

植物の柔軟な発生を支える細胞骨格ダイナミクス

濱田 隆宏

東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系
〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

Takahiro Hamada

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences,
The University of Tokyo

3-8-1 Komaba, Meguro-Ku, Tokyo 153-8902

DOI: 10.24480/bsj-review.9c1.00140

植物生理学では「植物がどのように成長しながら刻々と変化する環境変化に応答し、その「かたち」を変え、次世代へと命を繋いでいるのか」その営みを解き明かすことを目的としている。現在、植物生理学は深化が進み、詳細な分子メカニズムが明らかになっているが、その一方、研究分野の細分化も進んでおり、実際に研究を行なっている若手研究者にとって全体像の把握が難しくなっている。そのため植物の営みの全体像を理解するためには、植物生理学の各分野の研究者が交流を深め、相互理解に基づく横断的な研究展開をおこなう必要がある。

そこで私達、細胞骨格分野の研究者は各分野の研究者との交流や相互理解を深めるため、様々なシンポジウム等を企画してきた。2017年の日本植物学会第81回大会では、発生分野と細胞骨格分野の融合と発展を目指し、6名の演者によるシンポジウム「植物の柔軟な発生を支える細胞骨格ダイナミクス」を開催した。細胞骨格は細胞分裂や伸長方向の制御に直接的に関わる構造物であり、その構築・制御ダイナミクスは柔軟な形態形成を行う植物の発生に必須である。シンポジウムでは個体レベルでの柔軟な形態形成（塚谷・嶋村）、最先端イメージングで明らかにされた詳細な細胞骨格動態（村田・木全）、環境変化に応答した細胞骨格動態とその分子メカニズム（中村・濱田）についての講演が行われ、発生分野と細胞骨格分野の交流が図られた。

今回のBSJ-Reviewでは、細胞骨格を専門としない植物生理学の他分野の若手研究者・学生に細胞骨格分野との繋がりを感じてもらうため、シンポジウム演者を中心に7本の総説を執筆して頂いた。その中でも植物細胞の「かたち」を決めるためにセルロース合成酵素のレールとして働く表層微小管については、それぞれの研究者の異なる視点からの総説が集まっている。具体的な内容として「表層微小管の自己組織化」に関する総説（村田 BSJ-Review

2018 9C2: 111-119) , 「青色光に応答した表層微小管ダイナミクス」に関する総説 (中村&八木 BSJ-Review 2018 9C3: 120-129) , 「表層微小管の制御に関わる NIMA 関連キナーゼ」に関する総説 (本瀬, 高谷&高橋 BSJ-Review 2018 9C4: 130-147) , 「二次壁形成における表層微小管ダイナミクス」に関する総説 (佐々木&小田 BSJ-Review 2018 9C5: 148-154) , 「表層微小管とオルガネラ相互作用について」に関する総説 (濱田 BSJ-Review 2018 9C6: 155-168) が寄稿された。また染色体の分配に働く植物の紡錘体 (スピンドル) の「スピンドルチェックポイント」に関する総説 (小牧&橋本 BSJ-Review 2018 9C7: 169-177) と, 被子植物では失われた「陸上植物における中心体と鞭毛」についての総説も寄稿された (嶋村 BSJ-Review 2018 9C8: 178-196)。

動物分野と比較すると, 植物生理学では細胞レベルの研究はあまり進んでいないが, 本総説集をきっかけに, 細胞骨格に関わる細胞レベルの時空間制御の重要性と各分野との繋がりを再認識して頂ければ幸いである。

表層微小管「列」：自己組織化する繊維

村田隆

基礎生物学研究所 生物進化研究部門

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 3 8

Takashi Murata

Cortical arrays of microtubules: self-organizing filaments

Key words: microtubules, self-organization

Division of Evolutionary Biology, National Institute for Basic Biology, Myodaiji,
Okazaki, 444-8585 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9c2.00141

1 はじめに

生物の構造がどのようにして形作られるかは、生物学の大きな問いの一つである。微小管の重合と自己組織化は、生物由来のタンパク質が無細胞系で構造を作ることから、しばしば注目される。溶液中の微小管が相互作用し空間の制約に依存して構造を作る現象が示されている (Nedelec et al. 1997)。このような自己組織化は実際の細胞でも起こるのだろうか？ 植物細胞の微小管は細胞膜に沿って並び表層微小管列を形作る。本稿は表層微小管の配列機構を微小管相互作用による自己組織化の観点から概説し、細胞内での微小管の組織化過程を評価するために著者らが行っている 3D タイムラプス観察の試みについて紹介する。

2 表層微小管列とは

間期の植物細胞では、細胞膜に沿って微小管が局在する (Ledbetter & Porter 1963)。電子顕微鏡観察により、細胞膜と微小管の間を繋ぐ架橋が示されているため (Hardham & Gunning 1978)、微小管は膜近傍に係留されていると考えられている。この微小管 (表層微小管) は互いに平行に並ぶ。細胞膜に沿って並んだ微小管の集団を表層微小管列 (cortical array) と呼ぶ (図 1)。細胞膜上のセルロース合成酵素は表層微小管に沿って動くため (Paredes et al. 2006)、表層微小管列の並び方向は細胞壁

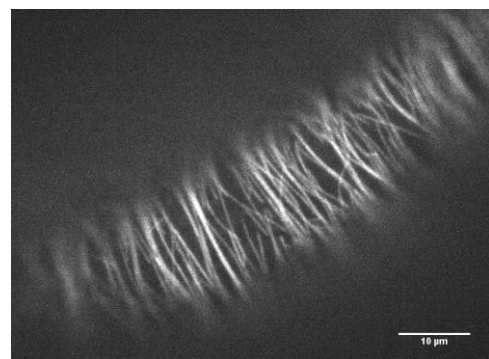


図 1 タバコ培養細胞の表層微小管列。微小管は YFP チューブリン (Yasuhara & Oe 2011) で標識した。スケールバーは 10 μm。

セルロース微繊維の並び方向を介して植物の形に大きく影響する。

植物器官における表層微小管列の並び方向は器官の形や伸長方向と相関がある。一般に、伸長中の茎では茎の伸長方向と直角に並んだ表層微小管列が見られる (Shibaoka 1994)。伸長方向と直角に向いた微小管は、細胞壁中に伸長方向に直角なセルロース微繊維を沈着させ、伸長方向に伸展しやすい細胞壁を作る。これにより、茎は細長く伸長できると考えられる。

3 微小管のダイナミクス：微小管は末端のチューブリン付加や解離により伸長、短縮する

微小管はどのようにして配列して表層微小管列を作るのだろうか。その理解のためには、細胞膜上の微小管ダイナミクスを理解する必要がある。微小管は細胞膜に沿って伸長、短縮を繰り返す (Shaw et al. 2003)。微小管にはプラス端とマイナス端があり、伸長と短縮を繰り返すのは主にプラス端である。マイナス端は安定化されているか、徐々に短縮する。微小管の伸長や短縮は、チューブリン ($\alpha\beta$ チューブリンヘテロダイマー) が微小管末端に結合や解離をすることによって起こる。その制御機構の詳細は本総説集の八木と中村により解説されているので参照してほしい (中村 & 八木 2018 BSJ-Review 9C3: 120-129)。

微小管のダイナミクスで特筆すべき点は、伸長期と短縮期が確率的に切り替わることである。1本の微小管の伸縮に着目すると、伸長を続けた微小管が突然短縮を開始する現象が見られる。伸長期から短縮期に切り替わる現象をカタストロフ (catastrophe) と呼ぶ。カタストロフは精製チューブリンを重合させた微小管でも起こる現象で、チューブリンに結合した GTP が微小管内部で加水分解されることによって起こるが (Horio & Murata 2014)、細胞内におけるカタストロフは様々な制御を受ける。

4 微小管の衝突による束化と脱重合：配列した繊維が生き残る仕組み

多数の微小管が細胞膜に沿って伸長や短縮を繰り返す状況を考えてみよう。微小管が膜に係留されて存在する場合、細胞膜と微小管の距離はほぼ一定と考えられる。このため、細胞膜に沿って微小管が伸長すると、ある一定の確率で微小管の衝突が起きる。微

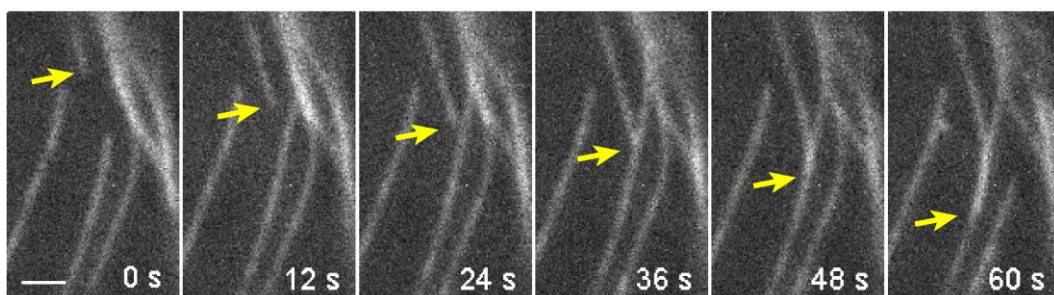


図2 微小管の衝突による束化。スケールバーは $2\ \mu\text{m}$ 。

小管が衝突したとき、何が起こるのだろうか？

微小管が衝突したときの挙動は、微小管と微小管の衝突角度に依存することが示されている (Dixit & Cyr 2004)。微小管が互いに平行に近い角度で衝突した場合、伸長中の微小管はその伸長方向を変えてもう 1 本の微小管に沿う。結果として、微小管の束化が起こる (図 2)。一方、微小管と微小管が直角に近い角度で衝突した場合、微小管を乗り越えるものもあるが、微小管のカタストロフが誘導されて短縮に転じる (図 3)。束化とカタストロフの臨界角は約 40° である。

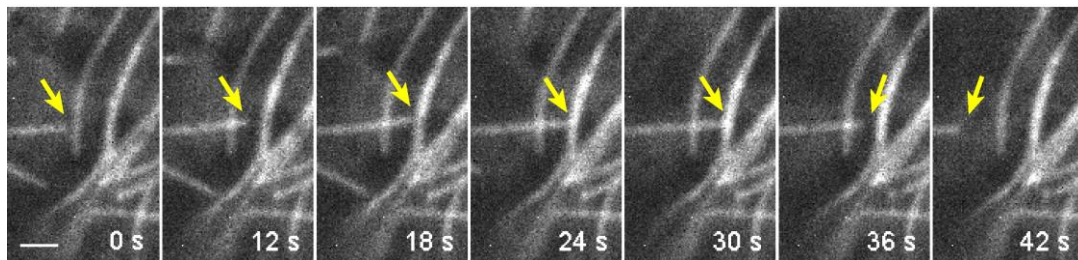


図 3 微小管の衝突によるカタストロフ。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ 。

直角に衝突した微小管は短縮し、平行に近い角度で衝突した微小管は束化により向きが揃うことから、表層微小管が伸長と短縮を繰り返すと、時間経過に伴って互いの向きが揃うことが予想される (図 4)。この予想が正しいことがコンピュータシミュレーションによって示されている (Dixit & Cyr 2004)。表層微小管列の形成は微小管の相互作用で説明できることが明らかになった。

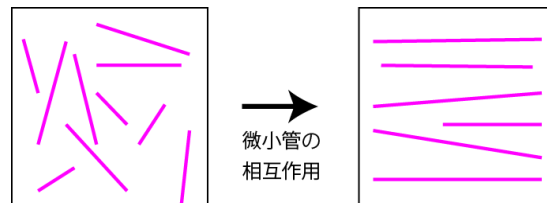


図 4 表層微小管が相互作用によって並ぶ過程。

5 微小管並び方向が変化する機構

上記の微小管相互作用によるメカニズムでは、ひとたび配列した表層微小管列の向きは安定で、配列方向の変化は起こらないと考えられる。しかしながら、実際の細胞では表層微小管列は内的要因 (Chan et al. 2007)、外的要因 (Murata & Wada 1989; Nick et al. 1990) によりその向きを変える。表層微小管列が配列変化を起こすためには、既存の微小管と異なった向きの微小管が、束化やカタストロフにより向きが揃う頻度より多く供給される必要がある。この微小管供給はどのようにして起こるのだろうか？

細胞表層の微小管はある一定の頻度で消滅し、それを補う量だけ供給される。表層微小管の供給は、微小管重合核 (γ チューブリン複合体) が細胞表層に結合し、新しい微小管を形成することによる。重合核の大部分は既存の表層微小管に結合し、既存の微小管に対して斜め 40° か平行 (0°) に伸長する微小管を生成する (Murata et al. 2005;

Nakamura et al. 2010)。斜め 40°の微小管形成が減るシロイヌナズナの突然変異体 (*ton2*) では、光照射によって誘導される微小管列の配向変化が阻害されることが示されている。斜め微小管の供給により、微小管の配列変化は促進されると考えられる (Kirik et al. 2012)。

微小管重合核による微小管形成以外の方法で、多数派の微小管と異なる向きの微小管が供給されることが示されている。微小管が直角に衝突するとき、カタストロフが起きることは既に述べた。しかしながら、微小管を乗り越える微小管も存在する。Lindeboomらは、微小管を乗り越えた微小管が微小管切断タンパク質カタニンにより切断され、切れた微小管がさらに伸長を続けることにより、微小管の数が増えることを示した (Lindeboom et al. 2013b)。青色光照射による微小管配列変化が起こるとき、この機構が活性化されて微小管配列変化が起こる。微小管切断タンパク質がどのような分子機構で活性化されるかは今後の課題である。この現象の詳細は八木と中村により議論されているので参照してほしい (中村 & 八木 2018 BSJ-Review 9C3: 120-129.)。

6 伸長軸に沿った微小管の並びは細胞隅の脱重合効果により説明できる

表層微小管列は植物器官の伸長方向に直角に配列することは既に述べた。微小管はどのようにして器官の伸長軸に直角に並ぶのだろうか？ このメカニズムが明らかになれば、植物の器官がどのようにして細長く伸長するかを理解することができ、植物器官の形作りの根本的な理解につながると考えられる。

細長い円筒形の細胞を仮定したシミュレーションでは、微小管が円筒の上下隅に衝突したときにカタストロフが起こることを仮定すると、実際の細胞と同様に微小管列が細胞の長軸方向に直角に向く (Allard et al. 2010; Eren et al. 2010) (図 5)。微小管が細胞の隅に衝突する時にカタストロフが誘導される現象は実際の細胞でも観察されている。シロイヌナズナの葉や根の表皮細胞にお

いては、細胞分裂によって生じた新しい細胞壁と既存の細胞壁が直角に近い角度で接する場合、微小管が接続部に衝突するとカタストロフを生じる (Ambrose et al. 2011)。著者らは、六面体の細胞を仮定したシミュレーションを行い、特定の細胞隅のみが微小管を通過させる条件では微小管が通過できる隅を通過して微小管が並ぶことを示した。これらの結果から、著者らは、細胞分裂によって生じた新しい細胞壁が

カタストロフを誘導することにより微小管は新しい細胞壁に平行に並ぶ仮説を提唱し

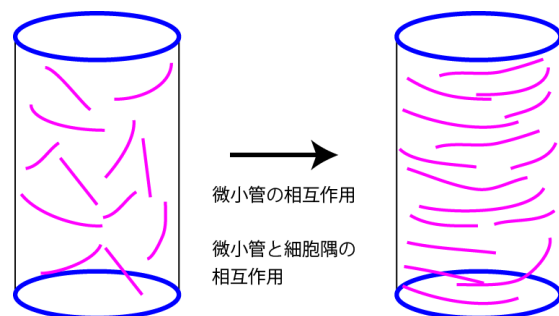


図 5 細胞の隅部が微小管列の向きにおよぼす影響。カタストロフを誘導する隅部を青で示す。

ている。

さらに Ambrose らは、細胞隅に微小管結合タンパク質 CLASP が局在することを示し、*clasp* 突然変異体の解析から CLASP が細胞隅部の微小管通過を制御することを提唱している (Ambrose et al. 2011)。しかしながら、*clasp* 変異体は微小管と細胞膜の係留の阻害など、微小管レベルで様々な表現型を示すため (Ambrose & Wasteney 2008)、微小管配列における役割は更なる検討が必要と思われる。

7 3次元的な細胞の微小管並びを理解することが試みられている

これまでに紹介したシミュレーションの結果は、2次元の平面、円筒状の細胞、六面体の細胞を仮定したものなど、単純な細胞の形を仮定したものだった。しかし、実際の細胞はより複雑な形状をしている。また、細胞の異なる面が異なる性質を持つことも考えられる。実際、シロイヌナズナの胚軸の表皮細胞では、外側の細胞壁に接する面と内側の細胞壁に接する面で微小管の向きが異なる (Crowell et al. 2011)。そのため、植物組織中で複雑な形状を持つ細胞を理解するためのシミュレーションが必要と考えられる。

ごく最近になって、複雑な形状を持つ細胞のシミュレーションが報告された。さまざまな長さや曲率を持った細胞を仮定したシミュレーションによって、細胞の形状自体が微小管配列の方向に影響することが示されている (Mirabet et al. 2018)。また、共焦点顕微鏡で実測した細胞形状をもとにしたシミュレーションも行われている (Chakraborty et al. 2018)。この場合、細胞縁のカタストロフ誘導に加え、異なる面の安定性の違いを仮定に加えている。より複雑な形状をした葉の表皮の pavement cell の微小管配列の再現も行われている (Chakraborty et al. 2018)。

8 3Dタイムラプスによる微小管配列過程の実測の試み

微小管の配列機構のシミュレーションは着実に進歩を遂げている。しかしながら、細胞内の微小管挙動は複雑であり、シミュレーションが実際の細胞の状況をどの程度反映しているのか対応づけて評価することは難しい。たとえば、通常シミュレーションでは微小管の初期状態はランダムに設定するが、細胞分裂後や微小管脱重合後のリカバリーで表層微小管列が形成されるときには、初期の微小管はランダムではないとの報告もある (Lindeboom et al. 2013a)。

陸上植物の個体の場合、顕微鏡を用いたライブイメージングで微小管1本1本の伸長が見えるのは表皮細胞の表面側の細胞膜に接した領域に限られる。3D (xyz) 観察で微小管動態を捉えることが必要なことが指摘されているが (Ambrose & Wasteney 2012)、通常の共焦点顕微鏡では微小管1本1本を識別できる空間解像度で3D観察を行い、同時に微小管の伸長と短縮を追跡できる時間解像度を得ることが困難である。

スピニングディスク共焦点顕微鏡は、通常のスキャン式共焦点顕微鏡に比べて高速に画像取得できるのが特徴だが、厚みのある試料では焦点外の蛍光の漏れ込みが生じる。

この弱点を克服する2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡が開発されている (Shimozawa et al. 2013)。著者らは広視野かつ高速の画像取得を得られるようにこの顕微鏡を改良した (Otomo et al. 2015)。現在、この顕微鏡を用いて細胞分裂後の表層微小管列形成過程を追跡中である (図6)。他にも、高速かつ高解像度で顕微鏡画像取得する顕微鏡の開発は盛んに行われている (Chen et al. 2014)。新しい顕微鏡技術の開発により、微小管動態の実測が可能になることが期待される。

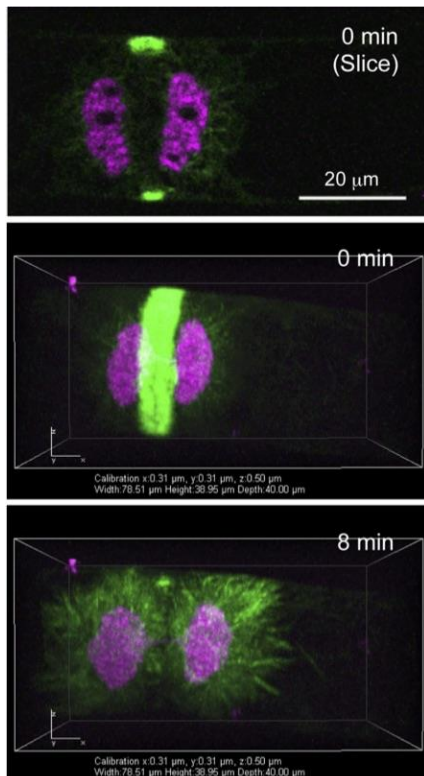


図6 2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡による細胞分裂終了時の3Dタイムラプス観察 (村田, 大友, 長谷部, 根本 未発表データ)。緑: 微小管, マゼンタ: 細胞核。上: 分裂終了直前の細胞。円筒状の細胞の中央部にフォーカスした光学切片像。中: 同じ細胞の3D再構成像 (側面から見た立体像)。細胞の上から下までの光学切片像81枚を再構成した。下: 同じ細胞の8分後の3D再構成像。

謝辞

図1～3に使用したYFPチューブリン標識のプラスミドは関西大学の安原裕樹博士より分譲いただきました。本総説中で紹介した2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡の画像は、物質・デバイス共同研究拠点 (CORE ラボ共同研究) と先端バイオイメージング支援プラットフォームの支援により撮影しました。また、紹介したタバコ培養細胞の培養は基生研・モデル植物研究支援室の支援により行われました。基生研・光学解析室の皆様、基生研・生物進化研究部門の皆様、北海道大学ニコイイメージングセンターの皆様には研究の遂行にあたり多大なる支援を受けました。これらの支援に感謝いたします。

引用文献

Allard, J. F., Wasteneys, G. O. & Cytrynbaum, E. N. 2010. Mechanisms of self-organization of

- cortical microtubules in plants revealed by computational simulations. *Mol Biol Cell* 21: 278-286.
- Ambrose, C., Allard, J. F., Cytrynbaum, E. N. & Wasteneys, G. O. 2011. A CLASP-modulated cell edge barrier mechanism drives cell-wide cortical microtubule organization in Arabidopsis. *Nature communications* 2: 430.
- Ambrose, C. & Wasteneys, G. O. 2012. Nanoscale and geometric influences on the microtubule cytoskeleton in plants: thinking inside and outside the box. *Protoplasma* 249: S69-S76.
- Ambrose, J. C. & Wasteneys, G. O. 2008. CLASP modulates microtubule-cortex interaction during self-organization of acentrosomal microtubules. *Mol Biol Cell* 19: 4730-4737.
- Chakraborty, B., Blilou, I., Scheres, B. & Mulder, B. M. 2018. A computational framework for cortical microtubule dynamics in realistically shaped plant cells. *PLoS computational biology* 14: e1005959.
- Chan, J., Calder, G., Fox, S. & Lloyd, C. 2007. Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in Arabidopsis hypocotyl epidermal cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 171-175.
- Chen, B. C., Legant, W. R., Wang, K., Shao, L., Milkie, D. E., Davidson, M. W., Janetopoulos, C., Wu, X. S., Hammer, J. A., 3rd, Liu, Z., English, B. P., Mimori-Kiyosue, Y., Romero, D. P., Ritter, A. T., Lippincott-Schwartz, J., Fritz-Laylin, L., Mullins, R. D., Mitchell, D. M., Bembenek, J. N., Reymann, A. C., Bohme, R., Grill, S. W., Wang, J. T., Seydoux, G., Tulu, U. S., Kiehart, D. P. & Betzig, E. 2014. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science* 346: 1257998.
- Crowell, E. F., Timpano, H., Desprez, T., Franssen-Verheijen, T., Emons, A. M., Hofte, H. & Vernhettes, S. 2011. Differential Regulation of Cellulose Orientation at the Inner and Outer Face of Epidermal Cells in the Arabidopsis Hypocotyl. *Plant Cell* 23: 2592-2605.
- Dixit, R. & Cyr, R. 2004. Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell* 16: 3274-3284.
- Eren, E. C., Dixit, R. & Gautam, N. 2010. A three-dimensional computer simulation model reveals the mechanisms for self-organization of plant cortical microtubules into oblique arrays. *Mol Biol Cell* 21: 2674-2684.
- Hardham, A. R. & Gunning, B. E. S. 1978. Structure of cortical microtubule arrays in plant-cells. *J. Cell Biol.* 77: 14-34.
- Horio, T. & Murata, T. 2014. The role of dynamic instability in microtubule organization. *Frontiers in plant science* 5: 511.
- Kirik, A., Ehrhardt, D. W. & Kirik, V. 2012. TONNEAU2/FASS regulates the geometry of microtubule nucleation and cortical array organization in interphase Arabidopsis cells. *Plant Cell* 24: 1158-1170.

- Ledbetter, M. C. & Porter, K. R. 1963. A "microtubule" in plant cell fine structure. *J. Cell Biol.* 19: 239-250.
- Lindeboom, J. J., Lioutas, A., Deinum, E. E., Tindemans, S. H., Ehrhardt, D. W., Emons, A. M., Vos, J. W. & Mulder, B. M. 2013a. Cortical microtubule arrays are initiated from a nonrandom prepattern driven by atypical microtubule initiation. *Plant Physiol* 161: 1189-1201.
- Lindeboom, J. J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Ketelaar, T., Emons, A. M., Mulder, B. M., Kirik, V. & Ehrhardt, D. W. 2013b. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* 342: 1245533.
- Mirabet, V., Krupinski, P., Hamant, O., Meyerowitz, E. M., Jonsson, H. & Boudaoud, A. 2018. The self-organization of plant microtubules inside the cell volume yields their cortical localization, stable alignment, and sensitivity to external cues. *PLoS computational biology* 14: e1006011.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T. I., 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: 961-952.
- Murata, T. & Wada, M. 1989. Organization of cortical microtubules and microfibril deposition in response to blue-light-induced apical swelling in a tip-growing *Adiantum* protonema cell. *Planta* 178: 334-341.
- Nakamura, M., Ehrhardt, D. W. & Hashimoto, T. 2010. Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array. *Nat. Cell Biol.* 12: 1064-1070.
- 中村匡良 & 八木慎宜 2018. 青色光に応答した微小管ダイナミクス. *BSJ Review* 9C3: 120-129.
- Nedelec, F. J., Surrey, T., Maggs, A. C. & Leibler, S. 1997. Self-organization of microtubules and motors. *Nature* 389: 305-308.
- Nick, P., Bergfeld, R., Schafer, E. & Schopfer, P. 1990. Unilateral Reorientation of Microtubules at the Outer Epidermal Wall during Phototropic and Gravitropic Curvature of Maize Coleoptiles and Sunflower Hypocotyls. *Planta* 181: 162-168.
- Otomo, K., Hibi, T., Murata, T., Watanabe, H., Kawakami, R., Nakayama, H., Hasebe, M. & Nemoto, T. 2015. Multi-point scanning two-photon excitation microscopy by utilizing a high-peak-power 1042-nm laser. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 31: 307-313.
- Paredez, A. R., Somerville, C. R. & Ehrhardt, D. W. 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312: 1491-1495.
- Shaw, S. L., Kamyar, R. & Ehrhardt, D. W. 2003. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 300: 1715-1718.

- Shibaoka, H. 1994. Plant Hormone-Induced Changes in the Orientation of Cortical Microtubules - Alterations in the Cross-Linking between Microtubules and the Plasma-Membrane. *Annu. Rev. Plant Phys.* 45: 527-544.
- Shimozawa, T., Yamagata, K., Kondo, T., Hayashi, S., Shitamukai, A., Konno, D., Matsuzaki, F., Takayama, J., Onami, S., Nakayama, H., Kosugi, Y., Watanabe, T. M., Fujita, K. & Mimori-Kiyosue, Y. 2013. Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 3399-3404.

青色光に応答した微小管ダイナミクス

中村匡良・八木慎宜

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町

Masayoshi Nakamura & Noriyoshi Yagi

Cortical array reorientation in response to blue light

Key words: Microtubule reorientation, Microtubule nucleation, Microtubule severing, γ -tubulin complex, Katanin

Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601 JAPAN

DOI: 10.24480/bsj-review.9c3.00142

1. はじめに

植物は外界の環境変化を認識し、適切に応答することで生存を可能にしている。植物細胞の伸長方向制御がその応答の一つである。光の当たらない場所で発芽した種子は、土の外に葉を押し出し光を享受するため、その胚軸を早く長く成長させる。この細胞伸長は異方性の細胞成長により引き起こされ、その領域の表皮細胞は60時間で19倍の長さにまで達する (Refrégier et al. 2004)。薬理学や遺伝学的解析により、素早く伸長する細胞では伸長軸に対し垂直に並ぶ表層微小管が細胞伸長の方向性に重要であることが明らかとなっている。セルロース合成酵素は表層微小管に沿ってセルロース微繊維を細胞壁に沈着させる。これら微繊維の配向により作り出される細胞壁構成因子の方向性が細胞壁の異方性の主な原因と考えられている。細胞が異方性成長を示す際の機械的ストレスの変化、細胞骨格の調整と細胞壁の異方性成長が、組織のかたちを作り出すフィードバックループを作り上げると考えられている (Hamant et al. 2008)。細胞壁の異方性特性は時間的空間的な環境の変化に対応するために制御されている。動的な表層微小管は重力や機械的なストレス、光によってその配向を変化させる (Hamant et al. 2008, Murata et al. 1997, Nick et al. 1990)(図 1)。

環境に応答した微小管の配向方向は微小管付随タンパク質 (MAPs) の活性の変化によって調整されており、微小管の形成と切断といった微小管動態の制御機構が、近年報告され注目

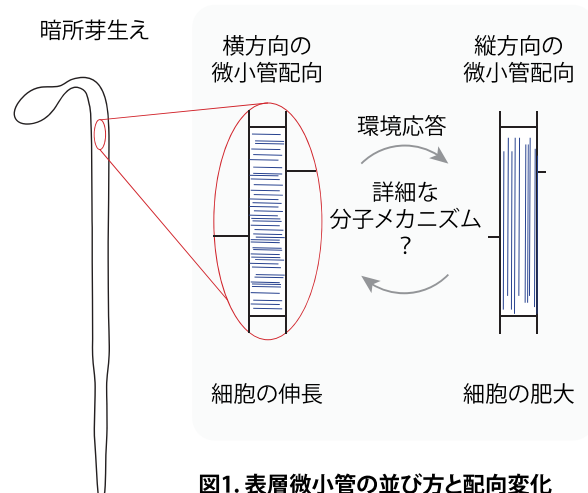


図1. 表層微小管の並び方と配向変化

横や縦に並んだ表層微小管は光や重力、機械的ストレスにより向きを変更する。

を集めている。新規の微小管形成は植物表層微小管の側面に局在する微小管形成因子から起こることが知られており、この形成機構によって既存の配向とは異なる角度を生み出すことができる (Murata et al. 2005)。微小管の切断機構は新規に形成された微小管が形成部位から切り離されるときに必要とされる (Nakamura et al. 2010)。そして、微小管を切り離すことで、微小管形成因子の再利用が可能となる。古い配向は微小管の伸長と短縮を繰り返すことで新調される (Ehrhardt 2008)。さらに、近年、微小管切断が既存の微小管配列を利用し、二つ目の微小管形成機構として機能していることが明らかとなった (Lindeboom et al. 2013)。

本レビューでは、 γ チューブリン複合体からの新規微小管形成機構とカタニンによる切断機構の最近の報告をまとめ、これらの機構がいかに青色光により制御され表層微小管配向を調節するかについて紹介する。

2. 細胞表層での微小管形成と制御因子

微小管は α , β チューブリン二量体が両末端で重合・脱重合することにより伸長と短縮を繰り返す極性を持った生体ポリマーである。ほとんどの真核生物において新しい微小管は γ チューブリン複合体から形成される。 γ チューブリン複合体は γ チューブリンと5つの γ チューブリンタンパク質 (γ tubulin complex proteins; GCP) から構成される (Kollman et al. 2011)。クライオ電子顕微鏡の結果から、酵母では、 γ チューブリン小複合体は二つの γ チューブリンと一つの GCP2 と GCP3 から構成され、*in vitro* では13個の微小管様の止めワッシャ構造を作る (Kollman et al. 2010)。この構造は、 γ チューブリン複合体が微小管の鋳型として機能することを示唆する。ヒトの GCP4 結晶解析から、GCP4、GCP5、GCP6 がそれぞれとそして GCP2、GCP3 と相互作用することによってリング型を安定化させていることが考えられている (Guillet et al. 2011)。シロイヌナズナから精製された γ チューブリン複合体は γ チューブリンと全ての GCP を含んでいる (Nakamura et al. 2010)。

高等植物は中心体のような微小管形成中心を持っていない。どのように新規微小管形成の場所、時間、頻度を決定する機構が制御され、植物の様々な間期細胞表層の微小管構造が作り出されるかは特に興味のあるところである。高等植物の間期細胞では、微小管は既存の微小管から約40度の角度を持って、もしくは既存の微小管に沿って平行に形成される (Chan et al. 2009, Murata et al. 2005)。シロイヌナズナでは、 γ チューブリン複合体動態の可視化によって表層微小管形成のモデルが提唱されている (図 2A)。 γ チューブリン複合体は細胞表層の既存の微小管上に運ばれ、そこで活性化される。活性化された γ チューブリン複合体は即座に40度か0度の角度を持って新しい微小管を形成する。ほとんど全ての微小管形成は既存の微小管を足場にして起こる。このことは微小管形成角度の制御に加え、既存の微小管配向が新しく形成される微小管の場所と角度を決定する重要な因子であると考えられる (Nakamura et al. 2010)。

シロイヌナズナ GCP タンパク質の分子遺伝学的解析から、微小管の枝分かれの角度は、 γ チューブリン複合体により決定されているようであった。*spiral3* 変異株はシロイヌナズナ GCP2 のアミノ酸置換を引き起こす一塩基置換の変異を持っており、この変異により GCP2 と GCP3 の相互作用が弱まっていることが示唆された。*spiral3* 変異株の子葉と胚軸の

表皮細胞では、微小管の形成角度が 40 度より大きくなり、表層微小管の配向が野生株に比べてより整列し、細胞が右巻きにねじれるように伸長していた (Nakamura & Hashimoto 2009)。GCP4 ノックダウン株では、新規の微小管は 40 度に比べ狭い角度で形成され、子葉の表層微小管はより整列した配向を示していた (Kong et al. 2010)。これらのデータから微小管形成の角度は γ チューブリン複合体の正確な構造と構成によって制御されており、その角度が微小管の配向形成に重要であることが示唆される。

γ チューブリン複合体が微小管を形成する細胞内の配置パターンは、 γ チューブリン複合体の活性と関連する標的因子により決定されると考えられる。真核生物では neural precursor cell expressed developmentally down-regulated gene-1 (NEDD1) が γ チューブリン複合体と共沈することが報告されており、NEDD1 非存在下では γ チューブリン複合体は形成されるが、有糸分裂時の微小管形成部位への輸送に不具合があった。このことから NEDD1 は γ チューブリン複合体の微小管形成部位への標的因子と考えられる (Lüders et al. 2006)。シロイヌナズナ NEDD1 は γ チューブリン複合体との共沈実験から、 γ チューブリン複合体に緩く結合している、もしくは微小管形成複合体に部分的に存在していることが示唆された (Nakamura et al. 2010)。nedd1 ヌル変異株では配偶体致死となり、NEDD1 は紡錘体形成や細胞分裂に必須であった (Zeng et al. 2009)。ノックダウン解析から、NEDD1 は間期微小管構造において γ チューブリン複合体を表層微小管上の形成部位に配置する為に機能していることが明らかとなった (Walia et al. 2014)。面白いことに、NEDD1 ノックダウン細胞では 40 度の角度を持った微小管形成の割合が減少していた。このことから微小管形成複合体の正確な配置や形態が、適切な微小管形成に重要であることが示唆された。 γ チューブリン複合体の標的因子と考えられる Augmin 複合体の構成因子 AUGMIN6 ノックダウン変異株においても同様に 40 度の角度を持った微小管形成の割合が減少することが確認されている (Liu et al. 2014)。

遺伝学的解析から、40 度の角度を持った微小管形成と平行な 0 度の微小管形成はシグナル伝達によって制御されていることが示唆されている。シロイヌナズナ type 2A protein phosphatases (PP2A) の B' サブユニット、TONNEAU2/FASS のノックダウン解析から、葉の表皮細胞では枝分かれ様の微小管形成に対し平行な微小管形成の割合が 0.62 から 6.0 にまで増加していた (Kirik et al. 2012)。この結果はフォスファターゼ活性が角度を持った微小管形成の割合を増加させる為に必要とされることを示唆する。青色光受容体であるフォトトロピンの欠損変異体では、平行な微小管形成の割合が野生株に比べ顕著に増加していた (Lindeboom et al. 2013)。フォトトロピンによるシグナルは角度を持った微小管形成を誘導するようである。フォトトロピンからのシグナルは PP2A フォスファターゼシグナルと協働し角度を持った微小管形成を制御しているのかもしれない。

酵母 2 ハイブリッドの研究から、微小管形成関連因子として GCP3-interacting protein 1 (GIP1) が高等植物で単離された (Janski et al. 2008)。GIP1 は脊椎動物の MOZART1 としても知られている。シロイヌナズナにおいて GIP1 は γ チューブリン複合体と相互作用し共沈され、動態解析から微小管が形成される複合体に選択的に局在しているようであった (Nakamura et al. 2012)。LS-MS/MS 解析から GIP1 複合体には γ チューブリンと 5 つ全ての

GCPが存在していることが確かめられたが NEDD1 は確認されなかった。構成因子の会合状況によって γ チューブリン複合体が制御されていることを示唆している。

3. 植物細胞表層での微小管切断と制御因子

γ チューブリン複合体から形成された新しい微小管は、カタニタンパク質の活性によって切断され、 γ チューブリン複合体から遊離する。カタニンは切断活性を持つ p60 サブユニット、および切断部位や活性を制御する p80 サブユニットで構成される。p60 サブユニットは ATP 依存的に 6 量体を形成し、p60 サブユニットのみで微小管側に結合し微小管を切断する (Hartman et al. 1998)。様々な遺伝学的スクリーニングによりシロイヌナズナの p60 が単離同定され、微小管の組織化、異方性の細胞伸長や細胞壁構造において重要な役割を担っていることが報告されている (Bichet et al. 2001, Burk & Ye 2002, Uyttewaal et al. 2012)。in vitro 解析によりシロイヌナズナ p60 も微小管切断活性を持つことが知られている (Stoppin-Mellet et al. 2002)。また、蛍光タンパク質を用いたライブセルイメージングにより、微小管切断部位にシロイヌナズナ p60 および p80 サブユニットが局在することが明らかになっている (Lindeboom et al. 2013, Nakamura et al. 2010, Zhang et al. 2013)。

微小管の切断は、 γ チューブリン複合体から形成された新しい微小管の基部だけでなく、微小管が交差した部位でも起こる (図 2B)。カタニがこれら別々の部位に特異的に局在する分子機構は未だ謎が多い。局在制御機構については、in vitro 解析などから 3 つ考えられている。一つは、チューブリンの翻訳後修飾がカタニンの集まる目印になっているかもしれない。カタニンの微小管切断活性はチューブリンの C 末の修飾に依存している (McNally & Vale 1993, Sharma et al. 2007)。

チューブリンの翻訳後修飾には、リン酸化、チロシン化、脱チロシン化、アセチル化、ポリグルタミル化が報告されており、植物の微小管配向に重要である翻訳後修飾や環境によって制御されている翻訳後修飾も報告されている (Cai 2010, Fujita et al. 2013)。二つ目は、カタニン p60 が微小管の傷や構造的な欠損を認識しているかもしれない。事実、in vitro でカタニン p60 が微小管側壁の傷に高い親和性を示しており (Díaz-Valencia et al. 2011)、また、in vitro と動物細胞での微小管が交差する部位に損傷を受けることが報告され

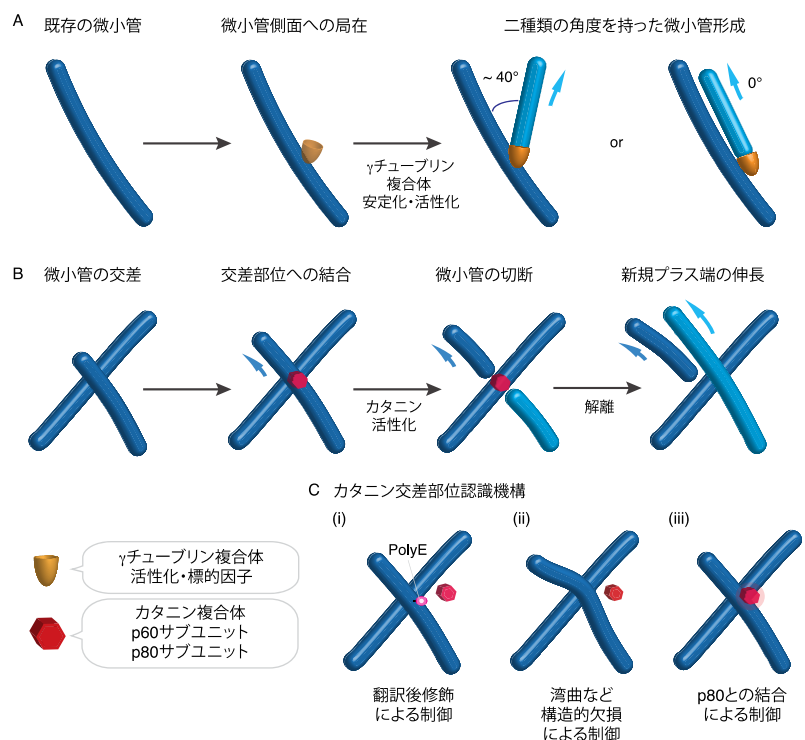


図2. 微小管形成と切断のモデル

(A) 細胞表層における微小管形成機構、(B) 交差部位での微小管切断機構、(C) 微小管切断因子カタニン複合体がどのようにして微小管交差部位を認識するのか。

ている (de Forges et al. 2016)。植物の表層微小管は細胞膜にアンカーされており (Ledbetter 1963)、二本の微小管が交差する際、少なくとも1本の微小管は湾曲すると考えられる (図 2C)。この湾曲によって生じる微小管の構造的変化をカタニンが認識しているのかもしれない。

最後に、微小管切断部位への局在制御ステップとして、カタニンの複合体形成制御が考えられる。p60 サブユニットは微小管結合能をもつが、p60 サブユニットのみでは微小管の束化はみられない。ところが、微小管結合能をもたない p80 サブユニットと、p60 サブユニットが共存すると、切断活性がない状況では微小管は束化を促進される。また、複合体形成時に、交差部位での切断活性が高かった (McNally et al. 2014)。シロイヌナズナには、p80 サブユニットをコードする遺伝子が4つ存在し、これら4つの遺伝子の機能欠失変異株では、微小管交差部位や形成部位への p60 の局在が見られなかった (Wang et al. 2017)。p60/p80 複合体形成による微小管切断制御機構が生物種で広く保存されていることが考えられる。今後は、p80 を含めたカタニン複合体が表層微小管において、このうちの一つもしくは複数を用いて局在を制御されているのか、詳細な動態解析と *in vitro* 解析により明らかにしていく必要がある。

植物の表層微小管では、多くの交差部位が観察されるが、すべての交差部位で切断が観察されるわけではない。近年、シロイヌナズナの Augmin 複合体が微小管交差部位に局在することにより、微小管交差部位での微小管切断を負に制御することが報告されている (Wang et al. 2018)。Augmin 複合体の交差部位への局在が、カタニンの交差部位へのリクルートを阻害しているのか、あるいは、カタニンの切断活性を抑制するのか、今後の解析が期待される。一方、微小管結合タンパク質である SPIRAL2 は、微小管のマイナス端に局在し脱重合を抑制する。その結果、切断場所としての交差部位の維持に寄与していることが報告されている (Nakamura et al. 2018)。このように、微小管の交差部位のカタニンによる切断は、様々な微小管結合タンパク質の機能により直接的間接的に制御されている。

4. 青色光に応答した微小管配向変化

これまでイメージング技術に遺伝学を組み合わせることで青色光による微小管配向変化の分子機構の詳細が明らかになってきた (Lindeboom et al. 2013)。青色光により引き起こされる微小管配向変化では、青色光受容体フォトロピンを介して微小管形成機構と微小管切断機構が巧く調整されている。青色光を受け取ったあと主に二つのステップを経る。一つ目は、横方向に並んだ既存の微小管の側面に結合したγチューブリン複合体からおおよそ40度の角度を持った新規の微小管が形成され、縦方向になり得る微小管を産出する。新規に形成された角度を持った微小管は既存の横方向の微小管と交差部位を作り出し、形成部位からはカタニンにより切り離される。二つ目は、微小管の交差は角度を持った微小管形成によって促進され、その交差部位で微小管はカタニンの活性によって切断される。切断により新規に形成されたプラス端は伸長しさらに交差部位を生み出し切断される機会を増やす。この機構は連続的に縦方向の微小管を増幅する機能として働き、効果的に横から縦への90度、微小管配向を変化させる (図 3A)。カタニン変異体を用いた解析から、この微小管配向変化が光屈性

において重要であることが示唆された(図 3B)。近年、植物ホルモンや暗闇による表層微小管の配向変化が報告されている。これらの反応は青色光が数分で引き起こすのに対し数時間かかり、青色光に応答した配向変化機構とは異なると考えられる(Sambade et al. 2012, Vineyard et al. 2013)。しかしながら、これらの配向変化においても微小管形成と切断の制御

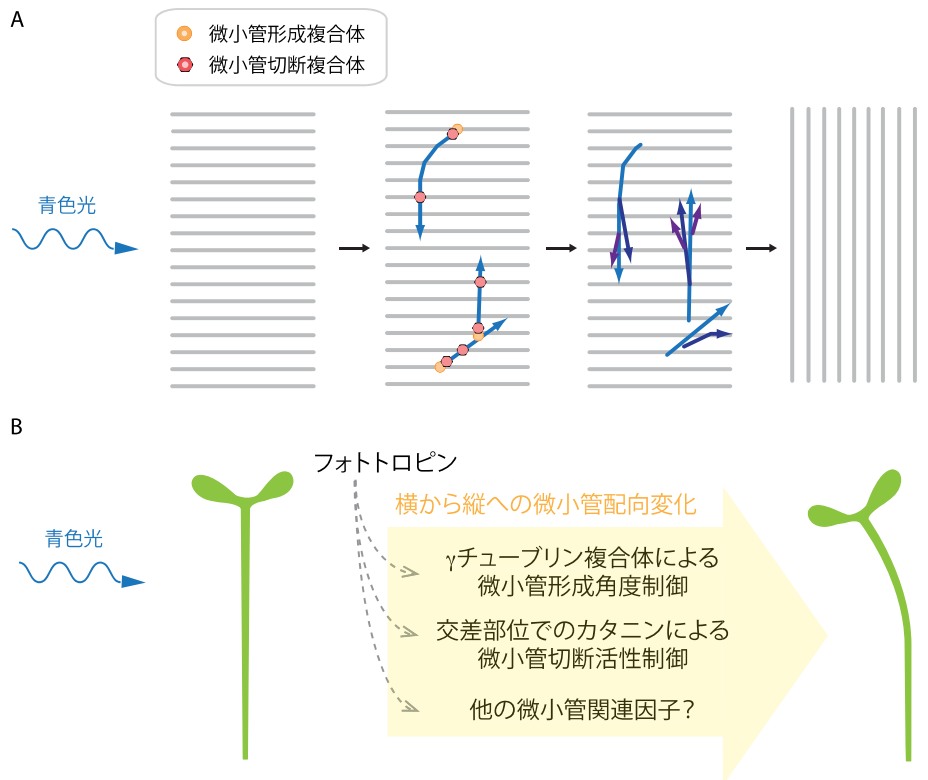


図3. 青色光に応答した微小管配向変化

(A) 角度を持った微小管形成と交差部位での微小管切断により、縦方向の微小管を増幅することで横方向から縦方向への微小管配向を変化させる。(B) 表層微小管配向変化と青色光による光屈性。

が重要な役割を担っているのかもしれない。

5. おわりに

微小管形成と微小管切断の分子メカニズムに注目し、最近の微小管配向変化の研究についてまとめてきた。私たちの理解は明らかに進んできているが、しかしながら、微小管の配向変化制御が組織間で共通か、刺激に応じて異なる分子メカニズムを用いるのか、多くの重要な問題が未だ残されたままである。例えば、植物ホルモンの添加や機械的刺激により微小管配向変化が引き起こされることが知られている (Shibaoka 1994)。これらの微小管配向変化を可能にする詳細な分子メカニズムは未だ明らかとなっていない。また、微小管の配向変化が胚軸の伸長阻害ではなく光屈性反応に寄与していることが明らかとなった。微小管の配向変化がどのように起こり、屈性にいかに寄与しているかはこれからの課題である。

表層微小管は細胞膜内側に裏打ちされるように局在している。しかしながら、その実態は未だ未解明である (Giddings & Staehelin 1988, Wasteneys & Ambrose 2009)。γチューブリン複合体による微小管形成やカタニンによる切断により形成された新規の微小管プラス端は直ち

に細胞膜に架橋されると考えられるが、微小管と細胞膜の相互作用の詳細は未だ示されていない。微小管がどのように振る舞い細胞内構造体と相互作用するかは微小管プラス端集積因子 (microtubule plus-end-tracking proteins; +TIPs) に依るところが大きい。微小管形成や切断により産出されるプラス端にこれら+TIPs がどのように働いているかを解明することが微小管配向変化を理解する上で今後重要となる。

微小管形成や微小管切断に関わると示唆されている新規微小管付随タンパク質もいくつか報告されてきている。近年、微小管マイナス端の紡錘体への固定に関わる分裂酵母 mitotic spindle disanchored 1 (MSD1) ホモログがシロイヌナズナ微小管付随タンパク質として単離され、表層微小管に局在することが示された (Hamada et al. 2013)。この MSD1 も環境に応答した微小管配向変化制御に関わる可能性がある。これら新規の制御因子と考えられるタンパク質や既知の+TIPs の時間空間的な制御機構を理解するためには、定量的なライブセルイメージング法とコンピュータシミュレーションの組み合わせが必要となる。また、*in vitro* の解析系や *in vivo* において時間的空間的にタンパク質を不活性化できるような新規技術の開発が期待される。

6. 引用文献

- Bichet, A., Desnos, T., Turner, S., Grandjean, O. & Höfte, H. 2001. BOTERO1 is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in Arabidopsis. *Plant J.* 25: 137–148.
- Burk, D. H. & Ye, Z.-H. 2002. Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell* 14: 2145–2160.
- Cai, G. 2010. Assembly and disassembly of plant microtubules: tubulin modifications and binding to MAPs. *J. Exp. Bot.* 61: 623–626.
- Chan, J., Sambade, A., Calder, G. & Lloyd, C. 2009. Arabidopsis cortical microtubules are initiated along, as well as branching from, existing microtubules. *Plant Cell* 21: 2298–2306.
- de Forges, H., Pilon, A., Cantaloube, I., Pallandre, A., Haghiri-Gosnet, A.-M., Perez, F. & Poüs, C. 2016. Localized mechanical stress promotes microtubule rescue. *Curr. Biol.* 26: 3399–3406.
- Díaz-Valencia, J. D., Morelli, M. M., Bailey, M. & Zhang, D. 2011. Drosophila katanin-60 depolymerizes and severs at microtubule defects. *Biophys. J.* 100: 2440–2449.
- Ehrhardt, D. W. 2008. Straighten up and fly right: microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 107–116.
- Fujita, S., Pytela, J., Hotta, T., Kato, T., Hamada, T., Akamatsu, R., Ishida, Y., Kutsuna, N., Hasezawa, S., Nomura, Y., et al. 2013. An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 23: 1969–1978.
- Giddings, T. H., Jr & Staehelin, L. A. 1988. Spatial relationship between microtubules and plasma-membrane rosettes during the deposition of primary wall microfibrils in *Closterium* sp. *Planta* 173: 22–30
- Guillet, V., Knibiehler, M., Gregory-Pauron, L., Remy, M.-H., Chemin, C., Raynaud-Messina, B.,

- Bon, C., Kollman, J. M., Agard, D. A., Merdes, A., et al. 2011. Crystal structure of γ -tubulin complex protein GCP4 provides insight into microtubule nucleation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: 915–919.
- Hamada, T., Tekeuchi, N. N., Kato, T., Fujiwara, M., Sonobe, S., Fukao, Y. & Hashimoto, T. 2013. Purification and characterization of novel microtubule-associated proteins from Arabidopsis cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 163: 1804–1816.
- Hamant, O., Heisler, M. G., Jonsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlin, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E. M., et al. 2008. Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis. *Science* 322: 1650–1655.
- Hartman, J. J., Mahr, J., McNally, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Thomas, S., Cheesman, S., Heuser, J., Vale, R. D. & McNally, F. J. 1998. Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell* 93: 277–287.
- Janski, N., Herzog, E. & Schmit, A.C. 2008. Identification of a novel small Arabidopsis protein interacting with gamma-tubulin complex protein 3. *Cell Biol. Int.* 32: 546–548.
- Kirik, A., Ehrhardt, D. W. & Kirik, V. 2012. TONNEAU2/FASS regulates the geometry of microtubule nucleation and cortical array organization in interphase Arabidopsis cells. *Plant Cell* 24: 1158–1170.
- Kollman, J. M., Polka, J. K., Zelter, A., Davis, T. N. & Agard, D. A. 2010. Microtubule nucleating γ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry *Nature*. 466: 879-882.
- Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L. & Agard, D. A. 2011. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 709–721.
- Kong, Z., Hotta, T., Lee, Y.-R. J., Horio, T. & Liu, B. 2010. The γ -tubulin complex protein GCP4 is required for organizing functional microtubule arrays in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 191–204
- Ledbetter, M. C. 1963. A “MICROTUBULE” IN PLANT CELL FINE STRUCTURE. *J. Cell Biol.* 19: 239–250.
- Lindeboom, J. J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Ketelaar, T., Emons, A. M. C., Mulder, B. M., Kirik, V. & Ehrhardt, D. W. 2013. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* 342: 1245533.
- Liu, T., Tian, J., Wang, G., Yu, Y., Wang, C., Ma, Y., Zhang, X., Xia, G., Liu, B. & Kong, Z. 2014. Augmin triggers microtubule-dependent microtubule nucleation in interphase plant cells. *Curr. Biol.* 24: 2708–2713.
- Lüders, J., Patel, U. K. & Stearns, T. 2006. GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 8: 137–147.
- McNally, F. J. & Vale, R. D. 1993. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* 75: 419–429.
- McNally, K., Berg, E., Cortes, D. B., Hernandez, V., Mains, P. E. & McNally, F. J. 2014. Katanin maintains meiotic metaphase chromosome alignment and spindle structure in vivo and has multiple

- effects on microtubules in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 24: 1037–1049
- Murata, T., Kadota, A. & Wada, M. 1997. Effects of blue light on cell elongation and microtubule orientation in dark-grown gametophytes of *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Physiol.* 38: 201–209
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T. I., 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: 961–968.
- Nakamura, M. & Hashimoto, T. 2009. A mutation in the Arabidopsis gamma-tubulin-containing complex causes helical growth and abnormal microtubule branching. *J. Cell. Sci.* 122: 2208–2217.
- Nakamura, M., Ehrhardt, D. W. & Hashimoto, T. 2010. Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal Arabidopsis cortical array. *Nat. Cell Biol.* 12: 1064–1070.
- Nakamura, M., Lindeboom, J. J., Saltini, M., Mulder, B. M. & Ehrhardt, D. W. 2018. SPR2 protects minus ends to promote severing and reorientation of plant cortical microtubule arrays. *J. Cell Biol.* 217: 915–927.
- Nakamura, M., Yagi, N., Kato, T., Fujita, S., Kawashima, N., Ehrhardt, D. W. & Hashimoto, T. 2012. Arabidopsis GCP3-interacting protein 1/MOZART 1 is an integral component of the γ -tubulin-containing microtubule nucleating complex. *Plant J.* 71: 216–225.
- Nick, P., Bergfeld, R., Schäfer, E. & Schopfer, P. 1990. Unilateral reorientation of microtubules at the outer epidermal wall during photo- and gravitropic curvature of maize coleoptiles and sunflower hypocotyls - Springer. *Planta* 181: 162–168.
- Refrégier, G., Pelletier, S., Jaillard, D. & Höfte, H. 2004. Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 135, 959–968.
- Sambade, A., Pratap, A., Buschmann, H., Morris, R. J. & Lloyd, C. 2012. The influence of light on microtubule dynamics and alignment in the Arabidopsis hypocotyl. *Plant Cell* 24: 192–201
- Sharma, N., Bryant, J., Wloga, D., Donaldson, R., Davis, R. C., Jerka-Dziadosz, M. & Gaertig, J. 2007. Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J. Cell Biol.* 178: 1065–1079.
- Shibaoka, H. 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: Alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 45: 527–544.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J. & Vantard, M. 2002. Functional evidence for in vitro microtubule severing by the plant katanin homologue. *Biochem. J.* 365: 337–342.
- Uyttewaal, M., Burian, A., Alim, K., Landrein, B., Borowska-Wykręt, D., Dedieu, A., Peaucelle, A., Ludynia, M., Traas, J., Boudaoud, A., et al. 2012. Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in Arabidopsis. *Cell* 149: 439–451.
- Vineyard, L., Elliott, A., Dhingra, S., Lucas, J. R. & Shaw, S. L. 2013. Progressive transverse microtubule array organization in hormone-induced Arabidopsis hypocotyl cells. *Plant Cell* 25: 662–676.

- Walia, A., Nakamura, M., Moss, D., Kirik, V., Hashimoto, T. & Ehrhardt, D. W. 2014. GCP-WD mediates γ -TuRC recruitment and the geometry of microtubule nucleation in interphase arrays of *Arabidopsis*. *Current Biology* 24: 2548–2555.
- Wang, C., Liu, W., Wang, G., Li, J., Dong, L., Han, L., Wang, Q., Tian, J., Yu, Y., Gao, C., et al. 2017. KTN80 confers precision to microtubule severing by specific targeting of katanin complexes in plant cells. *EMBO J.* 36: 3435–3447.
- Wang, G., Wang, C., Liu, W., Ma, Y., Dong, L., Tian, J., Yu, Y. & Kong, Z. 2018. Augmin antagonizes katanin at microtubule crossovers to control the dynamic organization of plant cortical arrays. *Curr. Biol.* 28: 1311–1317.
- Wasteneys, G. O. & Ambrose, J. C. 2009. Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19: 62–71.
- Zeng, C. J. T., Lee, Y.-R. J. & Liu, B. 2009. The WD40 repeat protein NEDD1 functions in microtubule organization during cell division in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 1129–1140.
- Zhang, Q., Fishel, E., Bertroche, T. & Dixit, R. 2013. Microtubule severing at crossover sites by katanin generates ordered cortical microtubule arrays in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23: 2191–2195.

NIMA 関連キナーゼによる極性成長の制御機構

本瀬宏康, 高谷彰吾, 高橋卓

岡山大学大学院自然科学研究科

岡山県岡山市北区津島中 3-1-1 岡山大学理学部本館

Hiroyasu Motose, Shogo Takatani, Taku Takahashi

NIMA-related kinases direct plant cell growth

Key words: growth polarity, land plant evolution, microtubule, NIMA-related kinase, tip growth

Graduate School of Natural Science & Technology, Okayama University

Tsushimanaka 3-1-1, Okayama, 700-8530 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9c4.00143

細胞が一定の方向に伸長する極性成長は様々な生物で見られる現象であり、形態形成や生殖過程に必須の役割を果たしている。特に、動物の神経細胞、糸状菌の菌糸、植物の花粉管・根毛・仮根・原糸体などは、明瞭な極性のある成長を行う。これらの極性成長は、主に微小管やアクチン繊維といった細胞骨格によって実行されているが、その制御機構については未だ不明な点が多い。私達の研究から、真核生物に広く保存されている NIMA 関連キナーゼ (NIMA-related kinase, NEK) が、微小管を介して植物細胞の伸長方向を調節することが明らかになった。動物や菌類の NEK は主に細胞分裂を制御しているが、植物では進化の過程で NEK が極性成長のメカニズムに組み込まれた可能性がある。本稿では、植物細胞の伸長極性がどのように制御されているかについて、NEK による微小管制御に着目して解説したい。

1. 極性成長と微小管

細胞の成長極性の制御は、真核・原核を問わず、生物の生存と形態形成に不可欠であり、細胞構成成分の組織化という普遍的な問題を内包している。酵母や糸状菌の極性伸長、動物の受精卵・神経細胞の研究から、微小管やアクチン繊維が細胞の極性形成に中心的な役割を果たしていることが明らかになってきた (Siegrist, & Doe 2007)。分裂酵母では、分裂によって形成された新しい細胞末端が成長し、細長い細胞形態が維持される。この過程は、New End Take Off (NETO) と呼ばれるシステムによって制御されており、G2 後期に Polo キナーゼにより NETO が活性化されると、Tealp などの極性形成因子が新しい細胞端に微小管をリクルートし、逆に微小管が極性形成因子を局在化させるという正のフィードバックにより極性が形成される。

植物の細胞極性については、ROP GTPase や BASL などの細胞膜タンパク質が細胞の片側に局在化し、細胞伸長や分裂、細胞壁形成、物質輸送の方向を制御することが明らかになってきた (Dettmer & Friml 2011, Oda 2018)。特に、オーキシンの細胞外への排出を行う PIN タンパク質は

細胞の片側に局在し、オーキシンの極性輸送を引き起こす。この過程では、細胞内のオーキシンの蓄積量と極性輸送（PIN の局在化）の間に正のフィードバックが働く。PIN タンパク質の局在は、細胞膜とエンドソームの間のリサイクリングとアクチン依存的な極性分泌により制御される。PIN と微小管の間には直接的な関連はないと考えられるが、PIN タンパク質は細胞が伸長する方向に局在し、表層微小管は伸長方向と垂直に配向するので、上から見るとお互いに重ならないように局在している（Heisler et al. 2010）。以上のことから膜タンパク質と細胞骨格の相互作用が重要なことが示唆されるが、植物細胞の極性形成については全体像がつかめておらず、極性形成と細胞成長を繋ぐメカニズムもわかっていないのが現状である。

植物の形態形成では細胞が移動しないため、個々の細胞がどの方向にどれくらい成長するかにより、器官全体の形が制御される。植物細胞の伸長様式は、拡散成長（diffuse growth）と先端成長（tip growth）の2つに大別される。拡散成長では細胞表面の全域が伸びるが、先端成長では細胞の一部に成長点が形成され、そこが突出して伸び出す。拡散成長はほぼ全ての細胞で見られるが、先端成長は花粉管や根毛・仮根、コケ植物の原糸体など比較的限られた細胞が行い、顕著な極性をもったフィラメント状の形態を発達させる。一方、拡散成長といっても細胞全体が成長して丸くなることはほとんどなく、細胞の領域によって成長量が違うため、方向性のある成長が可能であり、葉のトライコームやペーパーメント細胞などでは拡散成長により特徴的な細胞形態が生じる。

植物細胞の伸長方向は、細胞膜内側に局在する表層微小管が一定の方向に並ぶことで決定される（図1、2）。これは、細胞膜上のセルロース合成酵素が表層微小管のレールの上を移動しながらセルロース微繊維を形成するため、細胞壁のセルロース微繊維が微小管と同じ向きに配向し、伸長方向を限定するためと考えられている。また、表層微小管自体が伸長方向を限定するたがとして機能すると考えられる。上記の拡散成長では、成長方向と直角に微小管とセルロース微繊維が配向し、たがとしての機能を理解しやすい。また、細胞の領域による成長量の違いは微小管とセルロース微繊維の配向や細胞壁の伸展性の違いにより説明できる。一方、先端成長では、微小管が成長方向と平行もしくは斜めに配向し、先端部に微小管のプラス端が集まった微小管束（microtubule foci）が形成される（図2）。先端成長では、微小管がたがとして機能するのではなく、微小管束の何らかの機能により成長方向が決まると考えられる（詳しくは5の先端成長のセクションを参照）。

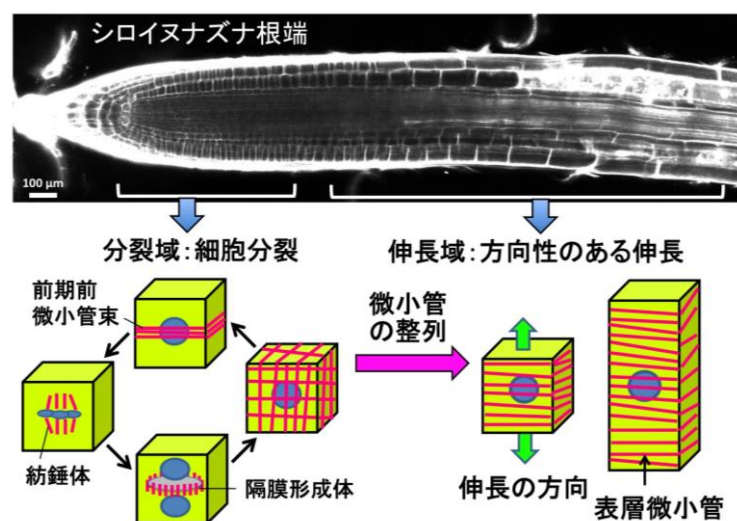


図1. 微小管（赤線）は細胞分裂・伸長の方向を規定する

ところで、中心体をもたない植物細胞において、微小管がどのように整列するのだろうか？これまでの研究から、微小管同士が角度依存的に相互作用することで、一定の方向に配向するという自己組織化モデルが提唱されている（本総説集の村田 2018 BSJ-Review 9C2）。

また、 γ -チューブリン複合体やカタニン、キネシンをはじめと

した様々な微小管付随タンパク質による制御機構が明らかになって来た（Hashimoto 2015, 本総説集の濱田 2018 BSJ-Review 9C6, 佐々木&小田 2018 BSJ-Review 9C5, 中村&八木 2018 BSJ-Review 9C3）。以下では、主に NIMA 関連キナーゼ（NIMA-related kinase, NEK）に着目し、微小管と細胞極性の制御機構について紹介する。

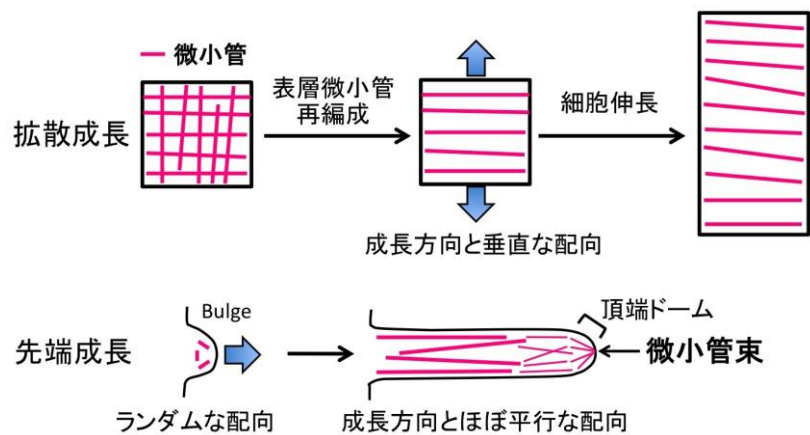


図 2. 拡散成長と先端成長. 微小管の配向の違いに着目.

2. NIMA 関連キナーゼ (NEK) とは？

NIMA 関連キナーゼは、真核生物に広く保存されている Ser/Thr 型のタンパク質キナーゼである。菌類や動物細胞の NEK は主に細胞分裂を制御しており, cyclin-dependent kinase (CDK), Polo-like kinase (PLK), aurora kinase と共に mitotic kinase を構成している (O'Connell et al. 2003, Fry et al. 2012)。NEK は糸状菌 *Aspergillus nidulans* における温度感受性変異体 *never in mitosis A (nimA)* の原因遺伝子として初めて同定された (Osmani et al. 1988)。nimA 変異体を制限温度条件下で生育すると、細胞周期が M 期直前 (G2 期) で停止する。逆に, nimA 遺伝子を過剰発現すると M 期への移行が誘導される。従って, NimA kinase は糸状菌の G2/M 移行に必要な十分な mitotic kinase であり, 細胞周期進行に必須な因子である。その後, nimA のオルソログとして分裂酵母 *fin1*, 出芽酵母 *kin3* 遺伝子が見出された。特に *fin1*, *nimA* の解析から, NEK が M 期への移行, 染色体凝集, 紡錘体形成, 細胞質分裂, M 期からの離脱 (mitotic exit) といった多面的な機能を果たしていることが明らかになった。

興味深いことに, 糸状菌とは異なり, 分裂酵母や出芽酵母の NEK は細胞周期進行に必須ではなく, 変異体は致死にならないことから, 生物種や分裂様式によって NEK の必要性が異なることが示唆されている。菌類の NEK 遺伝子はシングルコピーであるが, ほとんどの動物や植物では複数の NEK 遺伝子を持っており, 機能も多様化・分担化されていると考えられる (8 の NEK と進化のセクションを参照)。特に, クラミドモナスやテトラヒメナなど鞭毛・繊毛を持つ単細胞生物では NEK 遺伝子が多く, 多様化していることが知られている (Parker et al. 2007, Takatani et

al. 2015a)。

NEK の機能解析は、先述した菌類やヒトを始めとした動物細胞で研究が進んだ (Fry et al. 2012)。ヒトでは 11 個の *NEK* 遺伝子 (*NEK1-NEK11*) が存在し、*NEK2*, 6, 7, 9 は紡錘体形成に必要であり、*NEK1*, 10, 11 は DNA 損傷チェックポイント経路で機能している。*NEK2* は複製された中心体を連結している coiled-coil タンパク質をリン酸化し、中心体の分離を引き起こす。*NEK9* は *NEK6*, 7 をリン酸化して活性化し、Eg5 キネシンや γ -チューブリン複合体をリクルートする NEDD1 (GCP-WD) のリン酸化を介して紡錘体形成を促進する。このように *NEK* は、微小管を基盤とした中心体や紡錘体などと密接に関連して機能していると考えられる。

細胞周期制御の他に、間期における鞭毛・繊毛を制御する *NEK* が見出されている (Quarmby & Mahjoub 2005)。クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は 2 本の鞭毛により遊泳する単細胞の緑藻で、鞭毛の形成や機能を研究する優れたモデル生物である (鞭毛については本総説集の嶋村 2018 BSJ review 9C8 を参照)。クラミドモナスの鞭毛は、様々な化学刺激や細胞周期の進行に応じて切断・除去される (脱鞭毛)。これまでに脱鞭毛が起こらない変異体が多数単離されており、その内の *fa1*, *fa2* (*flagellar autotomy*) 変異体では Ca^{2+} 依存的な微小管切断に欠損があり、鞭毛の軸糸を切断することができない (Finst et al. 1998)。*FA2* は *NEK* をコードしており、*Fa2p* タンパク質は鞭毛基部の切断部位 (移行帯) に存在し、脱鞭毛を引き起こすと考えられる (Mahjoub et al. 2002)。もう一つのクラミドモナス *NEK* である *Cnk2p* は鞭毛の軸糸上にドット状に局在し、鞭毛の伸長を抑制する (Bradley & Quarmby 2005)。*Fa2p* と *Cnk2p* はいずれも細胞周期の進行を促進しており、細胞周期とリンクした鞭毛制御を行うと考えられる。また、脊椎動物の *NEK1*, 8 も繊毛の形成・機能を制御しており、その変異は繊毛異常による疾患 (繊毛病) の 1 つである多発生嚢胞腎 (polycystic kidney disease, PKD) の原因と考えられる (Quarmby & Mahjoub 2005)。従って、*NEK* は微小管を軸糸として持つ鞭毛・繊毛を制御している。しかし、*NEK* が脱鞭毛や鞭毛の長さをどのように制御しているのか、その作用機構の詳細は不明のままである。

3. シロイヌナズナ NIMA 関連キナーゼ 6 による細胞伸長制御

私達は、植物細胞の伸長制御機構を明らかにするため、シロイヌナズナ *ibo1* 変異体を単離した。*ibo1* (*nek6*) 変異体では、表皮細胞が異常な伸長を行い、突起を形成する (図 3, Motose et al. 2008, Sakai et al. 2008)。*ibo1* 変異体の原因遺伝子は NIMA 関連キナーゼ 6 (*NEK6*) であり、*NEK6* の機能が欠損していた。*NEK6* は微小管上に局在し、キナーゼ活性を介して細胞の伸長方向を制御する。その後の解析から、*NEK6* は *NEK4*, 5 と相互作用して機能すること、微小管を構成するチューブリンをリン酸化し、微小管を不安定化することが示唆された (Motose et al. 2011)。

最近の研究から、*NEK6* によってどのように微小管が制御され、伸長方向が限定されるのか、その詳細が明らかになってきた (Takatani et al. 2017)。顕著な表現型を示す *nek6-1* 変異体では、胚軸中央部の細胞において突起が形成され、胚軸下部の細胞では伸長が抑制されていた。このこと

から, NEK6 は突起形成の抑制 (異常な伸長の抑制) と細胞伸長の促進という 2 つの機能を持つことがわかった。*nek6-1* 変異体の微小管動態を詳しく解析したところ, 細胞膜から剥がれて屈曲・変形する微小管が増大していた (図 4 A)。野生株においても, 細胞膜に結合している表層微小管は時折, 細胞膜から剥離してふらふらと移動し (lateral movement と呼ぶ), 近傍の微小管や膜に結合して微小管構造の再編成に寄与すると考えられる (Ambrose & Wasteneys 2008)。*nek6-1* 変異体では, 微小管が細胞膜から剥がれる頻度は正常であるが, 剥がれた微小管が脱重合せずに長い時間維持され, 伸長と屈曲を続けていた。

また, NEK6 を過剰発現すると, 表層微小管が減少して配向が乱れ, 細胞伸長が抑制された。従って, NEK6 の活性や発現量のバランスが厳密に制御されること, NEK6 が微小管を脱重合することが示唆された。次に, NEK6-GFP と微小管マーカー mCherry-TUB6 を発現する 2 重ラベル株を観察し, 微小管上での NEK6 の動態を解析した。その結果, NEK6 は退縮する微小管末端に局在することがわかった (図 4 B)。また, 変形する微小管が脱重合する際の末端に局在していた。以上のことから, NEK6 は細胞膜から剥がれて変形した微小管を除去し, 極性のある細胞伸長を可能にしていると考えられる。

NEK6 の分子機能を解明するため, NEK6 によってリン酸化される β -チューブリンのアミノ酸残基を 5 つ同定した (図 5, Takatani et al. 2017)。これらのアミノ酸をリン酸化されないアラニン, または

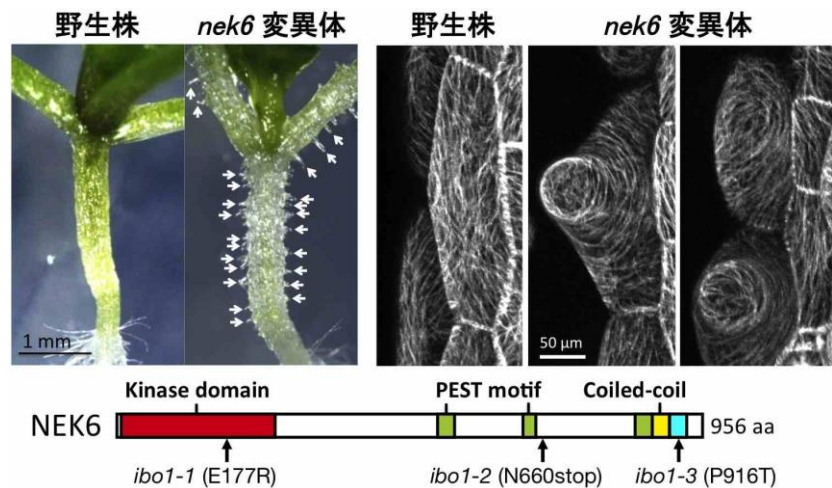


図 3. シロイヌナズナ *nek6* 変異体では微小管が整列せず, 細胞が異常な方向に伸長する。

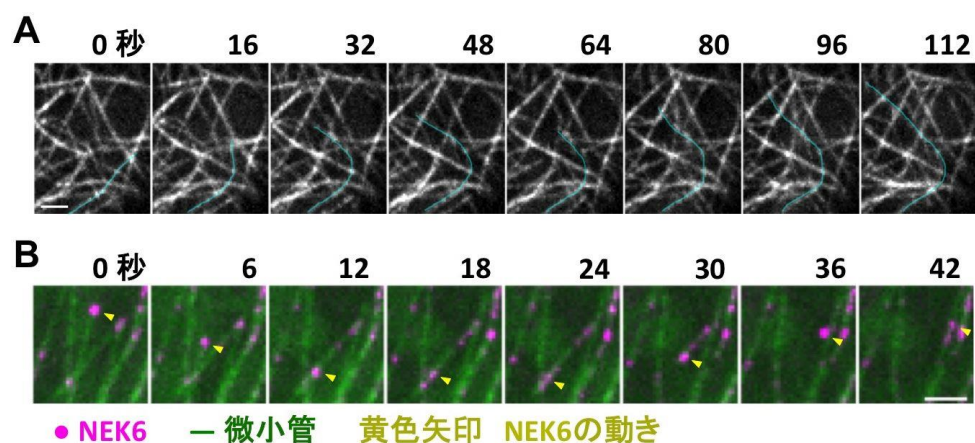


図 4. A. *nek6* 変異体における表層微小管の動態. 青線で表示した微小管が屈曲しながら伸長. B. 微小管上における NEK6 の動態. NEK6 は微小管の退縮末端に局在する。

リン酸化ミミックとなるアスパラギン酸に置換すると、チューブリンの微小管への重合が変化した。特に, Thr-166 をリン酸化されないアラニンに置換するとチューブリンの微小管への重合が顕著に促進されることから, このアミノ酸残基のリン酸化が重要であり, 微小管の不安定化に関与すると考えられた。以上より, NEK6 は β -チューブリンの特定のアミノ酸残基をリン酸化して脱重合させ, 余分な微小管を除去して整列させると考えられる (図6, チューブリンのリン酸化・修飾の詳細については章末のBOX1を参照)。

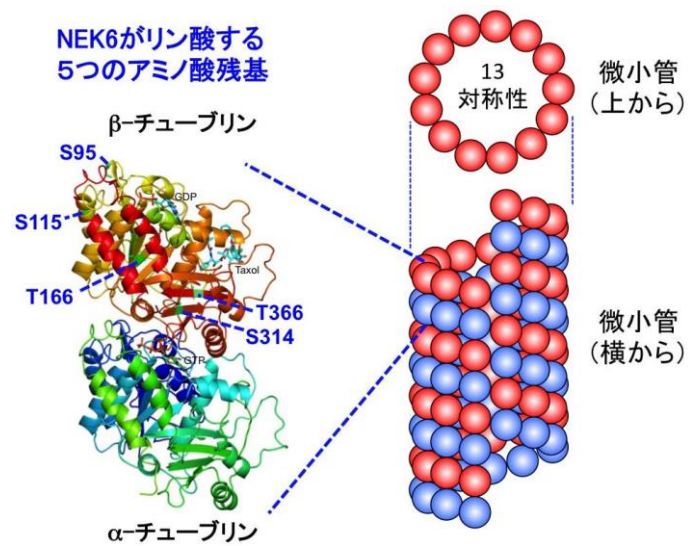


図5. NEK6によりリン酸化される β -チューブリンのアミノ酸残基

4. NEK6は微小管の張力応答を抑制し, 細胞と器官の成長を協調させる

nek6 変異体では, 表皮細胞に突起が形成される他に, 根や胚軸が屈曲して成長する表現型を示す (Motose et al. 2012)。また, 野生株では整然とした細胞列が形成されるが, *nek6* 変異体では成長に伴って細胞列が乱れていく。これらの細胞～組織・器官レベルでの伸長異常は, 何らかの同じメカニズムによって生じるのだろうか。もしそうであれば, NEK の新たな役割や, 微小管の新規な制御機構について重要なヒントとなるかもしれない。

植物の形態形成では, 個々の細胞の成長が協調し, 器官全体として統制のとれた形が作られる必要がある。器官が成長するのに伴い, その表面には張力が発生する。張力の強さや方向は, 細胞や器官の形と成長率に依存しており, 特徴的な張力パターンを発生させる。最近の研究から, この形態形成に伴う張力方向に微小管が配向し, 器官を構成する個々の細胞が協調して伸長・分裂することで, 器官全体の形態が制御されることが明らかになって来た (メカニカルフィードバック説, Hamant et al. 2008, Uyttewaal et al. 2012, Louveaux et al. 2016, Hervieux et al. 2016, 2017)。これまでの研究では植物ホルモン・ペプチドホルモンなどの化学シグナルにより細胞間の連携が行

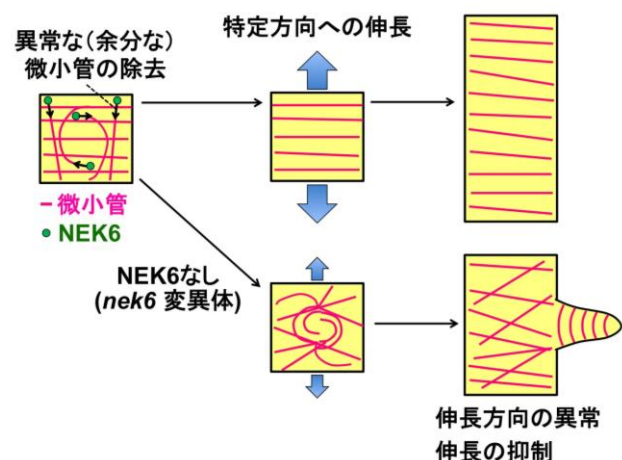


図6. NEK6により余分な微小管が除去されて整列し, 細胞伸長の方向が制御される。

われ、器官全体として調和した形態形成が実現されると考えられてきたが、それに加えて物理的な力がシグナルとなっている（メカニカルシグナル）という理解に移行しつつある。

微小管を切断するカタニンは、微小管が張力方向に配向するのに必要であり、カタニン変異体では張力応答が低下して分裂組織が平坦な形態を示す (Uyttewaal et al. 2012)。従って、カタニンがメカニカルフィードバックの **key regulator** であると考えられるが、それ以外のメカニカルフィードバックの制御機構や分子機構はほとんどわかっていない。私達は、シロイヌナズナ **NEK6** がメカニカルフィードバックを調節し、個々の細胞や器官全体をまっすぐ成長させるのではないかと考え、以下の研究を行った。

nek6 変異体では異常な細胞伸長により突起が形成されるが、これに先立って、突起を取り囲む同心円状の微小管が形成された。この異常な微小管配向は、細胞に負荷される張力に応答して促進された。従って *nek6* 変異体では、細胞の形に沿った局所的な張力に微小管が過剰に応答し、同心円状の表層微小管が形成されやすいことが示された。この異常な微小管配向が、細胞の変形を促進し、これが更に同心円上の微小管配向を強化するという、張力を介した形態と微小管のフィードバックにより突起形成を引き起こすことが明らかになった。

次に器官の伸長を詳細に解析した。*nek6* 変異体の胚軸は異常に屈曲しながら成長し、この屈曲は機械刺激の負荷により顕著に促進された。従って、*nek6* 変異体は器官レベルでもメカニカルストレスに対して過剰に応答すると考えられた。そこで、表皮細胞を一部除去し、除去部位を取り囲むように張力を発生させ、微小管の応答を定量した。その結果、*nek6* 変異体の微小管は張力に過剰に応答することが明らかになった。更に、張力応答が低下したカタニン変異体に *nek6* 変異体を掛け合わせて2重変異体を作成したところ、カタニン変異体の表現型が回復した。以上より、**NEK6** は、細胞や器官の形に沿って発生する局所的な張力に対して、微小管が過剰に応答しないよう抑制し、器官全体の細胞伸長を協調させると考えられる (Takatani et al. in prep.)。

5. ゼニゴケ NIMA 関連キナーゼは仮根の伸長方向を制御する

コケ植物は陸上植物の進化の初期に分岐し、祖先的な形質を保持している (Shimamura 2016, Bowman et al. 2017)。植物の発生進化における **NEK** の機能を明らかにするため、ゼニゴケとヒメツリガネゴケから **NEK** 遺伝子を単離し、それぞれ *MpNEK1*, *PpNEK1* と名付けた。被子植物では3~15個の **NEK** 遺伝子が存在するが、これらのコケ植物では **NEK** 遺伝子が1つだけで、**NEK** の根源的な機能を解明できると考えられる。

ゼニゴケは葉状体と呼ばれる扁平な器官が2又分岐しながら地面に沿って成長するが、地面に接する葉状体裏側（腹側）には仮根細胞が形成される（図7）。仮根細胞は、腹側の表皮細胞が先端成長してフィラメント状に伸長した細胞で、水分や栄養分の吸収、土壌への固着を行っている（図7）。ゼニゴケでは平滑仮根と有紋仮根という2種類の仮根が形成される。平滑仮根は生細

胞であり、植物体から放射状に伸びて、土壌への固着と水分・養分の吸収を行う。有紋仮根は特徴的な2次壁肥厚を持つ死細胞であり、その大部分は葉状体に沿って伸長し、仮根束を形成する。また、生殖枝の柄の内部には有紋仮根からなる仮根束が形成され、水分や養分の輸送、精子の移動に寄与する。

ゼニゴケゲノムには *NEK* 遺伝子が1つだけコードされている（ゼニゴケの学名 *Marchantia polymorpha* を付けて *MpNEK1* と呼ぶ）。*MpNEK1* の機能を明らかにするため、相同組み替えにより *Mpnek1* 破壊株を作出した。*Mpnek1* 破壊株では、仮根細胞の成長方向が異常になり、ジグザグやらせん状の形態を示した（図8, Otani et al. 2018）。

Mpnek1 破壊株に *MpNEK1*-Citrine を導入すると表現型が回復し、仮根が一定の方向に伸長した。この株において *MpNEK1*-Citrine の局在を観察したところ、*MpNEK1*-Citrine は先端成長を行っている仮根先端部に局在し、顆粒状や繊維状のパターンを示した（図9）。また、*MpNEK1* は先端部に収束する微小管上に局在していた（図9）。興味深いことに、微小管の交差部位に顆粒状に局在する *MpNEK1* が観察され、この顆粒が融合や分離を繰り返していた。以上のことから、*MpNEK1* は仮根先端部の微小管に局在し、仮根の伸長方向を制御すると考えられる。

MpNEK1 による微小管の制御機構を明らかにするため、野生株と *Mpnek1* 破壊株の微小管構造を観察した。野生株の仮根先端部では、細かい微小管が多く、細胞質に遊離したチューブリンの濃度も高い。一方、基部側では微小管が太く束化しており、細胞質の遊離チューブリンは少ない。このことは、仮根先端部において微小管が不安定化していること、チューブリンの重合・脱重合の

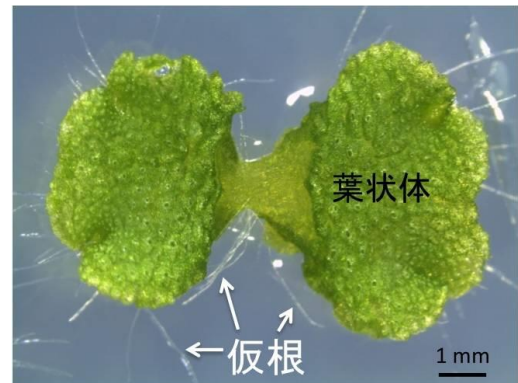


図7. ゼニゴケ幼植物体. 2週間程度、寒天培地上で生育したゼニゴケ. 扁平な葉状体が分岐しながら成長する. 葉状体の裏側から平滑仮根が放射状に伸び出している.

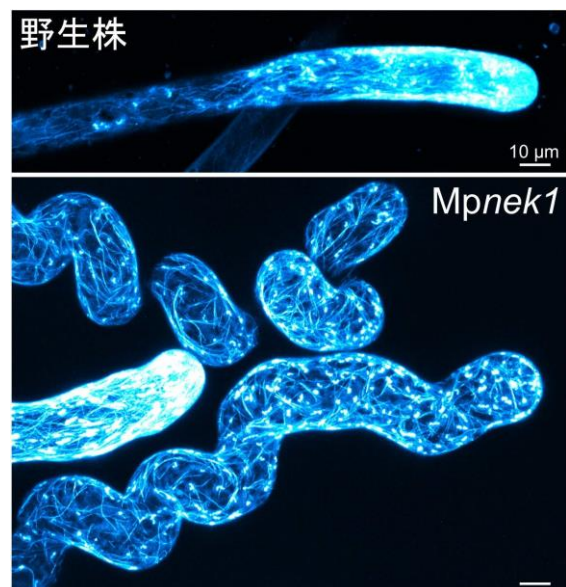


図8. ゼニゴケ野生株のまっすぐ伸長した仮根（上）と *Mpnek1* 破壊株のねじれた仮根（下）.

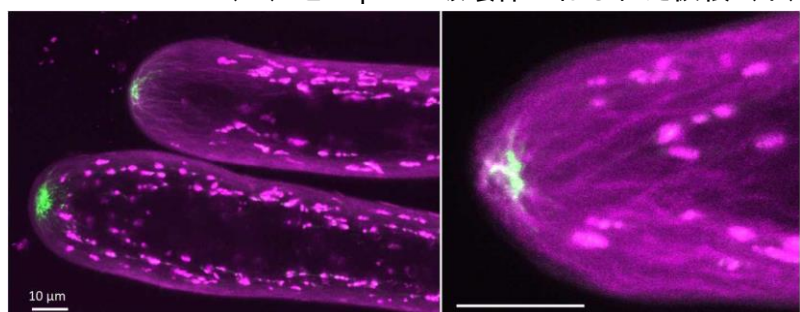


図9. *MpNEK1* の仮根先端部への局在. 緑と白: *MpNEK1*-Citrine, マゼンタ: 微小管 (繊維状) と色素体 (塊状)

ターンオーバーが高いことを示唆している。一方、*Mpnek1* 破壊株では束化した微小管が仮根先端部まで伸びており、細胞質の遊離チューブリン濃度は低下していた (図 8)。従って、*MpNEK1* は仮根先端部において微小管を不安定化し、微小管の再編成やターンオーバーを促進していると考えられる (図 10)。

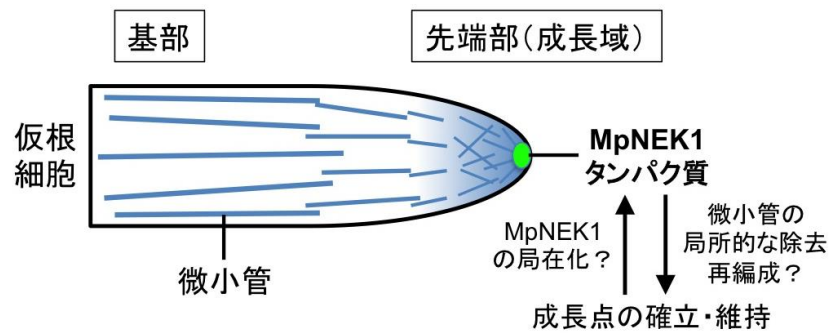


図 10. 仮根細胞の先端成長のモデル

MpNEK1 タンパク質 (緑) は先端成長を行っている頂端部に局在し、微小管 (青) を局所的に再編成し、その構造を制御する。これにより成長点が確立・維持され、仮根細胞が真っすぐ伸長する。一方、微小管束と成長点の確立により、先端への *MpNEK1* 局在が促され、成長点が安定化されると考えられる (*MpNEK1* と微小管・成長点のフィードバック)。

微小管の機能を明らかにするため、微小管阻害剤の効果を検討した。微小管安定化剤のタキソールを添加すると、仮根の伸長方向が異常になり、波打った仮根や曲がって渦を巻いたような仮根が形成された。微小管脱重合剤のプロピザミドを添加すると、同様に波打った仮根が形成されたが、伸長自体の抑制が顕著であり、枝分かれした仮根も見られた。従って、微小管の重合・脱重合 (作って壊す) というサイクルが、仮根細胞の伸長方向を決定し、安定化すると考えられる (図 10)。

シロイヌナズナ *nek6* 変異体においてゼニゴケ *MpNEK1* を発現させると、*nek6* 変異体の伸長方向異常が回復した。更に、シロイヌナズナ *NEK6* と同様に、ゼニゴケ *MpNEK1* は *in vitro* で β -チューブリンをリン酸化した。これらのことから、*NEK* による伸長方向制御は進化的に保存されており、初期の陸上植物の根系である仮根の形成に必要であったと考えられる (Otani et al. 2018)。

6. *NEK* とアルマジロリピート型キネシン *ARK* の相互作用

シロイヌナズナの *NEK6* はアルマジロリピート型キネシン (Armadillo-repeat kinesin, *ARK*) と相互作用して機能することが示唆された (Sakai et al. 2008)。キネシンは微小管上を移動するモータータンパク質で、細胞の分裂や伸長、微小管構造の制御、小胞輸送、オルガネラの移動などに関与する。*ARK* は植物固有のキネシンで、アルマジロリピートドメインというタンパク間相互作用に関わる特徴的な配列を持つ。シロイヌナズナのゲノムには3つの *ARK* 遺伝子 (*ARK1-3*) が存在する。*ARK1* は根毛の先端成長に必要であり、根毛が短く枝分かれする変異体の原因遺伝子として見出された (Jones et al. 2006, Sakai et al. 2008)。*ARK2* は根の伸長方向の制御に関与する (Sakai et al. 2008)。*ARK3* は前期前微小管束に局在し、孔辺母細胞を形成するメリステモイドの非対称分裂に必要である (Lau et al. 2014)。これまでの研究から、*ARK1* が根毛において微小管の

構造や動態を制御することが示された。*ark1* 変異体では、根毛の中央部に束化した細胞質微小管が蓄積する。また、ARK1 は微小管の伸長末端に局在しており、微小管のカタストロフ（伸長から退縮への切り替え）を促進すると考えられる（Eng & Wasteney 2014）。*ark1* 変異体では微小管のカタストロフと微小管の伸長速度の双方が低下するが、これは、微小管の脱重合が抑制された結果、再重合可能な遊離チューブリンの濃度が減少するためであると解釈された（Eng & Wasteney 2014）。つまり、ARK1 はカタストロフを促進して遊離チューブリンを供給し、微小管伸長を促進する役割があると考えられる。

ARK1 はプルダウン法や酵母2ハイブリッド法において NEK6 と相互作用することが示されているが、細胞内での相互作用やその機能はわかっていない（Sakai et al. 2008）。驚くべきことに、NEK6 との相互作用に必要なアルマジロリピートを欠失した *ARK1 Δ ARM* は細胞内で正常に機能しており、微小管の伸長末端に局在して *ark1* 変異体の表現型を相補できる（Eng et al. 2017）。また、*nek6* 変異体において、ARK1 は微小管に局在して正常に機能し、*ark1 ark2 ark3* 三重変異体においても NEK6 は微小管に局在した。これらのことから、シロイヌナズナ植物体、特に根毛では ARK1 と NEK6 は独立に機能すると考えられる（Eng et al. 2017）。

一方、ゼニゴケでは ARK と NEK が機能的に相互作用していることを示唆する結果が得られており、シロイヌナズナでは進化の過程で機能連関が失われてしまったのかもしれない。また、シロイヌナズナの ARK と NEK は遺伝子ファミリーを形成しており、その相互関係がより複雑な可能性も考えられる。今後は、コケ植物とシロイヌナズナにおける詳細な解析と比較により、機能的な関係が明らかになることが期待される。

ちなみに、ヒメツリガネゴケの原糸体頂端細胞では、分裂後に核が微小管依存的に先端方向に移動するが、この核の移動に ARK が必要であることが示された（Miki et al. 2015）。実際に、ヒメツリガネゴケ ARK は微小管のプラス端方向に移動するキネシンモーター活性があり、これにより核を移動させると考えられる。シロイヌナズナやゼニゴケの ARK も核などの輸送を介して極性成長に関わる可能性がある。

7. NEK の細胞伸長以外の機能

上記の研究から、植物 NEK の主要な機能は細胞の伸長方向制御であることが示された。一方で、NEK が細胞増殖や器官成長、環境応答などを制御することが示唆されている。キンギョソウの NEK である *AmnimA* の mRNA は茎頂分裂組織や花芽分裂組織の全体で発現が高いが、細胞周期の特定の時期で発現しているのではなく、分裂活性と関連していることが示唆された（Zhang et al. 1996）。トマト NEK の SPAK は花序形態を制御する SP タンパク（シロイヌナズナ花成制御因子 TFL1 のオルソログ）や 14-3-3 タンパクと相互作用する（Pnueli et al. 2001）。*AmnimA* と同様に SPAK の mRNA も細胞周期非依存的に分裂組織や花芽、維管束で発現していた。SPAK のアンチセンス鎖を過剰発現すると花序形態が異常になり、果実が細長くなる（Pnueli et al. 2001）。

これらのことから SPAK はシュートや花・果実の形成に関与すると考えられる。

ポプラ PNek1 は 14-3-3 タンパクと結合する因子として同定された。PNek1 mRNA は上記の *AmnimA* や SPAK と異なり、G1/S 移行期、G2 から M 期にかけて発現する (Cloutier et al. 2005)。シロイヌナズナで PNek1 を過剰発現すると様々な形態異常をもたらすことから、細胞増殖と器官形成に関わることが示唆された。シロイヌナズナにおいて PNek1 のプロモーター活性を調べると、維管束組織で発現が高く、引っぱりあて材の形成層で活性が増加することから、維管束の増殖に関わることが示唆された (Vigneault et al. 2007)。

シロイヌナズナ AtNEK2 の T-DNA 挿入変異体の 1 つは変異をホモに持つ個体が得られないことから、胚致死であると考えられる (Agucci et al. 2011)。AtNEK2 の RNAi 株では成長が遅延し、器官成長や花成が抑制され、葉の柵状組織・スポンジ組織の欠損を示すことから、AtNEK2 が生存と発生に必要であることが示唆された。以上の研究では、NEK と他のタンパクとの相互作用を植物細胞内で見えていないこと、過剰発現やノックダウン株の解析がメインで、変異体やその相補株による詳細な解析がなされていないなどの問題があるが、植物の NEK が形態形成に関わると考えられる。シロイヌナズナの NEK も分裂組織や維管束で発現が高いが、それらの組織での機能は分かっておらず、今後の課題である。

シロイヌナズナ *nek6* 変異体、NEK6 過剰発現体の解析から、NEK6 がストレス応答やアブシジン酸応答に関与することが示唆された (Lee et al. 2010, Zhang et al. 2011)。双方の研究では、変異体と過剰発現体の表現型が逆になっており、今後検討が必要である。ダイズ *GmNEK* はストレスに応答して発現が増加し、*GmNEK* の過剰発現により遺伝子発現が変化し、植物の成長やストレス耐性が増大する (Pan et al. 2017)。また、イネの OsNEK6 は、乾燥ストレス応答を抑制する E3 リガーゼ OsDIS1 によりプロテアソーム依存的に分解される (Ning et al. 2011)。我々の研究では、*nek6* 変異体のストレス応答・アブシジン酸応答の表現型は微弱であり、エチレン関連遺伝子・サイクリン遺伝子の発現量も野生株と比較して差がみられない。しかし、*nek6* 変異体では特異的な遺伝子の発現変動が見られること、*nek* 多重変異体ではストレス耐性がやや低下することから、環境応答の主要因子ではないが、それを何らかの形でサポートする機能があると考えられる (本瀬, 金澤, 伊藤ら 論文準備中)。様々なストレスに応答して、表層微小管の配向変化や脱重合・再重合が起こることが知られており、これらの微小管の応答に NEK が関与する可能性もある。

ちなみに、シロイヌナズナ野生株にアブシジン酸を添加すると微小管が脱重合し、*nek6* 変異体と似た突起が形成される (Takatani et al. 2015b)。*nek6* 変異体では微小管が安定化することで突起が形成されるので、アブシジン酸の効果と逆であるが、微小管の安定性・不安定性のバランスが細胞伸長において重要であることを反映している。また、*nek6* 変異体の突起形成はエチレン前駆体の ACC を添加することで促進され、ジベレリン添加により抑制されることから (Motosé et al. 2008)、NEK6 は植物ホルモンによる微小管制御と関連して機能すると考えられる。

8. NEK と植物の進化

先述したように、NEK は生物種によって多様化や退縮を起こしており、機能や必要性も異なっている。系統解析から NEK は5つのグループに分けられ、ヒト HsNEK の番号を元に HsNEK1/3/5, NEK2, NEK4/11, NEK6/7, NEK8/9 クレドと呼ばれる。真核生物の共通祖先はこれら5つの NEK を持っていたこと、進化の過程で生物種特異的に各グループの多様化や退縮が起こっていることが示唆された (Parker et al. 2007)。

系統樹解析から、植物 NEK は藻類型 (CNK ファミリー) と陸上型の2つに大別される (Takatani et al. 2015a, 図 1 1)。藻類型 NEK は上記5つの NEK のうち、HsNEK2 ファミリーを除く4つに属しており、鞭毛を持つクラミドモナスやボルボックスなどの緑藻類では NEK が多様化している (Parker et al. 2007)。また、陸上植物に近縁な車軸藻類の NEK は、陸上型 NEK の系統樹の基部に位置しており、祖先型の NEK であると考えられる。

一方、陸上型 NEK は全て HsNEK11 クレドに属している。陸上型 NEK はシロイヌナズナ AtNEK の番号を元に AtNEK1-4, AtNEK5/7, AtNEK6 ファミリーの3つに分けられる (Takatani et al. 2015a)。コケ植物の NEK は基本的に1つであり、AtNEK6 ファミリーに属している。基部維管束植物・小葉類のイヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) は NEK 遺伝子を3つ持ち、これらは全て AtNEK6 ファミリーに属している。一方、基部被子植物のアンボレラ (*Amborella trichopoda*) は3つの NEK 遺伝子を持ち、それぞれ AtNEK1-4, AtNEK5/7, AtNEK6 ファミリーの3つに属している。これらのことから、陸上植物の NEK は AtNEK6 ファミリーに似た単一の遺伝子から次第に多様化していったと考えられる。

NEK が必須遺伝子なのは今のところ糸状菌だけであり、NEK 遺伝子を1つしかもたない酵母やコケ植物においても必須ではない。酵母やコケ植物では別なキナーゼが NEK の代わりに機能する可能性もある。しかし、糸状菌では細胞周期の進行と共に細胞が伸長し、多核化 (細胞質分裂を伴わない核の分裂) が起こる必要があり、これらの過程を協調させるために NEK が必須であるのかもしれない。実際に、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の NimA は間期においても機能し、微小管を介して菌糸の先端成長を制御している (Govindaraghavan et al. 2014)。nimA 変異体では細胞伸長が欠損するため、核の分裂に十分なスペースが確保できず、細胞周期が停止してしまう可能性がある。また、細胞が小さくて鞭毛を持たず、極性のある伸長・分裂を行わない微細藻類 *Ostreococcus tauri*, 原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* は NEK 遺伝子を欠失していることを合わせて考えると、NEK の根源的な機能は極性成長や微小管制御 (表層微小管の配向制御, 中心体—基底小体サイクル) であるのかもしれない。

9. まとめと今後の課題

植物の NIMA 関連キナーゼの解析から、微小管の脱重合、特にターンオーバー (重合・脱重合のサイクル) が細胞の伸長極性に重要であることが浮き彫りになってきた。植物細胞は伸長しな

がら、自身の形の変化や器官全体の形にตอบสนองして、微小管の構造をダイナミックに変化させる必要がある。このような形態形成に伴う微小管のターンオーバー・配向変化を制御する個々のタンパク質の機能解析が今後も重要である。また、個々の因子の機能を統合したモデルの構築や細胞と器官全体を協調させるメカニズムの解明を期待したい。

このように形態形成における微小管の制御機構, NEK の役割についてはまだわからないことが山積みになっている。NEK については、チューブリンのリン酸化が生体内のいつどこで起こっているのか、その機能は何かを明らかにしたい。また、NEK を制御する上流因子、チューブリン以外の基質や下流因子、他の微小管付随タンパク質との関係を明確にしたい。更に、先端成長における NEK と微小管の役割を調べることで、新たな極性成長のメカニズムが明らかになることが期待される。

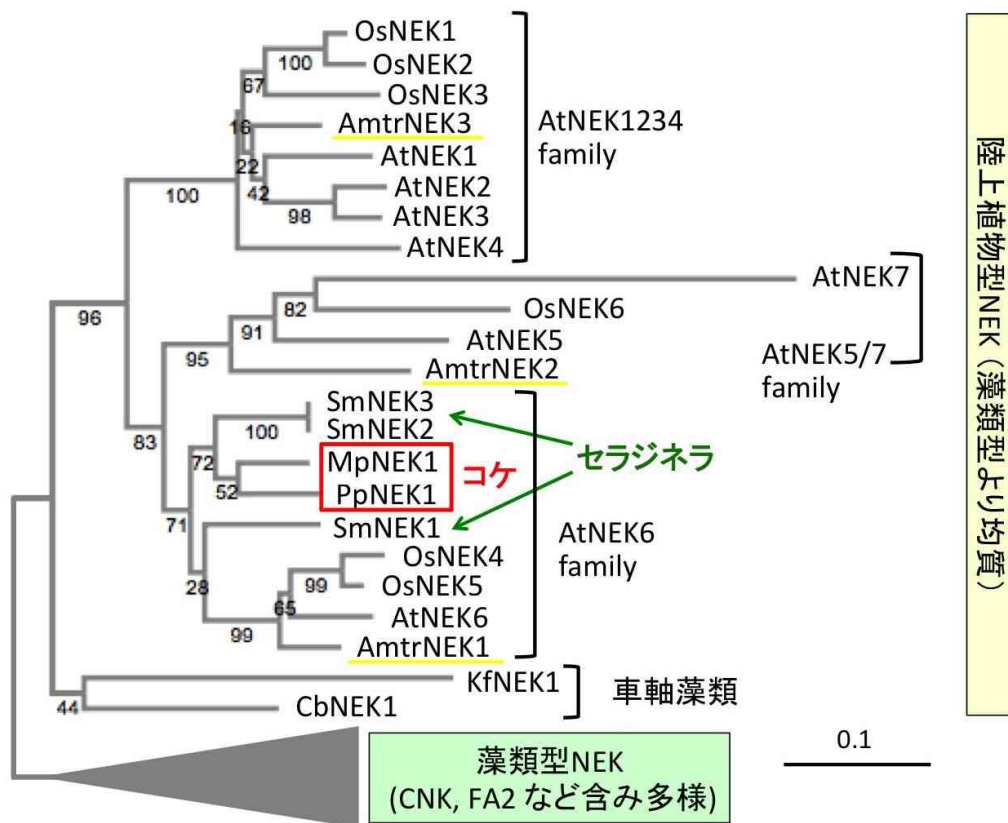


図 1 1. 植物 NEK の系統樹. 保存性の高いキナーゼドメインを用いて作成 (NJ 法, Bootstrap 確率 1000x). ゼニゴケとヒメツリガネゴケ NEK を赤のボックスで、基部被子植物アンボレラの NEK を黄色の下線で示した. Amtr: *Amborella trichopoda*, At: *Arabidopsis thaliana*, Cb: *Chara braunii*, Kf: *Klebsormidium flaccidum*, Mp: *Marchantia polymorpha*, Os: *Oryza sativa*, Pp: *Physcomitrella patens*, Sm: *Selaginella moellendorffii*. CNK・FA2: *Chlamydomonas reinhardtii* の NEK. 藻類型 NEK (主に緑藻類の NEK) については紙面の都合上省略した (灰色の三角形).

先端成長ではアクチン繊維が普遍的に重要であり、その機能がこれまで良く研究されてきた。微小管については、拡散成長における表層微小管の制御や機能が詳しく解析されてきたが、先端

成長における役割は明確ではない。最近、ライブイメージングに適したヒメツリガネゴケの原糸体において研究が進展しており、キネシンによる原糸体先端の微小管束の形成 (Hiwatashi et al. 2014) , キネシンによる核の移動 (Yamada et al. 2017, Yamada & Goshima 2018) , アクチン繊維と微小管の相互作用 (Wu & Bezanilla 2018) など、先端成長の重要なメカニズムが明らかになりつつある。私たちは、ゼニゴケのライブイメージングを確立し、仮根細胞をモデル系として先端成長を解析している。仮根細胞と他の先端成長を行う細胞を比較することで、普遍的なメカニズムや多様性、極性成長の進化が明らかになると考えられる。

謝辞

本稿で紹介した研究は、日本学術振興会 (JSPS) の科学研究費補助金 (基盤研究 C・16K07403) , 文部科学省の新学術領域研究「植物環境突破力」(23119513, 25119715) , 「植物発生ロジック」(25113009, 16H01245) , JSPS 特別研究員 (DC2・16J03501) , 両備てい園記念財団, ノバルティス科学財団, 中原教育研究基金 (岡山大・理・生物) の助成を受け実施しました。車軸藻 CbNEK1 の配列情報をいただいた坂山英俊先生 (神戸大)・西山智明先生 (金沢大) に感謝申し上げます。また、共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- Agueci, F., Rutten, T., Demidov, D., & Houben, A. 2011. *Arabidopsis* AtNek2 kinase is essential and associates with microtubules. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30: 339-348.
- Ambrose, J. C., & Wasteneys, G. O. 2008. CLASP modulates microtubule-cortex interaction during self-organization of acentrosomal microtubules. *Mol. Biol. Cell* 19: 4730-4737.
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., et al. 2017. Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell* 171: 287-304.
- Bradley, B. A., & Quarmby, L. M. 2005. A NIMA-related kinase, Cnk2p, regulates both flagellar length and cell size in *Chlamydomonas*. *J. Cell Sci.* 118: 3317-3326.
- Cloutier, M., Vigneault, F., Lachance, D., & Séguin, A. 2005. Characterization of a poplar NIMA-related kinase PNeK1 and its potential role in meristematic activity. *FEBS Lett.* 579: 4659-4665.
- Dettmer, J., & Friml, J. 2011. Cell polarity in plants: when two do the same, it is not the same.... *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 686-696.
- Eng, R. C., & Wasteneys, G. O. 2014. The microtubule plus-end tracking protein ARMADILLO-REPEAT KINESIN1 promotes microtubule catastrophe in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 3372-3386.
- Eng, R. C., Halat, L. S., Livingston, S. J., Sakai, T., Motose, H., & Wasteneys, G. O. 2017. The ARM domain of ARMADILLO-REPEAT KINESIN 1 is not required for microtubule catastrophe but can negatively regulate NIMA-RELATED KINASE 6 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 58: 1350-1363.
- Hiwatashi, Y., Sato, Y. & Doonan, J. H. 2014. Kinesins have a dual function in organizing microtubules during both tip growth and cytokinesis in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 26: 1256-1266.
- Lau, O. S., Davies, K. A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M. H., Ballenger, C. E., & Bergmann, D. C. 2014. Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science* 345: 1605-1609.

- Miki, T., Nishina, M. & Goshima, G. 2015. RNAi screening identifies the armadillo repeat-containing kinesins responsible for microtubule-dependent nuclear positioning in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 56: 737-749.
- Finst, R. J., Kim, P. J., & Quarmby, L. M. 1998. Genetics of the deflagellation pathway in *Chlamydomonas*. *Genetics* 149: 927-936.
- Fry, A. M., O'Regan, L., Sabir, S. R., & Bayliss, R. 2012. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J. Cell Sci.* 125: 1-11.
- Govindaraghavan, M., Anglin, S. L. M., Shen, K. F., Shukla, N., De Souza, C. P., & Osmani, S. A. 2014. Identification of interphase functions for the NIMA kinase involving microtubules and the ESCRT pathway. *PLoS Genet.* 10: e1004248.
- 濱田隆宏 2018. MAPs プロテオームから見出された表層微小管-オルガネラ相互作用. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 9C6: 155-168.
- Hamant, O., Heisler, M. G., Jönsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlin, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E. M., Couder, Y., & Traas, J. 2008. Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. *Science* 322: 1650-1655.
- Hashimoto, T. 2015. Microtubules in plants. *Arabidopsis Book* 13: e0179.
- Heisler, M. G., Hamant, O., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Ohno, C., Jönsson, H., Traas, J., & Meyerowitz, E. M. 2010. Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLoS Biol.* 8: e1000516.
- Hervieux, N., Dumond, M., Sapala, A., Routier-Kierzkowska, A. L., Kierzkowski, D., Roeder, A. H., Smith, R. S., Boudaoud, A., & Hamant, O. 2016. A mechanical feedback restricts sepal growth and shape in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 26: 1019-1028.
- Hervieux, N., Tsugawa, S., Fruleux, A., Dumond, M., Routier-Kierzkowska, A. L., Komatsuzaki, T., Boudaoud, A., Larkin, J. C., Smith, R. S., Li, C. B., & Hamant, O. 2017. Mechanical shielding of rapidly growing cells buffers growth heterogeneity and contributes to organ shape reproducibility. *Curr. Biol.* 27: 3468-3479.
- Jones, M. A., Raymond, M. J. & Smirnov, N. 2006. Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 45: 83-100.
- Lee, S. J., Cho, D. I., Kang, J. Y., Kim, M. D., & Kim, S. Y. 2010. AtNEK6 interacts with ARIA and is involved in ABA response during seed germination. *Mol. & Cells* 29: 559-566.
- Louveaux, M., Julien, J. D., Mirabet, V., Boudaoud, A., & Hamant, O. 2016. Cell division plane orientation based on tensile stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113: E4294-E4303.
- Mahjoub, M. R., Montpetit, B., Zhao, L., Finst, R. J., Goh, B., Kim, A. C., & Quarmby, L. M. 2002. The *FA2* gene of *Chlamydomonas* encodes a NIMA family kinase with roles in cell cycle progression and microtubule severing during deflagellation. *J. Cell Sci.* 115: 1759-1768.
- Motose, H., Tominaga, R., Wada, T., Sugiyama, M., & Watanabe, Y. 2008. A NIMA-related protein kinase suppresses ectopic outgrowth of epidermal cells through its kinase activity and the association with microtubules. *Plant J.* 58: 829-844.
- Motose, H., Hamada, T., Yoshimoto, K., Murata, T., Hasebe, M., Watanabe, Y., Hashimoto, T., Sakai, T., & Takahashi, T. 2011. NIMA-related kinases 6, 4, and 5 interact with each other to regulate microtubule organization during epidermal cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 67: 993-1005.

- Motose, H., Takatani, S., Ikeda, T., & Takahashi, T. 2012. NIMA-related kinases regulate directional cell growth and organ development through microtubule function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 7: 1552-1555.
- 村田隆 2018. 表層微小管「列」: 自己組織化する繊維. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 9C2: 111-119.
- 中村匡良 & 八木慎宜 2018. 青色光に応答した微小管ダイナミクス. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 9C3: 120-129.
- Ning, Y., Jantasuriyarat, C., Zhao, Q., Zhang, H., Chen, S., Liu, J., Liu, L., Tang, S., Park, C. H., Wang, X., Liu, X., Dai, L., Xie, Q., & Wang, G. L. 2011. The SINA E3 ligase OsDIS1 negatively regulates drought response in rice. *Plant Physiol.* 157: 242-255.
- O'Connell, M. J., Krien, M. J. E., & Hunter, T. 2003. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.* 13: 221-228.
- Oda, Y. 2018. Emerging roles of cortical microtubule-membrane interactions. *J. Plant Res.* 131: 5-14.
- Osmani, S. A., Pu, R. T., & Morris, N. R. 1988. Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* 53: 237-244.
- Otani, K., Ishizaki, K., Nishihama, R., Takatani, S., Kohchi, T., Takahashi, T., & Motose, H. 2018. An evolutionarily conserved NIMA-related kinase directs rhizoid tip growth in the basal land plant *Marchantia polymorpha*. *Development* 145: dev.154617 doi: 10.1242/dev.154617.
- Pan, W. J., Tao, J. J., Cheng, T., Shen, M., Ma, J. B., Zhang, W. K., Lin, Q., Ma, B., Chen, S. Y., & Zhang, J. S. 2017. Soybean NIMA-related kinase1 promotes plant growth and improves salt and cold tolerance. *Plant Cell Physiol.* 58: 1268-1278.
- Parker, J. D., Bradley, B. A., Mooers, A. O., & Quarmby, L. M. 2007. Phylogenetic analysis of the Neks reveals early diversification of ciliary-cell cycle kinases. *PLoS One* 2: e1076.
- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N., & Lifschitz, E. 2001. Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* 13: 2687-2702.
- Quarmby, L. M., & Mahjoub, M. R. 2005. Caught Nek-ing: cilia and centrioles. *J. Cell Sci.* 118: 5161-5169.
- Sakai, T., van der Honing, H., Nishioka, M., Uehara, Y., Takahashi, M., Fujisawa, N., Saji, K., Seki, M., Shinozaki, K., Jones, M. A., Smirnov, N., Okada, K., & Wasteneys, G. O. 2008. Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 53: 157-171.
- 佐々木武馬 & 小田祥久 2018. 木部道管細胞の分化を支える表層微小管ダイナミクス. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 9C5: 148-154.
- Shimamura, M. 2016. *Marchantia polymorpha*; taxonomy, phylogeny, and morphology of a model system. *Plant Cell Physiol.* 57: 230-256.
- 嶋村正樹 2018. 陸上植物の中心体と鞭毛. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 9C8: 178-196.
- Siegrist, S. E., & Doe, C. Q. 2007. Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev.* 21: 483-496.
- Takatani, S., Otani, K., Kanazawa, M., Takahashi, T., & Motose, H. 2015a. Structure, function, and evolution of plant NIMA-related kinases: Implication for phosphorylation-dependent microtubule regulation. *J. Plant Res.* 128: 875-891.
- Takatani, S., Hirayama, T., Hashimoto, T., Takahashi, T., & Motose, H. 2015b. Abscisic acid induces ectopic outgrowth in epidermal cells through cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis thaliana*. *Sci.*

Rep. 5: 11364.

- Takatani, S., Ozawa, S., Yagi, N., Hotta, T., Hashimoto, T., Takahashi, Y., Takahashi, T., & Motose, H. 2017. Directional cell expansion requires NIMA-related kinase 6 (NEK6)-mediated cortical microtubule destabilization. *Sci. Rep.* 7: 7826.
- Uyttewaal, M., Burian, A., Alim, K., Landrein, B., Borowska-Wykręt, D., Dedieu, A., Peaucelle, A., Ludynia, M., Traas, J., Boudaoud, A., Kwiatkowska, D., & Hamant, O. 2012. Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis*. *Cell* 149: 439-451.
- Vigneault, F., Lachance, D., Cloutier, M., Pelletier, G., Levasseur, C., & Séguin, A. 2007. Members of the plant NIMA-related kinases are involved in organ development and vascularization in poplar, *Arabidopsis*, and rice. *Plant J.* 51: 575-588.
- Wu, S. Z. & Bezanilla, M. 2018. Actin and microtubule cross talk mediates persistent polarized growth. *J. Cell Biol.* pii: jcb.201802039. doi: 10.1083/jcb.201802039.
- Yamada, M., Tanaka-Takiguchi, Y., Hayashi, M., Nishina, M., & Goshima, G. 2017. Multiple kinesin-14 family members drive microtubule minus end-directed transport in plant cells. *J Cell Biol.* 216: 1705-1714.
- Yamada, M. & Goshima, G. 2018. The KCH kinesin drives nuclear transport and cytoskeletal coalescence to promote tip cell growth in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 30: 1496-1510.
- Zhang, B., Chen, H. W., Mu, R. L., Zhang, W. K., Zhao, M. Y., Wei, W., Wang, F., Yu, H., Lei, G., Zou, H. F., Ma, B., Chen, S. Y., & Zhang, J. S. 2011. NIMA-related kinase NEK6 affects plant growth and stress response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 68: 830-843.
- Zhang, H., Scofield, G., Fobert, P., & Doonan, J. H. 1996. A nimA-like protein kinase transcript is highly expressed in meristems of *Antirrhinum majus*. *J. Microsc.* 181: 186-194.

BOX1. チューブリンの翻訳後修飾 チューブリンはリン酸化を始めとして、チロシン化・脱チロシン化・ポリグルタミン酸化・ポリグリシン化・アセチル化・メチル化・ポリアミン化などの多様な修飾を受けることが知られている (Janke 2014 J Cell Biol. 206: 461-472, Gadadhar et al. 2017 J. Cell Sci. 130: 1347-1353)。チューブリンの翻訳後修飾やアイソタイプの違いにより、異なる性質を持つ微小管が細胞内に生じ、これが微小管付随タンパク質によって読み取られるというチューブリンコード説が提唱された (Verhey & Gaertig 2007 Cell Cycle 6: 2152-2160)。実際に、キネシンの移動がチューブリンの翻訳後修飾により制御されることが実証された (Sirajuddin et al. 2014 Nat. Cell Biol. 16: 335-344)。チューブリンの C 末端の脱チロシン化・チロシン化のサイクルは特に重要であり、チロシン化を触媒するチューブリンチロシンリガーゼ TTL の発見により研究が進展した。最近の研究により、チューブリンの脱チロシン化が筋原繊維の収縮からの回復を制御すること (Robison et al. 2016 Science 352: aaf0659)、チロシン化が卵細胞形成時の非対称分裂を制御すること (Akeru et al. 2017 Science 358: 668-672) が明らかになった。最近、脱チロシン化を行う酵素が同定され、神経細胞の形成を制御することが示された (Aillaud et al. 2017 Science 358: 1448-1453, Nieuwenhuis et al. 2017 Science 358: 1453-1456)。また、チューブリンのアイソタイプによって、微小管の構造や動的不安定性が異なることが報告されている (Ti et al. 2018 Dev. Cell 47: 1-16)。

植物チューブリンの翻訳後修飾はほとんど研究が進んでいないが、培養細胞から単離・精製されたチューブリンは翻訳後修飾をあまり受けておらず、アセチル化のみが確認され、チロシン化・脱チロシン化は起こっていないと考えられる (Hotta et al. 2016 Plant Physiol. 170: 1189-1205)。TTL と配列が似ている遺伝子が植物にも存在するが、変異体は顕著な表現型を示さず、その機能は不明である。一方、分子量がシフトしたチューブリンが検出されており、動物細胞とは異なる修飾を受けている可能性がある。修飾を受けやすい C 末端配列は、植物のチューブリンでも保存されており、今後の解析に期待したい。

植物チューブリンのリン酸化の機能についてはわかっていなかったが、近年の解析からその一端が明らかになった。植物細胞が高浸透圧や塩ストレスにさらされると、微小管が一過的に脱重合して減少し、細胞成長が一旦停止する。この一過的な微小管脱重合は PHS1 タンパク質による α -チューブリンのリン酸化によって引き起こされる (Fujita et al. 2013 Curr. Biol. 23: 1969-1970, Ban et al. 2013 Plant Cell Physiol. 54: 848-858)。PHS1 は MAP キナーゼフォスファターゼドメインと、非典型的なキナーゼドメインを持つハイブリッド型のタンパク質で、高浸透圧ストレスによってキナーゼが活性化して α -チューブリンの Thr-359 をリン酸化する。Thr-359 がリン酸化されるとチューブリンの微小管への重合が抑制され、微小管が脱重合する。動物細胞では M 期に微小管が脱重合するが、この時、CDK が β -チューブリンの Thr-172 をリン酸化して微小管への重合を抑制すると考えられる (Fourest-Lieuvain et al. 2006 Mol Biol Cell 17: 1041-1050)。また、動物や酵母では γ -チューブリンのリン酸化が中心体の分離や紡錘体形成に関与することが報告されている (詳しくは Takatani et al. 2015a の reference を参照)。

木部道管細胞の分化を支える表層微小管ダイナミクス

佐々木武馬¹, 小田祥久^{1,2}

¹ 国立遺伝学研究所 新分野創造センター

² 総合研究大学院大学 生命科学研究科 遺伝学専攻

〒411-8540 静岡県三島市谷田1-1-1

Takema Sasaki¹, Yoshihisa Oda^{1,2}

Cortical microtubule dynamics during xylem vessel cell differentiation

Keywords: MAPs, Microtubule, Secondary cell wall, Tracheary element, Xylem vessel

¹Center for Frontier Research, National Institute of Genetics

²Department of Genetics, School of Life Science, SOKENDAI (Graduate University for Advanced Studies) 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540

DOI: 10.24480/bsj-review.9c5.00144

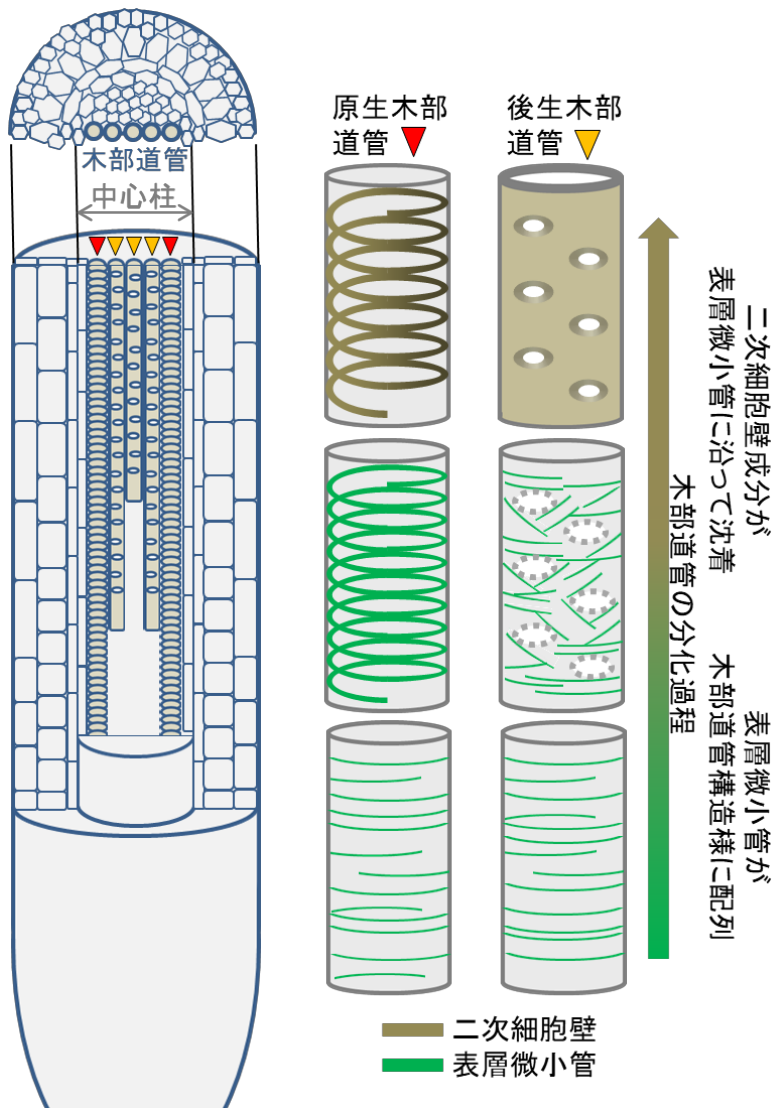
1. はじめに

植物細胞は葉や根、気孔等、器官や組織の役割に合わせ多様な形に成長する。植物細胞の形を生み出す要因として表層微小管が挙げられる。微小管は真核生物に保存された細胞骨格の一つであり、 α チューブリンと β チューブリンが結合したチューブリンダイマーが管状に重合することにより作られる。表層微小管は細胞膜内側にアンカーされた微小管の一群であり、表層微小管に沿って細胞壁成分が沈着する。この細胞壁成分が「たが」となり、細胞が異方的に伸長することにより細胞の形が生み出される。表層微小管の並びは細胞分化過程において適切な配向へと柔軟に変化する。これまでに表層微小管の配向を制御する多くの微小管付随タンパク質が同定されてきた。これらの微小管付随タンパク質は、表層微小管の重合・脱重合・枝分かれや束化等を制御することにより、表層微小管の配向を決定している。本稿ではシロイヌナズナの木部道管細胞を例にとり、特徴的な二次細胞壁の沈着パターンを誘導する表層微小管の形成機構について、微小管付随タンパク質に着目して紹介する。

2. シロイヌナズナの根における木部道管の形成

維管束組織の構成要素の一つである木部道管は植物全身に張り巡らされており、根から吸収した水分や養分を全身に供給する。木部細胞はセルロース、セミヘルロース、リグニンを主な構成成分とする厚い二次細胞壁を沈着した後、プログラム細胞死により細胞内を消化し、中空の管状要素となる。この管状要素が縦に連なることにより長い管状の道管を作り上げている。木部道管は原生木部道管と後生木部道管の2種類に分類される。原生木部道管では環状やらせん状のパターンに、後生木部道管では壁孔を伴った孔紋状のパターンに二次細胞壁が沈着する。シロイヌナズナの根端では内皮に囲まれた中心柱において2列の原生木部細胞

の分化が始まる。続けて原生木部の間の3列において後生木部細胞の分化が始まり、合わせて5列の木部道管が形成される（図1左）。



原生木部細胞の分化過程において表層微小管は顕著に束化し、環状やらせん状に配向する。この表層微小管の束に沿って二次細胞壁が沈着することにより環状およびらせん状の二次細胞壁パターンが形成される。一方、後生木部細胞では表層微小管が将来壁孔になる領域を避けるように配向し、この表層微小管の配向に従って二次細胞壁が沈着することにより、孔紋状の二次細胞壁パターンが形成される（図1右）。この様に、原生木部道管と後生木部道管のどちらにおいても表層微小管が二次細胞壁の沈着パターンを決定する上で重要なはたらきを担う。このような表層微小管の配向は、複数の微小管付随タンパク質により制御されていることが明らかとなってきた。

図1 シロイヌナズナの根における木部道管の形成

（左）シロイヌナズナの根組織，（右）原生木部道管細胞（赤いやじり）と後生木部道管細胞（黄いやじり）の分化過程。表層微小管に沿って二次細胞壁が沈着する。

3. 二次細胞壁パターンを制御する微小管付随タンパク質

木部道管細胞において表層微小管の配向を制御する因子は、主にシロイヌナズナの培養細胞を利用した研究により同定されてきた。Pesquetらは木部道管分化を誘導する細胞培養系を用いて微小管付随タンパク質の遺伝子発現を網羅的に調べ、微小管付随タンパク質MAP70-5が木部道管分化において顕著に発現することを報告した (Pesquet et al., 2010)。Pesquetらの培養系ではらせん状、網状、孔紋状などの二次細胞壁パターンが形成される。MAP70-5の過剰発現株ではそれらのパターンの内、らせん状の二次細胞壁を形成する細胞の割合が上昇し、孔紋状の二次細胞壁を形成する細胞は減少した。一方、RNAiによるMAP70-5の発現抑制株

ではらせん状の二次細胞壁を形成する細胞の割合が減少し、孔紋状の二次細胞壁を形成する細胞の割合が上昇した。また、MAP70-5 が二次細胞壁の辺縁部に顕著に局在した。これらのことから、MAP70-5 は二次細胞壁の境界に位置する微小管を安定化させることにより、二次細胞壁パターンのタイプを制御していると考えられた (Pesquet et al., 2010)。その後、Derbyshireらは同培養系を用いて微小管付随タンパク質のプロテオーム解析を行い、木部道管細胞から複数の微小管付随タンパク質を単離した (Derbyshire et al., 2015)。これらの過剰発現や発現抑制により MAP65-1 や AIR9 が木部道管の二次細胞壁パターンの制御に関わっていることが示唆された。しかしながらこれらの知見は *in vitro* の培養系に限られており、植物個体内の原生木部道管、あるいは後生木部道管におけるこれらのタンパク質の詳細な機能は明らかになっていない。今後、植物体を用いたさらなる解析が望まれる。

4. 後生木部道管の二次細胞壁パターンを制御する微小管付随タンパク質

一方、筆者らの研究グループは後生木部道管分化において特異的にはたらく複数の微小管付随タンパク質を同定し、その機能を明らかにした。筆者らは後生木部道管分化のマスター転写因子 VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 6 (VND6) をシロイヌナズナの培養細胞に発現させることにより、後生木部道管の分化を高頻度同調的に誘導する実験系を確立した (Oda et al. 2010)。この実験系を用いて解析を進めた結果、植物特異的な Rho GTPase ファミリーに属する ROP GTPase が微小管付随タンパク質を制御することにより、孔紋状の二次細胞壁パターンが構築されることを突き止めた (Oda and Fukuda, 2012)。ROP GTPase は guanine nucleotide exchange factor である ROPGEF のはたらきにより活性化し、逆に GTPase activating protein である ROPGAP のはたらきにより不活性化する。後生木部細胞では ROPGEF4 と ROPGAP3 のはたらきにより ROP11 が局所的に活性化し、周期的に ROP11 が活性化した領域（活性化 ROP11 ドメイン）が作られる（図 2）。活性化した ROP11 は微小管付随タンパク質である MIDD1 (MICROTUBULE DEPLETION DOMAIN1) を介して Kinesin-13A を活性化

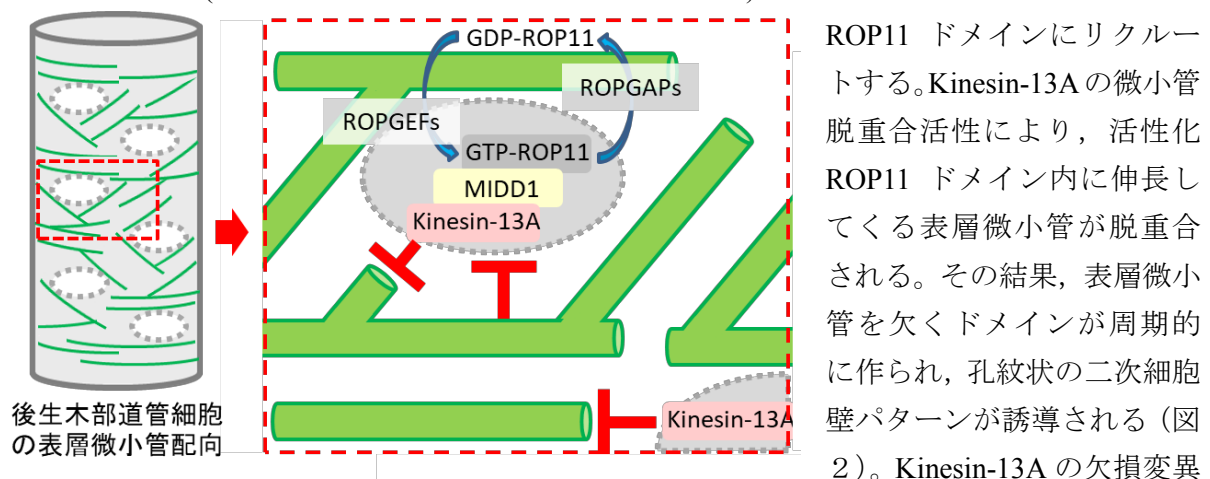


図 2 後木部道管細胞において表層微小管の配向パターンを作り出す分子機構（左）後生木部細胞の分化初期における表層微小管配向パターン。灰色の点線内の領域は微小管が失われ壁孔となる。（右）左図の赤点線内の拡大図。壁孔を形成する領域における表層微小管の配向制御機構を示す。

体では壁孔が小さくなったことから、この一連のシグナルが後生木部道管の二次細胞壁パターン形成にはたらいていることが証明された (Oda and Fukuda, 2013)。

今後の研究においては、規則的かつ細胞自律的に形成される活性化 ROP11 ドメインパターンの形成機構の解明が待たれる。これまでに筆者らの研究グループは数理解析を取り入れた試みにより ROP11 のドメインパターンが反応拡散系と類似した仕組みにより自発的に形成され得るという知見を得ている (Nagashima et al., 2018)。これに関しては別の機会に詳しく紹介したい。

最近になり筆者らの研究グループは後生木部道管の二次細胞壁パターンに関わる 2 種の微小管付随タンパク質を報告した。1 報目では植物特異的な微小管付随タンパク質である IQD13 (IQ67-DOMAIN13) が壁孔の形態を制御することを報告した (Sugiyama et al., 2017)。IQD13 の欠損変異体および RNAi による発現抑制体では野生型より大きい壁孔が形成され、IQD13 の過剰発現体では野生型よりも細長い壁孔が形成された。IQD13 は微小管結合ドメインに加え細胞膜結合ドメインを持つことから、表層微小管を細胞膜に強く結合させると考えられる。さらに、IQD13 を異所的に発現した細胞では表層微小管が増加し、これらの微小管は微小管重合阻害剤に強い耐性を示したことから、IQD13 は表層微小管を特異的に安定化していると考えられる (Sugiyama et al., 2017)。これまでに活性化 ROP11 ドメインを囲む表層微小管が活性型 ROP11 の拡散を抑制することが示唆されている (Oda and Fukuda, 2012)。人為的に活性化 ROP11 ドメインを形成すると、IQD13 非存在下では円形のドメインが形成されたが、IQD13 存在下では表層微小管により ROP11 の局在が制限され、細長いドメインが形成された。このことから IQD13 は表層微小管を介して活性型 ROP11 の拡散を抑制することにより、壁孔の大きさを負に制御していると考えられる (図 3)。

2 報目では植物特異的な微小管付随タンパク質 CORTICAL MICROTUBULE DISORDERING1 (CORD1) および CORD2 が壁孔の形態制御に関わっていることを報告した (Sasaki et al., 2017)。IQD13 とは逆に、*cord1 cord2* 二重欠損変異体では野生型より小さい壁孔が形成され、CORD1 の過剰発現体では野生型よりも大きい壁孔が形成された。CORD1 を異所的に発現させると、表層微小管がゆらゆらと揺れるような不安定な動態が観察された。このような動態は、表層微小管が細胞膜から部分的に離れ、細胞質に遊離することにより引き起こされていた。このことから、CORD1 は表層微小管の細胞膜結合を阻害し、それにより表層微小管の動態を不安定にすると考えられた。これを確かめるため、胚軸組織を用いて異所的に後生木部細胞を分化させ、その表層微小管を観察した。その結果、野生型では表層微小管がややランダムに並んでいたのに対し、*cord1 cord2* 二重変異体では表層微小管が野生型よりも平行にそろっていた。二重変異体では表層微小管が野生型よりも強固に細胞膜に結合し、表層微小管の配向変化が阻害されたと考えられた。これは CORD1 が表層微小管の細胞膜結合を阻害し、表層微小管の動態を不安定にするという考えを支持する。*cord1 cord2* 二重変異体では、強固に細胞膜に結合した表層微小管が活性化 ROP11 ドメインの拡散を阻害し、それにより活性化 ROP11 ドメイン、さらには壁孔が小さく形成されたのだろう。以上をまとめると、CORD1 は木部道管の分化初期に表層微小管の細胞膜からの脱離を促進することにより、表層微小管の可動性を増し、表層微小管の配向変化を促進することにより壁孔の大きさを制

御していると考えられる (図 3)。シロイヌナズナには *CORD1* と *CORD2* に加え 5 つの *CORD* 遺伝子が存在し、これらの遺伝子は様々な組織で発現している。表層微小管の配向が乱れる現象は、根毛 (Van Bruaene et al., 2004) やトライコーム (Tian et al., 2015) の分化、受精卵 (Kimata et al., 2016) においても観察されているが、その分子メカニズムと生理学的な意義は明確にされていない。*CORD* ファミリーは様々な器官で発現していることから、このような表層微小管の配向制御に *CORD* による細胞膜からの表層微小管の脱離機構が関わっているのかもしれない。*CORD* ファミリーの変異体を解析することにより、その分子メカニズムと生理学的な意義に関して知見が得られると期待される。

IQD13 と *CORD1* は壁孔の大きさに対して相反する作用をもつ。両者が協調的に働くことにより、適切な二次細胞壁パターンが形成されていると考えられる。今後、両者の機能欠損変異体における表層微小管の詳細な構造解析や高感度イメージングによる細胞内局在の解析、*CORD1* による表層微小管の制御機構の解析を進めることにより、両者が協調的にはたらく仕組みが明らかになると期待される。

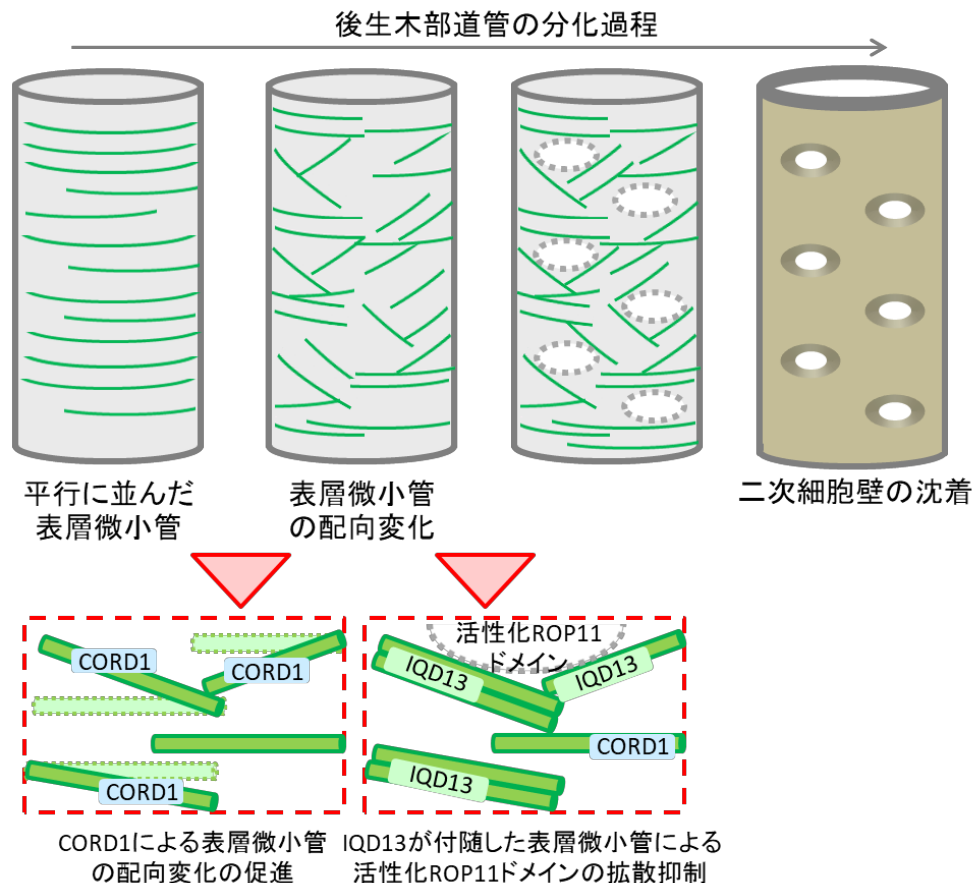


図 3 木部道管分化過程における *CORD1* と *IQD13* の役割

平行に並んだ表層微小管は木部道管の分化過程において二次細胞壁を誘導するパターンに配向する。*CORD1* は表層微小管の可動性を上げることにより表層微小管の配向変化を促進する。一方、表層微小管は *IQD13* を介して細胞膜に強く結合することにより、活性化 *ROP11* ドメインの細胞膜上での拡散を抑制し、適切な大きさのドメインを形成する。

5. 表層微小管に沿った細胞壁成分の輸送に関わるタンパク質

前述したように、木部道管の分化過程では複数の微小管付随タンパク質のはたらきにより表層微小管が適切に配向し、二次細胞壁の沈着パターンを作り出すための基礎となっている。それに加え、近年、表層微小管に沿った細胞壁成分の輸送に関わる因子も報告された。Exocyst 複合体は8つのサブユニットからなる巨大な複合体であり、分泌小胞を細胞膜の適切な位置に誘導する。筆者らの研究グループは道管において機能未知タンパク質である VETH1 および VETH2 が exocyst 複合体を細胞膜上の表層微小管にリクルートすることにより表層微小管近傍への二次細胞壁成分の輸送を制御することを報告した (Oda et al., 2015; Vukasinovic et al., 2017)。また、Kinesin ファミリーに属する FRA1 が原生木部道管を含め細胞壁成分の輸送に広く関わっていることが報告された (Zhu et al., 2015)。この様に、表層微小管の配向変化から表層微小管に沿った二次細胞壁の沈着に至る、木部道管分化の一連の機構が着実に明らかになってきている。

6. おわりに

木部道管の複雑な二次細胞壁パターンは、表層微小管の高度に組織化された配向により制御されている。これまでに、培養細胞を用いた網羅的解析により二次細胞壁パターンの形成に関わる微小管付随タンパク質が次々と明らかにされてきた。そして、これらの微小管付随タンパク質の機能解析により、表層微小管の配向を制御する分子機構の理解が進んできた。これらの微小管付随タンパク質の大部分には複数の相同遺伝子が存在し、木部道管以外の組織において発現しているものも多い。道管の研究から得られた知見に加え、これらの遺伝子の機能解析を進めることにより、様々な細胞の分化や形態形成の研究がさらに発展すると期待される。

引用文献

- Derbyshire, P., Menard, D., Green, P., Saalbach, G., Buschmann, H., Lloyd, C.W., Pesquet, E., 2015. Proteomic Analysis of Microtubule Interacting Proteins over the Course of Xylem Tracheary Element Formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 27, 2709-2726.
- Kimata, Y., Higaki, T., Kawashima, T., Kurihara, D., Sato, Y., Yamada, T., Hasezawa, S., Berger, F., Higashiyama, T., Ueda, M., 2016. Cytoskeleton dynamics control the first asymmetric cell division in Arabidopsis zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 14157-14162.
- Nagashima, Y., Tsugawa, S., Mochizuki, A., Sasaki, T., Fukuda, H., Oda, Y., 2018. A Rho-based reaction-diffusion system governs cell wall patterning in metaxylem vessels. *Sci Rep* 8, 11542.
- Oda, Y., Fukuda, H., 2012. Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* 337, 1333-1336.
- Oda, Y., Fukuda, H., 2013. Rho of plant GTPase signaling regulates the behavior of Arabidopsis kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. *Plant Cell* 25, 4439-4450.
- Oda, Y., Iida, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, Y., Fukuda, H., 2015. Novel coiled-coil proteins regulate exocyst association with cortical microtubules in xylem cells via the conserved oligomeric golgi-

- complex 2 protein. *Plant Cell Physiol* 56, 277-286.
- Pesquet, E., Korolev, A.V., Calder, G., Lloyd, C.W., 2010. The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in Arabidopsis wood cells. *Current Biology* 20, 744-749.
- Sasaki, T., Fukuda, H., Oda, Y., 2017. CORTICAL MICROTUBULE DISORDERING1 Is Required for Secondary Cell Wall Patterning in Xylem Vessels. *Plant Cell* 29, 3123-3139.
- Sugiyama, Y., Wakazaki, M., Toyooka, K., Fukuda, H., Oda, Y., 2017. A Novel Plasma Membrane-Anchored Protein Regulates Xylem Cell-Wall Deposition through Microtubule-Dependent Lateral Inhibition of Rho GTPase Domains. *Curr Biol* 27, 2522-2528 e2524.
- Tian, J., Han, L., Feng, Z., Wang, G., Liu, W., Ma, Y., Yu, Y., Kong, Z., 2015. Orchestration of microtubules and the actin cytoskeleton in trichome cell shape determination by a plant-unique kinesin. *Elife* 4.
- Van Bruaene, N., Joss, G., Van Oostveldt, P., 2004. Reorganization and in vivo dynamics of microtubules during Arabidopsis root hair development. *Plant Physiol* 136, 3905-3919.
- Vukasinovic, N., Oda, Y., Pejchar, P., Synek, L., Pecenkova, T., Rawat, A., Sekeres, J., Potocky, M., Zarsky, V., 2017. Microtubule-dependent targeting of the exocyst complex is necessary for xylem development in Arabidopsis. *New Phytol* 213, 1052-1067.
- Zhu, C., Ganguly, A., Baskin, T.I., McClosky, D.D., Anderson, C.T., Foster, C., Meunier, K.A., Okamoto, R., Berg, H., Dixit, R., 2015. The fragile Fiber1 kinesin contributes to cortical microtubule-mediated trafficking of cell wall components. *Plant Physiol* 167, 780-792.

MAPs プロテオームから見出された表層微小管-オルガネラ相互作用

濱田 隆宏

東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系
〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

Takahiro Hamada

Cortical microtubules-organelles interaction in plant cells

Keywords: microtubules, organelles, endoplasmic reticulum, RNA granules

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences,

The University of Tokyo

3-8-1 Komaba, Meguro-Ku, Tokyo 153-8902

DOI: 10.24480/bsj-review.9c6.00145

植物には、セルロース合成酵素のレールとして働く表層微小管、分裂面の方向を決定する PPB (preprophase band, 分裂準備帯)、染色体の分配に働く紡錘体、細胞板の構築に働くフラグモプラストと呼ばれる微小管構造物が存在する。これらの微小管構造物の構築と機能発現には微小管の周囲に集積する微小管付随タンパク質群 (MAPs, microtubule associated proteins) が必須であり、植物における微小管の役割やその制御メカニズムを調べるためには MAPs の機能解析をする必要がある (Hamada 2014, Hashimoto 2015)。

1. 微小管付随タンパク質群 (MAPs)

植物の微小管付随タンパク質群 (MAPs) には真核生物に共通したタンパク質ファミリーと植物独特のタンパク質ファミリーに分類できる。真核生物共通な MAPs の基本的な動作メカニズムは、ほぼ保存されていると考えられるが、その一方で、植物独特な使われ方や役割を担っていることがある。例えば、微小管の重合開始に関わる γ -tubulin 複合体の構成因子は植物にも存在し、微小管の重合開始に関わっている。しかしながら動物細胞では γ -tubulin 複合体が中心体周辺に局在して微小管が中心体から放射状に伸びるのに対し、植物細胞 (特に被子植物) では γ -tubulin 複合体は細胞の全体 (特に微小管上や細胞膜) に分布して分散型の微小管ネットワーク形成の基盤となっている。また微小管上を動くモータータンパク質であるキネシンもその作動メカニズムは基本的に同じであると思われるが、一部のキネシンサブファミリーでは動物と植物で多様性が大きく異なる。特にその違いが顕著なサブファミリーはキネシン 14 サブファミリーであり、植物には動物のキネシンでは稀な微小管マイナス端方向へと移動できるキネシンが多く含まれている。また微小管束化タンパク質の一つである MAP65

ファミリー（植物では MAP65, ヒトでは PRC1, 酵母では ASE1 と呼ばれる）は大半の動物や菌類では 1 遺伝子座しか存在しないのに対し, 植物では多様化しており（シロイヌナズナに 9 遺伝子座）, 植物の微小管構造物の構築に束化が重要であることが示唆されている。また植物独特の使われ方をする MAPs として, カタニンが注目されている。カタニンは動物や菌類では微小管を切断することで微小管を脱重合させたり, 中心体から微小管を切り離して細胞周辺部に輸送される微小管を生み出している。植物のカタニンは表層微小管の交差部位に局在して微小管を切断するが, 切断された微小管のプラス端が安定化されることで微小管の本数を増加させるという役割を担っている（Lindeboom et al. 2013, 中村 & 八木 2018 BSJ-Review 9C3: 120-129）。真核生物に共通した MAPs に関しては, 今後の更なる解析により植物独特な使われ方や役割が明らかにされると期待される。

一方, 植物には多くの植物独特な MAPs も存在している。それらの大半はシロイヌナズナを用いた遺伝学によって同定されてきた（Sedbrook & Kaloriti 2008）。シロイヌナズナの MAPs 変異体では異常が重篤な場合は致死の表現型が見られ, また致死ではないが細胞伸長や種子形成に顕著な異常を示す表現型, 根や葉柄が「ねじれる」という軽微な異常を示す表現型, さらに個体レベルでの見た目に変化は生じず細胞レベルの形態でのみ異常が見られる軽微な表現型などが見られる。これまでに機能が明確な植物独特な MAPs として, セルロース合成酵素と微小管を繋ぐ CSI (Cellulose synthase interacting) ファミリー（Gu et al. 2010, Li et al. 2012）, 微小管のマイナス端の安定化に働く SPR2 ファミリー（Nakamura et al. 2018, Leong et al. 2018, Fan et al. 2018）, 微小管密度の調節に働く RIP/MIDD ファミリー（Lavy et al. 2007, Li et al. 2008, Oda et al. 2010, Oda and Fukuda 2012, 2013）などが挙げられる。しかしながら, 多くの植物独特な MAPs は詳細な機能解析がされておらず, どのように微小管に作用するか, その作用メカニズムは今後, 続々と明らかになると期待される。

また翻訳後修飾による MAPs の機能変換も, 微小管研究における重要なテーマである。動物や菌類の MAPs 同様に, 植物 MAPs の主な機能変換もリン酸化・脱リン酸化で引き起こされており, それらに関連する微小管関連キナーゼ, フォスファターゼが同定されている。その多くは細胞周期の変化に応じた変化であり, CDK, Aurora キナーゼ, mitogen activated タンパク質キナーゼ (MAPK) などが同定され, 植物独特な制御メカニズムの一端が明らかにされている（Sasabe & Machida 2012）。また間期の表層微小管の制御に関わる微小管関連キナーゼ, フォスファターゼとして, NIMA キナーゼや PHS1 フォスファターゼが同定されており, これらの因子による詳細な微小管制御メカニズムが明らかにされている（Fujita et al. 2013, Takatani et al. 2017）。さらに表層微小管と PPB の構築に関わる TON1/FASS (TON2) フォスファターゼ複合体の機能も明らかにされている（Kirik et al. 2012, Spinner et al. 2013）。

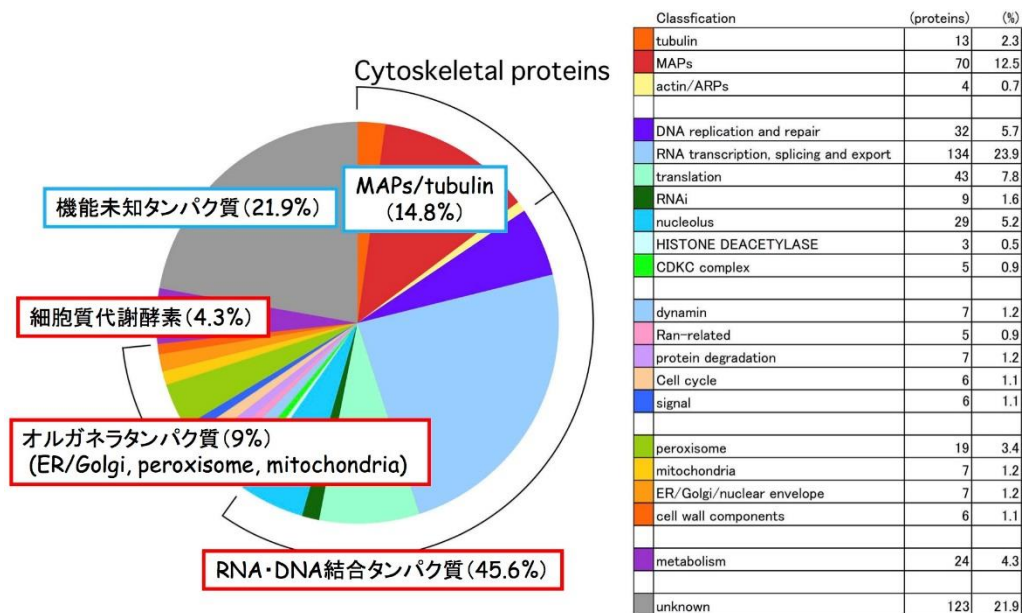
微小管構造物の構築やその機能発現は, 多くの MAPs や翻訳後修飾に関わる制御分子が協調的に働く複雑なネットワークの上に成り立っている。現時点ではその僅かな一端が解き明か

されているのみであり、今後の研究発展により、さらに詳細なメカニズムが明らかになることが期待される。特に植物独特な MAPs については、個々の MAPs による微小管制御メカニズム・作用メカニズムすら不明な点が多く、明らかにすべき課題が多く残されているのが現状である。

2-1. 微小管はオルガネラ・RNA 顆粒・タンパク質が集積する足場として働く

筆者は、これまでに生化学を基盤とした植物 MAPs の同定と機能解析を行ってきた。植物細胞の大半を占める液胞には多くのタンパク質分解成分が含まれており、植物細胞を破碎すると細胞質に含まれる MAPs はすぐに分解されてしまう。そこで筆者らは、密度勾配遠心により液胞を取り除くことによって分解の少ない高品質の細胞質を調整し、動物細胞同様に微小管の重合・脱重合と遠心分離を繰り返す MAPs 精製法を可能とした (Sonobe 1996, Hamada and Sonobe 2017)。この技術を用いて、シロイヌナズナ培養細胞を材料とした MAPs の網羅的同定 (MAPs プロテオーム) を行った。その結果、精製した MAPs 画分において、727 種類の MAPs を同定した (Hamada et al. 2013, 濱田・未発表データでは 1568 種類の MAPs を同定)。MAPs プロテオームでは、この解析以前に同定されていた既知の 117 種類の MAPs のうち、約 75% にあたる 87 種類の MAPs が同定されており、信頼性の高い解析結果だと言える。さらに機能未知であったタンパク質の中から、細胞内で微小管局在を示す新たな 6 family の MAPs も同定されている。

その一方、MAPs プロテオームの全体像を俯瞰すると、同定した全タンパク質のうち、MAPs は 1 割程度であり、それ以外に DNA・RNA 結合タンパク質が 4 割、オルガネラタンパク質が 1 割、



MAPs画分は主に以下のタンパク質を含む

- ・ 微小管構造物の構築と機能発現に関わるタンパク質 (狭義のMAPs)
- ・ 微小管上で起こる様々な現象 (代謝・RNA代謝・膜交通・シグナル伝達など) に関わるタンパク質

図1 微小管付随タンパク質群 (MAPs) プロテオームで同定されたタンパク質

細胞質タンパク質が1割と一見すると微小管機能とは関係のないものが多く含まれていた(図1)。これらのMAPs以外のタンパク質の中には、MAPs画分に高濃度に濃縮されているものも多く、筆者はこれらのタンパク質が単なる非特異的結合による夾雑物(コンタミネーション)ではなく、実際に細胞内でも微小管と相互作用しているのではないかと考えている。そこでこのBSJ-Reviewでは、これまでの筆者らの研究成果を含め、MAPs画分に含まれていたオルガネラやRNA結合タンパク質・RNAなどが集合したRNA顆粒の細胞内での振る舞いと微小管の関連について概説する。

2-2. オルガネラ・RNA顆粒の係留とキネシン・モータータンパク質

植物のオルガネラ輸送がアクチン繊維上を駆動するミオシンによって行われていることは明確であるが、その一方、微小管の役割はあまり分かっていなかった(Shimmen 2007, Cai & Cresti 2012)。その理由の一つが、植物のアクチン繊維-ミオシンが引き起こす運動が、植物の微小管-キネシンが引き起こす運動も含む他の真核生物の細胞骨格運動に比べて極めて早く(Tominaga & Nakano 2012, Nebenführ & Dixit 2018)、微小管による運動が目立たないためだと考えられる。これまでに植物における微小管依存的なオルガネラの運動を明確に示した例として、*in vitro*での解析(Romagnoli et al. 2003)、ゴルジ体分泌小胞の動き(Crowell et al. 2009, Gutierrez et al. 2009)、小胞体チューブの伸長(Hamada et al. 2014)、分泌小胞に局在するキネシンの動き(Zhu et al. 2015, Kong et al. 2015)などがあるが、その運動スピードは一般的な植物アクチン繊維が引き起こす運動スピードの10分の1程度である。また細胞内ライブイメージングによりオルガネラ(ペルオキシソーム、ミトコンドリア、ゴルジ体)を観察すると、オルガネラはアクチン繊維によって輸送され、表層微小管が存在する場所で係留されるように見える(Van Gestel et al. 2002, Chuong et al. 2005, Crowell et al. 2009, Gutierrez et al. 2009)。さらにmRNAの5'末端のキャップ構造の分解に働く細胞質RNA顆粒であるP-bodiesもアクチン繊維によって輸送され、表層微小管で係留される(Hamada et al. 2012)。P-bodiesと同様の動きは翻訳抑制されたmRNAなどで構成されるストレス顆粒や、microRNAを含むAGO1顆粒などでも観察される(Hamada et al. 2018, 濱田, 未発表データ)。これらの観察により、MAPs画分に含まれていたオルガネラ・細胞質RNA顆粒のタンパク質は、実際に細胞内でも微小管と相互作用している可能性が高いと言える。

この細胞内でのオルガネラ・RNA顆粒と微小管の相互作用は、キネシンや架橋タンパク質によって引き起こされている可能性が高く、微小管に沿ったオルガネラの移動は(微小管に平行に伸びたアクチン繊維-ミオシンの関与がない限り)キネシンが関与すると思われる。一方、微小管上に係留されるように観察される粒状オルガネラ・RNA顆粒に関しては、細胞膜上で小胞体や微小管などが形成する「オルガネラ・RNA顆粒が係留される特別な領域」で起きる可能性も高く、1個から数個程度のタンパク質で構成されるような直接的な相互作用ではない可

能性もある (Peña & Heinlein 2013)。その証拠として、微小管を脱重合させた場合でも、粒状のオルガネラ (ペルオキシソーム, ミトコンドリア, ゴルジ体) や RNA 顆粒の停止頻度は影響を受けない (Hamada et al. 2012)。これは粒状オルガネラや RNA 顆粒が、細胞膜上で形成されている「オルガネラ・RNA 顆粒が係留される特別な領域」に含まれる微小管以外の構造体 (小胞体や細胞膜, その他のオルガネラなど) と強く相互作用しているためだと考えられる。

微小管上を動くモータータンパク質であるキネシンは、微小管構造物の構築に関わるキネシンとオルガネラ輸送に関わるキネシンに分類される。植物におけるキネシンファミリーの種類は多く、オルガネラ輸送を微小管依存的に行う動物と比較しても遜色ない (Richardson et al. 2006, Nebenführ & Dixit 2018)。このキネシンファミリーの中でもキネシン 14 サブファミリーは特に植物で多様化しており、微小管のマイナス端方向へと移動できるキネシンが多く含まれていることが特徴である。

キネシン 4 サブファミリーに属する FRA1 がゴルジ体由来の分泌小胞を運び、確実に微小管上で移動することが観察されている (Zhu et al. 2015, Kong et al. 2015)。被子植物において核の輸送はアクチン繊維依存的であるが (Tamura et al. 2013), アクチン繊維結合ドメインをもつ KCH (キネシン 14 サブファミリー, 以下, サブファミリーは省略) は微小管依存的にアクチン繊維を運ぶことが可能であり (Walter et al. 2015), KCH は微小管-アクチン繊維相互作用を介した核の輸送に働くと考えられている (Frey et al. 2010)。一方, ヒメツリガネゴケにおける核の輸送は微小管依存的に KCBP-b (キネシン 14) や KCH が行なっており (Miki et al. 2015, Jonsson et al. 2015, Yamada et al. 2017, Yamada & Goshima 2018), 生物種によって異なる細胞骨格の使い方をしていることがわかる。KP1 (キネシン 14) はミトコンドリア外膜タンパク質 VDAC3 と結合し、ミトコンドリアの輸送に関わっていると報告されている (Yang et al. 2011)。また分裂期の微小管構造物である PPB やフラグモプラストに偏在する POK1 ファミリー (キネシン 12) や PAKRP/KINID1 ファミリー (キネシン 12), NACK ファミリー (キネシン 7) などは微小管構造物の機能発現に必須なキネシンである。これらのキネシンが何らかのオルガネラ輸送に関わっている可能性もあるが、断言するためには更なる検証が必要であると思われる。

2-3. 表層微小管と「オルガネラが係留される特別な領域」について

微小管とオルガネラ・RNA 顆粒がキネシンや架橋タンパク質によって直接結合する以外の可能性として、微小管が存在していた領域が「オルガネラ・RNA 顆粒が係留される特別な領域」である可能性がある (図 2)。この領域の実体については不明な点が多いが、以下のようにその存在は確実であると思われる。

筆者らは、小胞体ネットワークと表層微小管をライブイメージング観察することで、小胞体

ネットワークの分岐点が微小管上に形成されていることを見出した (Hamada et al. 2012, Peña & Heinlein 2013)。小胞体ネットワークはチューブ状とシート状の小胞体で構成され、他のオルガネラ同様にアクチン繊維依存的に活発に運動しており (Quader et al. 1989), その一部分は細胞内で固定されている (Sparkes et al. 2009)。筆者らの観察では、この小胞体が固定されている箇所が微小管と共局在しており、その小胞体-微小管接着部位が分岐点になりやすいことを明らかにした (Hamada et al. 2014)。この観察結果を裏付けるように、微小管を薬剤で脱重合させた場合、小胞体分岐の数は減少する (Hamada et al., 2012)。また細胞内で観察される微小管密度と小胞体の分岐数は強い相関を示した (Hamada et al., 2014)。

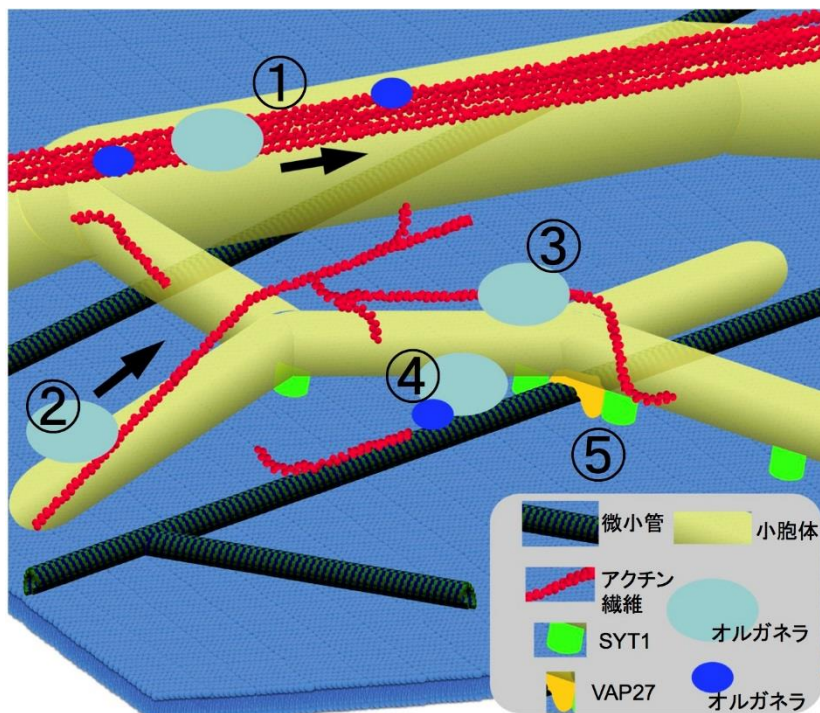


図2 細胞質中・細胞膜近傍における細胞骨格・小胞体・「オルガネラ・RNA 顆粒が係留される特別な領域」の模式図

表層微小管周辺には小胞体を含む様々なオルガネラや RNA 顆粒が集積し、「オルガネラ・RNA 顆粒が係留される特別な領域」が形成される。この領域ではオルガネラ間の相互作用に加え、表層微小管上に局在する細胞質酵素などにより活発な代謝が行われ、またイノシトールリン酸が多く、細胞膜でのエンドサイトーシス、エキソサイトーシスのみならず、シグナル伝達や膜輸送、病害応答などの多様な発生や環境応答の基盤として働くと考えられる。

表層微小管は細胞膜に沿って2次元に広がるネットワークである。①細胞膜から離れた細胞質中に原形質流動を引き起こすアクチン繊維の太い束が存在し、小胞体を含むオルガネラや RNA 顆粒などを運んでいる。②細胞膜近傍では、細いアクチン繊維 (おそらく1本) が小胞体を含むオルガネラや RNA 顆粒などを運ぶ。③アクチン繊維によって運ばれてきたオルガネラや RNA 顆粒は微小管周辺でしばしば係留される。④一部のオルガネラは微小管上を動いたり、微小管上に係留されている。⑤小胞体は VAP27 などの因子によって微小管や細胞膜に係留されている。小胞体と細胞膜を繋ぐ SYT1 は VAP27 を挟むように局在する。また SYT1 による小胞体-細胞膜との結合には微小管は必須ではない。

また小胞体は細胞膜にも直接結合しており、微小管を完全に破壊した場合、小胞体ネットワークの固定部位や分岐点は減少するが完全には失われぬ。この小胞体と細胞膜に接着部位は小胞体-細胞膜接着部位 (EPCSs: Endoplasmic Reticulum-Plasma membrane contact sites) と呼ばれている (Wang et al. 2017)。この EPCSs のマーカーとしては真核生物に保存された小胞体-細胞膜架橋タンパク質である VAP27 や SYT1 が知られており、これらのタン

パク質が植物のEPCSsに局在することが知られている (Wang et al. 2014, Pérez-Sancho et al. 2015, Levey et al. 2015, Wang et al. 2016)。またEPCSsに局在する植物特有のタンパク質としてSNAREタンパク質であるSYP7ファミリーやNET3Cなどが知られており、これらのタンパク質はアクチン繊維結合ドメインを介してアクチン繊維と小胞体を安定的に繋いでいると考えられている (Suwastika et al. 2008, Wang et al. 2014, Cao et al. 2016)。

これらの中で注目すべきタンパク質はVAP27である。VAP27は微小管へ直接結合することが*in vitro*で示されており、微小管・小胞体・細胞膜の3者を繋いでいる (Wang et al. 2014)。VAP27とSYT1の細胞内局在は異なっており、VAP27で認識されるV-EPCSsは表層微小管の周囲に局在し (表層微小管は約10 nm程度の距離で密接に細胞膜に沿った二次元の構造である)、SYT1で認識されるS-EPCSsは表層微小管周囲には少なくVAP27の局在を避けて微小管を挟むように局在している (Siao et al. 2016)。このVAP familyは動物細胞や酵母では微小管への結合 (Skehel et al. 2000) 以外に、脂質合成や膜交通、膜輸送などに働いていることが知られている (Lev et al. 2008)。シロイヌナズナにおいてもVAP27がクラスリンを介したエンドサイトーシスに働くことが示されている (Stefano et al. 2018)。またVAP27はPI(3)P、PI(4)P、PI(5)Pなどのイノシトールリン酸とも直接結合することができる (Stefano et al. 2018)。

一方、MAPsであるCLASPは後期エンドソームに局在するSNX1 (Sorting Nexin1) との相互作用することが報告されている (Ambrose et al. 2013)。このSNX1はPI(3)PやPI(3,5)P₂と結合し、またPI(3)PをPI(3,5)P₂へ変換するFAB1タンパク質とも後期エンドソームで共局在する (Hirano et al. 2015)。この後期エンドソームは細胞表層で微小管に沿った粒状やチューブ状の構造として存在するが、微小管を破壊するとこれらの後期エンドソームが細胞質に離散してしまうことが知られている (Ambrose et al. 2013, Hirano et al. 2015)。

このVAP27とCLASPの研究において浮かび上がる「微小管・小胞体・エンドサイトーシス・イノシトールリン酸」などの共通のキーワードは、VAP27が形成するV-EPCSsとCLASPの相互作用を連想させ、CLASPはV-EPCSsの構築に働く重要な因子である可能性が示唆される。またイノシトールリン酸は膜ドメインの目印として細胞膜でのエンドサイトーシス、エキソサイトーシスのみならず、シグナル伝達や膜輸送、病害応答などの多様な発生や環境応答の基盤として働いており (Heilmann, 2016)、イノシトールリン酸と共局在するCLASPやV-EPCSsが関わる構造の重要性はその点からも支持される。

この表層微小管周辺には、EPCSsに関わる小胞体・細胞膜のみならず、その他のミトコンドリア・ペルオキシソーム・ゴルジ体などのオルガネラ、P-bodiesやストレス顆粒などのRNA顆粒も局在し、「オルガネラ・RNA顆粒が係留される特別な領域」が形成される。これらのオルガネラ間の相互作用 (オルガネラ間コンタクトサイト) は細胞内の代謝にとって非常に重要である (Gatta and Levine, 2017)。植物は動物や酵母よりも更に多くの代謝物を合成してお

り、表層微小管が構築に関わる「オルガネラが係留される特別な領域」は重要な役割を担っていると想像できる。しかしながらこれらのオルガネラ機能と微小管の直接的な繋がりを実験的に見つけることは難しいかもしれない。過去には観察条件や観察対象を変えることで、新たな微小管とオルガネラの繋がりを見出した例がある。例えばシロイヌナズナの表皮細胞ではエキソサイトーシスの頻度が微小管の有無に依存しないと報告されていたが (Gutierrez et al. 2009, Fendrych et al. 2013) , 導管分化時に注目すると微小管がエキソサイトーシスの足場として働くことが示されている (Oda et al. 2015, 佐々木&小田 2018)。また微小管に沿って伸長する小胞体や、微小管-小胞体の相互作用などは、アクチン繊維の非存在下で観察されやすくなる (Hamada et al. 2014)。

これまでの微小管研究では、表層微小管の機能は「セルロース合成酵素のレール」としての役割が大きくクローズアップされてきた。今後は「細胞膜近傍で様々なオルガネラ間相互作用や細胞質タンパク質を集積させるハブ」という表層微小管の役割についても、多くの知見が得られると期待している。

引用文献

- Ambrose, C., Ruan, Y., Gardiner, J., Tamblyn, L.M., Catching, A., Kirik, V., et al. 2013. CLASP Interacts with Sorting Nexin 1 to Link Microtubules and Auxin Transport via PIN2 Recycling in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Cell.* 24: 649–659.
- Cai, G., & Cresti, M. 2012. Are kinesins required for organelle trafficking in plant cells? *Front Plant Sci.* 3.
- Cao, P., Renna, L., Stefano, G., Brandizzi, F., Cao, P., Renna, L., et al. 2016. SYP73 Anchors the ER to the Actin Cytoskeleton for Maintenance of ER Integrity and Streaming in Report SYP73 Anchors the ER to the Actin Cytoskeleton for Maintenance of ER Integrity and Streaming in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 26: 3245–3254.
- Chuong, S.D.X., Park, N., Freeman, M.C., Mullen, R.T., & Muench, D.G. 2005. The peroxisomal multifunctional protein interacts with cortical microtubules in plant cells. *BMC Cell Biol.* 13: 1–13.
- Crowell, E.F., Bischoff, V., Desprez, T., & Vernhettes, S. 2009. Pausing of Golgi Bodies on Microtubules Regulates Secretion of Cellulose Synthase Complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 21: 1141–1154.

- Fan, Y., Burkart, G.M., & Dixit, R. 2018. The Arabidopsis SPIRAL2 Protein Targets and Stabilizes Microtubule Minus Ends. *Curr. Biol.* 987–994.
- Fendrych, M., Synek, L., Pecenková, T., Drdová, E.J., Sekeres, J., de Rycke, R., et al. 2013. Visualization of the exocyst complex dynamics at the plasma membrane of Arabidopsis thaliana. *Mol. Biol. Cell.* 24: 510–520.
- Frey, N., Klotz, J., & Nick, P. 2010. A kinesin with calponin-homology domain is involved in premitotic nuclear migration. *J. Exp. Bot.* 61: 3423-3437.
- Fujita, S., Pytela, J., Hotta, T., Kato, T., Hamada, T., Akamatsu, R., et al. 2013. An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in arabidopsis. *Curr. Biol.* 23: 1969–1978.
- Gatta, A.T., & Levine, T.P. 2017. Piecing Together the Patchwork of Contact Sites. *Trends Cell Biol.* 27: 214–229.
- Gu, Y., Kaplinsky, N., Bringmann, M., Cobb, A., Carroll, A., Sampathkumar, A., et al. 2010. Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 12866–12871.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J.J., Paredez, A.R., Emons, A.M.C., & Ehrhardt, D.W. 2009. Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nat. Cell Biol.* 11: 797–806.
- Hamada, T., Yako, M., Minegishi, M., Sato, M., Kamei, Y., Yanagawa, Y., Toyooka, K., Watanabe, Y., & Hara-Nishimura, I. 2018. Stress granule formation is induced by a threshold temperature rather than a temperature difference in Arabidopsis. *J. Cell Sci.* 131, jcs216051.
- Hamada, T., Ueda, H., Kawase, T., & Hara-Nishimura, I. 2014. Microtubules Contribute to Tubule Elongation and Anchoring of Endoplasmic Reticulum, Resulting in High Network Complexity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 166: 1869–1876.
- Hamada, T. 2014. Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 312: 1–52.

- Hamada, T., Igarashi, H., Taguchi, R., Fujiwara, M., Fukao, Y., Shimmen, T., et al. 2009. The putative RNA-processing protein, THO2, is a microtubule-associated protein in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 50: 801–811.
- Hamada, T., Nagasaki-Takeuchi, N., Kato, T., Fujiwara, M., Sonobe, S., Fukao, Y., et al. 2013. Purification and characterization of novel microtubule-associated proteins from Arabidopsis cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 163: 1804–1816.
- Hamada, T., & Sonobe, S. 2017. Isolation of microtubules and microtubule-associated proteins. In *Methods in Molecular Biology.* 281–289.
- Hashimoto, T. 2015. Microtubules in Plants. *Arabidopsis Book.* e0179.
- Heilmann, I. 2016. Phosphoinositide signaling in plant development. *Development.* 143: 2044–2055.
- Hirano, T., Munnik, T., & Sato, M.H. 2015. Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, FAB1/PIKfyve mediates endosome maturation to establish endosome-cortical microtubule interaction in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 169: 1961–1974.
- Jonsson, E., Yamada, M., Vale, R.D., & Goshima, G. 2015. Clustering of a kinesin-14 motor enables processive retrograde microtubule-based transport in plants. *Nat. Plants.* 1: 15087.
- Kirik, A., Ehrhardt, D.W., & Kirik, V. 2012. TONNEAU2/FASS Regulates the Geometry of Microtubule Nucleation and Cortical Array Organization in Interphase Arabidopsis Cells. *Plant Cell.* 24: 1158–1170.
- Kong, Z., Ioki, M., Braybrook, S., Li, S., Ye, Z.H., Julie Lee, Y.R., et al. 2015. Kinesin-4 Functions in Vesicular Transport on Cortical Microtubules and Regulates Cell Wall Mechanics during Cell Elongation in Plants. *Mol. Plant.* 8: 1011–1023.
- Leong SY, Yamada M, Yanagisawa N, G.G. 2018. SPIRAL2 Stabilises Endoplasmic Microtubule Minus Ends in the Moss *Physcomitrella patens*. *Cell Struct. Funct.* 43: 53–60.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., & Yalovsky, S. 2007. A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr. Biol.* 17: 947–952.

- Lev, S., Halevy, D. Ben, Peretti, D., & Dahan, N. 2008. The VAP protein family : from cellular functions to motor neuron disease. *Trends Cell Biol.* 18: 282–290.
- Levy, A., Zheng, J.Y., Sondra, G., Levy, A., Zheng, J.Y., & Lazarowitz, S.G. 2018. Synaptotagmin SYTA Forms ER-Plasma Membrane Junctions that Are Recruited to Plasmodesmata for Plant Virus Movement Report Synaptotagmin SYTA Forms ER-Plasma Membrane Junctions that Are Recruited to Plasmodesmata for Plant Virus Movement. *Curr. Biol.* 25: 2018–2025.
- Li, S., Lei, L., Somerville, C.R., & Gu, Y. 2012. Cellulose synthase interactive protein 1 CSII. links microtubules and cellulose synthase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 185–190.
- Li, S., Gu, Y., Yan, A., Lord, E., & Yang, Z.B. 2008. RIP1 ROP Interactive Partner 1/ICR1 marks pollen germination sites and may act in the ROP1 pathway in the control of polarized pollen growth. *Mol. Plant.* 1: 1021–1035.
- Lindeboom, J.J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Ketelaar, T., et al. 2013. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* 342: 1245533.
- Miki, T., Nishina, M., & Goshima, G. 2015. RNAi screening identifies the armadillo repeat-containing kinesins responsible for microtubule-dependent nuclear positioning in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 56: 737–749.
- 中村匡良 & 八木慎宜 2018 青色光に応答した微小管ダイナミクス. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 9C3: 120-129.
- Nakamura, M., Lindeboom, J.J., Saltini, M., Mulder, B.M., & Ehrhardt, D.W. 2018. SPR2 protects minus ends to promote severing and reorientation of plant cortical microtubule arrays. *J. Cell Biol.* 217: 915–927.
- Nebenführ, A., & Dixit, R. 2018. Kinesins and Myosins: Molecular Motors that Coordinate Cellular Functions in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69: 329–361.
- Oda, Y., & Fukuda, H. 2012. Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* 337: 1333–1336.
- Oda, Y., & Fukuda, H. 2013. Rho of Plant GTPase Signaling Regulates the Behavior of Arabidopsis Kinesin-13A to Establish Secondary Cell Wall Patterns. *Plant Cell.* 25: 4439–4450.

- Oda, Y., Iida, Y., Kondo, Y., & Fukuda, H. 2010. Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored protein. *Curr. Biol.* 20: 1197–1202.
- Oda, Y., Iida, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, Y., & Fukuda, H. 2015. Novel Coiled-Coil Proteins Regulate Exocyst Association with Cortical Microtubules in Xylem Cells via the Conserved Oligomeric Golgi-Complex 2 Protein. *Plant Cell Physiol.* 56: 277–286.
- Peña, E., & Heinlein, M. 2013. Cortical microtubule-associated ER sites: organization centers of cell polarity and communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 764–773.
- Pérez-Sancho, J., Vanneste, S., Lee, E., Mcfarlane, H.E., & Esteban, A. 2015. The Arabidopsis Synaptotagmin1 Is Enriched in Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites and Confers Cellular Resistance to Mechanical Stresses. *Plant Physiol.* 168: 132–143.
- Quader, H., Hofmann, A., & Schnepf, E. 1989. Reorganization of the endoplasmic reticulum in epidermal cells of onion bulb scales after cold stress: Involvement of cytoskeletal elements. *Planta.* 177: 273–280.
- Richardson, D.N., Simmons, M.P., & Reddy, A.S.N. 2006. Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genomics.* 37: 1–37.
- Romagnoli, S., Cai, G., Cresti, M., Scienze, D., Sarfatti, A.G., & Siena, U. 2003. In Vitro Assays Demonstrate That Pollen Tube Organelles Use Kinesin-Related Motor Proteins to Move along Microtubules. *Plant Cell.* 15: 251–269.
- Sasabe, M., & Machida, Y. 2012. Regulation of Organization and Function of Microtubules by the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Plant Cytokinesis. *Cytoskeleton.* 69:913-918.
- 佐々木武馬 & 小田祥久 2018 木部道管細胞の分化を支える表層微小管ダイナミクス. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 9C5: 148-154.
- Sedbrook, J.C., & Kaloriti, D. 2008. Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. *Trends Plant Sci.* 13:303-310.
- Shimmen, T. 2007. The sliding theory of cytoplasmic streaming: Fifty years of progress. *J. Plant Res.* 120: 21–43.

- Siao, W., Wang, P., Voigt, B., Hussey, P.J., & Baluska, F. 2016. Arabidopsis SYT1 maintains stability of cortical endoplasmic reticulum networks and VAP27-1-enriched endoplasmic reticulum – plasma membrane contact sites. *J. Exp. Bot.* 67: 6161–6171.
- Skehel, P. a, Fabian-Fine, R., & Kandel, E.R. 2000. Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 1101–1106.
- Sonobe, S. 1996. Studies on the plant cytoskeleton using miniprotoplasts of tobacco BY-2 cells. *J. Plant Res.* 109:437-48
- Sparkes, I., Runions, J., Hawes, C., & Griffing, L. 2009. Movement and Remodeling of the Endoplasmic Reticulum in Nondividing Cells of Tobacco Leaves. *Plant Cell.* 21: 3937–3949.
- Spinner, L., Gadeyne, A., Belcram, K., Goussot, M., Moison, M., Duroc, Y., et al. 2013. A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nat. Commun.* 4: 1863.
- Stefano, G., Renna, L., Wormsbaecher, C., Gamble, J., Zienkiewicz, K., & Brandizzi, F. 2018. Plant Endocytosis Requires the ER Membrane-Anchored Proteins VAP27-1 and VAP27-3. *Cell Rep.* 23: 2299–2307.
- Suwastika, I.N., Uemura, T., Shiina, T., H. Sato, M., & Takeyasu, K. 2008. SYP71, a Plant-specific Qc-SNARE Protein, Reveals Dual Localization to the Plasma Membrane and the Endoplasmic Reticulum in Arabidopsis. *Cell Struct. Funct.* 33: 185–192.
- Takatani, S., Ozawa, S., Yagi, N., Hotta, T., Hashimoto, T., Takahashi, Y., et al. 2017. Directional cell expansion requires NIMA-related kinase 6 NEK6.-mediated cortical microtubule destabilization. *Sci. Rep.* 7826.
- Tamura, K., Iwabuchi, K., Fukao, Y., Kondo, M., Okamoto, K., et al. 2013. Myosin XI-I links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 23:1776– 1781.
- Tominaga, M., & Nakano, A. 2012. Plant-Specific Myosin XI, a Molecular Perspective. *Front Plant Sci.* 3: 1–11.
- Van Gestel, K., Köhler R. H., & Verbelen, J. P. 2002. Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules. *J. Exp. Bot.* 53: 659–667.

- Walter, W.J., MacHens, I., Rafieian, F., & Diez, S. 2015. The non-processive rice kinesin-14 OsKCH1 transports actin filaments along microtubules with two distinct velocities. *Nat. Plants*. 1: 15111.
- Wang, P., Hawes, C., & Hussey, P.J. 2017. Plant Endoplasmic Reticulum – Plasma Membrane Contact Sites. *Trends Plant Sci*. 22: 289–297.
- Wang, P., Hawkins, T.J., Richardson, C., Cummins, I., Deeks, M.J., Sparkes, I., et al. 2014. The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Curr. Biol*. 24: 1397–1405.
- Wang, P., Richardson, C., Hawkins, T.J., Sparkes, I., Hawes, C., & Hussey, P. J. 2016. Plant VAP27 proteins: Domain characterization, intracellular localization and role in plant development. *New Phytol*. 210: 1311–1326.
- Yamada, M., Tanaka-Takiguchi, Y., Hayashi, M., Nishina, M., & Goshima, G. 2017. Multiple kinesin-14 family members drive microtubule minus end-directed transport in plant cells. *J. Cell Biol*. 216: 1705–1714.
- Yamada, M., & Goshima, G. 2018. KCH kinesin drives nuclear transport and cytoskeletal coalescence for tip cell growth. *Plant Cell*. 30:1496-1510.
- Yang, X., Chen, Z., Xu, T., Qu, Z., Pan, X., Qin, X., et al. 2011. Arabidopsis Kinesin KP1 Specifically Interacts with VDACC3, a Mitochondrial Protein, and Regulates Respiration during Seed Germination at Low Temperature. *Plant Cell*. 23: 1093–1106.
- Zhu, C., Ganguly, A., Baskin, T.I., McClosky, D.D., Anderson, C.T., Foster, C., et al. 2015. The Fragile Fiber1 Kinesin Contributes to Cortical Microtubule-Mediated Trafficking of Cell Wall Components. *Plant Physiol*. 167: 780–792.

植物における Spindle assembly checkpoint

小牧伸一郎・橋本隆

奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域

〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

Shinichiro Komaki, Takashi Hashimoto

Spindle assembly checkpoint in plants

Key words: cell cycle, polyploidization, spindle assembly checkpoint

Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology,

Takayama 8916-5, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9c7.00146

1. はじめに

1つの細胞が分裂することによって2つの娘細胞を作り出すには、細胞周期と呼ばれる4つの特徴的な期間(G1期、S期、G2期、M期)を経る必要がある。このとき、生命の設計図であるゲノムを正確に娘細胞に伝えることは生物にとって最も重要な課題の1つである。そのため、細胞周期の各期間には、分裂が正常に行われているかを監視するチェックポイントが存在することが知られている(Barnum and O'Connell, 2014)。このうち、M期に存在するチェックポイントは Spindle assembly checkpoint (SAC) と呼ばれ、紡錘体微小管と各染色体上に存在するキネトコアが正確に結合するまで、細胞分裂を M 期中期に停止させる。SAC に関わる遺伝子群は酵母に微小管重合阻害剤を処理する実験によって単離同定が進められた(Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991)。野生型の酵母では、微小管が破壊されることによって紡錘体微小管とキネトコアの結合が起こらないため、SAC によって分裂が停止する。一方、SAC の変異体は分裂を停止することができないため、微小管重合阻害剤の存在下でも一定期間増殖を続けることになる。このようにして解析が進められた SAC は、酵母から動物まで高度に保存された機構であることが確認され、特にヒトでは SAC に異常が起こるとガンを誘発することが明らかとなったため、これまでに多くの研究が行われてきた(Kops et al., 2005)。しかし、植物には SAC に関わる相同遺伝子が保存されていることは分かっていたものの、機能的な SAC が存在するかどうかはわかっていなかった。

最近、筆者らは植物にも SAC が存在することを突き止め、その制御機構が他の生物とは異なることを明らかとした。さらに、興味深いことに植物が高頻度に起こすゲノム倍加に SAC が関与することを示唆する結果を得た。本稿では、現在までに分かっている植物における SAC の機能及びその制御機構を中心に、ゲノム倍加との関係性も紹介したい。

2. Spindle assembly checkpoint の機能

ここでは SAC の機能について、動物細胞を例に解説していく。細胞周期の S 期で複製した

染色体を M 期において正確に娘細胞へ等分することは、生物がゲノムを安定して保持するために必須のステップである。E3 のユビキチンリガーゼである Anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) は複製された 2 本の染色体をつなぎとめるコヒーシリングを取り除くことで染色体分離に関わるとともに、Cyclin を分解へと導くことで CDK の活性を低下させ、細胞を M 期中期から後期へと移行させる (Sivakumar and Gorbsky, 2015)。染色体分離を正確に行うためには、ペアとなっている染色体が持つそれぞれのキネトコアに、細胞の別々の極から伸長してくる紡錘体微小管が正しく結合し、均等に引っ張る力が加わる必要がある (Nezi and Musacchio, 2009)。仮に、片方の染色体のキネトコアに微小管が結合することなく染色体分離が始まってしまうと、この染色体は細胞の中央部に残り残されてしまい、分裂後の細胞は不完全な染色体セットを持つことになってしまう。このような状態の細胞を作り出さないようにキネトコアと紡錘体微小管の結合を監視しているチェックポイントが SAC である。SAC は全てのキネトコアに両極からの紡錘体微小管が結合することで均等な力がかかるまで、APC/C の活性を抑制することで細胞の M 期中期から後期への移行を阻害し、細胞が正しい結合状態を作り出すまでの時間的猶予を作り出す (図 1)。このとき SAC に必要なタンパク質複合体は紡錘体微小管と結合していないキネトコアを認識し、局在している。また、APC/C の直接の阻害は、キネトコアに局在している SAC 複合体から作り出される Mitotic checkpoint complex (MCC) が行っていることが知られている (London and Biggins, 2014a)。

このように動物ではその機能の詳細が明らかとなっている SAC であるが、植物にも同様の機構が存在するかは長年わかっていなかった。筆者らは近年、モデル植物であるシロイヌナズナの根の細胞を用いることで、初めて植物にも SAC が存在することを明確に示した (Komaki and Schnittger, 2017)。つまり、野生型の根の細胞では微小管重合阻害剤であるオリザリンを処理すると、細胞周期が M 期中期で停滞するが、SAC を構成する遺伝子の変異体ではそのような停滞は観察されなかった。しかし、後述の通り、中期での停滞が長時間続いた場合の細胞の反応は動植物で大きく異なることも同時に明らかとなった。また、動物では SAC の活性は生存に必須であるが、植物は SAC の活性が消失しても通常の生育条件下では生長に影響は見られず、オリザリン添加時にのみ生育阻害が観察された (Wang et al., 2012; Komaki and Schnittger, 2017)。これは、植物では SAC の活性が生存には必須ではなく、ストレスに晒された時のみ重要な働きを持つことを意味する。

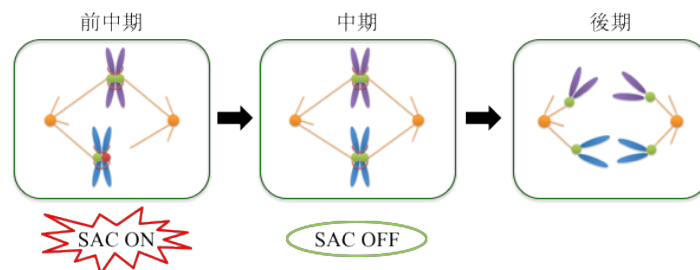


図 1. M 期チェックポイントである SAC の役割

紡錘体微小管との正確な結合が成立していないキネトコア(赤丸)が存在すると、SAC が活性化することで細胞周期が停滞し、時間的猶予を作り出す。一旦すべてのキネトコアが紡錘体微小管と結合すると SAC が解除され、細胞周期が後期へと移行する。

3. Spindle assembly checkpoint の構成因子とキネトコア局在様式

動物の SAC は主に BUB1、BUBR1、BUB3、MAD1、MAD2、MPS1 の 6 つのタンパク質から構成される(London and Biggins, 2014a)。このうち、MAD2 は 2 つのコンフォメーションをとることが知られており、それぞれ closed 型(C-MAD2)と open 型(O-MAD2)と呼ばれている。SAC の活性化に関わる MPS1 は間期には細胞質に局在する(Zhang et al., 2011)。細胞が M 期に入ると、キネトコア構成因子の 1 つである NDC80 を介して、微小管との結合が成立していない染色体のキネトコアに局在し、同じくキネトコア構成因子である KNL1 をリン酸化する。リン酸化された KNL1 は BUB1-BUB3 複合体をキネトコアに局在させる(Shepperd et al., 2012; Yamagishi et al., 2012)。この時、BUB1 は同じく BUB3 と複合体を形成する BUBR1 をキネトコアに局在させる(Millband, and Hardwick, 2002)。次に、MPS1 が BUB1 をリン酸化することで、MAD1-C-MAD2 複合体をキネトコアに呼び込め、全ての SAC 構成因子がキネトコアに局在することとなる(London, and Biggins, 2014b) (図 2)。MAD1 とともにキネトコアに局在した C-MAD2 は、触媒の様に働くことで細胞質中に存在する O-MAD2 を C-MAD2 へと構造の変換を誘導すると考えられている (De Antoni et al., 2005)。C-MAD2 へと変換された MAD2 は BUB3、BUBR1 そして APC/C のコファクターである CDC20 と共に、APC/C の活性を阻害する MCC を形成することで SAC が成立することとなる。MCC に含まれる BUBR1 には保存された 2 つの KEN-BOX (APC/C 認識配列)が存在するにも関わらず、M 期中期では APC/C を介した分解を受けない。そのため、BUBR1 が偽基質として APC/C に取り込まれ、本来の基質との結合が阻害されるため、結果として APC/C の活性が低下する (Burton and Solomon, 2007)。SAC の解除には様々な経路が存在することが知られている。近年、微小管と MPS1 が NDC80 上の同じ領域に結合することが明らかとなった(Ji et al., 2015)。つまり、いったん微小管との結合が確立された NDC80 からは SAC の活性化因子である MPS1 が乖離することとなり、SAC を解除する一因となっていることが示唆されている。

植物にも主要な SAC 構成因子は保存されているものの、その機能や局在様式において動物との違いが明らかとなっている(図 2AB)。まず、動物では M 期にのみキネトコアに局在していた MPS1 が、シロイヌナズナでは間期においても同様にキネトコアに局在しており、どのように SAC の活性化が始まるかはまだわかっていない。また、動物では MPS1 が他の SAC 構成因子のキネトコア局在に関するイニシエーターとして働くことが示されているが (Maciejowski et al., 2010)、シロイヌナズナでは MAD2 のキネトコア局在にのみ必要であり、他の SAC 構成因子の局在には関与しない。次に、動物では MAD1 の局在に必要な BUB1 は Kinase ドメインを持ち、そのリン酸化能は Aurora kinase のキネトコアへの局在に重要であることが知られているが(Ricke et al., 2012)、シロイヌナズナの BUB1 様のタンパク質には Kinase ドメインは存在するものの、MAD1 との結合モチーフが欠失している。実際、筆者らの研究から、植物の BUB1 様のタンパク質は MAD1 のキネトコア局在に必要なことが明らかとなった。さらに配列を詳しく調べたところ、シロイヌナズナに 2 つ存在する BUBR1 様のタンパク質のうちの 1 つに MAD1 の結合モチーフが保存されており、植物体内においてもこの BUBR1 様のタンパク質の 1 つが MAD1 のキネトコア局在に必須であることがわかった。以上の結果より、動物の BUB1 と BUBR1 の機能が植物では 3 つのタンパク質に機能分担され

ていることが示された。そこで、筆者らは植物の BUB1 様タンパク質を BMF1 とし、2 つある BUBR1 様のうち KEN-BOX を保持するものを BMF2、そして MAD1 のキネトコア局在に
関与するものを BMF3 と名付けた(Komaki and Schnittger, 2017) (図 2B)。MAD1-MAD2 複合体
は植物にも存在するが(Ding et al., 2012)、植物の MAD2 が C-MAD2 と O-MAD2 の 2 つの形
態を持つかは明らかとされていない。最後に、シロイヌナズナには 3 つの BUB3 が存在し、
それぞれ BUB3.1、BUB3.2 そして BUB3.3 と呼ばれている(Lermontova et al., 2008)。このうち、
BUB3.1 と BUB3.2 はフラグモプラストの中央部に局在し、キネトコアには存在しないことか
ら、SAC としての機能は持っていないと思われる。一方、BUB3.3 の変異体は他の SAC 変異
体と同様にオリザリンに高感受性を示すことから、SAC の一員として働いていることが示唆
される。

この様に、動植物では主要な SAC の構成因子は保存されているものの、キネトコアへの局
在様式では異なる点も見られる。また、BUB3.1 や BUB3.2、そして BMF3 の様に植物にのみ
保存されたタンパク質が存在することからも、動植物で SAC の制御機構が異なることが予想
される。

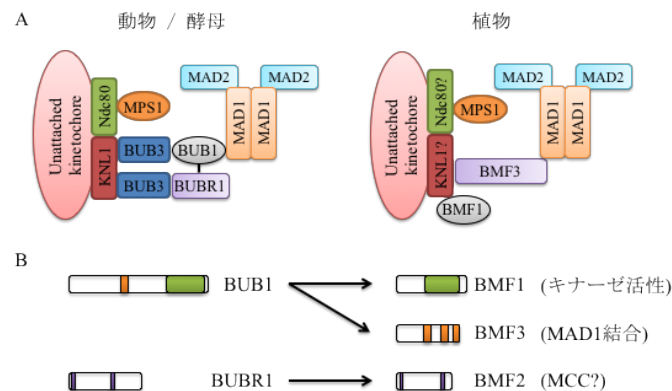


図 2. 動植物における SAC のキネトコアへの局在様式および機能の違い

(A) SAC のキネトコア局在様式。植物の BUB3 は SAC 構成因子のキネトコア局在に
関与しない。(B) SAC 構成因子の機能分化。動物や酵母の BUB1 が保持しているキナーゼドメイン(緑)
と MAD1 結合モチーフ(橙)が、植物では BMF1 と BMF3 に分かれて存在する。また、植物で
は KEN-BOX(紫)を持つ BMF2 が MCC の一員として機能することが示唆される。

(Komaki and Schnittger, 2017 より、改変して転載。)

4. 植物におけるゲノム倍加と Spindle assembly checkpoint の関係性

M 期の動物細胞に高濃度の微小管重合阻害剤を処理すると、紡錘体微小管とキネトコアの
安定した結合が確立できず、SAC によって細胞周期が M 期中期に停滞する。多くの場合、
この停滞が長時間続くと分裂することなくそのまま死んでいく。しかし、ごくわずかな細胞
は SAC が活性化した状態のまま後期に移行することが知られており、この現象を SAC
adaptation または mitotic slippage と呼ぶ(Rossio et al., 2010) (図 3)。ヒトの細胞では、中期での
停滞が約 20 時間経過した細胞に SAC adaptation を起こす傾向がみられるが、起こるまでの時
間は生物種そして細胞種によっても異なることが観察されている(Rieder, and Maiato, 2004)。
SAC adaptation 起こした細胞は、微小管とキネトコアの結合が不完全なまま後期に突入する

ため、2つの娘細胞のどちらにも移行できず中央部に残り残された染色体が生み出されてしまう。一部の染色体を失った娘細胞はアポトーシスによって排除される場合もあれば、そのままガンの形成を行うこともあるため、SAC adaptation は動物細胞にとって非常に不都合な現象として認識されている(Dai et al., 2004)。これまでのところ、この SAC adaptation が起こる理由は不明瞭であるが、1つの可能性として Cyclin の減少に伴う CDK の活性低下が関与していることが示唆されている(Brito, and Rieder. 2006)。動物細胞では SAC の活性化状態においても APC/C の活性阻害が完全ではないため、わずかに残っている APC/C 活性によって Cyclin が徐々に分解されていき、最終的に M 期を維持できるだけの Cyclin-CDK 複合体を形成できなくなる。そのため、長時間 SAC によって中期に停滞した細胞では SAC が活性化したまま CDK の活性低下を招き、細胞の後期への移行つまりは SAC adaptation が引き起こされると考えられる。

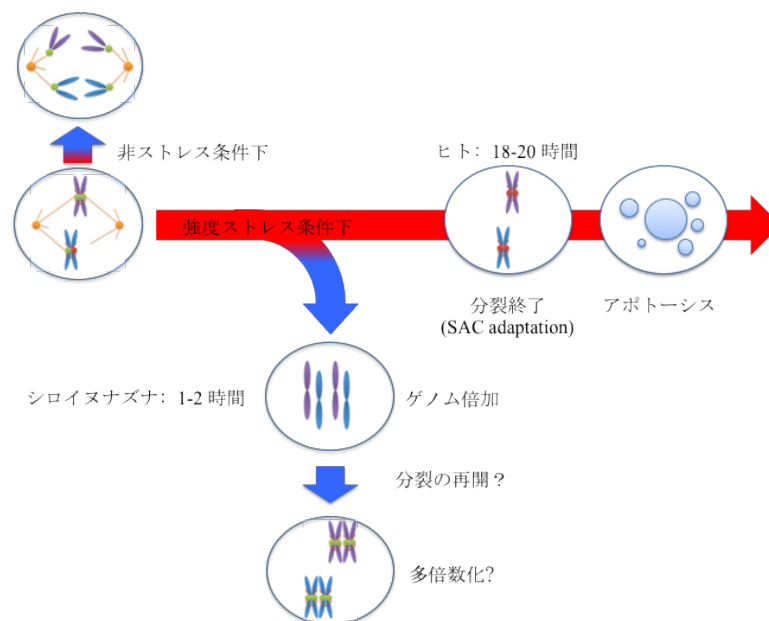
一方、植物では、育種の一環として作物に高濃度の微小管重合阻害剤を処理することでゲノム倍加作物を作り出すことが行われてきた。このような新たに作り出された倍数化作物は、自然界に存在する倍数化植物と比べると、次世代において異数体を形成する頻度が高い問題を抱えているが、動物とは異なり減数分裂を介して子孫を残すことが可能である (Song et al., 1995; Comai et al., 2000)。さらに近年の研究から、現存する全ての種子植物はその進化の過程で少なくとも3度のゲノム倍加を起こしていることが明らかとなった(Jiao et al., 2012)。つまり、ゲノム倍加が容易に起こる性質は植物が元来有している有用な特徴であり、農学的そして生物学的にも非常に興味深い特徴であるが、その分子機構は分かっていなかった。筆者らはシロイヌナズナを用いて、高濃度の微小管重合阻害剤の処理が及ぼす植物細胞への影響を観察したところ、細胞は紡錘体を形成出来ず SAC による中期での停滞を起こした(Komaki and Schnittger, 2017)。しかし、動物細胞とは異なり高濃度の微小管阻害剤を処理し続けても、わずか90分後には SAC の活性が消失することが明らかとなった。さらに驚くことに、SAC が解除された細胞は2つに分裂することなく、S 期に複製され2倍に増えている染色体を全て含んだ1つの細胞に戻ることがわかった(図3)。これは細胞内のゲノムが倍加したことを意味する。実際、1つに戻った細胞を観察してみると、通常は10本であるはずの染色体が20本に増加していることが確認された。つまり、古くから行われているゲノム倍加作物の作製過程においても同様に、紡錘体ができない条件下で SAC が解除されることによって染色体数の倍数化が引き起こされていることが示唆される。

このように動植物では、紡錘体が正常に形成できないストレス状態が続いた時の反応が異なることが明らかになりつつある。しかし、植物がストレス条件下において SAC を解除する制御機構は未だわかっていない。また、その後起こるゲノム倍加の生物学的意義についても今後検討していく必要がある。

5. 展望

SAC が発見されて30年近く経つにもかかわらず、植物においてはその存在自体が明らかになっていなかった。筆者らはモデル植物であるシロイヌナズナを用いることで、植物が SAC を持つことを初めて明確に示すとともに、その性質が動物と異なることを明らかとした。

まず、動物では分裂期において、MPS1 が細胞質からキネトコアへと移動することが SAC の活性化に重要であることが知られているが、植物の MPS1 は細胞周期を通じて常にキネトコアに局在していた。これは動植物において SAC の活性化機構が異なることを示唆する。動物では NDC80 を介して MPS1 がキネトコアに局在することが明らかになっているが、植物で同じ経路が働いているかはわかっていない。その大きな原因として、植物のキネトコアを構成するタンパク質群がほとんど明らかになっていないことが挙げられる。動物では 100 個以上のタンパク質がキネトコア形成に関わっていることが知られており (Cheeseman, and Desai, 2008)、キネトコアと紡錘体微小管の結合を監視する SAC の制御機構を明らかにするためには、植物のキネトコアを構成するタンパク質を網羅的に探索していく必要があると思われる。次に、植物は BMF3 と呼ばれる植物特有の SAC 構成因子を持つことがわかった。BMF3 は、動物の BUB1 が持つ 2 つの主要な機能のうち、MAD1 をキネトコアに局在させる機能のみを保持しており、もう 1 つの機能であるキナーゼ活性は BMF1 が受け持っている。なぜこの様に機能分担が起こったかはわかっていないが、植物にのみ広く保存されている特徴であるた



め、さらなる解析を続けることで植物特有の SAC の制御機構の解明に繋がることが期待される。

図 3. 強度のストレス条件下における動植物細胞の反応の違い

通常、細胞は SAC を ON(赤矢印)から OFF(青矢印)にした後で、後期に移行する。しかし、強度のストレス条件に晒された動物細胞の一部は SAC を解除することなく後期に移行してしまい(SAC adaptation)、アポトーシスによって排除される、もしくは細胞のガン化を引き起こす。一方、シロイヌナズナは強度のストレスに晒されているにも関わらず短時間で SAC を解除する。この時、細胞は分裂を行わず S 期で複製した染色体を全て保持した 1 つの細胞に戻る。その後、倍加した細胞が分裂を再開することで、多倍数化が引き起こることが示唆される。

動植物の SAC に関してのもっとも大きな違いは、ストレスが継続し細胞分裂が中期で長時間停滞した場合の応答において観察された。動物細胞が長期のストレスに晒されると、SAC

が活性化したままアポトーシスによって排除される、もしくは SAC adaptation が起こることによって後期へと移行してしまうことが知られている。一方、植物では同様のストレス条件下において SAC の解除が起こるとともに細胞は分裂することなく、元の 1 つの細胞に戻ることでゲノム倍加を起こすことがわかった。この現象は植物がゲノム倍加を高頻度に起こす性質をうまく説明できると考えられるが、ゲノム倍加を起こした細胞が次世代に伝わるためには、減数分裂を乗り越える必要がある。しかし、倍加を起こした生物は相同染色体の数が増えてしまっていることにより、染色体を均等に分離することが困難である。そのためチェックポイントによって減数分裂が停滞してしまい、次世代を残すことがほとんど不可能である。これまでのところ、植物の減数分裂に機能的な SAC が存在するかは確認されていないが、ゲノム倍加した植物は異数体を形成する頻度は高くなるものの、次世代を残すことが可能である。これは体細胞分裂で観察されたように、ゲノム倍加植物の減数分裂においても分裂が停滞した場合に、SAC を解除する機構が存在することが示唆される。さらなる研究によって詳細が明らかになれば、ゲノム倍加作物が次世代で作り出す異数体の頻度を低下させることも出来ると期待される。

6. 謝辞

本稿で取り上げた、植物における Spindle assembly checkpoint の研究に従事する機会を与えてくださった、Hamburg 大学の Arp Schnittger 教授に心より感謝申し上げます。

7. 引用文献

- Barnum, J., O'Connell, M.J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol. Biol.* 1170: 29-40
- Brito, D.A., and Rieder, C.L. (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* 16: 1194-1200.
- Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2007). Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APCCdc20 in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev.* 15: 655-67.
- Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9: 33-46.
- Comai, L., Tyagi, A.P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S.H., Stevens, Y., and Byers, B. (2000). Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids. *Plant Cell* 12: 1551-68.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y.M., Xu, M., and Rao, C.V. (2004). Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res.* 15: 440-5.
- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., and Musacchio, A. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* 15: 214-225.
- Ding, D., Muthuswamy, S., and Meier, I. (2012). Functional interaction between the Arabidopsis orthologs of spindle assembly checkpoint proteins MAD1 and MAD2 and the nucleoporin NUA.

Plant Mol. Biol. 79: 203-216.

- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 9: 507-17.
- Ji, Z., Gao, H., and Yu, H. (2015). CELL DIVISION CYCLE. Kinetochore attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* 348: 1260-1264.
- Jiao, Y., Wickett, N.J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A.S., Landherr, L., Ralph, P.E., Tomsho, L.P., Hu, Y., Liang, H., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Clifton, S.W., Schlarbaum, S.E., Schuster, S.C., Ma, H., Leebens-Mack, J., dePamphilis, C.W. (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473: 97-100.
- Komaki, S., and Schnittger, A. (2017). The Spindle Assembly Checkpoint in Arabidopsis Is Rapidly Shut Off during Severe Stress. *Dev. Cell* 23: 172-185.
- Kops, G.J., Weaver, B.A., and Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 5: 773-85.
- Lermontova, I., Fuchs, J., and Schubert, I. (2008). The Arabidopsis checkpoint protein Bub3.1 is essential for gametophyte development. *Front. Biosci.* 13: 5202-5211.
- Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 9: 519-31.
- London, N., and Biggins, S. (2014a). Signaling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 736-747.
- London, N., and Biggins, S. (2014b). Mad1 kinetochore recruitment by Mps1- mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 28: 140-152.
- Maciejowski, J., George, K.A., Terret, M.E., Zhang, C., Shokat, K.M., and Jallepalli, P.V. (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* 12: 89-100
- Millband, D.N., and Hardwick, K.G. (2002). Fission yeast Mad3p is required for Mad2p to inhibit the anaphase-promoting complex and localizes to kinetochores in a Bub1p-, Bub3p-, and Mph1p-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2728-2742.
- Nezi, L., and Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol.* 21: 785-95.
- Ricke, R.M., Jeganathan, K.B., Malureanu, L., Harrison, A.M., and van Deursen, J.M. (2012). Bub1 kinase activity drives error correction and mitotic checkpoint control but not tumor suppression. *J. Cell Biol.* 10: 931-49.
- Rieder, C.L., and Maiato, H. (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* 7: 637-51.
- Rossio, V., Galati, E., and Piatti, S. (2010). Adapt or die: how eukaryotic cells respond to prolonged activation of the spindle assembly checkpoint. *Biochem. Soc. Trans.* 38: 1645-9.
- Shepperd, L.A., Meadows, J.C., Sochaj, A.M., Lancaster, T.C., Zou, J., Buttrick, G.J., Rappsilber, J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B. (2012). Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr. Biol.* 22: 891-899.
- Sivakumar, S., and Gorbsky, G.J. (2015). Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting

complex in mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 82-94.

Song, K., Lu, P., Tang, K., and Osborn, T.C. (1995). Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15: 7719-23.

Wang, M., Tang, D., Luo, Q., Jin, Y., Shen, Y., Wang, K., and Cheng, Z. (2012). BRK1, a Bub1-related kinase, is essential for generating proper tension between homologous kinetochores at metaphase I of rice meiosis. *Plant Cell* 24: 4961-4973.

Yamagishi, Y., Yang, C.H., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat. Cell Biol.* 14: 746-752

Zhang, X., Yin, Q., Ling, Y., Zhang, Y., Ma, R., Ma, Q., Cao, C., Zhong, H., Liu, X., and Xu, Q. (2011). Two LXXLL motifs in the N terminus of Mps1 are required for Mps1 nuclear import during G(2)/M transition and sustained spindle checkpoint responses. *Cell Cycle* 10: 2742-2750.

陸上植物の中心体と鞭毛

嶋村正樹

広島大学大学院理学研究科生物科学専攻

〒739-8526 東広島市鏡山1-3-1

Masaki Shimamura

Centrosomes and flagella in land plants

Key words: basal body, centriole, centrosome, flagella, land plants

Department of Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University

Kagamiyama 1-3-1, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9c8.00147

1. はじめに

植物細胞の特徴として、葉緑体と細胞壁を持つことに加え、動物細胞でみられるような中心体 (centrosome) を持たないことがあげられる。動物細胞における中心体は細胞周期を通じて細胞内の主要な微小管形成中心である。細胞分裂期においては、紡錘体極に位置し、紡錘体微小管の形成、核分裂軸、細胞質分裂面決定に重要な役割を果たす。これに対し植物細胞は恒常的な微小管形成中心を持たず、紡錘体は1点に収束しない分散した極を持つ(Smirnova & Bajer 1992; Wasteneys 2002)。しかし、厳密に言えば、中心体がないことは被子植物の細胞の特徴であり、緑色植物の大部分(緑藻類, 車軸藻類, コケ・シダ植物, 一部の裸子植物)では中心体やそれに類似の構造が知られている。また、中心体の有無は、鞭毛を備えた遊泳性の細胞の有無とよく相関している。陸上植物のうちコケ植物とヒカゲノカズラ類の精子はほとんどの場合2本の鞭毛をもつ。大葉シダ類と一部の裸子植物(イチョウ綱・ソテツ綱)では精子は数十~数万本の鞭毛をもつ(図1)。これらの植物では、内部に中心小体(centriole)を備えた中心体やそれに類似の構造が、精子形成過程で細胞内に一過的に出現し、内部の中心小体が鞭毛基部の基底小体(basal body)へと変化する。一方、精細胞が花粉管を通じて直接卵細胞に送り届けられる現生の種子植物では、精細胞は中心小体も鞭毛も持たない。

植物における中心体、鞭毛に関する研究は、植物の生殖様式の進化、陸上植物特有の微小管系の起源・多様化・中心体の消失を考える上で重要な情報を提供すると考えられる。本総説では、植物における中心体の定義、中心小体、基底小体、鞭毛、スプラインなど、陸上植物の遊泳性精子の微小管系について、研究史と最近の知見についてまとめた。

2. 中心体とは何か

中心体は、微小管から構成された一対の中心小体(中心粒, centrioles)とその周囲を取り囲む不定形の中心体周辺物質(pericentriolar material: PCM)からなる構造である。内部の中心小体は9本の短い3連微小管が回転対称に並んだ直径約200 nmの柱状の構造体である。典型的な動物細胞では2つの中心小体はリンカータンパク質で連結されており、互いに直交する方向に配置する。

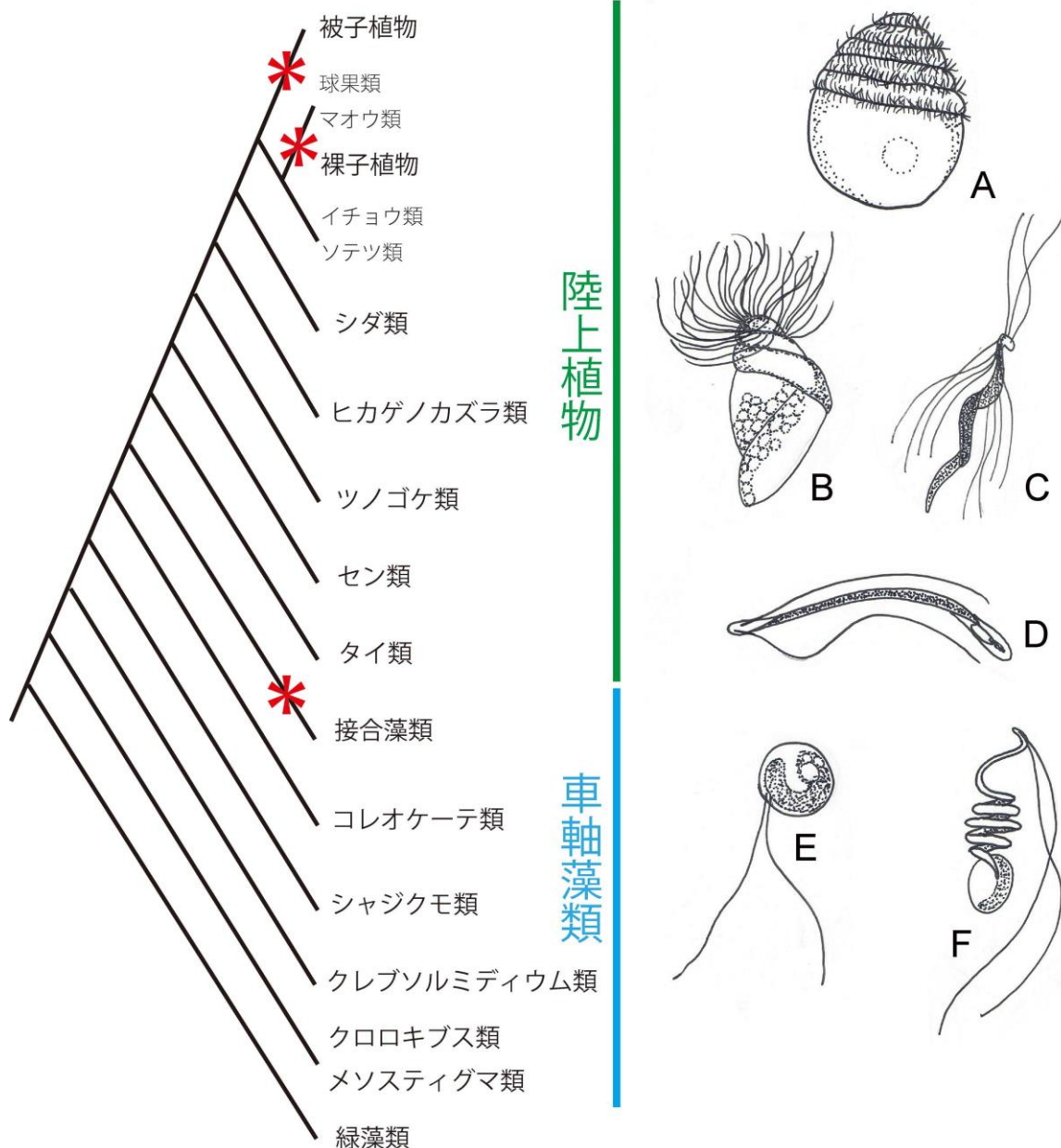


図1. ストレプト植物の系統関係(左図)と精子の形態(A~F)。系統樹中の星印は鞭毛・繊毛をもたない系統群を示す。接合藻類に加え、裸子植物と被子植物の系統基部で鞭毛・繊毛の消失が独立におきたと考えられる。A: ザミア(裸子植物)の精子。B: スギナ(シダ類)の精子。C: ミズニラ(ヒカゲノカズラ類)の精子。D: スギゴケ(セン類)の精子。E: コレオケーテの遊走子。F: シャジクモの精子。Hodges et al. 2012, 湯浅 1969 を改変写。

そのような中心小体は細胞分裂時に半保存的複製され、娘細胞に一對ずつ配分され、鞭毛・繊毛など、微小管を軸系としてもつ突起構造が形成される際には、それらの形成起点である基底小体へと変化する。中心小体を取り巻く、多数のタンパク質からなるPCMでは、 γ チューブリンリング複合体(γ -tubulin ring complex: γ -TuRC)が微小管の重合核として機能し、分裂間期の細胞質内の微小管網や分裂期の紡錘体などが中心体を起点として構築される。つまり、中心体は構造的に二重性(中心小体・PCM)があるだけでなく、機能的(基底小体形成・細胞質微小管形成)にも二重性がみとめられる。陸上植物の中心小体は、精子形成時のみ一過的に出現し、鞭毛の基底小

体となるため、生活環を通じて紡錘体形成に必須の構造ではないことは明らかである。実は中心小体は、様々な動物においても紡錘体の形成自体には必須でないことが示されている。昆虫の精子形成時には、中心小体が鞭毛を生じた基底小体へと変わった後に、紡錘体が形成され、その極には中心小体がないことが観察されている (Yamashiki & Kawamura 1998)。ほ乳類培養細胞において実験的に中心小体の除去を行った場合 (Khodjakov et al. 2000)、中心小体の複製を阻害した場合 (Basto et al. 2006) などでも、二極性の機能的な紡錘体が形成される。ただし、動物細胞では紡錘体の形成位置が細胞質分裂面の位置を規定するため、中心体の存在は正確な細胞質分裂面の決定に重要である (Rappaport 1986)。一方、陸上植物の細胞では、紡錘体の形成位置は細胞質分裂面の決定にあまり重要ではなく、核分裂の前に、分裂準備微小管帯 (preprophase band of microtubule; PPB) の形成位置によって決定される (Mineyuki 1999)。

構造と機能の二重性を備えた、中心小体を含む中心体の存在は、真核生物全般で保存的といえるが、いくつかの系統群では進化の過程を通じて、中心小体は完全に失われている。真菌類では子囊菌や担子菌といった主要分類群が分岐する以前に中心小体が生活環から失われている。その代わりに酵母菌の Spindle Pole Body (SPB) に代表される、核膜上に存在し中心小体をもたない微小管重合中心が知られている (Celio et al. 2006)。光合成生物では、すべての紅藻類、一部の緑色植物は生活環を通じて中心小体をもたない。このことは、それらの生物が遊泳性の細胞をもたないことと対応している (Yubuki & Leander 2013)。中心小体が様々な系統群で失われた一方で、 γ -チューブリンを含むタンパク質複合体は、すべての真核生物で微小管重合中心として機能していると考えられる (Farache et al. 2018)。中心体 (中心小体) をもたない植物では、 γ -チューブリンを含むタンパク質複合体が既存の微小管上に配置し、そこから新たな微小管が形成されることが紡錘体形成に重要な役割を担っていると考えられている (Murata et al. 2007; Hotta et al. 2012)。

中心小体は、既存の中心小体の半保存的複製によって細胞内に常に 1 対以上の数が維持されるのが普通であるが、*de novo* に出現 (新生) することもある。陸上植物では有鞭毛の精子形成時のみ、精子の鞭毛数に応じた数が一過的に出現し、栄養組織の細胞分裂に関与することはない。扁形動物などでも繊毛の形成時のみ中心小体が出現する例がある (Azimzadeh et al. 2012)。脊椎動物でも、実験的に細胞質中の中心小体の除去や破壊を行うと、既存の中心小体の存在に依存せず、新たに中心小体が形成される。多細胞動物では、多数の繊毛をもつ細胞が分化する際に、多くの中心小体が球状の電子密度の高い構造の内部で形成されることが観察されており、この構造は中心体とは区別してデューテロソーム (deuterosome) とよばれている。一般に、デューテロソームは中心体と異なり、中心小体の複製を経ず新生的に形成されることが考えられている (Sorokin 1968; Zhao et al. 2013)、多数の中心小体が既存の 1 つの中心小体の複製に由来するという報告もある (Al Jord 2014)。

電子顕微鏡観察が発達する以前から、コケ・シダ・裸子植物の精母細胞の分裂極には星状体構造が現れ、内部の強染色性の構造がのちに、鞭毛の基部に位置するようにみえることが観察されていた。この星状体構造は、細胞内に常時存在する動物細胞の中心体とは区別して「生毛体」 (blepharoplast) と呼ばれてきた (Webber 1901; Ikeno 1905; Lepper 1956; 湯浅 1969)。現在は電子顕微鏡による観察から、生毛体の内部に、精細胞で形成される鞭毛の数に応じた数の中心小体が存在することが分かっており、生毛体は中心体と相同の構造とみなされている (Mizukami et

al.1966)。ただし、現在もシダ植物や裸子植物でみられる多数の中心小体を持った球状の微小管形成中心は、中心体ではなく生毛体（ブレファロプラスト）とよばれることが多い（図 2D）。コケ植物の精子形成時の球状の微小管形成中心は他の真核生物の中心体と同様に 1 対の中心小体のみ生じるため、中心体とよばれることが多い（図 2B）。

以上のように、構造・機能の二重性のため「中心体」の定義は難しい面があり、動物細胞でも中心体の存在様式には様々なものがある。Mazia (1984, 1987)のように、中心小体の有無ではなく、中心体の微小管形成中心としての機能を重要視し、被子植物で典型的にみられる分散した紡錘体極さえも「中心体」(flexible centrosome)と解釈する考え方もある。本稿では、陸上植物において、内部に 1 対の中心小体をもつ構造を「中心体」とよぶこととする。1 対以上の中心小体を持つ、機能的に相同な構造は「生毛体」とよぶ。中心体、あるいは生毛体は陸上植物では、コケ植物、シダ植物、裸子植物（イチョウ綱，ソテツ綱）に限って存在する。

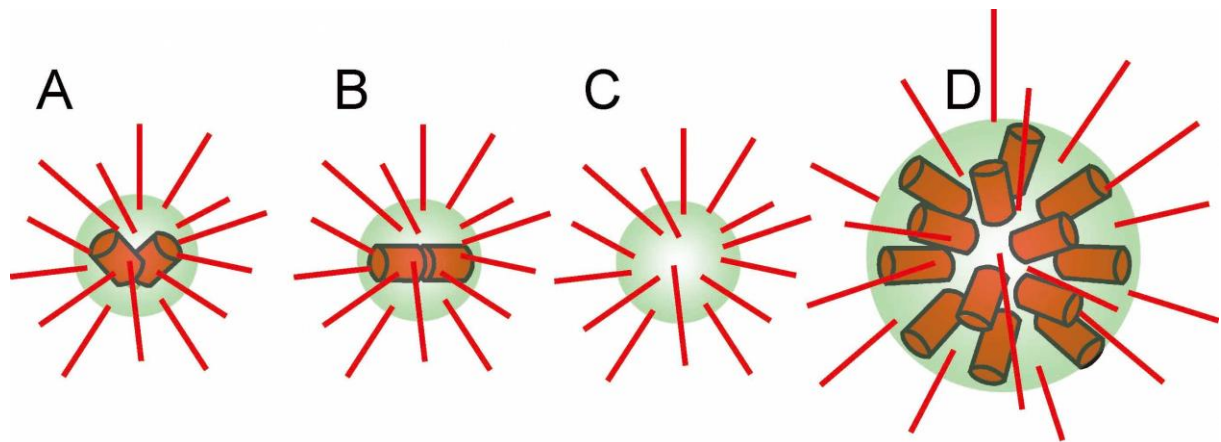


図 2. 緑色植物でみられる中心体やそれに類似した構造。A. 直交する一対の中心小体を含む中心体（緑藻類）。B. 直列二中心小体を含む中心体（シャジクモ・コケ・ヒカゲノカズラ類）。C. 中心小体を含まない極形成体（コケ植物タイ類）。D. 多数の中心小体を含む生毛体（シダ類・裸子植物）。

3. 鞭毛とは何か

鞭毛 (flagellum) については、原核生物と真核生物で類似の機能を持つ、全く異なるオルガネラに対し、同じ名称が使われている。細菌類の鞭毛がフラジェリンタンパク質からなり、基部で鞭毛自身が回転するのに対し、真核生物の鞭毛では微小管からなる鞭毛軸糸 (axoneme) がそれを連結するダイニンとの相互作用により屈曲する。真核生物では電子顕微鏡による観察技術が発達する以前から、遊泳の駆動力や周囲への水流を作り出す、単独あるいは複数の突起構造について、数、長さ、機能や動きの違いに基づいて、鞭毛 (flagellum, pl. flagella) と繊毛 (cilium, pl. cilia) という用語が使い分けられてきた。flagellum と cilium はそれぞれ語源が whips (鞭) と eyelashes (まつ毛) であり、数が少なく細胞に比して長い場合には「鞭毛」、多数存在し細胞に比して短い場合には「繊毛」と使い分けることも多い。ただし、真核生物の鞭毛と繊毛について、電子顕微鏡レベルでの断面の微細構造に両者の明確な区別点は認められない。動きの違いについても、鞭毛運動と繊毛運動に大別されてきたが、実際には、生物ごとに独特な動きがあり、明確に分けることはできない。用語の混乱をさけるため、真核生物の鞭毛には繊毛とともに原核生物とは別の用語 (undulipodium など) をあてるべき (Margulis 1980 など) との意見もある。また、真核生物の鞭毛・

繊毛を区別せず「シリア」(cilium, cilia)と表記している例も多い。本稿では、Renzaglia & Garbary (2001)などに倣って、陸上植物の同様の構造は、多数ある場合でも「鞭毛」が多数化したものと解釈し、すべて「鞭毛」(flagellum, pl. flagella)と表記する。

真核生物の鞭毛の断面を電子顕微鏡で観察すると、9本の2連微小管が2本の微小管を取り囲んでいる特徴的な構造が観察できる(9+2構造)(図3右側)。このような微小管からなる軸糸構造の本数や配向は幅広い生物群でよく保存されている。鞭毛の進化的起源として、スピロヘータ様の共通生物が真核生物の祖先に共生したとの考え方(Sagan 1967)があるが、葉緑体・ミトコンドリアの共生起源説と比べて広く支持されているとはいえない。

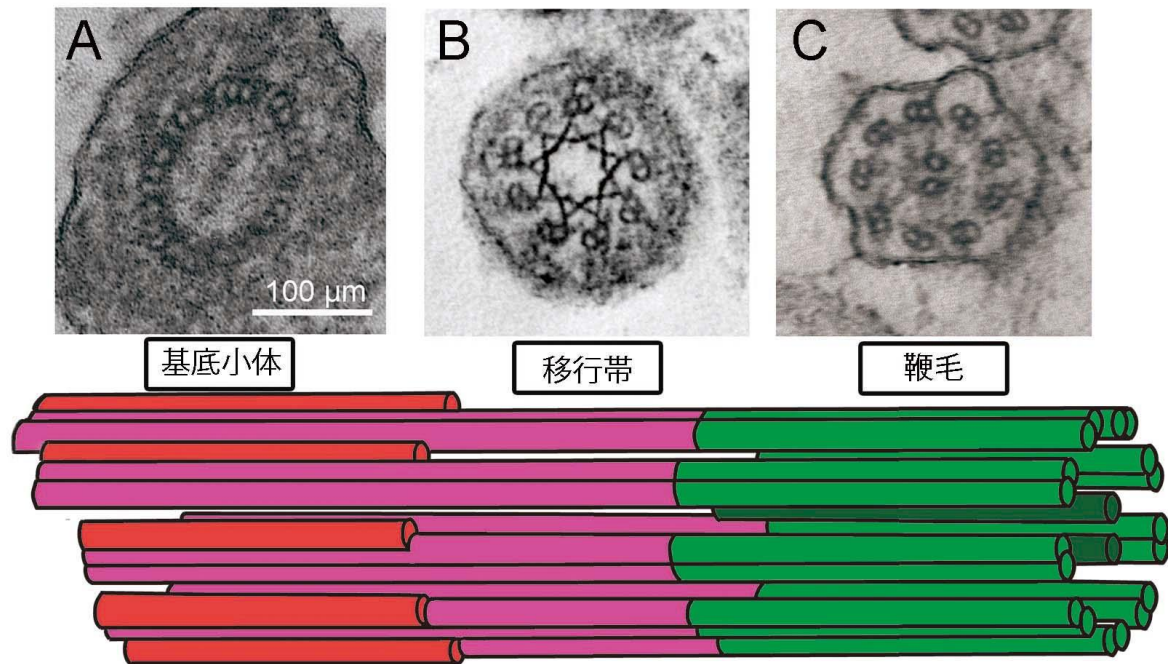


図3. 緑色植物の鞭毛基部の微小管の配行。基底小体側は9本の3連微小管(A管, B管, C管)が回転対称に配置している。鞭毛の移行帯ではC管が消失し、9本の2連微小管となり、中央に2本の微小管対が現れる。上列のa, b, c, は、ゼニゴケ精子の鞭毛基部で3領域に対応する部位の横断切片を示す。移行帯では、特徴的な星型の構造が存在する。

4. 陸上植物の中心小体・鞭毛を構成する微小管

陸上植物においても、中心小体・基底小体は9本の短い3連微小管からなり、鞭毛を構成する微小管構造も、9本の2連微小管が2本の微小管を取り囲んでいる点で、他の真核生物とよく似ている。鞭毛軸糸の中心の2本の微小管からはradial spokeが周囲の9本の2連微小管に伸びており、2連微小管同士はネキシンで接続されている。2連微小管のA管からはダイニン腕が伸びており、モーターヘッドドメインが隣の2連微小管のB管に隣接するように配置している。緑藻類では1本の2連管を除いて、ダイニンには外腕と内腕が存在するが、ストレプト植物(車軸藻類と陸上植物)ではすべての2連管で外腕を欠いている(Hyams & Campbell 1985)。鞭毛の最基部は、中心小体由来の部分であり、基底小体(basal body, kinetosome)と呼ばれ、鞭毛の駆動部とは断面の構造が異なっている(図3左側)。基底小体の近位側(proximal end)は中心小体と同様に、回転対称に配置した9本の3連微小管(A管, B管, C管)からなる。しかし、鞭毛へ接続される遠位側(distal end)の移行帯(接続領域)ではC管が消失し、9本の2連微小管がみられる。緑色植

物ではツノゴケ類を除き、この移行帯に特徴的な星型の構造が存在する(図3中央部)。他の真核生物の移行帯では、Y型リンカー(Y-links)とよばれる、2連微小管を鞭毛の原形質膜に結びつける構造が特徴的に見られるが、陸上植物はこれを欠く(Barker et al.2014)。鞭毛の基部とその周辺の構造は、鞭毛装置(flagellar apparatus)とよばれ、微小管やそれ以外の繊維状構造からなる、各分類群に特徴的な構造がみられる。

5. 緑色植物の細胞分裂装置、鞭毛装置の多様性

緑色植物の細胞分裂装置、鞭毛装置の比較研究は、細胞分裂や鞭毛装置に大きく2つのタイプがあることを明らかにしてきた。緑藻類の多くが、核分裂時に核膜が崩壊せず、ファイコプラストによる求心的な細胞質分裂を行うのに対し、車軸藻類や陸上植物では、核分裂時に核膜が崩壊し、フラグモプラストによる遠心的な細胞分裂を行う(Stewart et al.1973; Pickett-Heaps 1975)。鞭毛装置については、緑藻類では2つの基底小体が交差・対向するような角度で配置し、鞭毛根とよばれる構造が細胞質内にX字型に配置する例が多い(Mattox & Stewart 1984)。一方、車軸藻類と陸上植物では、2本の基底小体が平行やそれに近い形に並び、その下に多数の微小管が帯状に並び、さらにその下に3層の層状構造が積み重なっている(Carothers & Kreitner 1968; Kreitner & Carothers 1976; Graham & McBride 1979)。これは多層構造体(Multilayered structure: MLS)とよばれる(図4G)。車軸藻類と陸上植物のこれらの微細形態の類似性は両者を合わせたストレプト植物の単系統性を支持する形質として知られている(Pickett-Heaps 1975)。MLSの最上層のスプラインが微小管からなることを除けば、MLSを構成する要素についてはよくわかっていない。

藻類では鞭毛の表面に鱗片や小毛など分類群ごとに特徴的な修飾構造がみられるが、陸上植物では知られていない。藻類を含めれば細胞分裂装置、鞭毛や鞭毛装置の多様性はさらに多岐に及ぶが、本稿では主に、車軸藻類と陸上植物を合わせたストレプト植物の中心体と鞭毛について紹介する。系統関係からはストレプト植物において、中心体と鞭毛の生活環からの完全な消失が、接合藻類、球果類、被子植物の系統で独立に起きたことが示唆される(図1)。車軸藻類、コケ植物、シダ植物、裸子植物では、中心体の出現過程、鞭毛の数、配置などについて様々な例が知られる(Garbarý et al. 1993; Renzaglia et al. 2000; Renzaglia & Garbarý 2001)。以下、各分類群の精子形成過程について微小管細胞骨格系を中心に紹介する。

6-1. 車軸藻類

車軸藻類の精子や遊走子は後方に伸びた2鞭毛をもつ。細胞壁は持たないが、鞭毛を含めた細胞膜表面に四角形の鱗片が認められることが多い(Duncan et al. 1997)。車軸藻類のうち単細胞～細胞塊のメソスティグマ(Mesostigma)やクロロキブス(Chlorokybus)、多細胞であるが、どの細胞からも遊走子を形成しうるクレブソルミディウム(klebsormidium)とコレオケーテ(Coleochaete)は、多くの緑藻類と同様に、半保存的複製により維持される中心小体を持っており、2つの中心小体が直角に並ぶように存在する様子が観察されている。このような中心体は紡錘体形成の微小管形成中心としても働き、内部の中心小体は鞭毛の基底小体となる(Graham & Wedemayer 1984; Graham & Repavich 1989)。一方、シャジクモ目(Charales)では、栄養組織の紡錘体極は被子植物と同様に幅の広い極をもった樽型で、そこに中心小体を持った中心体がみとめら

れない (Pickett-Heaps. 1967, 1968)。シャジクモ目の中心小体は、精子形成の直前に新生的に出現すると考えられている (Pickett-Heaps. 1967)。車軸藻類の精子では2つの基底小体は有紋繊維で結合しているが、緑藻類で見られるような、核と基底小体を結ぶような構造 (リゾプラスト) は存在しないとされる (Turner 1968; Vouilloud et al. 2005)。車軸藻類のクレブソルミディウムやコレオケーテ目では遊走子や精子が球形や卵型の外形を持つが、シャジクモ目の精子は細長く螺旋状であり、鞭毛が後方に伸びるような基底小体の配置も陸上植物のものとよく似ている (Marchant et al. 1973)。細長い外形で鞭毛が後方に伸びた精子は、シャジクモ目の生卵器や、コケ・シダ植物の造卵器を通過するために必要な形態変化であったかもしれない。クラミドモナスで見られるような障害物に衝突した際にみられる後退遊泳が欠如していることも、生卵器や造卵器の獲得と関連があるかもしれない (Sakaushi et al. 2003)。クラミドモナスのダイニン外腕欠失変異体で、障害物に当たった時の後退遊泳を欠くこと (Kamiya & Okamoto 1985) は、ストレプト植物の精子の軸糸がダイニン外腕を欠くことが、陸上植物系列での精子の運動様式の変化と関わっている可能性を示唆する。

6-2. コケ植物

コケ植物では、中心体が精子形成の際、精母細胞中に一過的に出現し、紡錘体極の微小管形成中心として機能する。中心体の内部には2つの中心小体が直列につながった直列二中心小体 (bicentrioles) という構造がみとめられる (Moser & Kreitner 1970) (図 4C,D)。同様の構造の中心小体は、シャジクモ目の精母細胞でも観察される (Turner 1968)。タイ類では直列二中心小体は精細胞中で2つに分離し、基底小体となり、そこから2本の鞭毛が形成される (Robbins 1984)。精細胞が精子へと変態する過程で、細胞質の縮小、核の変形と凝集、精子特有の微小管構造 (基底小体、鞭毛、スプライン) の形成がおこる。完成した精子は、頭部の細胞質に1つのミトコンドリアがあり、多層構造体に接する基底小体から後方に向けて2本の鞭毛が平行に伸びている。緑藻類で見られる基底小体同士を結ぶ繊維状構造はないか痕跡的である。長い胴体部は凝集した核が大部分を占めており、核に沿うようにスプラインとよばれる微小管が帯状に配向する (Kreitner 1977a,b) (図 4H)。尾部の細胞質には1つの色素体と1つのミトコンドリアがある。

筆者らが観察したコケ植物 (ゼニゴケ) の精子形成過程・完成した精子の模式図を図5に示す。精子形成過程、精子の形態は、コケ植物の3群 (セン類・タイ類・ツノゴケ類) でよく似ているが、分類群ごと、種ごとの形態の違いもみとめられる。ツノゴケ類の1種では、精細胞が形成される二回前の細胞分裂時に一对の直列二中心小体 (4つの中心小体) が出現し、最終的に精細胞には1つの直列二中心小体 (2つの中心小体) が配分される (Vaughn & Renzaglia 1998)。中心小体の数、出現の様式、タイミングなどには多様性がある可能性があり、さらなる研究が必要であるが、これまでの研究は、コケ植物の中心小体は例外なく直列二中心小体として出現し、その後の細胞分裂周期を通じて複製されることがないことを示している。直列二中心小体が精細胞に1つずつ配分されることは、コケ植物が2本の鞭毛をもつことと対応しているが、4本鞭毛をもつ種類の報告 (Shimamura et al. 1999, 2015) もある。蘚類とタイ類では2つの基底小体は、前後にずれて平行に隣接して並ぶが、ツノゴケ類では、前後のずれはなく、互いに離れて配置する。ほとんどのコケ植物で精子の核は緩やかに左螺旋を描いて伸長しているがツノゴケ類だけは例外に右螺旋

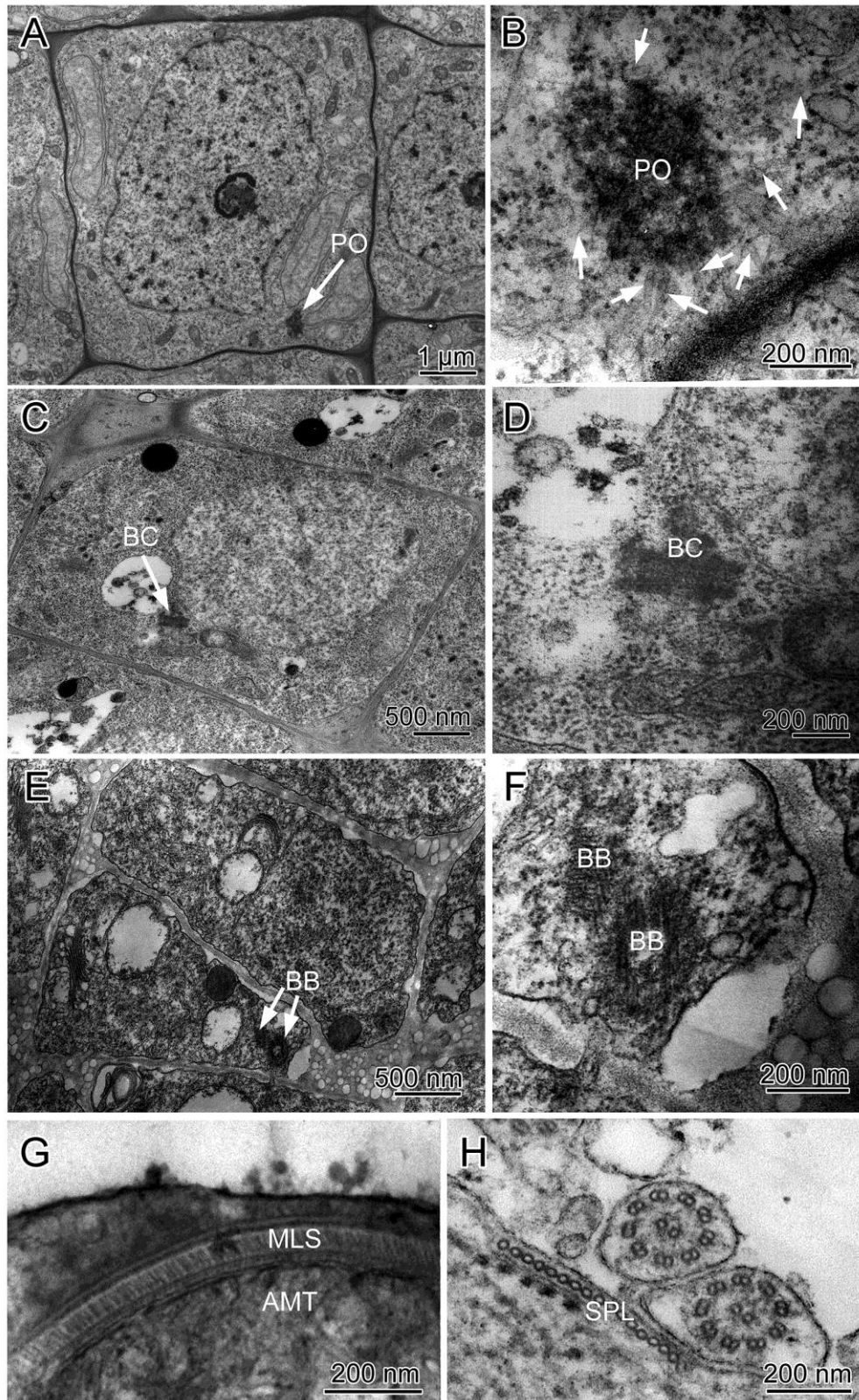


図4. 透過電子顕微鏡で観察したコケ植物の精子形成時にみられる微小管系。A: 精原細胞（ケゼニゴケ）。核近傍に極形成体（PO; 矢印）が存在する。B: 極形成体の拡大像。電子密度の高い球状の領域から微小管（矢印）が伸びている。C: 精母細胞（ゼニゴケ）。直列二中心小体（BC; 矢印）が出現する。D: 直列二中心小体（BC）の拡大像（ゼニゴケ）。E: 精細胞の基底小体（BB）。F: 基底小体（BB）の拡大像（ゼニゴケ）。直列二中心小体は2つに分離し、基底小体となる。G: 多層構造体（MLS）（ゼニゴケ）。多数の微小管が一層に配列したスプライン（SPL）とそれを裏打ちする層状構造からなり、頭部ミトコンドリア（AMT）と密着している。H: スプライン微小管（SPL）（ケゼニゴケ）。

旋 (dextral)である (Renzaglia & Duckett 1989)。胴体部のスプライン微小管は通常 10 本から数 10 本であり、コケ植物の種ごとに違いがみられる (Renzaglia & Duckett 1987)。コマチゴケ属 (*Haplomitrium*)では、核の凝集の程度が低く、太い胴体部を持ちスプライン微小管は 100 本以上存在する、また頭部や尾部のミトコンドリアや葉緑体は複数個になっている。

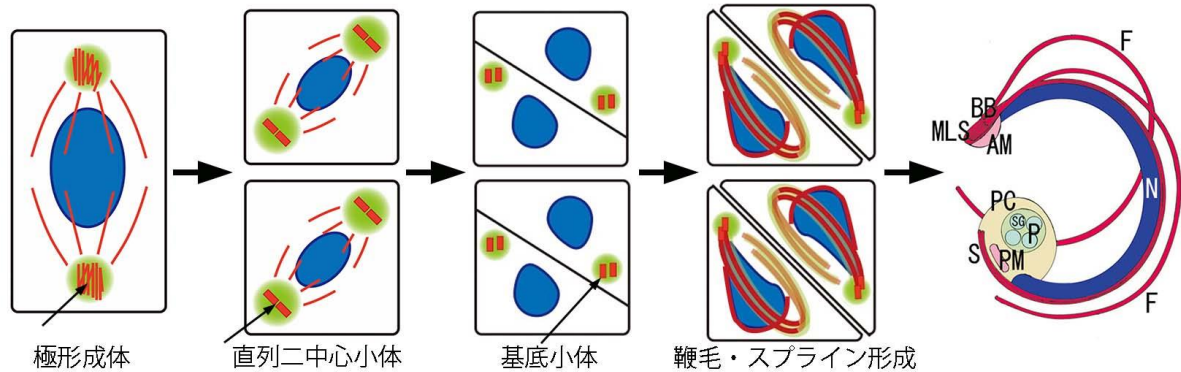


図 5. ゼニゴケ精子形成過程の模式図 (赤:微小管, 青:核, 緑:中心体局在性タンパク質の分布)。精原組織では内部に中心小体をもたない極形成体が主要な微小管形成中心として機能する。精母細胞では中心小体 (直列二中心小体) が出現し、直列二中心小体を含む中心体が紡錘体極に位置する。精細胞では直列二中心小体は分離し、基底小体となる。中心体から伸びる微小管がスプラインを形成し、基底小体からは鞭毛が伸びる。右端は完成した精子の模式図。MLS: 多層構造帯, BB: 基底小体, AM: 頭部ミトコンドリア, F: 鞭毛, N: 核, S: スプライン微小管, PM: 尾部ミトコンドリア, P: 色素体, PC: 尾部細胞質, SG: デンプン粒

内部に中心小体を備えた構造は、精子形成期にしか出現しないが、コケ植物では中心体に類似の形態や機能をもつ構造、他のオルガネラが中心体の代わりに紡錘体の微小管形成中心となる例が知られている。タイ類では、紡錘体形成時に内部に中心小体をもたない球状の構造がみられ、極形成体 (polar organizer) とよばれる (図 2C; 図 4A, B)。極形成体は球状の紡錘体形成の起点となる構造である点で、中心体と似ているが内部に中心小体を持たない点異なる。極形成体は、分裂中期になると消失し、中期の紡錘体は種子植物でよく見られる様な、極が分散したものとなる (Brown & Lemmon 1990)。最近、セン類のヒメツリガネゴケの茎葉体頂端細胞においても類似の構造の存在が指摘されている (Kosetsu et al. 2017)。種子植物の細胞内には、数十から数百の葉緑体がみとめられるが、コケ植物とシダ植物の一部 (小葉類) では細胞内に大きな葉緑体を 1 つしかもたない細胞 (単色素体細胞) がみとめられることがある。単色素体性の細胞では、色素体と核の分裂が協調的に起こるのが特徴である。典型的な例では、まず核の分裂に先立って色素体の分裂がおこり、色素体表面から伸びる微小管が紡錘体へと発達し、核の分裂を行う (Shimamura 2012)。色素体が紡錘体の極となる代表例としてよく知られているのが四極微小管系 (quadripolar microtubule system: QMS) と呼ばれる構造で、コケ植物の減数分裂 (孢子形成) 時にみられる。四極微小管系は、減数分裂前期に核の分裂に先立ち、色素体が分裂して 4 つに分かれる過程で形成される。色素体表面から前期の核を取り囲むように微小管が伸びており、紡錘体の極性決定、細胞分裂面挿入位置の決定の双方に関与していると考えられている (Brown & Lemmon 1997; Brown et al. 2010)。単色素体性の細胞で色素体の表面が紡錘体の形成中心としてはたらくことは、1 つしかない色素体を娘細胞に確実に配分する機能を有していると考えられる。単色素体性細胞の分裂様式は、初期の陸上植物において、栄養組織から中心体を失う代わりに新たに獲得した紡錘体

形成システムであったかもしれない (Shimamura et al. 2004)。

6-3. シダ植物

シダ植物の精子の形態は、コケ植物と比べ多様であり、特に鞭毛・繊毛の数については分類群ごとに大きな違いがある。イワヒバ属 (*Selaginella*) やヒカゲノカズラ属 (*Lycopodium*) を含むヒカゲノカズラ類では精子は、コケ植物と同様、鞭毛を2本もっている。これらを含む小葉類 (*Lycophyta*) では、鞭毛の数が少ないのが特徴だが、ミズニラ属 (*Isoetes*) では11本、ヨウラクヒバ属 (*Phylloglossum*) で20本の鞭毛が観察されている (湯浅 1969; Renzaglia & Garbary 2001)。他のシダの鞭毛の数は、マツバラン属 (*Psilotum*)、ハナワラビ属 (*Botrychium*)、リュウビンタイ属 (*Angiopteris*) などで数十本、トクサ属 (*Equisetum*) で50~100本近く、その他の薄囊シダで100本近くかそれ以上など多様性がある (湯浅 1969; Renzaglia & Garbary 2001)。

イワヒバ属やヒカゲノカズラ属では、コケ植物と同様、直列二中心小体を含む中心体が *de novo* に出現し、精母細胞中で中心体として振る舞う。小葉類 (*Lycophyta*) は、栄養組織や孢子形成時の細胞分裂で、色素体の表面が紡錘体の形成中心としてはたらく単色素体性の細胞分裂が見られることがある点も、コケ植物とよく似ている (Brown & Lemmon 1982)。

薄囊シダ類では、精母細胞で出現する球状の微小管形成中心 (生毛体) 内部に多数の中心小体が出現する。個々の中心小体は生毛体中で新生的に出現するとされる (Hepler 1976)。中心小体の形成の過程については、まず中心のハブ構造が出来、その周囲にA管、B管、C管が順に形成されることが電子顕微鏡像から示唆されているが、詳細は不明である (Renzaglia et al. 2017)。小葉類で例外的に生毛体を形成するヨウラクヒバ属 (*Phylloglossum*) の生毛体中では、複数の中心小体が枝分かれした構造が観察されており、中心小体形成の過程には多様性があることが示唆されている (Renzaglia & Maden 2000)。精子への変態過程で球状の生毛体は崩壊し、スプライン微小管の伸長、MLSの構築に従い、内部の中心小体は、鞭毛装置上に配置されていく。この間に、個々の中心小体は両方向に伸長しながら基底小体へ変化する。細胞質側 (proximal end) では、中央のハブ構造が伸長し、周囲に3連微小管が付加される。鞭毛が成長する遠位側には星状構造が作られ、鞭毛への移行帯となる。スプライン微小管の伸長に従い、核がそれに沿うように伸長、凝集する。

6-4. 種子植物

現生の裸子植物の一部 (イチョウヤソテツ類) においても、花粉管内で鞭毛を持つ精子が形成される (Hirase 1896; Ikeno 1896)。コケ植物では造精器内部に多数の精子が形成されるが、裸子植物では1つの花粉管の内部に形成される精子は通常2個である。ミクロキカス属 (*Microcycas*) では例外的に最大16個の精子が形成される (Norstog 1990)。裸子植物の精子形成過程では、核の凝集や細胞質の退化があまりおこらず、精子は楕円球の外形で、直径が50~500 μ mに達し、数百から数万本の鞭毛が、細胞の端部のMLSに沿って数回転の螺旋状に配置する (Gifford & Lin 1975; Norstog & Nicholls 1997; Norstog et al. 2004)。ペルム紀 (2.9~2.5億年前) に生育していた裸子植物の一群 (シダ種子植物) の1つである、グロッソプテリス類の1種 (*Glossopteris homevalensis*) の化石からも花粉管内に同様の外形の精子が発見されている (Nishida et al. 2003, 2004)。現生の他の裸子植物群である球果類、グネツム類などでは、中心体や生毛体はみられず、花粉管内に形成される

精子にも鞭毛はみられない。

裸子植物の生毛体は、精母細胞中に出現し、紡錘体形成過程で2つに分離し、紡錘体の極に位置する(Gifford & Larson 1980)。生毛体の表面に中心小体が密集するように配置するのが特徴的である。イチョウの生毛体は、直径3.5~4.5 μm であるのに対し、ソテツ類のザミア科では生毛体は直径25-30 μm に達する。精子への変態過程で生毛体が崩壊し、MLSが形成されその上に鞭毛が配置されていく。電子顕微鏡の観察では、生毛体の内部は一様ではなく、電子線密度の高い領域と低い領域があることが観察されている。後者が、鞭毛基部装置形成のためのMTOCとなると解釈されている(Norstog et al. 2004)。

被子植物では、精子形成過程で中心体や生毛体、鞭毛などは存在せず、精細胞は伸長する花粉管内部の原形質中を移動して卵細胞に達する(Southworth & Cresti 1997)。2つ形成される精細胞の1つからは花粉管核に向けて細胞質が線状に伸長しており、その内部には微小管の伸長が認められる(McCue et al. 2011)。この構造は鞭毛の進化的名残の可能性があり、注目される。

7. 新しい研究アプローチ

中心体と鞭毛装置ではそれぞれ、ゲノム情報や様々なオミクスデータの蓄積により、数百種類におよぶタンパク質について、真核生物の中心体・鞭毛装置の形態や機能の保存性と多様性に対応する情報が得られつつある。(van Dam et al. 2013; Dos Santos et al. 2013. Dean et al. 2016; Nevers et al. 2017; Sanchez & Feldman 2017)。陸上植物についても、様々なオミクスデータに基づいた情報の蓄積が、進化過程でおきた中心体・鞭毛構造の特殊化や消失について重要な情報を提供しつつある。被子植物のゲノムからは、鞭毛軸糸ダイニン、radial spoke, central pairなどの鞭毛構成要素となるタンパク質の遺伝子が完全に欠落していることがわかっている。しかし幾つかの鞭毛タンパク質は保存されており、花粉での発現が示唆されている(Hodges et al. 2011)。陸上植物における、中心体や鞭毛装置の構造、機能の特殊化、消失などのイベントについては、コケ植物を含めた比較研究が欠かせないと考えられる。

ゼニゴケのゲノム情報および造精器トランスクリプトームから、中心体、基底小体、鞭毛軸糸、ラディアル・スポーク、中心対装置、鞭毛内輸送系などの構成タンパク質遺伝子を抽出する作業や発現解析が進められている(Higo et al. 2016)。チューブリンに関しては、微小管を形成する α -チューブリンと β -チューブリン遺伝子がそれぞれ7個と5個知られている。このうちのいくつかは、造精器特異的に発現しており、精子形成過程や精子に特異的な微小管系の構築と関連があると示唆される(Buschmann et al. 2016; 荒木崇博士私信)。微小管形成中心を構成するチューブリンについては、 γ -チューブリンが一個、それ以外に、 δ (delta)チューブリンが一個、 ϵ (epsilon)チューブリン遺伝子一個がゲノム中に見つかっている。 ζ (zeta)チューブリンはゼニゴケゲノム中に存在しないようである。 δ (delta)、 ϵ (epsilon)、 ζ (zeta)チューブリンは、ZEDモジュールと呼ばれ、中心小体に局在することが知られており、中心体を有する生物ではよく保存的されているが、真核生物の系統ごとに存在の組みあわせが異なっている(Turk et al. 2015)。緑色植物では、クラミドモナスでは3つとも存在するが、被子植物では全てを欠いている。Findeisen et al. (2014)では、Streptophytesの進化過程でまず、 δ チューブリンが失われ、種子植物ではさらに ϵ チューブリンが失われたという進化過程が提起されているが、コケ、シダ植物のゲノム中での精査が必要で

ある。既知のコケ、シダ植物のゲノムでは、ZED モジュールのうち、 ζ -チューブリンのみを欠いていることが分かっている。 ζ -チューブリンの欠失が、精子形成時のみにしか出現しないという、陸上植物の中心小体の特異な振る舞いを反映している可能性があり、注目される。

8. まとめと今後の展望

緑色植物では、長年、緑藻類クラミドモナスが植物の中心体・鞭毛研究のモデル生物の位置にある (Pazour et al. 2005; Merchant 2007; Witman 2008)。クラミドモナスのような中心体と鞭毛が密接に結びついたシステムから、被子植物でみられる中心体や鞭毛をもたないシステムの間には、大きな形態的、機能的ギャップがあるが、コケ・シダなどの下等陸上植物の微小管形成システムを調べることで、陸上植物でおきた中心体・鞭毛システムの特異化・退化の過程について新たな知見が得られる可能性がある (荒木 2012; Hodges et al. 2011)。陸上植物の多細胞組織から単細胞の遊泳細胞が作られる精子形成過程は、微小管系をはじめとする大幅な細胞システムの作り替えともいえる。被子植物では花器官の形成に関わる転写因子である MADS-box 遺伝子群は、ヒメツリガネゴケにも存在し、その中には精子形成時に発現して、精子の鞭毛形成に必要な遺伝子を制御する働きを持つものがあることが最近示された (Koshimizu et al. 2018)。モデル植物であるゼニゴケやヒメツリガネゴケは精子形成過程でおこる遺伝子発現システムの切り替えやその進化を研究する上で、今後、重要な情報を提供すると考えられる。

陸上植物の有鞭毛精子の研究は、長い間、精子の形態や鞭毛装置の構造の記述と、それを形態形質として用いた系統解析が主流であり、実験的な研究はあまり進んでいない。車軸藻類やシダ植物で微小管の重合・脱重合阻害剤などの影響を調べた研究からは、スプライン微小管は核の伸長に重要な機能を持っていることが示されているが、その作用機序は不明である (Vaughn & Harper 1998)。鞭毛内部の微小管に沿う、微小管モータータンパクによる双方向的な輸送などについても研究が進んでいない。精子形成時におけるチューブリンアイソフォームの使い分けや、チロシン化、アセチル化などの修飾についても今後の研究の進展を期待したい。微小管以外についての細胞骨格系についても情報が少ない。アクチンについては精細胞の変態過程で細胞質内に多く存在し、精子変態期の核の周囲に局在することが分かっているが詳しい機能は不明である (Marc & Gunning 1986)。精母細胞に現れる中心体や精子の鞭毛装置には、 γ -チューブリンやセントリンなど真核生物の中心体や鞭毛装置に普遍的に存在するタンパク質の幾つかが共通して存在することが分かっている (Vaughn et al. 1993; Vaughn & Harper 1998; Vouilloud et al. 2005; Vaughn & Renzaglia 2006)。しかし、中心体や複雑な鞭毛装置それぞれに含まれるタンパク質について包括的な情報は欠いている。シダ植物においては、界面活性剤と DNase を用いて、MLS を単離し、MLS に特有な機能未知のタンパク質が存在することが示されたことは今後の研究の足がかりとなる (Sakaushi et al. 2003)。中心体、生毛体、鞭毛、MLS などのオルガネラの単離技術と、オミクス研究の進展が望まれる。

真核生物の多くで、中心体が細胞内の微小管の配向の制御や、分裂装置の配置や細胞分裂面の決定に重要な役割を持っていることを考えれば、進化の過程で中心体を失うことには、大きな困難があったと考えられる。コケ植物の極形成体や葉緑体表面の微小管形成中心は、恒常的な中心体を失った陸上植物が過渡的に採用した紡錘体形成システムだったのかもしれない (Shimamura

et al. 2004)。これらの構造は、中心小体（基底小体）の維持機能を失いながらも、紡錘体形成の機能だけを残した、中心体の名残のような構造ではないだろうか。陸上植物の進化過程で、まず栄養組織で中心体が失われたが、そのためには、中心体のような恒常的な MTOC ではなく、既存の微小管を足場にして微小管を形成するメカニズムの獲得が重要であったと考えられている (Murata et al. 2007; Hotta et al. 2012)。恒常的な中心体をもたない陸上植物で、分裂準備微小管帯の形成とそこへのフラグモプラストの接続という、より厳密な細胞分裂面決定機構が獲得されたことは、進化の過程でより高度な組織分化を可能にしたと考えられている (Mineyuki 1999)。表層微小管系やフラグモプラスト微小管系では、既存の微小管に γ -チューブリン複合体が結合し、そこを足場にした微小管形成が典型的に観察されている (Murata et al. 2005, 2013)。このことは、中心体を失ったことと、新たな微小管系を獲得したことが表裏一体の関係にあったことを示唆する。Mazia (1984,1987)は、彼が定義した必ずしも中心小体を必要としない「中心体」(flexible centrosome)が生物種ごと、組織、細胞ごとに多様な形態をとりうることを説明するために、微小管形成の足場となる中心体周辺物質として、仮定の紐状の構造の存在を想定した。しかし、現在まで実体としてそのような構造は見つかっていない。陸上植物における MTOC の多様性をもたらした原因は、Mazia が考えた紐状の足場の存在ではなく、かつて中心体に存在していた γ -チューブリン複合体の存在様式が変化し、他のオルガネラや微小管自身とも会合可能になったからかもしれない。

謝辞

本稿をまとめるにあたり、南イリノイ大学の Karen Renzaglia 博士に文献情報の収集に多大な協力をいただいた。筆者の研究室におけるコケ植物精子の研究は、文部科学省および学術振興会の科学研究費補助金による助成のもと、酒井建輔さん、赤司一さん、野村佳織さんら大学院生の協力によって進めてきたものである。ゼニゴケ研究者コミュニティからは共同研究を通じて不断の支援を受けている。京都大学の荒木崇博士には、ゼニゴケのチューブリン遺伝子、造精器トランスクリプトームデータに関して貴重な情報提供をいただき、多くのコメントもいただいた。記して感謝したい。

引用文献

- Al Jord, A., Lemaitre, A. I., Delgehr, N., Faucourt, M., Spassky, N., & Meunier, A. 2014. Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature* 516: 104–107.
- 荒木崇 2012. 植物固有の転写因子 LEAFY とゼニゴケの有性生殖. *BSJ Review*. 3: 134158.
- Azimzadeh, J., Wong, M. L., Downhour, D. M., Sánchez Alvarado, A., & Marshall, W. F. 2012. Centrosome loss in the evolution of planarians. *Science* 335: 461–463.
- Barker, A. R., Renzaglia, K. S., Fry, K., & Dawe, H. R. 2014. Bioinformatic analysis of ciliary transition zone proteins reveals insights into the evolution of ciliopathy networks. *BMC Genomics* 15: 531
- Basto, R, Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A., & Raff, J. W. 2006. Flies without centrioles. *Cell* 125:1375–1386.

- Brown, R.C., & Lemmon, B.E. 1982. Plastid apportionment and preprophase microtubule bands in monoplastidic root meristem cells of *Isoetes* and *Selaginella*. *Protoplasma* 123: 95–103.
- Brown, R.C., & Lemmon, B.E. 1990. Polar organizers mark division axis prior to preprophase band formation in mitosis of the hepatic *Reboulia hemisphaerica* (Bryophyta). *Protoplasma* 156: 74–81.
- Brown, R.C., & Lemmon, B.E. 1992. Polar organizers in monoplastidic mitosis of hepatics (Bryophyta). *Cell Motil. Cytoskeleton* 22: 72–77.
- Brown, R.C., & Lemmon, B.E. 1997. The quadripolar microtubule system in lower land plants. *J. Plant Res.* 110: 93–106.
- Brown R.C. Lemmon B.E., & Shimamura M. 2010. Diversity in meiotic spindle origin and determination of cytokinetic planes in sporogenesis of complex thalloid liverworts (Marchantiopsida). *J. Plant Res.* 123: 589–605.
- Buschmann, H., Holtmannspötter, M., Borchers, A., O'Donoghue, M.T., & Zachgo, S. 2016. Microtubule dynamics of the centrosome-like polar organizers from the basal land plant *Marchantia polymorpha*. *New Phytol.* 209: 999–1013.
- Carothers, Z.B., & Kreitner, G.L. 1968. Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. II. Blepharoplast structure in the spermatid of *Marchantia*. *J. Cell Biol.* 36: 603–616.
- Celio, G.J., Padamsee, M., Dentinger, B.T., Bauer, R., & McLaughlin, D.J. 2006. Assembling the Fungal Tree of Life: Constructing the structural and biochemical database. *Mycologia* 98: 850–859.
- Dean S, Moreira-Leite, F, Varga, V., & Gull, K. 2016. Cilium transition zone proteome reveals compartmentalisation and differential dynamics of ciliopathy complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E5135–43.
- Duncan, T.M., Renzaglia, K.S., & Garbary, D.J. 1997. Ultrastructure and phylogeny of the spermatozoid of *Chara vulgaris* (Charophyceae). *Pl. Syst. Evol.* 204:125–40.
- Dos Santos, H.G., Abia, D., Janowski, R., Mortuza, G., Bertero, M.G., Boutin, M., Guarín, N., Méndez-Giraldez, R., Nuñez, A., Pedrero, J. G., Redondo, P., Sanz, M., Speroni, S., Teichert, F., Bruix, M., Carazo, J.M., Gonzalez, C., Reina, J., Valpuesta, J.M., Vernos, I., Zabala, J. C., Montoya, G., Coll, M., Bastolla, U., & Serrano, L. 2013. Structure and non-structure of centrosomal proteins. *PLoS One* 8: e62633.
- Farache, D., Emorine, L., Haren, L., & Merdes, A. 2018. Assembly and regulation of gamma-tubulin complexes. *Open Biol.* 8: 170266. DOI: 10.1098/rsob.170266
- Findeisen, P., Mühlhausen, S., Dempewolf, S., Hertzog, J., Zietlow, A., Carlomagno, T., & Kollmar, M. 2014. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol.* 6: 2274–2288.
- Garbary, D.J., Renzaglia, K.S., & Duckett, J.G. 1993. The phylogeny of land plants: a cladistic analysis based on the male gametogenesis. *Plant Sys. Evol.* 188: 237–269
- Gifford, E. M.Jr., & S. Larson. 1980. Developmental features of the spermatogenous cell in *Ginkgo biloba*. *Amer. J. Bot.* 67: 119–124.

- Gifford, E.M., Jr., & J. Lin. 1975. Light microscope and ultrastructural studies of the male gametophyte in *Ginkgo biloba*: The spermatogenous cell. *Amer. J. Bot.* 62: 974–981.
- Graham, L.E. & McBride, G.E. 1979. The occurrence and phylogenetic significance of a multilayered structure in *Coleochaete* spermatozooids. *American Journal of Botany* 66:887–894.
- Graham, L.E., & Repavich, W.M. 1989. Spermatogenesis in *Coleochaete pulvinata* (Charophyceae): early blepharoplast development. *Am. J. Bot.* 76: 1266–1278.
- Graham, L. E. & Wedemayer, G.J. 1984. Spermatogenesis in *Coleochaete pulvinata* (Charophyceae): sperm maturation. *J. Phycol.* 20: 302–309.
- Hepler P.K. 1976. The blepharoplast of *Marsilea*: Its *de novo* formation and spindle association. *J. Cell Sci.* 21: 361–390.
- Higo, A., Niwa, M., Yamato, K. T., Yamada, L., Sawada, H., Sakamoto, T., Kurata, T., Shirakawa, M., Endo, M., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Ishizaki, K., Nishihama, R., Kohchi, T., & Araki, T. 2016. Transcriptional framework of male gametogenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* 57: 325–338
- Hirase, S. 1896. On the spermatozoid of *Ginkgo biloba*. *Bot. Mag. Tokyo* 10: 325–328.
- Hodges, M.E., Wickstead, B., Gull, K., & Langdale, J. A. 2011. Conservation of ciliary proteins in plants with no cilia. *BMC Plant Biol.* 11: 185.
- Hotta, T., Kong, Z., Ho, C., Zeng, C., Horio, T., Fong, S., Vuong, T., Lee, Y., & Liu, B. 2012. Characterization of the *Arabidopsis* Augmin complex uncover its critical function in the assembly of the acentrosomal. *Plant Cell* 24: 1494–1509.
- Hyams, J.S., & Campbell, C.J.J. 1985. Widespread absence of outer dynein arms in the spermatozooids of lower plants. *Cell Biol. Int. Rep.* 9: 841–848.
- Ikeno, S. 1896. The spermatozoid of *Cycas revoluta*. *Bot. Mag. Tokyo* 10: 367–368.
- 池野成一郎. 1903. 植物界に於ける生毛體. *植物学雑誌* 17: 278–290.
- Kamiya, R., & Okamoto, M. 1985. A mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* that lacks the flagellar outer dynein arm but can swim. *J. Cell Sci.* 74: 181–191
- Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B. R., & Rieder, C.L. 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Current Biology* 10: 59–67.
- Kosetsu, K., Murata, T., Yamada, M., Nishina, M., Boruc, J., Hasebe, M., Damme, D.V., & Goshima, G. 2017. Cytoplasmic MTOCs control spindle orientation for asymmetric cell division in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114: 8847–8854.
- Koshimizu, S., Kofuji, R., Sasaki-Sekimoto, Y., Kikkawa, M., Shimojima, M., Ohta, H., Shigenobu, S., Kabeya, Y., Hiwatashi, Y., Tamada, Y., Murata, T., & Hasebe, M. 2018. Physcomitrella MADS-box genes regulate water supply and sperm movement for fertilization. *Nature Plants* 4: 36–45.
- Kreitner, G.L. 1977a. Influence of the multilayered structure on the morphogenesis of *Marchantia* spermatids. *Amer. J. Bot.* 64: 57–64.
- Kreitner, G.L. 1977b. Transformation of the nucleus in *Marchantia* spermatids: morphogenesis. *Amer. J. Bot.* 64: 464–475.

- Kreitner, G.L., & Carothers, Z.B. 1976. Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. V. Blepharoplast development in *Marchantia polymorpha*. *Amer. J. Bot.* 63: 545–557.
- Lepper R. 1956. The plant centrosome and the centrosome-blepharoplast homology. *Botanical Review* 22: 375–417.
- Marc, J., & Gunning, B.E.S. 1986. Immunofluorescent localization of cytoskeletal tubulin and actin during spermatogenesis in *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Protoplasma* 134: 163–177.
- Marchant, H.J., Pickett-Heaps, J.D., & Jacobs, K. (1973). An ultrastructural study of zoosporogenesis and the mature zoospore of *Klebsormidium flaccidum*. *Cytobios* 9: 95–107.
- Margulis, L. 1980. Undulipodia, flagella and cilia. *Biosystems* 12: 105–108.
- Mattox, K.R., & Stewart, K.D. 1984. Classification of the Green Algae A Concept Based on Comparative Cytology. In Irvine, D.E.G. and John, D., Eds., *Systematics of the Green Algae*, Academic Press, London. pp29–72.
- Mazia, D. 1984. Centrosomes and mitotic poles. *Exp. Cell Res.* 153: 1–15
- Mazia, D. 1987. The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Inter. Rev. Cytol.* 100: 49–92.
- McCue, A.D., Cresti, M., Feijó, J.A., & Slotkin, R.K. 2011. Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *J. Exp. Bot.* 62: 1621–1631.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S. J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H. et al. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245–250.
- Mineyuki, Y. 1999. The preprophase band of MTs: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int. Nat. Rev. Cytol.* 187: 1–49.
- Mizukami, I., & Gall, J. 1966. Centriole replication. II. Sperm formation in the fern, *Marsilea*, and the cycad, *Zamia*. *J. Cell Biol.* 29: 97–111.
- Moser, J.W., & Kreitner, G.L. 1970. Centrosome structure in *Anthoceros laevis* and *Marchantia polymorpha*. *J. Cell Biol.* 44: 454–458.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T. I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., & Hasebe, M. 2005. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ -tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* 7: 961–968.
- Murata, T., Tanahashi, T., Nishiyama, T., Yamaguchi, K., & Hasebe, M. 2007. How do plants organize microtubules without a centrosome? *J. Integ. Plant Biol.* 49: 1154–116.
- Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasezawa, S., Machida, Y., & Hasebe, M. 2013. Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nat. Comm.* 4: 1967. DOI: 10.1038/ncomms2967.
- Nevers, Y., Prasad, M.K., Poidevin, L., Chennen, K., Allot, A., Kress, A., Ripp, R., Thompson, J.D., Dollfus, H., Poch, O., & Lecompte, O. 2017 Insights into ciliary genes and evolution from multi-level phylogenetic Profiling. *Mol. Biol. Evol.* 34: 2016–2034

- Nishida, H., Pigg, K.B., & Rigby, J.F. 2003. Swimming sperm in an extinct Gondwanan plant. *Nature* 422: 396–397
- Nishida, H., Pigg, K.B., Kudo, K., & Rigby, J. F. 2004. Zooidogamy in the late permian genus *Glossopteris*. *J. Plant Res.* 117: 323–328.
- Norstog, K.J. 1990. The spermatozoid of *Microcycas calocoma*: ultrastructure. *Bot. Gaz.* 151: 275–284.
- Norstog, K.J., & Nieholls, T. 1997. The biology of the cycads. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY. 504 pp.
- Norstog, K.J., Gifford, E.M., & Stevenson, D.W. 2004. Comparative development of the spermatozoids of cycads and *Ginkgo biloba*. *Botanical Review*: 70: 5–15.
- Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J., & Witman, G. B. 2005. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol.* 170: 103–113.
- Pickett-Heaps, J.D. 1967. Ultrastructure and differentiation in *Chara* sp. II. Mitosis. *Austr. J. Bio. Sci.* 20: 883–894.
- Pickett-Heaps J.D. 1968 Ultrastructure and differentiation in *Chara* (fibrosa) IV. Spermatogenesis. *Austral. J. Biol. Sci.* 21: 655–690.
- Pickett-Heaps J. D. 1975. Green Algae. Structure, reproduction and evolution in selected genera. Sinauer Assoc, Sunderland, Massachusetts, 606 pp.
- Rappaport, R. 1986. Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 105: 245–281.
- Renzaglia, K.S., & Duckett, J.G. 1987. Comparative ultrastructural studies of spermatogenesis in the Metzgeriales (Hepatophyta). II. The blepharoplast of *Blasia pusilla*. *Amer. J. Bot.* 74:53–64.
- Renzaglia, K.S. & Duckett, J.G. 1989. Ultrastructural studies of spermatogenesis in the Anthocerotales. V. The posterior mitochondrion and nuclear metamorphosis in *Notothylas* and *Phaeoceros*. *Protoplasma* 51: 137–150.
- Renzaglia, K.S., & Maden, A.R. 2000. Microtubule organizing centers and the origin of centrioles during spermatogenesis in the pteridophyte *Phylloglossum*. *Micros. Res. Tech.* 49: 496–505.
- Renzaglia, K.S., Duff, R.J. T., Nickrent, D.L., & Garbary, D.J. 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 769–793.
- Renzaglia, K.S., & Garbary, D.J. 2001. Motile gametes of land plants: diversity, development, and evolution. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20: 107–213
- Renzaglia, K.S., Lopez, R. A., Henry, J.S., Flowers, N.D., & Vaughn, K.C. 2017. Transmission Electron Microscopy of Centrioles, Basal Bodies and Flagella in Motile Male Gametes of Land Plants. *Bio-protocol* 7: 19 e2448. DOI: 10.21769/BioProtoc.2448.
- Robbins, R.R. 1984. Origin and behavior of bicentriolar centrosomes in the bryophyte *Riella americana*. *Protoplasma* 121: 114–119.
- Sakaushi, S., Okoshi, M., Miyamura, S., & Hori, T. 2003. Swimming behavior and ultrastructure of sperm of *Lygodium japonicum* (Pteridophyta). *Sex. Plant Reprod.* 16: 113–122.
- Sagan, L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14: 255–274.

- Sanchez, A.D. & Feldman, J. L. 2017. Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 44: 93–101.
- Shimamura, M., Brown, R.C., Lemmon, B.E., Akashi, T., Mizuno, K., Nishihara, N. Tomizawa K. I., Yoshimoto, K., Deguchi, H., Hosoya, H., Horio, T., & Mineyuki, Y. 2004. γ -Tubulin in basal land plants: characterization, localization, and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. *Plant Cell* 16: 45–59.
- Shimamura, M. 2014. Monoplastidic cells in lower land plants. In Noguchi, T. et al. (eds) *Atlas of Plant Cell Structure*. Springer, Tokyo. pp. 56–57.
- Shimamura, M., Fukushima, H. Yamaguchi, T., & Deguchi, H. 1999. Behavior of plastid and plastid DNA during spermiogenesis in *Dumortiera hirsuta*. *Bryol. Res.* 7: 201–204.
- Shimamura, M. 2015. Aerial dispersal of tetraflagellated sperm cells in *Dumortiera hirsuta* (Marchantiophyta, Dumortieraceae). *Hikobia* 17: 27–29.
- Smirnova, E.A., & Bajer, A. S. 1992. Spindle poles in higher plant mitosis. *Cell Motil. Cytoskel.* 23: 1–7.
- Sorokin, S.P. 1968. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell Sci.* 3: 207–230.
- Southworth, D., & Cresti, M. 1997. Comparison of flagellated and nonflagellated sperm in plants. *Amer. J. Bot.* 84: 1301–1311.
- Stewart, K.D., Mattox, K.R., & Floyd, G.L. 1973. Mitosis, cytokinesis, the distribution of plasmodesmata, and other cytological characteristics in the Ulotrichales, Ulvales, and Chaetophorales: phylogenetic and taxonomic considerations. *J. Phycol.* 9: 128–141.
- Turk, E., Wills, A. A. Kwon, T., Sedzinski, J., Wallingford, J.B., & Stearns. T. 2015. Zeta-tubulin is a member of a conserved tubulin module and is a component of the centriolar basal foot in multiciliated cells. *Current Biology* 25: 2177–2183.
- Turner, F. R. 1968. An ultrastructural study of plant spermatogenesis. Spermatogenesis in *Nitella*. *J. Cell Biol.* 37: 370–393.
- Van Dam, T.J.P., Townsend, M. J, Turk, M., Schlessinger, A., Sali, A., Field, M. C., & Huynen, M. A. 2013. Evolution of modular intraflagellar transport from a coatomer-like progenitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2110: 6943–6948.
- Vaughn, K.C., & Renzaglia, K.S. 1998. Origin of bicentrioles in Anthocerozoan spermatogenous cells. In *Bryology for the Twenty-First Century*, J.W. Bates, N.W. Ashton & J.D. Duckett, eds. Maney Publishing and the British Bryological Society. Leeds, UK. pp. 189–203.
- Vaughn K. C., & Harper, J. D. 1998. Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *International Reviews of Cytology* 181: 75–149.
- Vaughn K. C., & Renzaglia K. S. 2006. Structural and immunocytochemical characterization of the *Ginkgo biloba* L. sperm motility apparatus. *Protoplasma* 227: 165–173.
- Vaughn, K. C., Sherman T. D., & Renzaglia, K. S. 1993. A centrin homologue is a component of the multilayered structure in bryophytes and pteridophytes. *Protoplasma* 175: 58–66.

- Vouilloud, A. A., Cáceres, E.J., & Leonardi, P. I. 2005. Changes in the absolute configuration of the basal/flagellar apparatus and evidence of centrin during male gametogenesis in *Chara contraria* var. *nitelloides* (Charales, Charophyta). *Plant. Syst. Evol.* 251: 89–105.
- Wasteneys, G. O. 2002. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell Sci.* 115: 1345–1354.
- Webber, H. J. 1901. Spermatogenesis and fecundation of *Zamia*. *USDA. Bur. Plant Ind. Bull.* 2: 1–92.
- Witman, G. B. 2008. *Chlamydomonas* Sourcebook 2nd ed. Vol. 3 Cell Motility and Behavior. Academic Press, New York. 512 pp.
- Yamashiki, N., & Kawamura, N. 1998. Behavior of centrioles during meiosis in the male silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). *Dev. Growth Diff.* 40: 619–630.
- 湯浅 明 1969. 植物の精子. 東京大学出版会, 東京.
- Yubuki, N., & Leander B. S. 2013. Evolution of microtubule organizing centers across the tree of eukaryotes. *Plant J.* 75: 230–244.
- Zhao, H., Zhu, L., Zhu, Y., Cao, J., Li, S., Huang, Q., Xu, T., Huang, X., Yan, X., & Zhu, X. 2013. The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. *Nat. Cell Biol.* 15: 1434–1444.