

博士論文番号:0581009

# アラビドプシス微小管プラス端集積タンパク 質 **EB1** の機能解析

小牧 伸一郎

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 22 年 1 月 25 日提出

# 目次

<b>1 序論</b>	<b>1</b>
1-1 微小管の動的不安定性およびプラス端の構造変化	
1-2 植物の細胞周期における微小管構造およびプラス端局在場所	
1-3 微小管結合タンパク質	
1-4 プラス端集積タンパク質	
1-5 EB1 タンパク質	
<b>2 材料と方法</b>	<b>12</b>
2-1 植物の生育条件および形質転換植物の作出	
2-2 <i>in vitro</i> 微小管結合実験および微小管重合実験	
2-3 <i>in vitro</i> における EB1s のダイマー形成能の検証	
2-4 EB1c に含まれる核局在シグナルの同定	
2-5 形質転換用コンストラクトの作製	
2-6 アラビドプシス <i>eb1</i> 変異体の解析	
2-7 タバコ BY-2 培養細胞の <i>NtEB1c</i> の抑制	
2-8 TAIL-PCR	
2-9 EB1 の結合タンパク質の単離	
<b>3 結果</b>	<b>18</b>
3-1 <i>in vitro</i> activity	
3-2 <i>eb1</i> 変異体の微小管重合阻害剤に対する感受性検定	
3-3 <i>eb1</i> 変異体における微小管構造物	
3-4 <i>eb1</i> 変異体における分裂期の染色体移動	
3-5 アラビドプシス EB1s の発現領域および細胞内局在性	
3-6 相補性試験によるアラビドプシス EB1s の機能分化の検証	
3-7 EB1 の結合タンパク質の探索	
<b>4 考察</b>	<b>52</b>
4-1 アラビドプシス EB1s の機能ドメイン	
4-2 アラビドプシス EB1s の変異体解析	
4-3 アラビドプシス EB1s の発現領域および細胞内局在性	
4-4 植物特異的な配列をもつ EB1c の C 末配列の機能	
4-5 アラビドプシス EB1s の結合タンパク	
<b>5 参考文献</b>	<b>63</b>
<b>6 謝辞</b>	<b>75</b>

# 1 序論

## 1-1 微小管の動的不安定性およびプラス端の構造変化

微小管はアクチンと同様に全ての真核生物に高度に保存された細胞骨格の一つであり、細胞形態、細胞極性、細胞内輸送、細胞分裂など様々な細胞機能に関与することが知られている。微小管を構成する基本構造は $\alpha$ チューブリンと $\beta$ チューブリンのヘテロダイマーであり、このヘテロダイマーが長軸方向に規則的に並ぶことで一本のプロトフィラメントを形成する。微小管はこのプロトフィラメントが 13 本並ぶことで直径 25nm の中空の筒状構造を作る。このため微小管はそれ自身が極性を持ち、 $\beta$ チューブリンが位置する側をプラス端、 $\alpha$ チューブリンが位置する側をマイナス端と呼ぶ(図 1)。

微小管は新たな $\alpha, \beta$ チューブリンのヘテロダイマーが結合することで伸長し(重合)、逆にかい離すると短縮する(脱重合)。さらに伸長から短縮への状態移行をカタストロフと呼び、短縮から伸長への状態移行をレスキューと呼ぶ。伸長と短縮を繰り返す微小管の特徴は動的不安定性(dynamic instability)と呼ばれ、微小管動態を制御するために重要な役割を果たしている(図 1)。この動的不安定性は微小管の両端で起きるが、プラス端でより激しく伸長と短縮が起こる。生物はこの動的不安定をうまく利用することで様々な微小管構造を作り出す。後述する"Search-and-capture"モデルもこの動的不安定性を基本としている。

$\alpha, \beta$ チューブリンは共にグアニンヌクレオチド結合タンパク質であり、それぞれ結合部位を1カ所ずつ持っている。このうち $\beta$ チューブリンの結合部位はヘテロダイマー間のインターフェイスに位置しているため、外部からの加水分解を受けやすい状態にある。 $\beta$ チューブリンには GTP も GDP も結合可能であるが、細胞質中に存在する遊離のチューブリンヘテロダイマーのうち、多くの $\beta$ チューブリンには GTP が結合している。この GTP 分子はヘテロダイマーが微小管に取り込まれると $\beta$ チューブリンが持つ GTPase 活性により加水分解が行われ GDP に変換されるが、このとき、 $\alpha$ チューブリンの持つ GAP (GTPase activating protein) 活性により加水分解が促進される(図 1)。

この機能により微小管の大部分は GDP 結合型チューブリンで構成されるが、プラス端にはまだ加水分解を受けていない GTP 結合型チューブリンで構成されている部分を持つ。このように微小管のプラス端にある GTP 結合型チューブ

リンを多く含む部分を **GTPcap** と呼ぶ(図 1)。また **GTP** 結合型チューブリンのヘテロダイマーでは $\alpha, \beta$ のチューブリンが一直線上に整列するのに対し、**GDP** 結合型チューブリンのヘテロダイマーでは $\beta$ チューブリンがやや外側に反ったような状態になることが知られている(Krebs et al., 2006)。このため **GTPcap** が存在する状態では、微小管の構造は維持され伸長する。一方、チューブリンの重合速度が低下し、加水分解の速度を下回ると **GTPcap** が消失し、微小管は構造が維持できなくなり短縮を始める。このとき、脱重合し続ける端に **GTPcap** が再構築されるのに十分な **GTP** 結合型チューブリンのヘテロダイマーが重合すると再び伸長を始める(Desai and Mitchison 1997)。伸長している微小管と短縮している微小管のプラス端は異なった構造を持つことが **cryo-電子顕微鏡 (cryo-EM)**を用いた研究から明らかとなっている。伸長している微小管のプラス端ではプロトフィラメントの束が平行に並ぶことで二次元的なシートを形成し、そのシートが伸長とともに丸まるように閉じていくことで円筒形の微小管構造を形成する(Chrétien et al., 1995)。一方、短縮中の微小管のプラス端はプロトフィラメント同士の横方向の結合が失われ、カールした構造をとることが観察されている(Mandelkow et al., 1991)(図 1)。

## 1-2 植物の細胞周期における微小管構造およびプラス端局在場所

植物は細胞周期に合わせさまざまな微小管構造を作る(図 2, Wasteneys, 2002)。植物の細胞分裂は動物とは異なり、分裂面に細胞壁のもととなる細胞板が細胞の中心部から円盤が広がるように形成される。この細胞板が徐々に拡大し、既存の細胞壁と融合することで仕切りとして新しい細胞壁ができ、細胞分裂が完了する。分裂期に入った細胞では将来分裂面ができる位置に分裂準備帯 (**Preprophase band; PPB**) と呼ばれる微小管が密に並んだ構造物が作られる。どのようにして **PPB** が細胞分裂面を決定し、その情報を分裂後期まで記憶させているかは明確になっていないが、**PPB** の形成には **Phosphatase** である **TONNEAU2 (TON2)** や **Kinesin** の一種である **PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN 1 と 2 (POK1, POK2)**、そして **POK1,2** に結合する **TANGLED** といったタンパク質が関与することが示唆されている。これらの遺伝子の欠損変異体ではいずれも分裂面に異常が生じることが知られている(Camilleri et al., 2002; Müller et al., 2006; Walker et al., 2007)。また **PPB** が形成されていた領域には分裂期を通じてアクチンフィラメントが見られないアクチン排除領域 (**actin depleted zone; ADZ**) が存在することや(Clearly et al.,

1992; Hoshino et al., 2003)、ADZ を挟むように形成されるアクチンフィラメントが密に存在する領域(microfilament twin peaks; MFTP)が観察されている(Sano et al., 2005)。これらの構造はいずれも将来の分裂面の決定に重要な働きをすると考えられており、PPB 消失後にその位置情報を記憶するための機構にも関与すると思われる。細胞が分裂期に入ると微小管は動物細胞と同様に紡錘体を形成し染色体を細胞の両端へと等分する。このとき、微小管のプラス端と染色体が正確に結合することが染色体の分離および紡錘体の形成自体に重要である(Wood et al., 1997; Maiato et al., 2004)。動物細胞ではアストラル微小管と呼ばれる紡錘体の位置を安定させる微小管が中心体から細胞膜方向へ形成されることが知られている(Ito et al., 1994)。一方、植物では長年アストラル微小管は観察されていなかったが、近年いくつかの研究でその存在が示唆されている(Chan et al., 2005; Gaillard et al., 2008)。分裂後期になると微小管はシリンダー状に凝集して、フラグモプラストと呼ばれる微小管構造物を形成する。フラグモプラストの位置は形成初期には紡錘体の傾きに依存するが、その後 PPB によって示された分裂面へと修正されていく(Smith, 2001)。またフラグモプラストでは多くの微小管がプラス端を内側に向くように配置されており、ゴルジ小胞などを輸送することで細胞板を拡大していく。このときの細胞板には PATELLIN や TPLATE といったタンパク質が含まれることが示されており、どちらも細胞板の正常な形成に必要であると考えられている(Peterman et al., 2004; Van et al., 2006)。拡大した細胞板が PPB の存在した分裂予定位置に到達するとフラグモプラストは消滅して細胞分裂が完了する。このように分裂期の微小管のプラス端は局在場所が正確に規定されており、この配向が乱れると微小管構造物の形成や極性に異常が生じる(図 2)。間期には表層微小管と呼ばれる細胞膜の直下を、細胞を取り囲むように配向する特殊な微小管構造が現れる。植物細胞の伸長方向はセルロース微繊維が“たが”のように働くことで決定されると考えられているが(Baskin, 2005)、表層微小管はこのセルロース微繊維の配向を規定していると思われ、細胞の伸長方向の決定に重要な役割を果たす(図 3)。細胞の伸長方向の決定における微小管の重要性はアラビドプシスにおけるさまざまな変異体解析より明らかになりつつある。表層微小管がうまく配向できず植物が左巻きの表現形を示す *lefty1*、*lefty2* は微小管を構成するチューブリンに変異が生じた変異体である(Thitamadee et al., 2002; Abe et al., 2004)。また同じように表層微小管の配向に異常が生じ植物体がねじれてしまう変異体として *spiral1*、*spiral2* 変異体が知られている。これらの原因遺伝子はどちらも植物に特有のタンパク質をコードしており、表層微小管の制御機構に関わると考えられている(Nakajima et al., 2004; Sedbrook et al., 2004; Buschmann et al., 2004; Shoji et al., 2004; Yao et al., 2008)(図 3)。

### 1-3 微小管結合タンパク質

微小管には多くのタンパク質 (Microtubule-associated protein; MAP) が結合することで動態や空間的制御に関与していることが知られている。動物での MAPs と微小管の関係性は、培養細胞を用いた *in vivo* の解析と微小管の再構築系を用いた *in vitro* の解析法が確立されており、体系的な研究が進みつつある。MAP2/Tau や MAP4 は過剰発現した細胞では微小管の重合や束化が促進し、低温や微小管重合阻害剤などに対し耐性を示す。これらの活性は暗視野顕微鏡による *in vitro* の実験でも確かめられており、MAP2/Tau, MAP4 は微小管安定化 MAP であると考えられている (Al-Bassam et al., 2002; Permana et al., 2005)。これとは逆に Op18/Stathmin は 2 組のチューブリンダイマーと結合することで、新たなチューブリンダイマーの微小管への取り込みを妨げ微小管重合速度の低下を引き起こさせる微小管不安定化 MAP である (Gigant et al., 2000; Ravelli et al., 2004)。現在までにこれらの MAPs のホモログは植物のゲノム中からは発見されていない。

一方で、動物や植物に共通な MAP である XMAP215/TOG ファミリーはアフリカツメガエルの卵抽出物から発見された MAP であり、微小管を安定化することが知られている (Gard and Kirschner, 1987)。アラビドプシスにおけるホモログタンパク質である MOR1 も同様に微小管の重合を促進すると考えられ、MOR1 の温度変異株である *mor1-1* は制限温度条件下で生育すると表層微小管が短く断片化する (Hussey et al., 2002; Kinoshita et al., 2002; Whittington et al., 2001)。また、分裂期の微小管構造である紡錘体やフラグモプラストの形成にも大きな影響が生じる (Kawamura et al., 2006)。MAP65 はタバコ BY-2 培養細胞から生化学的手法により単離された MAP であり (Jiang and Sonobe, 1993)、アラビドプシスには 9 つの MAP65 ファミリーが存在する。MAP65 ファミリーの特徴として微小管を束化する性質が知られている (Jiang and Sonobe, 1993)。この束化の現象は MAP65 がダイマーを形成し、微小管と微小管を架橋する活性によって起こることが *in vitro* で観察されている (Smertenko et al., 2004; Chan et al., 1999)。また、近年のさらなる研究によって AtMAP65-1 および AtMAP65-5 は微小管をアンチパラレルに架橋することも明らかとなった (Gaillard J et al., 2008)。AtMAP65-3 はフラグモプラストの midzone に局在し、フラグモプラストの微小管の安定性に関与している (Müller et al., 2004; Van et al., 2004)。また、同じくフラグモプラストに局在する NtMAP65-1 は MAPK

**cascade** によってリン酸化されることが明らかとなっている(Sasabe et al., 2006)。リン酸化された **NtMAP65-1** は束化活性を失い、微小管の安定性を変化させることでフラグモプラストの制御を行っていると思われる。

近年、植物特異的な **MAPs** もいくつか発見されている。**SPIRAL1** は約 **12kDa** の低分子量タンパク質で、**in vivo** ではすべての微小管構造物に局在する。**SPIRAL1** の欠損変異株では表層微小管が傾くことで植物体が右にねじれる表現形を示す(Nakajima et al., 2004; Sedbrook et al., 2004)。また、同様に欠損すると植物体が右にねじれる **SPIRAL2** は **HEAT** リピートを持つ **MAP** であり、**in vivo** および **in vitro** においても微小管に直接結合することで、より動的な微小管を作り出すことが明らかとなっている(Buschmann et al., 2004; Shoji et al., 2004; Yao et al., 2008)。アラビドプシスのゲノム中に 5 つ存在する **MAP70** ファミリーも植物特異的 **MAPs** に属し、**MAP70-1** および **MAP70-5** は **in vivo**、**in vitro** のどちらにおいても微小管に結合することが示されている(Korolev et al., 2005, 2007)。また、**MAP70-5** の過剰発現体は右ねじれの表現形を示すことから、表層微小管への関与が示唆されている(Korolev et al., 2007)。**WVD2** ファミリーはアラビドプシスゲノム中に 8 つの遺伝子が存在し、保存された共通配列である **KLLEK** モチーフを持つ。**WVD2** は **Ds** タグラインから選抜され、過剰発現することで生長が阻害され、弱いねじれの表現形を示す(Yuen et al., 2003)。また、**in vitro** の実験から微小管の束化活性を持つことが明らかとなっている(Perrin et al., 2007)。これらの遺伝子は植物にのみ存在することから植物特有の微小管制御機構や微小管構造の構築に関与することが期待されている。

#### 1-4 プラス端集積タンパク質

$\alpha$ チューブリンと $\beta$ チューブリンのヘテロダイマーから構成される微小管はそれ自身が 2 極性を持ち、よりダイナミックな動体を示すプラス端は細胞内においてさまざまな役割を果たすことが知られている。例えば、分裂時におけるキネトコアとの結合(DeLuca et al., 2006)および染色体分離(Gardner et al., 2008)や細胞の特定領域への小胞の輸送(Toda et al., 2008)、細胞の形や極性の決定(Etienne-Manneville and Hall et al., 2003; Sawin et al., 2004)といった現象に関与することが知られている。また、Kirschner と Mitchison は確率的に細胞内を伸縮している微小管が一定の配向を示す機構として”Search-and-capture”モデルを提唱した(Kirschner and Mitchison et al.,

1986; Vos et al., 2004)。このモデルは微小管のもつ動的不安定性によって細胞空間を自在に動いている微小管 (**search**) が細胞の局所に固定される (**capture**) ことで微小管が一定の場所に配置されるというものである。このとき細胞内の局所で微小管の動きを制御していると考えられるのが **plus-end-tracking proteins (+TIPs)** である(図 4)。

**+TIPs** は微小管のプラス端に局在するタンパク質群のことであり、微小管の動態や安定性、局在性などに重要な働きを示す。**+TIPs** の1つである **CLIP-170** は初めてプラス端特異的な局在が示されたタンパク質である。特徴として、伸長する微小管先端に特異的に集積し、脱重合が始まる直前にかい離することが観察され、その挙動はチューブリンドイマーと同様に **treadmill** によって常に伸長端に集積することが明らかになった(Perez et al., 1999)。さらに癌抑制タンパク質である **APC** や **APC** に結合するタンパク質として単離された **End-Binding Protein1(EB1)**、モータータンパクであるダイニンとその制御因子ダイナクチン、**CLIP-170** の結合するタンパク質として単離された **CLASP**(Akhmanova et al., 2001)など、さまざまな**+TIPs** が発見された。分裂酵母では、細胞伸長時に微小管が細胞の長軸に沿って伸長するが、その際に微小管のプラス端に **CLIP170** ホモログ **Tip1p** と **Tea1p** が集積し **Tip1p-Tea1p** 複合体を形成していることが知られている。**Tea1p** が欠損すると微小管の伸長が細胞端で停止せず、伸びすぎて細胞は湾曲した形になる(Behrens and Nurse 2002)。一方、**Tip1p** が欠損すると、微小管が細胞端に達する前に短縮してしまい正常な長さに細胞は伸長しない(Brunner and Nurse, 2000)。また、**Tip1p** のプラス端への局在にはキネシン様タンパク質である **Tea2p** および **EB1** のホモログである **Mal3p** が関与することがわかった(Browning et al., 2003)。これは **Tea2p** による **Tip1p** のプラス端への輸送とその場での **Mal3p** による安定的局在が必要であるためである。しかし、**Tea2p** のホモログを持たない脊椎動物では **CLIP-170** が **EB1** に直接結合することでプラス端局在性を示していることが明らかとなった(Bieling et al., 2008)。近年、このように生物間で保存されている **MAPs** においても性質が異なる **MAPs** がいくつか報告されている(Ambrose et al., 2007)。このように**+TIPs** 同士が複雑に結合することで微小管のプラス端を正確に制御し、さまざまな微小管構造を作り出す(図 4)。



## 1-5 EB1 タンパク質

+TIPs の 1 つである EB1 は酵母から動植物にいたる幅広い生物に高度に保存されている(Tirnauer and Bierer, 2000)。EB1 は、酵母 2 ハイブリッド法により癌抑制である APC の結合タンパク質として発見され、GFP を用いた研究から伸長中の微小管のプラス端に局在することがわかった(Su et al., 1995; Kiyosue et al., 2000)。また、EB1 は APC 以外にも現在発見されている多くの +TIPs(CLIP-115, CLIP-170, CLASP, p150<sup>Glued</sup>, dynactin など)と結合することから、プラス端のマスターレギュレーターとして働いているのではないかと推測されている(Vaughan, 2005; Akhmanova and Hoogenraad, 2005)(図 4)。このため、EB1 が欠損した細胞では様々な影響が出ることが知られている。例えば、出芽酵母では EB1 ホモログである Bim1p が欠損した変異株では紡錘体形成時に、極性因子である Kar9 と結合できずに核が正常に娘細胞に分配されないことが報告されている(Lee et al., 2000; Korinek et al., 2000)。ヒトの培養細胞では EB1 が Aurora B と結合することで PP2A の脱リン酸化作用から保護する役割を持つため、欠損すると Aurora B の活性制御に異常をきたし、細胞の癌化の一因となることが指摘されている(Sun et al., 2008)。個体レベルでの研究はいまだ少ないが、ハエでは EB1 の欠損により神経系の発達に異常が生じることが明らかとなっている(Elliott et al., 2005)。

in vitro の結果より、EB1 ファミリーのタンパク質はレスキューの頻度を上げ、また脱重合と停止の時間を減らすことで微小管を重合方向へ向かわせることがわかった(Morrison et al., 1998; Rogers et al., 2002; Tirnauer et al., 1999)。EB1 は N 末に微小管結合ドメイン、中央部にダイマー形成ドメイン、そして C 末には酸性のアミノ酸を多く含んだドメイン(Acidic tail)が生物間を問わず高度に保存されている(図 5)。上記で示した EB1 に結合するタンパク質の多くはこの C 末の Acidic tail を介して結合する。EB1 結合タンパク質の一つである p150<sup>Glued</sup> が存在することで in vitro における微小管重合活性が増加すること、また p150<sup>Glued</sup> が結合する C 末の Acidic tail を削ることで同様の活性が得られることから、EB1 は N 末と C 末が結合することで Auto-inhibition の形態をとることが示唆されている(Hayashi et al., 2005)。同様の現象は CLIP-170 においてもみられている(Lansbergen et al., 2004)。

アラビドプシスには 3 つの EB1 ホモログ(EB1a, EB1b, EB1c)が存在する。このうち EB1a と EB1b は他の生物の EB1 と非常によく似た構造を持ち(図 5)、植物体や培養細胞でも微小管の端に存在することが知られている(Chan et al., 2003; Mathur et al., 2003)。一方、EB1c の C 末は他の生物の EB1 とは異なる

り、酸性アミノ酸をほとんど含まない(図 5)。この酸性アミノ酸の少ない C 末をもつ EB1 は植物にのみ保存されており、局在場所も一般的な EB1 とは異なり、間期細胞において核内に存在する(Dixit et al., 2006)。これまでのところその機能の違いや微小管構造に与える影響は明らかになっていない。また動物や酵母で知られている EB1 結合タンパク質のうち CLIP-170 や APC を含む大部分のものが植物のゲノム中に存在しない。つまり植物の EB1 には特有のタンパク質群が結合することを示唆する。(図 4)

このように微小管には多くの微小管局在タンパク質がかかわることで微小管の安定性を制御し、細胞の状態にあった微小管構造を作り出す。なかでも、植物は細胞周期に合わせ他の生物にはないさまざまな微小管構造を作ることが知られている。このとき、微小管のプラス端は一定の局在を示すことでこれら微小管構造物の構築や安定性に寄与することが示唆されているが、分子レベルでの制御機構はいまだ明らかになっていない。プラス端の制御に直接かかわる +TIPs のうち動植物に共通してみられるものは非常に限られており、その局在が実際に確認されたものは EB1 および CLASP のみである。このうち CLASP は植物において、EB1 との結合能を失っているとみられ(Kirik et al., 2007)、局在も完全なプラス端ではないことが確認されている(Ambrose et al., 2007; Kirik et al., 2007)。一方、EB1 に関しては他の生物と同じく完全なプラス端への局在性を示す。さらに植物にはアラビドプシスにおける EB1c にあたる、特有の構造をもつ EB1 が高度に保存されている。また他の生物に見られる EB1 結合タンパク質の多くを欠落しており、植物に特異的な結合タンパク質の存在が考えられる。以上の点から EB1 の機能を明らかにすることは植物における微小管プラス端の制御機構を知るうえで非常に有効であると思われる。本研究ではアラビドプシスに存在する 3 つの EB1 の機能の違いを調べることで、植物の微小管構造の制御機構の一端を明らかにすることを試みた。

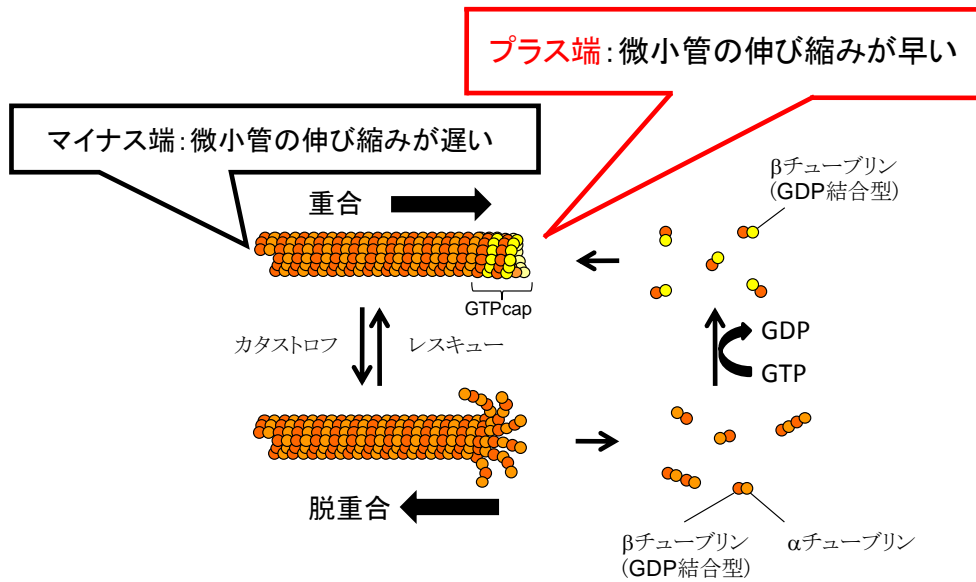


図 1 微小管の動的不安定性

プラス端集積タンパク質の一部は微小管プラス端の構造の違いや GTPcap を認識すると考えられている。

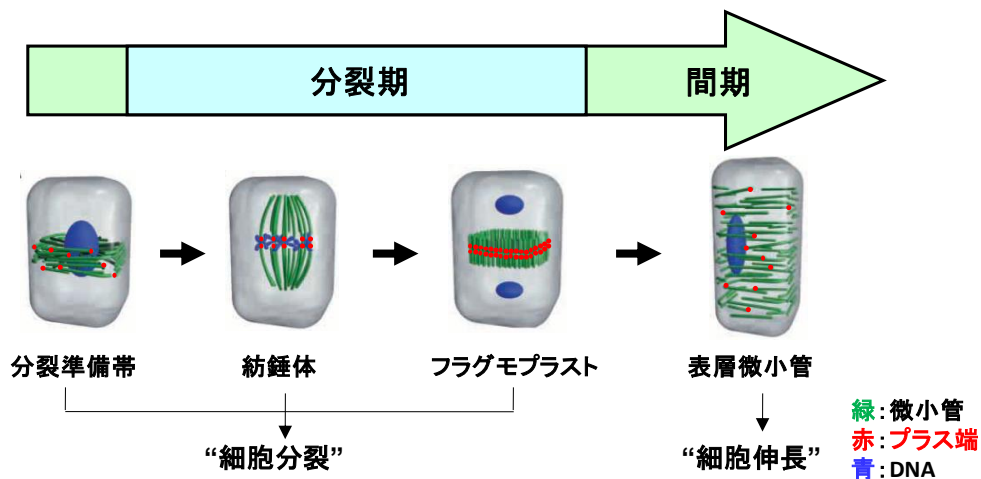


図 2 植物の細胞周期に合わせ形成されるさまざまな微小管構造物

微小管のプラス端は各構造物内で一定の局在性をもつ。

(Wasteneys, 2002 より改変して転載)

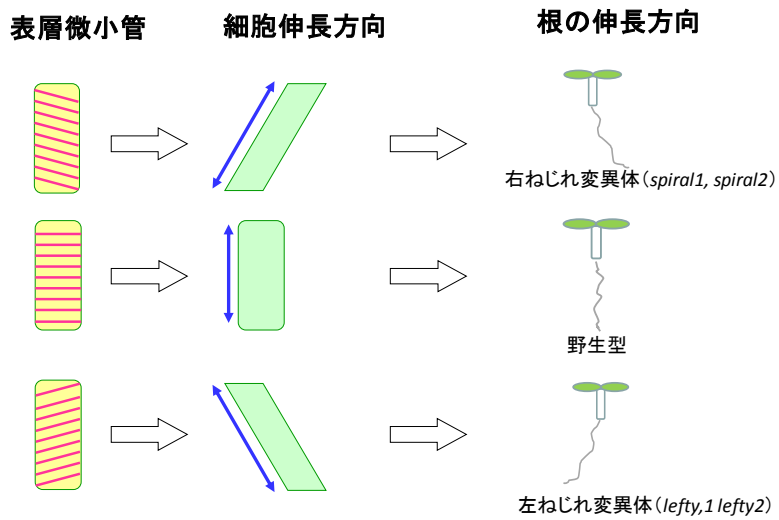


図 3 表層微小管による細胞の伸長方向の制御モデル

細胞膜直下の表層微小管に沿ってセルロース微繊維が形成される。形成されたセルロース微繊維は「たが」のように働くことで細胞の伸長方向を制御する。微小管(赤)、細胞の伸長方向(青矢印)

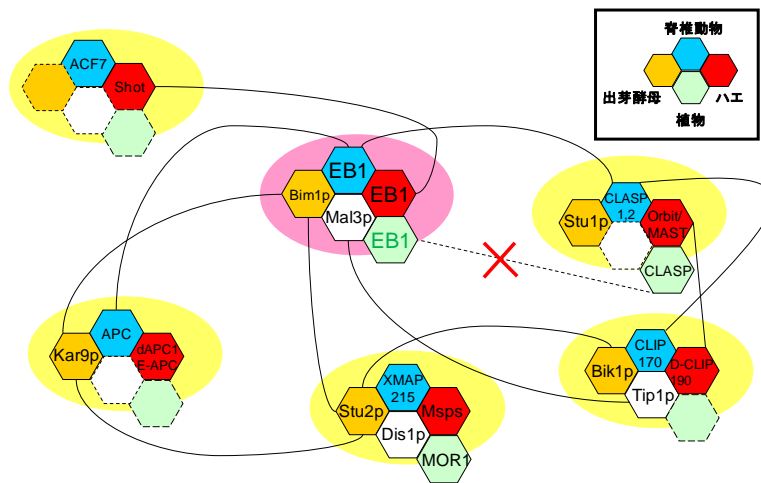


図 4 +TIPs の結合マップ

EB1 はこれまでに見つかった多くの+TIPs と結合する。しかしながら植物ではこれら EB1 結合タンパク質のほとんどがゲノム上に存在しない。

EB1の機能ドメイン (ヒト, 酵母 etc.)

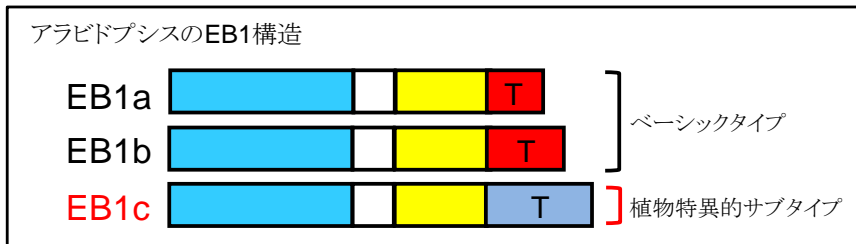
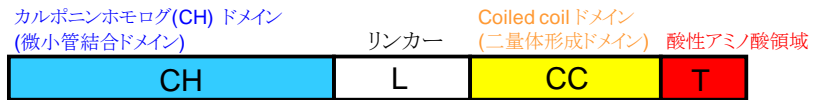


図 5 EB1 の構造比較

アラビドプシスには 2 種類の EB1 が存在する。このうち C 末に酸性アミノ酸をほとんど含まない EB1c は植物にのみ見つかっている。

## 2 材料と方法

### 2-1 植物の生育条件および形質転換植物の作出

アラビドプシス(*Arabidopsis thaliana*)は、5%次亜塩素酸及び1%Triton X-100の溶液で滅菌処理した種子を、4°Cの暗所に3日間放置して春化处理したものを、1%ショ糖と1.5%Agarを含むArabidopsis nutrient solution (2.5mM KNO<sub>3</sub>, 1.25mM KPO<sub>4</sub>, 1.0mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.0mM MgSO<sub>4</sub>, 35μM Fe/EDTA, 7μM MnCl<sub>2</sub>, 5μM NaCl, 0.5μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.25μM CuSO<sub>4</sub>, 0.1μM NaMoO<sub>4</sub>, 0.005μM CoCl<sub>2</sub>)の寒天培地に蒔き、22°C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°Cに移した日を0日目として日数を数えた。

タバコBY-2培養細胞(*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow NO.2)は、BY-2用液体培地[0.46%ムラシゲ・スクーク培地用混合塩類(和光純薬)、3% sucrose、0.05% MES、0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、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°C、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%ゲランガムと適当な抗生物質を含むBY-2固形培地で、28°C暗所にて培養した。

本研究で新たに作出したアラビドプシス及び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(アラビドプシス; Clough and Bent, 1998, BY-2培養細胞; 矢尾(2004)修士論文)。

### 2-2 in vitro 微小管結合実験および微小管重合実験

実験に使用したチューブリンはブタ脳から精製した。精製には元名古屋大学伊藤知彦准教授の方法(Ito et al., 1997)を用い、ブタ脳は京都食肉市場内、いけだ食品にて購入した。組換えEB1sは、大腸菌BL21(DE3)もしくは

Rosseta(DE3)株に導入し、0.1mM IPTG を添加後、37°C、3 時間もしくは16°C、24 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、リゾチームにより細胞を破壊、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。精製バッファーは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 MgCl<sub>2</sub>]に置換し、必要に応じて Amicon Ultra (Millipore)を用いて濃縮した。

精製後の 25 $\mu$ M チューブリンと 20 $\mu$ M タキソールおよび 1mM GTP を混合し、37 度、20 分間保温することで安定した微小管を形成した。つぎに検定を行う EB1s を 2 $\mu$ M ずつ加え再び 37 度、15 分間保温した。各サンプルを微小管が沈殿する強さ(100,000g)で 30 分間遠心することで沈殿(微小管結合画分)と上清(微小管非結合画分)に分け、SDS-PAGE によって分離後、CBB 染色によって EB1s のバンドを確認することで微小管への結合能を検定した。

濁度による微小管重合度の測定には、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 EB1s 組換えタンパク質(full EB1a,full EB1b,full EB1c, $\Delta$ T EB1b,  $\Delta$ T EB1c)を使用した。37°C、5 分間で前処理した 40  $\mu$  M チューブリン 35  $\mu$  l に 4  $\mu$  M EB1s を 35  $\mu$  l 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 20  $\mu$  M チューブリン、2  $\mu$  M EB1)。その後、あらかじめ 37°C に保温しておいたキュベット(70  $\mu$  l サイズ)に移し、温度制御マシン (CPS-240A, SHIMAZU) で 37°C 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 20 分間、濁度を測定した。EB1s 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。

## 2-3 in vitro における EB1s のダイマー形成能の検証

ホモダイマーおよびヘテロダイマーの形成能の検証には Pull-down アッセイを用いた。N 末に His タグを融合した全長の EB1s(10 $\mu$ M)を $\Delta$ CH EB1s(10 $\mu$ M)と混合し、37 度、5 分間保温した。各サンプルを 20mM Tris-HCl (pH7.4), 0.15M NaCl, 1mM DTT で平衡化した Ni-NTA agarose (Qiagen)に添加後、同じバッファーで洗浄した。その後、50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.5M NaCl, 0.5M イミダゾールでサンプルを溶出し、SDS-PAGE によって分離後、CBB 染色によってダイマー化を検証した。

## 2-4 EB1c に含まれる核局在シグナルの同定

EB1b(1-264)とEB1c(1-277)の N 末をそれぞれ pUC19 の *Bam*HIと *Kpn*I の間にクローニングした。次に EB1b(265-293)とEB1c(278-329)の C 末をそれぞれ先ほどの pUC19 の *Kpn*Iと *Sac*Iの間にクローニングすることでキメラ遺伝子を作製した。その後、各キメラ遺伝子を *Bam*HIと *Sac*Iで切り出し、CaMV 35S プロモーターおよび GFP の配列を含む pUC19 に組み込んだ。EB1c の C 末に存在する Box1, Box2 への変異の導入には以下のプライマーを組み合わせて PCR を行うことで導入した。

変異導入用プライマー	KRK-AAA-S: 5'-CAGAGTCGCAGGCCGGCGCGCTCATAGTGAAT-3'
	KRK-AAA-A: 5'-ATTCACTATGAGCGCCGCGCCTGCGACTCTG-3'
	RQR-AQA-S: 5'-ACACTCTCTCCAGCACAAAGCCCTTTCTGATGC-3'
	RQR-AQA-A: 5'-GCATCAGAAAAGGGCTTGTGCTGGAGAGAGTGT-3'

変異を導入した各配列は CaMV 35S プロモーター-GFP および GUS の配列を含む pUC19 に組み込んだ。作製したコンストラクトはパーティクルガン (PDS-1000/He; Bio-Rad Japan)を用いて一過的にタマネギの表皮細胞に発現させることで局在場所を確認した。

## 2-5 形質転換用コンストラクトの作製

EB1a、EB1b および EB1c の開始コドンの上流 2kbp を含む 5kbp のゲノム断片を PCR によって増幅した。次に PCR を用いて各遺伝子の終始コドンの直前に *Sma*I (EB1a, EB1b)または *Nae*I (EB1c)を導入した。導入した制限酵素サイトをそれぞれの酵素で切断後、GFP 配列を挿入し、ハイグロマイシン耐性マーカーを持つ pBIN19 ベクターにクローニングした。eb1c-2 変異体の相補試験に用いたコンストラクトは上記の EB1c ゲノム配列を元に作製した。m1m2 変異の導入には上記の変異導入プライマーを用いた。EB1b の開始コドンより下流 3kbp を PCR によって増幅し、2kbp の EB1c プロモーターと連結した。GFP-EB1c の作製には上流 2kbp を含む EB1c ゲノムの開始コドン直前に *Nae*Iサイトを導入し、切断後 GFP 配列を挿入した。EB1c $\Delta$ T-GFP の作製には EB1c-GFP より PCR を用いて C 末領域(1579-1737bp)を取り除いた。EB1b および EB1c $\Delta$ T-GFP の C 末への人工的 NLS(MAPKKKRKGG)の導入は PCR を用いて行った。



## 2-6 アラビドプシス *eb1* 変異体の解析

T-DNA 挿入変異体である *eb1a-2* (CS858017) および *eb1c-2* (SALK\_018475)は Arabidopsis Biological Resource Center (Columbus, OH)より入手した。*eb1b-3* は Seattle TILLING Project を用いて同定した。*eb1a-2* および *eb1c-2* の T-DNA はそれぞれ予想される開始コドンの 1510bp および 630bp 下流に挿入されていた。*eb1b-3* は 1147 番目のシトシンがチミンに置換されることで終始コドンができていた。またこの置換により *MseI*の認識配列が形成されていた。これら *eb1* 変異体(Col-0)を GFP-TUA6 が発現している植物体と掛け合わせることで微小管の可視化を行った。微小管薬剤感受性調査には、微小管重合阻害剤である 1mM オリザリン(Sigma)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、幼植物の写真は、実体顕微鏡 (OLYMPUS SXZ12)またはデジタルカメラ (OLYMPUS DP70)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。微小管の観察には共焦点レーザー顕微鏡(C1-ECLIPSE E600; Nikon, Tokyo, Japan)または共焦点スキャナユニット(CSU10; 横河電機)を搭載した顕微鏡(LEICA DMRE; Leica)を用いた。根の縦断面の撮影には 7 日目の根を 10 $\mu$ M Propidium iodide によって染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

*EB1a* および *EB1c* の発現確認には RT-PCR を用いた。各変異体より RNeasy kit (Qiagen)を用いてトータル RNA を抽出し、SuperScript II reverse transcriptase によって cDNA の作製を行った。各遺伝子の発現確認には以下のプライマーを用いた。

<i>EB1a</i> 発現確認用プライマー	5'-CATGCCATGGCGACGAACATCGGA-3' 5'-CCGCTCGAGTTAGGCTTGAGTCTTTTCTTC-3'
<i>EB1c</i> 発現確認用プライマー	5'-CATGCCATGGCTACGAACATTGGG-3' 5'-CCGCTCGAGTCAGCAGGTCAAGAGAGGAG-3'

*eb1b* の変異確認には前述のポリモフィズムを用いた。以下の 2 つのプライマーによって *EB1b* の断片を増幅後、*MseI*による切断確認を行った。

<i>eb1b</i> 変異確認用プライマー	5'-ATCTCCCACTTTTTAGGGTAACTTT-3' 5'-GTTCTTGGATTCAAAGTTGAGAGAA-3'
------------------------	--

## 2-7 タバコ BY-2 培養細胞の *NtEB1c* の抑制

tdTomato-CenH3 発現ベクターの耐性マーカーをハイグロマイシンからカナマイシンへ改変し、BY-2 培養細胞に形質転換を行った。*NtEB1c* の cDNA 断片(+769 から+1049)を pHANNIBAL の *pdk* イントロンを挟むように導入しヘアピン構造を形成する配列を作製。できた配列を制限酵素によって pER8 ベクターの OLexA プロモーターの下流に連結することでエストラジオール誘導的に遺伝子の発現抑制の起こるベクターを作製。できたベクターを tdTomato-CenH3 発現 BY-2 に導入し、ハイグロマイシン耐性カルスを液体培養に戻した。培養 2 日目の形質転換 BY-2 細胞に対し、2 $\mu$ M のエストラジオールまたは DMSO(コントロール)を加えさらに 3 日間培養を続けた。合計 5 日間培養した形質転換 BY-2 細胞を用いて後期細胞の移動速度の遅い染色体を共焦点レーザー顕微鏡(C1-ECLIPSE E600; Nikon, Tokyo, Japan)によって測定した。RT-PCR による RNAi 効率の測定には以下のプライマーを使用した。

<i>NtEB1c</i> 発現確認用プライマー	5'--CAGTGTCAGAGATTGAAAACCTCC-3'
	5'-ACCCAGAGAGAACAAGTCAT-3'
<i>NtEB1ab</i> 発現確認用プライマー	5'-TGGGAAGGAACGAAATGTGAAGGG-3'
	5'-TCTGCCAATGCTGATTCTCTTGCA-3'

## 2-8 TAIL-PCR

*NtEB1c* および *NtEB1ab* に対する特異的プライマーとランダムプライマーを用いて以下の 3 ステップの TAIL-PCR を行った。

TAIL-PCR 1st

サイクル	× 1		× 5			× 1					
温度(°C)	94	95	94	65	72	94	25	37	49	61	72
時間(分)	1:00	1:00	1:00	1:00	3:00	1:00	3:00	0:50	0:50	0:50	3:00
サイクル	× 15										× 1
温度(°C)	94	68	72	94	68	72	94	44	72	72	4
時間(分)	0:30	1:00	3:00	0:30	1:00	3:00	0:30	1:00	3:00	5:00	∞

TAIL-PCR 2nd

サイクル	× 12									× 1	
温度(°C)	94	64	72	94	64	72	94	44	72	72	4
時間(分)	0:30	1:00	3:00	0:30	1:00	3:00	0:30	1:00	3:00	5:00	∞

TAIL-PCR 3rd

サイクル	× 20			× 1	
温度(°C)	94	64	72	72	4
時間(分)	1:00	1:00	3:00	5:00	∞

## 2-9 EB1 の結合タンパク質の単離

酵母 2 ハイブリッド法による EB1b 結合タンパク質の単離には N 末を欠損させた EB1b( $\Delta$ CH EB1b)を制限酵素によって pGBKT7 ベクター(Clontech)に連結し、Bait として用いた。一方 Prey には ABRC から取り寄せた発芽後 3 日目の幼植物体から合成した cDNA を用いた。定法を用いて Leu/Trp/His/Ade を添加しない最少培地で約 200 万個のコロニーを選抜した。得られた陽性コロニーに対してはダイレクトシーケンスを用いて挿入配列を確認した。

免疫沈降法を用いた EB1 の結合タンパク質の単離には EB1a-GFP および EB1c-GFP を導入した植物体を使用した。それぞれの植物体を 1g 用意し、2ml の抽出バッファー(150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris-HCL pH8.0, 1mM PMSF, protease inhibitor cocktail (Roche))中でガラスホモジェナイザーを用いて破砕し、15,000rpm, 20min で遠心分離を行った。遠心後のサンプルの上清を Miltenyi 社の GFP タンパク質精製キットを用いて精製した。精製サンプルは SDS-PAGE によって分離後、銀染色または SYPRO Ruby 染色を用いて差のあるバンドを確認し、LC/MS/MS によって同定した。コントロールには 1g の野生型植物体を用いた。

## 3 結果

### 3-1 in vitro activity

アラビドプシスには 3 つの EB1(EB1a、EB1b、EB1c)が存在する。このうち EB1a および EB1b は他の生物の EB1 と同様に、N 末の微小管結合ドメイン、中央部の2量体形成ドメイン、そして C 末の酸性アミノ酸を多く含んだドメイン (Acidic tail)から構成される。一方、EB1c は C 末に酸性アミノ酸をほとんど含まず、この形状の EB1 は植物にのみ高度に保存されている(図 5)。これまでのところ植物の EB1 を用いた in vitro での結合能を検証した例はないため、まずアラビドプシス EB1s の微小管結合能および結合部位を決定することとした。微小管重合剤であるタキソールを用いて安定な微小管を形成し、大腸菌を用いて発現させた各 EB1 タンパク質の全長およびドメインごとに分けた断片を加えた。このサンプルを 100,000g で遠心し、微小管と共沈させることで結合能および結合部位を調べた(図 6A)。なお、EB1a と EB1b は構造がよく似ているため全長を用いた実験以外は EB1b を代表として実験を行った。その結果、全長 (Full) および Acidic tail を欠損させた EB1( $\Delta T$ )はすべて微小管とともに沈殿画分に回収された(図 6B,D)。また CH ドメインとリンカー領域を含んだ断片(CH-L)では少量の結合が観察された(図 6B,D)。これらのタンパク質は微小管を加えないときはすべて上清画分から回収された(図 6C)。一方、CHドメインを欠損させたもの( $\Delta CH$ )、および CHドメインだけ(CH)では微小管との結合能は確認されなかった(図 6B,D)。つまりアラビドプシスの EB1 は Acidic tail の有無にかかわらず、動物と同様に CH ドメインが微小管結合に重要であることがわかった。また  $\Delta T$  と CH-L の比較より微小管との結合にはダイマー化は必須ではないが、その活性を促進することが確認された。

次にアラビドプシスに存在する 3 つの EB1 がダイマーおよびヘテロダイマーを形成するかを確認した。大腸菌を用いて His タグを付加した EB1 と CHドメインを欠損させた EB1 を発現させ精製した。次に各精製タンパク質を混合し 5 分間 37 度で温めることでサブユニットの置換を促進させた(図 7A)。その結果、すべての EB1 においてホモダイマーの形成が確認された(図 7B)。また EB1a および EB1b は互いにヘテロダイマーを形成したが EB1c とは形成しなかった(図 7B)。つまり in vitro において植物特異的な配列をもつ EB1c はホモダイマーのみを形成することが明らかとなった。

酵母や動物といった他の生物の EB1 は微小管重合促進活性を持つことが

知られている(Tirnauer and Bierer, 2000; Rogers et al., 2002; Tirnauer et al., 2002b; Ligon et al., 2003)。そこでアラビドプシスの EB1s も同様の活性を持っているかを調べるために *in vitro* における微小管の重合活性を測定した。測定には吸光度計を用いて微小管の重合量を濁度(350nm の波長の光に対する吸光値)として定量化する濁度法を用いた。まず単離した各 Full EB1 を微小管と混合し、重合活性を測定した。その結果すべての Full EB1 で重合促進活性が確認されたが、特に Full EB1c が高い重合促進活性を示した(図 8)。

動物の EB1 は自身の N 末と Acidic tail が相互作用することで自己不活性化を起こすことが知られている(Hayashi et al., 2005)。しかしながら、EB1c は C 末に酸性アミノ酸をほとんど含まない。そこで EB1c が自己不活性化を起こすかを調べるために  $\Delta T$  EB1b および  $\Delta T$  EB1c の重合活性を測定し、それぞれの全長タンパク質の活性と比較した。その結果  $\Delta T$  EB1b のみ活性の上昇がみられ、Full EB1c と同程度の活性を示した(図 8)。一方、 $\Delta T$  EB1c の活性は Full EB1c と変化しなかった(図 8)。以上の結果より動物の EB1 と同様に Acidic tail を持つ EB1b は自己不活性化構造をとるが、植物にのみ保存されている EB1c は自己不活性化能をもたないことがわかった。

### 3-2 *eb1* 変異体の微小管重合阻害剤に対する感受性検定

*in vivo* における EB1 の働きを明らかにするために Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)より各遺伝子の T-DNA 挿入変異体種子を取り寄せた(図 9 AB)。*EB1b* に関しては変異体種子が存在しなかったため、Seattle TILLING Project (STP)から一塩基変異によってエキソン内に終始コドンを獲得した新たな変異体種子を取り寄せた。取り寄せた *eb1a* および *eb1c* 変異体から total RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、いずれの変異体からも完全長の遺伝子の発現は確認されなかった(図 9 AB)。また *eb1b* 変異体に関しては制限酵素を用いて変異の導入を確認した(図 9 AB)。

次に 3 回以上野生株とのバッククロスを行った各変異体同士を掛け合わせ、2 重変異体および 3 重変異体の作出を行った。掛け合わせた各変異体を通常の生育培地に播種し、7 日目の根の長さを測定したところ、3 重変異体においても野生株と顕著な違いは観察されなかった(図 10 AB)。そこで微小管重合阻害剤であるオリザリンを培地に加え、観察を行った。各変異体を 100nM または 200nM のオリザリンを加えた培地上で 7 日間生育させ根の長さを測定した。

100nM のオリザリンを加えた培地において *eb1a*、*eb1b* および *eb1a eb1b* は野生型と同様の感受性を示したのに対し、*eb1c*を含む変異体では根の伸長が著しく抑制された(図 10 AB)。この傾向は 200nM のオリザリンを加えることでさらに顕著になった(図 10 AB)。根の短くなった原因を調べるためにまず表皮細胞の長さを計測した。通常培地または 100nM オリザリン添加培地に野生株および *eb1c* 変異体を 7 日間生育させた後、実体顕微鏡を用いて分化の始まる直前の根の表皮細胞の長さを測った。その結果、どちらの培地においても表皮細胞の長さに顕著な差は確認できなかった(図 11)。次に G2/M 期のマーカーである CycB1:GUS と野生株および *eb1c* 変異体を掛け合わせた。それぞれの植物体を通常生育培地または 100nM のオリザリンを加えた培地に播種し 7 日目に GUS 染色を行った。その結果、両者において GUS の染色度合いに大きな差は見られず、*eb1c* 変異体でも分裂領域や細胞周期に明確な違いは確認できなかった。(図 12 A)。そこで細胞の分裂自体が正常に行われているかを確かめることとした。100nM のオリザリンを加えた培地で 7 日間生育させた *eb1c* 変異体の根を Propidium iodide (PI)によって細胞壁を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、分裂面の乱れた細胞が多数見られた(図 12 B)。

### 3-3 *eb1* 変異体における微小管構造物

細胞の分裂面は微小管によって強く規定されることから GFP を融合したチューブリンを発現させた植物体(GFP-TUA6)と *eb1c* 変異体および *eb1a eb1b* 変異体を交配し微小管構造を可視化した。通常培地および 100nM のオリザリンを加えた培地で 4~6 日間生育させた野生株、*eb1a eb1b* 変異体および *eb1c*変異体の根の分裂領域を観察した。まず、分裂直前に形成される PPB を各植物体で比較したが大きな差は観察されなかった(図 13 AB)。次に各植物体の紡錘体を比較したところ野生株と *eb1a eb1b* 変異体ではほとんどの紡錘体が細胞列に対し垂直に配向しているが、*eb1c* 変異体では傾いたものや崩壊したものが多数観察された(図 14 A)。そこでまず崩壊した紡錘体の割合を各植物体で比較した。その結果、通常培地において *eb1c* 変異体では野生株に対し高い頻度で崩壊した紡錘体が観察された。この傾向は 100nM のオリザリン添加培地でより顕著となった(図 14 B)。次に紡錘体の 2 極間の距離を測定した。その結果、通常培地および 100nM のオリザリン添加培地、どちらにおいても *eb1c* 変異体の紡錘体で顕著に距離が短くなっていることが明らかとなった

(図 14 C)。さらに紡錘体の配向を比較した。すると *eb1c* 変異体では通常培地においても細胞列に対し 10 度以上傾いた紡錘体が約 10% 観察された(野生株、*eb1a eb1b* 変異体ではそれぞれ 0%と 2%)。さらに 100nM のオリザリン添加培地では約 70%の紡錘体が 20 度以上傾いており(野生株、*eb1a eb1b* 変異体ではそれぞれ 15%と 20%)、30 度以上傾いた紡錘体も約 50% 観察された(野生株、*eb1a eb1b* 変異体ではそれぞれ 6%と 10%)(図 14 D)。以上の結果より EB1c は紡錘体の 2 極性の維持に必要であることが明らかとなった。

次に、各植物体のフラグモプラストを比較したところ、紡錘体と同様に、野生株や *eb1a eb1b* 変異体ではほとんどのフラグモプラストが細胞列に対し水平に配向しているが、*ec1c* 変異体では傾いたものや崩壊したものが多数観察された(図 15 A)。そこでまず崩壊したフラグモプラストの割合を各植物体で比較した。その結果、通常培地において *eb1c* 変異体では野生株と比べ高い頻度で崩壊したフラグモプラストが観察された。この傾向は 100nM のオリザリン添加培地でもより顕著となった(図 15 B)。次にフラグモプラストの幅を測定した。その結果、通常培地および 100nM のオリザリン添加培地、どちらにおいても *eb1c* 変異体のフラグモプラストで顕著に幅が狭くなっていることが明らかとなった(図 15 C)。さらにフラグモプラストの配向を比較した。すると通常培地では各植物体でほとんど差がなく、*eb1c* 変異体においても 10 度以上傾いたフラグモプラストは 10% 以下であった。しかしながら 100nM のオリザリン添加培地では *eb1c* 変異体において約 40%のフラグモプラストが 10 度以上傾いていた(野生株、*eb1a eb1b* 変異体ではそれぞれ 8%と 4%)(図 15 D)。以上の結果より EB1c はフラグモプラストの形成や配向にも関与することが明らかとなった。

*eb1a eb1b* 変異体を 100nM のオリザリン添加培地で 7 日間生育させた場合、根の伸長自体は野生株と変わらなかったが、根の伸長方向が野生株に比べ左に流れることがわかった(図 16)。根の伸長方向は表層微小管によって規定されることが知られている(図 3) (Thitamadee et al., 2002; Abe et al., 2004)。そこで野生株および *eb1a eb1b* 変異体の表層微小管をチューブリンに対する免疫染色法を用いて可視化し、その配向を計測した。その結果、野生株では約 5 度の右肩上がりの配向を示すのに対し、*eb1a eb1b* 変異体では約 14 度の右肩上がりの配向を示すことが明らかとなった(図 17)。*eb1a* および *eb1b* の単独変異体では根の流れに変化は見られないため、この 2 つの遺伝子は協調して表層微小管の配向を制御していることが考えられる。

### 3-4 *eb1* 変異体における分裂期の染色体移動

分裂期の染色体の移動にはキネトコアと微小管プラス端の正確な結合が必要である。またこの結合が不完全であると分裂時に移動速度の遅い **Lagging chromosome** が観察される(Cimini et al., 2006)。動物の **EB1** はこの分裂期の染色体移動に重要な役割を果たすことが知られている(Green., 2005)。そこで植物の **EB1c** が染色体分離に関与するかを調べるために、細胞が大きく染色体の移動が観察しやすいタバコ **BY-2** 培養細胞を用いて観察を行った。まず、タバコの **EB1** を単離するために **Blast search** を用いてその断片を確認した。その後 **3'RACE** 法および **TAIL-PCR** を用いてタバコ **EB1c(NtEB1c)** およびタバコ **EB1ab(NtEB1ab)** の全長を単離した。次にキネトコアマーカである **tdTomato-CenH3** を発現させた **BY-2** 培養細胞に対し、エストラジオール依存的に **NtEB1c** を **RNAi** で抑制するベクターを導入した。24 ラインの形質転換 **BY-2** のうち効率よくエストラジオール依存的に **NtEB1c** が抑制される 2 ライン(#4,#19)を選抜した。半定量的 **RT-PCR** による検定の結果、エストラジオール添加時に#4 では 74%、#19 では 63%の割合で **NtEB1c** が抑制された。一方、**NtEB1ab** の発現には影響は見られなかった(図 18 A)。得られた 2 ラインの **BY-2** 細胞を通常培地に継代後、3 日目にエストラジオールまたは **DMSO**(コントロール)を添加し、さらに 2 日間培養を行った。その結果、**NtEB1c** の **RNAi** ラインではエストラジオール依存的にコントロール区の 4~5 倍の **Lagging chromosome** が観察された(図 18BC)。以上の結果より、植物の **EB1c** は分裂期の染色体移動にも関与することがわかった。

### 3-5 アラビドプシス **EB1s** の発現領域および細胞内局在性

次にアラビドプシス **EB1s** の発現領域および細胞内局在性を調べるために、各遺伝子の上流 2kbp をプロモーター領域と考え、**GUS** レポーター遺伝子上流に連結し、アグロバクテリウム法を用いて植物体に導入した。遺伝子の導入された植物体を各 20 ラインずつ観察したところ、**EB1a** は維管束、根のコルメラ細胞、そして花粉での強い **GUS** 染色が観察された。**EB1b** は **EB1a** とほぼ同じ場所での発現が確認されたが、加えて孔辺細胞での発現も確認された。一方、植物特異的な **EB1c** は根および地上部の分裂領域、孔辺細胞、そして花粉での強い発現が観察された(図 19)。



次により正確な発現領域を調べるために上記で用いた 2kbp のプロモーターを含んだ 5kbp のゲノム領域の N 末または C 末に GFP を挿入し、各遺伝子の変異体に導入した。その結果、N 末に GFP を融合したベクターを導入した植物体ではすべての遺伝子において 2kbp のプロモーターに GUS レポーター連結し確認した実験と同様の発現領域を示した。しかし、C 末に GFP を融合したベクターを導入した植物体では EB1a および EB1b において根や葉の表皮細胞や孔辺細胞、花粉や花粉管など観察を行ったすべての細胞で発現が観察された(図 20 AB, 図 21A)。一方、EB1c の発現領域は 2kbp のプロモーターを用いた場合と変化がなく分裂領域での発現が強かった(図 20AB, 図 21A)。組織ごとに行った RT-PCR や Web に公開されている各遺伝子の発現領域を解析したデータは C 末に GFP を結合した場合の発現領域を支持する結果になっており、また C 末に GFP をつないだベクターは *eb1c* 変異体の表現形を完全に相補したため(図 25)、以後の実験では C 末に GFP を結合したものをを用いることとした。EB1a および EB1b は非常によく似たゲノム構造を持っており、ともに 8 個のエキソンと 7 個のイントロより構成されている。このうちどちらの遺伝子においても 1 つ目のイントロンが非常に大きく、おそらくこの第 1 イントロンが完全な発現に必要であると思われる(図 9 A)。

各遺伝子の C 末に GFP を融合したタンパク質(EB1a-GFP, EB1b-GFP, EB1c-GFP)を発現している植物を観察したところ、EB1a-GFP および EB1b-GFP は間期において表層微小管への局在が観察された。このとき、コメント状の蛍光を示したことから動物の EB1 と同様に、微小管のプラス端に結合することが明らかとなった(図 21AB)。一方、EB1c-GFP は間期において核内に局在することが明らかとなった(図 21AC)。このため EB1c-GFP は PPB には局在しないことがわかった(図 22D)。次に分裂期における各 EB1 の局在を調べた。その結果、EB1c-GFP を含むすべての EB1 が紡錘体およびフラグモプラストにコメント状に局在した(図 21BC)。さらに EB1b-GFP および EB1c-GFP に関して細胞周期をおって動画観察したところ、核膜崩壊によって細胞質に放出された EB1c-GFP が再び核に収納されるまでおよそ 2 時間かかることが明らかとなった(図 21C)。また、このとき全ての EB1c-GFP が核に収納されるまでの間、一部の EB1c-GFP が表層微小管にも局在することが確認された(図 25)。

さらに分裂期の EB1c-GFP をキモグラフ解析によって詳しく観察すると紡錘体およびフラグモプラスト形成時に一部の GFP シグナルが細胞膜方向に進んでいることがわかった(図 22AB)。動物の EB1 は紡錘体形成時に膜方向に進むアストラス微小管に局在することが知られており、植物においても同様の微小管への局在が示唆された。

これまでの動物をはじめとする他の生物の EB1 の研究では EB1c のように核

内に局在するものは見つかっていない。そこで次に **EB1c** の核内局在シグナルを同定することとした。**EB1c** は他の生物 **EB1** には見られない、特殊な配列を **C** 末に含んでいる(図 23A)。よって、**EB1b** と **EB1c** の **C** 末を交換したものを **GFP** に連結し、タマネギの表皮細胞を用いた一過的発現によりそれぞれの局在性を調べた(図 23B)。その結果、**EB1c** の **C** 末の配列を持つもののみが核局在を示した(図 23C)。つまりこの **C** 末に核局在シグナルことが明らかとなった。さらに **EB1c** の **C** 末を他の植物の **EB1c** ホモログと比較したところ、すでに知られている核局在シグナルは存在しないものの、2 か所で塩基性アミノ酸が高度に保存されていることがわかりそれぞれを **Box1**, **Box2** と名付けた(図 23A)。塩基性アミノ酸は核への局在に関与することが知られている。そこで **Box1** の塩基性アミノ酸をアデニンに置換したもの(**GFP-GUS-Tc<sup>m1</sup>**)、**Box2** の塩基性アミノ酸をアデニンに置換したもの(**GFP-GUS-Tc<sup>m2</sup>**)、および両方に置換を加えたもの(**GFP-GUS-Tc<sup>m1m2</sup>**)を **GUS** と **GFP** を融合したタンパク質の **C** 末に連結し、同様の実験を行った。なお、**GUS** をつなげることでサイズの小さなタンパク質が拡散によって核内に入るのを阻害することが知られている。その結果、どちらの箇所に変異を入れたものでも核に局在できなくなることが確認された(図 23C)。つまり、植物にのみ保存されている **EB1c** の核局在には **C** 末の 2 か所の保存された塩基性アミノ酸が必要であることがわかった。

### 3-6 相補性試験によるアラビドプシス **EB1s** の機能分化の検証

アラビドプシスの各 **EB1s** の機能の違いを調べるために **eb1c** 変異体の相補試験を行った。用いた配列は **EB1b**、**SV40** の **NLS** を結合し核局在するようにした **EB1b(EB1b-NLS)**、**EB1c** および核に行けないように変異を加えた **EB1c(EB1c<sup>m1m2</sup>)** の 4 つである。プロモーターにはすべて **EB1c** の上流 2kbp の配列を用いた。各形質転換体を 100nM のオリザリンを加えた培地上で 7 日間生育させ根の長さを測定した。**EB1c** を導入した形質転換体では **eb1c** 変異体の表現形を完全に相補したが **EB1b**、**EB1b-NLS** および **EB1c<sup>m1m2</sup>** では根の長さが完全には回復しなかった(図 24)。つまり **EB1b** は核内に存在しても **EB1c** の機能を完全には相補できないことが明らかとなった。このことは **EB1c** が核内において機能を持つことが予想される。また核に入れぬ **EB1c<sup>m1m2</sup>** が **eb1c** 変異体の表現形を完全に相補できないことも、核内で **EB1c** が機能を持つことを示唆させる結果である。

次に **EB1c** の **C** 末に核移行以外の機能があるのかを調べるために、上記と

同様に *eb1c* 変異体の相補試験を行った。用いた配列は GFP-EB1c、EB1c-GFP、EB1c $\Delta$ T-GFP、EB1c $\Delta$ T-GFP-NLS および EB1c<sup>m1m2</sup>-GFP-NLS の 5 つである。プロモーターにはすべて EB1c の上流 2kbp の配列を用いた(図 25)。各形質転換体を 100nM のオリザリンを加えた培地上で 7 日間生育させ根の長さを測定した。GFP-EB1c を導入した形質転換体では *eb1c* 変異体の表現形をまったく相補できなかった(図 25)。このとき GFP 蛍光を観察すると間期には核内に局在するものの、表層でのドットが観察できず、微小管に結合できていないことが明らかとなった(図 25)。つまり、N 末への GFP の融合は EB1c の微小管への結合を阻害することがわかった。一方、C 末に GFP を融合した EB1c-GFP を導入した形質転換体では *eb1c* 変異体の表現形を完全に相補したことから機能的なタンパク質ができていることが明らかとなった。また、EB1c $\Delta$ T-GFP および EB1c $\Delta$ T-GFP-NLS では根の長さが完全には回復しなかった(図 25)。つまり、C 末の配列を持たない EB1c を核内に局在させても EB1c の機能を完全には相補できないことが明らかとなった(図 25)。さらに EB1c<sup>m1m2</sup>-GFP-NLS を導入した形質転換体では *eb1c* 変異体の表現形を完全に相補した(図 25)。これらの結果は EB1c の C 末には核移行以外の機能があることを示す。

### 3-7 EB1 の結合タンパク質の探索

動物や酵母をはじめとする他の生物の EB1 では C 末に存在する Acidic tail に数多くのタンパク質が結合し、機能的複合体が作られることが知られている (Vaughan, 2005; Akhmanova and Hoogenraad, 2005)。そこで酵母 2 ハイブリッド法を用いて EB1b に結合するタンパク質を探索することとした。本研究によって EB1b は自己不活性化構造をとることが予想されたため、N 末を欠損させた EB1b を Bait として用いた。一方 Prey には ABRC から取り寄せた発芽後 3 日目の幼植物体から合成した cDNA を用いた。約 200 万個のコロニーを選抜したところ、114 個の陽性コロニーを得た。シーケンスを確認したところ、微小管や微小管構造の形成に関与すると思われるものが 5 種類、12 個存在した (表 1)。

酵母 2 ハイブリッド法によって確認された EB1b 結合タンパク質候補のうち Patellin ファミリーは膜輸送に関わるドメインを持つタンパク質ファミリーであり、形成中および成熟過程にある細胞板に局在することが知られている (Peterman et al., 2004)。細胞板形成に関わる微小管構造であるフラグモプラ

ストはプラス端を内側に向けた構造をとり、細胞板の構成成分を運ぶことが示唆されている。そこで EB1b との結合をさらに詳しく確かめることとした。アラビドプシスのゲノム中に 6 つ存在する Patellin ファミリー間でもっとも小さく大腸菌での発現が容易であった Pattelin6 を代表として用い、*in vitro* における EB1 との結合を Pull-down アッセイによって確かめた。まず GST タグを融合した EB1b(GST-EB1b)を GST タグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。次に FLAG タグを融合した Patellin6(FLAG-PATL6)を発現した大腸菌の全抽出液を GST-EB1b の吸着した GSTビーズと混合し、洗浄した後、還元型グルタチオンを用いて溶出した。コントロールには GSTのみをカラムに吸着させたものを用いた(図 26)。それぞれのサンプルを SDS-PAGE によって分離後、FLAG タグに対する抗体を用いて Patellin6 の存在を確認した。その結果、GST-EB1b からの溶出サンプルにのみバンドが確認された(図 26)。よって *in vitro* においても EB1b と Patellin ファミリーの結合が確認された。

EB1b 結合タンパク質候補として得られた ATK4 は Kiensin-14 グループに属し、アラビドプシスにはさらに 2 つのホモログ遺伝子 (At1g09170、At2g47500) が存在する。また、ワタのホモログである GhKCH1 は実際に表層微小管への結合が確認されている (Preuss., 2004)。そこで EB1b との *in vitro* での結合をさらに詳しく検討することとした。まず、アラビドプシスの EB1s と ATK4 およびそのホモログである At1g09170(ATK4L1)、At2g47500(ATK4L2)の間での結合能を酵母 2 ハイブリッド法によって調べた。用いた配列は EB1s に関しては Bait に使った配列と同じく N 末を除いたものを、また ATK4 および ATK4L1、ATK4L2 に関しては酵母 2 ハイブリッド法によって単離された ATK4 の C 末領域と同じ部位を用いた。その結果、ATK4 および ATK4L1 は EB1b だけでなく、EB1a と EB1c にも結合することが明らかとなった(図 27 A)。一方、ATK4L2 はいずれの EB1s との結合性も確認できなかった。すべての EB1s と結合したことから C 末の配列は結合に関与しないと考えられるため N 末および C 末の Acidic tail をともに欠損した EB1b でもう一度 ATK4 ファミリーとの結合を調べたところ、同様に結合することが明らかとなった(図 27 A)。次に、ATK4 が EB1b と *in vitro* において結合するかを調べるために ATK4 に FLAG タグを付加し大腸菌で発現させた。精製後、EB1b との結合を Pull-down アッセイを用いて調べたところ *in vitro* においても EB1b と結合することがわかった(図 27 B)。次に、ATK4 および ATK4L1 が植物体のどこで EB1s と結合し機能するかを推測するために発現領域を調べることにした。それぞれの遺伝子の上流 2.5kbp をプロモーター領域と考え、GUS レポーター遺伝子と連結し植物体に導入した。その結果、ATK4 では根の維管束組織および花粉での強い発現が確認された。また ATK4L1 は根の根毛および花粉での強い発現が確認された(図 28)。EB1b 同様に花粉にお

いて強い発現が見られることから **ATK4** および **ATKL1** と **EB1b** は花粉の形成もしくは花粉管の伸長時に結合し、働くことが示唆された。

次に免疫沈降法を用いた **EB1** の結合タンパク質の単離を試みた。各変異体に **EB1a-GFP** および **EB1c-GFP** を導入した植物と野生株よりタンパク質を抽出し、Miltenyi 社の **GFP** タンパク質精製キットを用いて複合体の精製を行った。各サンプルを **SDS-PAGE** によって分離後、銀染色または **SYPRO Ruby** 染色を用いて差のあるバンドを確認し、**LC/MS/MS** によって同定した(図 29)。その結果、**EB1a-GFP** に特異的に精製されたタンパク質のうち、微小管に関連するものとして **PHS2** が単離された(表 2)。また、**EB1c-GFP** に特異的に精製されたタンパク質のうち、微小管に関連するものとして **Patellin1** および **SKU5 Similar10** が単離された(表 3)。また、**EB1a-GFP** および **EB1c-GFP** の両方のサンプルに共通して精製されたタンパク質のうち、微小管に関連するものとして **DYNAMIN-like** タンパク質と **SKU5 Similar4** が単離された(表 2,3)。

動植物にともに存在する数少ない **EB1** 結合タンパク質として **CLASP** と **Aurora kinase (AUR)** が存在する。このうち、植物の **CLASP** は動物の **CLASP** を用いて同定された **EB1** 結合ドメインを保持しておらず、*in vitro* での実験においても結合が見られないことが確認されている(Kirik et al., 2007)。一方、アラビドプシスには 3 つの **AUR** 遺伝子(**AUR1,2,3**)が存在する。動物では **AUR** 遺伝子の欠損は分裂異常を示すことが知られており(Carmena and Earnshaw., 2003)、またタバコ **BY-2** 培養細胞において **AUR3** を抑制すると移動速度の遅い染色体が観察されることが明らかとなっている(Kurihara et al., 2006)。これらの表現形はアラビドプシスの **eb1c** 変異体の表現形と似通っている。そこで *in vitro* における **EB1** との結合を確かめた。まず **GST** タグを融合した **EB1b(GST-EB1b)** および **EB1c(GST-EB1c)** を **GST** タグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。次に **FLAG** タグを融合した **AUR1(FLAG-AUR1)**、**AUR2(FLAG-AUR2)** および **AUR3(FLAG-AUR3)** を発現した大腸菌の全抽出液を **GST-EB1b** または **GST-EB1c** の吸着した **GST** ビーズと混合し、洗浄した後、還元型グルタチオンを用いて溶出した。コントロールには **GST** のみをカラムに吸着させたものを用いた。それぞれのサンプルを **SDS-PAGE** によって分離後、**FLAG** タグに対する抗体を用いて **AUR** の存在を確認した。その結果、**AUR1** は **EB1b** と強く、また **EB1c** と弱く結合した。**AUR2** は **EB1b** と非常に弱く結合したが **EB1c** との結合は見られなかった。**AUR3** は **EB1c** と強く、また **EB1b** と弱く結合した(図 30)。このうち、**EB1c** と強く結合した **AUR3** に関し、その局在性を調べることにした。**AUR3** の上流約 **800bp** のプロモーターを含んだ **2700bp** のゲノム領域の **C** 末に **GFP** を挿入し、野生株または **eb1c** 変異体植物に導入した。その結果、どちらの植物体においても間期は核

内に局在し、分裂期は染色体のキネコトアに局在した(図 31)。以上の結果は **EB1c** が核内で **AUR3** と結合し機能を果たすことが示唆されるとともに、その働きは局在規定ではなく活性調節といったものである可能性が高いと考えられた。次に、**AUR3** の変異体解析を行うこととした。まず野生型植物にエストラジオール依存的に **AUR3** を **RNAi** で抑制するベクターを導入した。15 ラインの形質転換植物のうち効率よくエストラジオール依存的に **AUR3** が抑制される 1 ライン (**#2**)を選抜した。得られた植物体 (**AUR3RNAi#2**)を 5 $\mu$ M エストラジオールまたは 5 $\mu$ M エストラジオールと 100nM オリザリンを同時に加えた添加培地で 7 日間生長させ、根の長さを測定した。その結果、5 $\mu$ M エストラジオールを加えた培地において、**AUR3RNAi#2** の根は野生株に比べ短く、またその表現形はオリザリンを加えることでさらに顕著になった(図 32A)。さらにこれら植物体の根の分裂面を観察したところ、**eb1c** 変異体と同様に乱れていることがわかった(図 32B)。以上の結果より、アラビドプシスの **AUR3** を抑制すると根の伸長が遅延し、また細胞の分裂面に異常が生じることが明らかとなった。これらの現象はいずれも **eb1c** 変異体でも観察されることから、**eb1c** 変異体の表現形の一部は **AUR3** の活性に原因があることが示唆された。

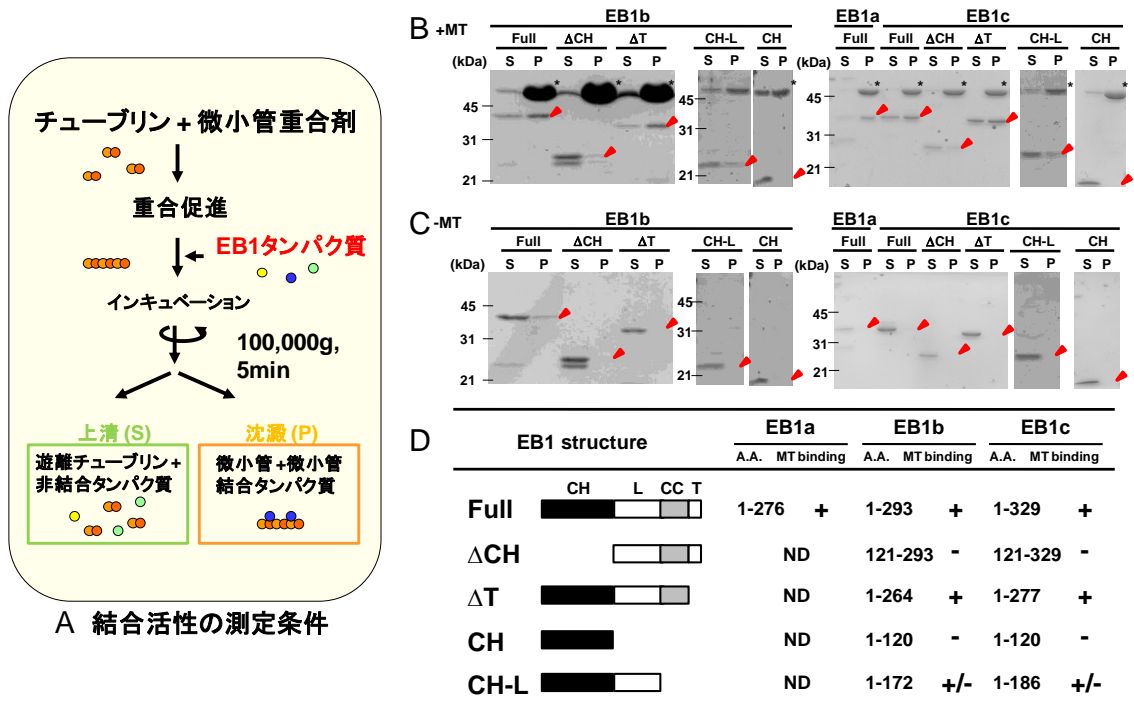
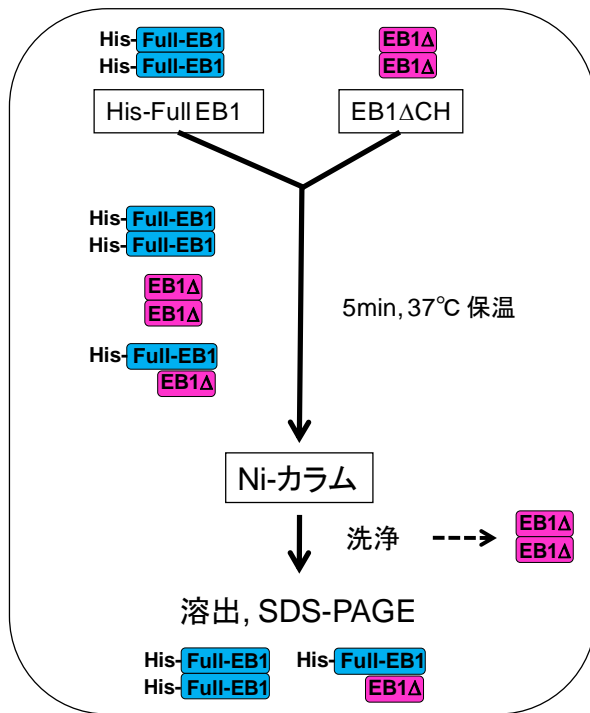


図 6 アラビドプシスの EB1s の微小管結合能および結合活性の検証

(A)微小管結合活性の測定法の模式図。(B)微小管存在下および(C)微小管非存在下における共沈実験の上清(S)と沈澱(P)の SDS-PAGE ゲル画像。赤矢じりは各 EB1 タンパク質断片の位置を示す。アスタリスクはチューブリンのバンドを示す。(D)微小管結合実験のまとめの図。CH, カルポニンホモログドメイン L, リンカー領域 CC, コイルドコイル 2 量体形成ドメイン T, C 末領域 A.A., アミノ酸



A ダイマー形成の検定条件

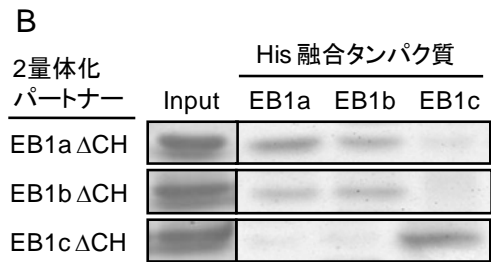


図 7 アラビドプシス EB1s のダイマー形成能の検証

(A) ダイマー形成の検定法の模式図。 His-tag が融合された全長の EB1 を含んだ 2 量体のみが Ni-カラムに結合する。(B) His 融合タンパク質と 2 量体化パートナーによる Pull-down アッセイ。各サンプルを溶出後 SDS-PAGE で分離し CBB で染色したゲル画像。

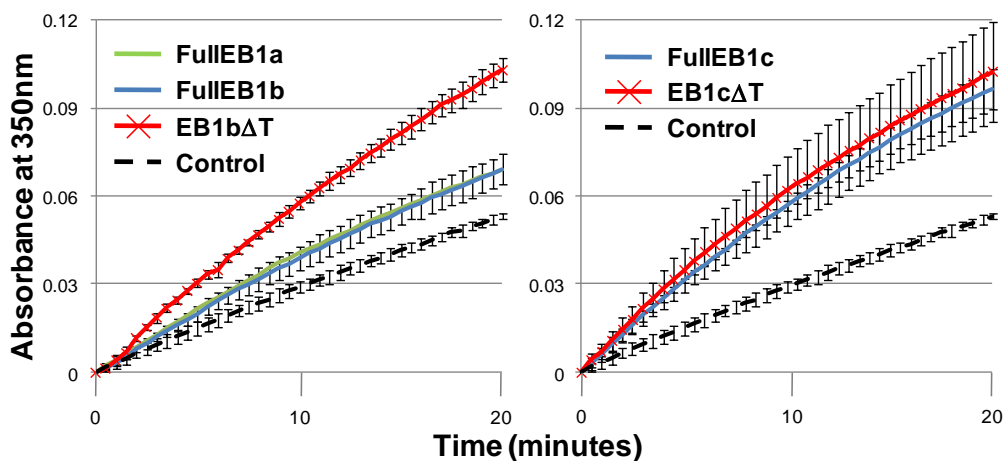


図 8 アラビドプシス EB1s の重合活性および自己不活性化

微小管の重合活性を 350nm の波長に対する吸光値で測定。Control は EB1 を加えない状態でのチューブリンの重合度を示す。



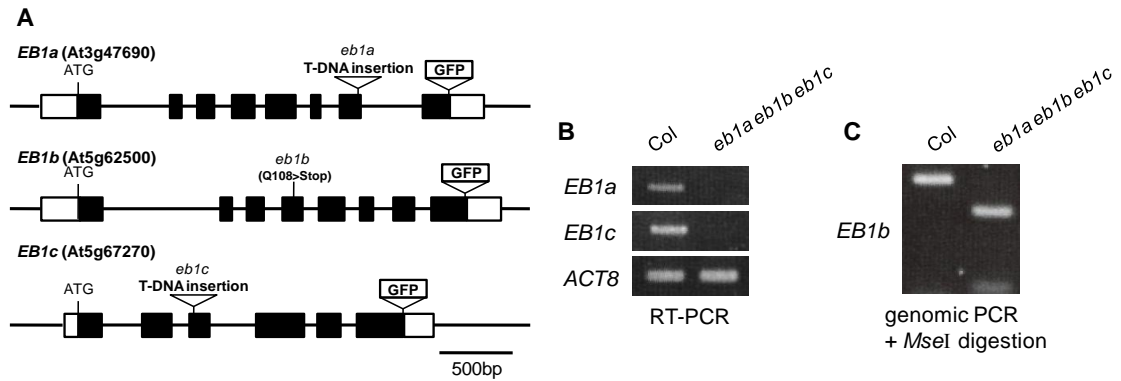


図 9 用いたアラビドプシス *eb1* 変異体

(A) 各変異体の T-DNA 挿入箇所および変異箇所。 (B) *eb1a* 変異体および *eb1b* 変異体の発現確認。Actin8 (ACT8)は内生コントロールとして用いた。 (C) *eb1b* 変異体の変異導入確認。変異箇所を持つことで *MseI* の認識部位となる。

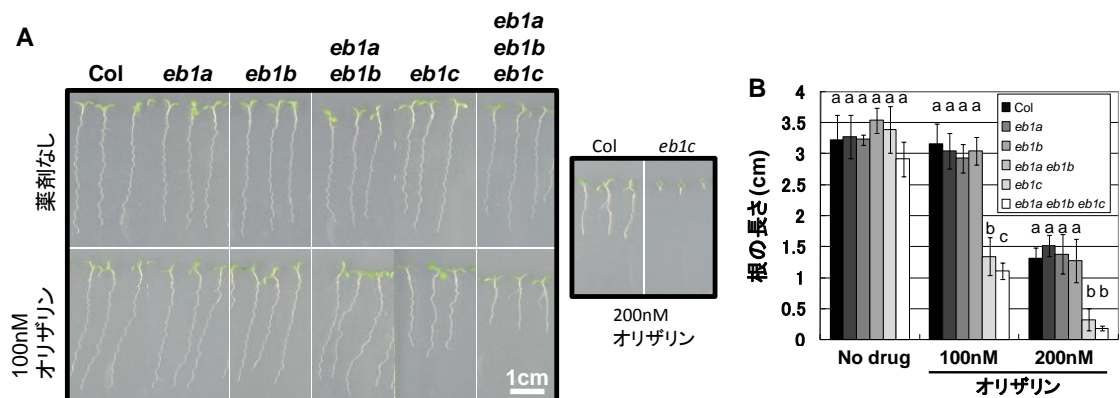


図 10 アラビドプシス *eb1* 変異体の微小管脱重合剤に対する感受性検定

(A) 通常培地または 100nM、200nM オリザリンを添加した培地上で 7 日間生育させたアラビドプシス *eb1* 変異体植物。 (B) 7 日目の植物の根の長さ。データの信頼度の検定には one-way ANOVA および Tukey-Kramer テストを用いた。

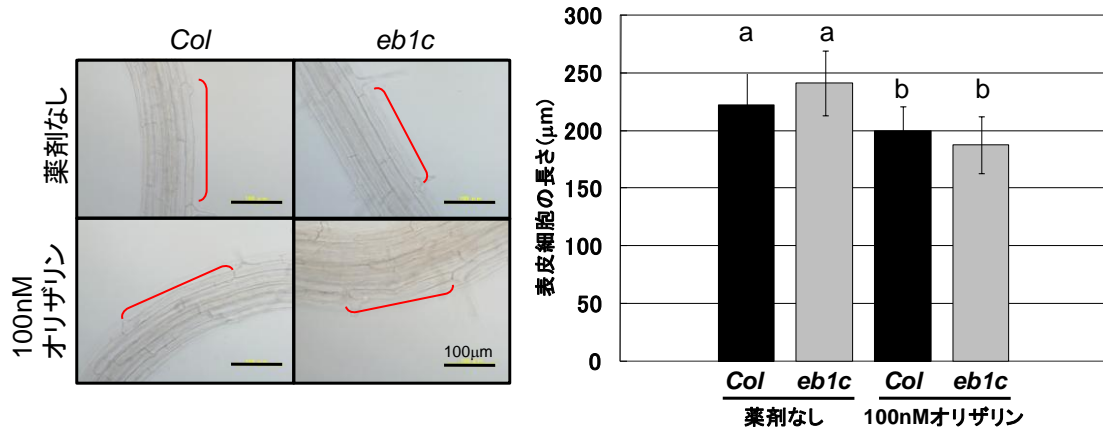


図 11 アラビドプシス *eb1c* 変異体の表皮細胞の長さ測定

薬剤添加によるアラビドプシス *eb1c* 変異体の表皮細胞の長さへの影響を観察した。赤線は 1 細胞を示す。データの信頼度の検定には one-way ANOVA および Tukey-Kramer テストを用いた。

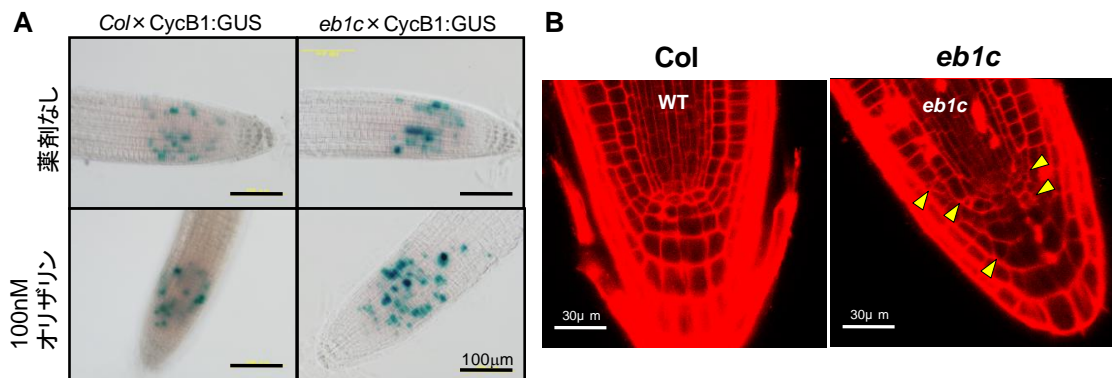


図 12 アラビドプシス *eb1c* 変異体の分裂領域および分裂面の観察

(A) 野生株および *eb1c* 変異体と *CycB1:GUS* 発現植物体を掛け合わせ、通常培地または 100nM オリザリン添加培地で 7 日間生育させたのち GUS 染色を行った。

(B) 野生株および *eb1c* 変異体を 100nM オリザリン添加培地で 7 日間生育させたのち PI 染色を行った。黄矢印は異常な分裂面を示す。

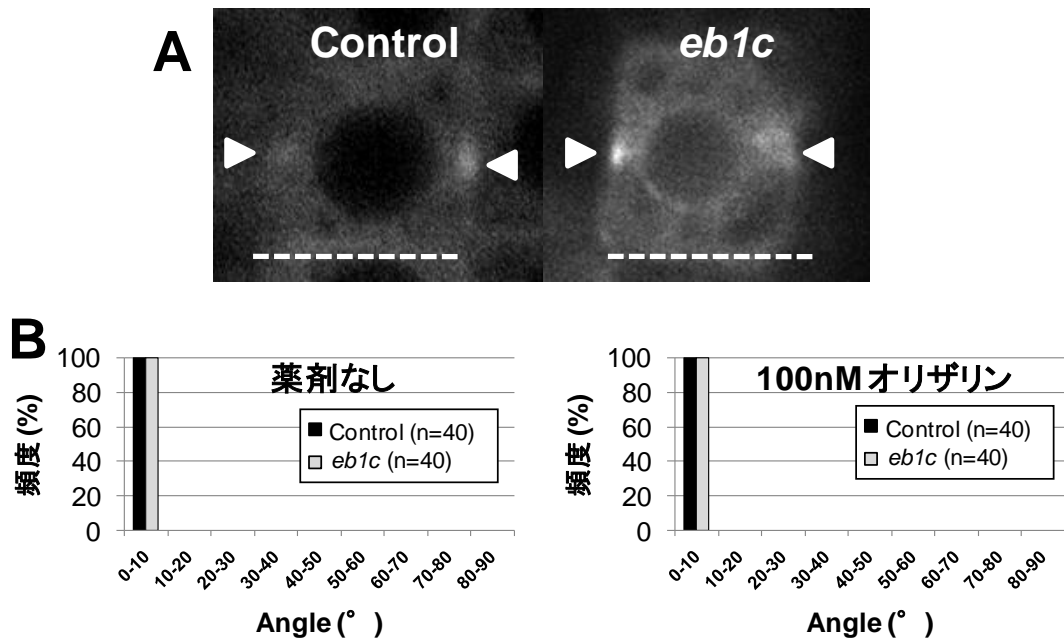


図 13 アラビドプシス *eb1c* 変異体の PPB の観察

(A) Control および *eb1c* 変異体を 100nM オリザリン添加培地で 4 日間生育させたのち共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。白矢印は PPB の位置を白点線は細胞の底辺を示す。

(B) 各植物体の PPB の細胞底辺に対する傾きを計測した。

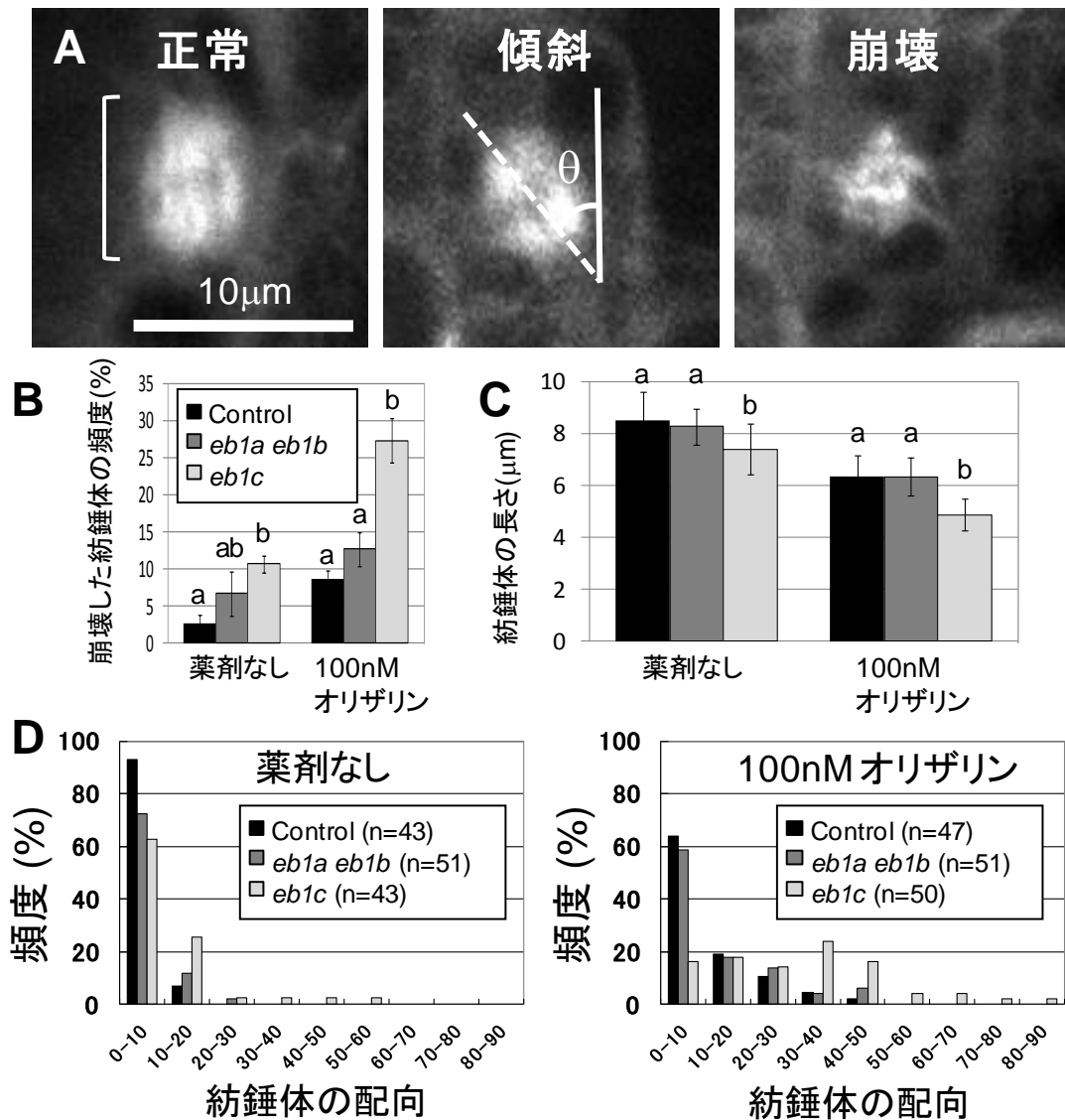


図 14 アラビドプシス *eb1c* 変異体の紡錘体の観察

(A) 紡錘体の形による分類。(B) 崩壊した紡錘体の割合。各植物体の紡錘体をそれぞれ 50 個ずつ計測した。(C) 「正常」および「傾斜」に分類された紡錘体の 2 極間の距離を測定。各植物体の紡錘体をそれぞれ 50 個ずつ計測した。測定した距離は(A)の「正常」で示した白カッコにあたる。(D) 紡錘体の細胞列に対する角度を測定。測定した角度は(A)の「傾斜」で示した $\theta$ にあたる。データの信頼度の検定には one-way ANOVA および Tukey-Kramer テストを用いた。

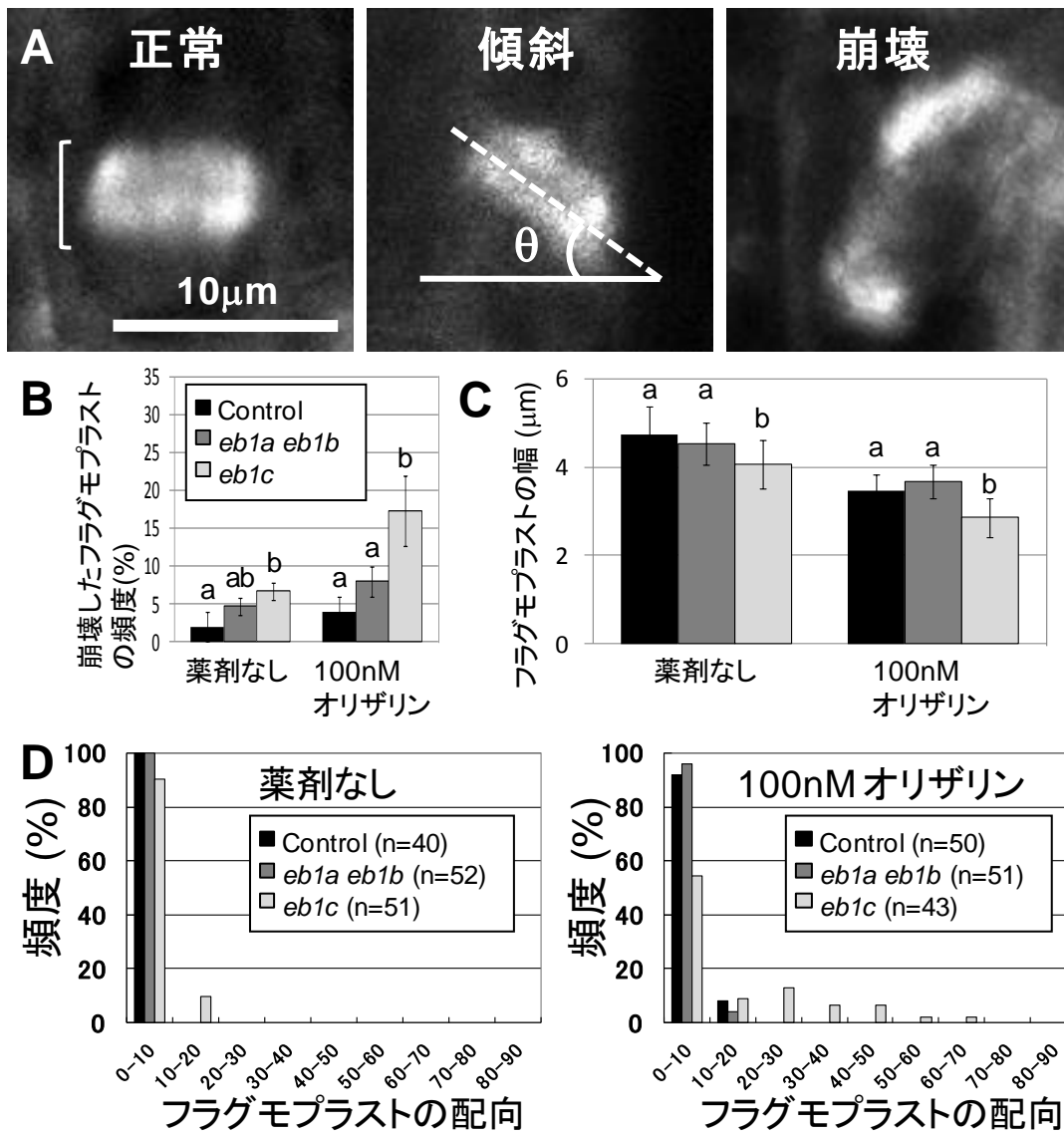


図 15 アラビドプシス *eb1c* 変異体のフラグモプラストの観察

(A) フラグモプラストの形による分類。(B) 崩壊したフラグモプラストの割合。各植物体のフラグモプラストをそれぞれ 50 個ずつ計測した。(C) 「正常」および「傾斜」に分類されたフラグモプラストの幅を測定。各植物体のフラグモプラストをそれぞれ 50 個ずつ計測した。測定した幅は(A)の「正常」で示した白カッコにあたる。(D) フラグモプラストの細胞底辺に対する角度を測定。測定した角度は(A)の「傾斜」で示した $\theta$ にあたる。データの信頼度の検定には one-way ANOVA および Tukey-Kramer テストを用いた。

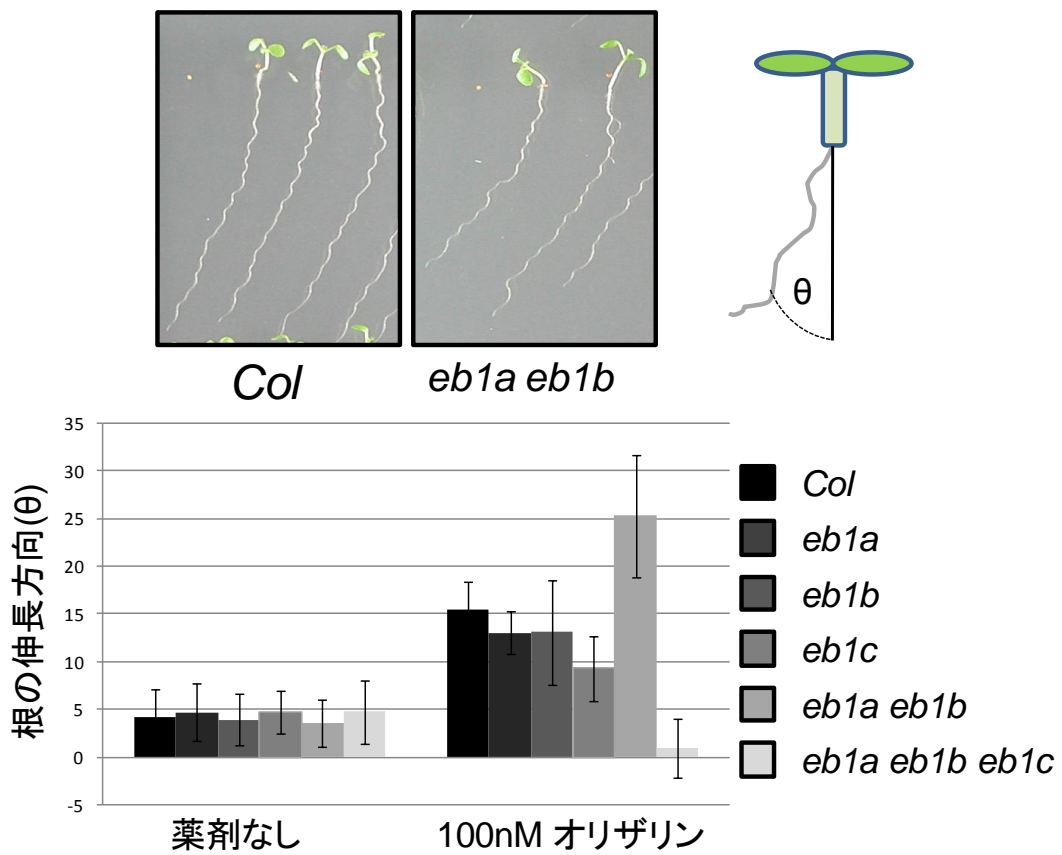


図 16 アラビドプシス *eb1c* 変異体の根の伸長方向

野生株および *eb1* 変異体を通常培地または 100nM オリザリン添加培地で 7 日間生育させたのち根の伸長方向の測定を行った。測定した角度を模式図中の  $\theta$  で示した。

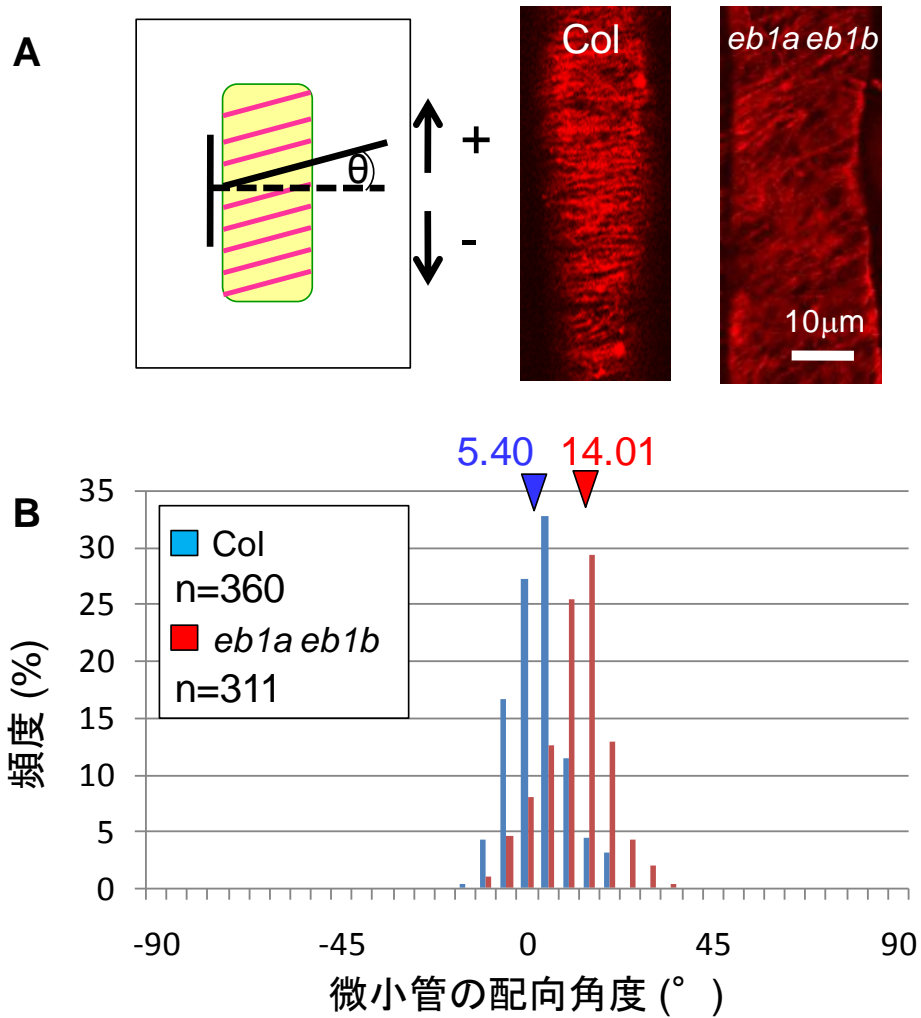


図 17 アラビドプシス *eb1a eb1b* 変異体の表層微細管の配向角度  
 100nM オリザリン添加培地における表層微細管の配向角度の測定。(A) 測定した表層微細管の配向角度を  $\theta$  で示した模式図および実際に計測に用いた写真の一例。(B) *eb1a eb1b* 変異体と野生株での表層微細管の配向角度の比較データ。

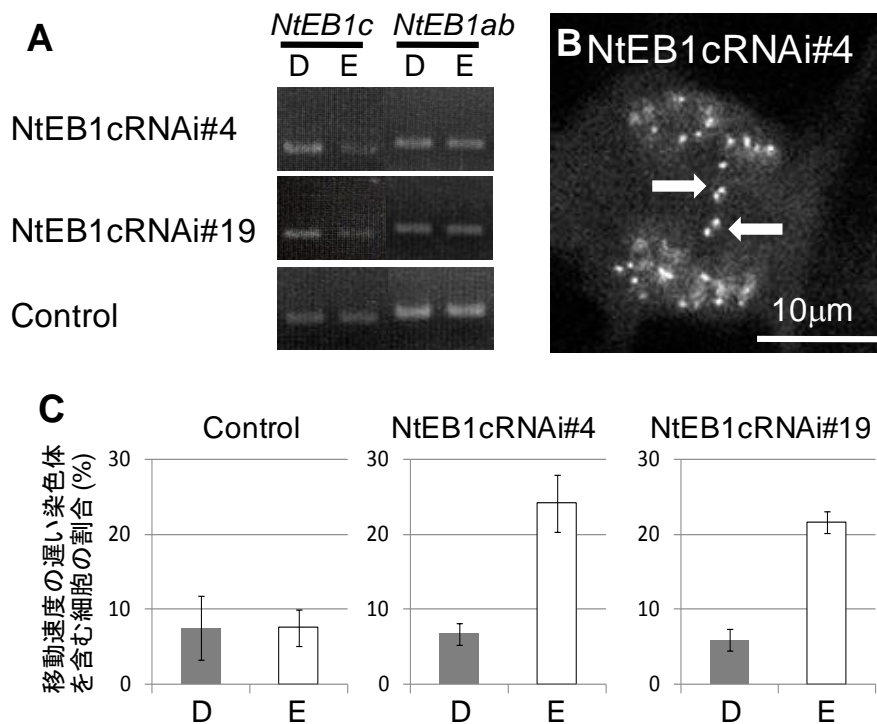


図 18 EB1c を抑制したタバコ BY-2 培養細胞の染色体移動の観察

誘導形の RNAi を用いて BY-2 の *NtEB1c* を抑制した。(A) DMSO (D) またはエストラジオール (E) を処理後 3 日目の BY-2 での *NtEB1ab* および *NtEB1c* の発現を判定的 RT-PCR を用いて定量した。(C) DMSO (D) またはエストラジオール (E) を処理後 3 日目の BY-2 での移動速度の遅い染色体を含む細胞の割合。各細胞ラインにおいて 40 個ずつの細胞を観察した。Control には野生株の BY-2 を用いた。

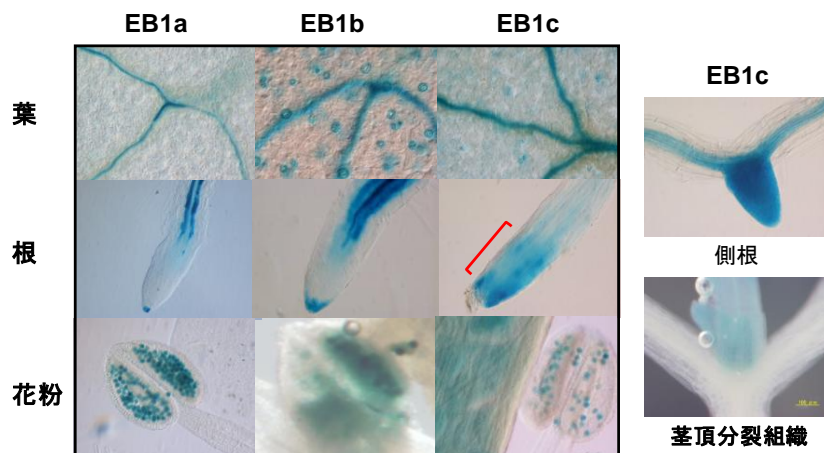


図 19 各遺伝子の upstream 2.0kbp をプロモーターとして用いた場合の GUS 染色。各遺伝子の upstream のみを GUS に連結した結果。赤カッコは分裂領域を示す。



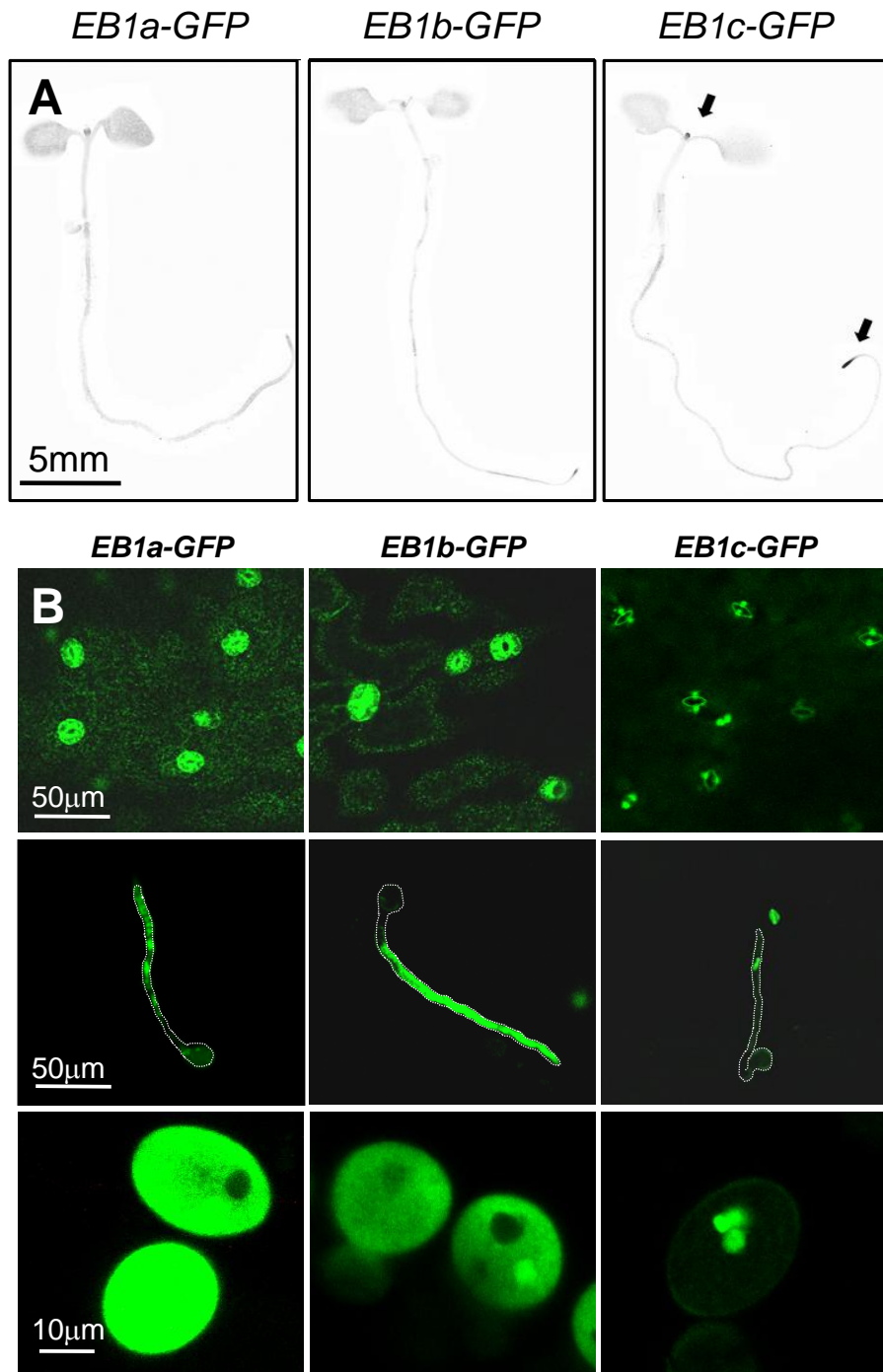


図 20 各遺伝子のゲノム配列に GFP を連結した場合の発現場所  
 (A) 発芽後 4 日目の GFP 発現領域。黒矢印は分裂領域での強い発現を示す。  
 (B) 葉の表皮、花粉管および花粉での発現確認。

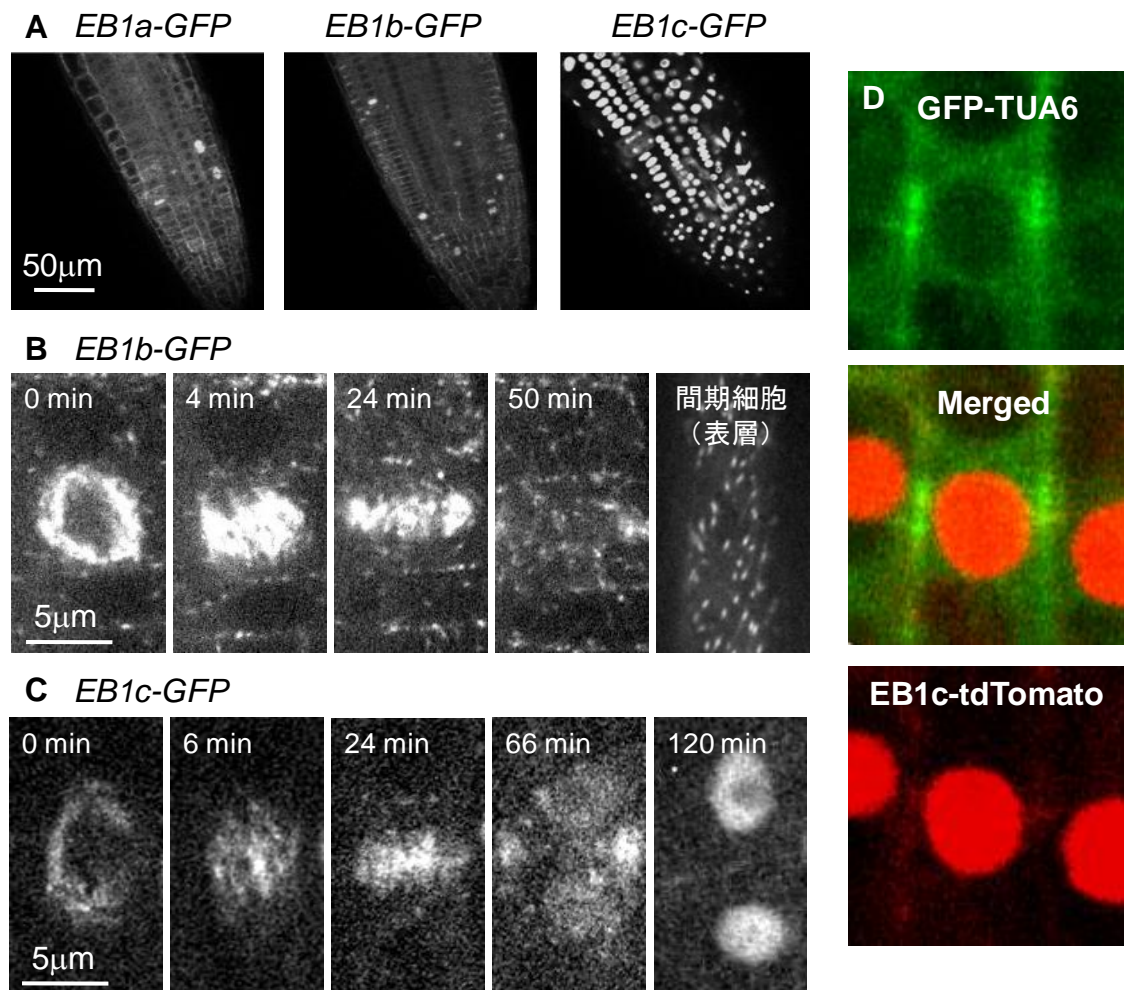


図 21 アラビドプシス **EB1s** の発現領域および細胞内局在

(A) 根の分裂領域での **EB1s** の局在。(B) 細胞周期に合わせた **EB1b-GFP** の局在変化。(C) 細胞周期に合わせた **EB1c-GFP** の局在変化。(D) PPB 形成時の **EB1c** の局在。**EB1c** のゲノム配列の C 末に **tdTomato** を挿入したものを発現した植物と **GFP-TUA6** を発現した植物を掛け合わせ観察を行った。

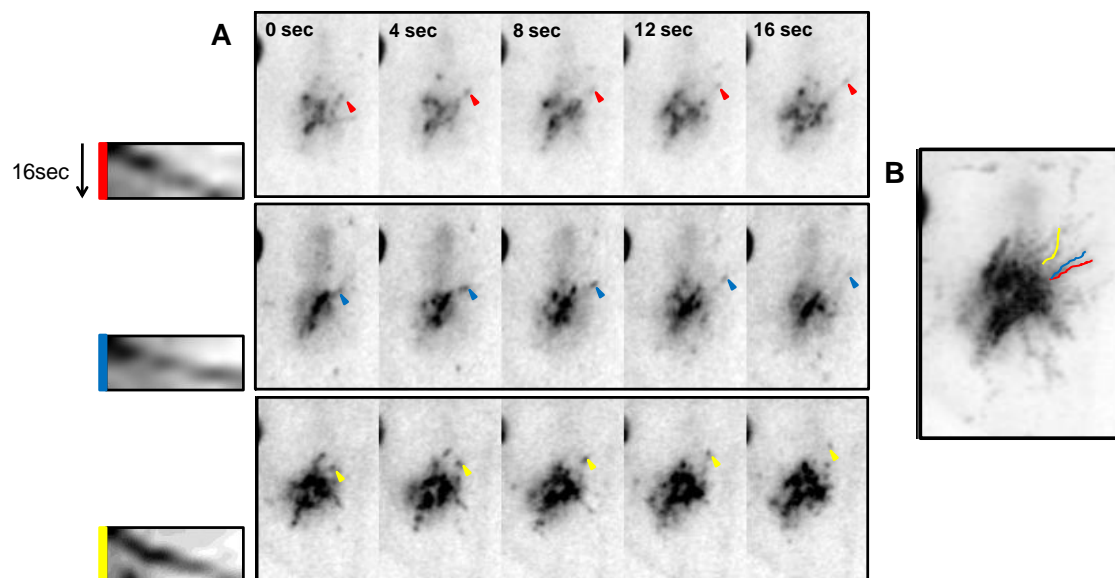


図 22 膜方向に進む EB1c-GFP のキモグラフ解析

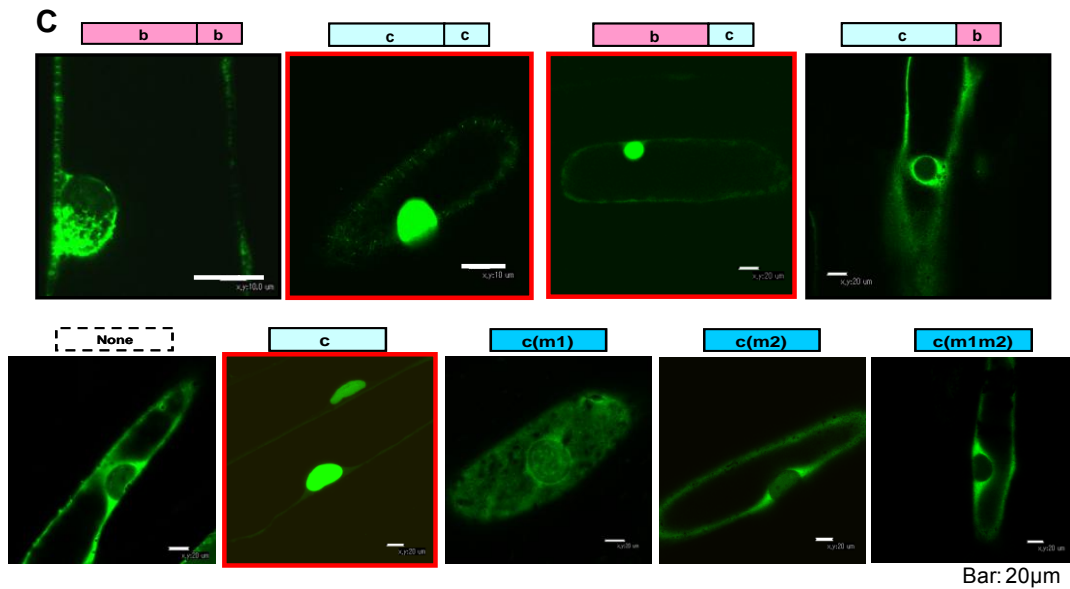
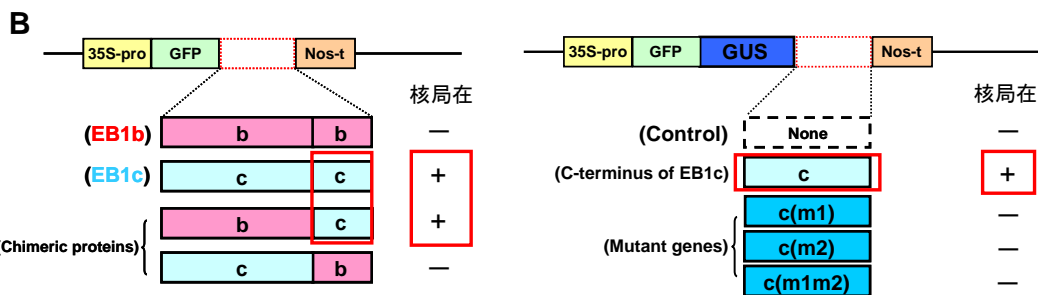
(A) 紡錘体形成時の EB1c-GFP を 4 秒に 1 度撮影しキモグラフを作製。各キモグラフは 16 秒間の写真を重ね合わせて解析した。(B) すべての写真を重ね合わせたもの。赤、青、黄色の線は(A)で検証を行った微小管を示す。

**A EB1a/b subfamily**

*A. thaliana* a 258 **EDDEA**EGNGEQLEEEKTQA 276  
 b 265 **EGYEE**EGK**EEEEEEEEEEEE**AAAA**ET**QT 293  
*N. tabacum* 249 SALAE**AE**FPSE**VDG**SEG 267  
*O. sativa* 249 SPL**EA**NE**II**TRSPSM**FP**DEA 269

**EB1c subfamily**

		<b>BOX1</b>		<b>BOX2</b>	
<i>A. thaliana</i>	278	<b>EE</b> RRNS-V- <b>TES</b> Q	<b>KRK</b>	LIVNLDVDVAAITTLSP	<b>RQR</b> LSDASDVK-CSGSSPLLTC 329
<i>N. tabacum</i>	284	<b>EEA</b> EE <b>R</b> -LRVDTQ	<b>KRK</b>	NIVNIDVDIAASNTLSP	<b>KQR</b> MSDASDVH-SSGSLVTY 326
<i>O. sativa</i>	280	<b>EASE</b> ERP <b>AQ</b> EAH	<b>KRK</b>	SISDLE <b>EE</b> FGMAS-SS	<b>RQR</b> LSDISDVQLCGSPLTSFT 332
			m1 (KRK>AAA)		m2 (RQR>AQA)



**図 23 EB1c の核局在シグナルの同定**

(A) EB1s の C 末配列の植物間での比較。赤は酸性アミノ酸を、緑は塩基性アミノ酸を示す。m1 は BOX1 の配列を KRK から AAA に置換したもの。m2 は BOX2 の配列を RQR から AQA に置換したもの。m1m2 はどちらの配列も置換したものを意味する。(B) 核局在シグナルの同定に用いたコンストラクト。(C) 各コンストラクトをタマネギの表皮細胞に一過的に発現させた結果。赤枠が核局在を示したものの。

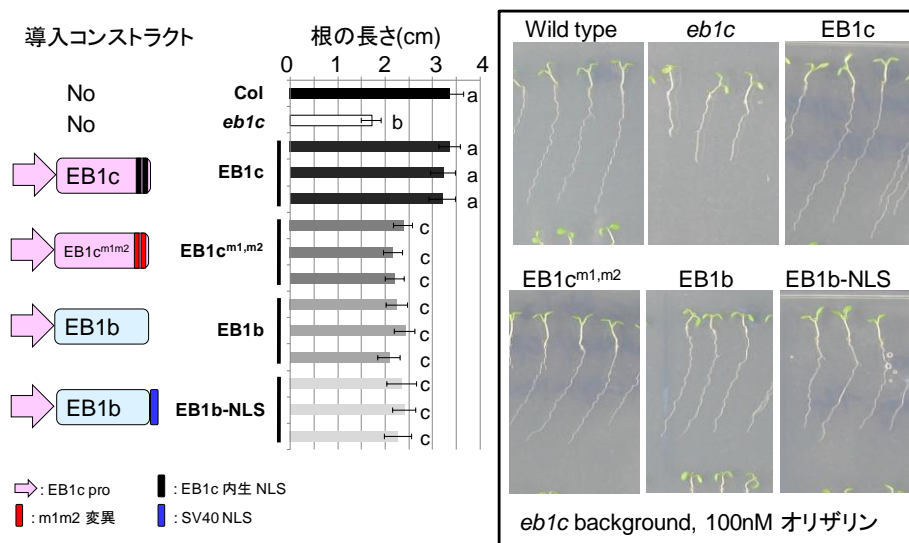


図 24 相補試験を用いたアラビドプシス EB1s の機能検証

各コンストラクトを *eb1c* 変異体に導入し 7 日間 100nM オリザリン添加培地で生育させ、根の長さの回復度合いを測定した。データの信頼度の検定には one-way ANOVA および Tukey-Kramer テストを用いた。

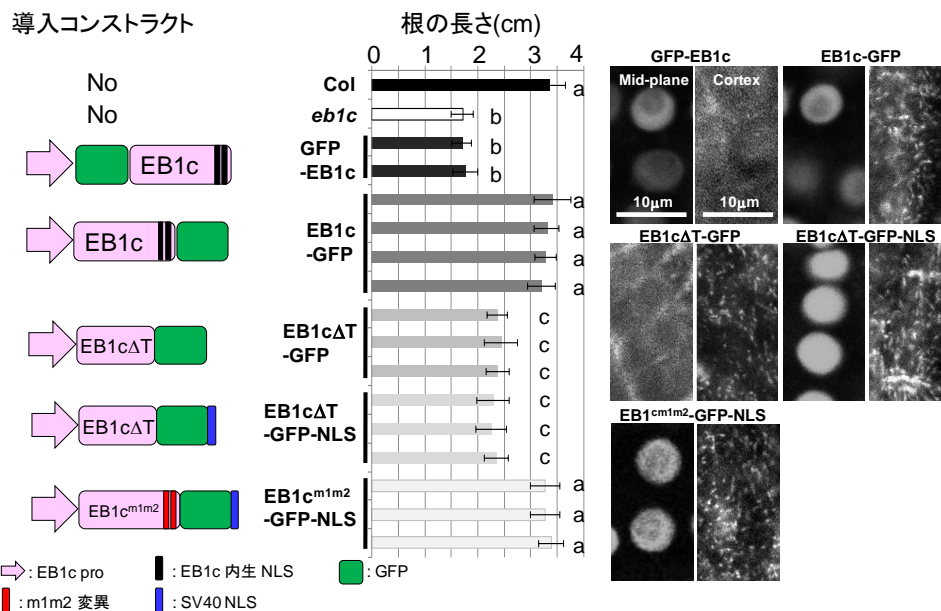


図 25 EB1c の C 末の機能検証

各コンストラクトを *eb1c* 変異体に導入し 7 日間 100nM オリザリン添加培地で生育させ、根の長さの回復度合いを測定した。GFP 蛍光は核局在 (Mid-plane) および表層微小管への局在 (Cortex) の確認に用いた。データの信頼度の検定には one-way ANOVA および Tukey-Kramer テストを用いた。

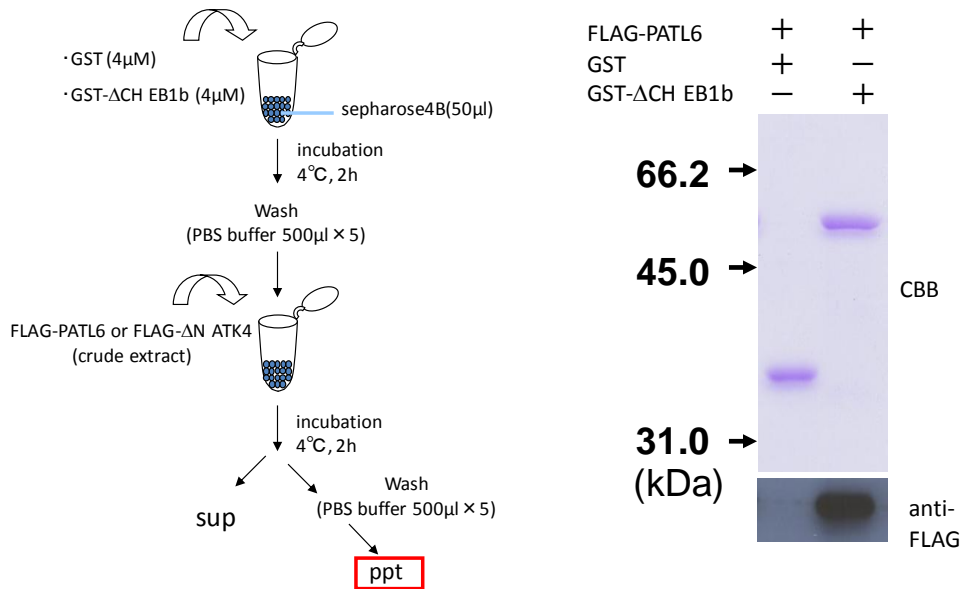


図 26 *in vitro* における EB1b と Patellin6 および ATK4 の結合実験  
 サンプルを溶出後、沈澱画分(ppt)を SDS-PAGE によって分離後 FLAG タグに対する抗体で結合を確認した。

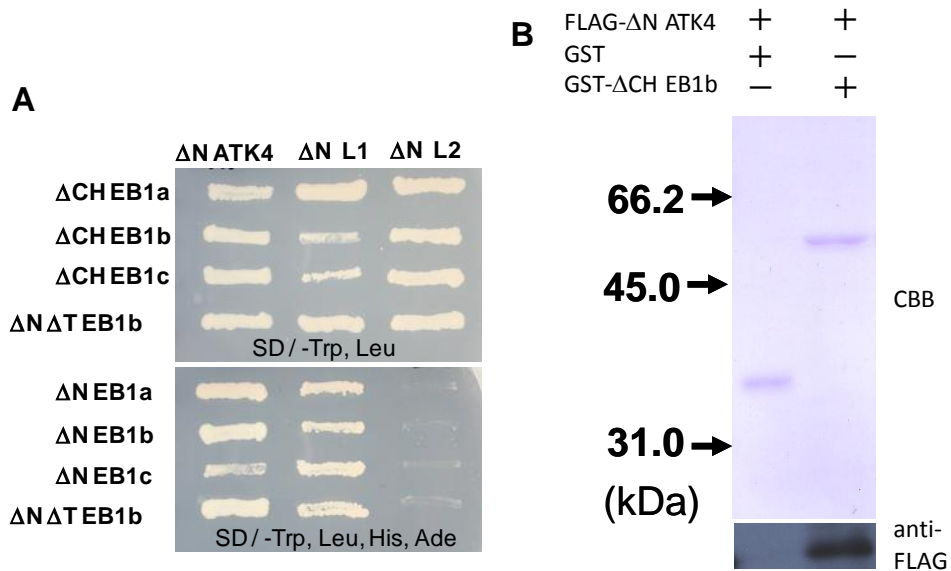


図 27 アラビドプシス EB1s と ATK4 ファミリーの結合実験  
 (A) 酵母 2 ハイブリッド法を用いた結合確認。上の写真(SC/-Trp, Leu)は生育培地、下の写真(SC/-Trp, Leu, His, Ade)は選抜培地。 (B) Pull-down アッセイを用いた結合実験。



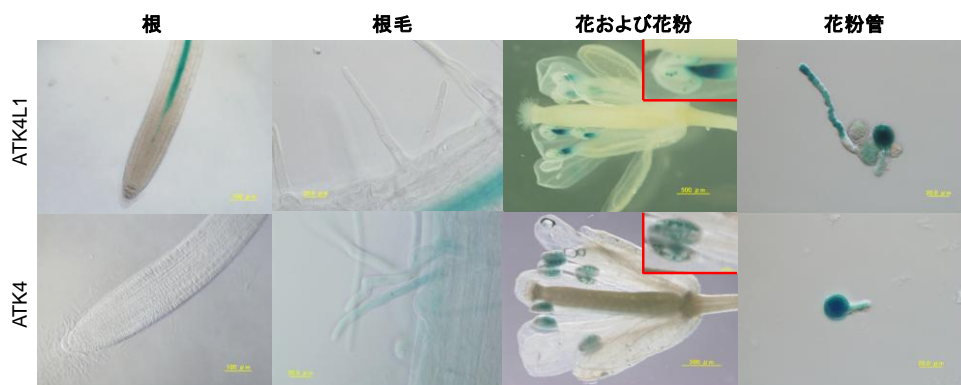


図 28 ATK4 および ATK4L1 の発現領域

各組織を GUS 染色液に浸し 16 時間後に観察を行った。赤枠内は拡大写真を示す。

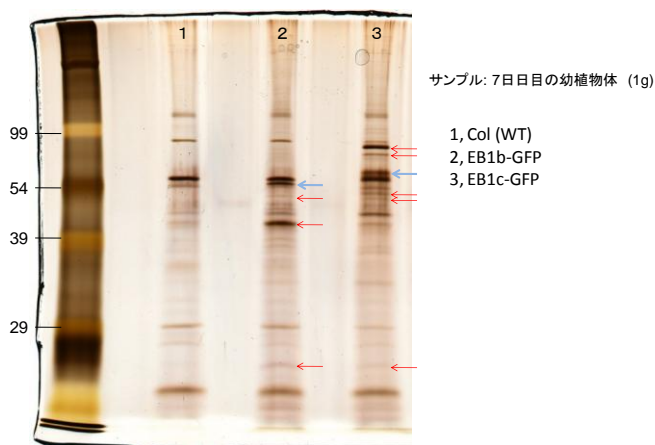


図 29 GFP を用いた Pull-down アッセイによる EB1 結合タンパク質の単離

7 日目の幼植物体よりタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により分離後、銀染色を行った。青矢印は GFP 融合 EB1 を示す。赤矢印はコントロール(Col)と比べ差がみられるバンド

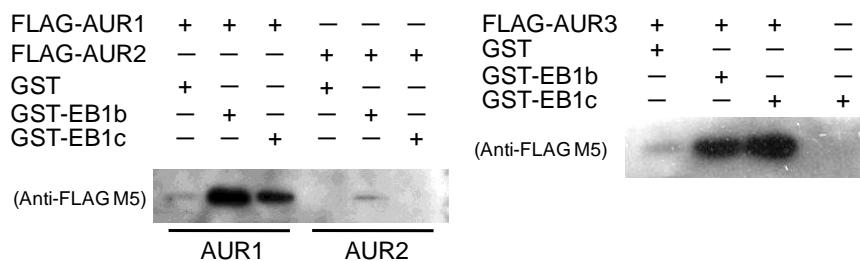


図 30 アラビドプシス EB1s と AUR ファミリーの in vitro の結合実験

Pull-down アッセイを用いた in vitro における結合実験。

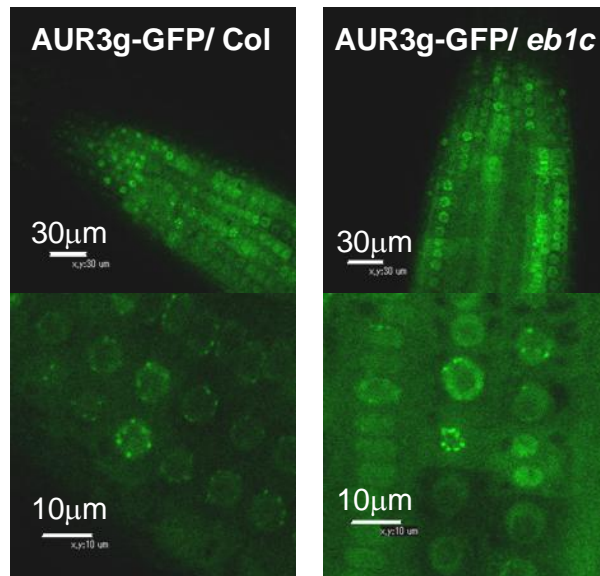


図 31 AUR3 の局在確認

野生株および *eb1c* 変異体での AUR3 の局在の変化を調べた。上の写真は根の分裂領域を、下の写真は拡大図を示す。

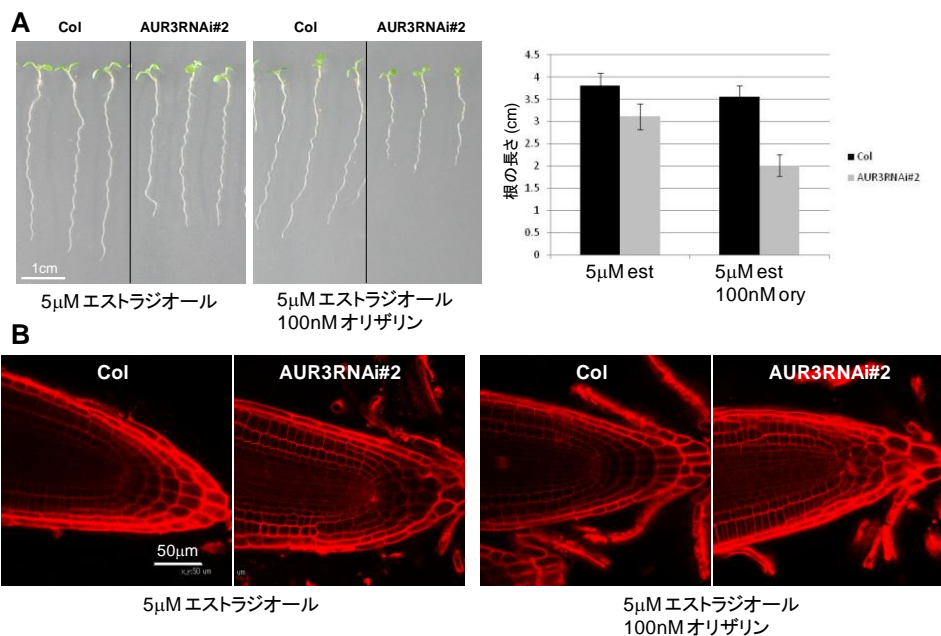


図 32 誘導系 RNAi を用いた *aur3* 変異体の表現形解析

(A) 播種後 7 日目の植物の根の長さを測定。(B) 各植物の根を PI で染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察。



表 1 酵母 2 ハイブリッドによって単離された EB1b 結合タンパク質

Locus	Gene name	Information
At3g15970	unknown protein	Ran-binding protein 1 domain-containing protein
At1g30690	SEC14 cytosolic factor family protein	PATL4
At4g09160	SEC14 cytosolic factor family protein	PATL5
At5g27000	ATK4 (ARABIDOPSIS THALIANA KINESIN 4)	
At5g45500	unknown protein	putative myosin heavy chain homolog
At1g77460	unknown protein	C2 domain-containing protein (Itosugi-like)
At2g30360	CBL-interacting protein kinase 11 (CIPK11)	relays in plant calcium signaling (SOS2-like)
At1g09070	rhodopsin-like receptor	C2 domain-containing protein
At4g21160	ZAC; ARF GTPase activator	zinc finger and C2 domain protein (ZAC)
At5g40190	calmodulin-binding protein	
At5g40190	calmodulin-binding protein	
At5g22640	unknown protein	Phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase, putative
At4g26860	pyridoxal phosphate binding	providing the D-alanine required for cell wall
At3g02550	unknown protein	lateral organ boundaries domain protein 41 (LBD41)
At2g02950	PKS1 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1)	
At1g14280	PKS2 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 2)	
At5g15850	COL1 (CONSTANS-LIKE 1)	
At4g25990	CIL	similar to constans-like 1
At5g05600	isopenicillin-N synthase	MOP10_14 leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein
At3g12270	methyltransferase	
At1g76600	unknown protein	Low-Oxygen Response
At5g19860	unknown protein	DUF538(several plant proteins of unknown function)
At3g17940	aldose 1-epimerase	
At1g73260	endopeptidase inhibitor	trypsin and protease inhibitor family protein
At2g27080	unknown protein	harpin-responsive protein-related involved in the plant
At5g20250	DIN10 (DARK INDUCIBLE 10)	
At1g31410	similar to Putrescine-binding periplasmic protein	transporter activity
At5g67360	cucumis-like serine protease (ARA12)	
At1g65980	TPX1; antioxidant	similar to peroxiredoxin type 2
At1g14740	unknown protein	DUF1423 (Arabidopsis thaliana proteins of unknown function)
At3g04730	early auxin-induced (IAA16)	
At1g51720	oxidoreductase	similar to NADP-specific glutamate dehydrogenase
At3g44820	protein binding / signal transducer	
At4g24520	ATR1 (ARABIDOPSIS CYTOCHROME REDUCTASE)	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative
At3g15640	cytochrome-c oxidase	
At3g61440	ATCYSC1; L-3-cyanoalanine synthase/ cysteine	
At4g16950	RPP5 (RECOGNITION OF PERONOSPORA	NBS-LRR encoding gene
At4g08685	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	
At1g42970	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit	
At1g17210	unknown protein	Domain found in inhibitor of apoptosis proteins
At4g00895	unknown protein	ATP synthase delta (OSCP) subunit
At3g11780	unknown protein	ML domain (interacting with specific lipids)
At3g26890	unknown protein	
At2g20310	unknown protein	
At5g14090	unknown protein	
At2g01990	unknown protein	
At3g48070	unknown protein	
At4g09580	unknown protein	
At3g17950	unknown protein	
At1g60950	electron transporter/ iron ion binding (FED A)	ferredoxin precursor
At2g04700	ferredoxin reductase	
At5g15090	voltage-gated ion-selective channel	porin, putative
At5g15090	voltage-gated ion-selective channel	porin, putative
At5g15090	voltage-gated ion-selective channel	porin, putative
At5g15090	voltage-gated ion-selective channel	porin, putative
At5g15090	voltage-gated ion-selective channel	porin, putative
At5g15090	voltage-gated ion-selective channel	porin, putative
At5g15090	voltage-gated ion-selective channel	porin, putative
At3g05020	acyl carrier protein 1, chloroplast (ACP-1)	

黄色ラベルは微小管との関連が示唆される遺伝子

表 2 Pull-down アッセイによって単離された EB1a 結合タンパク質

AT1G07920.1	elongation factor 1-alpha / EF-1-alpha
AT3G47690.1	ATEB1A (Arabidopsis thaliana Microtubule End Binding Protein EB1A); microtubule binding
AT1G60410.1	EMB2753 (EMBRYO DEFECTIVE 2753); binding
AT5G42060.1	ADL1 (ARABIDOPSIS DYNAMIN-LIKE PROTEIN); GTP binding
AT1G17220.1	FUG1 (FU-GAERI1); translation initiation factor
AT1G08520.1	CHLD/PDE166 (PIGMENT DEFECTIVE 166); magnesium chelatase/ nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding
AT4G18830.1	nuclear RNA-binding protein (RGGA)
AT3G08940.2	LHCB4.2 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII)
AT5G60980.1	nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein / RNA recognition motif (RRM)-containing protein
AT1G48900.1	signal recognition particle 54 kDa protein 3 / SRP54 (SRP-54C)
AT2G10940.1	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
AT5G24690.1	similar to RER1 (RETICULATA-RELATED 1) [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G22790.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO24736.1)
AT5G00670.1	ATP synthase beta chain 1, mitochondrial
AT4G39520.1	GTP-binding protein, putative
AT5G50920.1	CLPC (HEAT SHOCK PROTEIN 93-V); ATP binding / ATPase
AT3G48870.1	ATCLPC (CASEINOLYTIC PROTEASE C); ATP binding / ATPase
AT1G27090.1	glycine-rich protein (GPI-anchored membrane protein 1)
AT5G61970.1	signal recognition particle-related / SRP-related
AT1G62390.1	octacosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein / tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
AT3G46740.1	TOC75-III (translocon outer membrane complex 75-III); P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter
AT2G37620.1	ACT1 (ACTIN 1); structural constituent of cytoskeleton
AT1G59610.1	ADL3 (ARABIDOPSIS DYNAMIN-LIKE 3)
AT4G27500.1	PPI1 (PROTON PUMP INTERACTOR 1)
AT3G13930.1	dihydroipoamide S-acetyltransferase, putative
AT5G43960.1	nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein / RNA recognition motif (RRM)-containing protein
AT2G21160.1	translocon-associated protein alpha (TRAP alpha) family protein
AT1G56110.1	NOP56 (ARABIDOPSIS HOMOLOG OF NUCLEOLAR PROTEIN NOP56)
AT2G20280.1	zinc finger (CCCH-type) family protein
AT3G01540.1	DRH1 (DEAD box RNA helicase 1)
AT5G19760.1	dicarboxylate/tricarboxylate carrier (DTC)
AT1G70770.1	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G23170.1); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN67931.1); contains domain PTHR13448
AT4G10340.1	LHCB5 (LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5); chlorophyll binding
AT5G58000.1	heat shock protein 81-4 (HSP81-4)
AT3G09350.1	Encodes psaA protein comprising the reaction center for photosystem I along with psaB protein; hydrophobic protein encoded by the chloroplast genome.
AT5G62500.1	ATEB1B (Arabidopsis thaliana Microtubule End Binding Protein EB1A); microtubule binding
AT1G14830.1	ADL1/ADL5 (DYNAMIN-LIKE PROTEIN 5); GTP binding / GTPase
AT3G52140.1	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
AT2G24420.1	DNA repair ATPase-related
AT3G44330.1	similar to hypothetical protein OsJ_024705 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:EAZ41222.1); similar to Os08g0102100 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001060766.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO48
AT5G19510.1	elongation factor 1B alpha-subunit 2 (eEF1Balpha2)
AT2G42520.1	DEAD box RNA helicase, putative
AT5G37720.1	RNA and export factor-binding protein, putative
AT1G10290.1	ADL6 (DYNAMIN-LIKE PROTEIN 6)
AT4G31340.1	myosin heavy chain-related
AT3G58510.1	DEAD box RNA helicase, putative (RH11)
AT4G37930.1	SHM1 (SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 1); glycine hydroxymethyltransferase/ poly(U) binding
AT1G31340.1	RUB1 (RELATED TO UBIQUITIN 1)
AT3G08790.1	UBQ8 (ubiquitin 8)
AT1G55060.1	UBQ12 (UBIQUITIN 12)
AT5G62390.1	ATBAG7 (ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 7); calmodulin binding
AT1G08760.1	histone H1, putative
AT2G30620.1	histone H1.2
AT4G01310.1	ribosomal protein L5 family protein
AT5G52640.1	HSP81-1 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-1); ATP binding / unfolded protein binding
ATMG00280.1	hypothetical protein
AT5G18690.1	STT3A (STAUROSPORIN AND TEMPERATURE SENSITIVE 3-LIKE A); oligosaccharyl transferase
AT4G30720.1	oxidoreductase
AT1G20010.1	TUBS (tubulin beta-5 chain)
AT1G04170.1	EIF2 GAMMA (eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit); translation factor, nucleic acid binding
AT1G56070.1	LOS1 (Low expression of osmotically responsive genes 1); translation elongation factor/ translation factor, nucleic acid binding
AT1G26910.1	60S ribosomal protein L10 (RPL10B)
AT4G13940.1	HOG1 (HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING 1); adenosylhomocysteinase
AT5G59550.1	RNA and export factor-binding protein, putative
AT3G01500.2	CA1 (CARBONIC ANHYDRASE 1); carbonate dehydratase/ zinc ion binding
AT5G59910.1	HTB4; DNA binding
AT3G54110.1	ATPUMP1; binding / oxidative phosphorylation uncoupler
AT3G00680.1	encodes for CP47, subunit of the photosystem II reaction center.
AT1G26880.1	60S ribosomal protein L34 (RPL34A)
AT3G48470.1	NACA2 (NASCENT POLYPEPTIDE-ASSOCIATED COMPLEX SUBUNIT ALPHA-LIKE PROTEIN 2)
AT5G14610.1	ATP binding / ATP-dependent helicase
AT4G10840.1	kinesin light chain-related (PHS2)
AT1G08340.1	CRB; binding / catalytic/ coenzyme binding
AT1G74050.1	60S ribosomal protein L6 (RPL6C)

AT5G43940.1	ADH2 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 2); formaldehyde dehydrogenase (glutathione)
AT3G61820.1	aspartyl protease family protein
AT4G09000.1	GRF1 (GENERAL REGULATORY FACTOR 1); protein phosphorylated amino acid binding
AT1G78300.1	GRF2 (GENERAL REGULATORY FACTOR 2); protein phosphorylated amino acid binding
AT5G65430.1	GRF8 (GENERAL REGULATORY FACTOR 8); protein phosphorylated amino acid binding
AT5G10450.1	GRF6 (G-BOX REGULATING FACTOR 6); protein phosphorylated amino acid binding
AT5G46110.1	APE2 (ACCLIMATION OF PHOTOSYNTHESIS TO ENVIRONMENT); antiporter/ triose-phosphate transmembrane transporter
AT5G07030.1	pepsin A
AT3G05060.1	SAR DNA-binding protein, putative
AT1G15310.1	ATHSRP54A (Arabidopsis thaliana signal recognition particle 54kDaA); 7S RNA binding / GTP binding / mRNA binding
AT3G44110.1	ATJ3 (Arabidopsis thaliana DnaJ homologue 3)
AT3G49720.1	Identical to Uncharacterized protein At3g49720 [Arabidopsis Thaliana] (GB:Q9M2Y6;GB:Q93YM8); similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G65810.1); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN74732.1); contains domain S-a
AT5G27120.1	SAR DNA-binding protein, putative
AT3G14420.1	(S)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal, putative / glycolate oxidase, putative / short chain alpha-hydroxy acid oxidase, putative
AT1G61520.1	LHCA3 (Photosystem I light harvesting complex gene 3); chlorophyll binding
AT1G78010.1	nucleic acid binding
AT5G14740.1	CA2 (BETA CARBONIC ANHYDRASE 2); carbonate dehydratase/ zinc ion binding
AT2G01250.1	60S ribosomal protein L7 (RPL7B)
AT1G20280.1	(VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT B3); hydrogen ion transmembrane transporter/ hydrogen ion transporting ATP synthase, rotational mechanism / hydrogen ion transporting ATPase, rotational mechanism
AT1G15280.1	DEAD/DEAH box helicase, putative
AT5G44340.1	TUB4 (tubulin beta-4 chain)
AT1G55020.1	LOX1 (Lipoxygenase 1); lipoxygenase
AT2G45820.1	DNA-binding protein, putative
AT4G23400.1	PIP1;5/PIP1D (plasma membrane intrinsic protein 1;5); water channel
AT3G54820.1	PIP2;5/PIP2D (plasma membrane intrinsic protein 2;5); water channel
AT2G06850.1	EXGT-A1 (ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE); hydrolase, acting on glycosyl bonds
AT4G31700.1	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6); structural constituent of ribosome
AT4G18360.1	(S)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal, putative / glycolate oxidase, putative / short chain alpha-hydroxy acid oxidase, putative
AT1G55490.1	CPN60B (CHAPERONIN 60 BETA); ATP binding / protein binding / unfolded protein binding
AT2G34040.1	apoptosis inhibitory 5 (API5) family protein
AT3G60180.1	ADL4/ADLP2/DRP1E/EDR3 (DYNAMIN-LIKE PROTEIN 4); GTP binding / GTPase
AT2G44120.1	60S ribosomal protein L7 (RPL7C)
AT5G52470.1	FIB1 (FIBRILLARIN 1)
AT4G25630.1	FIB2 (FIBRILLARIN 2)
AT1G54870.1	oxidoreductase
AT3G47520.1	MDH (MALATE DEHYDROGENASE); malate dehydrogenase
AT5G20920.1	EIF2 BETA (EMBRYO DEFECTIVE 1401)
AT4G09320.1	NDPK1 (nucleoside diphosphate kinase 1); ATP binding / nucleoside diphosphate kinase
AT3G25230.1	ROF1 (ROTAMASE FKBP 1); FK506 binding / calmodulin binding / peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
AT1G72450.1	protein kinase, putative
AT3G26050.1	RGS1 (REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1)
AT1G18450.1	ATARP4 (ACTIN-RELATED PROTEIN 4); structural constituent of cytoskeleton
AT1G01300.1	aspartyl protease family protein
AT4G18330.1	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, putative / eIF2S3, putative / eIF-2-gamma, putative
AT1G34780.1	GRF11 (GENERAL REGULATORY FACTOR 11); amino acid binding / protein phosphorylated amino acid binding
AT1G26480.1	GRF12 (GENERAL REGULATORY FACTOR 12); protein phosphorylated amino acid binding
AT2G42590.1	GRF9 (GENERAL REGULATORY FACTOR 9); protein phosphorylated amino acid binding
AT3G51800.1	ATG2 (G2p-related protein), metalloexopeptidase

黄色ラベル EB1a サンプルから検出された遺伝子。緑ラベルは EB1a,c サンプルともに検出された遺伝子。

表 3 Pull-down アッセイによって単離された EB1c 結合タンパク質

AT3G03960.1	chaperonin, putative
AT3G20050.1	ATTCP-1 (Arabidopsis thaliana T-complex protein 1 alpha subunit);
AT4G14960.2	TUA6 (tubulin alpha-6 chain)
AT3G09440.1	heat shock cognate 70 kDa protein 3 (HSC70-3) (HSP70-3)
AT5G19770.1	TUA3 (tubulin alpha-3)
AT4G14960.1	TUA6 (tubulin alpha-6 chain)
AT3G11830.1	chaperonin, putative
AT5G20890.1	chaperonin, putative
AT5G16070.1	chaperonin, putative
AT3G02530.1	chaperonin, putative
AT5G67270.1	ATEB1C (MICROTUBULE END BINDING PROTEIN 1); microtubule binding
AT3G18190.1	chaperonin, putative
AT1G24510.1	T-complex protein 1 epsilon subunit, putative / / chaperonin, putative
AT1G20010.1	TUB5 (tubulin beta-5 chain)
AT3G13920.1	EIF4A1 (eukaryotic translation initiation factor 4A-1); ATP-dependent helicase
AT5G08670.1	ATP synthase beta chain 1, mitochondrial
AT5G26360.1	chaperonin, putative
AT5G44340.1	TUB4 (tubulin beta-4 chain)
AT2G37620.1	ACT1 (ACTIN 1); structural constituent of cytoskeleton
AT5G42060.1	ADL1 (ARABIDOPSIS DYNAMIN-LIKE PROTEIN); GTP binding
AT3G11130.1	clathrin heavy chain, putative
AT5G62390.1	ATBAG7 (ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 7); calmodulin binding
AT1G55490.1	CPN60B (CHAPERONIN 60 BETA); ATP binding / unfolded protein binding
AT4G22010.1	SKS4 (SKU5 Similar 4); copper ion binding / oxidoreductase
AT5G44120.3	CRA1 (CRUCIFERINA); nutrient reservoir
AT3G08940.2	LHCB4.2 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII)
AT3G58510.1	DEAD box RNA helicase, putative (RH11)
AT4G16830.1	nuclear RNA-binding protein (RGGA)
AT4G13940.1	HOG1 (HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING 1); adenosylhomocysteinase
AT3G52930.1	fructose-bisphosphate aldolase, putative
AT5G10450.1	GRF6 (G-BOX REGULATING FACTOR 6); protein phosphorylated amino acid binding
AT2G30950.1	VAR2 (VARIATED 2); ATP-dependent peptidase/ ATPase/ metallopeptidase/ zinc ion binding
AT4G10340.1	LHCB5 (LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5); chlorophyll binding
AT1G71500.1	Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein
AT4G16830.2	nuclear RNA-binding protein (RGGA)
AT5G17920.1	ATCIMS (COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE); 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase/ methionine synthase
AT3G01500.2	CA1 (CARBONIC ANHYDRASE 1); carbonate dehydratase/ zinc ion binding
AT4G27440.1	PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE B); oxidoreductase/ protochlorophyllide reductase
AT2G31610.1	40S ribosomal protein S3 (RPS3A)
AT5G14040.1	mitochondrial phosphate transporter
AT3G44110.1	ATJ3 (Arabidopsis thaliana DnaJ homologue 3)
AT1G06430.1	FTSH8 (FtsH protease 8); ATP-dependent peptidase/ ATPase/ metallopeptidase/ zinc ion binding
AT4G37930.1	SHM1 (SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 1); glycine hydroxymethyltransferase/ poly(U) binding
AT3G14420.1	(S)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal, putative / glycolate oxidase, putative / short chain alpha-hydroxy acid oxidase, putative
AT4G29130.1	ATHXK1 (GLUCOSE INSENSITIVE 2); ATP binding / hexokinase
AT5G14740.1	CA2 (BETA CARBONIC ANHYDRASE 2); carbonate dehydratase/ zinc ion binding
AT5G19510.1	elongation factor 1B alpha-subunit 2 (eEF1Balpha2)
AT3G56030.1	HSP81-2 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 8); ATP binding
AT3G23820.1	GAE6 (UDP-D-GLUCURONATE 4-EPIMERASE 6); catalytic
AT1G47128.1	RD21 (RESPONSIVE TO DEHYDRATION 21); cysteine-type peptidase
AT5G50920.1	CLPC (HEAT SHOCK PROTEIN 93-V); ATP binding / ATPase
AT3G48870.1	ATCLPC (CASEINOLYTIC PROTEASE C); ATP binding / ATPase
AT3G19760.1	eukaryotic translation initiation factor 4A, putative / eIF-4A, putative / DEAD box RNA helicase, putative
AT1G65930.1	isocitrate dehydrogenase, putative / NADP+ isocitrate dehydrogenase, putative
AT1G32060.1	PRK (PHOSPHORIBULOKINASE); ATP binding / phosphoribulokinase/ protein binding
AT1G78300.1	GRF2 (GENERAL REGULATORY FACTOR 2); protein phosphorylated amino acid binding
AT5G65430.1	GRF8 (GENERAL REGULATORY FACTOR 8); protein phosphorylated amino acid binding
AT3G03780.1	ATMS2 (Arabidopsis thaliana methionine synthase 2); 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase
AT1G56110.1	NOP56 (ARABIDOPSIS HOMOLOG OF NUCLEOLAR PROTEIN NOP56)
AT5G12110.1	elongation factor 1B alpha-subunit 1 (eEF1Balpha1)
AT4G13930.1	SHM4 (SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 4); glycine hydroxymethyltransferase
AT1G64740.1	TUA1 (ALPHA-1 TUBULIN)
AT3G12780.1	PGK1 (PHOSPHOGLYCERATE KINASE 1); phosphoglycerate kinase
AT3G13930.1	dihydroliipoamide S-acetyltransferase, putative
AT5G46110.1	APE2 (ACCLIMATION OF PHOTOSYNTHESIS TO ENVIRONMENT); antiporter/ triose-phosphate transmembrane transporter
AT3G13860.1	chaperonin, putative
AT5G60980.1	nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein / RNA recognition motif (RRM)-containing protein
AT3G55800.1	SBPASE (SEDOHEPTULOSE-BISPHOSPHATASE); phosphoric ester hydrolase/ sedoheptulose-bisphosphatase
AT1G52740.1	HTA9; DNA binding
AT5G35630.1	GS2 (GLUTAMINE SYNTHETASE 2); glutamate-ammonia ligase
AT2G42520.1	DEAD box RNA helicase, putative
ATCG00540.1	Encodes cytochrome f apoprotein; involved in photosynthetic electron transport chain; encoded by the chloroplast genome and is transcriptionally repressed by a nuclear gene HCF2.
AT2G10940.1	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein

ATCG00350.1	Encodes psaA protein comprising the reaction center for photosystem I along with psaB protein; hydrophobic protein encoded by the chloroplast genome.
AT4G28090.1	SKS10 (SKU5 Similar 10); copper ion binding / oxidoreductase
AT5G19690.1	STT3A (STAUROSPORIN AND TEMPERATURE SENSITIVE 3-LIKE A); oligosaccharyl transferase
AT5G50750.1	RGP4; alpha-1,4-glucan-protein synthase (UDP-forming)
AT3G02230.1	RGP1 (REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 1)
AT3G08900.1	RGP3 (REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 3); alpha-1,4-glucan-protein synthase (UDP-forming)
AT3G58140.1	phenylalanyl-tRNA synthetase class IIc family protein
AT5G47210.2	nuclear RNA-binding protein, putative
AT5G62500.1	ATEB1B (Arabidopsis thaliana Microtubule End Binding Protein EB1A); microtubule binding
AT5G28510.1	glycosyl hydrolase family 1 protein
AT1G62020.1	coatomer protein complex, subunit alpha, putative
AT2G21390.1	coatomer protein complex, subunit alpha, putative
AT3G09790.1	UBQ8 (ubiquitin 8)
AT1G23410.1	ubiquitin extension protein, putative / 40S ribosomal protein S27A (RPS27aA)
AT5G37640.1	UBQ9 (ubiquitin 9)
AT3G49720.1	Identical to Uncharacterized protein At3g49720 [Arabidopsis Thaliana] (GB:Q9M2Y6;GB:Q93YM8); similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G65810.1); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN74732.1); contains domain S-a
AT1G72150.1	PATL1 (PATELLIN 1); transporter
AT3G47520.1	MDH (MALATE DEHYDROGENASE); malate dehydrogenase
AT3G25520.1	ATL5 (A. THALIANA RIBOSOMAL PROTEIN L5); structural constituent of ribosome
AT1G73450.1	protein kinase, putative
AT3G01540.1	DRH1 (DEAD box RNA helicase 1)
AT5G14610.1	ATP binding / ATP-dependent helicase
ATCG00500.1	Encodes the carboxyltransferase beta subunit of the Acetyl-CoA carboxylase (ACCase) complex in plastids. This complex catalyzes the carboxylation of acetyl-CoA to produce malonyl-CoA, the first committed step in fatty acid synthesis.
AT5G52640.1	HSP81-1 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-1); ATP binding / unfolded protein binding
AT4G16155.1	dihydroliipoamide dehydrogenase 2, plastidic / lipoamide dehydrogenase 2 (PTLPD2)
AT1G04170.1	EIF2 GAMMA (eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit); translation factor, nucleic acid binding
AT1G76010.1	nucleic acid binding
AT2G38040.1	CAC3 (acetyl co-enzyme A carboxylase carboxyltransferase alpha subunit); acetyl-CoA carboxylase
AT1G22300.1	GRF10 (GENERAL REGULATORY FACTOR 10); protein phosphorylated amino acid binding
AT2G36250.1	FTSZ2-1 (FtsZ homolog 2-1); structural molecule
AT4G34670.1	40S ribosomal protein S3A (RPS3aB)
AT3G02560.1	40S ribosomal protein S7 (RPS7B)
AT5G51070.1	ERD1 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 1); ATP binding / ATPase
AT1G70770.1	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G23170.1); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN67931.1); contains domain PTHR13448 (PTHR13448)

青色ラベル EB1c サンプルから検出された遺伝子。緑ラベルは EB1a,c サンプルともに検出された遺伝子。

## 4 考察

### 4-1 アラビドプシス EB1s の機能ドメイン

微小管のプラス端特異的に局在する EB1 は真核生物に広く保存された MAPs のひとつである(Tirnauer and Bierer, 2000)。動物や酵母の EB1 は N 末から CHドメイン、リンカー領域、コイルドコイル(CC)ドメインそして C 末に酸性のアミノ酸領域(Acidic tail)を持つ。これまでの研究より CHドメインは微小管結合にそして CCドメインは 2 量体形成に重要な働きを持つことが明らかとなっている(Slep et al., 2005)。アラビドプシスに存在する 3 つの EB1 のうち EB1a および EB1b は動物や酵母とよく似た構造を持ち、その C 末は酸性のアミノ酸に富んでいる。一方、植物にのみ存在する EB1c はその C 末にほとんど酸性のアミノ酸を含まず植物特有の配列を持つ。つまりアラビドプシスには 2 種類の EB1 が存在している。本研究の *in vitro* の実験より EB1c を含む 3 つの EB1 はいずれも CHドメインを介して微小管に結合し、CCドメインによって 2 量体を形成することがわかった。また、2 量体を形成することによって微小管への結合能が増加することも明らかとなった。したがって、アラビドプシスの EB1s においても各ドメインの機能は基本的に保存されており、動物や酵母の EB1 と同様の役割を果たすことが示された。しかしながら 2 量体形成に関しては EB1a,b は互いにヘテロダイマーを形成できるが、EB1c とは形成できないことから、アラビドプシスに存在する 2 種類の EB1 の間には一部性質の違いが見られこともわかった。

これまでの動物や酵母の研究より C 末の酸性アミノ酸領域は自己不活性化および CLIP170 や p150<sup>glued</sup> といった他の微小管プラス端局在タンパク質(+TIPs)との結合に必要であることが分かっている(Vaughan, 2005; Akhmanova and Hoogenraad, 2005)。このうち p150<sup>glued</sup> は EB1 の C 末に結合することで EB1 の自己不活性化状態を解除することが知られている(Hayashi et al., 2005)。しかしこのような EB1 結合タンパク質は植物のゲノム中には存在せず、植物の EB1 の C 末に他の生物と同様の機能が保存されているかは知られていない。アラビドプシスの EB1b は C 末に酸性アミノ酸を多数含む領域を有しており、その C 末を取り除くことで微小管の重合活性が上昇することが確認された。この結果はアラビドプシスの EB1b が自己不活性化能を持つことを示すとともに、動物とは異なる結合タンパク質群が植物には存在することを示唆する。また、C 末にほとんど酸性アミノ酸を持たない EB1c は微小管の

重合活性は持つものの自己不活性化形態はとらないことが明らかとなった。このように *in vitro* の機能においても植物特異的な配列を持つ **EB1c** は他の生物の **EB1** と異なることがわかった。

## 4-2 アラビドプシス **EB1s** の変異体解析

以前報告されたアラビドプシス **EB1s** の変異体解析では 3 重変異体において根が左に流れ、渦を巻いたような表現形を示した(Bisgrove et al., 2008)。しかしながら本研究で用いた 3 重変異体ではそのような渦状の根は観察されなかった。Bisgrove らが論文中で述べていたようにエコタイプ間の差による違いが示唆される。本研究におけるアラビドプシス **EB1s** の変異体解析より **EB1a,b** は表層微小管にそして **EB1c** は分裂期の微小管に対しておもに機能することがわかった。*eb1c* 変異体では根の分裂領域において分裂面に異常が生じた細胞が多数観察された。これまでに研究が行われてきた微小管に関与する変異体の中で、分裂面に乱れが生じる変異体は将来の分裂面の決定に関わる **PPB** の形成に問題を持つものが多かった((Camilleri et al., 2002; Müller et al., 2006; Walker et al., 2007))。しかしながら *eb1c* 変異体では **PPB** の形成異常は観察されなかった。**EB1c-GFP** は核膜が崩壊までは核内に局在することから **PPB** の形成には関与しないと思われる。*eb1c* 変異体での微小管構造を詳しく調べたところ、紡錘体の 2 極性の維持ができず、その後形成されるフラグモプラストの形も異常なものが数多く観察された。動物では **EB1** の欠損によって紡錘体の空間的配置に異常が生じる。その理由として紡錘体の極性維持に関わるアストラル微小管の不安定化が挙げられている(Green et al., 2005)。アストラス微小管は中心体から細胞膜方向に伸長する微小管であり、細胞膜と結合することで紡錘体の位置の維持に寄与する。これまでのところ植物においてアストラル微小管の存在はほとんど観察されていないが、近年いくつかの研究においてアストラル様微小管の存在が示唆されている(Chan et al., 2005; Gaillard et al., 2008)。本研究においても **EB1c-GFP** の局在解析より、膜方向に伸長するシグナルが多数確認された。このことからアストラル様微小管の不安定化が *eb1c* 変異体の表現形の一因になっているのかもしれない。またタバコ **BY-2** 培養細胞を用いた実験より **EB1c** が染色体の移動にも関与することがわかった。この染色体移動に関する表現形は動物の **EB1** 欠損でも現れるものであり、微小管のプラス端動態の変化によってキネトコアと微小管の結合に異常が生じるために起こるとされている(Wood et al., 1997; Maiato et al.,

2004)。in vitro の実験よりアラビドプシスの EB1c も微小管重合促進活性を持つことが示されたことから、植物の EB1c 欠損による染色体移動の遅延も微小管プラス端の動態の変化によると思われる。このように *eb1c* 変異体では膜へと伸びる微小管そして染色体へと伸びる微小管という 2 種類の微小管がいずれも不安定化することで紡錘体の 2 極性の維持ができなくなっていると考えられる。そのため *eb1c* 変異体では分裂面が乱れ、結果として根の伸長が遅延すると考えられる(図 33)。今後は植物体内での微小管の安定性を実際に計ることでこのモデルを実証していく必要がある。

一方、*eb1a eb1b* 変異体では根の伸長方向が野生株と異なることが明らかとなり、その原因として表層微小管の配向異常が示唆された。この表現形は *eb1a* および *eb1b* 変異体の単独変異体では観察されないため、この 2 つの遺伝子は重複した機能を持つと考えられる。植物の細胞は表層微小管が伸長方向に対し垂直に配向し、それに沿ってセルロース微繊維が合成される。このセルロースが「たが」のように働くことで、伸長方向が正確に規定されるモデルが提唱されている(Baskin, 2005)。近年、チューブリン変異体を含む様々な変異体の解析よりこのモデルが実証されつつある(Thitamadee et al., 2002; Abe et al., 2004)。EB1a および EB1b はともに微小管重合促進活性を持っており、さらに間期細胞において表層微小管のプラス端に局在することから、プラス端の動態を調節することで表層微小管の正確な配向に関与しているのかもしれない。アラビドプシスの *eb1a eb1b eb1c* 変異体は *eb1c* の単独変異体よりオリザリンに対し高い感受性を示した。EB1a,b はともに分裂期のすべての微小管構造に局在する。また間期に核内に局在する EB1c は分裂期に細胞質に放出された後ふたたび核に収納されるまでの間、表層微小管にも局在する。これらの結果は EB1a,b と EB1c が共通して存在し、働く可能性を示す。また、いずれの EB1 も in vitro での活性は微小管重合を促進するものであり、このことから植物に存在する 2 種類の EB1 が重複した機能を持つことを示唆する。

### 4-3 アラビドプシス EB1s の発現領域および細胞内局在性

GFP を用いた局在解析の結果、アラビドプシス EB1s のうち EB1a,b は細胞周期を通じてすべての微小管のプラス端に局在した。一方 EB1c は分裂期には微小管のプラス端に局在したが、間期には核内に局在することが明らかとなった。このように核に局在する EB1 は他の生物では見つかっていない。核局在シグナルを決定したところ植物の EB1 に特徴的な C 末に 2 か所存在すること



が明らかとなった。この配列を各植物の EB1 間で比較したところシダ植物を含むすべての維管束植物に見つかった(図 34)。しかしながら緑藻、コケ、そして酵母や動物には核局在シグナルをもつ EB1 は確認できなかった。本研究から EB1c が特に紡錘体の 2 極性の維持に関与することが示された。動植物間での紡錘体形成時の違いの一つとして中心体の存在の有無がある(Bannigan et al. 2008)。中心体には $\gamma$ チューブリンが局在し、そこから新規の微小管が合成されることが知られている。分裂時には中心体を起点として作り出されるアストラル微小管およびキネトコア微小管によって紡錘体の位置や極性が規定される。一方、植物は陸上に進出する過程において中心体が消失し、 $\gamma$ チューブリンが細胞質中に散在しており、紡錘体の極性維持が不完全である(Smith et al. 2001)。植物はこのような中心体のない不安定な紡錘体の極性維持機構を補完するために EB1c のような新たな 2 極性安定化因子を獲得したのかもしれない。

*in vitro* の実験より EB1c はホモダイマーを形成するが EB1a,b とのヘテロダイマーは形成しないことが明らかとなった。また、核局在シグナルが機能しない EB1c<sup>m1m2</sup>-GFP および EB1c $\Delta$ T-GFP を野生株に導入したところ GFP シグナルは核内から観察されるが *eb1c* 変異体に導入することで核内のシグナルは消失し、細胞質に観察される(図 35)。この結果は野生型の EB1c が核内に存在することを示唆する。一方、EB1a-GFP および EB1b-GFP は野生型 EB1c の存在下で発現させても核内には観察されないことから *in vivo* においても EB1c は EB1a,b とはヘテロダイマーは形成しないと思われる。このような選択的なダイマー形成様式は EB1c 機能の特異性を高めるために重要であると考えられる。

#### 4-4 植物特異的な配列を持つ EB1c の C 末配列の機能

本研究において植物に特異的な配列を持つ EB1c の C 末配列には核移行シグナルが存在することが明らかとなった。更なる機能解析を進めるために *eb1c* 変異体の相補試験を用いた。EB1b のコード領域を EB1c のプロモーターの下流に連結し *eb1c* 変異体の相補を試みたが表現形の部分的な回復にとどまった。この結果は両遺伝子間で機能の重複部分があることを示唆するとともに紡錘体の制御機構において EB1c が EB1b にない機能を持つことが考えられる。分裂期以前に EB1c が核に局在する理由の一つとして核膜崩壊後に素早く紡錘体で機能することが挙げられる。しかしながら C 末を欠損した EB1c に人工的な核局在シグナルを付加し(EB1c $\Delta$ T-GFP-NLS)、*eb1c* 変異体の相補

を試みたところ、完全な回復には至らなかった。一方、C末の核移行シグナルに変異を加えることで核移行能をなくした EB1c(他の C 末配列は保持している)に、さらに人工的な核局在シグナルを付加した EB1c(EB1c<sup>m1m2</sup>-GFP-NLS)で *eb1c* 変異体の相補を試みたところ完全に表現形を回復できた。つまり EB1c の C 末は核局在シグナル以外の配列を持つことが示唆される。含まれる配列として、「翻訳後修飾の標的となる配列」、もしくは「EB1 結合タンパク質の標的配列」といったものが考えられる。EB1c の C 末を調べたところ核局在シグナルのほかに高度に保存された CDK の認識配列となりうる SP 配列が存在することがわかった(図 34)。しかしながら SP 配列に変異を加えた EB1c を用いても *eb1c* 変異体の表現形を完全に回復できたことからこの SP 配列は EB1c の機能に必須ではないと考えられる(図 36)。今後、EB1c の C 末の機能に関しては結合タンパク質の単離といった更なる研究が必要であると思われる。

#### 4-5 アラビドプシス EB1s の結合タンパク

動物や酵母の EB1 は他の多くの +TIPs と結合することで機能的複合体を作ることから +TIPs のマスターレギュレーターとして働くことが示されている (Vaughan, 2005; Akhmanova and Hoogenraad, 2005)。しかし、植物のゲノム上にはこれら EB1 結合タンパク質の多くが欠損してしまっており、植物の EB1 の機能を明らかにしていくにあたり結合タンパク質の単離は非常に重要であるとされる。本研究においても様々な方法を用いて EB1 結合タンパク質の単離を試みた。酵母 2 ハイブリッド法を用いた実験では EB1b に結合する微小管に関連する因子として *ATK4*、*Patellin4,5*、*SOS2-like*、*RanBP1 homolog*、*Itosugi-like* などが単離された。*ATK4* は微小管のマイナス端に移動するキネシンの 1 種であり、発現解析より特に花粉での発現が強いことがわかった。またワタでのホモログはアクチンと微小管のどちらにも結合することが確かめられている (Preuss et al., 2004)。EB1b も花粉での発現が強く、また花粉管の伸長時にはアクチンが重要な働きを持つことから微小管のプラス端に局在する EB1b とマイナス端に移動し、かつアクチンとの関与も示唆される *ATK4* が結合することは非常に興味深い。*Patellin* ファミリーは細胞分裂時にフラグモプラストの間に形成される細胞板に局在することが知られている (Peterman et al., 2004)。フラグモプラストはその構成されるほとんどの微小管が内側を向くことで細胞板の材料を中央部に供給する。このため EB1b が *Patellin* と結合することで効率よく細胞板に運んでいることが示唆される。今後、EB1s の変異体内での *Patellin* の動き

を観察することが必要である。そのほか **SOS2-like** は表層微小管の制御に関わる **SPR1** の変異体のサブレッサーのホモログであり(Shoji et al., 2006)、**RanBP1** は動物ではキネトコアに局在し染色体の分離に関わっている(Tedeschi et al., 2007)。また、**Itosugi** はセルロース合成に関わると思われる変異体の原因遺伝子として単離された(Yagi et al., 未発表論文)。これら遺伝子と**EB1b**の関係を明らかにしていくことで植物特異的な微小管制御機構に新たな知見が得られると思われる。

**EB1a-GFP** および **EB1c-GFP** から **GFP** に対する免疫沈降法を用いてそれぞれの **EB1** に結合するタンパク質の単離を試みた。その結果、酵母 2 ハイブリッド法でも得られた **Patellin** ファミリーのほかに **PHS2**、**DYNAMIN-like**、**SKU5** といった微小管関連遺伝子が単離された。**PHS2** は微小管重合阻害剤であるプロピザミドに高感受性を示す変異体の原因遺伝子として特定され、**GFP** を用いた局在解析より表層微小管に局在することが示された(Kato et al., 未発表論文)。**EB1a** も同様に表層微小管に局在することからその関連性に期待が持てる。**DYNAMIN** は **GTP** 結合タンパク質の一種であり、微小管との結合とともにアクチンとの関連性も広く知られている(Praefcke and McMahon., 2004)。**DYNAMIN** の植物において微小管に対する機能はほとんど明らかになっていないが、近年細胞分裂に関与することが明らかになりつつある(Boutté et al., 2009)。**EB1s** との相互作用を調べることでより詳細な解析が進むと期待される。**SKU5** は根が左にねじれる変異体として単離された(Sedbrook et al., 2002)。このため、表層微小管を介したセルロース微繊維の制御に関わると考えられるがその機能はいまだよくわかっていない。**eb1a eb1b** 変異体もオリザリン添加培地において根が左にねじれる表現形を示すために **SKU5** ファミリーとの関連性を調べることで更なる機能解析が行えると思われる。

動物の **EB1** 結合タンパク質との相同性よりアラビドプシスの **EB1s** と **AUR** ファミリーの結合能を調べたところ **EB1c** は **AUR3** と強く結合することがわかった動物における **AUR3** のホモログである **Aurora B** は間期に核外に局在し、分裂期にはキネトコアに局在することで染色体の分離に関わることが知られている(Xu et al., 2009)。動物の染色体が正確に分離には **Aurora B** のキナーゼ活性が重要な役割を果たす。そのキナーゼ活性は **PP2A** が結合することによって抑制されるが、近年の研究によって **EB1** は **PP2A** と同じ場所に結合することが明らかとなった。そのため **EB1** は **PP2A** と拮抗することで結果的に **Aurora B** のキナーゼ活性を促進する。このため細胞分裂時に **EB1** が欠損すると **Aurora B** のキナーゼ活性が抑制され、移動速度の遅い染色体が発生することが明らかとなった(Sun et al., 2008)。植物細胞においても **AUR3** は染色体分離に重要な役割を果たしており、その発現が抑制されると染色体分離が正常に起こらないこと

が報告されている(Kurihara et al., 2006)。また、このとき全体の細胞周期に遅れは生じないことが知られている。これらの現象は *eb1c* 変異体の表現形によく似ている。また本研究によって *AUR3* を *RNAi* によって抑制した植物では細胞の分裂面が乱れ、根の伸長が阻害されることがわかった。アラビドプシス植物体内においても分裂期の細胞において *EB1c* と *PP2A* が拮抗的に働くことでうまく *AUR3* の活性が調節されているのかもしれない。今後、*eb1c* 変異体内での *Aurora B* のキナーゼ活性を定量化することなどより詳細な表現形解析を行う必要がある。

微小管は広く高度に生物間に保存されているにもかかわらず、植物は他の生物には見られないさまざまな微小管構造物を作り出す。これは植物が特有の微小管制御機構を持っていることを意味する。その一部を担っているのが微小管結合タンパク質群である。本研究では微小管プラス端に局在するタンパク質である *EB1* の機能解析を通じて植物に特異的な微小管制御機構に迫った。*EB1* はすべての真核生物に保存された+TIPs のマスターレギュレーターであるが、植物は他の生物と同じ形を持つ *EB1a* および *EB1b* を用いて表層微小管を制御し、独自に獲得した核に局在する *EB1c* によって紡錘体の形成維持を行っていることが明らかとなった。つまり植物は 2 種類の *EB1* をうまく使い分けているのである(図 37)。植物がなぜ独自の *EB1* を獲得するに至ったかはいまだ謎ではあるが、植物にのみ存在する微小管構造物である表層微小管の誕生や中心体の存在しない細胞分裂といった特有の現象に関係するのかもしれない。間期における微小管のプラス端の役割は動植物で大きく異なる。動物では”Search-and-capture”モデルに代表されるようにプラス端は微小管を一定の場所に伸長させる役目を果たす。一方、植物では細胞を取り囲むように表層微小管が存在するため、一定の場所という概念が存在しない。このため植物では動物で確認されているような *EB1* に結合する他の多くの+TIPs を失ってしまったのかもしれない(これら+TIPs の多くは微小管を一定の場所に導くために用いられる)。近年の研究より植物の表層微小管の形成には枝分かれとそれに伴う微小管同士の衝突角度が重要であることが分かってきた(Murata et al., 2005)。*EB1* を含む植物の+TIPs はこの衝突時の微小管の振る舞いに関与するのかもしれない(図 38)。分裂期において植物細胞には中心体が存在しない。このため中心体から伸びる紡錘体の位置決定に関わるアストラル微小管もほとんど観察されない。その結果、極が固定されておらず不安定な紡錘体を形成すると考えられている。しかしながら本研究より *EB1c-GFP* は膜方向に進むシグナルとして観察された。これは植物細胞にも明確ではないがアストラル様の微小管構造が存在することを示唆する。植物は *EB1c* のような新たな微小管安定化因

子を手に入れることで中心体のない不安定な紡錘体の形成維持を可能としているのかもしれない(図 38)。今後は植物に特異的な MAPs の機能解析や新たな +TIPs の探索を進めることで植物特有の微小管構造の構築や制御機構の全貌を明らかにしていく必要がある。

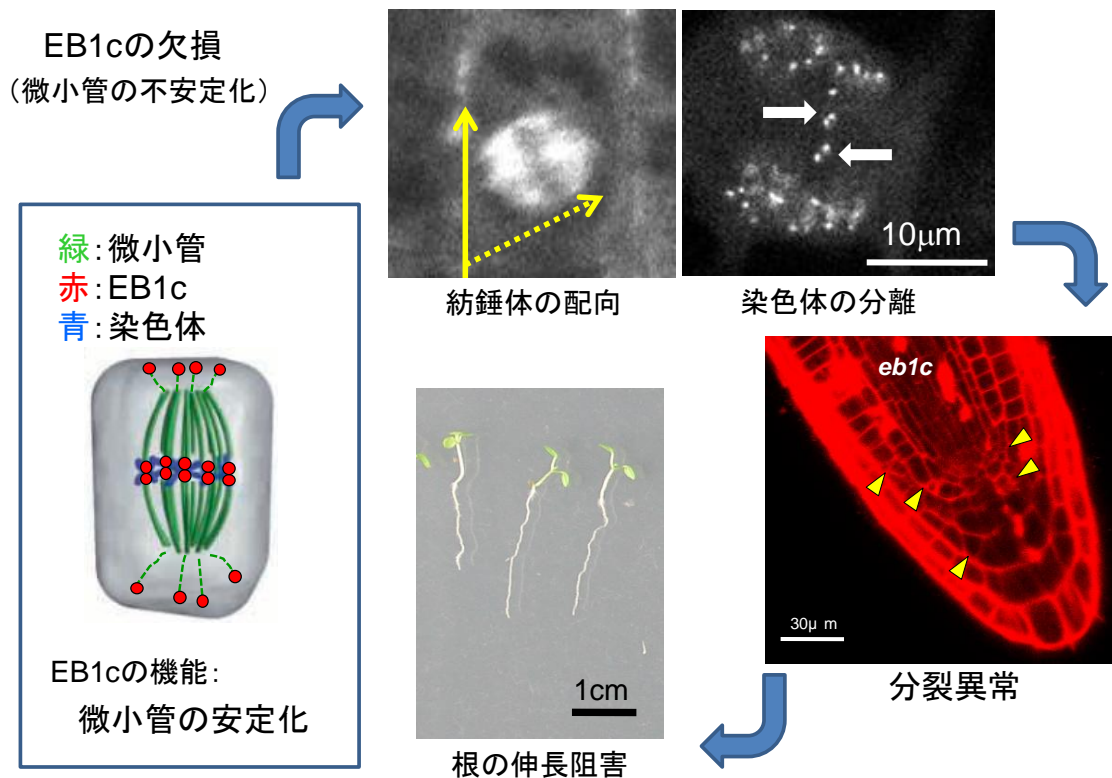


図 33 EB1c による紡錘体の 2 極性安定化モデル

EB1c は微小管の安定化を促進することで紡錘体の 2 極性を維持し、分裂面を正確に配置することに関与すると考えられる。

	Box1	Box2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	EERRNSVTESQ <b>KRK</b> L I V N L D V D V A A I T T L S P	<b>RQR</b> L S D A S D V K C S ----- G S S P L L T C
<i>Nicotiana tabacum</i>	EAEERLRVDTQ <b>KRK</b> N I V N I D V D I A A S N T L S P	<b>KQR</b> M S D A S D V H S S ----- G - S - L V T Y
<i>Oryza sativa</i>	SEERPAKQEAH <b>KRK</b> S I S D L E L E E F G M A S - S S	<b>RQR</b> L S D I S D V Q L C ----- G - S P L T S F T
<i>Medicago truncatula</i>	VSEEKSSSEN L <b>KRK</b> N F A N P E V D A A G I D N L S P	<b>RRR</b> L S D V S N V H H N ----- G - S P L M I
<i>Zea mays</i>	SEERPKQEAH <b>KRK</b> S I S D - - L D E F G M S S - S S	<b>RQR</b> L S D I S D V Q L C ----- G - S P L T S F S
<i>Hordeum vulgare</i>	ESLRQEAAAAH <b>KRK</b> S I S D - - L E E F E M G S - S S	<b>RMR</b> L S D V S D V Q L C ----- G - S P L M S F T
<i>Sorghum bicolor</i>	SEERPKQEMAN <b>KRK</b> S I S D - - L D E F G M S S - S S	<b>RQR</b> L S D I S D V Q L C ----- G - S P L T S F S
<i>Ricinus communis</i>	SSEKMNDSQ <b>KRK</b> N I V N F D V E A T G I T V L S P	<b>RQR</b> L S D A T D V H C S ----- G - S P L M T Y
<i>Populus trichocarpa1</i>	STEEKENS DPQ <b>KRK</b> N I V N L G V D A V G I S T L S P	<b>RQR</b> L S D A T D V R C S ----- G - S P L M T Y
<i>Populus trichocarpa2</i>	STDEKENS DPQ <b>KRK</b> N I V N L D V D A V G I S T L S P	<b>RQR</b> L S D A T D V H C S ----- G - S P L M T Y
<i>Vitis vinifera</i>	LPEEKPKPETQ <b>KRK</b> I I M N H E V D V A A I T T L S P	<b>RQR</b> I S D A S D V H C S ----- G - S P L M T Y
<i>Selaginella moellendorffii</i>	EAVSSIRRESL <b>KRK</b> S I G G L E V E - - - - N P S P	<b>RQR</b> R N S C G G S A A A A A A V G I A S E E I V L G S S P L S V Q

SP1 SP2

図 34 植物間で保存された EB1c の C 末配列の比較

緑は保存されている核移行シグナルを示す。青はその他の保存されたアミノ酸を示す。黄線は CDK の認識配列となりうる SP 配列を示す。

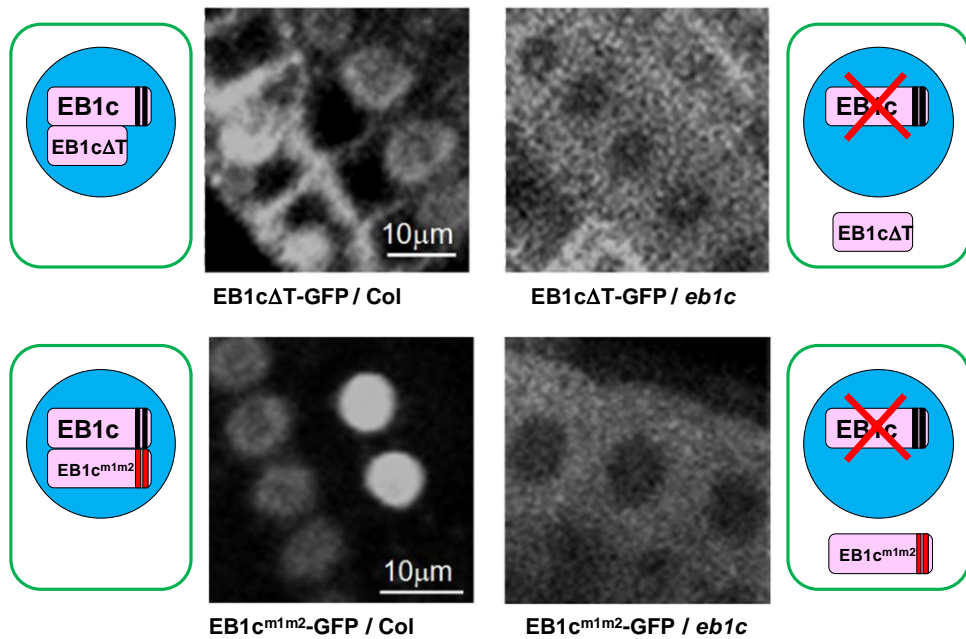


図 35 内在 EB1c の局在  
 緑は細胞を示す。青丸は核を示す。

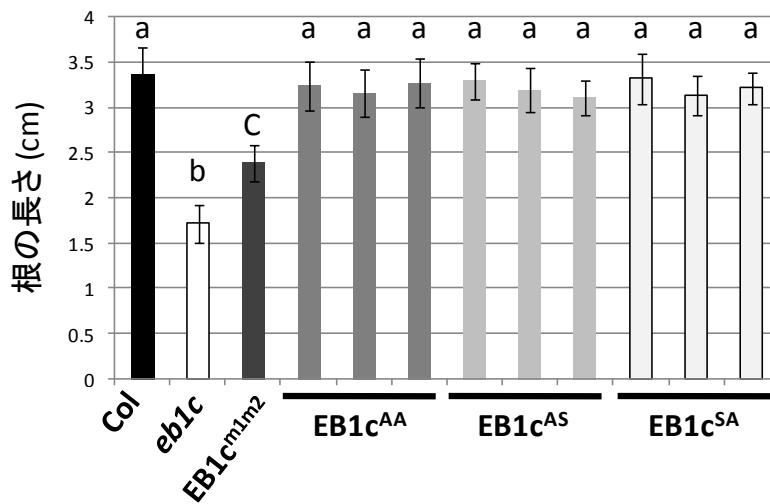


図 36 EB1c の C 末に保存された SP 配列の置換による影響  
 各コンストラクトを *eb1c* 変異体に導入し 100nM オリザリン添加培地で 7 日間生育させたのち根の長さを測定した。EB1c<sup>AA</sup> は SP1 および SP2 のセリン(S)をどちらもアラニン(A)に置換したもの。EB1c<sup>AS</sup> は SP1 のセリン(S)をアラニン(A)に置換したもの。EB1c<sup>SA</sup> は SP2 のセリン(S)をアラニン(A)に置換したもの。

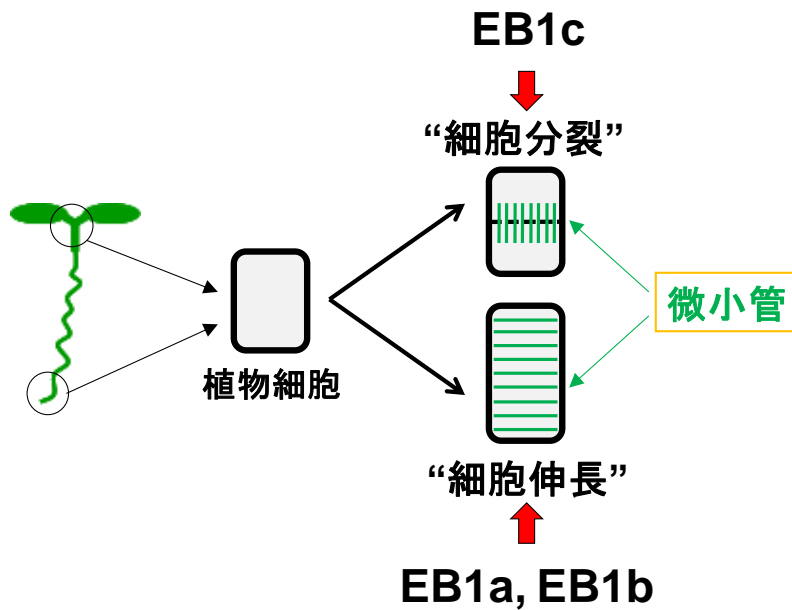


図 37 植物細胞における EB1 の機能分担

植物は発現領域や局在場所を変えることで細胞伸長に関わる EB1a,b と細胞分裂に関わる EB1c に機能分担させている。

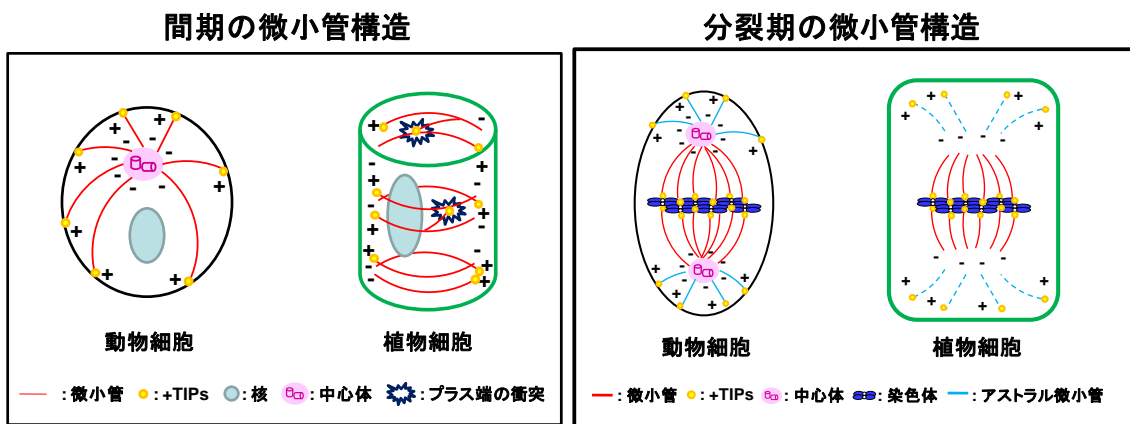


図 38 動植物の間期および分裂期細胞における微小管プラス端の局在性の違い  
 間期および分裂期を通じて植物細胞には明確な中心体が存在せず、動物とは大きく異なった微小管構造を形成する。



## 5 参考文献

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

Akhmanova and Hoogenraad. (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol.* 17:47-54.

Akhmanova A, Hoogenraad CC, Drabek K, Stepanova T, Dortland B, Verkerk T, Vermeulen W, Burgering BM, De Zeeuw CI, Grosveld F, Galjart N. (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell.* 104:923-35.

Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol.* 157:1187-96.

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.* 19:2763-75.

Bannigan A, Lizotte-Waniewski M, Riley M, Baskin TI. (2008). Emerging molecular mechanisms that power and regulate the anastral mitotic spindle of flowering plants. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2008 65:1-11.

Baskin TI. (2005). Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:203-22.

Bieling P, Kandels-Lewis S, Telley IA, van Dijk J, Janke C, Surrey T. (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J Cell Biol.* 29:1223-33.

Behrens R, Nurse P. (2002). Roles of fission yeast *tea1p* in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *J Cell Biol.* 157:783-93.

Bieling P, Kandels-Lewis S, Telley IA, van Dijk J, Janke C, Surrey T. (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J Cell Biol.* 183:1223-33.

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.* 20:396-410.

Browning H, Hackney DD, Nurse P. (2003). Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nat Cell Biol.* 5:812-8.

Brunner D, Nurse P. (2000). CLIP170-like *tip1p* spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell.* 102:695-704.

Boutté Y, Frescatada-Rosa M, Men S, Chow CM, Ebine K, Gustavsson A, Johansson L, Ueda T, Moore I, Jürgens G, Grebe M. (2010). Endocytosis restricts *Arabidopsis* KNOLLE syntaxin to the cell division plane during late cytokinesis. *EMBO J.* 2:546-58.

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.* 14:1515-21.

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.

Carmena M and Earnshaw WC. (2003). The cellular geography of aurora

kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:842-54.

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. (2005). Localization of the microtubule end binding protein EB1 reveals alternative pathways of spindle development in Arabidopsis suspension cells. *Plant Cell.* 17:1737-48.

Chan J, Jensen CG, Jensen LC, Bush M, Lloyd CW. (1999). The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc Natl Acad Sci* 96:14931-6.

Chrétien D, Fuller SD, Karsenti E.(1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol.* 129:1311-28.

Cimini D, Wan X, Hirel CB, Salmon ED. (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol.* 5:1711-8.

Cleary AC, Brown RC, and Lemmon BE. (1992). Microtubule arrays during mitosis in monoplastidic root tip cells of Isoetes. *Protoplasma.* 167:123-133.

DeLuca JG, Gall WE, Ciferri C, Cimini D, Musacchio A, Salmon ED. (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell.* 1:969-82.

Desai A, Mitchison TJ. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:83-117.

Dixit R, Chang E, Cyr R. (2006). Establishment of polarity during organization of the acentrosomal plant cortical microtubule array. *Mol*

Biol Cell. 17:1298-305.

Elliott SL, Cullen CF, Wrobel N, Kernan MJ, Ohkura H. (2005). EB1 is essential during *Drosophila* development and plays a crucial role in the integrity of chordotonal mechanosensory organs. *Mol Biol Cell*. 16:891-901

Etienne-Manneville S, Hall A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*. 425:713-6.

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.

Gard DL, Kirschner MW. (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J Cell Biol*. 105:2203-15.

Gardner MK, Haase J, Myhre K, Molk JN, Anderson M, Joglekar AP, O'Toole ET, Winey M, Salmon ED, Odde DJ, Bloom K. (2008). The microtubule-based motor Kar3 and plus end-binding protein Bim1 provide structural support for the anaphase spindle. *J Cell Biol*. 14:91-100.

Gigant B, Curmi PA, Martin-Barbey C, Charbaut E, Lachkar S, Lebeau L, Siavoshian S, Sobel A, Knossow M. (2000). The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell*. 101:809-16.

Green RA, Wollman R, Kaplan KB. (2005). APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol Biol Cell*. 16:4609-22.

Hayashi I, Wilde A, Mal TK, Ikura M. (2005). Structural basis for the activation of microtubule assembly by the EB1 and p150Glued complex. *Mol Cell*. 19:449-60.

Hoshino H, Yoneda A, Kumagai F, Hasezawa S. (2003). Roles of actin-depleted zone and preprophase band in determining the division site of higher-plant cells, a tobacco BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Protoplasma*. 222:157-65.

Hussey PJ, Hawkins TJ, Igarashi H, Kaloriti D, Smertenko A. (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol Biol*. 50:915-24.

Ito K, Masuda M, Fujiwara K, Sato H. (1994). Do astral microtubules play a role in metaphase chromosome positioning? *Biol Cell*. 82:95-102.

Jiang W, Lechner J, Carbon J. (1993). Isolation and characterization of a gene (CBF2) specifying a protein component of the budding yeast kinetochore. *J Cell Biol*. 121:513-9.

Kawamura E, Himmelspach R, Rashbrooke MC, Whittington AT, Gale KR, Collings DA, Wasteneys GO. (2006). MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the *Arabidopsis* root. *Plant Physiol*. 140:102-14.

Kinoshita K, Habermann B, Hyman AA. (2002). XMAP215: a key component of the dynamic microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 12:267-73.

Kirik V, Herrmann U, Parupalli C, Sedbrook JC, Ehrhardt DW, Hülkamp 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*. 120:4416-25.

Kirschner M, Mitchison T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*. 45:329-42.

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.* 1:2241-7.

Korinek WS, Copeland MJ, Chaudhuri A, Chant J. (2000). Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science.* 287:2257-9.

Korolev AV, Chan J, Naldrett MJ, Doonan JH, Lloyd CW. (2005). Identification of a novel family of 70 kDa microtubule-associated proteins in Arabidopsis cells. *Plant J.* 42:547-55.

Kurihara D, Matsunaga S, Kawabe A, Fujimoto S, Noda M, Uchiyama S, Fukui K. (2006). Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* 48:572-80.

Lansbergen G, Komarova Y, Modesti M, Wyman C, Hoogenraad CC, Goodson HV, Lemaitre RP, Drechsel DN, van Munster E, Gadella TW Jr, Grosveld F, Galjart N, Borisy GG, Akhmanova A. (2004). Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization. *J Cell Biol.* 166:1003-14.

Lee L, Tirnauer JS, Li J, Schuyler SC, Liu JY, Pellman D. (2000). Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science.* 287:2260-2.

Ligon, L.A., S.S. Shelly, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. (2003). The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization. *Mol. Biol. Cell.* 14:1405–1417.

Maiato H, DeLuca J, Salmon ED, Earnshaw WC. (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci.* 117:5461-77.

Mandelkow EM, Mandelkow E, Milligan RA.(1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol.* 114:977-91.

Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Srinivas BP, Hülkamp M. (2003). A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization. *Curr Biol.* 13:1991-7.

Morrison EE, Wardleworth BN, Askham JM, Markham AF, Meredith DM. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene.* 17:3471-7.

Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S. (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol.* 10:865-8.

Müller S, Han S, Smith LG. (2006). Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol.* 9:888-94.

Müller S, Smertenko A, Wagner V, Heinrich M, Hussey PJ, Hauser MT. (2004). The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr Biol.* 14:412-7.

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 gamma-tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol.* 7:961-8.

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.* 16:1178-90.

Praefcke, G.J. and McMahon, H.T. (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 133–147.

Perez F, Diamantopoulos GS, Stalder R, Kreis TE. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*. 96:517-27.

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*. 29:147-57.

Perrin RM, Wang Y, Yuen CY, Will J, Masson PH. (2007). WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 49:961-71.

Peterman TK, Ohol YM, McReynolds LJ, Luna EJ. (2004). Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant Physiol*. 136:3080-94

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*. 136:3945-55.

Ravelli RB, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, Knossow M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*. 428:198-202.

Rogers SL, Rogers GC, Sharp DJ, Vale RD. (2002). *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J Cell Biol*. 158:873-84.

Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Sonobe S, Igarashi H, Itoh TJ, Hidaka M, Machida Y. (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev*. 20:1004-14.

Sawin KE, Snaith HA. (2004). Role of microtubules and tea1p in establishment and maintenance of fission yeast cell polarity. *J Cell Sci*.



15:689-700.

Sedbrook JC, Carroll KL, Hung KF, Masson PH, Somerville CR. (2002). The Arabidopsis SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *Plant Cell*. 14:1635-48.

Sedbrook JC, Ehrhardt DW, Fisher SE, Scheible WR, Somerville CR. (2004). The Arabidopsis sku6/spiral1 gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *Plant Cell*. 16:1506-20.

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*. 136:3933-44.

Shoji T, Suzuki K, Abe T, Kaneko Y, Shi H, Zhu JK, Rus A, Hasegawa PM, Hashimoto T. (2006). Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 47:1158-68.

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*. 16:2035-47.

Smith LG. (2001). Plant cell division: building walls in the right places. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:33-9.

Slep KC, Rogers SL, Elliott SL, Ohkura H, Kolodziej PA, Vale RD. (2005). Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *J Cell Biol*. 14:587-98.

Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW. (1995). APC binds to the novel protein EB1.

Cancer Res. 55:2972-7.

Sun L, Gao J, Dong X, Liu M, Li D, Shi X, Dong JT, Lu X, Liu C, Zhou J. (2008). EB1 promotes Aurora-B kinase activity through blocking its inactivation by protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci* 105:7153-8.

Tedeschi A, Ciciarello M, Mangiacasale R, Roscioli E, Rensen WM, Lavia P. (2007). RANBP1 localizes a subset of mitotic regulatory factors on spindle microtubules and regulates chromosome segregation in human cells. *J Cell Sci.* 1:3748-61.

Thitamadee S, Tsuchihara K, Hashimoto T. (2002). Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature.* 417:193-6.

Tirnauer JS, Bierer BE. (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol.* 149:761-766

Tirnauer JS, Grego S, Salmon ED, Mitchison TJ. (2002). EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol Biol Cell.* 13:3614-26.

Tirnauer JS, O'Toole E, Berrueta L, Bierer BE, Pellman D. (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J Cell Biol.* 145:993-1007.

Toda H, Mochizuki H, Flores R 3rd, Josowitz R, Krasieva TB, Lamorte VJ, Suzuki E, Gindhart JG, Furukubo-Tokunaga K, Tomoda T. (2008). UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. *Genes Dev.* 1:3292-307.

Van Damme D, Bouget FY, Van Poucke K, Inzé D, Geelen D. (2004). Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J.* 40:386-98.

Van Damme D, Coutuer S, De Rycke R, Bouget FY, Inzé D, Geelen D. (2006). Somatic cytokinesis and pollen maturation in Arabidopsis depend on TPLATE, which has domains similar to coat proteins. *Plant Cell*. 18:3502-18.

Vaughan KT. (2005). TIP maker and TIP marker; EB1 as a master controller of microtubule plus ends. *J Cell Biol*. 171:197-200.

Vos JW, Dogterom M, Emons AM. (2004). Microtubules become more dynamic but not shorter during preprophase band formation: a possible "search-and-capture" mechanism for microtubule translocation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 57:246-58.

Walker KL, Müller S, Moss D, Ehrhardt DW, Smith LG. (2007). Arabidopsis TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Curr Biol*. 6:1827-36.

Wasteney GO. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J Cell Sci*. 115:1345-54.

Whittington AT, Vugrek O, Wei KJ, Hasenbein NG, Sugimoto K, Rashbrooke MC, Wasteney GO. (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature*. 411:610-3.

Wood KW, Sakowicz R, Goldstein LS, Cleveland DW. (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell*. 91:357-66.

Xu Z, Ogawa H, Vagnarelli P, Bergmann JH, Hudson DF, Ruchaud S, Fukagawa T, Earnshaw WC, Samejima K. (2009). INCENP-aurora B interactions modulate kinase activity and chromosome passenger complex localization. *J Cell Biol*. 187:637-53.

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

121:2372-81.

Yuen CY, 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.

## 6 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の立案段階から論文の執筆にいたるまで、多大な御助言と御指導を賜りました奈良先端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の橋本隆教授に心より感謝をいたします。

本研究を遂行するにあたり Ghent 大学の **Silvie Coutuer** 博士、**Eugenia Russinova** 博士、**Dirk Inze** 教授、UC Davis 大学の **Bo Liu** 准教授に適切な御助言を頂きました。深く感謝いたします。

実験を行うにあたり有用な御助言を多数頂いた中島敬二准教授、加藤壮英助教、庄司翼助教に深く御礼申し上げます。

研究室配属当初より丁寧かつ適切な御指導を賜りました阿部竜也博士、稲井康二博士、矢尾真樹博士、石田喬志博士、**Jaromir Pytela** 博士、中村匡良博士、宮島俊介博士に心より御礼申し上げます。

研究室での生活の日々を支えて頂いた山下聡美氏に深く感謝いたします。

これまで共に研究を行った全ての植物遺伝子機能学研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、いつも私を温かく見守り支えて頂いた小牧信夫・裕子夫妻に心より感謝いたします。

平成 22 年 1 月