秒間隔で 0.2 ml の ONPG 溶液 (O-nitrophenyl galactoside 4 mg / Z バッファー1 ml) を加え、ボルテックスの後 28°Cに保温する。黄色が着いてきたら 1M Na_2CO_3 を 0.5 ml 加え、反応を停止させる。10000 rpm で 10 分間遠心した後、上清を 1 ml とり OD_{420} を測定する。 β ガラクトシダーゼ活性 (unit / ml $\cdot OD_{600}$) = $OD_{420} \times 1000 / OD_{600} \times t$ (反応時間, min) $\times V$ (酵素液量, ml)。

2-4. 植物体の観察

寒天培地上で育てた植物体は Panasonic DMC-FX8 で撮影した。根の細胞層の観察は propidium iodide (PI; Sigma) によって行った。2 mg/ml を水で 300 倍に希釈シマウント液として使用し、560 nm フィルター、ヘリウムネオンレーザーを用いて共焦点レーザー顕微鏡 Eclipse E600 C1 (Nikon) で観察した。

走査型電子顕微鏡による胚軸細胞観察のために、レプリカ法を用いた (Furutani et al., 2000)。ビニルシリコン印像材用のトレイ接着材の Base 及び Catalyst (ExtrudeTM Wash; Keer Manufacturing Co., Romulus, U.S.A) を等量、スライドガラス上でよく混ぜ合わせた後、ペースト内に寒天プレートで発芽させた 4 日目の植物体胚軸を沈み込ませた。ペーストが固まったところで、植物体を取り除いた。気泡が入らないよう注意して混合した高性能エポキシ系

急速硬化接着剤 (Devcon ; ITW インダストリー株式会社) をネガのレプリカに流し込み、室温で 1 時間程度放置し固めた。次に固まったポジのレプリカを取り外し、蒸着装置 (日立イオンスパッターE-1010 ; 日立製作所) を用いてプラチナの蒸着を 5-10 分を行った。そして、レプリカを走査型電子顕微鏡 (SEM N3200 ; 日立製作所) で観察した。

2-5. シロイヌナズナ配偶体の観察

雌性配偶体の観察はChristensen et al. (1997) の方法に従って観察を行った。ステージ12c (花卉が萼片と同じかより長い時期で開花は起こっていない) の花器官から花卉、おしべ、萼片を除去し、めしべを摘出した。胚珠を固定するためにカッターでめしべに切れ目を入れ、室温で固定液 (4% glutaraldehyde, 12.5 mM cacodylate, pH 6.9) に2時間浸した。固定初めの30分は脱気状態で行った。固定後、20%、40%、60%、80%、100%エタノールに各10分間順次入れ替えた。サンプルを脱水処理の後、ベンジルアルコールと安息香酸ベンジルを1:2の割合にした混合液に浸けることで透明化させた。スライドグラスに移し、共焦点レーザー顕微鏡Nikon C1の488 nmレーザーを用いて、細胞質と核質、核からの自家蛍光により観察した。このとき細胞質と核質からの蛍光は穏やかだが、核からは強い蛍光を示す。また、液胞は蛍光を発しない。

雄性配偶体の解析を行うために、成熟した花粉を含んだ葯をスライドグラスに打ち付け花粉をスライドグラス上に載せた。DAPI 染色液 (0.1% Nonidet P-40, 10% DMSO, 50 mM PIPES (pH7.2), 5 mM EGTA (pH7.5), and 5 μ g/ml DAPI) (Schnurr et al., 2006) をスライドグラスのサンプル上に添加した後、カバーガラスで覆い、Nikon ECLIPSE E1000 顕微鏡と水銀ランプを用い観察した。*qrt* 変異株 (*qrt1-4*) は ABRC から入手した。

2-6. 微小管の観察

・免疫抗体染色法

根の表皮細胞における表層微小管の配向を見るために Whole mount 法 (Abe and Hashimoto, 2005) を少し改良して用い、微小管を染色した。4 日目もしくは 5 日目のシロイヌナズナ幼植物体を 1.5% (v/v) formaldehyde, 0.5% (v/v) glutaraldehyde を含む PEMT 溶液 (50 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM MgSO₄, 0.05% (v/v) Triton X-100, pH7.2) に 40 分浸して固定し、その後、PEMT 溶液で 10 分間 3 回洗浄を繰り返してから 0.05% (w/v) Pectolyase Y-23 (協和化成株式会社)

と 0.4 M mannitol を含む PEMT 溶液に入れて 30°C で 25 分間静置した。PEMT 溶液で 5 分間 3 回洗浄した後に -80°C の Methanol を加え -20°C に 10 分間静置してから PBS 溶液 (130 mM NaCl, 5.1 mM Na₂HPO₄, 1.6 mM KH₂PO₄, pH7.4) に 10 分間浸透させた。1 mg/ml NaBH₄ を加えた PBS 溶液に 13 分間入れてから洗浄液 (50 mM glycine, PBS 溶液) で 5 分間 2 回洗浄し、1% BSA を含む洗浄液に 30 分浸した。そして試料を二つ穴ホールスライドガラス (MATSUNAMI) に移し、洗浄液で 500 倍希釈した一次抗体の抗 α -tubulin 抗体 YL1/2 (Abcam, Cambridge, UK) と一晩 30°C で反応させた。次いで、幼植物体を洗浄液で 10 分間 3 回洗浄し、洗浄液で 100 倍希釈した二次抗体の Alexa Fluor 568-conjugated 抗ラット IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) と 2 時間 37°C で反応させた。二次抗体と反応させた後、PBS 溶液で 10 分間 3 回洗浄しスライドガラスに Mount 溶液 (0.1% (w/v) phenylenediamine, 50% (v/v) グリセロール, pH9.0-9.5) で固定し、共焦点レーザー顕微鏡 Eclipse E600 C1 (Nikon) で表層微小管を観察した。

表層微小管の配向角度の測定には ImageJ version 1.4 (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) を用いた。配向の傾きは細胞の伸長方向を軸とし、左肩上がりの配向を -90 度から 0 度、右肩上がりの配向を 0 度から 90 度として測定した。

・植物生細胞での微小管動態の観察

表層微小管の動態を観察するための試料として、明所条件で播種後 4 日目の植物体の胚軸上部を切り取り 2 つ穴ホールスライドガラスに両面テープを用いて胚軸を固定したものを用いた。共焦点スキャナユニット CSU10 (横河電機) を搭載した LEICA DMRE 顕微鏡 (Leica)、488 nm アルゴンイオンレーザー (Omnichrome, CA, USA)、Metamorph ソフトウェア (Universal Imaging, Brandywine, PA) を用い、4 秒間隔で 4 分間または 6 分間動画を撮影した。

個々の微小管の動態は Scion Image software (www.scioncorp.com) を用いて画像上の微小管の端を追うことにより測定した。それぞれの微小管動態を 3 回測定し平均を数値とした。得られたデータは Excel (Microsoft, Redmond, WA) に移してから適切な処理を行い、ライフヒストリープロットを描いた。伸長速度と収縮速度は位置座標から求め、停止状態は 12 秒以上伸長や収縮が起こらない場合と定義づけた。カタストロフ頻度は微小管の伸長していた時間の平均の逆数から、レスキュー頻度は微小管の収縮していた時間の平均の逆数からそれぞれ求めた (Dhonukshe et al., 2003; Nakamura et al., 2004)。

2-7. AtGCP2 と微小管の動態観察

・植物体と生育条件

AtGCP2 の細胞内二色同時ライブイメージングを行うために、mCherry-TUB6 シロイヌナズナ形質転換体と Genomic GCP2-3GFP シロイヌナズナ形質転換体を作成し、交配した。Cherry-TUB6 形質転換体には CaMV35S プロモーター制御下に mCherry (Shaner et al., 2004) を N 末に付加したチューブリン 6 (At5g12250) コンストラクトを用いた。PCR により mCherry の 5' 側に *Bam*HI、3' 側に *Nae*I を付加しそれらの制限酵素を利用し、GFP-TUB6 の GFP を mChery に置き換えた。

Primer for	mCherry-fBam:5' -acggatccATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'
mCherry	mCherry-rSma: 5' -ggggccggcCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'

AtGCP2-3GFP や *spr3* 変異型 AtGCP2-3GFP コンストラクトは上述の AtGCP2 のゲノム領域を含むエンターベクターを元に作成した。それぞれ下記のプライマーと上述のプライマーを用い、PCR によって配列付加 (制限酵素サイト; *Not*I, *Kpn*I) や配列置換 (305 番目のグリシン (GGG) をアラニン (AGG) へ) を行った。そして PCR 産物を TA クローニングにより pGEM-T easy ベクター (Promega) に導入するかセルフライゲーションをした。PCR には KOD-plus (TOYOBO) を使用し 94°C15 秒、55°C30 秒、68°C7 分の温度設定で行った。ライゲーションには DNA Ligation Kit (TAKARA) を使用した。

Primer for	GCP2gns-rKpn:5' -cggtaccTTCTTTCGAAACACCAAGGATCC-3'
配列付加	GCP2Ter-fNot: 5' -agcggccgcGAGGTGAGACTTAACTAAACAAA-3'

3GFP は smRSGFP をタンデムにつなげることで作成した (Appendix 3)。5' 側に *Sma*I サイト、3' 側に *Nae*I サイトを持つ smRS-GFP を pGEM-T easy 上に組み込み、*Sma*I と *Nae*I で切断したフラグメントを *Nae*I のみで切断した smRS-GFP ベクターに挿入した。これを繰り返しタンデムな GFP を作成した。5' 側に *Kpn*I サイト 3' 側に *Not*I サイトを付加し、それを利用して AtGCP2 ゲノムに導入し AtGCP2-3GFP/エンターベクターを作成した (Appendix 4)。シークエンスによる配列確認の後、LR 反応により pGWB1 に挿入し Genomic GCP2-3GFP/pGWB1 及び *spr3* 型 Genomic GCP2-3GFP/pGWB1 プラスミドを精製した。

Primer for	GFP-fSma1:5' -aaccgggatgagtaaaggagaagaacttttcac-3'
3GFP _1	GFP-rNae1: 5' -ggggccggcCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
primer for	GFP-fKpn1: 5' -AGGTACCatgagtaaaggagaagaactttt-3'
3GFP _2	GFP-rNot1: 5' -GCGGCCGcTtattttgtatagttcatccatgcc-3'

種子は滅菌し、2 日間暗所 4°C で春化处理を行った後、1%寒天培地 (ムラシゲスクーグ培地、pH5.6) に播種した。プレートはアルミホイルで包み、ほぼ垂直に立て、21°C で 3 日間もしくは 4 日間育成した。

・顕微鏡観察

播種後 3 日か 4 日後の幼植物体を 24×60 と 22×22 のカバーガラスの間に入れ少量の水を入れグリースで密封した。共焦点スキヤニングヘッド CSU-X (横河電機) を搭載したライカ DMI6000B 顕微鏡を用い暗所胚軸を観察し、撮影した。顕微鏡は Stanford 大学の David Ehrhardt 博士の研究室の装置を使用させていただいた。GFP タンパク質の励起に 491 nm 半導体励起固体レーザー (Cobolt Clypso 491 nm) と mCherry タンパク質励起に 561 nm 半導体励起固体レーザー (Cobolt Jive 561 nm) を使用し、画像は EM-CCD カメラ (QuantEM:512SC, PHOTOMETRICS) により取得した。画像解析にはイメージングソフトウェア Slidebook (Intelligent Imaging Innovations, Inc) と ImageJ を使用した。タイムラプス画像は 5 秒間隔で 6 分から 9 分間撮影した。得られたデータは Excel 上で適切な処理を行った。キモグラフ作成には ImageJ のプラグイン (http://www.embl.de/eamnet/html/body_kymograph.html) を使用した。

・薬剤処理

3 日間か 4 日間、暗所で育てた幼植物体全をグリースで密封された 24×60 と 22×22 のカバーガラスの間に入れ、20 μ M のオリザリンで 8 時間か 22 時間処理した。

3. 結果

3-1. シロイヌナズナ新規右巻き変異株 *spiral3* (*spr3*)

当研究室では植物の形態形成、特に伸長方向性の決定を理解するために、ねじれて伸長するシロイヌナズナ変異株を多数単離し、解析を行っている。その一連の流れの中で Wassilewskija エコタイプの右巻き変異株シロイヌナズナ *spiral3* (*spr3*) が単離された (小宮修論, 2004; 中村修論, 2005)。シロイヌナズナの幼植物体を立てたプレートの硬い寒天培地 (1.5%) 上で育てると、野生型の根は重力方向に下に成長するが、*spr3* 変異株の根はプレート上で強く右に向かって伸長した。野生型の子葉は真っすぐに広がるが、*spr3* 変異株の子葉は上から見ると反時計回りにねじれて見えた。同じような反時計回りの表現型は *spr3* 変異株の花弁でも見られた。野生型の暗所胚軸や根の表皮細胞の細胞列は組織の伸長軸に対して真っ直ぐに並んでいるが、*spr3* 変異株では右まきのねじれを示した (Fig. 5)。

伸長する器官のねじれる表現型の他、トライコームや葉の表皮細胞の形態に異常が観察された (Fig. 6)。発芽後 14 日目の野生型植物本葉のトライコーム ($n = 389$) は主に 3 つ (63.5%) と 2 つ (35.5%) に分岐していた。一方で *spr3* 変異株の本葉では、トライコーム ($n = 419$) は 3 つに分岐するもの (0.4%) も観察されたが、主に 2 つに分岐しているものが多かった (95.9%)。針のような枝分かれしないトライコームも観察された (3.6%) (Fig. 6AB)。トライコームの分枝数の減少はこれまでチューブリンの変異株 *lefty* の解析で報告されている (Abe et al., 2004)。また、微小管重合阻害剤を処理した野生型幼植物体でも見られている (Mathur and Chua, 2000)。

シロイヌナズナの葉の表皮細胞はジグソーパズル様の特徴的な形態を示す。入り組んだふくらみとへこみからなる。表皮細胞ステージ II において、*spr3* 変異株の細胞はふくらみの外への広がりが抑えられているようであった (Fig. 6D)。細胞形態の複雑さを円形値で表した (Le et al., 2006)。 $1.0 (4 \times \text{area} / \text{perimeters}^2)$ は完全な円形を表し、複雑さが増えていくと値は小さくなる。野生型葉の表皮細胞の円形値は 0.16 ± 0.03 で、*spr3* 変異株の葉の表皮細胞の円形値は 0.38 ± 0.07 であった。これは *spr3* 変異株の葉の表皮細胞が野生型に比べて入り組みが緩くなったことを示唆している。*spr3* 変異株では細胞の伸長の方向性、トライコームの分枝数そして葉の表皮細胞の形態と微小管の働きが示唆される部位において異常が観察された。

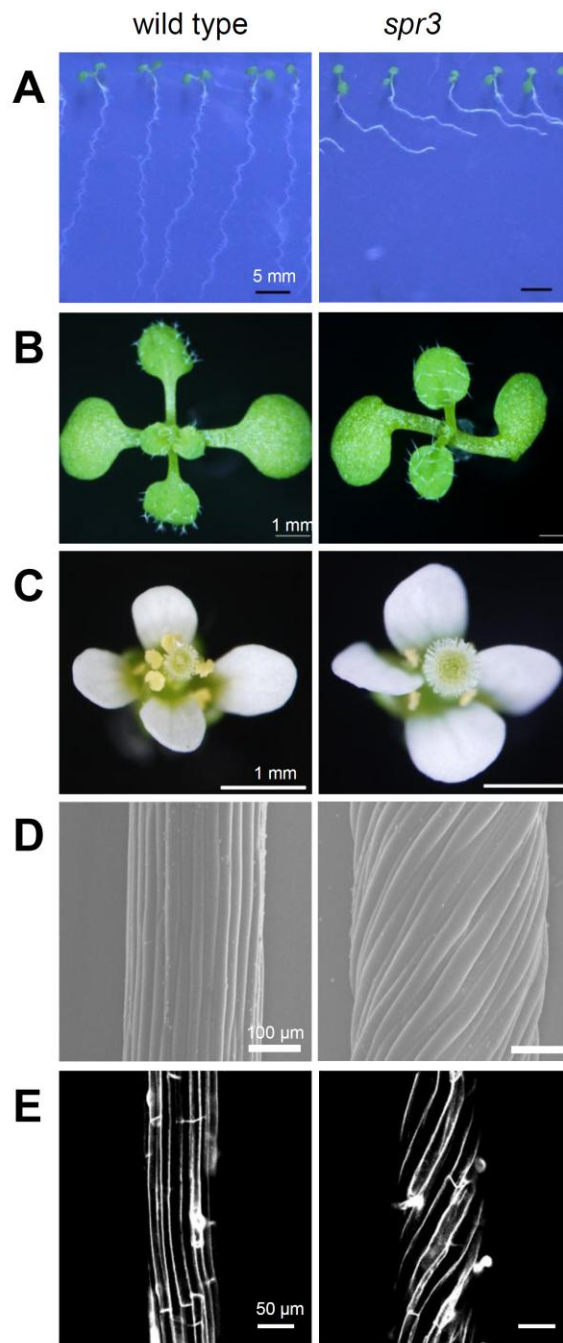


Figure 5. *spr3* 変異株の右巻きにねじれる表現型

野生型は左側、*spr3* 変異株は右側に示す。(A) 播種後 7 日目の幼植物体。(B) 10 日齢の葉柄。(C) 播種後約 4 週間の花卉。(D) 播種後 4 日齢の暗所胚軸。電子顕微鏡写真を示す。(E) pI で染色した 7 日齢の根の表皮細胞。

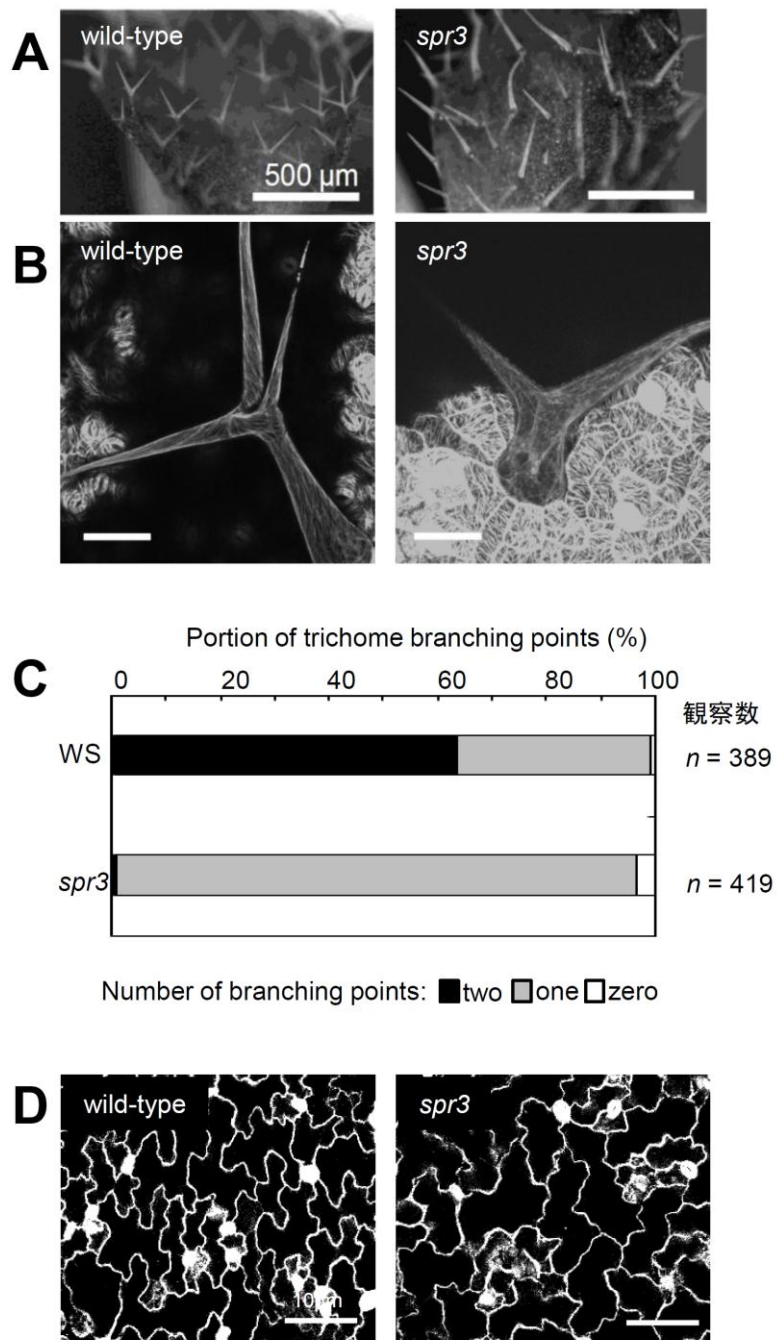


Figure 6. *spr3*変異株におけるトライコームと葉の表皮細胞の変化

(A) 本葉のトライコーム。(B) 本葉のトライコームの拡大図。GFP-TUB6 マーカーを含む野生型と *spr3*変異株を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(C) 野生型と *spr3*変異株におけるトライコームの分岐数の分布。(D) 第3の本葉の表皮細胞。GFP-TUB6 マーカーを含む野生型と *spr3*変異株を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3-2. *spr3*変異株における表層微小管

変異株の形態観察から *SPR3* と微小管配向に関係性があることが示唆されたので、次に表層微小管の配向を解析した。根の伸長領域における表層微小管を抗 α チューブリン抗体で免疫染色を行い観察した。すると、野生型の表層微小管は伸長軸に対して垂直に配向しているのに対し、*spr3* 変異株での表層微小管は左肩上がりに配向していることが観察された (Fig. 7A)。微小管の配向角度を定量すると、*spr3* 変異株の微小管は野生型に比べて平均で 11° 左肩上がりに配向していた (Fig. 7B)。

葉の表皮細胞の表層微小管の配向を GFP により微小管を標識した GFP-TUB6 形質転換体をマーカーとして発現する植物体を用いて観察した。野生型の葉の発生ステージ II では表皮細胞列はジグソーパズルのような形を形成し、横方向に並んだ表層微小管は細胞のへこんだ部位にのみ観察される (Fu et al., 2002)。*spr3* 変異株の葉の表皮細胞では太く並列した表層微小管が観察された (Fig. 7CD)。

3-3. *spr3*変異株の原因遺伝子

マップベースのクローニング法により *SPR3* 遺伝子を同定した。*SPR3* 遺伝子座は第 5 染色体北側にある BAC クローン T10B6 内 7 遺伝子が存在する 30kb に位置した。シーケンスの結果、At5g17410 の 10 番目のエキソンの G が A に置換していた。At5g17410 は γ チューブリン複合体の構成因子 GCP2 ホモログをコードしていた (Fig. 8A)。 γ チューブリン複合体の構成因子はそれぞれ保存された領域を 2 つ、もしくは 1 つ保持しており、N 末からグリップモチーフ 1、グリップモチーフ 2 と呼ばれている。機能は不明であるが、グリップモチーフは真核生物で高度に保存されており、*spr3* 変異は保存された Grip モチーフ 1 の高度に保存された 305 番目のアミノ酸グリシンがアルギニンに置換していた (Fig. 8B, 9A.)。野生型 *AtGCP2* のゲノム領域 8.7 kb を *spr3* 変異株に導入すると特徴的なねじれる表現型を含む異方性の伸長は相補された (Fig. 9B)。それゆえ、*spr3* 変異株の表現型の原因は 305 番目のグリシンのアルギニンへの一アミノ酸置換によるものだと考えられた。

タンパク質レベルでの *spr3* 変異の影響を調べるために、酵母 2 ハイブリッド法を用い、AtGCP2 と γ チューブリン複合体のもう一つの構成因子である AtGCP3 との相互作用を試験した。野生型の AtGCP2 に GAL4DNA 結合ドメインを付加したタンパク質と GAL4 転写活性ドメインを付加した AtGCP3 を核内で発現させたとき、相互作用したため選択培地で成長し、 β ガラクトシダーゼ活性を示した。一

方で、G305R 置換した *spr3* 変異型 AtGCP2 と野生型 AtGCP3 は選択培地で成長がわるく、 β ガラクトシダーゼの活性を著しく下げた (Fig. 9C)。このように、酵母実験から AtGCP2 の G305R 変異は AtGCP3 との相互作用をかなり弱めさせたことが示唆された。

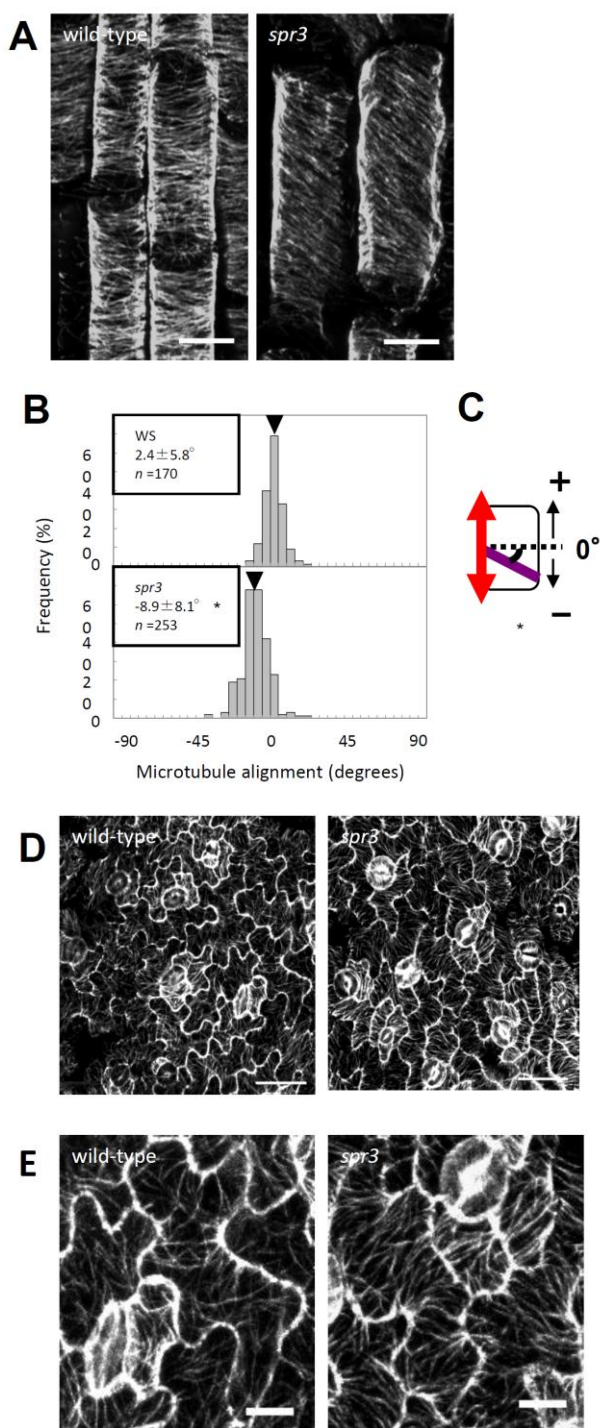


Figure 7. *spr3*変異株における表層微小管の配向

(A) 表層微小管の配向。野生型と *spr3* 変異株の播種後4日目の根の表に細胞を抗 α チューブリン抗体による免疫染色法で観察した。(B) 表層微小管の角度を計測しヒストグラムで表す。微小管微小管配向角度の平均値と計測微小管の本数(n)をグラフ上に記す。矢尻は平均を示す。*は野生型にくらべて統計学的に有意な差であることを示す (t -test; $p < 0.05$)

(C) 表層微小管の角度の測定方法。長軸方向 (赤矢印) に対して垂直を 0° として微小管角度を測定。プラスは右巻きの配向とし、マイナスは左巻きの配向とした。(D) 野生型と *spr3* 変異株の第三本葉の成長ステージIIの表層微小管。GFP-TUB6形質転換体微小管標識マーカーを用い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(E) (D)の拡大図。

Scale Bar; 10 μm in (A) and (D), 30 μm in (E)

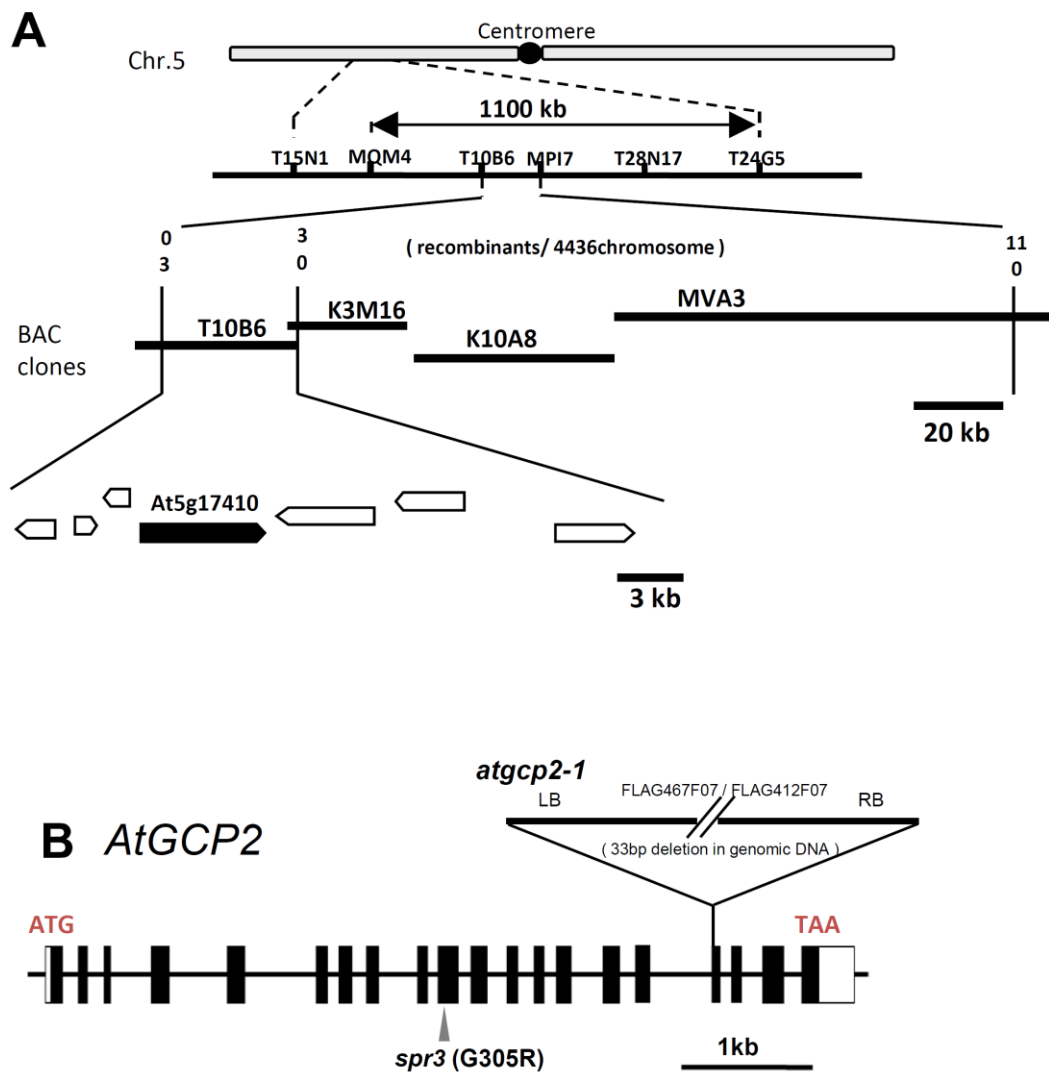


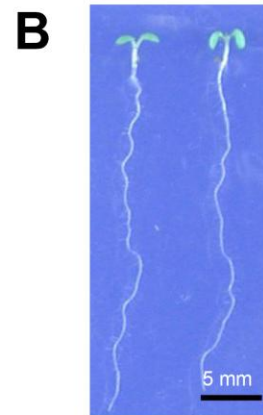
Figure 8. *SPR3* 遺伝子の同定

(A) *spr3* 変異株のマッピングの結果、*SPR3* 遺伝子座は第 5 染色体北側にある BAC クローン T10B6 と K3M16 の間に含まれていた。シークエンスの結果、At5g17410 に変異が見つかった。

(B) AtGCP2 のゲノム領域。黒と白のボックスはそれぞれコーディングとノンコーディングのエキソンを示す。AtGCP2 遺伝子は 21 個のエキソンからなる約 6.8kb の遺伝子で 678 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている。*spr3* 変異株は第 10 エキソンに一塩基置換が起こり、305 番目のグリシンがアルギニンに変わっていた。ノックアウト変異株 *atgcp2-1* の T-DNA 挿入位置も共に示す。

A Grip motif 1

AtGCP2	219	G	D	N	S	V	R	S	L	L	E	K	M	T	E	C	A	S	N	A	Y	L	S	I	L	E	R	W	V	Y	E	G	I	D	D	P	Y	G	E	F	F	I	A	E	N	R	S	L	K	K	E	S	L	S	Q	D	---	274		
OsGCP2	222	G	D	S	A	V	R	S	L	L	E	K	M	T	E	C	A	S	A	A	Y	L	R	M	L	E	R	W	V	Y	E	G	I	D	D	P	Y	G	E	F	F	I	A	E	N	K	S	L	K	E	S	L	T	Q	D	---	277			
XGCP2	367	G	D	S	Q	A	Q	E	L	C	L	Y	L	T	K	A	A	S	A	P	F	D	I	L	E	R	W	I	Y	R	G	I	I	N	D	P	Y	S	E	F	M	V	E	E	H	-	E	L	Q	K	E	K	I	Q	E	D	---	421		
HGCP2	368	G	D	S	Q	A	Q	E	L	C	L	Y	L	T	K	A	A	S	A	P	F	E	V	L	E	K	W	I	Y	R	G	I	I	N	D	P	Y	S	E	F	M	V	E	E	H	-	E	L	R	K	E	R	I	Q	E	D	---	422		
Dgr ip84	356	G	N	K	D	A	Q	Q	L	I	I	G	L	V	R	K	A	A	K	P	M	R	M	L	Q	M	N	I	Q	K	G	V	I	V	D	R	H	R	E	F	L	V	D	N	E	V	I	H	R	D	E	L	P	E	H	---	411			
SpAip4	271	G	D	P	V	A	R	K	I	L	T	Y	L	L	R	E	A	S	R	P	T	K	M	L	N	E	W	I	H	L	G	L	V	N	D	P	Y	D	E	F	M	I	K	I	H	K	G	I	T	S	M	Q	L	D	E	D	---	326		
ScSPC97	262	G	D	R	S	S	V	M	F	L	K	L	N	N	I	S	D	N	C	T	M	L	Y	E	W	L	T	G	I	L	N	D	P	Y	Q	E	F	M	T	Y	D	D	L	E	G	K	T	D	N	I	F	O	T	R	D	---	317			
AtGCP2	275	---	S	T	A	K	W	S	Q	R	Y	S	L	K	D	T	-	I	P	G	F	L	A	N	A	A	T	I	L	T	T	G	K	Y	L	N	V	M	R	E	C	G	-	H	N	V	Q	V	P	I	S	E	R	S	---	326				
OsGCP2	278	---	Y	D	A	K	W	Q	R	Y	S	L	K	D	G	-	I	P	S	F	L	N	V	A	A	T	I	L	T	T	G	K	Y	L	N	V	M	R	E	C	E	-	Y	T	V	Q	V	P	L	S	E	S	S	---	329					
XGCP2	422	---	Y	N	D	K	W	D	Q	R	Y	T	I	V	Q	Q	I	P	S	F	L	Q	K	V	A	D	K	I	L	S	T	G	K	Y	L	N	V	M	R	E	C	G	-	H	D	V	T	C	P	D	A	K	---	472						
HGCP2	423	---	Y	N	D	K	W	D	Q	R	Y	T	I	V	Q	Q	I	P	S	F	L	Q	K	M	A	D	K	I	L	S	T	G	K	Y	L	N	V	M	R	E	C	G	-	H	D	V	T	C	P	V	A	K	---	473						
Dgr ip84	412	---	Y	S	D	D	W	E	R	R	Y	T	L	R	D	E	Q	I	P	S	F	L	A	K	Y	S	D	K	I	L	R	T	G	K	Y	L	N	V	I	R	Q	G	-	K	R	V	M	P	T	O	E	M	N	---	463					
SpAip4	327	---	Y	T	D	E	W	E	K	R	Y	V	I	R	E	D	O	V	P	P	Q	L	L	D	L	Q	N	K	V	L	F	A	G	K	Y	L	N	V	L	E	C	R	-	K	G	V	N	L	A	S	L	N	A	K	D	O	T	Q	---	384
ScSPC97	318	R	A	W	T	Q	M	F	I	R	K	D	V	L	L	R	D	C	D	S	E	E	D	K	N	L	L	F	K	M	E	R	T	G	I	L	K	V	R	A	S	L	-	Q	I	P	T	I	P	S	N	S	D	I	T	I	Q	E	---	377



C

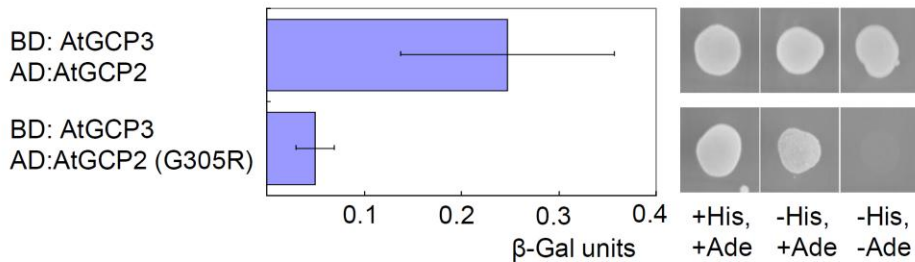


Figure 9. *spr3*変異は保存されたアミノ酸置換によるものであった

(A) 様々な生物種における *AtGCP2* オーソログの Grip モチーフ 1 のアミノ酸シーケンスアライメントを示す。*spr3* 変異株では矢印で示された保存された 305 番目のグリシンがアルギニンに置換していた。*At*; *Arabidopsis thaliana*, *Os*; *Oryza sativa*, *X*; *Xenopus*, *H*; *Human*, *D*; *Drosophila*, *Sp*; *Saccharomyces pombe*, *Sc*; *Saccharomyces cerevisiae*。シーケンスアライメントは ClustalW program によって得られた (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)。すべてに保存された塩基をオレンジのボックスで、5か6の塩基が保存されている場合を黄色のボックスで示す。(C) 酵母 2 ハイブリッド法による *AtGCP2* と *AtGCP3* の相互作用解析。ベータガラクトシダーゼ活性は酵母半定量的 ONPG アッセイキット (Clontech, USA) を用い、7 回の独立試行により測定した。BD; GAL4 DNA 結合ドメインを融合したコンストラクト、AD; GAL4 活性化ドメインを融合したコンストラクト。図右はヒスチジン (His) やアデニン (Ade) の存在、非存在による選択培地での酵母の成長具合を示す。

3-4. *spr3*細胞での微小管形成の頻度と微小管動態

AtGCP2の *spr3*変異は微小管形成の機能をおかしくさせるかもしれないと考えられたため、野生型と *spr3* 変異株の細胞で微小管形成頻度を測定し比較した。微小管を可視化するために GFP-TUB6 形質転換体を用いた。二つの独立した解析により、角度をもった微小管形成の頻度を評価した。解析 1 では、微小管形成を胚軸細胞の任意の 400 μm^2 領域で 4 分間観測した。微小管形成頻度は約 1.3 events / min / 400 μm^2 と野生型細胞と *spr3* 変異株細胞であまり変化はなかった。別の解析 2 では、表層微小管密度が形成頻度に影響するかもしれないので、胚軸細胞の既存の表層微小管の長さ当たりの形成数を数えた。計測された頻度は 0.002 events / min / μm とコントロールと *spr3* 変異株で差はなかった (Fig. 10B)。このことから、*spr3* 変異は微小管形成効率にはほとんど影響がないと考えられた。

次に、微小管標識形質転換体 GFP-TUB6 を用いて微小管動態を解析した。表層微小管の動的不安定性のパラメーターをコントロールの微小管標識 GFP-TUB6 マーカー株と *spr3* 変異株、そして *spr3* 変異株に AtGCP2 を含むゲノム領域を導入し、表現型を相補した株の胚軸細胞からそれぞれ観察し評価した。取得した画像から個々の微小管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。その後、長さが増加している「伸長」、減少している「短縮」、長さが変化していない「停止」(今回は 4 秒間以上 1 μm / min 以上動かなかった時を「停止」と定義した。)と定義して、微小管の動態を評価するパラメーター(伸長・収縮速度及びカタストロフとレスキューの頻度、微小管の伸長、短縮、停止の時間占有率)を求め、Table 2 に示した。リーディング端では、コントロールと *spr3* 変異株、*spr3* 変異株と AtGCP2 / *spr3* 変異株で大きな違いはなかった。*spr3* 変異細胞の伸長速度はコントロールや GenomicAtGCP2 / *spr3* に比べ 19-20%減少していた。ラギング端では *spr3* 変異株でレスキュー頻度が 0.119 ± 0.090 events / second とコントロールの 0.058 ± 0.050 events / second や GenomicAtGCP2 / *spr3* 細胞での 0.077 ± 0.054 events / second に比べてわずかだが有意に増加していた。そして、*spr3* 細胞の微小管マイナス端はコントロールや GenomicAtGCP2 / *spr3* 細胞に比べて収縮の占有時間が減少し停滞の占有時間が増加していた。*spr3* 変異株のマイナス端はコントロールより幾分か短縮をとめ、プラス端の伸長速度を減少させた。

Table 2. Effects of *spr3* mutation on parameters of microtubule dynamic instability in the GFP:TUB6 transgenic background.

		Wild-type (<i>n</i> = 72)	<i>spr3</i> (<i>n</i> = 59)	GenomicAtGCP2/ <i>spr3</i> (<i>n</i> = 61)
Dynamic Parameters				
Leading end				
Growth rate ($\mu\text{m}/\text{min}$)		5.85 \pm 2.91	4.68 \pm 2.56*	5.77 \pm 3.06
Shrinkage rate ($\mu\text{m}/\text{min}$)		12.00 \pm 10.07	12.25 \pm 12.41	10.35 \pm 9.92
Catastrophe frequency (events/s)		0.019 \pm 0.013	0.020 \pm 0.014	0.022 \pm 0.014
Rescue frequency (events/s)		0.073 \pm 0.061	0.105 \pm 0.779	0.077 \pm 0.057
Time spent	growth	77.2%	75.2%	73.7%
	Pause	7.5%	10.0%	10.5%
	Shrinkage	15.4%	14.8%	15.8%

Lagging end				
Growth rate ($\mu\text{m}/\text{min}$)		1.20 \pm 0.18	1.48 \pm 0.54	2.00 \pm 1.01
Shrinkage rate ($\mu\text{m}/\text{min}$)		4.72 \pm 5.22	4.83 \pm 5.77	3.72 \pm 5.42
Catastrophe frequency (events/s)		0.208 \pm 0.072	0.188 \pm 0.068	0.236 \pm 0.041
Rescue frequency (events/s)		0.058 \pm 0.050	0.119 \pm 0.090*	0.077 \pm 0.054
Time spent	growth	0.1%	1.4%	0.5%
	Pause	67.4%	80.4%	76.3%
	Shrinkage	32.4%	18.2%	23.3%

GenomicGCP2/*spr3* represents plants in which *spr3* phenotypes are rescued by AtGCP2 genomic region constructs.

Values are the mean \pm SD.

* statistically significant difference from both Wild-type plants and GenomicAtGCP2/*spr3* plants (*t*-test; $p < 0.01$)

3-5. 表層微小管形成角度

微小管形成の観察を注意深くしていくと、野生型細胞ではしっかりと制御されているはずの微小管形成角度が *spr3* 細胞では変化していることに気付いた。GFP-TUB6 を発現するコントロールの胚軸や葉の表皮細胞では、表層微小管は約 40° の角度をもって既存の微小管の側面から伸長する。*spr3* 細胞では微小管の形成角度は標準偏差 (SD) 値が示すようにより広く分散して分布しており、コ

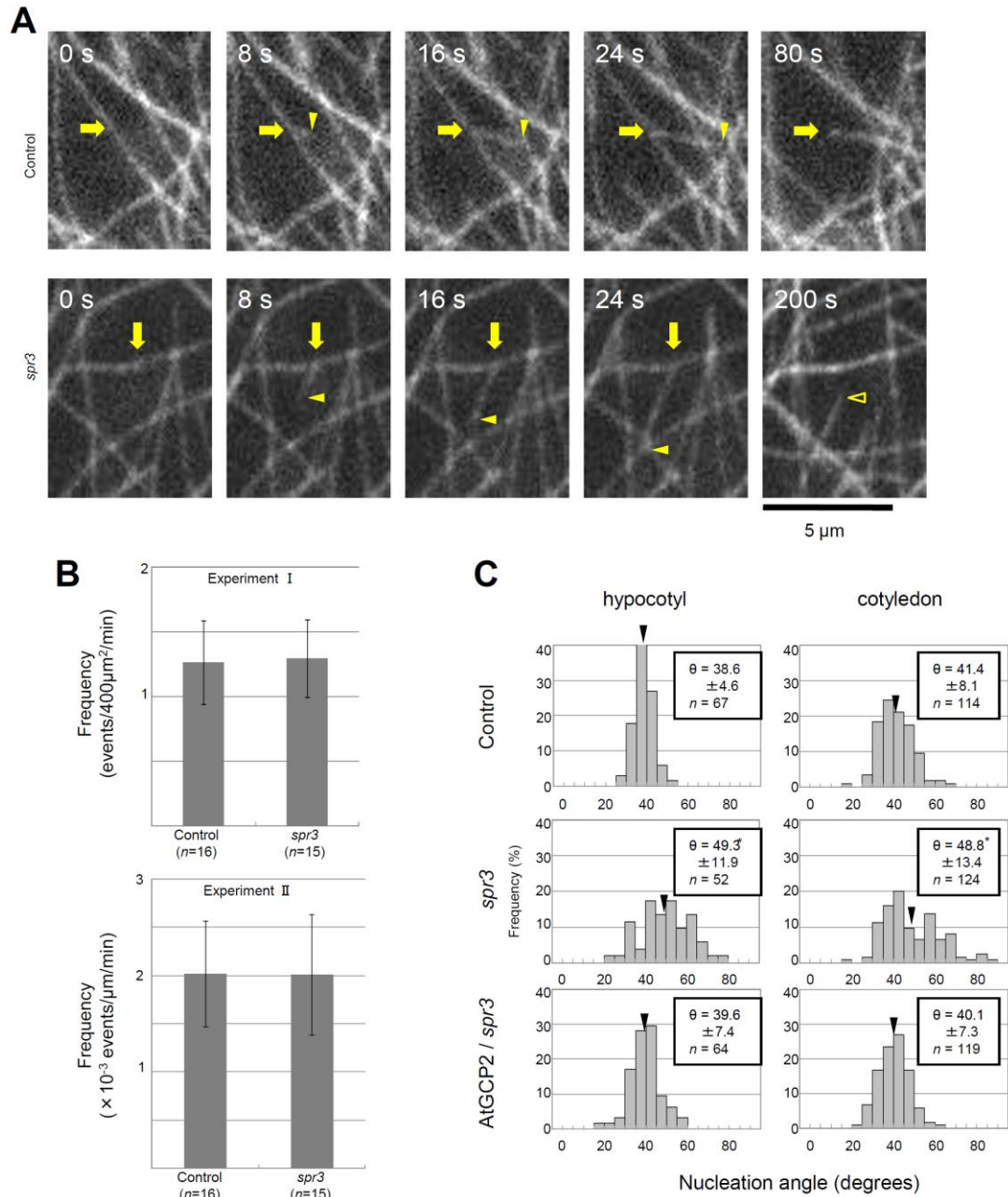


Figure 10. *spr3*変異の微小管形成角度への影響

(A) GFP-TUB6形質転換体の子葉表皮細胞の表層微小管を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。野生型細胞と *spr3* 変異型細胞での微小管形成を示す。矢印は微小管形成部位を示し、新しい微小管のプラス端を閉じた矢尻で示す。コントロールの画像では80秒以内に形成の足場となる微小管の脱重合が観察された。*spr3*細胞では200秒以内に形成された部位から、マイナス端が移動することが観察された（開いた矢尻）。コントロールと *spr3* 変異株でのそれぞれの形成角度は38° と56° であった。(B) 胚軸細胞の微小管形成頻度。Experiment I では任意の400 μ m²の表層での微小管頻度を数えた。Experiment II では微小管の長さ当たりの微小管形成頻度を数えた。観測形成数を (n) で示す。(C) 微小管形成角度の度数分布を示す。コントロールと *spr3*変異株と AtGCP2を含むゲノム領域を導入することで *spr3*変異株の表現型を相補する AtGCP2 / *spr3*変異株の子葉表皮細胞と胚軸細胞の表層微小管形成角度を解析した。平均値 \pm 標準偏差と観測数 (n) をグラフ上に示し、平均値を矢尻で示す。*はコントロールと AtGCP2 / *spr3*の両方に比べて、統計的に有意な差であることを示す (*t*-test; *p*<0.05)。

ントロールに比べると平均値が 7-10° 増加していた。*spr3* 変異株におけるねじれて伸長する表現型が AtGCP2 を含むゲノム領域を導入して相補されたとき、微小管の形成角度の分布はコントロールで見られた度数分布に戻った (Fig. 10AC)。このことから、*spr3* 変異は緩く広がった微小管形成角度に起因すると考えられた。

3-6. *spr3* 細胞で見られた表層微小管の動態変化の評価

これまで *spr3* 細胞においてマイナス端動態の減少と微小管形成角度制御の緩和という表層微小管の変化を見いだした。マイナス端動態の重要性を評価するために、カタニン *spr3* の二重変異株の形態的表現型と細胞の表現型を観察した。使用した Wassilewskija エコタイプのカタニン変異株は報告されている *fra2* 変異株のアレルであり、カタニン二量体の 60kDa ATPase 活性構成因子 (Atlg80350) の cDNA 852 bp 目の A の後に A が挿入されフレームシフトを起こし、通常 481 アミノ酸のものが 295 アミノ酸と短くなってしまいう変異が入っている (Fig. 11)。カタニンは微小管を切断し、植物間期細胞の表層微小管を形成部位から切り離すのに寄与すると考えられている (Burk et al., 2001; Wasteneys, 2002)。カタニン変異株では暗所胚軸や根の表皮細胞の長さが短くなり幅が広がっていた。カタニン *spr3* の二重変異株の表皮細胞は短く膨れ、そして右巻きのねじれを示した。カタニンの表現型に *spr3* の表現型が付加された (Fig. 12A)。

カタニン変異株やカタニン *spr3* 二重変異株の抗 α チューブリン抗体による免疫染色から、伸長する根の表皮細胞の表層微小管配向の異常が見つかった。ほとんどの微小管は伸長方向に対して垂直な配向からは広く分散した様々な角度を示していた (Fig. 12BC)。多くの表層微小管は、ある部位に集中し星状を示していた。他のカタニン変異株アレルでも同じような表層微小管配向が様々な細胞で報告されている (Bichet et al., 2001; Burk et al., 2001; Burk and Ye, 2002; Bouquin et al., 2003)。これまでも報告されているように (Burk and Ye, 2002) カタニン変異株における少数の表皮細胞表層微小管は伸長軸に対して垂直に配向しており、その部分的に見られる配向はカタニン *spr3* 二重変異株では左肩上がりにわずかに変化していた。

GFP-TUB6 マーカーを用いた微小管形成のタイムラプス解析はカタニン変異株とカタニン *spr3* 二重変異株では新規に形成された微小管のマイナス端が既存の微小管上の形成部位から切り離されることがないことを明らかにした (Fig. 13A)。これはカタニンの切断活性が微小管の切り離しに必要であることを示唆

A

```

Col1 1' ATGGTGGGAA GTAGTAATTC GTTAGCGGGT CTACAAGACC ACTTGA AATT AGCGAGAGAA
*****
WS 1' ATGGTGGGAA GTAATAATTC GTTAGCGGGT CTACAAGACC ACTTGA AATT AGCGAGAGAA

61' TATGCACTAG AAGGATCCTA TGACACATCT GTCATCTTCT TCGATGGGCG CATTGCTCAG
*****
61' TATGCACTAG AAGGATCCTA TGACACATCT GTCATCTTCT TCGATGGGCG CATTGCTCAG

121' ATCAACAAGC ATTTAAACAC CCTTGACGAT CCTTTGGGCC GACCAAAATG GATGAACGTT
*****
121' ATCAACAAGC ATTTAAACAC CCTTGACGAT CCTTTGGGCC GACCAAAATG GATGAACGTT

181' AAAAAGGCCA TAATGAAGA GACGGAAGT GTGAAGCAAT TGGATGCAGA GAGGAGAGCA
*****
181' AAAAAGGCCA TAATGAAGA GACGGAAGT GTGAAGCAAT TGGATGCAGA GAGGAGAGCG

241' TTTAAAGAAG CTCGCCACTGG GCGTGGGCT GCTTCTCCAC CTATCAATAC CAATCATCC
*****
241' TTTAAAGAAG CTCGCCACTGG GCGTGGGCT GCTTCTCCAC CTATCAATAC CAATCATCC

301' TTTGTTTTTC AGCCCTTGGG TGAGTATCCA ACTTCATCCG GTGGTGGTCC TATGATGAT
*****
301' TTTGTTTTTC AGCCCTTGGG TGAGTATCCA ACTTCATCCG GTGGTGGTCC TATGATGAT

361' CCTGATGAT GGAGGCTCCG TACCCTGAT GTTACTAGTC GAAGACCGCG CAGGGCTGGT
*****
361' CCTGATGAT GGAGGCTCCG TACTGTGAT GTTAGTAGTA GAAGACCGCG CAGGGCTGGT

421' CAACTGCTA CTAGA AATC ACCTCAAGAT GGGGCTTGGG CTCGTGGGCC TACTACACGG
*****
421' CAACTGCTA CTAGA AATC ACCTCAAGAT GGGGCTTGGG CTCGTGGGCC TACAACAACGG

481' ACGGCTCCAG CTTCCTGGG TGGCAGAGGT GGGGCTACTA GTAAGTCAAC TGCAGGTGCC
*****
481' ACGGCTCCAG CTTCCTGGG TGAAGAGGT GGGGCTACTA GTAAGTCAAC TGCAGGTGCC

541' CGCTCTCCA CTGCGCGAAA GAAGGAGCT GCCTCAAAAT CTAACAAGGC AGATGCTATG
*****
541' CGCTCTCCA CTGCGCGAAA GAAGGAGCT GCCTCAAAAT CTAACAAGGC AGATGCTATG

601' AATGGTGATG CTGAAGATGG GAAGTCAAAA AGGGGATTGT ATGAGGACCC TGATGAGGAC
*****
601' AATGGTGATG CTGAAGACGG GAAGTCAAAA AGGGGATTGT ATGAGGACCC TGATGAGGAC

661' CTGGCTGCTA TGCTTGA AAG GGATGTGTTG GACTCAACTC CTGGTGTCCG TTGGGATGAT
*****
661' CTGGCTGCTA TGCTTGA AAG GGATGTGTTG GACTCAACTC CTGGTGTCCG TTGGGATGAT

721' GTTGCAGGTT TGCTGAAGC CAAAAGGCTG CTTGAGGAGG CAGTTGTGCT TCCTTTATGG
*****
721' GTTGCAGGTT TGCTGAAGC CAAAAGGCTG CTTGAGGAGG CAGTTGTGCT TCCTTTATGG

```

```

781' ATGCCCGAAT ACTTTCAGGG TATTCGAAGA CCATGGAAAG GAGTTCTCAT GTTTGGTCC
*****
781' ATGCCCGAAT ACTTTCAGGG TATTCGAAGA CCATGGAAAG GAGTTCTCAT GTTTGGTCC

841' CCTGGGACAG GTAAAACCCCT GTTGGCAAAA GCTGTGGCAA CTGAGTGTGG TACCACCTTC
*****
841' CCTGGGACAG GTAAAACCCCT GTTGGCAAAA GCTGTGGCAA CTGAGTGTGG TACCACCTTC
      ↑ insertion in a katanin mutant in this study

901' TTCAATGTAT CTCTGCTAC ATTAGCTTCA AAATGGCGTG GAGAGAGTGA GCGCATGGTC
*****
901' TTCAATGTAT CTCTGCTAC ATTAGCTTCA AAATGGCGTG GAGAGAGTGA GCGCATGGTC

961' AGATGCGTGT TTGATCTGGC TAGGGCATAT GCTCCAAGCA CAATTTTTAT TGATGAGATC
*****
961' AGATGCGTGT TTGATCTGGC TAGGGCATAT GCTCCAAGCA CAATTTTTAT TGATGAGATC

1021' GACTCTCTCT GCAATTCTCG GGGGGTCTCT GGAGAGCATG AATCATCAAG AAGGGTGAAA
*****
1021' GACTCTCTCT GCAATTCTCG GGGGGTCTCT GGAGAGCATG AATCATCAAG AAGGGTGAAA

1081' TCGAATCCG TAGTCAAGT AGATGGAGTG AGCAATACAG CGACAATGA AGATGGTAGT
** *****
1081' TCGAATCCG TAGTCAAGT AGATGGAGTG AGCAATACAG CGACAATGA AGATGGTAGT

1141' CGCAAAATAG TAATGGTATT GGCAGCTACC AACTCCCGT GGGACATAGA TGAAGCTCTC
*****
1141' CGCAAAATAG TAATGGTATT GGCAGCTACC AACTCCCAT GGGACATAGA TGAAGCTCTC

1201' AGGAGGAGGT TGGAAAAACG TATATATATC CCACTTCCAG ATTTTGAAG TCGTAAGGCT
*****
1201' AGGAGGAGGT TGGAAAAACG TATATATATC CCACTTCCAG ATTTTGAAG TCGTAAGGCT

1261' CTTATCAATA TCAATCTGAG AACAGTTGAG GTGGCGAGTG ATGTTAATC TGAAGATGTG
*****
1261' CTTATCAATA TCAATCTGAG AACAGTOSAG GTGGCGAGTG ATGTTAATC TGAAGATGTG

1321' GCGGAGGAAA GCGAAGGGTA CAGTGGAGAG GATCTGACTA ACGTGTGACG GGCAGCATCA
*****
1321' GCGGAGGAAA GCGAAGGGTA TAGTGGAGAG GATCTGACTA ACGTGTGACG GGCAGCATCA

1381' ATGAACGGGA TGGGCGTAA GATAGGCGGG AAAACGAGAG ATGAGATAAA GAACATGTGG
*****
1381' ATGAACGGGA TGGGCGTAA GATAGCTGGG AAAACGAGGG ATGAGATAAA GAACATGTGG

1441' AAAGACGATA TATCAATGA TCCAGTGGCA ATGTGTGATT TCGAAGAGGC CATTAGGAAA
*****
1441' AAAGACGATA TATCAATGA TCCAGTGGCA ATGTGTGATT TCGAAGAGGC CATTAGGAAA

1501' GTGCAACCGA GTGTGTCTTC CTCTGATATC GAGAAACACG AGAAGTGGCT CTCTGAGTTT
*****
1501' GTGCAACCGA GTGTGTCTTC CTCTGATATC GAGAAACACG AGAAGTGGCT CTCTGAGTTT

1561' GGATCTGCTT AA
*****
1561' GGATCTGCTT AA

```

B

```

Col1 1' MVGSSNSLAG LQDHLKLFRE YALEGSYDTS VIFFDGAIAQ INKHLNLTLD PLARTKMMNV
*****
WS 1' MVGSSNSLAG LQDHLKLFRE YALEGSYDTS VIFFDGAIAQ INKHLNLTLD PLARTKMMNV

61' KKAIMEETE V KQLDAERFA FKEAPTGRFA ASPPINTKSS FVFQPLDEYP TSSGGGPMDD
*****
61' KKAIMEETE V KQLDAERFA FKEAPTGRFA ASPPINTKSS FVFQPLDEYP TSSGGGPMDD

121' POWRFPTRD VTSRRPARAG QTGTRKSPQD GAWARGPTTR TGPASRGGG GATSKSTAGA
*****
121' POWRFPTRD VTSRRPARAG QTGTRKSPQD GAWARGPTTR TGPASRGGG GATSKSTAGA

181' RSSTAGKKG AASKNKAESM NGDAEDGKSK RGLYEGPDED LAAMLERDVL DSTPGVRWDD
*****
181' RSSTAGKKG AASKNKAESM NGDAEDGKSK RGLYEGPDED LAAMLERDVL DSTPGVRWDD

241' VAGLSEAKRL LEEAVVPLW MPEYFGIR PWRGVLMEFP PGTGKTLAK AVATECGTTF
*****
241' VAGLSEAKRL LEEAVVPLW MPEYFGIR PWRGVLMEFP PGTGKTLAK AVATECGTTF
      KHPYQK SCCH* in a katanin mutant in this study

301' FIVSSATLAS KWRGSERMV RCLFDLARY APSTIFIDEI DSLNSRGGG GEHESSRVRK
*****
301' FIVSSATLAS KWRGSERMV RCLFDLARY APSTIFIDEI DSLNSRGGG GEHESSRVRK

361' SELLVQDVG SINTATNEGGS RKIVMVLAA NFPWIDEAL RARLEKRIYI PLPDFESRKA
*****
361' SELLVQDVG SINTATNEGGS RKIVMVLAA NFPWIDEAL RARLEKRIYI PLPDFESRKA

421' LINIINLRTVE VASDVNI EDV ARRETEGYSGD DLTNVCRDAS MNGMFRKIAG KTRDEIKNMS
*****
421' LINIINLRTVE VASDVNI EDV ARRETEGYSGD DLTNVCRDAS MNGMFRKIAG KTRDEIKNMS

481' KDIISNDPVA MCFEFAIRK VQPSVSSSDI EKHEKWLSEF GSA
*****
481' KDIISNDPVA MCFEFAIRK VQPSVSSSDI EKHEKWLSEF GSA

```

Figure 11. 本研究で使用したカタニン変異株の変異
 (A) *At1g80350* cDNA (ColとWS 配列比較)。ColエコタイプとWSエコタイプのcDNAのシーケンスにより、多型が確認された。カタニン変異株の変異は赤字で示す。
 (B) *At1g80350* アミノ酸(ColとWS 配列比較)一塩基置換によりフレームシフトが起こっていた(赤字)

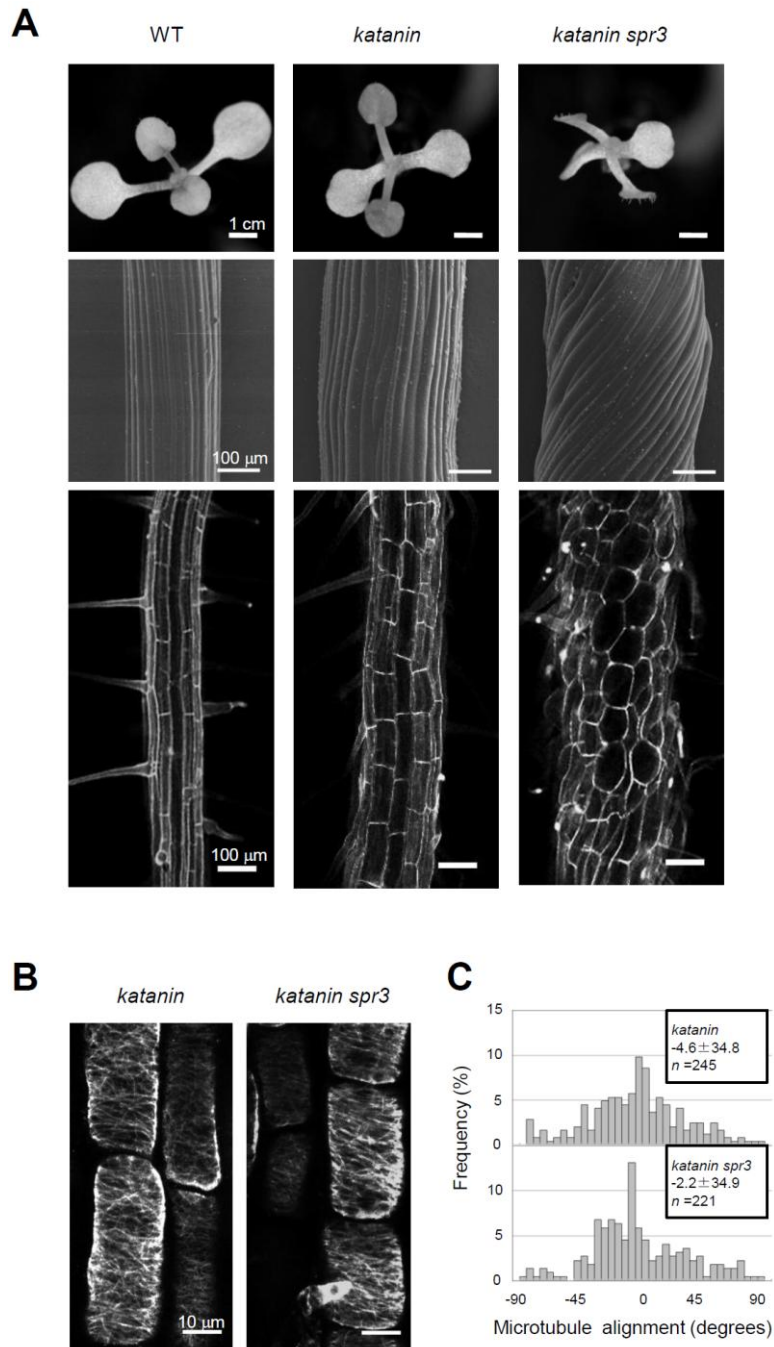


Figure 12. カタニン *spr3* 二重変異株の表現型と微小管配向

(A) 野生型とカタニン変異株とカタニン *spr3* 二重変異株の 10 日齢の幼植物体の地上部 (上) と暗所胚軸 (中) と根の分化領域 (下)。観察方法は Fig. 5 と同じ。(B) 根の伸長領域の表層微小管を抗 α チューブリン抗体を用いた抗体免疫染色法により、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(C) (B) で観察された微小管の角度の分布をヒストグラムに表した。平均角度と観測微小管数 (n) をグラフ上に示す。

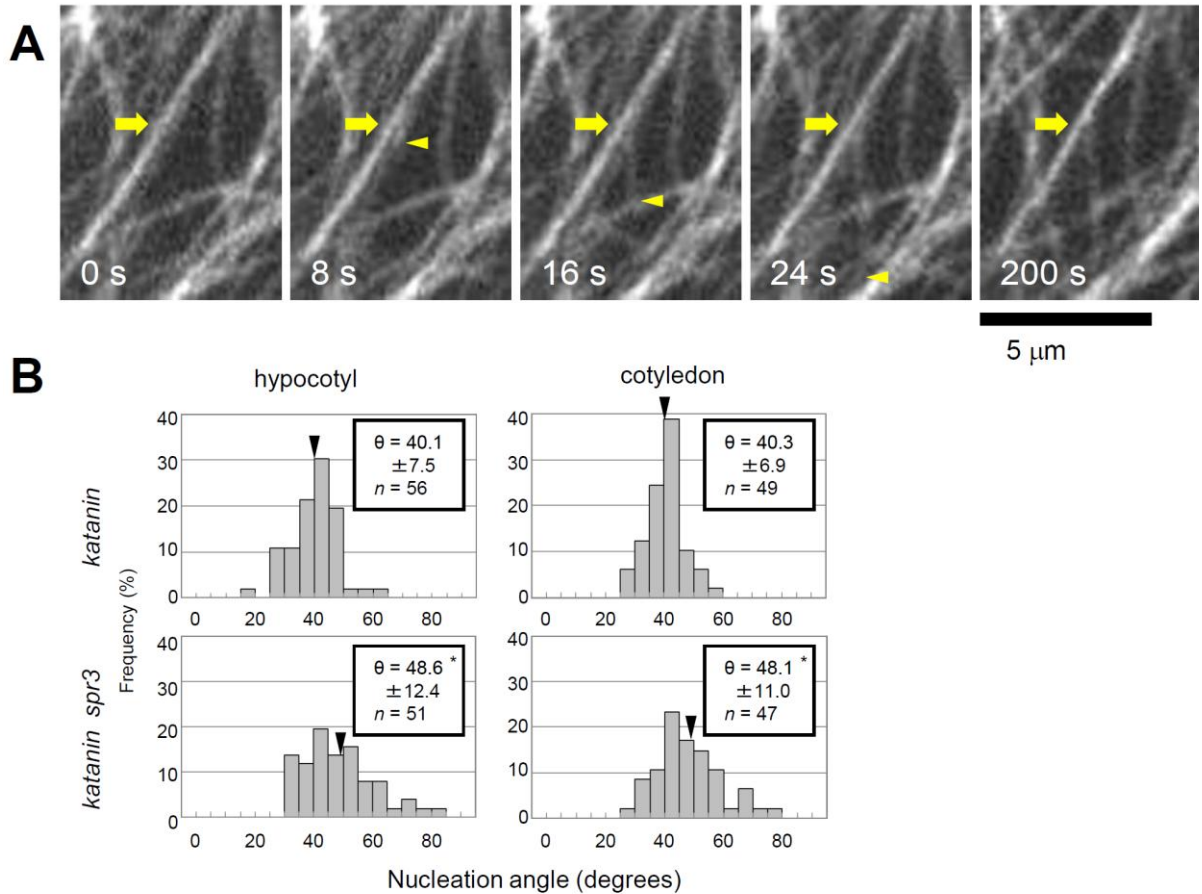


Figure 13. カタニン *spr3* 二重変異株における表層微小管形成

(A) カタニン細胞では 200 秒以上経っても新規に形成された微小管（プラス端を矢尻で示す）が形成部位（矢）にくっついたままである。200 秒間の間に新規に形成された微小管のマイナス端の形成部位からの切り離しは観察されなかった ($n=47$)。一方で、野生型細胞では 200 秒の観察中に 54 本中 35 本のマイナス端が形成部位から切り離された。(B) カタニン変異株とカタニン *spr3* 二重変異株の子葉表皮細胞と胚軸表皮細胞における微小管形成角度の度数分布を示す。平均値 \pm 標準偏差と観測数 (n) をグラフ上に示す。平均値を矢尻で示す。*はカタニン変異株に比べて、統計学的に有意な差であることを示す (t -test; $p < 0.05$)

している。胚軸細胞と子葉細胞での微小管形成角度の分布は野生型とカタニンで差は見られなかった。しかし二重変異体の細胞では *spr3* 変異株で見られたように、微小管形成角度の分布は広がり、平均角度は拡大していた (Fig. 13B)。これらの結果はカタニンが微小管形成角度の制御には関わっていないことを示した。また、*spr3* 変異株で観察された微小管マイナス端動態の変化は *spr3* 変異株の右巻きにねじれる表現型に重要ではないことが示唆された。

3-7. *AtGCP2* の T-DNA 挿入変異株 *atgcp2-1*

spr3 変異株は *AtGCP2* 遺伝子の機能を完全に失ったアレルではないと考えられたため、データベースをもとに *AtGCP2* のノックアウトアレルを探し、2 つの T-DNA 挿入株、FLAG467F07 と FLAG412F07 (Wassilewskija, INRA, Versailles, France) を入手した。シーケンスにより、それぞれの株の T-DNA 挿入の正確な部位を確認した。FLAG 467F07 では T-DNA が *AtGCP2* 遺伝子の 17 番目のエキソンの最初の塩基 G の後に挿入されており、それに伴い挿入部位の後 33bp の欠如が確認された。この株を *atgcp2-1* 変異株と名付けた。他の T-DNA 挿入株 FLAG412F07 は FLAG467F07 と同じものであった。*atgcp2-1* ヘテロ変異株は野生型と表現型に違いは見られなかったが、ヘテロ植物体の自殖次世代からホモ植物体が見つかることはなかった。*atgcp2-1* ヘテロ植物体からのさやの中には収縮した胚珠が含まれていた (Fig. 14A)。そのため、さやの中の種子の数が野生型で見られる約 40% に減少していた。*AtGCP2* を含む 8.7 kb のゲノム領域を導入すると、*atgcp2-1* がホモになる株が得られた。野生型と表現型に差は見られなかった (Fig. 14B)。*AtGCP2* のヌルアレルは正常な種を作ることができず、また、*spr3* 変異は部分的な欠損であることが示唆された。

成熟しない胚珠が多いことから、*atgcp2-1* では配偶子機能が損傷していると考えられた。雌雄配偶子の次世代への伝達効率を解析するために、野生型と *atgcp2-1* ヘテロ植物体の相反交雑を行った (Table 3)。野生型の花粉を *atgcp2-1* ヘテロ植物体のめしべに受粉したとき、変異の伝達率は次世代の 50% になるはずだが、子孫 ($n = 143$) の 3.4% のみが *atgcp2-1* 変異を持っていた。*atgcp2-1* ヘテロ植物体の花粉を野生型の雌しべに受粉したとき、*atgcp2-1* 変異は次世代 ($n = 205$) の 17% が保持していた。そのため、変異を持った配偶子の伝達効率は雌で 93%、雄で 66% まで減少していた。これは *atgcp2-1* 変異が雄雌共の半数体配偶子の発生や機能に強く影響していることを示す。

Table 3. Reciprocal crosses of hetetozygous mutant *atgcp2* line with WT plants

♀	♂	<i>atgcp2-1</i> / +	<i>n</i>	Transmission	
				Efficiency ^a	P ^b
<i>atgcp2-1</i> / +	× + / +	5	147	3.4%	<i>p</i> < 0.0001
+ / +	× <i>atgcp2-1</i> / +	35	205	17.0%	<i>p</i> < 0.0001

Plants were crossed manually and seeds of resulting cross were collected and grown on medium plates.

To determine the efficiency, we performed genomic PCR analysis.

^a Calculated transmission efficiency (TE) of *atgcp2-1* mutant gametes through the male and female parents.

^b χ^2 -Test based on the expectation that 50% of the gametophytes carry a *atgcp2-1* allele.

雌性配偶子の形成での変異の影響を解析するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて胚嚢を視覚化し、成熟した胚珠を観察した (Christensen et al., 1997)。雌性配偶体の形成は胚珠の中で起こり、減数分裂から始まる。雌の細胞が胚嚢を生じる分裂には多くのパターンがあり得るが、多くはタデ型の胚嚢の発生を行う。そして、減数分裂によって生じた細胞のうち 3 つが細胞死を起こし、残った 1 つが大胞子を形成する。生き残った大胞子は、3 回の有糸分裂を経て雌性配偶体として胚嚢をつくる。これによって典型的な胚嚢は、3 つの反足細胞、2 つの助細胞、1 つの中央細胞、そして卵細胞の 7 つの細胞を持つ。野生型植物の胚珠 ($n = 127$) には異常なものがほとんど見られなかったが (<1%)、*atgcp2-1* ヘテロ植物体の雌しべ内の成熟胚珠 ($n = 426$) の 38%が観察される核の数が異常な配偶体であった (Fig. 14C)。異常な配偶体の多くは、助細胞核が欠失し、珠孔領域に大きな液胞空間が形成されていた。

atgcp2-1 と野生型の雄性配偶子の発生を直接比較するために、*quartet* (*qrt*) 変異株を用いて解析を行った。*qrt* 変異株は、花粉形成時減数分裂を 2 回行い、4 つの花粉細胞に分かれる際、花粉母細胞の細胞壁の分解が完全には起こらず、小胞子の 4 分子が結合したまま残る表現型を示す。遺伝的に 2 つずつに分かれると予想されるヘテロ変異株の花粉四分子では *atgcp2-1* 変異を持つ花粉の形成がうまく行われないと考えられるが、この *qrt* 変異株を用いることで形成異常の観察が行いやすくなる。成熟した花粉ステージでは、コントロールの *qrt* 花粉四分子は 99%以上が 4 つの花粉を含んでおり、それぞれに 2 つの精核と 1 つの栄養細胞核が観察される (Fig. 14D)。*qrt/qrt atgcp2-1/+* 変異植物体から得られる花粉四分子の 22%が雄原細胞の分裂が起こらず、1 つの精核と 1 つの栄養細胞核を保持した小胞子を 1 つ持っており、40%の四分子が花粉の一つが形

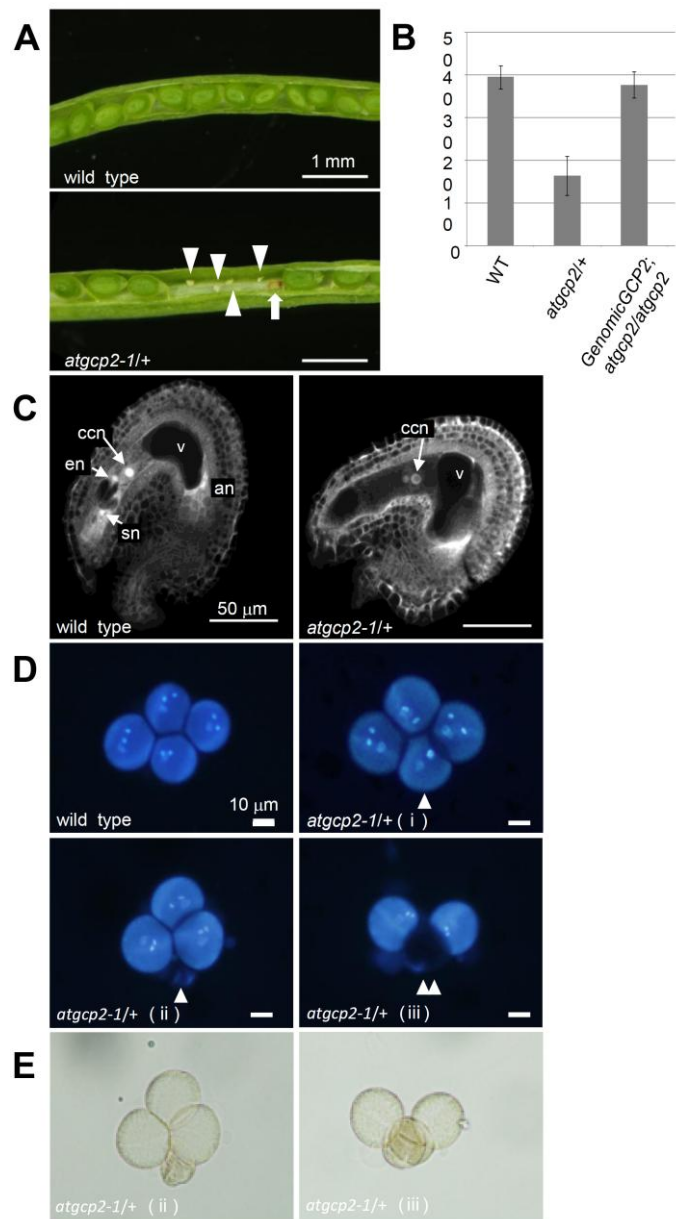


Figure 14. AtGCP2 T-DNA挿入株*atgcp2-1* の解析

(A) *atgcp2-1*ヘテロ植物体の鞘には正常に成長した種子と小さく収縮した種子(矢印)とおそらく受精できていない胚珠(矢尻)が含まれる。(B) 野生型植物と*atgcp2-1*ヘテロ植物体とAtGCP2を含むゲノム領域を導入された*atgcp2-1*ホモ植物体の鞘に作られる種子の数を数えた。(C) 雌性配偶体を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。胚珠では核の自家蛍光が明るく検出できる。高い確率で*atgcp2-1*ヘテロ植物体からの胚珠には核数が1つか2つで、珠孔領域に異常な空隙が見られた。野生型雌性配偶体は中央細胞核と卵核と2つの助細胞核を含んでいる。v; 中央細胞の液胞、ccn; 中央細胞核、en; 卵核、sn; 助細胞核。(D) *qrt*変異株背景の花粉四分子。野生型の花粉四分子と*atgcp2-1*ヘテロ植物体からの1つの小胞に核が2つのみの花粉四分子。(i)と1つの小胞がつぶれている四分子(ii)と2つの小胞がつぶれている四分子(iii)。(E) 左からそれぞれ(D)の*atgcp2-1*(ii)と*atgcp2-1*(iii)の明視野顕微鏡像。

成されず三分子であり、7%が2つ花粉の形成がうまくいかずに花粉二分子の状態であった。実に、68%の四分子が1つか2つの小孢子異常を保持していた (Fig. 14DE)。これらの結果は *AtGCP2* が雌雄両方の配偶子の正常な発生に必要とされることを示す。

3-8. *AtGCP2* の細胞内局在解析

AtGCP2 の細胞内局在を調べるために、*GenomicAtGCP2* の C 末ストップコドンの前に 3×GFP を挿入したコンストラクトを作成し、植物に導入し *GenomicAtGCP2-3GFP* 形質転換体を作成した (Fig. 15A)。*atgcp2-IT-DNA* 挿入株にも導入し内生 *AtGCP2* がない植物体でも *GenomicAtGCP2-3GFP* コンストラクトにより正常に生育することを確認した (Fig. 15BC)。このことから植物体内で観察された GFP 蛍光が機能しているタンパク質の局在であることが示唆された。微小管との局在の関係を明らかにするために、別波長の蛍光で微小管全長を標識する mCherry-TUB6 形質転換体を作成し、*GenomicAtGCP2-3GFP* 形質転換体に交配により導入した。本研究に用いた交配した形質転換体植物には機能的な GFP 融合型の *AtGCP2* と mCherry-TUB6 由来の内在性の *AtGCP2* が存在する。共焦点レーザー顕微鏡による暗所胚軸細胞の二色同時ライブイメージングにより、新規微小管形成と *AtGCP2* の局在の関係を観察し評価した。共焦点レーザー顕微鏡は、Stanford 大学の David Erhardt 博士の研究室の装置を使わせていただいた。一回の撮影は 5 秒間隔で 500 秒間を基本とした。タイムラプスイメージングにより、間期表皮細胞における *AtGCP2* を介した以下の 3 種類の微小管形成機構が確認された。(1) 既存の微小管から約 40° の角度を持って分岐するように新規微小管を形成する。(2) 既存の微小管に平行に新規微小管を形成する。その結果、即座に束化がおこる。(3) 微小管非依存的に細胞膜から新規微小管を形成する (Fig. 16)。

ほとんどの *AtGCP2* は表層微小管上に局在したが、微小管の存在しない細胞表層に局在する *AtGCP2* も観察された。ここで微小管形成に関する *AtGCP2* シグナルを分類した。上述の形成機構別の 3 つに加え、(4) 表層微小管上に出現するが微小管を形成しないものと、(5) 微小管非依存的に細胞膜表層に出現するが微小管を形成しないものの 5 つに分類した (Fig. 17)。*AtGCP2* のシグナルはほとんどが表層微小管上に出現し (879 / 1 027; (1)+(2)+(4))、微小管の存在しない細胞表層に出現するシグナルも存在した (148 / 1027; (3)+(5), Fig. 18A)。約 77%の *AtGCP2* シグナルは細胞表層に一過的の局在を示した (10 秒以下)が、残りの 23%はより長く局在し (30 秒以上)、新規の微小管を形成した (Fig. 18B)。各パターンにおける *AtGCP2* の平均表層局在時間はそれぞれ、(1) 65.7 秒、(2)

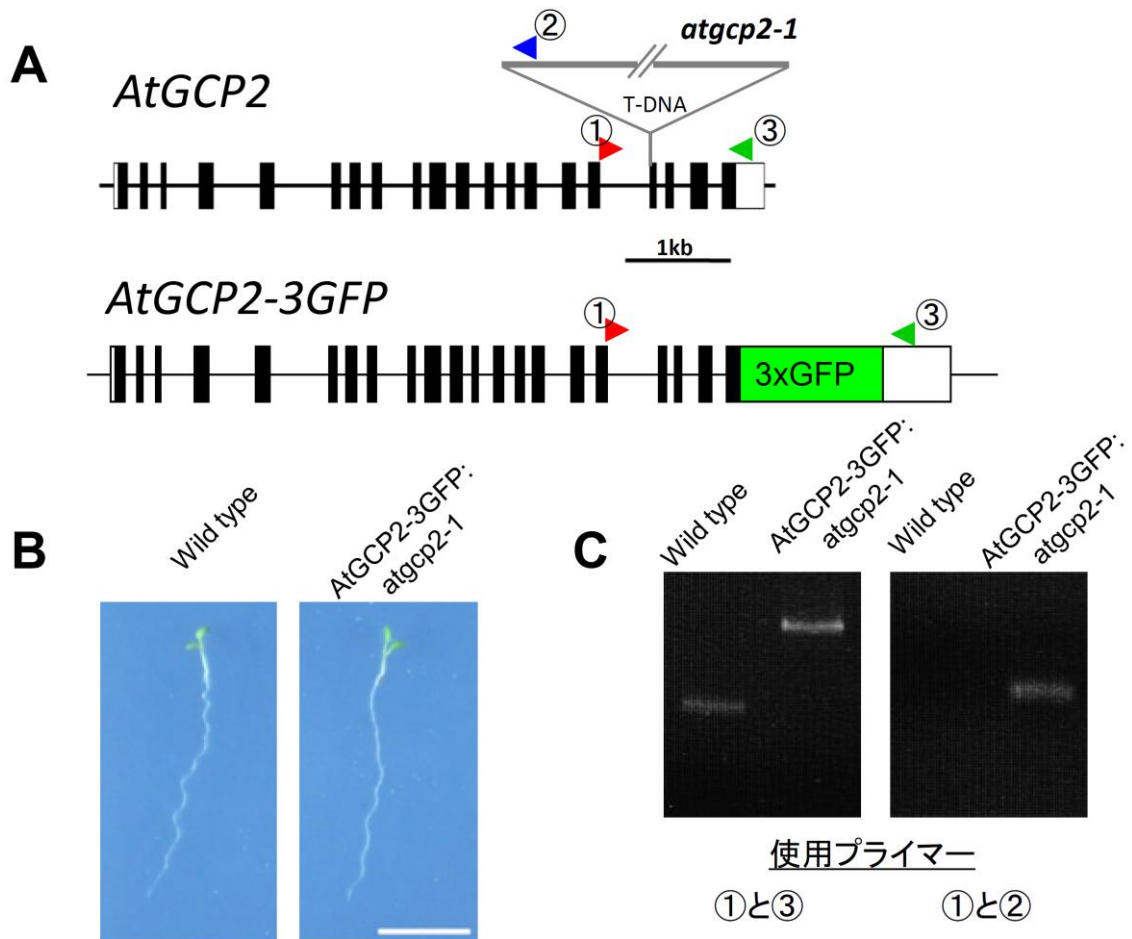


Figure 15. *Genomic AtGCP2-3GFP*は機能的に働く

(A) *AtGCP2*を含むゲノム領域。*atgcp2-1* 変異株の T-DNA 挿入場所、ゲノムチェックに用いたプライマーを記す。*AtGCP2-3GFP* は導入遺伝子。(B) 播種後 7 日目の幼植物体。*AtGCP2-3GFP* 導入により *atgcp2-1* ホモ変異株は野生型と見分けがつかなかった。(C) (A) に示したプライマーを用い (B) の植物体のゲノムチェックを行い、*AtGCP2-3GFP/atgcp2-1* 植物体が T-DNA の挿入されていない *AtGCP2* 野生型ゲノムを持たないことを示す。

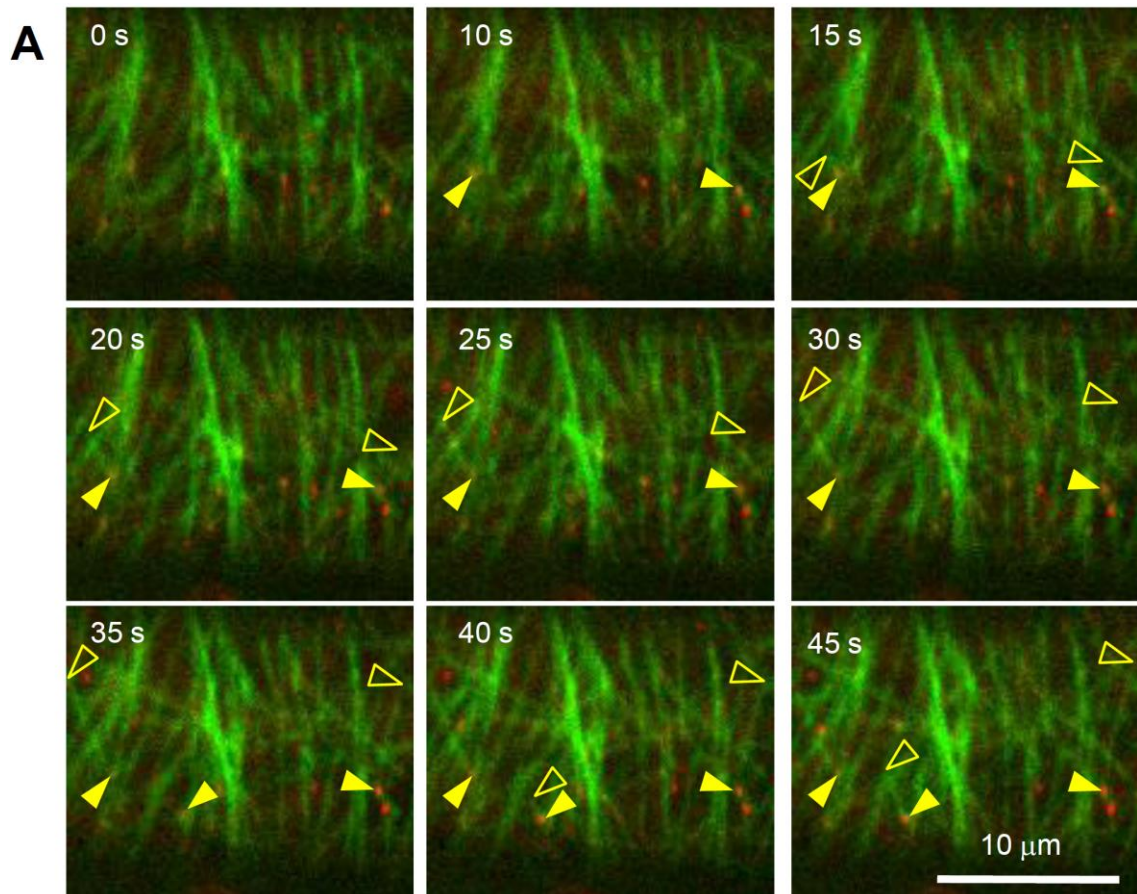


Figure 16. 新規微小管は AtGCP2 (赤) から形成される。微小管は緑で示す。
 (A) 既存の微小管上の 3 つの AtGCP2 シグナルから角度をもった微小管形成。 形成部位を閉じた矢尻で示し、新たに伸長する微小管のプラス端を開いた矢尻で示す。

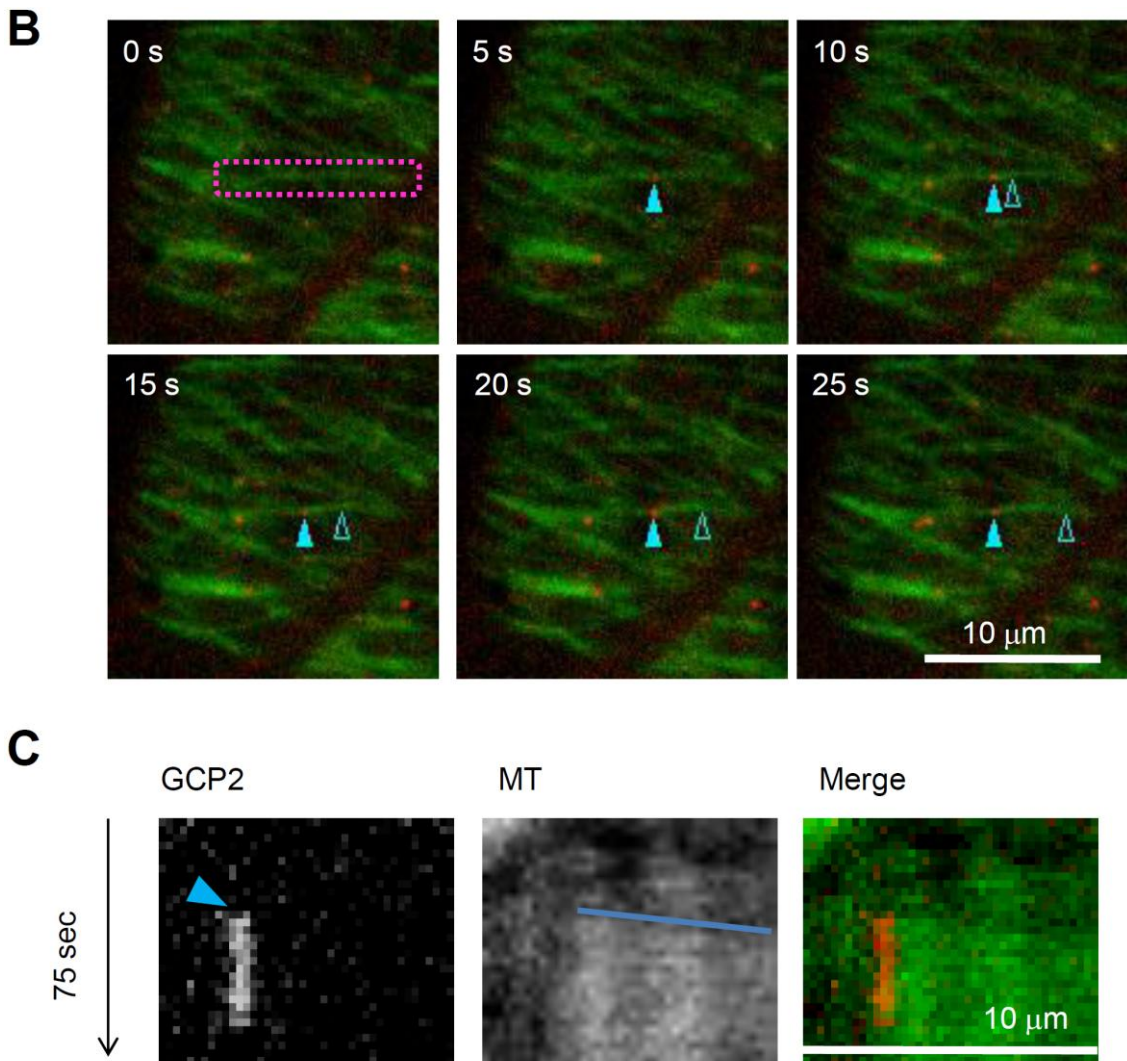


Figure 16. 新規微小管はAtGCP2（赤）から形成される。微小管は緑で示す。

(B) AtGCP2 シグナルから微小管に沿った微小管形成。(C) 既存の微小管に沿った新規微小管形成。AtGCP2 と微小管を (B) のピンクで示すように選択し、キモグラフで表した。AtGCP2 の出現を矢尻で表し、微小管の時間に沿った伸長を青いラインで示した。形成部位を閉じた矢尻で示し、新たに伸長する微小管のプラス端を開いた矢尻で示す。

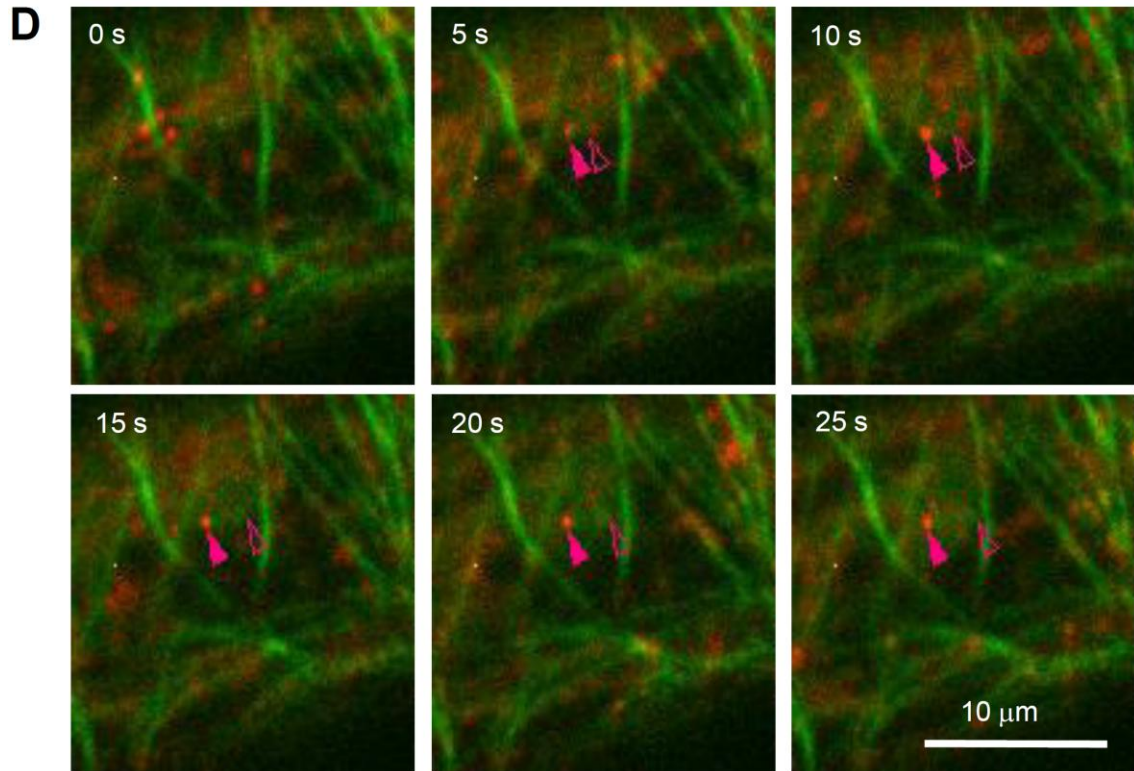


Figure 16. 新規微小管は AtGCP2 (赤) から形成される。微小管は緑で示す。
 (C) 微小管非依存的な細胞表層の AtGCP2 シグナルからの微小管形成。形成部位を閉じた矢
 尻で示し、新たに伸長する微小管のプラス端を開いた矢尻で示す。

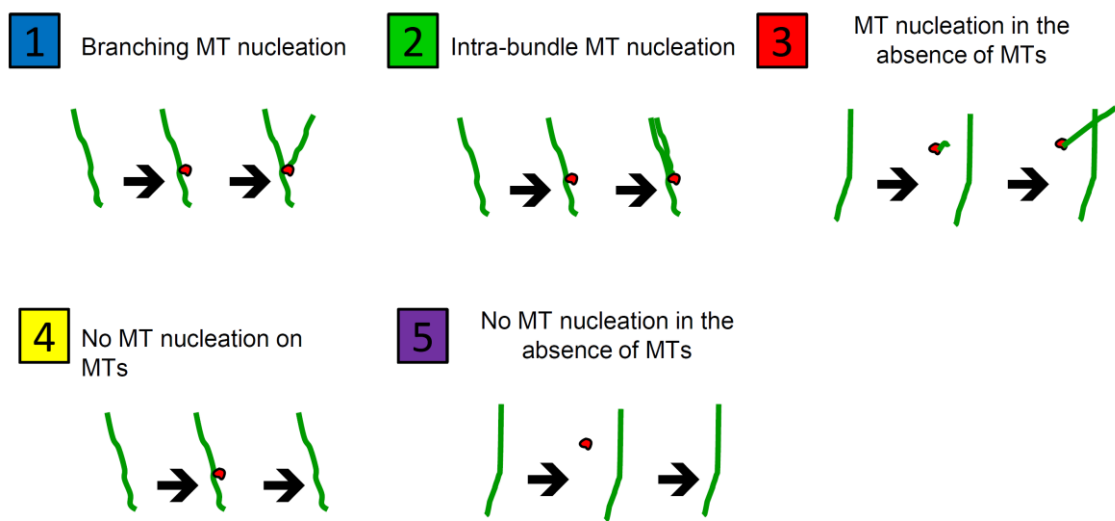


Figure 17. 微小管形成に関する AtGCP2 シグナルの分類

- (1, 青) 既存の微小管から約 40° の角度を持って分岐するように新規微小管を形成する。
 (2, 緑) 既存の微小管に平行に新規微小管を形成する。その結果即座に束化が形成される。
 (3, 赤) 微小管非依存的に細胞膜から新規微小管を形成する。(4, 黄) 微小管上に出現するが微小管形成しない。(5, 紫) 微小管非依存的に細胞膜に出現するが微小管形成しない。

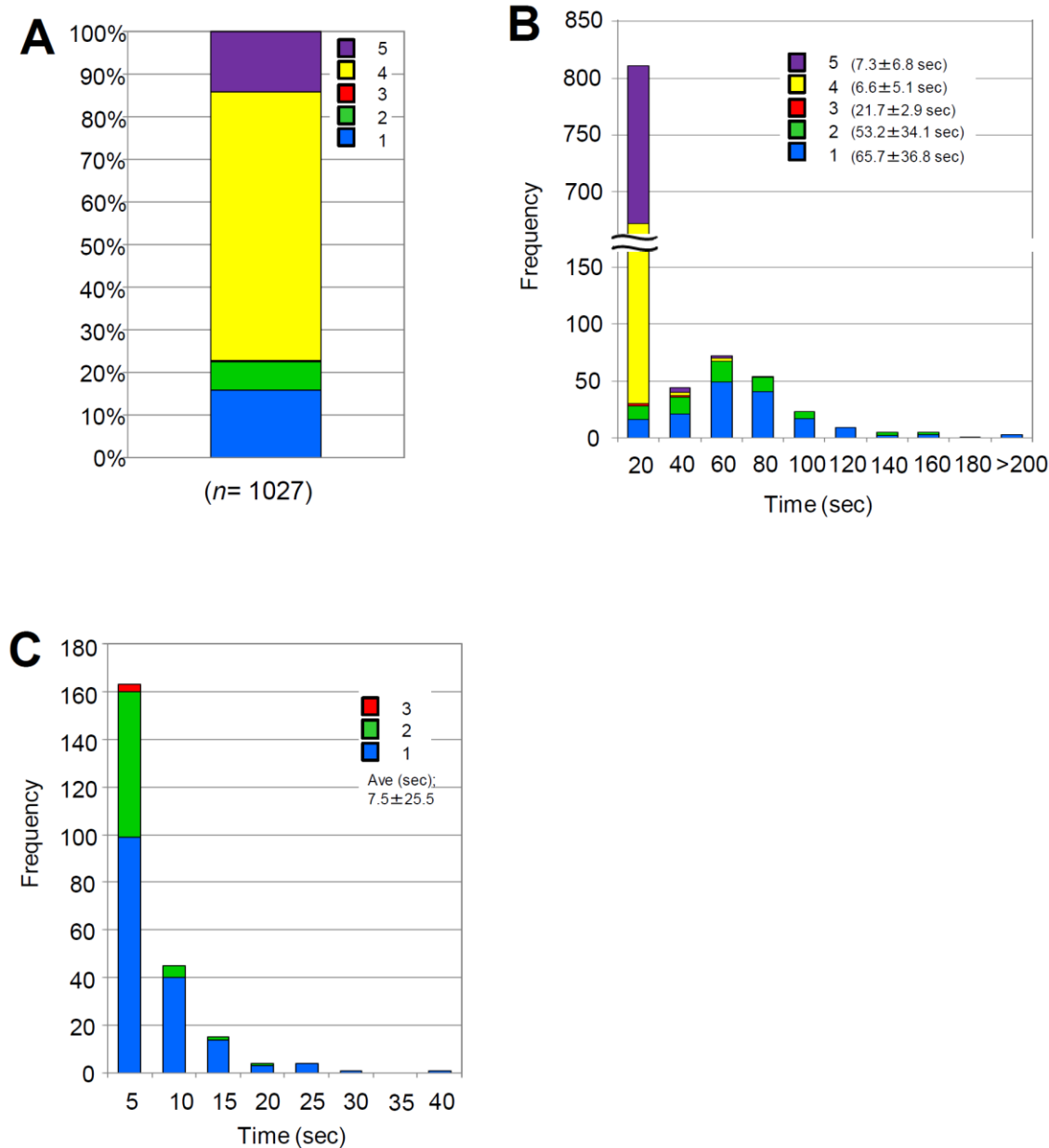


Figure 18 . Genomic AtGCP2-3GFP×mCherry-TUB6 形質転換体の暗所胚軸細胞で観察された AtGCP2 と微小管の動態の解析。Fig. 17 で分類された AtGCP2 毎に色分けされている。

(A) 胚軸表皮細胞で観察された 5 つに分類された AtGCP2 の割合。4 細胞からデータを取り、延べ観察時間は 2000 秒である。AtGCP の数を (n) で記す。(B) 細胞表面で観察される AtGCP2 シグナルの分類別局在した時間。それぞれの平均滞在時間をグラフ上に記す。(C) AtGCP2 が表面微小管上にあらわれてから新規微小管形成に要する時間。平均所要時間をグラフ上に記す。

53.2 秒、(3) 21.7 秒、(4) 6.6 秒、(5) 7.3 秒であった。新たな微小管は AtGCP2 が細胞表層に現れた後約 5 秒以内に形成された (Fig. 18C)。角度のない微小管に沿った新たな微小管形成がたびたび起こったが (68 / 233)、微小管形成をした AtGCP2 の 70%が枝分かれ様に微小管を形成した (162 / 233)。微小管非依存的な細胞膜からの微小管形成は滅多に起こらないようであった (3 / 233)。これらことから AtGCP2 を介した微小管形成には、AtGCP2 が既存の微小管に相互作用することと AtGCP2 が安定化され活性化されることの 2 つの制御が存在することが示唆された。

微小管重合阻害剤オリザリンを 8 時間から 22 時間処理し、微小管を細胞表層から消失させ、AtGCP2 シグナルの局在を観察した。微小管重合阻害剤により表層微小管は消失していたが、細胞膜に AtGCP2 シグナルが確認された (11 細胞、2985 秒間、Fig. 19)。微小管非依存的な細胞表層への出現 (5) における AtGCP2 の細胞表層局在の平均滞在時間は薬剤非処理に比べて大きな差はなかった (平均 7.93 秒)。

3-9. 新規微小管の形成部位からの切り離しにおける AtGCP2

これまで微小管のマイナス端が形成部位から移動することは見られていたが (Shaw et al., 2002)、その際の微小管重合核については明確でなかった。本研究により AtGCP2 を視覚化できたため、この現象をより詳細に解析することが可能になった。分岐するように形成された微小管は形成部位からそのマイナス端を移動させるものが観察される。その際の AtGCP2 の挙動には 2 通りのパターンが見られた。一つは、AtGCP2 が細胞表層から消失した後に新たに形成した微小管のマイナス端が微小管形成部位から切り離される (Fig. 20A, 21A)。もう一つは、新たに形成した微小管が形成部位から切り離された後に AtGCP2 が細胞表層から消失する (Fig. 20B, 21B)。後者は稀で、前者のほうの頻度が高いようであった。

また、形成部位からの切り離しを行うことができないカタニン変異株を用いることでさらにマイナス端の移動と AtGCP2 について明らかにしようとした。カタニン変異株ではこれまで通り新規微小管の形成部位からの切り離しは見られなかった。野生型でも見られたように、微小管依存的に角度を持った微小管形成や角度のない微小管形成、微小管非依存的な微小管形成、そして一過的な微小管上や細胞膜への局在はそれぞれ確認されたが、特徴的な形質として、AtGCP2 の細胞表層への滞在時間の延長が観察された (Fig. 22A, 23B)。解析には、500 秒間撮影した動画を用いるが、カタニン変異株では AtGCP2 シグナルが 200 秒以

上同じ処に検出されるものが多く (229 / 1206 particles)、撮影開始から終了までの 500 秒間細胞表層に局在するものも存在した (Fig. 22B, 23A; 194 / 229 particles)。また、プラス端からの短縮により形成した微小管がなくなると AtGCP2 が細胞表層から消失することができることが観察された (Fig. 22C)。このことから、カタニンは新規微小管と AtGCP2 の間を切断することが示唆された。そして、角度を持って形成された新規微小管はカタニンによって切断されないと AtGCP2 を取り外すことができないようであった。AtGCP2 出現から新規微小管形成活性に要する時間はそれほど差がなかったことから、カタニンは形成活性には寄与していないようであった。

さらに注意深く観察をしていると、AtGCP2 の局在性は細胞表層での出現や消失だけでなく、その距離は短いものであったが、表層微小管上を移動するものも存在した (Fig. 24)。ゆっくりと脱重合する遊離したマイナス端に付随して移動しているようであった。今後は、移動する頻度やその速度を計測しマイナス端動態と比較する必要がある。

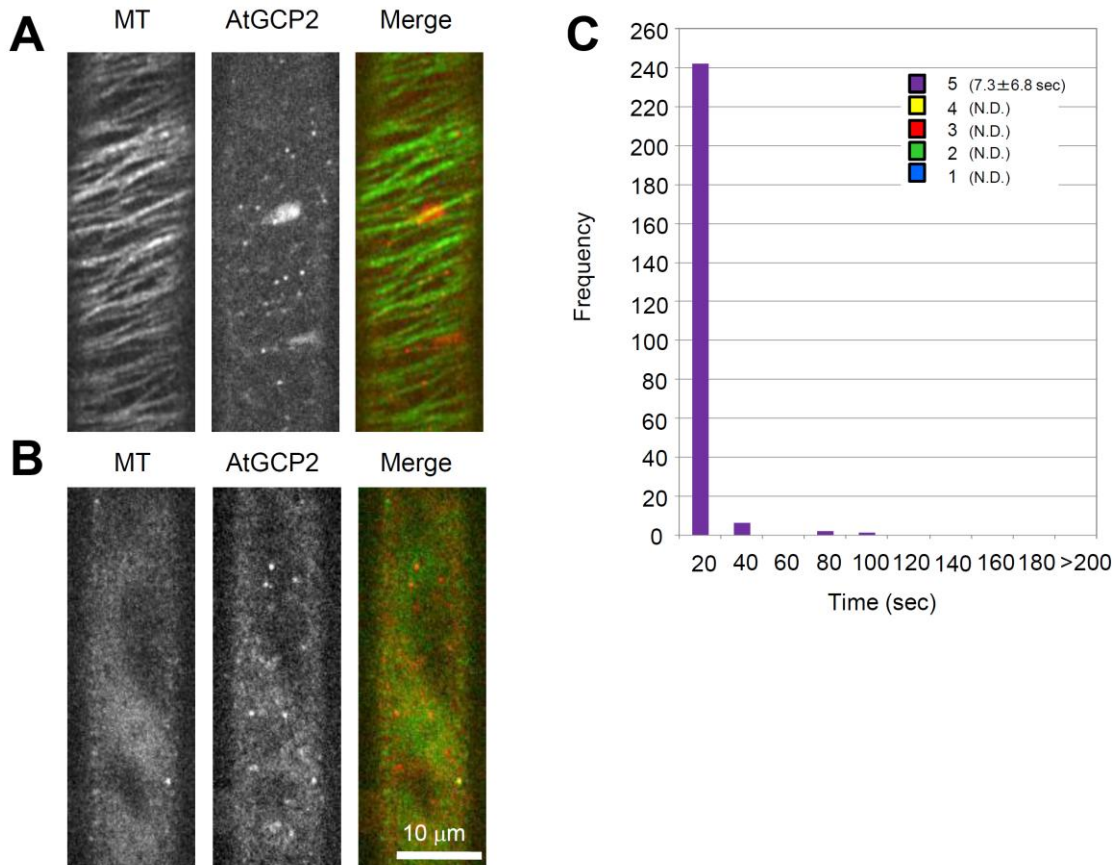


Figure 19. 微小管を細胞表層から消失させても AtGCP2 は細胞表層に局在する

Genomic AtGCP2-3GFP×mCherry-TUB6 形質転換体暗所胚軸細胞を観察。

(A) 薬剤処理をせず 22 時間静置し、暗所胚軸細胞を観察した。微小管と AtGCP2 が細胞表層に確認できる。(B) 20mM のオリザリン処理 22 時間後、暗所胚軸を観察した。細胞表層に微小管はいなくなったが、AtGCP2 は細胞表層に局在していた。(C) (B)に見られるようなオリザリン処理後の微小管のない細胞表層で観察される AtGCP2 シグナルの分類別の局在時間を測定した。11 細胞からデータを取り、延べ観察時間は 2985 秒間である。それぞれの平均滞在時間をグラフ上に記す。N.D. は検出されなかったことを示す。

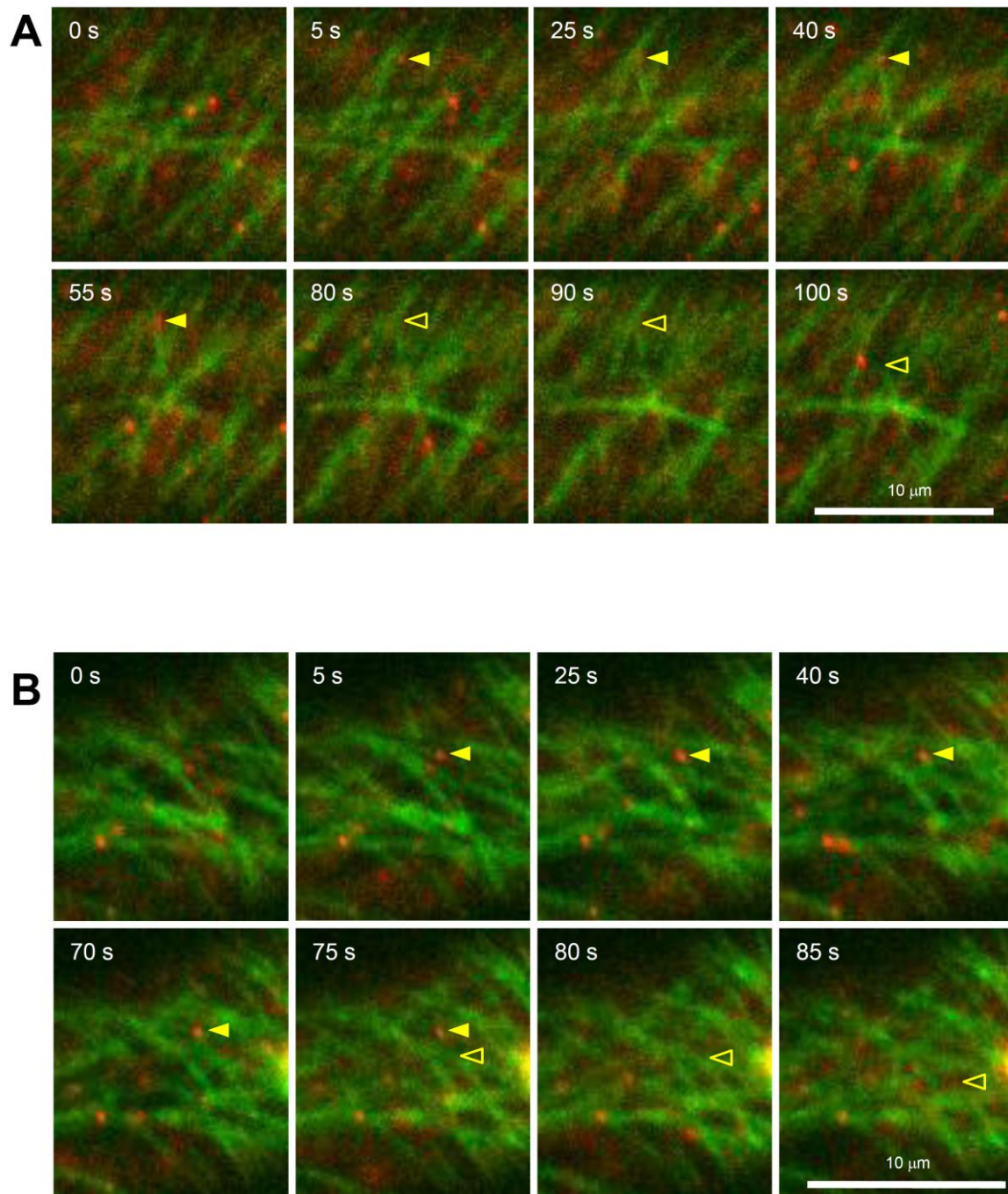


Figure 20. 微小管マイナス端の微小管形成部位からの切り離し。

(A) 新規に形成した微小管が AtGCP2 が細胞表層から消失したあとで微小管形成部位から切り離される。(B) 新規に形成した微小管が形成部位から切り離されたあとに AtGCP2 が細胞表層から消失する。閉じた矢尻は微小管の形成部位の AtGCP2 を示し、開いた矢尻は新規形成微小管の切り離されたマイナス端を示す。

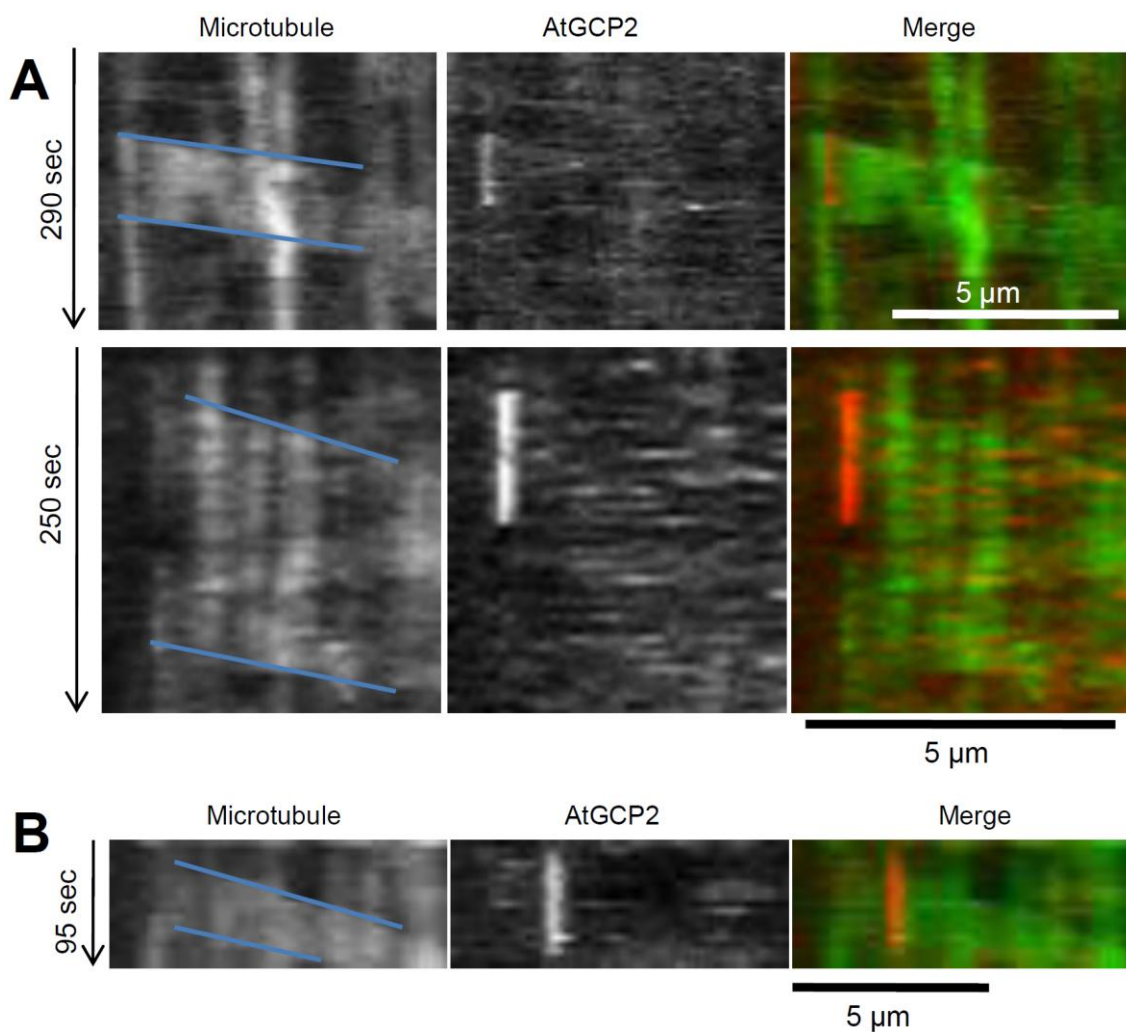


Figure 21. 微小管マイナス端の微小管形成部位からの切り離し。

(A) 新規に形成した微小管が AtGCP2 が細胞表層から消失したあとで微小管形成部位から切り離される 2 つの例をキモグラフで表す。(B) 新規に形成した微小管が形成部位から切り離されたあとに AtGCP2 が細胞表層から消失する 1 つの例をキモグラフで表す。

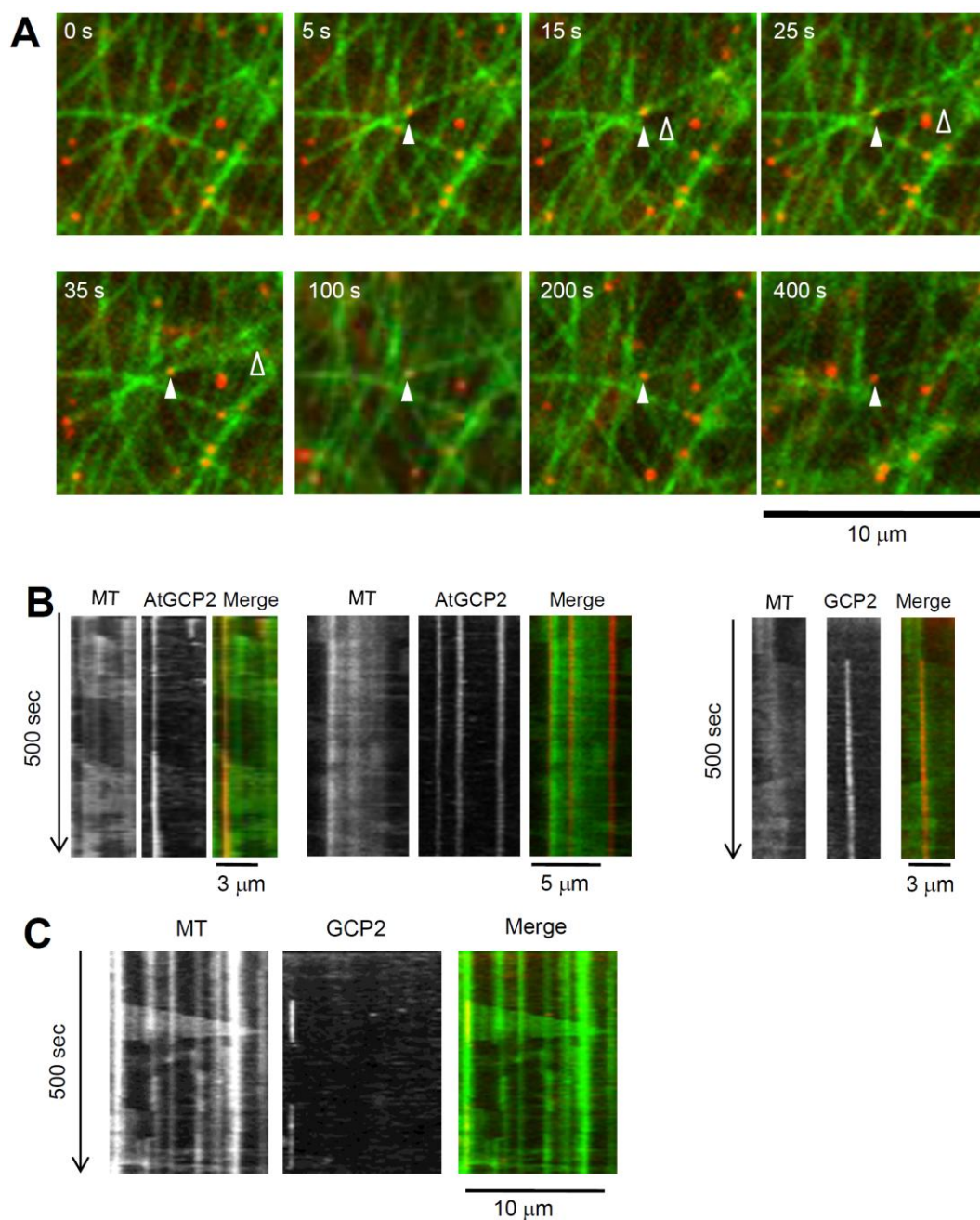


Figure 22. カタニン変異株における AtGCP2 の局在性

Genomic AtGCP2-3GFP×mCherry-TUB6 / *katanin* 形質転換体暗所胚軸細胞の観察。

(A) 微小管上に AtGCP2 シグナルが現れて微小管を形成する。400 秒以上経っても AtGCP2 は滞在し続ける。形成部位を閉じた矢尻、新規微小管のプラス端を開いた矢尻で示す。(B) 撮影開始から終了までの 500 秒間細胞表層に滞在する 4 つの AtGCP2 の例と微小管形成後長時間存在する 1 つの AtGCP2 の例。任意の AtGCP2 を含むラインを選択し、キモグラフで表した。赤い縦のラインが同じ場所に動かずに長時間存在することを示す。(C) カタニン変異株における短い AtGCP2 の細胞表層への滞在を示すキモグラフ。微小管を形成したあと、新規微小管が脱重合によりなくなると共に AtGCP2 も細胞表層から消失する。

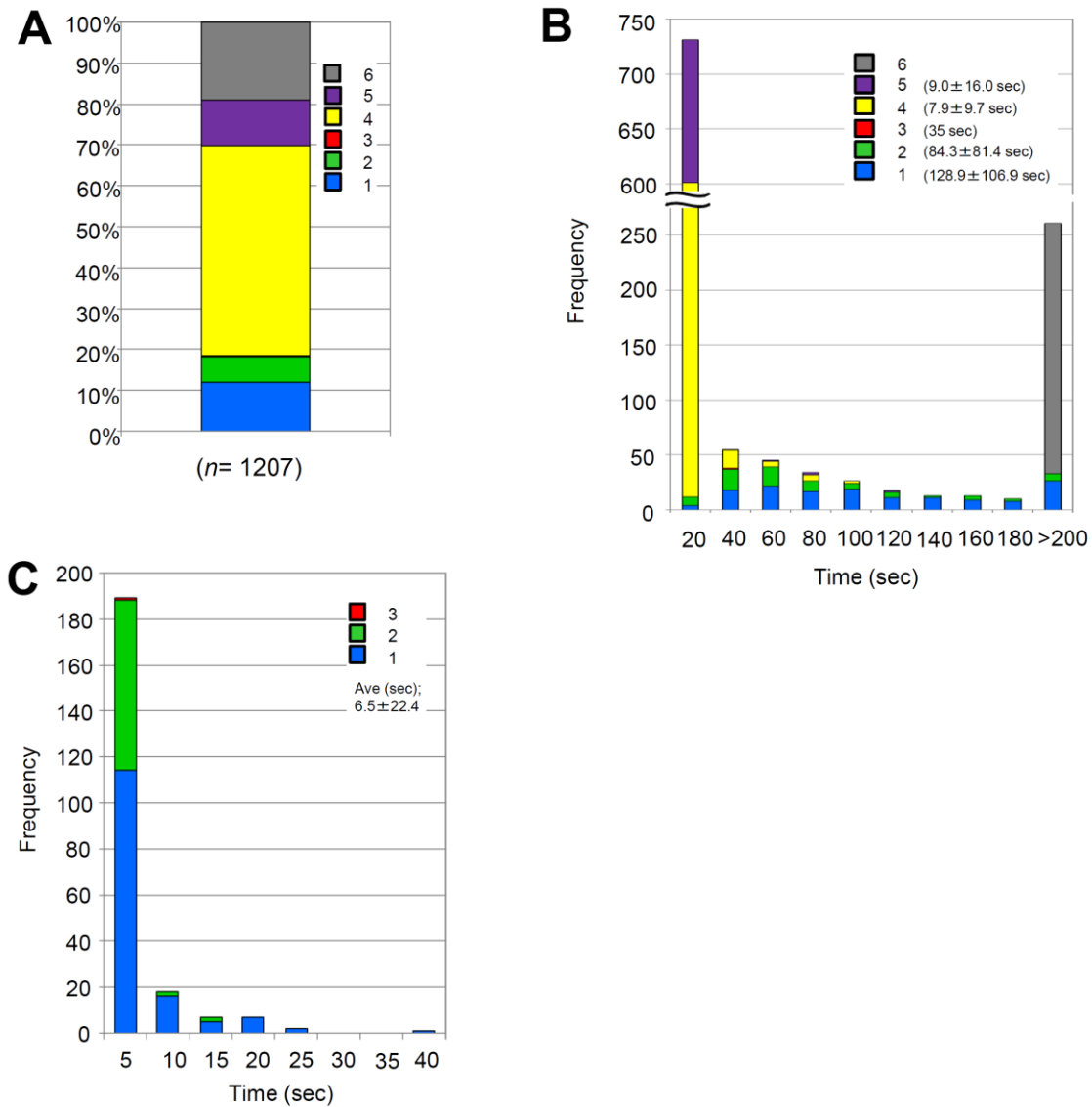


Figure 23. カタニン変異株における、微小管形成と AtGCP2 の関係性

Genomic AtGCP2-3GFP×mCherry-TUB6 / *katanin* 形質転換体暗所胚軸細胞の観察データから計測。5 つの分類に加え、撮影開始から長時間局在する AtGCP2 シグナルを(6)とした。

(A) 胚軸表皮細胞で観察された 6 つに分類された AtGCP2 の割合。5 細胞からデータを取り、延べ観察時間は 2500 秒である。計測した AtGCP2 の数を n で記す。(B) 細胞表面で観察される AtGCP2 シグナルの滞在時間。分類される AtGCP2 毎の平均滞在時間をグラフ上に記す。(C) AtGCP2 が表面微小管上にあらわれてから新規微小管形成に要する時間。平均所要時間をグラフ上に記す。

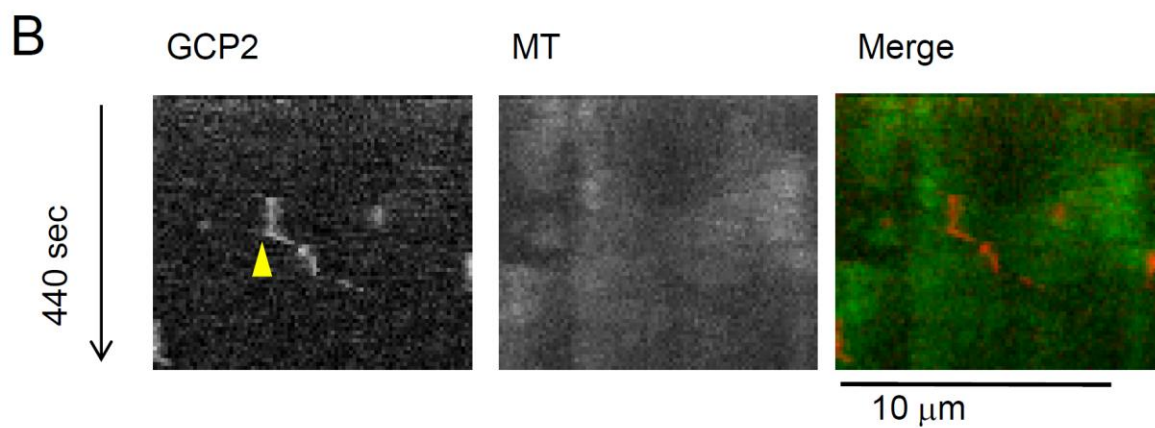
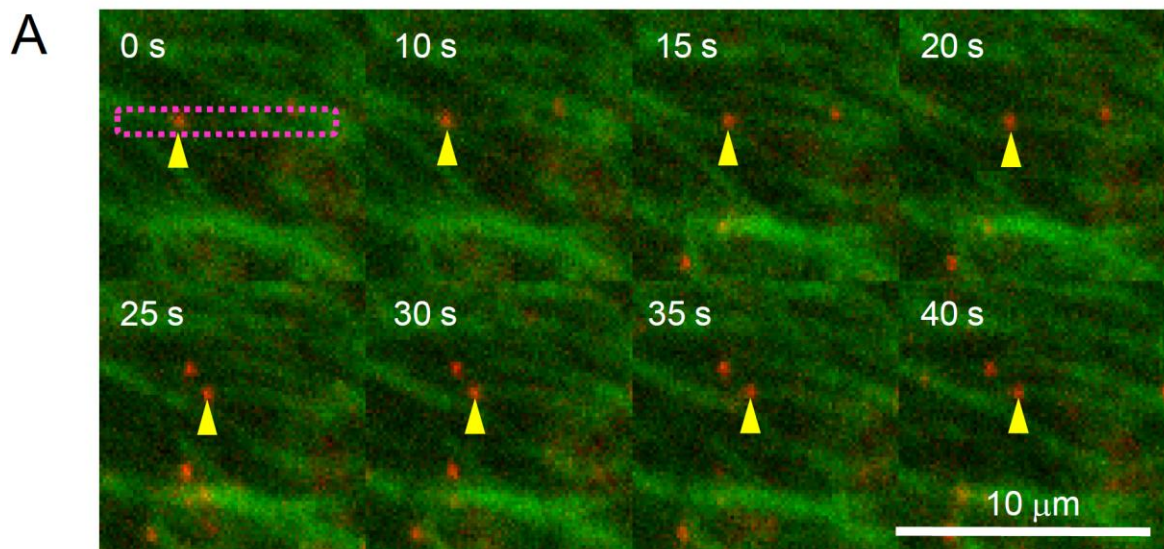


Figure 24. AtGCP2 の表層微小管上での移動

(A) 表層微小管に沿って移動する AtGCP2 シグナル (矢尻)。 (B) (A) のピンクで示唆される微小管領域のキモグラフ。矢尻のところで移動していることがわかる。

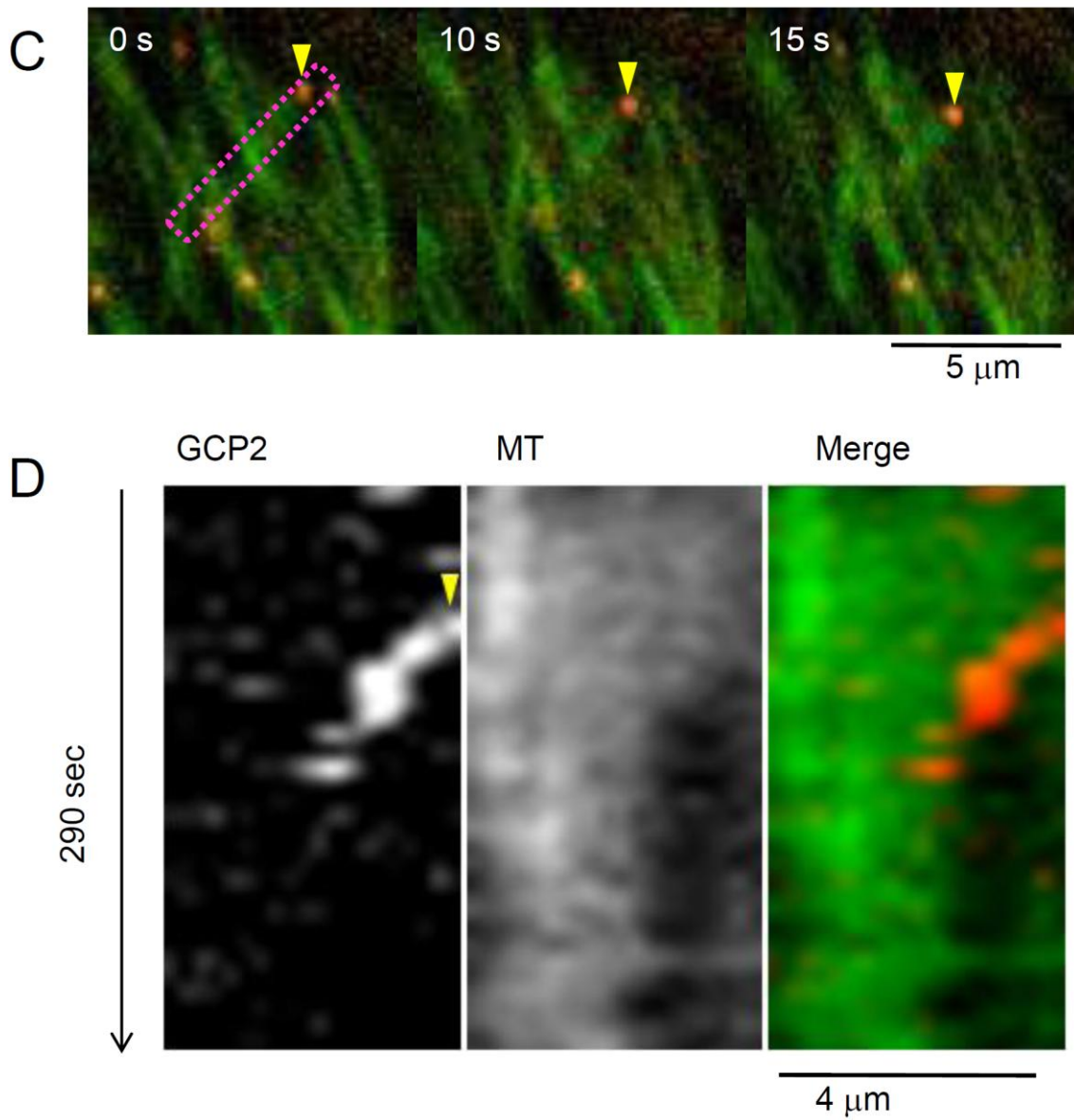


Figure 24. AtGCP2 の表層微小管上での移動

(C) AtGCP2 シグナル (矢尻) が脱重合するマイナス端に付随して動いている。(D) (C) のピンクで示唆される微小管領域のキモグラフ。矢尻のところから移動していることがわかる。

4. 考察

4-1. *AtGCP2*T-DNA 挿入株 *atgcp2-1* の解析

微小管形成における γ チューブリン複合体の役割の研究は動物や酵母で行われてきている。ハエの GCP2 オーソログ Dgrip84 の変異体は分裂期における微小管構造の構築に欠損が見られ、1 齢か 2 齢の間に死に至り (Colombié et al., 2006)、出芽酵母や分裂酵母の GCP2 オーソログ、それぞれ Spc97p と Alp4p の欠損変異株も微小管構造に異常が見られ致死性を示した (Knop et al., 1997, Vardy and Toda, 2000)。予想された通り、本研究では、シロイヌナズナ GCP2 ホモログの T-DNA 挿入株である *atgcp2-1* 変異株はホモに変異を持つ種子を産出できなかった。そして、*atgcp2-1* 変異は配偶子の形成と機能に致命的な影響を及ぼした。これらの様々な生物種における変異体解析は γ チューブリン複合体の保存された GCP2 がそれぞれの生物種の生存に必須であることを示した。

シロイヌナズナでは、2 つの γ チューブリン機能を同時に欠損させると、異常な微小管構造を示し配偶体の細胞分裂に致命的な損傷を与え、90%以上の雌性配偶子と 60%以上の雄性配偶子が正常に機能しない (Pastuglia et al., 2006)。 γ チューブリン損失によるこの影響は *atgcp2-1* 変異による影響と全く同じであった。これは AtGCP2 と γ チューブリンが同じ複合体に存在し同時に機能している結果であると考えられる。*atgcp2-1* 変異植物体の配偶体はその発生における欠損から様々な表現型を示していた (Fig. 14CD)。これは親となる孢子母細胞から γ チューブリンと GCP2 を含むプールが配偶体に持ち込まれ、その量の閾値によって数回の細胞分裂が可能かどうかを決定しているからかもしれない。*atgcp2-1* 変異の雌性配偶体における影響が雄性配偶体に比べて大きいことは、雌性配偶体が雄性配偶体よりも細胞量が大きく 3 回もの有糸分裂を必要とすることに起因するかもしれない。

4-2. *AtGCP2* 一アミノ酸置換変異株 *spr3* の解析

近年、25 Å の解像度の電子顕微鏡法と γ チューブリンの金粒子ラベル法、in vivo FRET によって出芽酵母の γ TuSC 構造が解析された (Kollman et al., 2008)。その結果、複合体は「Y」型をしていると予測された。「Y」字の縦棒の部分が酵母の GCP3 と GCP2 ホモログである Spc98p と Spc97p の N 末で形成され、上部の 2 つの腕を Spc98p と Spc97p の C 末とそれぞれに結合する γ チューブリンで形成されていた。*AtGCP2* の *spr3* 変異であるグリップモチーフ 1 の G305R 変異は「Y」字の二股の付け根付近の縦棒のダイマー化している部位に位置すると考えられ

る。また、本研究の酵母 2 ハイブリッド法の結果からも *spr3* 変異が AtGCP2 と AtGCP3 の結合を弱めていることが示唆された。*spr3* 変異株において微小管の形成頻度に影響がなかったことから、*spr3* 変異型 AtGCP2 は生体内では γ チューブリン複合体に取り込まれ、AtGCP3 との相互作用も他の γ チューブリン複合体構成因子の助けを得ることで安定化されているのかもしれない。

spr3 変異細胞では微小管動態に野生型細胞との差が見られた。変異細胞ではプラス端の伸長速度が減少し、マイナス端でのレスキュー頻度が増加していた。分裂酵母で、GCP2 ホモログの変異や C 末の過剰発現によってプラス端のカタストロフ頻度が減少したり微小管が停止状態にすることが長くなったりと、微小管動態に影響が出ることが報告されている (Zimmerman and Chang, 2005; Masuda et al., 2006)。また他にも、分裂酵母で GCP2、GCP3、GCP6 ホモログや γ チューブリンの変異による微小管プラス端動態の変化が報告され、 γ チューブリン複合体によって微小管動態が制御されていることが示唆されている (Raynaud-Messina and Merdes, 2007)。これらは、マイナス端の一定した脱重合によって遊離チューブリンの量が制御されプラス端の偏った伸長を促すモデル (Waterman-Storer and Salmon, 1997) による。試験管内実験において、 γ チューブリン複合体がマイナス端に結合しキャップ構造をとることで脱重合を防いでいることが示されている (Wiese and Zheng, 2006)。また、今回の動態解析により、AtGCP2 の一部が微小管のマイナス端に付随している可能性が示されている (Fig. 24)。このことから、*spr3* 変異株では、微小管重合核の異常がレスキュー頻度を増加させ遊離チューブリン量の減少を引き起こし、その結果プラス端の伸長速度が減少したのかもしれない。*spr3* 変異型 AtGCP2 のゲノムに GFP を付加したコンストラクトを T-DNA 挿入ノックアウト *atgcp2-1* 変異株に導入することで *spr3* 変異株と同じ右にねじれる表現型を示す形質転換を得ることができた (Fig. 25)。今後はこの形質転換体を用い、*spr3* 変異型 AtGCP2 と微小管の局在解析を行うことで、*spr3* 変異の微小管動態への影響が詳細に解析されると期待される。

新規の微小管形成角度に *spr3* 変異の特徴的な影響が見られた。シロイヌナズナやタバコ培養細胞における微小管のライブイメージングから、新たな微小管は既存の微小管上から分岐するように形成され、その角度は約 40° に規定される (Murata and Hasebe, 2007)。*spr3* 変異細胞では微小管形成角度の分布が拡がり、平均値がわずかに増加していた。また、AtGCP2 と γ チューブリンの局在解析から、AtGCP2 を含む γ チューブリン複合体が分岐に存在していると考えられる (Fig. 16, ;Murata et al., 2005) ことから、*spr3* 変異による微小管形成角度

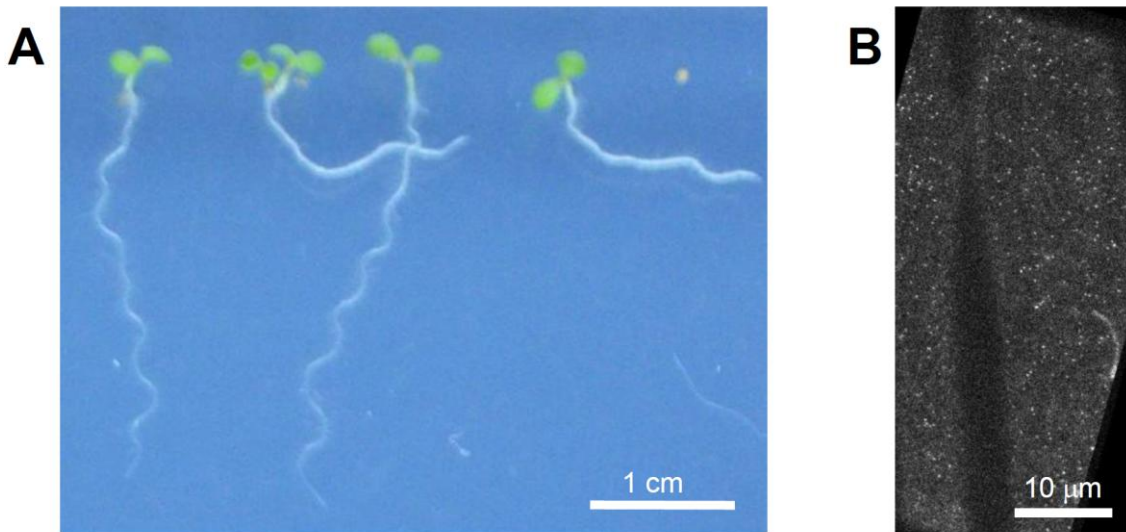


Figure 25. *spr3* 変異型 GenomicGCP2(G305)-3GFP 形質転換体は右巻きねじれを引き起こす。

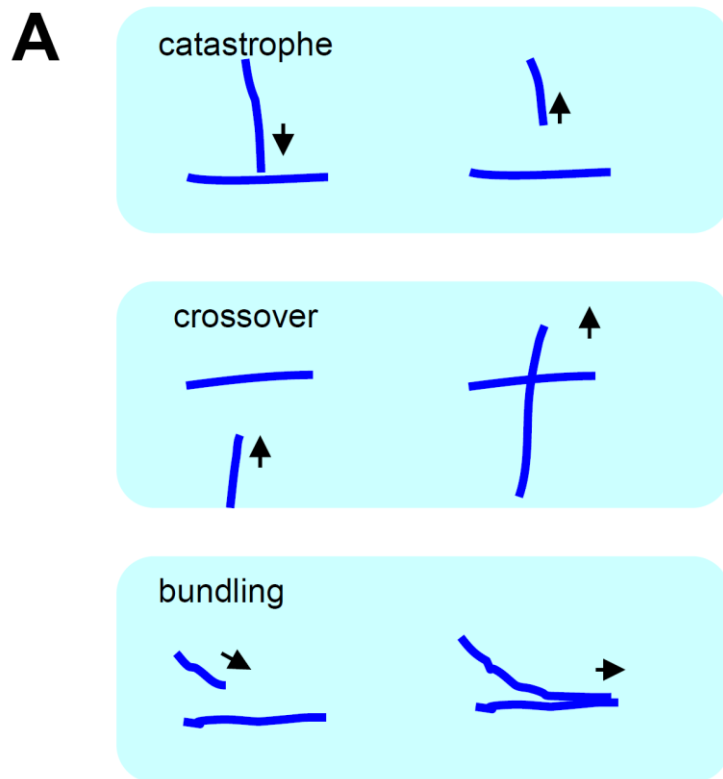
(A) 播種後 7 日目の幼植物体。 *atgcp2-1* ヘテロ植物体に *Genomic GCP2 (G305R)-3GFP* を導入した T2 世代。 *spr3* 変異株と同様の右巻きねじれにねじれる表現型を示す植物体が観察された。現在は安定にねじれる T3 世代を得ることができている。(B) GenomicGCP2(G305)-3GFP / *atgcp2-1* 植物体暗所胚軸における GFP の局在。野生型 AtGCP2-3GFP のシグナルと同様に表層にドットとして観察された。

の変化は γ チューブリン複合体と既存の微小管の構造的に 40° と決定された相互作用において AtGCP2 が重要であることを示唆している。アクチンフィラメントも一定の角度を持って分岐すると知られているが、構造解析から actin-related 2/3 (Arp2/3) 複合体構造が足場となるアクチン繊維と新規に形成されるアクチン繊維の間の特徴的な角度 70° を決定していることがわかった (Rouiller et al., 2008)。植物細胞における 40° という微小管形成角度も同様に、関わるタンパク質同士の相互作用による γ チューブリン複合体の形態が物理的な制御に必要であると考えられる。今後は複合体因子の同定を行い、微小管にどのように結合しているかを解析する必要がある。

4-3. 右巻きねじれ伸長と微小管形成

植物細胞において、細胞表層にある微小管は伸長軸に対して垂直に配向することで、細胞壁の最内層にあるセルロース微繊維の配向を介した細胞の伸長方向の決定に重要な役割を果たしている。これまでの研究から微小管動態が表層微小管形成に重要であることが微小管薬剤の実験とねじれ変異株の研究から示されている (Nakamura et al., 2004; Ishida et al., 2007a)。*spr3* 変異株でも微小管のプラス端とマイナス端の動態は変化していた。しかし、*spr3* カタニン二重変異株は微小管を形成部位から切り離すことなく、遊離のマイナス端を作らない変異株ではあるが、*spr3* 変異株同様右巻きのねじれを引き起こした。このことは、微小管のマイナス端の動態が *spr3* 変異株のねじれには必要ではないことを意味する。

2本の微小管がプラス端の伸長により接触するとき、その後の反応が元ある微小管に対して近づいてくる微小管の入射角によって決まることが知られている。入射角が 40° 以下の場合、伸長してきた微小管は対する微小管に沿うように伸長を続け (Bundling)、 40° 以上の場合、脱重合により短縮するか (Catastrophe) 乗り越えて交差する (Crossover) (Dixit and Cyr, 2004; Ehrhardt, 2008; Fig. 26A)。微小管形成角度は 40° 以下であり、微小管形成角度と新規形成微小管の伸長先の対する微小管への束化が特徴的な伸長軸に対して横の配向に重要であると考えられている (Murata and Hasebe, 2007)。右巻きのねじれる *spr3* 変異株では微小管形成角度の分布が拡がり、平均値が大きくなっていった。実際、*spr3* 変異株では微小管同士の相互作用を観察すると、Catastrophe の割合が野生型の 20.4% に比べ、42.6% と増大していた (Fig. 26B)。カタニン *spr3* 二重変異株でも同様に微小管形成角度の分布が拡がり、平均の値



B

	wild type (<i>n</i> =60)	<i>spr3</i> (<i>n</i> =75)
Catastrophe	20.4%	42.6%
Crossover	40.8%	30.7%
Bundling	38.8%	26.7%

Figure 26. *spr3*変異株における個々の微小管同士の相互作用

(A) 微小管相互作用を Catastrophe、crossover、bundling に分類した (Dixt and Cyr, 2004; Ehrhardt, 2008)。 (B) GFP-TUB6 形質転換体を使用し、野生型胚軸細胞と *spr3* 変異型胚軸細胞での新規の微小管の他の微小管との相互作用を観察した。計測微小管数を (*n*) で示す。

が大きくなり、右巻きねじれの表現型を示していた。微小管の形成角度の異常が表層微小管の特徴的な横の配向の形成と維持に影響を与えたと考えられる。

一定したヘリックスの配向の形成には微小管自体の左右性の関与が考えられる (Ishida et al., 2007b)。形成角度異常の他の *spr3* 変異株のねじれを引き起こす可能性としては、微小管原繊維自体のねじれが原因と考えられる。多くの細胞では、微小管の軸と原繊維が平行に並ぶ 13 本の原繊維からなる微小管を持つことが報告されているが (Ishida et al., 2007a)、いくつか例外も報告されている。In vitro の系では 9 から 16 本の原繊維からなる微小管が形成され、中でも 14 本のものが大部分である (Chretien and Wade, 1991)。原繊維 13 本の微小管は原繊維が軸に対して平行に並ぶ真っ直ぐな構造をとるが、13 本以外の本数で形成される微小管は、原繊維が軸に対して傾いてしまいゆるやかならせん構造 (スーパーツイスト構造) が形成される (Fig. 27A)。例えば、12 本からなる微小管は右巻きのらせん状となり、14 本からなる微小管は逆に左巻きとなる (Chretien and Wade, 1991)。この原繊維の数の決定に中心体が重要な役割を果たすことが報告されている。In vitro で微小管を重合させると 98% が 14 本の微小管を形成するが、単離した中心体と共に反応させると 82% の微小管が 13 本の原繊維からなる微小管であった (Evans et al., 1985)。これは中心体に存在する γ チューブリン複合体が微小管形成の鋳型と成り 13 本という数を規定した結果だと考えられる。*spr3* 変異細胞では γ チューブリン複合体の形成に異常が起こり、原繊維の数の制御に損傷が起こっている可能性がある。それにより、ねじれを持った微小管が形成され、適切な微小管配向がとれなくなっているのかもしれない (Fig. 27B)。この仮説を明らかにするためには、変異株における微小管原繊維構造を観察する必要がある。

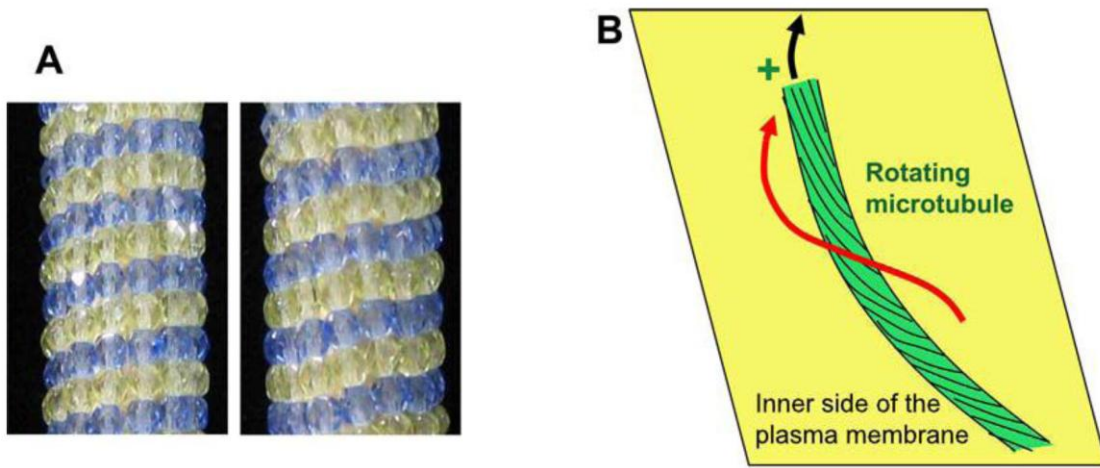


Figure 27. 原繊維の数の違いによる微小管のねじれ構造

(A) 微小管の軸に沿って真っ直ぐな 13 本の原繊維からなる微小管 (Left) と原繊維の数の違いによるねじれた微小管 (Right)。青と黄色のビーズでそれぞれ α , β チューブリンを表す。(B) ねじれた微小管構造のため、プラス端から回転するようにねじれて伸長するかもしれない。植物の表層微小管は細胞膜に張り付いている。(Ishida et al., 2007b より転載)

4-4. 植物細胞における微小管形成機構

AtGCP2 を蛍光タンパク質と共焦点レーザー顕微鏡で視覚化できたことにより、初めて微小管重合核を介した植物の微小管形成が観察された。このことから植物の表層微小管形成機構のモデルが考えられる (Fig. 28A)。一過的に細胞表層に出現する AtGCP2 が 7 割以上を占め、8 割以上が表層微小管上に出現しているようであった。表層表面に占める微小管の割合は $63.4 \pm 6.9\%$ ($n = 4$ cells) であり、微小管と細胞膜の比率というよりも、微小管がより標的とされやすいことが考えられた。このとき、AtGCP2 のシグナルが微小管のシグナルと少しでも被っている場合と隣接している場合を微小管上と定義しているが、実際は直径 25 nm の微小管を蛍光を用いて間接的に 200 nm の解像度で見ていることに注意しなければならない。微小管上に出現したもののうち 3 割が直ちに活性化され微小管を形成する。また、オリザリン処理により表層に微小管がない状況でも AtGCP2 は細胞膜に局在することができた。このことから、AtGCP2 を含む微小管重合核が細胞膜にアンカーされる機構があることが考えられ、しかしその結合は長時間維持できないものと考えられた。AtGCP2 の細胞表層への長時間の滞在と新規微小管形成活性は既存の足場となる微小管が必要であることが示唆された (Fig. 28B)。カタニン変異株における AtGCP2 を観察することで、カタニンの切断部位が既存の足場となる微小管と AtGCP2 の間ではなく、AtGCP2 と新規微小管の間であることが示唆された。これは、カタニンがオリゴマー化し ATP 活性と微小管依存的に微小管を切断するという動物で予想されているカタニンの活性と矛盾しない (Hartman and Vale, 1999)。微小管形成活性の後、AtGCP2 は消失するが、主にカタニンによる切断が要因となる (9 / 14 particles)。微小管マイナス端が短縮し始めてから AtGCP2 が消失することも稀にあり (2 / 14)、また、カタニン変異株で見られたように、野生型においても新規微小管がプラス端からの脱重合によりなくなると AtGCP2 は細胞表層から消失する (3 / 14)。

微小管非依存的な形成を含め、新規微小管の形成には 3 種類存在した。これまでに観察されていた角度を持った微小管形成と角度のない微小管形成である。既存の微小管に沿った新規微小管の形成は、即座に束化微小管を形成する。微小管の束化は植物細胞表層における微小管の特徴で、架橋する構造体が存在することは電子顕微鏡写真により確認されている (Hardham and Gunning, 1978)。特に MAP65 ファミリーが架橋タンパク質の候補として研究されており、最近では MAP65 のホモダイマーが微小管の反対向きに平行になるように架橋することが実証されている (Gaillard et al., 2008)。束化した微小管束は個々の微小管ポリマーをその中に捕獲することで、細胞における微小管の主要な極性を作り上げ配向化に重要な要因となる (Ehrhardt and Shaw, 2006)。また、束化微

小管束は個々の微小管よりも安定であり、この安定性が細胞の形態を形成するセルロース繊維の配向を決めるセルロース合成酵素の案内に不可欠なものとなる (Paredes et al., 2006)。つまり、新たに確認された形成機構、微小管に沿って微小管を形成し束化微小管を積極的に作成することは、表層微小管の配向化にとって非常に理にかなった機構と考えられる。微小管形成機構と表層微小管の配向化のモデルを段階毎にまとめた (Fig. 29)。

胚軸細胞では表層微小管の配向は周期的に変化することが知られている。微小管の生細胞での視覚化により、1つの細胞に注目すると、200 から 800 分で一回転するような速度で、表層微小管の配向の角度が時計回りもしくは反時計回りに変化し、再構築されることが示された (Hejnowicz, 2005; Chan et al, 2007)。植物は光や接触などの環境要因の変化に応答して迅速に伸長方向を変換する必要がある。その際、この表層微小管の急速な再構成機構は重要となると考えられた (Chan et al., 2007)。微小管の配向変化というダイナミズムをもたらすかもたらさないかは角度を持った微小管形成を行うか、角度のない形成を行うかの選択によるものかもしれない。今後、環境に応答した分岐形成機構と束化形成機構の使い分けの制御を理解することが、細胞形態形成のさらなる理解に繋がると期待される。

遺伝学的解析から微小管の配向化は様々なシグナルによる制御を受けていることが考えられる (Camilleri et al., 2002; Naoi et al., 2004)。微小管の配向に重要な束化タンパク質 MAP65 もその時間的制御はリン酸化によって負に制御されている (Smertenko et al., 2006)。 *spr3* 変異株の葉の表皮細胞における微小管配向異常と形態異常は plant-type small GTPase (ROP2 と ROP4) の発現が減少したシロイヌナズナや ROP2/4 のエフェクター RIC1 が過剰発現したシロイヌナズナ変異株の葉の表皮細胞のそれらに似ていた (Fu et al., 2005)。また *ric1* 変異株において微小管形成の異常が見られている (Yang unpublished observations)。このことは ROP2/4 シグナル系に微小管形成が関与している可能性を示唆する。動物細胞では、 γ チューブリン複合体の構成因子である GCP-WD のリン酸化部位をアラニンに置換すると、 γ チューブリン複合体が適所に行けず紡錘体の微小管が減少することが報告され (Lüders et al., 2006)、微小管形成の時間空間的制御の重要性が示唆されている。

本研究により、植物における微小管形成重合核による微小管形成と微小管配向化の関係性、角度を持った形成の意義、角度のない微小管形成が文字通り目に見え始めてきた。基本的な生命現象であるが未解明であった表層微小管形成機構を明らかにできたことは非常に意義深い。しかし、じつはまだその解明のための道具が手に入ったにすぎない。植物間期細胞においても、微小管形成活

性は時間的空間的に制御されていると考えられる。今後は、 γ チューブリン複合体構成成分やそれを膜にアンカーする因子、活性を制御する因子を単離同定することで、さらなる微小管形成機構の解明が期待される。

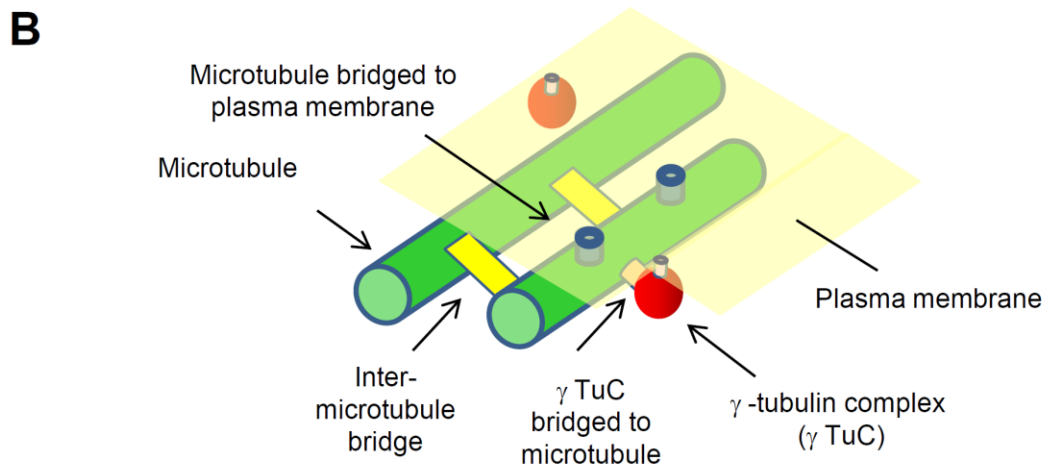
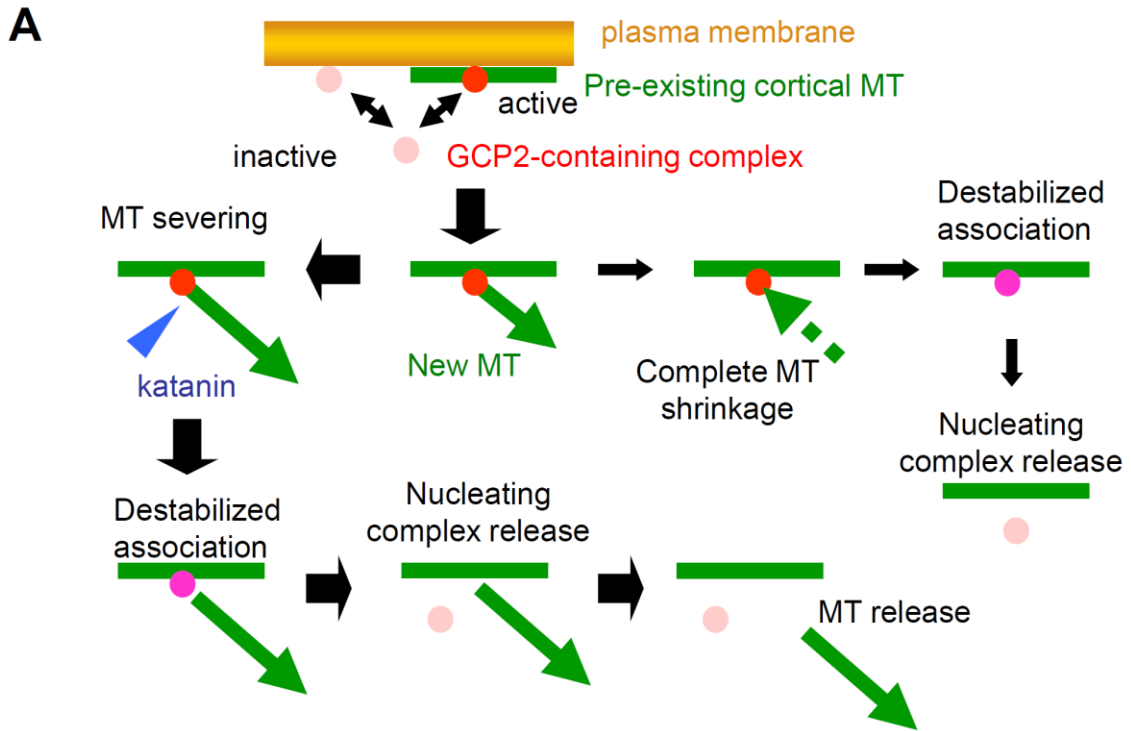


Figure 28. 微小管形成機構と表層微小管配向化

(A) 植物細胞における表層微小管形成機構のモデル。AtGCP2 を含む複合体の細胞表層へのリクルートメントと微小管形成活性、微小管からの解離機構。(B) γ チューブリン複合体と表層微小管と細胞膜の関係性モデル。 γ チューブリン複合体は微小管と細胞膜に結合する機構があると考えられる。

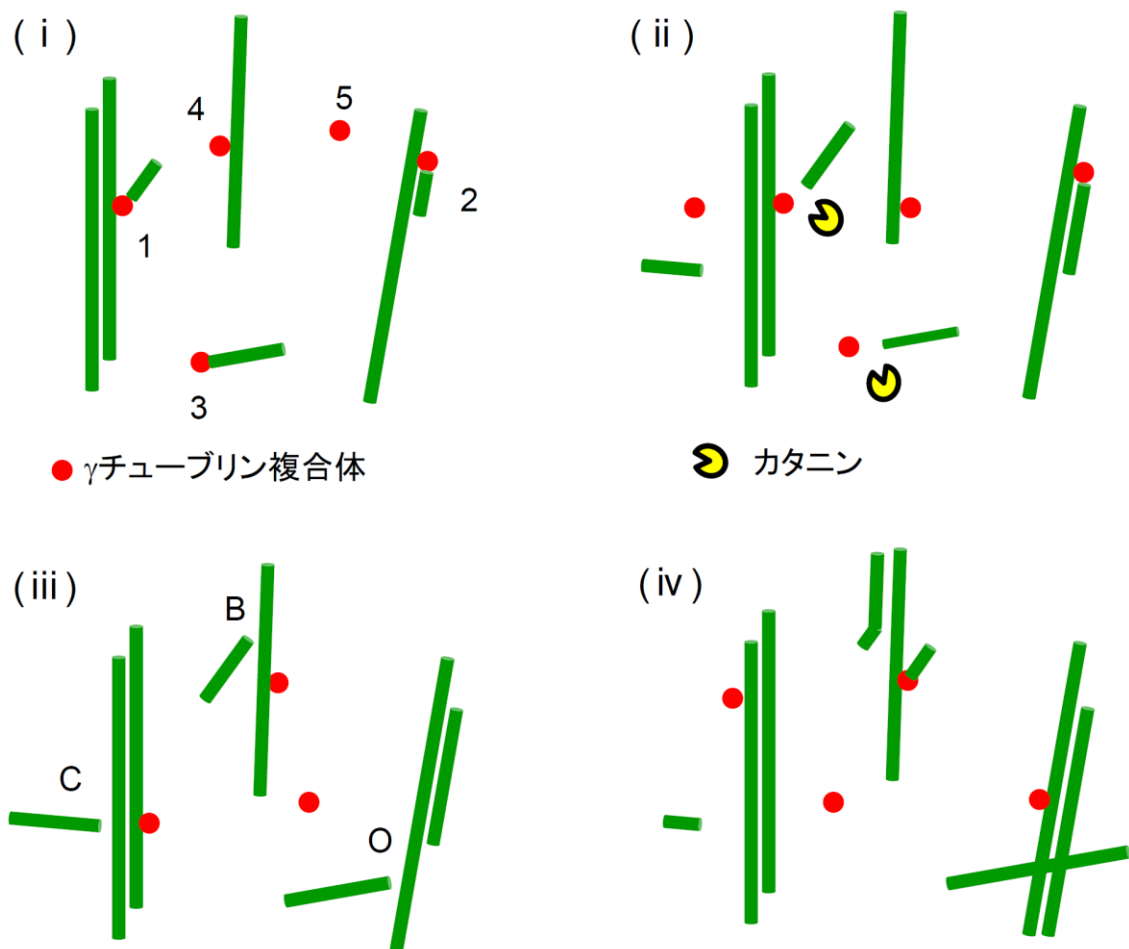


Figure 29. 微小管形成機構と表層微小管配向化

(B) (i) γ チューブリン複合体が細胞表層に結合して微小管形成を行う。数字は Fig. 17 に対応する。(ii) 新規形成微小管は形成部位からカタニンによって切り離される。(iii) 角度依存的な微小管同士の相互作用 (Fig. 26)。B; bundling、C; Catastrophe、O; crossover。

5. 参考文献

- Abe, T. and Hashimoto, T. (2005) Altered microtubule dynamics by expression of modified α -tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant J.* 43, 191-204.
- Abe T, Thitamadee S, Hashimoto T. (2004) Microtubule defects and cell morphogenesis in the lefty1lefty2 tubulin mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 211-20.
- Alberts B., Johnson A., Walter P., Lewis J., Raff M. and Roberts K. (2008) *Molecular Biology of the Cell* (5th Revised edition) Garland
- Baskin TI. (2005) Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21, 203-22.
- Bichet, A., Desnos, T., Turner, S., Grandjean, O. and Höfte, H. (2001) *BOTERO1* is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant J.* 25, 137-148.
- Binarová, P., Cenklová, V., Procházková, J., Doskočilová, A., Volc, J., Vrlik, M. and Bögre, L. (2006) γ -tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1199-1212.
- Bouquin, T., Mattsson, O., Næsted, H., Foster, R. and 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, 791-801.
- Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H. and Ye, Z. (2001) A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* 13, 807-827.
- Burk DH, Ye ZH. (2002) Alteration of oriented deposition of cellulose

microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell*. 14, 2145-60.

Camilleri C, Azimzadeh J, Pastuglia M, Bellini C, Grandjean O, Bouchez D. (2002) The Arabidopsis TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* 14, 833-45.

Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW. (2003) EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. *Nat Cell Biol*. 5, 967-71.

Chan J, Calder G, Fox S, Lloyd C. (2007) Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in Arabidopsis hypocotyl epidermal cells. *Nat Cell Biol*. 9, 171-5.

Chrétien, D. and Wade, R.H. (1991) New data on the microtubule surface lattice. *Biol. Cell* 71, 161-174.

Christensen, C.A., King, E.J., Jordan, J.R. and Drews, G.N. (1997) Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the Gf mutant. *Sex. Plant Reprod*. 10, 49-64.

Colombié, N., Vérollet, C., Sampaio, P., Moisand, A., Sunkel, C., Bourbon, H., Wright, M. and Raynaud-Messina, B. (2006) The *Drosophila* γ -tubulin small complex subunit Dgrip84 is required for structural and functional integrity of the spindle apparatus. *Mol. Biol. Cell* 17, 272-282.

Davis SJ, Vierstra RD. (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol*. 36, 521-8.

Dixit, R. and Cyr, R. (2004) Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell* 16, 3274-3284.

Dhonukshe, P., and Gadella, T.W. Jr. (2003) Alteration of microtubule dynamic instability during preprophase band formation revealed by yellow fluorescent protein-CLIP170 microtubule plus-end labeling. *Plant Cell* 15, 597-611.

Drykova D, Cenklova V, Sulimenko V, Volc J, Draber P, Binarova P. (2003) Plant gamma-tubulin interacts with alphabeta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell*. 15, 465-80.

Ehrhardt DW. (2008) Straighten up and fly right: microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants. *Curr Opin Cell Biol*. 20, 107-16.

Ehrhardt, D.W. and Shaw, S.L. (2006) Microtubule dynamics and organization of the plant cortical array. *Annu. Rev. Plant Biol*. 57, 859-975.

Erhardt M, Stoppin-Mellet V, Campagne S, Canaday J, Mutterer J, Fabian T, Sauter M, Muller T, Peter C, Lambert AM, Schmit AC. (2002). The plant Spc98p homologue colocalizes with gamma-tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *J Cell Sci*. 115, 2423-31.

Evans L, Mitchison T, Kirschner M. (1985) Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol*. 100, 1185-91.

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

Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, Yang Z. (2005) Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120, 687-700.

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(20), 4443-53.

Gaillard J, Neumann E, Van Damme D, Stoppin-Mellet V, Ebel C, Barbier E, Geelen D, Vantard M. (2008) Two microtubule-associated proteins of *Arabidopsis* MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol Biol Cell*. 19, 4534-44.

Gunawardane RN, Martin OC, Cao K, Zhang L, DeJ K, Iwamatsu A, Zheng Y. (2000) Characterization and reconstitution of *Drosophila* gamma-tubulin ring complex subunits. *J Cell Biol*. 151:1513-24.

Gunawardane RN, Martin OC, Zheng Y. (2003) Characterization of a new gammaTuRC subunit with WD repeats. *Mol. Biol. Cell* 14, 1017-26.

Gunning BES and Hardham AR (1982) Microtubules *Annu Rev plant Physiol*. 33, 651-698.

Hardham AR, Gunning BE. (1978) Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *J Cell Biol*. 77, 14-34.

Hartman JJ, Vale RD. (1999) Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science*. 286, 782-5.

Heath IB. (1974) A unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis. *J Theor Biol*. 48, 445-9.

Heitz MJ, Petersen J, Valovin S, Hagan IM. (2001) MTOC formation during mitotic exit in fission yeast. *J. Cell Sci*. 114, 4521-4532

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, 243-56.

Ishida, T., Kaneko, Y., Iwano, M. and Hashimoto, T. (2007a) Helical microtubule arrays in a collection of twisting tubulin mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 8544-8549.

Ishida, T., Thitamadee, S. and Hashimoto, T. (2007b) Twisted growth and organization of cortical microtubules. *J. Plant Res.* 120, 61-70.

Job D, Valiron O, Oakley B. (2003) Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 111-7.

Knop, M., Pereira, G., Geissler, S., Grein, K. and Schiebel (1997) The spindle pole body component Spc97p interacts with the γ -tubulin of *Saccharomyces cerevisias* and functions in microtubule organization and spindle pole body duplication. *EMBO J.* 16, 1550-1564

Kollman, J., Zelter, A., Muller, E.G.D., Fox, B., Rice, L.M., Davis, T.N. and Agard, D.A. (2008) The structure of the γ -tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation. *Mol. Biol. Cell* 19, 207-215.

Korolev, A., Buschmann, H., Doonan, J.H. and Lloyd, C.W. (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, 2241-2247.

Kumagai F, Yoneda A, Tomida T, Sano T, Nagata T, Hasezawa S. (2001) Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells. *Plant Cell Physiol.* 42, 723-32.

Lambert AM. (1993) Microtubule-organizing centers in higher plants. *Curr Opin Cell Biol.* 5:116-22.

Le, J., Malley, E.L., Zhang, C., Brankle, S. and Szymanski, D.B. (2006) *Arabidopsis* BRICK1/HSPC300 is an essential WAVE-complex subunit that selectively stabilizes the Arp2/3 activator SCAR2. *Curr. Biol.* 16, 895–901.

Liu B, Marc J, Joshi HC, Palevitz BA. (1993) A gamma-tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci.* 104, 1217–28.

Lüders J, Patel UK, Stearns T. (2006) GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat Cell Biol.* 8, 137–47.

Marc J. (1997) Microtubule-organizing centres in plants. *Trends Plant Sci* 2:223–229

Masuda H, Miyamoto R, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2006) The carboxy-terminus of Alp4 alters microtubule dynamics to induce oscillatory nuclear movement led by the spindle pole body in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells.* 11, 337–52.

Mathur, J. and Chua, N. (2000) Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. *Plant Cell* 12, 465–478.

Mitchison T, Kirschner M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312, 237–42.

Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasegawa, S., Nagata, T., Horio, T. and Hasebe, M. (2005) Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ -tubulin in higher plants. *Nature Cell Biol.* 7, 961–968.

Murata, T. and Hasebe, M. (2007) Microtubule-dependent microtubule nucleation in plant cells. *J. Plant Res.* 120, 73–78.

Murphy SM, Urbani L, Stearns T. (1998) The mammalian gamma-tubulin complex contains homologues of the yeast spindle pole body components spc97p and spc98p. *J. Cell Biol.* 141, 663-74.

Murphy SM, Preble AM, Patel UK, O'Connell KL, Dias DP, Moritz M, Agard D, Stults JT, Stearns T. (2001) GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell.* 12, 3340-52.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and 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, 34-41.

Nakajima, K., Furutani, I., Tachimoto, H., Matsubara, K. and 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.

Nakamura, M., Naoi, K., Shoji, T. and Hashimoto, T. (2004) Low concentrations of propyzamide and oryzalin alter microtubule dynamics in *Arabidopsis* epidermal cells. *Plant Cell Physiol.* 45, 1330-1334.

Naoi, K. and Hashimoto, T. (2004) A semi-dominant mutation in an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase phosphatase-like gene compromises cortical microtubule organization. *Plant Cell* 16, 1841-1853.

Oakley CE, and Oakley BR. (1989) Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 20, 662-4

Oegema K, Wiese C, Martin OC, Milligan RA, Iwamatsu A, Mitchison TJ, Zheng Y. (1999) Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J Cell Biol.* 144, 721-33.

Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*. 312, 1491-5.

Pastugilia, M., Azimzadeh, J., Goussot, M., Camilleri, C., Belcram, K., Evrard, J., Schmit, A., Guerche, P. and Bouchez, D. (2006) γ -tubulin is essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1412-1425.

Pastuglia, M. and Bouchez, D. (2007) Molecular encounters at microtubule ends in the plant cell cortex. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 557-563.

Perrin, R.M., Wang, Y., Yuen, C.Y.L., Will, J. and Masson, P.H. (2007) WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 49, 961-971.

Raynaud-Messina, B. and Merdes, A. (2007) γ -tubulin complexes and microtubule organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 24-30.

Rouiller, I., Xu, X., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkman, N. and Hanein, D. (2008) The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 180, 887-895.

Schnurr, J.A., Storey, K.K., Jung, H.G., Somers, D.A. and Gronwald, J.W. (2006) UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Planta* 224, 520-532.

Sedbrook, J.C., Ehrhardt, D.W., Fisher, S.E., Scheible, W.R. and Somerville, C.R. (2004) The *Arabidopsis sku6/spirall* gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *Plant Cell* 16, 1506-1520.

Seltzer, V., Janski, N., Canaday, J., Herzog, E., Erhardt, M., Evrard, J.

and Schmit, A. (2007) Arabidopsis GCP2 and GCP3 are part of a soluble γ -tubulin complex and have nuclear envelope targeting domains. *Plant J.* 52, 322–331.

Shoji, T., Narita, N.N., Hayashi, K., Asada, J., Hamada, T., Sonobe, S., Nakajima, K. and Hashimoto, T. (2004) Plant-specific microtubule-associated protein SPIRAL2 is required for anisotropic growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136, 3933–3944.

Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W. (2003) Sustained microtubule treadmill in Arabidopsis cortical arrays. *Science* 300:1715–1718.

Thitamadee, T., Tuchiara, K. and Hashimoto, T. (2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* 417, 193–196.

Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Bögre L, Hussey PJ. (2006) Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J Cell Sci.* 119, 3227–37.

Thitamadee, T., Tuchiara, K. and Hashimoto, T. (2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* 417, 193–196.

Tran PT, Marsh L, Doye V, Inoué S, Chang F. (2001) A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J. Cell Biol.* 153, 397–411

Vardy, L. and Toda, T. (2000) The fission yeast γ -tubulin complex is required in G₁ phase and is a component of the spindle assembly checkpoint. *EMBO J.* 19, 6098–6111.

Wasteneys GO. and Williamson RE. (1989) Reassembly of microtubules in *Nitella tasmanica*: assembly of cortical microtubules in branching clusters and its relevance to steady-state microtubule assembly. *J. Cell Sci.* 93:705–714

Wasteneys GO. (2002) Microtubule organization in the green kingdom: chaos

or self-order? *J Cell Sci.* 115, 1345-54.

Wiese, C. and Zheng, Y. (2006) Microtubule nucleation: γ -tubulin and beyond. *J. Cell Sci.* 119, 4143-4153.

Yao, M., Wakamatsu, Y., Itoh, T.J., Shoji, T. and Hashimoto, T. (2008) *Arabidopsis* SPIRAL2 promotes uninterrupted microtubule growth by suppressing the pause state of microtubule dynamics. *J. Cell Sci.* 121, 2372-2381.

Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T. (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* 378:578-83

Zimmerman S, Chang F. (2005) Effects of γ -Tubulin Complex Proteins on Microtubule Nucleation and Catastrophe in Fission Yeast. *Mol Biol Cell.* 16:2719-33.

小宮有吾 細胞伸長が異常なアラビドプシス変異株の解析 (修士論文、2004)

中村匡良 植物細胞における微小管の形成と動態の解析 (修士論文、2005)

6. 謝辞

本論文は、著者が奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士後期課程に所属した4年間とそれまでの前期課程の2年間の研究成果をまとめたものです。本研究を進めるにあたり、研究の立案を初め、研究全般にわたり、御助言と御指導を賜りました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橋本隆教授に心より感謝いたします。

スタンフォード大学のDavid Ehrhardt 博士には、本研究を遂行するにあたり、共焦点レーザー顕微鏡の使用の受け入れや適切な御指導と御助言を頂きました。深く感謝いたします。

本研究を行う上で、適宜適切な御助言や御指導を頂いた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中島敬二准教授と庄司翼助教、加藤壮英助教に深く感謝いたします。

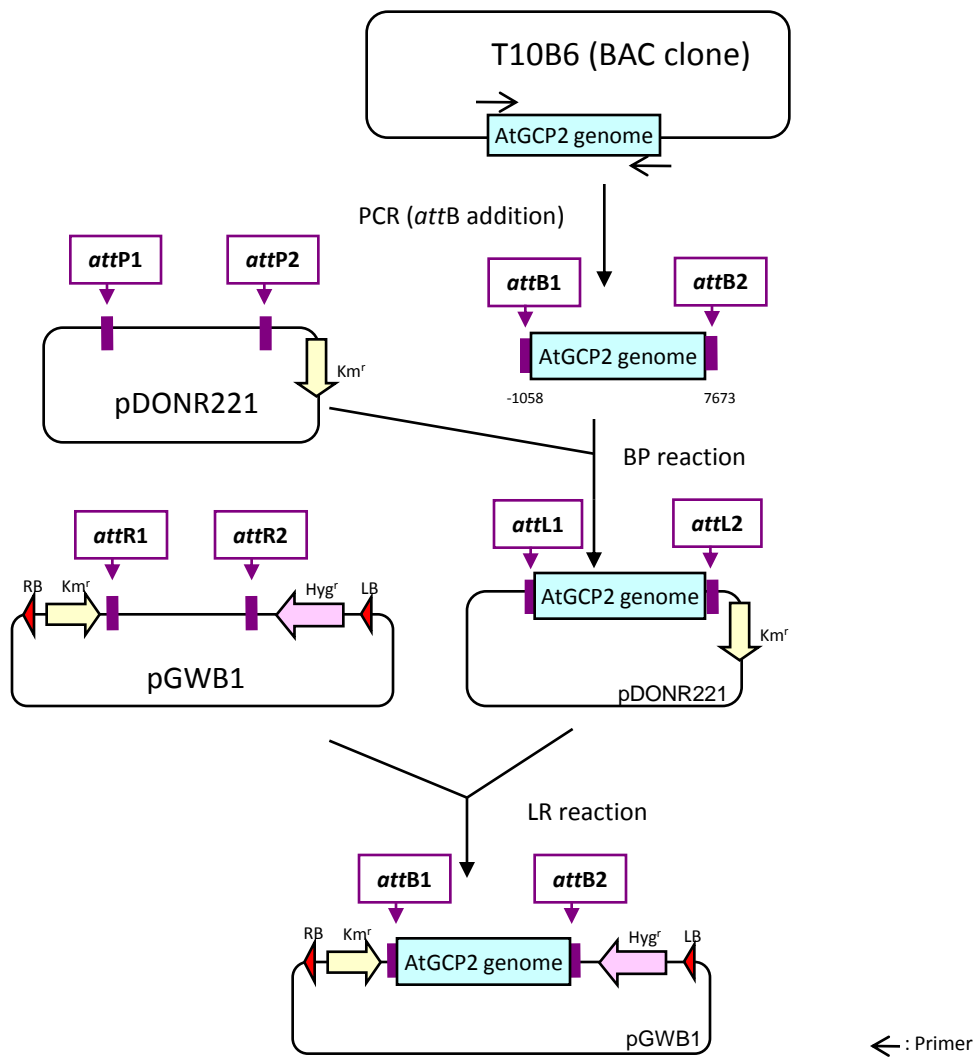
実験を行うにあたり、適切で丁寧な御指導を賜りました直井国子博士と阿部竜也博士、稲井康二博士、石田喬志博士に心より感謝いたします。

研究の日々を支えていただいた山下聡美氏に深くお礼申し上げます。

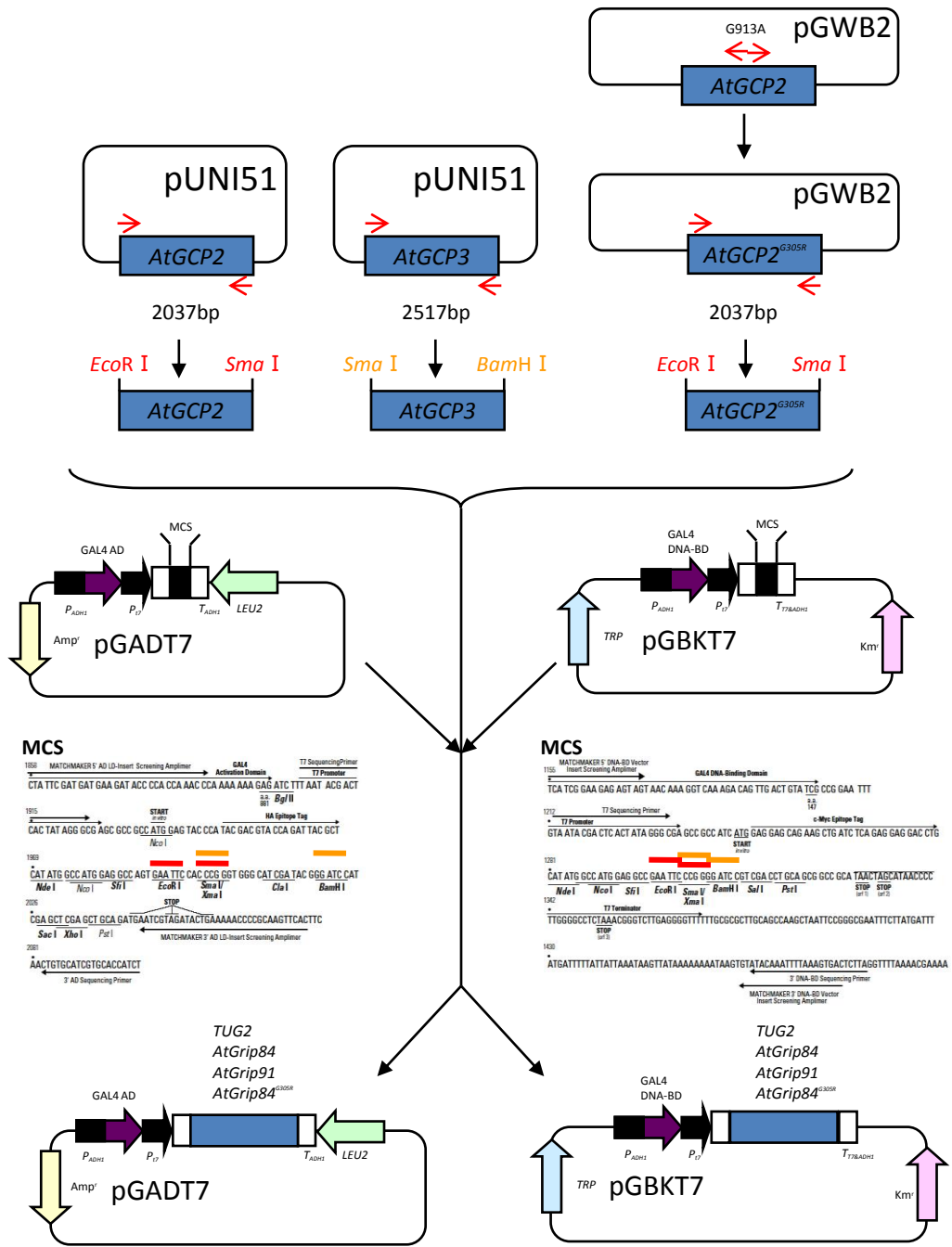
常に暖かい雰囲気を実験のみならず実験外にも助言や励ましを与えて頂きました研究室の諸先生方ならびに皆さまのおかげで、楽しく自由に研究生活の日々を過ごすことができました。心よりお礼申し上げます。

最後に、いつも温かく見守り、支えてくれました中村吉則・はるみ夫妻に心から感謝いたします。

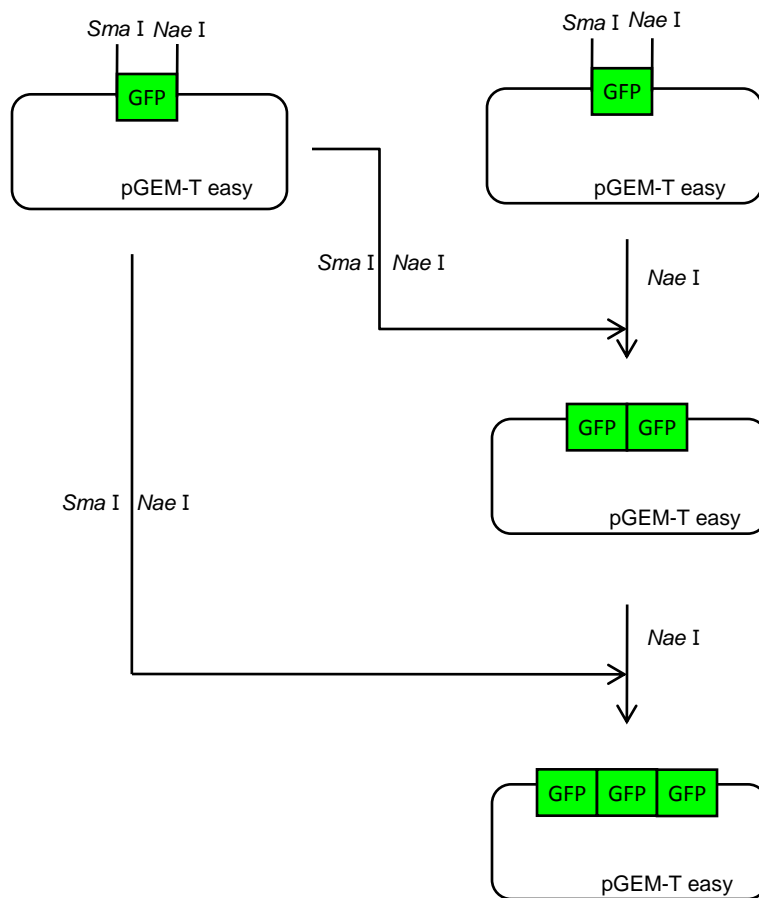
平成21年 1月



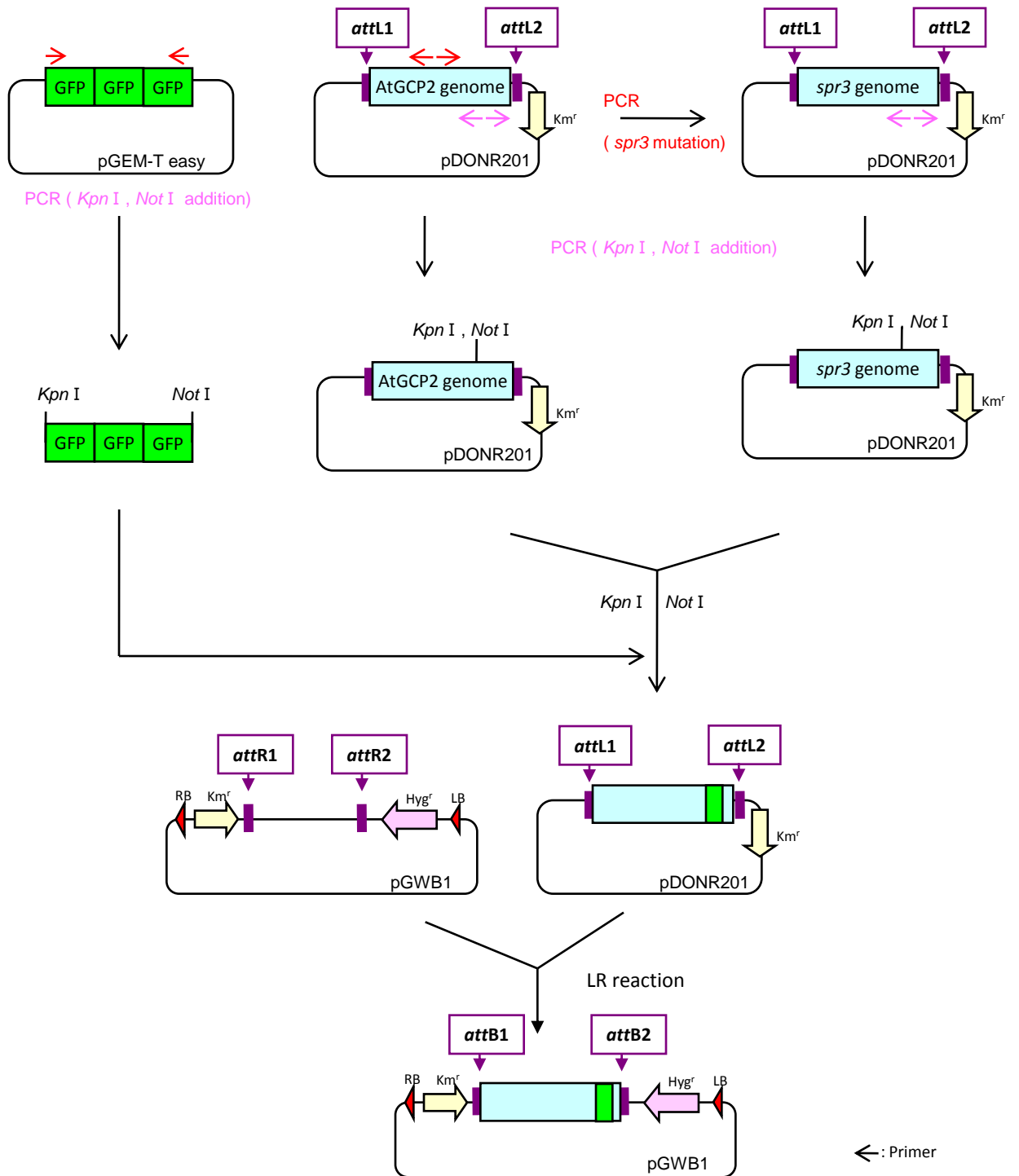
Appendix 1. Gateway technology を用いたAtGCP2ゲノム発現ベクターの作製



Appendix 2. 酵母Two-Hybrid法に用いたコンストラクト
AtGCP2, *AtGCP3*, *AtGCP2^{G305R}* を pGADT7, pGBKT7 に挿入した。



Appendix 3. 3GFP (smRS GFP) コンストラクト



Appendix 4. GenomicAtGCP2-3GFP, *spr3*型GenomicGCP2-3GFP コンストラクト