

植物の発生を支える分子メカニズム ～分裂、輸送とその制御～

笹部 美知子¹, 田中 博和²

¹弘前大学 農学生命科学部 生物学科

〒036-8561 青森県弘前市文京町3番地

²明治大学 農学部 生命化学科

〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

Michiko Sasabe¹ and Hirokazu Tanaka²

¹Department of Biology, Hirosaki University, 3 Bunkyo-cho, Hirosaki, 036-8561, Japan

²Graduate School of Agriculture, Meiji University, 1-1-1 Higashimita, Kawasaki, Kanagawa
214-8571, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.11b1.00183

植物が発生の過程で細胞を増やし、種々の組織を分化させる過程は、植物ゲノムに組み込まれた内在のプログラムによる巧妙な制御過程に支えられています。例えば、植物の発生や成長の様々な局面では細胞分裂及び細胞間の極性輸送の制御が重要であることが知られています。多細胞体制において、異なる種類の細胞や組織で細胞の分裂装置や細胞極性がどのように制御されているのかということは興味深い問題であり、鍵因子の制御機構の解明が重要な課題となっています。また、植物が環境に依存して器官の形成や成長を調節する際に、内在の制御系と環境シグナルがどのように統合されて調節されるのか、ということも重要な問題です。そのような制御メカニズムを明らかにするために、分子遺伝学や生化学、細胞生物学、ケミカルジェネティクスなどの多面的なアプローチによる研究が精力的に進められています。そのような研究により、高校の教科書は我々が高校生だった頃とは大きく様相を変えるほど、細胞レベルや局所的な組織レベルでの分子メカニズムの理解は大きく進みました。しかし、依然として植物個体全体を統御する実体（例えば動物の神経のような）はつかめていません。個々の素晴らしい研究や発見にワクワクしつつも、個々の点をつなぐ「統御システム」の実体は何だろうか？というモヤモヤを今一度俯瞰してみたいという思いから、2019年9月に行われた日本植物学会第83回大会において、「植物の発生を支える分子メカニズム～分裂、輸送とその制御～」と題して、シロイヌナズナやヒメツリガネゴケの細胞分裂や細胞内輸送に関与する分子の研究を行なっている若手研究者に講演をお願いし、最新の知見を紹介していただきました。美しい画像データとともに、未発表データも含めて最新の成果を様々な角度から講演をして下さった演者の皆様のおかげで、初日の朝一番目のシンポジウムにも関わらず多くの人に足をお運びいただき、暖かい雰囲気の中で大いに議論が盛り上がりました。本総説集は、このシンポジウムで講演をしていただいた方々の研究内容と、各分野の知見を執筆していただいたものです。シンポジウムと同じ順番で、環境ストレス下での細胞分裂の制御について転写因子による制御システムを（高橋）、それに引き続き、細胞分裂に

おける分裂装置や細胞骨格の制御系やそのエフェクター分子の機能について紹介した後に (笹部, 日渡), 基部植物のヒメツリガネゴケや初期胚発生の中での多細胞体制の中での細胞内オルガネラの配置や極性局在の制御機構と (山田, 木全), オーキシンの輸送体の制御について (田中), 最新のイメージング技術を基盤とした最近の研究を紹介しています。異なったアプローチで異なった事象を見ているにも関わらず, これらの総説を続けて読んでみると 個々の研究間に少しずつ重なりがあることがより明確になったように感じています。その重なりや隙間に目を向けることが, 当初のシンポジウムの狙いであった「統御システム」を議論する小さなきっかけになることを期待したいと思います。

植物科学研究の進展は目覚ましいものがあり, 今回扱った内容は, 植物の細胞分裂と発生制御の全体を包括するものではありませんが, 本総説集が, 植物の発生制御の研究の進展を俯瞰するための一助となれば幸いです。シンポジウムの開催にあたり, 大会実行委員会の先生方には大変お世話になりました。また, 本総説集の出版の機会を与えていただきました電子出版物編集委員の先生方にも, 厚く御礼を申し上げます。

ストレスに応答した植物の細胞周期停止機構

高橋 直紀, 梅田 正明

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

Mechanisms of stress-induced cell cycle arrest in plants

Naoki Takahashi, Masaaki Umeda

Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology,
Takayama 8916-5, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

Key words: abiotic stress, cell cycle, NAC-type transcription factor,

R1R2R3-type MYB transcription factor

DOI: 10.24480/bsj-review.11b2.00184

1. はじめに

植物は通常の生育環境とは異なるストレス条件下におかれると、その環境に適応するために自らの成長を柔軟に変化させることで、持続的な成長を可能にしている。植物にとってストレスとなる要因は、高温、低温、乾燥、高塩、強光など様々あり、植物はこれらのストレスを受けると一時的に細胞分裂を抑制し、ストレスへの対処を優先させる。一般に、細胞分裂の停止や遅延にはチェックポイント機構（細胞周期が適切に進行しているか監視する機構）が重要な役割を果たしており、細胞周期進行に異常が発見されるとチェックポイント機構が働くことで速やかに細胞周期進行が抑制される。植物が浸透圧や栄養飢餓のストレスを受けると主にG1期で細胞周期が停止し、高温・高塩ストレスやDNA損傷を受けるとG2期で細胞周期が停止することが報告されている (Zhao *et al.*, 2014)。このようなストレスに応答した細胞周期の進行阻害にもチェックポイント機構が働いていると考えられるが、その分子メカニズムの解明は殆ど進んでいなかった。最近、複数のストレスに応答するG2期停止機構の一端が解明されつつあるので、本稿ではその最近の知見について紹介したい。

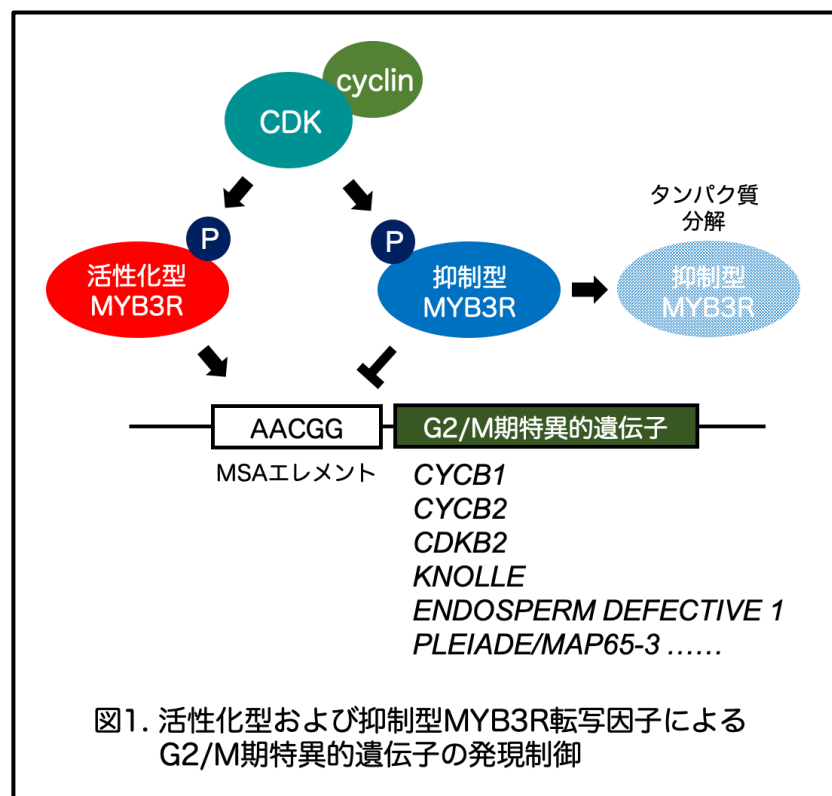
2. 植物のG2/M期制御機構

細胞周期のG2期からM期への移行には、R1R2R3型MYB転写因子 (MYB3R) が重要な役割を果たす (Ito, 2015)。MYB3R転写因子は、G2/M期特異的に発現量が上がる遺伝子のプロモーターに存在するシス配列 (M-specific activator (MSA) エlement; 5'-AACGG-3') に結合し、転写制御を行う (Ito *et al.*, 1998)。G2/M期特異的遺伝子の中には、サイクリンBやB2型サイクリン依存性キナーゼ (CDKB2) などのCDK活性の制御に関わるものや、細胞質分裂に関わるKNOLLE, PLEIADE/MAP65-3,

ENDOSPERM DEFECTIVE 1 (EDE1) などが含まれている。シロイヌナズナには5種類のMYB3R転写因子 (MYB3R1 から MYB3R5) が存在し, MYB3R4 は発現誘導に, MYB3R3 と MYB3R5 は発現抑制に働くことが示されている (Haga *et al.*, 2007; Haga *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2015)。また, MYB3R1 は発現誘導と抑制の両方に働くと考えられている (Kobayashi *et al.*, 2015)。変異体を使った解析から, 分裂組織の細胞では, 抑制型 MYB3R が G2/M 期以外のステージで G2/M 期特異的遺伝子の発現を抑制することが示されている。さらに, 分化した細胞では, 抑制型 MYB3R が細胞分裂の停止と細胞分化に重要な役割をもつことも示唆されている (Kobayashi *et al.*, 2015)。

MYB3R 転写因子の活性制御には CDK によるリン酸化が重要である。タバコ BY-2 細胞では, 活性化型 MYB3R が CDK によりリン酸化されると活性化され, G2/M 期特異的遺伝子の転写を誘導する (Araki *et al.*, 2004)。G2/M 期特異的遺伝子の中にはサイクリンも含まれているため, この転写誘導はさらに CDK 活性を上昇させ, G2/M 期特異的遺伝子群の爆発的な誘導を引き起こすと考えられる。一方で, 抑制型 MYB3R も CDK によりリン酸化されるが, シロイヌナズナにおいてこのリン酸化は抑制型 MYB3R のプロテアソーム系によりタンパク質分解を促すことが報告されている

(Chen *et al.*, 2017)。すなわち, CDK によるリン酸化を介して活性化型 MYB3R と抑制型 MYB3R が正負逆に制御されることで, G2/M 期特異的遺伝子の発現のオンオフが厳密に調節されているのである (図1)。G2 期から M 期にかけて CDK 活性と G2/M 期特異的遺伝子群の発現が連動して急上昇するのは, このような活性化型と抑制型の MYB3R のリン酸化制御に依るものと考えられる。



動物の MYB 転写因子は, 8 種類以上のタンパク質からなる巨大複合体を形成することで, 細胞周期遺伝子の転写を制御することが知られている。ヒトでは DREAM (DP, RB-like E2F, and MuvB) 複合体もしくは LINC (LIN complex), ショウジョウバエでは dREAM (Drosophila RBF, E2F2, and Myb) 複合体もしくは MMB (Myb-MuvB) 複合体として報告されている (Korenjak *et al.*, 2004; Georgette *et al.*, 2007; Litovchick *et al.*, 2007; Schmit *et al.*, 2007)。ヒトの DREAM 複合体は, RETINOBLASTOMA (Rb) 関連タンパ

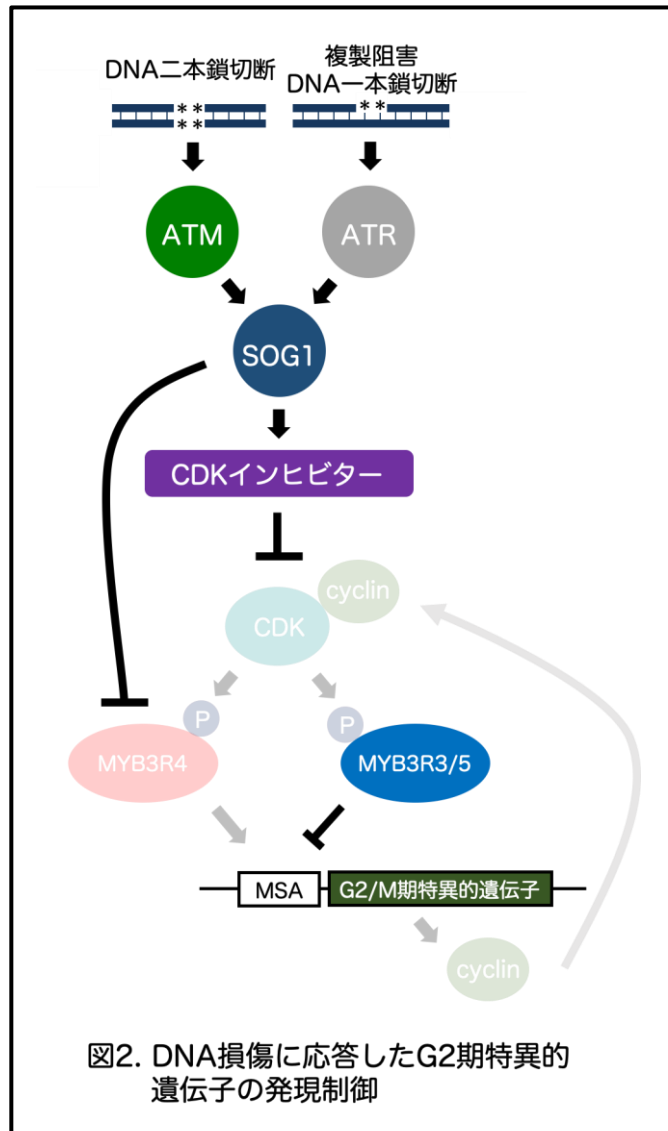
ク質 (p130 もしくは p107), E2F ファミリータンパク質 (E2F4 もしくは E2F5), DP, MuvB core 複合体 (LIN9, LIN37, LIN52, LIN54, RBBP4) などの因子により構成されている (Litovchick *et al.*, 2007; Schmit *et al.*, 2007)。これらのうちの多くはショウジョウバエの dREAM 複合体でも保存されており, ヒトと同様な機能をもっていると考えられている (Korenjak *et al.*, 2004; Georlette *et al.*, 2007)。シロイヌナズナにおいても多くの因子が保存されており, 質量分析による複合体成分の解析により, MYB3R 転写因子は E2F 転写因子や Rb 関連タンパク質などと同一複合体を形成していることが明らかにされている (Koboyashi *et al.*, 2015)。興味深いことに, 活性化型である MYB3R4 は E2FB (転写活性化型) と, 抑制型の MYB3R3 は E2FC (転写抑制型) と複合体を形成していることから (Koboyashi *et al.*, 2015), MYB3R と E2F という 2 種類の転写因子が連動して活性化型もしくは抑制型の DREAM 複合体を形成していると考えられる。E2F は G1/S 期の移行を制御する上で鍵を握る転写因子なので, 細胞分裂活性が高い状態と低い状態でどのような複合体成分が変化をするかをさらに詳細に解析することにより, G1/S 期と G2/M 期の協調的制御における DREAM 複合体の役割が明らかになると期待される。

3. DNA 損傷に応答した細胞周期停止における MYB3R 転写因子の役割

植物は, 通常の DNA 複製の過程で起こる複製エラーや, 光合成等により生じる活性酸素などにより DNA 損傷を受ける。さらに, 太陽光に含まれる紫外線や土壌中に含まれるアルミニウムやホウ素, さらには病原菌感染なども DNA 損傷を引き起こすことが知られている (Rounds & Larsen, 2008; Sakamoto *et al.*, 2011; Song & Bent, 2014)。真核生物においては, DNA 損傷を受けると ATM (ATAXIA-TALANGIECTASIA MUTATED) および ATR (ATM AND RAD3-RELATED) と呼ばれるキナーゼが損傷 DNA を認識する (Shiloh, 2006; Su, 2006; Cimprich & Cortez, 2008)。ATM は DNA 二本鎖切断を認識し, ATR は複製エラーや DNA 一本鎖切断を認識する。植物でも ATM および ATR が損傷 DNA を認識するが, これらのセンサーキナーゼは植物特異的な NAC 型転写因子 SOG1 (SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1) をリン酸化し活性化することにより, DNA 損傷シグナルを伝達する (Yoshiyama *et al.*, 2013; Sjogren *et al.*, 2015; Yoshiyama *et al.*, 2017)。シロイヌナズナの SOG1 は, N 末端領域に DNA 結合に必要な NAC ドメイン, C 末端領域に転写調節領域を持っている。SOG1 の C 末端領域には 5 箇所セリン-グルタミン (SQ) モチーフが存在し, それらが ATM によりリン酸化されることにより活性化される (Yoshiyama *et al.*, 2013; Yoshiyama *et al.*, 2017)。そして, 活性化した SOG1 が下流遺伝子の転写を誘導することで, G2 期での細胞周期停止や DNA 修復, 幹細胞の細胞死などの DNA 損傷応答を引き起こすことが明らかにされている (Yoshiyama *et al.*, 2009; Fulcher & Sablowski, 2009; Furukawa *et al.*, 2010; Adachi *et al.*, 2011)。

シロイヌナズナにおいては, DNA 損傷に応答して細胞周期が G2 期で停止することが報告されている (Adachi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017)。その際, M 期サイクリンや

CDKB2などのG2/M期特異的遺伝子群の発現が一斉に抑えられることから、これがG2期停止を引き起こす要因になっていると考えられる (Adachi *et al.*, 2011)。シロイヌナズナにDNA損傷を与えると、CDKインヒビターをコードするSMR5, SMR7, KRP6の発現がSOG1により直接転写誘導される (Yi *et al.*, 2014; Ogita *et al.*, 2018)。また、活性化型MYB3RをコードするMYB3R4の発現がSOG1依存的に抑制される (Chen *et al.*, 2017)。このことから、CDKインヒビターの発現誘導によるCDK活性の低下がMYB3R4のリン酸化(活性化)を阻害し、さらにMYB3R4の発現抑制がMYB3R4自体の蓄積を阻害すると考えられる。しかし、*myb3r4*変異体にDNA損傷を与えても野生型植物と同程度の細胞分裂阻害を示すことから (Chen *et al.*, 2017), MYB3R4の制御だけではG2/M期特異的遺伝子群の発現抑制を説明することはできない。そこで、



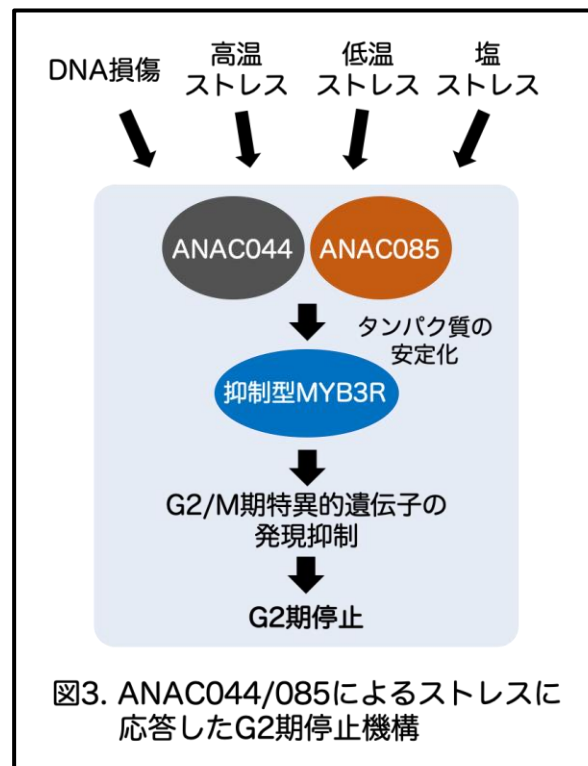
抑制型MYB3Rに着目した研究が進められた結果、DNA損傷下でCDK活性が減少すると、MYB3R3やMYB3R5のリン酸化レベルが低下し、安定化したMYB3R3/5が蓄積することによりG2/M期特異的遺伝子群の転写が完全に抑制されることが明らかになった (Chen *et al.*, 2017)。実際、*myb3r3*や*myb3r5*変異体はDNA損傷下でも細胞分裂の抑制が起きにくく、DNA損傷剤に対する高い耐性を示す (Chen *et al.*, 2017)。以上のような研究から、抑制型MYB3Rが外的ストレスにตอบสนองした細胞周期停止に重要な役割をもつことが初めて明らかになった (図2)。

4. ストレス応答性のNAC型転写因子を介したG2期停止機構

上述のように抑制型MYB3Rのリン酸化制御が細胞周期停止に一義的に重要であれば、CDK活性の低下をもたらすMYB3R4の活性・発現減少だけでG2期停止が誘導されるはずである。しかし、*myb3r4*変異体は野生型植物と同様なDNA損傷感受性を示すことから、他にも抑制型MYB3Rを制御する鍵因子が存在すると考えられる。その答えは、SOG1の標的遺伝子の探索から見つかった。ANAC044とANAC085は、

DNA 損傷に応答して SOG1 により直接転写誘導される NAC 型転写因子である (Ogita *et al.*, 2018; Bourbousse *et al.*, 2018)。両者とも SOG1 とアミノ酸配列が似ており、NAC ドメインにおいては 70%以上の相同性を示す。一方で、SOG1 がもっているような SQ モチーフは持っていないことから、ATM や ATR によるリン酸化制御は受けないと考えられる。興味深いことに、*anac044 anac085* 二重変異体では、DNA 損傷に応答した G2 期停止が起きないことが明らかになった。また、この変異体では DNA 損傷を与えても抑制型 MYB3R タンパク質の安定化が起きないことも明らかになった (Takahashi *et al.*, 2019)。そのことから、ANAC044 と ANAC085 は抑制型 MYB3R のタンパク質分解を阻害することにより、抑制型 MYB3R による G2/M 期特異的遺伝子の転写抑制を促進し、G2 期停止を誘導していると考えられる (図 3)。ANAC044, ANAC085 がどのように抑制型 MYB3R の安定性制御に関わっているのかは未だ不明であるが、これらの NAC 型転写因子が G2 期停止に主要な役割を担っているのは確かである。

ANAC044 と *ANAC085* は、DNA 損傷だけでなく、高温・低温・高塩などのストレスによっても発現誘導される (Takahashi *et al.*, 2019)。植物は高温ストレスを受けると細胞周期を G2 期で停止させるが (Zhao *et al.*, 2014)、*ANAC044* と *ANAC085* はこの際にも G2 期停止を制御していることが報告されている (Takahashi *et al.*, 2019)。高温ストレスによる *ANAC044* と *ANAC085* の発現誘導には SOG1 は必要ないことから、別のシグナル伝達経路を介して転写制御されていると考えられる (Takahashi *et al.*, 2019)。これらの知見を総合すると、*ANAC044*, *ANAC085* は様々なストレスシグナルが集約するハブとして働き、これらを頂点としたシグナル伝達系は、ストレスに応答して G2 期停止をもたらすコアモジュールとして機能していると考えられる (図 3)。



5. おわりに

ストレス環境下で細胞分裂を停止させる仕組みは、ストレス対処のためのエネルギーを確保する一種のトレードオフの機構として重要である。したがって、上述のような *ANAC044/085* や抑制型 MYB3R を介した G2 期停止機構は、ストレス環境下で生存することを運命づけられた植物がもつ、必要不可欠な制御系と言える。しかし、その分子メカニズムに関してはまだ謎の部分が多い。特に、*ANAC044/085* がどのように抑制型 MYB3R のタンパク質安定化を制御しているかは、全く不明である。*ANAC044/085*

の下流因子の中に抑制型 MYB3R のタンパク質分解に関わる鍵因子が含まれている可能性も考えられるが, ANAC044/085 を頂点とするシグナル伝達系は様々な細胞内イベントを制御していると予想されるので, それらを一つ一つ紐解くことが最終的な全容解明につながると考えられる。

近年, 地球温暖化の影響で, これまで経験したことのないような猛暑や大雨, 干ばつなどの異常気象が起きており, 世界中で大きな社会問題となっている。イネやコムギ, トマトなどの作物生産は今後著しく減少すると予想されている。高温や乾燥などのストレスに対する植物の応答機構については比較的研究が進展しており, それらの知見をもとにストレス耐性植物の作出が試みられている。しかし, ストレス耐性を獲得しても, 成長阻害の軽減に至るケースは希であり, バイオマス生産量の確保には大きな壁が立ちはだかっていた。上述のように, ANAC044/085 や抑制型 MYB3R を欠失させた植物はストレスに曝されても細胞分裂を続けることができる。また, ANAC044/085 は複数のストレスに応答する転写因子なので, その機能阻害により, 様々なストレスに曝されても持続的に成長する植物の作出が可能になると考えられる。したがって, ANAC044/085 の阻害剤の開発やゲノム編集による機能欠損体の作出により, 野外環境下で持続的かつ安定的な作物生産を実現できると期待される。また, ストレスによる細胞分裂阻害の影響を軽減した上で, 従来試みられてきたようなストレス耐性付与技術を利用すれば, 真の意味で環境ストレスに強い作物の育種につながるであろう。今後は, 様々な植物種で ANAC044/085 -抑制型 MYB3R 経路の解析を行うことにより, 野外の複合ストレス下でバイオマス生産量が飛躍的に上がるような新規技術開発が可能になると期待される。

6. 謝辞

本稿で取り上げた我々の研究は, 科学研究費補助金 (研究課題番号: 17H03965, 17H06470, 17H06477, 17K15141, 16H01243) による助成のもと行われた。

7. 引用文献

- Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., Kurihara, D., Matsunaga, S., & Umeda, M. 2011. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 10004-10009.
- Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R., & Machida, Y. 2004. Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J. Biol. Chem.* 279: 32979-32988.
- Bourbousse, C., Vegesna, N., & Law, J.A. 2018. SOG1 activator and MYB3R repressors regulate a complex DNA damage network in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: E12453-E12462.
- Chen, P., Takatsuka, H., Takahashi, N., Kurata, R., Fukao, Y., Kobayashi, K., Ito, M., & Umeda

- M. 2017. *Arabidopsis* R1R2R3-Myb proteins are essential for inhibiting cell division in response to DNA damage. *Nat. Commun.* 8: 635.
- Cimprich, K.A., & Cortez, D. 2008. ATR: An essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 616-627.
- Fulcher, N., & Sablowski, R. 2009. Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 20984-20988.
- Furukawa, T., Curtis, M.J., Tominey, C.M., Duong, Y.H., Wilcox, B.W., Aggoune, D., Hays, J.B., & Britt, A.B. 2010. A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair (Amst)* 9: 940-948.
- Georlette, D., Ahn, S., MacAlpine, D.M., Cheung, E., Lewis, P.W., Beall, E.L., Bell, S.P., Speed, T., Manak, J.R., & Botchan, M.R. 2007. Genomic profiling and expression studies reveal both positive and negative activities for the *Drosophila* Myb MuvB/dREAM complex in proliferating cells. *Genes Dev.* 21: 2880-2896.
- Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., Suzuki, K., Müller, I., Voss, U., Jürgens, G., & Ito, M. 2007. R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of *KNOLLE* transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134: 1101-11010.
- Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Demura, T., Nakamura, K., Jürgens, G., & Ito, M. 2011. Mutations in *MYB3R1* and *MYB3R4* cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/M-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 157: 706-717.
- Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y., & Watanabe, A. 1998. A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell* 10: 331-341.
- Ito, M. 2005. Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants. *J. Plant Res.* 118: 61-69.
- Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., Leviczky, T., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J.H., Hauser, M.T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bögre, L., & Ito M. 2015. Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* 34: 1992-2007.
- Korenjak, M., Taylor-Harding, B., Binné, U.K., Satterlee, J.S., Stevaux, O., Aasland, R., White-Cooper, H., Dyson, N., & Brehm, A. 2004. Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell* 119: 181-193.
- Litovchick, L., Sadasivam, S., Florens, L., Zhu, X., Swanson, S.K., Velmurugan, S., Chen, R., Washburn, M.P., Liu, X.S., & DeCaprio, J.A. 2007. Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in

- quiescence. *Mol. Cell* 26: 539-551.
- Ogita, N., Okushima, Y., Tokizawa, M., Yamamoto, Y.Y., Tanaka, M., Seki, M., Makita, Y., Matsui, M., Okamoto-Yoshiyama, K., Sakamoto, T., Kurata, T., Hiruma, K., Saijo, Y., Takahashi, N., & Umeda, M. 2018. Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 94: 439-453.
- Rounds, M.A., & Larsen, P.B. 2008. Aluminum-dependent root-growth inhibition in *Arabidopsis* results from AtATR-regulated cell-cycle arrest. *Curr. Biol.* 18: 1495-1500.
- Sakamoto, T., Inui, Y.T., Uraguchi, S., Yoshizumi, T., Matsunaga, S., Mastui, M., Umeda, M., Fukui, K., & Fujiwara, T. 2011. Condensin II alleviates DNA damage and is essential for tolerance of boron overload stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 3533-3546.
- Schmit, F., Korenjak, M., Mannefeld, M., Schmitt, K., Franke, C., von Eyss, B., Gargic, S., Hänel, F., Brehm, A., & Gaubatz, S. 2007. LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G2/M genes. *Cell Cycle* 6: 1903-1913.
- Shiloh, Y. 2006. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* 31: 402-410.
- Sjogren, C.A., Bolaris, S.C., & Larsen, P.B. 2015. Aluminum-dependent terminal differentiation of the *Arabidopsis* root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-regulated transcriptional response. *Plant Cell* 27: 2501-2515.
- Song, J., & Bent, A.F. 2014. Microbial pathogens trigger host DNA double-strand breaks whose abundance is reduced by plant defense responses. *PLoS Pathog.* 10: e1004030.
- Su, T.T. 2006. Cellular responses to DNA damage: One signal, multiple choices. *Annu. Rev. Genet.* 40: 187-208.
- Takahashi, N., Ogita, N., Takahashi, T., Taniguchi, S., Tanaka, M., Seki, M., & Umeda, M. 2019. A regulatory module controlling stress-induced cell cycle arrest in *Arabidopsis*. *eLIFE* 8: pii: e43944.
- Yi, D., Alvim Kamei, C.L., Cools, T., Vanderauwera, S., Takahashi, N., Okushima, Y., Eekhout, T., Yoshiyama, K.O., Larkin, J., Van den Daele, H., Conklin, P., Britt, A., Umeda, M., & De Veylder, L. 2014. The *Arabidopsis* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell* 26: 296-309.
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J.M., Seki, M., Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schöffl, F., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2011. *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol. Genet. Genomics* 286: 321-332.
- Yoshiyama, K., Conklin, P.A., Huefner, N.D., & Britt, A.B. 2009. Suppressor of gamma

- response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 12843-12848.
- Yoshiyama, K.O., Kaminoyama, K., Sakamoto, T., & Kimura, S. 2017. Increased phosphorylation of Ser-Gln sites on SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 strengthens the DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 29: 3255-3268.
- Yoshiyama, K.O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H., & Umeda, M. 2013. ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 14: 817-822.
- Zhao, L., Wang, P., Hou, H., Zhang, H., Wang, Y., Yan, S., Huang, Y., Li, H., Tan, J., Hu, A., Gao, F., Zhang, Q., Li, Y., Zhou, H., Zhang, W., & Li, L. 2014. Transcriptional regulation of cell cycle genes in response to abiotic stresses correlates with dynamic changes in histone modifications in maize. *PLoS One* 9: e106070.

分裂期キナーゼによる植物の細胞質分裂の制御

笹部 美知子

弘前大学 農学生命科学部 生物学科
〒036-8561 青森県弘前市文京町 3 番地

The regulatory mechanism of cytokinesis by mitotic kinases in plant cells

Michiko Sasabe

Department of Biology, Faculty of Agriculture and Life Science,
Hirosaki University, 3 Bunkyo-cho, Hirosaki, 036-8561, Japan

Key words: cytokinesis, microtubule, microtubule-associated protein, MAPK cascade,
mitotic kinase

DOI: 10.24480/bsj-review.11b3.00185

1. はじめに

植物の形態形成は、細胞分裂の最後の過程である細胞質分裂において正確な位置に細胞板が形成されることに依存している。植物の細胞質分裂はフラグモプラストと呼ばれる微小管を主成分とする構造体により実行される。このイベントには細胞骨格の動態制御、膜交通の制御、細胞膜融合と細胞壁の合成という複雑で多様な素過程が含まれる。これらの素過程は、フラグモプラストの中で複雑なシグナルネットワークの制御下で協調して進行する。細胞質分裂に関与する分子は、種々の研究により多数知られるようになったが (Smertenko *et al.* 2017; 2018), 依然としてこれらの分子がどのように機能制御され、統御されたイベントとして実行されているのかは未だ謎が多い。動物細胞では、細胞質分裂を含む分裂期のイベントを協調的に進行させる分裂期キナーゼと呼ばれる制御因子が多数同定され、シグナルネットワークの解析や下流の詳細な制御メカニズムの解析が進められているが、植物ではそのオソログが存在しないものも多く、植物独自の制御系を進化させてきたと考えられている。ここでは、植物細胞の細胞質分裂の制御に重要であることが分かっている MAP キナーゼカスケードと動物細胞でも重要な分裂期キナーゼとして知られる Aurora キナーゼ及び、これらキナーゼの下流の制御因子を中心に紹介しながら、リン酸化制御の面から植物の細胞質分裂の分子メカニズムについて明らかになってきたことを紹介したい。

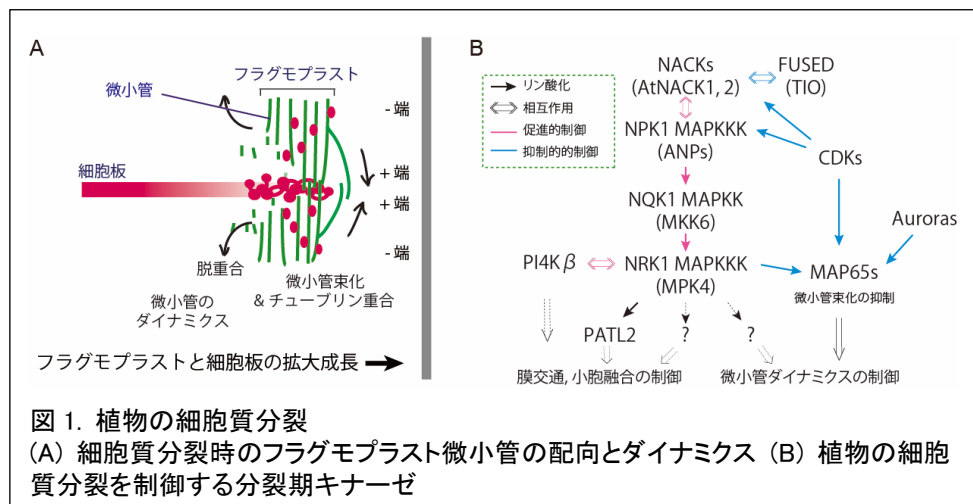
2. 植物の細胞質分裂を制御する MAP キナーゼカスケード

2-1. MAP キナーゼカスケードによる細胞質分裂の制御

植物の細胞質分裂は、先にも述べた通りフラグモプラストと呼ばれる微小管構造体により実行される。逆平行に配向した巨大な微小管束より構成されたフラグモプラストは、分裂期終期に両極に分離した娘染色体の間に形成された後、細胞周期の進行に伴い細胞板の形成を

伴いながら親細胞壁に向かって遠心的に拡大する。フラグモプラストの拡大成長は微小管束の内側での微小管の脱重合と外側でのチューブリンの重合によって保証されている (Murata *et al.* 2013; 図 1A)。このような微小管の動的変動は微小管ダイナミクスと呼ばれるが、フラグモプラスト微小管のダイナミクスを制御するキーレギュレーターとして、キネシン様タンパク質 NACK1 (NPK1-activating kinesin-like protein1) により活性化される MAP キナーゼカスケードが明らかになっている (Nishihama *et al.* 1997; 2001; 2002; Krysan *et al.* 2002; Strompen *et al.* 2002; Ishikawa *et al.* 2002; Soyano *et al.* 2003; Tanaka *et al.* 2004; Takahashi *et al.* 2010; Kosetsu *et al.* 2010; 図 1B)。タバコでは、この MAP キナーゼカスケードの最上位に位置するのは NPK1 MAPKKK (nucleus-and phragmoplast-localized protein kinase1) で、キネシン様タンパク質 NACK1 との結合により活性化される (Banno *et al.* 1993; Carderini *et al.* 1998; 2001; Bögre *et al.* 1999; Nishihama *et al.* 2001; 2002)。この 2 つのタンパク質は、M 期では細胞質

に散在しているが、細胞質分裂が始まると直接結合を介して活性化すると同時に、フラグモプラストの赤道面、つまりフラグモプラスト微小管のプラス



端に局在を変化させる。NPK1 の活性はこの時期にピークを迎えるので、両タンパク質の結合はこの時期まで抑制されているが、その仕組みについては後述する。NPK1 の下流では、NQK1/NtMEK1 MAPKK, NRK1/NTF6 MAPK がそれぞれ下流のキナーゼをリン酸化し、カスケード全体が細胞質分裂時特異的に活性化される (Soyano *et al.* 2013)。BY-2 細胞やシロイヌナズナにおいて、NACK1 や NPK1, NQK1 のドミナントネガティブ型 (下流因子への結合部位欠損型やキナーゼ不活性型タンパク質) を過剰発現させると、フラグモプラストの拡大成長が阻害され、不完全な細胞板を持つ多核化した細胞質分裂不全を示す細胞が高頻度で観察される (Nishihama *et al.* 2001; 2002; Soyano *et al.* 2003; Sasabe *et al.* 2015)。この表現型は微小管安定化剤であるタキソールで培養細胞を処理した時の表現型と似ていたことがヒントとなり (Yasuhara *et al.* 1993)、このカスケードはフラグモプラストの拡大成長の基盤となっている微小管ダイナミクスの制御に関与していると考えられるようになった。

その後、微小管結合タンパク質 (microtubule-associated proteins; MAPs) に着目したカスケードの標的タンパク質の探索が行われ、基質の一つとして微小管束化タンパク質、NtMAP65-1 が同定されている (Sasabe *et al.* 2006)。MAP65 はヒト (PRC1)、線虫 (SPD1) から酵母 (Ase1) まで広く保存されたタンパク質ファミリーで、いずれの生物においても細胞質分裂への関与が報告されている (Pellman *et al.* 1995; Jiang *et al.* 1998; Schuyler *et al.* 2003;

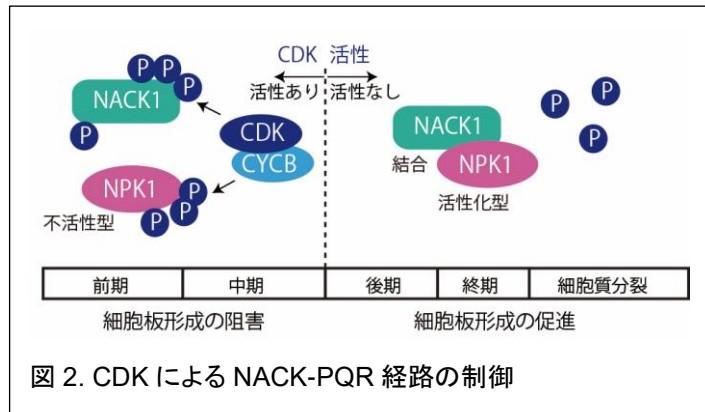
Müller *et al.* 2004; Verbrugghe *et al.* 2004)。細胞質分裂は、生物種ごとに独自のシグナルネットワークを発達させ、見かけ上様々な様式により実行されているが、最終的に同じファミリーのタンパク質が下流で働いていることは進化上も興味深い。NtMAP65-1 は、MAPK によって C 末端の 1 カ所がリン酸化されることにより微小管の束化活性が低下する (Sasabe *et al.* 2006)。このリン酸化サイトにアミノ酸置換を導入した非リン酸化型 MAP65 をタバコ培養細胞で過剰発現させると、微小管脱重合剤に対する抵抗性が增大すると同時に、フラグモプラストの拡大成長が遅延することが分かった (Sasabe *et al.* 2006)。これらの結果から、細胞板の周縁に位置するフラグモプラスト微小管のプラス端では、MAPK が MAP65 のリン酸化を介して微小管の束化を局所的に緩めて微小管のダイナミクスを更新することによりフラグモプラストの拡大成長を促進するというモデルが提唱されている (Sasabe *et al.* 2006; 図 1B)。

この経路は、シロイヌナズナでも保存されており、NACK1 のシロイヌナズナホモログをコードする *AtNACK1* と *AtNACK2* は、細胞質分裂不全の変異体から同定された *HINKEL* と *TETRASPORE* とそれぞれ同一であった (Nishihama *et al.* 2002; Strompen *et al.* 2002; Yang *et al.* 2003)。*HINKEL/AtNACK1* 及び、*TETRASPORE/AtNACK2* の変異体は、それぞれ体細胞分裂と花粉形成に異常を示すが、二重変異体は細胞質分裂の失敗から配偶体致死になる (Tanaka *et al.* 2004)。このことから、NACK-PQR 経路と名付けられたこの経路は、植物の細胞質分裂及び個体発生において必須であることが明らかになった。MAP65 はシロイヌナズナでは 9 つのファミリーメンバーが存在するが、そのうち MAP65-1, 2, 3 及び 4 は MAPK に加えて CDK や Aurora キナーゼによりリン酸化されること、そのリン酸化が MAP65 の微小管への結合活性や束化活性に影響を与えることにより細胞質分裂に寄与する可能性が報告されている (Smertenko *et al.* 2006; Kosetsu *et al.* 2010; Beck *et al.* 2010; Sasabe *et al.* 2011a; Li *et al.* 2017; Boruc *et al.* 2017; 図 1B)。このように、植物の細胞質分裂におけるフラグモプラスト微小管の制御において MAP65 は鍵因子となっているようであるが、高度に協調して進行していると思われる細胞質分裂の分子メカニズムの全容解明のためには、個々のリン酸化による機能制御の詳細とそれぞれのシグナルネットワークの相互関係を明らかにする必要がある。

2-2. CDK による NACK-PQR 経路の制御

先にも述べた通り、NACK-PQR 経路の因子は M 期に入った段階で十分量の蓄積が観察されるが、MAPK カスケードの活性化は細胞質分裂の時期に限定されている。この特異的な活性化は、活性化因子である *NACK* 遺伝子の M 期特異的転写と、M 期後期への移行期での特異的な *NACK1* と *NPK1* の結合に依存しているが、この経路が正確なタイミングで細胞質分裂を実行するために重要なこの二つの制御は、いずれも CDK により調節されていることが示されている (Araki *et al.* 2004; Sasabe *et al.* 2011b)。本レビューの高橋らの稿でも述べられているように、植物の細胞周期の G2/M 期への移行には R1R2R3 型 MYB 転写因子 (MYB3R) が関与している (Ito *et al.* 2005)。MYB3R の活性制御には CDK によるリン酸化が重要であるが、タバコにおいて *NACK1* は、この転写因子の制御下にあることが明らかになっている (Araki *et al.* 2004)。また、翻訳後の *NACK1* と *NPK1* も CDK の基質であることが示されている (Sasabe *et al.* 2011b; 図 1B)。M 期に入ると、MYB3R による転写に依存して両タンパク質の蓄

積量は増加するが、これらタンパク質は速やかに CDK によりリン酸化され、M 期後期において CDK 活性が低下するまでリン酸化状態が維持される。NPK1 は NACK1 の直接結合により活性化されることが分かっているが、CDK リン酸化は NACK1 及び NPK1 の結合を *in vitro* 及び *in vivo* において阻害することが明らかになった。



つまり、M 期中期までは、両タンパク質は CDK によるリン酸化によって結合が阻害されており、後期に入り CDK 活性が低下すると (つまり M 期を脱出すると)、CDK による両タンパク質のリン酸化が解除されることにより、NACK1 と NPK1 の直接結合とそれに続く NACK-PQR 経路の活性化が誘導される (Sasabe *et al.* 2011b)。このように NACK-PQR 経路の活性化、言い換えると細胞質分裂の開始は、M 期の進行とリンクして厳密に制御されている (図 2)。

3. 分裂期キナーゼ Aurora キナーゼの分裂期における機能と制御

3-1. 動物細胞における Aurora kinase の働き

細胞分裂における染色体の正確な分配は、紡錘体微小管による染色体の補足とこれら微小管のダイナミクスに依存している。動物細胞では、このイベントの制御のキーレギュレーターとして Aurora キナーゼが働いていることが知られている。Aurora キナーゼは動物から酵母にまで保存された分裂期キナーゼで、分裂酵母や出芽酵母では 1 つ、線虫やショウジョウバエでは 2 つ、そして哺乳動物では 3 つのメンバーから構成されている。その機能は中心体の分離や、染色体の凝集、中期染色体の整列から紡錘体の形成や細胞質分裂の制御と多岐に渡っている (Goldenson *et al.* 2015; Vader and Lens 2008; Ducat and Zheng 2008; Willems *et al.* 2018)。動物細胞における Aurora キナーゼの機能と比較して、植物細胞の Aurora キナーゼの機能解析は遅れているが、ここでは最近報告された細胞質分裂への関与に焦点を絞って紹介したい。

哺乳動物の Aurora キナーゼは Aurora A, B, C の 3 つのメンバーからなるが、そのうち Aurora A と B は全身の増殖細胞で発現している。Aurora A は、G2 期より中心体に局在し始め、核膜崩壊後は紡錘体極 (両極に分かれた中心体) と紡錘体に集積する。分裂の開始に伴い、中心体には γ チューブリン複合体や、TACC (transforming acidic coiled-coil) タンパク質、そして様々な微小管結合タンパク質がリクルートされ、微小管形成中心 (microtubule organizing center; MTOC) としての機能が亢進する。成熟した中心体は、微小管の重合核となり双極性の紡錘体形成を促進するが、Aurora A は中心体成熟を介して紡錘体形成を制御していることが明らかになっている。一方で、Aurora B は S 期から核内に蓄積し、M 期に入ると染色体から動原体へ、細胞質分裂時にはセントラルスピンドルのミッドゾーンに局在場所を移し、最終的にはミッドボディーへとダイナミックに局在を変化させる。このように次々と局在場所を移

動させることから, Aurora B を含む複合体タンパク質は染色体パッセンジャー複合体 (chromosome passenger complex) と呼ばれている (Adams *et al.* 2002)。この局在パターンからも予測できるとおり, Aurora B は染色体の凝集と分配, そして細胞質分裂と分裂期を通して重要な機能を果たしてしていることが明らかにされている。

これらキナーゼの分裂期における様々な生理的機能については, それぞれの時期における活性化因子や基質の同定によりその分子機構が明らかになりつつあるが (Willems *et al.* 2018), ここでは Aurora B によって制御される細胞質分裂の進行を制御するメカニズムについてのみ簡単に紹介する。Aurora B を含む染色体パッセンジャー複合体は, 細胞質分裂時において, 二つに分かれた染色体の間に形成される微小管構造体であるセントラルスピンドルのミッドゾーンに局在し, キネシン様タンパク質 MKLP1 と Rho GTPase activating protein (RhoGAP), CYK-4 から構成された centralspindlin と呼ばれる複合体をリン酸化することが分かっている (Glotzer 2005)。Centralspindlin はセントラルスピンドル形成において中心的な制御因子として知られており, 逆並行に配向した微小管を+端で束化し, セントラルスピンドルの形成を促進する (Mishima *et al.*; 2002; 2004)。Centralspindlin は, 多量体化を介して微小管の束化活性が上昇し, セントラルスピンドルの形成を促進することが知られているが (Hutterer *et al.* 2009), この多量体化は MKLP1 への 14-3-3 タンパク質の結合により阻害される。一方で, Aurora B によりリン酸化された MKLP は, 14-3-3 タンパク質との結合が阻害されることから, セントラルスピンドルのミッドゾーンでは, 局所的な centralspindlin の集積と束化活性が維持されることにより, 正常な細胞質分裂の進行が保証されていると考えられている (Douglus *et al.* 2010)。

3-2. 植物細胞の Aurora kinase: 細胞質分裂における機能と標的因子

植物の Aurora キナーゼは α -Aurora キナーゼと β -Aurora キナーゼの二つのサブクラスからなり, シロイヌナズナでは二つの α -Aurora キナーゼ (AtAurora1, AtAurora2) と一つの β -Aurora キナーゼ (AtAurora3) を持つ (Demidov *et al.* 2005; Van Damme *et al.* 2004; Kawabe *et al.* 2005)。 α -Aurora キナーゼに分類される AtAurora1 及び AtAurora2 は, 核膜の崩壊前は核質に局在するが, 核膜崩壊後は M 期を通して分裂期の微小管構造体し, 細胞質分裂時には細胞板に局在する (Demidov *et al.* 2005; Van Damme *et al.* 2004; 2011; Kawabe *et al.* 2005; Petrovska *et al.* 2012)。一方, β -Aurora キナーゼの AtAurora3 は, 間期には核質及びクロモセンターに, M 期中期にはセントロメアに局在することが報告されている (Demidov *et al.* 2005)。このような局在から, α -Aurora キナーゼと β -Aurora キナーゼは分裂期においてそれぞれ特異的な機能を有していると考えられているが, 動物の Aurora A, B とそれぞれ機能的に対応しているわけではなさそうである。例えば, AtAurora1 の紡錘体への局在は動物の Aurora A の局在に似ているが, 細胞板への局在は Aurora B のセントラルスピンドルミッドゾーンへの局在と類似している。また AtAurora3 のセントロメアへの局在は M 期中期においてパッセンジャー複合体を形成する Aurora B の局在に似ているが, 細胞質分裂時には Aurora B のように局在場所をかえることなく, 染色体にとどまる (Demidov *et al.* 2005)。植物における Aurora キナーゼの機能はまだ未解明の部分が多いが, 動物の Aurora キナーゼの基質の一つ, ヒストン H3 (CenH3) は植物

においても Aurora キナーゼの基質であると考えられている (Demidov *et al.* 2009; Kurihara *et al.* 2006)。CenH3 は染色体のキネトコアに局在するが、BY-2 細胞においてその局在をライブイメージングにより観察したところ Aurora キナーゼの阻害剤である Hesperadin 処理により紡錘体の赤道面への整列の遅れと、染色体の分配の際にラギングクロモソームが多数観察された。このことから、Aurora キナーゼは、中期染色体の整列におけるキネトコアと微小管の間の結合と染色体分離におけるコヒーシンの解離に機能していると考えられている (Kurihara *et al.* 2008)。しかし、Hesperadin 処理により微小管ダイナミクスには変化が見られず、微小管に対する Aurora キナーゼの作用についてはさらなる解析を待ちたい。

AtAurora1 及び2は細胞質分裂時に細胞板に局在するが、植物細胞の細胞質分裂時において Aurora キナーゼはどのように機能しているのだろうか？シロイヌナズナの *ataurora1* *ataurora2* 二重変異体は配偶体致死の表現型を示すが、弱いアレルの *ataurora1* と *ataurora2* の二重変異体を用いた解析により、 α -Aurora キナーゼの機能についてヒントが得られている。この二重変異体は側根形成に異常を示すが、その原因は側根原基形成時の並層分裂において分裂方向の異常が生じることに起因していた (Van Damme *et al.* 2011)。つまり、正常な方向への細胞質分裂に欠損が生じたのである。 α -Aurora キナーゼの二重変異体では、この表現型に加えて、胚発生時の方向性を持った分裂や、根端分裂組織、気孔形成といった様々な発生過程における非対称分裂時に側根原基において見られたような細胞質分裂の方向異常が観察されたことから、このキナーゼの主要な機能は細胞板形成時の分裂面の制御であると考えられている (Van Damme *et al.* 2011)。また、 α -Aurora キナーゼの RNAi ラインでは細胞板形成の欠損を伴う細胞質分裂の異常が観察されていることから、細胞板形成そのものにも関与しているのかもしれない (Petrovská *et al.* 2012)。最近、シロイヌナズナの α -Aurora キナーゼの基質として、先にも紹介した微小管結合タンパク質の MAP65-1 が報告された (Boruc *et al.* 2017; 図 1B)。Aurora キナーゼによるリン酸化は、細胞分裂における MAP65 の局在を制御することにより細胞分裂の進行に寄与しているようであるが、MAP65 の制御メカニズムと細胞分裂時における詳細な分子機能については、前述したとおり他の分裂期キナーゼによる時空間的なリン酸化制御のネットワークの詳細を明らかにすることが必要である。

4. 細胞質分裂に関与するその他のキナーゼ

細胞質分裂に必須の因子として単離されたシロイヌナズナの TWO-IN-ONE (TIO) は、動物の発生を制御する重要なシグナル伝達経路として知られているヘッジホッグシグナル伝達経路における鍵となる複合体因子の一つである FUSED プロテインキナーゼと類似したセリン/スレオニンプロテインキナーゼである (Oh *et al.* 2005)。TIO は、細胞質分裂時、Kinesin-12 ファミリーの PAKRP1/Kinesin12A 及び PRKRP1L/Kinesin12B との相互作用を介してフラグモプラストのプラス端に局在し、フラグモプラストの拡大を制御していることが明らかになっている (Oh *et al.* 2012)。一方で、TIO は Kinesin-7 ファミリーの AtNACK2/TETRASPORE と相互作用すること、この結合を介して AtNACK2 の花粉形成時における細胞質分裂の機能を拮抗的に阻害する可能性を報告している (Oh *et al.* 2014)。この拮抗的作用は Kinesin-12 ファミリーとは独立していることから、TIO は少なくとも花粉形成過程において NACK-PQR 経路の

構成因子との直接結合を介して濃度依存的に細胞質分裂を負に制御しているようである (図 1B)。今後、TIO の基質を明らかにすると同時に、花粉形成において見られたこの表現型が NACK-PQR 経路の活性に影響を与えているのか、AtNACK2/TETRASPORE の未知の機能を反映しているのかを明らかにすることにより、細胞質分裂の制御における TIO の役割が明らかになると期待される。

最近、細胞板に局在する PI4K β が細胞質分裂において細胞板形成とフラグモプラスト微小管のダイナミクスの両方を制御していることが報告された (Lin *et al.* 2019)。シロイヌナズナの *pi4k β 1 pi4k β 2* 二重変異体では膜交通が異常となり細胞板の縁での小胞融合が阻害されると同時に、フラグモプラスト微小管が異所的に過剰安定している様子が観察され、結果的に細胞質分裂の異常が生じる。この変異体では、MAP65-3 がフラグモプラストの赤道面のみならず、形成された細胞板の内部に残存している様子が観察されたことから、フラグモプラストの過剰な安定化は MAP65-3 の異所的局在に起因していると推測されている。さらに、筆者らは、PI4K β と MPK4 MAPK が物理的相互作用することを示しており、PI4K β と MPK4 がそれぞれ MAP65-3 の局在と活性を制御することによりフラグモプラスト微小管のダイナミクスを相乗的に制御している可能性を報告している (Lin *et al.* 2019; 図 1B)。我々は、MPK4 の基質の一つとしてホスファチジルイノシトール結合タンパク質 PATELLIN2 (PATL2) を報告している (Suzuki *et al.* 2016; 図 1B)。PATL2 の細胞質分裂における機能は今のところ明らかではないが、その局在と保存されたドメインの性質から、細胞板の拡大成長において膜交通や小胞の融合に関与している可能性がある。PATL2 は各種ホスファチジルイノシトールに結合する能力を持つが、MPK4 によるリン酸化によりそれぞれのホスファチジルイノシトールに対する結合能が変わることから、NACK-PQR 経路が PATL2 のリン酸化を介して、フラグモプラスト微小管のダイナミクスだけでなく、細胞質分裂における膜交通や膜融合の制御に関与している可能性もあると考えている (Suzuki *et al.* 2016)。今後、NACK-PQR 経路とホスファチジルイノシトール経路の相互ネットワークの詳細を明らかにすることにより、細胞質分裂における複雑な素過程がどのように協調して実行されているのかが明らかになるかもしれない。

5. おわりに

植物の細胞質分裂はフラグモプラストの動態制御と細胞板の構築が共役して起こる必要がある。今回、M 期キナーゼに焦点を絞り、その基質や相互作用因子の解析により細胞質分裂の素過程を協調させる仕組みが少しずつ明らかになりつつあることを紹介した。しかし、その理解はまだほんの一端であり、植物の細胞質分裂のメカニズムの理解のためには、明らかになってきた M 期キナーゼの基質の同定をはじめ、それぞれのシグナル経路の相互作用を詳細に解析することが必要である。最後に述べた PI4K の例のように、細胞板形成に関わると思われていた分子が、様々な結合因子を介して細胞骨格の制御にも関与している例を考えると、今回は紹介しきれなかった細胞質分裂時の膜交通の制御系からも細胞骨格のダイナミクスとの関係を見直す必要があるかもしれない。細胞質分裂に機能する最も有名な膜融合因子である SNARE タンパク質の KNOLLE に相互作用する KEULE は、SNARE タンパク質の構造変換

を誘導し膜融合を促進するタンパク質であるが、その変異体では、細胞板形成だけでなくフラグモプラストの構造に異常が見られることが報告されており、本因子が細胞板形成と微小管ダイナミクスを協調させる因子として機能する可能性が提案されている (Steiner *et al.* 2016)。はじめに述べたように、細胞質分裂は形態形成の基盤となるイベントである。今後、細胞質分裂において実行される個々のイベントをつなぐシグナルネットワークの分子メカニズムやさらに高次のネットワーク同士の相互作用を地道に明らかにしていくことが、植物の細胞分裂の分子機構の全体像の理解とその先の形態形成の理解のために重要であると考えている。

6. 謝辞

本稿で述べた著者たちのグループの研究は、科学研究費補助金 (課題番号 : 25114504, 26840086, 15H01223, 17K07432), 住友財団による支援を受けて行われた。

7. 引用文献

- Adams, R.R., Maiato, H., Earnshaw, W.C., & Carmena, M. 2001. Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 153: 865-880.
- Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R., & Machida, Y. 2004. Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J. Biol. Chem.* 279: 32979-32988.
- Banno, H., Hirano, K., Nakamura, T., Irie, K., Nomoto, S., Matsumoto, K., & Machida, Y. 1993. NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4745-4752.
- Beck, M., Komis, G., Müller, J., Menzel, D., & Samaj, J. 2010. Arabidopsis homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell* 22: 755-771.
- Boruc, J., Weimer, A.K., Stoppin-Mellet, V., Mylle, E., Kosetsu, K., Cedeño, C., Jaquinod, M., Njo, M., De Milde, L., Tompa, P., Gonzalez, N., Inzé, D., Beeckman, T., Vantard, M., & Van Damme, D. 2017. Phosphorylation of MAP65-1 by Arabidopsis Aurora Kinases Is Required for Efficient Cell Cycle Progression. *Plant Physiol.* 173: 582-599.
- Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N.S., Hirt, H., & Heberle-Bors, E. 1999. A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11: 101-113.
- Calderini, O., Bögre, L., Vicente, O., Binarova, P., Heberle-Bors, E., & Wilson, C. 1998. A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell. Sci.* 111: 3091-3100.
- Calderini, O., Glab, N., Bergounioux, C., Heberle-Bors, E., & Wilson, C. 2001. A novel tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 18139-18145.

- Demidov, D., Hesse, S., Tewes, A., Rutten, T., Fuchs, J., Ashtiyani, R.K., Lein, S., Fischer, A., Reuter, G., & Houben, A. 2009. Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in Arabidopsis. *Plant J.* 59: 221-230.
- Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F.R., & Houben, A. 2005. Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in Arabidopsis and other plants. *Plant Cell* 17: 836-848.
- Douglas, M.E., Davies, T., Joseph, N., & Mishima, M. 2010. Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr. Biol.* 20: 927-933.
- Glotzer, M. 2005. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307: 1735-1739.
- Goldenson, B., & Crispino, J.D. 2015. The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene* 34: 537-545.
- Hutterer, A., Glotzer, M., & Mishima, M. 2009. Clustering of centralspindlin is essential for its accumulation to the central spindle and the midbody. *Curr. Biol.* 19: 2043-2049.
- Ishikawa, M., Soyano, T., Nishihama, R., & Machida, Y. 2002. The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase contains a functional nuclear localization signal at the binding site for the NACK1 kinesin-like protein. *Plant J.* 32: 789-798.
- Ito, M. 2005. Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants. *J. Plant Res.* 118: 61-69.
- Jiang, W., Jimenez, G., Wells, N.J., Hope, T.J., Wahl, G.M., Hunter, T., & Fukunaga, R. 1998. PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol. Cell* 2: 877-885.
- Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., Uchiyama, S., & Fukui, K. 2005. Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol. Biol.* 58: 1-13.
- Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Hirt, H., & Machida, Y. 2010. The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 3778-3790.
- Krysan, P.J., Jester, P.J., Gottwald, J.R., & Sussman, M.R. 2002. An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell* 14: 1109-1120.
- Kurihara, D., Matsunaga, S., Kawabe, A., Fujimoto, S., Noda, M., Uchiyama, S., & Fukui, K. 2006. Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* 48: 572-580.
- Kurihara, D., Matsunaga, S., Uchiyama, S., & Fukui, K. 2008. Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol.* 49: 1256-1261.
- Li, H., Sun, B., Sasabe, M., Deng, X., Machida, Y., Lin, H., Julie Lee, Y.R., & Liu, B. 2017. Arabidopsis MAP65-4 plays a role in phragmoplast microtubule organization and marks the cortical cell division site. *New Phytol.* 215: 187-201.
- Lin, F., Krishnamoorthy, P., Schubert, V., Hause, G., Heilmann, M., & Heilmann, I. 2019. A dual role for cell plate-associated PI4K β in endocytosis and phragmoplast dynamics during plant somatic cytokinesis. *EMBO J.* 38: e100303.

- Mishima, M., Kaitna, S., & Glotzer, M. 2002. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev. Cell* 2: 41-54.
- Mishima, M., Pavicic, V., Grüneberg, U., Nigg, E.A., & Glotzer, M. 2004. Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature* 430: 908-913.
- Müller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P.J., & Hauser, M.T. 2004. The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr. Biol.* 14: 412-417.
- 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 Commun.* 4:1967.
- Nishihama, R., Banno, H., Kawahara, E., Irie, K., & Machida, Y. 1997. Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of Arabidopsis ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J.* 12: 39-48.
- Nishihama, R., Ishikawa, M., Araki, S., Soyano, T., Asada, T., & Machida, Y. 2001. The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev.* 15: 352-363.
- Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., Irie, K., Ito, M., Terada, M., Banno, H., Yamazaki, Y., & Machida, Y. 2002. Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* 109: 87-99.
- Oh, S.A., Allen, T., Kim, G.J., Sidorova, A., Borg, M., Park, S.K., & Twell, D. 2012. Arabidopsis Fused kinase and the Kinesin-12 subfamily constitute a signalling module required for phragmoplast expansion. *Plant J.* 72: 308-319.
- Oh, S.A., Bourdon, V., Dickinson, H.G., Twell, D., & Park, S.K. 2014. Arabidopsis Fused kinase TWO-IN-ONE dominantly inhibits male meiotic cytokinesis. *Plant Reprod* 27: 7-17.
- Oh, S.A., Johnson, A., Smertenko, A., Rahman, D., Park, S.K., Hussey, P.J., & Twell, D. 2005. A divergent cellular role for the FUSED kinase family in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Curr. Biol.* 15: 2107-2111.
- Pellman, D., Bagget, M., Tu, Y.H., Fink, G.R., & Tu, H. 1995. Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 130: 1373-1385.
- Sasabe, M., Boudolf, V., De Veylder, L., Inzé, D., Genschik, P., & Machida, Y. 2011. Phosphorylation of a mitotic kinesin-like protein and a MAPKKK by cyclin-dependent kinases (CDKs) is involved in the transition to cytokinesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 17844-17849.
- Sasabe, M., Ishibashi, N., Haruta, T., Minami, A., Kurihara, D., Higashiyama, T., Nishihama, R., Ito, M., & Machida, Y. 2015. The carboxyl-terminal tail of the stalk of Arabidopsis NACK1/HINKEL kinesin is required for its localization to the cell plate formation site. *J. Plant Res.* 128: 327-336.
- Sasabe, M., Kosetsu, K., Hidaka, M., Murase, A., & Machida, Y. 2011. *Arabidopsis thaliana* MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant Signal Behav* 6: 743-747.
- Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T.J., Hidaka, M., & Machida, Y.

2006. Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev.* 20: 1004-1014.
- Schuyler, S.C., Liu, J.Y., & Pellman, D. 2003. The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. Microtubule-associated proteins. *J. Cell Biol.* 160: 517-528.
- Smertenko, A., Assaad, F., Baluška, F., Bezanilla, M., Buschmann, H., Drakakaki, G., Hauser, M.T., Janson, M., Mineyuki, Y., Moore, I., Müller, S., Murata, T., Otegui, M.S., Panteris, E., Rasmussen, C., Schmit, A.C., Šamaj J, Samuels, L., Staehelin, L.A., Van Damme, D., Wasteneys, G., & Žárský V 2017. Plant Cytokinesis: Terminology for Structures and Processes. *Trends Cell Biol.* 27: 885-894.
- Smertenko, A. 2018. Phragmoplast expansion: the four-stroke engine that powers plant cytokinesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 46: 130-137.
- Smertenko, A.P., Chang, H.Y., Sonobe, S., Fenyk, S.I., Weingartner, M., Bögre, L., & Hussey, P.J. 2006. Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J. Cell. Sci.* 119: 3227-3237.
- Soyano, T., Nishihama, R., Morikiyo, K., Ishikawa, M., & Machida, Y. 2003. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev.* 17: 1055-1067.
- Steiner, A., Müller, L., Rybak, K., Vodermaier, V., Facher, E., Thellmann, M., Ravikumar, R., Wanner, G., Hauser, M.T., & Assaad, F.F. 2016. The Membrane-Associated Sec1/Munc18 KEULE is Required for Phragmoplast Microtubule Reorganization During Cytokinesis in Arabidopsis. *Mol Plant* 9: 528-540.
- Strompen, G., El Kasmi, F., Richter, S., Lukowitz, W., Assaad, F.F., Jürgens, G., & Mayer, U. 2002. The Arabidopsis HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr. Biol.* 12: 153-158.
- Suzuki, T., Matsushima, C., Nishimura, S., Higashiyama, T., Sasabe, M., & Machida, Y. 2016. Identification of Phosphoinositide-Binding Protein PATELLIN2 as a Substrate of Arabidopsis MPK4 MAP Kinase during Septum Formation in Cytokinesis. *Plant Cell Physiol.* 57: 1744-1755.
- Takahashi, Y., Soyano, T., Kosetsu, K., Sasabe, M., & Machida, Y. 2010. HINKEL kinesin, ANP MAPKKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 51: 1766-1776.
- Tanaka, H., Ishikawa, M., Kitamura, S., Takahashi, Y., Soyano, T., Machida, C., & Machida, Y. 2004. The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis. *Genes Cells* 9: 1199-1211.
- Verbrugghe, K.J., & White, J.G. 2004. SPD-1 is required for the formation of the spindle midzone but is not essential for the completion of cytokinesis in *C. elegans* embryos. *Curr. Biol.* 14: 1755-1760.
- Van Damme, D., Bouget, F.Y., Van Poucke, K., Inzé, D., & Geelen, D. 2004. Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J.* 40: 386-398.

- Van Damme, D., De Rybel, B., Gudesblat, G., Demidov, D., Grunewald, W., De Smet, I., Houben, A., Beeckman, T., & Russinova, E. 2011. Arabidopsis α Aurora kinases function in formative cell division plane orientation. *Plant Cell* 23: 4013-4024.
- Willems, E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat, P.N., & Rogister, B. 2018. The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell Div* 13: 7.
- Yang, C.Y., Spielman, M., Coles, J.P., Li, Y., Ghelani, S., Bourdon, V., Brown, R.C., Lemmon, B.E., Scott, R.J., & Dickinson, H.G. 2003. TETRASPORE encodes a kinesin required for male meiotic cytokinesis in Arabidopsis. *Plant J.* 34: 229-240.
- Yasuhara, H., Sonobe, S., & Shibaoka, H. 1993. Effects of Taxol on the Development of the Cell Plate and of the Phragmoplast in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiol.* 34: 21-29.

植物の微小管依存的な細胞内輸送機構

山田 萌恵

名古屋大学大学院理学研究科

〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

Microtubule-dependent intracellular transport in plants

Moé Yamada

Graduate School of Science, Nagoya University

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8602, Japan

Key words: microtubule, kinesin, intracellular transport, nucleus, chloroplast

DOI: 10.24480/bsj-review.11b4.00186

1. はじめに

微小管やアクチンによって行われる細胞内輸送は、真核生物の細胞内で物質輸送を司る必須の生命機構である (Vale, 2003)。膜小胞や細胞小器官に留まらず、タンパク質やシグナル伝達物質などの細胞内構成成分が、細胞内輸送によって細胞内の特定領域へ適切に配置される。動物ではキネシンとダイニンによる微小管依存的な細胞内輸送機構の研究が精力的に行われてきた一方で、植物ではアクチンとミオシンによる原形質流動が主要な細胞内機構として重要視されてきた。しかしながら、植物にもキネシン遺伝子が多数存在しているにも関わらず、植物における微小管の細胞内輸送への寄与はあまり分かっていない。本稿では、基部陸上植物であるヒメツリガネゴケのオルガネラ輸送を例に取り、植物細胞における微小管依存的な細胞内輸送機構について紹介する。

2. 細胞内輸送を司る細胞骨格とモーター分子

細胞内輸送はアクチンと微小管、そしてこれら細胞骨格に付随するモータータンパク質によって駆動される (Vale, 2003)。モータータンパク質の非モーター領域が積み荷 (カーゴ) と結合し、モーター領域が細胞骨格上を移動することでカーゴの輸送が行われる。そして、特定のカーゴを輸送するモーターが欠損すると、細胞内でカーゴの分布異常や運搬異常が引き起こされる (Hall & Hedgecock, 1991; Tanaka *et al.*, 1998)。アクチン依存的な細胞内輸送を駆動するのはミオシンであり、特にミオシン V は小胞や液胞、微小管結合タンパク質など多様なカーゴを輸送する (Reck-Peterson *et al.*, 2000)。一方で、微小管依存的な細胞内輸送を駆動するのはキネシンと細胞質ダイニンであり、キネシンがプラス端方向性の輸送を、細胞質ダイニンがマイナス端方向性の輸送を遂行する。細胞はプラス端方向性とマイナス端方向性の 2 種類のモータータンパク質とカーゴとの結合様式を使い分けることで、両方向性の微小管依存的輸送を行っている (図 1)。

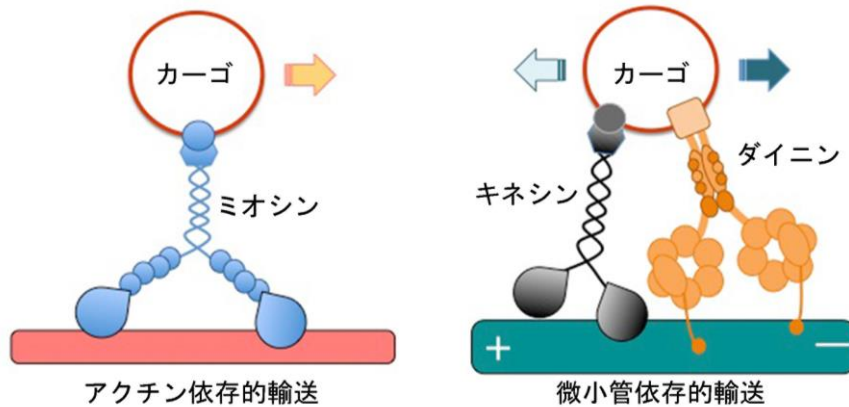


図 1. 細胞骨格とモーター分子による細胞内輸送のモデル

一般的に、植物では原形質流動が細胞内の長距離輸送を行う主要な駆動力だと考えられてきた (Shimmen & Yokota, 2004)。植物細胞の原形質流動はアクチンとミオシンによって推進され、小胞体やミトコンドリアといったカージョに結合したミオシンがアクチン上で滑り運動することで駆動力が生じる。陸上植物のミオシンは class VIII と class XI の二種に大別される。主に原形質流動を駆動するのは class XI ミオシンであり (Lee & Liu, 2004; Reddy & Day, 2001a)、モデル植物であるシロイヌナズナには 13 種の class XI ミオシン遺伝子が存在する (Ryan & Nebenfuhr, 2018)。しかし、活発な原形質流動が観察されないヒメツリガネゴケに存在する 3 種の class XI ミオシン遺伝子は、原形質流動ではなく細胞の先端成長に寄与する (Vidali & Bezanilla, 2012; Vidali *et al.*, 2010)。

アクチンとミオシンによる細胞内輸送に比べると、微小管依存的な細胞内輸送に関する知見は乏しい。その理由として、原形質流動という速く強力な輸送システムによって、微小管の寄与が表面化されない可能性が指摘されている (Shimmen & Yokota, 2004)。しかし、シロイヌナズナには 61 種、ヒメツリガネゴケには 78 種のキネシン遺伝子が存在していることから、動物細胞内と同様の微小管依存的輸送機構が植物細胞内でも機能している可能性は十分考えられる (Lee & Liu, 2004; Reddy & Day, 2001b; Shen *et al.*, 2012)。そして、微小管依存的な輸送の存在を示唆する結果もいくつか報告されている。例えば、タバコ花粉管の抽出液を使った実験では、抽出液中の細胞小器官が微小管依存的に移動する様子が観察された (Romagnoli *et al.*, 2003)。また、ヒメツリガネゴケの葉緑体運動に関する実験から、光照射によって誘導される葉緑体運動が微小管依存的であることが示された (Sato *et al.*, 2001)。他にも、細胞壁構成成分を含む小胞の移動や、核、微小管断片の移動といった微小管依存的な動きが観察され、キネシンを含む微小管付随モーター分子の関与が示唆された (Cai & Cresti, 2012; Doonan *et al.*, 1986; Kong *et al.*, 2015; Miki *et al.*, 2015; Nakaoka *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015)。しかしながら、どのキネシンモータータンパク質が何を輸送するかなど、その詳細な分子機構についてはよく分かっていない。

陸上植物の微小管依存的な輸送機構について考える上で、興味深い点として細胞質ダイニン遺伝子の消失が挙げられる。細胞質ダイニンは、動物や菌類における主要なマイナス端方向性モーターであり、DHC (Dynein heavy chain) と多数の相互作用因子によって構成

されるモーター分子である (Cianfrocco *et al.*, 2015; Hancock, 2014; Kardon & Vale, 2009)。動物では唯一のマイナス端方向性長距離輸送モーターとして、核やミトコンドリア、脂質小胞、エンドソーム、ペルオキシソーム、オートファゴソーム、mRNA 等、様々なカーゴを輸送する (Allan, 2011; Holt & Bullock, 2009)。また、モーター活性を利用したスピンドル配置制御や (Aniento *et al.*, 1993; Grill & Hyman, 2005; Kariki & Holzbaaur, 1999; Kiyomitsu, 2015; McNally, 2013)、微小管同士の架橋 (Ferenz *et al.*, 2009; Tanenbaum *et al.*, 2013) 等も行う多機能タンパク質であるため、細胞質ダイニンは多くの生物種で必須遺伝子として機能している (Cianfrocco *et al.*, 2015)。ところが、ゲノム解析によって陸上植物では細胞質ダイニンをコードする遺伝子群のほとんどが失われていることが明らかになった (Lawrence *et al.*, 2001; Vale, 2003; Wickstead & Gull, 2007)。このことは、陸上植物の細胞内ではキネシンと細胞質ダイニンによる両方向性輸送が成立していないことを意味するが、植物がどのようにして細胞質ダイニンの消失を補償したのかは分かっていなかった。

3. ヒメツリガネゴケの核配置

近年、ヒメツリガネゴケにおけるキネシンの機能解析から、細胞内輸送に関与する 3 種のキネシンが同定された (図 2; Miki *et al.*, 2015; Yamada & Goshima, 2018; Yamada *et al.*, 2017)。ヒメツリガネゴケの原糸体先端細胞は、一様な微小管配向を有しており、表現型からプラス端とマイナス端のどちらの輸送が異常なのかを推測できるため、細胞内輸送のモデルとして有用である (Hiwatashi *et al.*, 2014)。

細胞内の核配置は細胞の分化段階や細胞周期ごとに厳密に制御されており、均等な娘細胞を生じるためには正確な制御が必須である (Gundersen & Worman, 2013)。例えば、出芽酵母や分裂酵母で観察される細胞分裂直前の核の移動は、核と繋がった微小管のダイナミクスが生じる力によって駆動される (Adames & Cooper, 2000; Tran *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2012)。また、シロイヌナズナのみオシン XI-i は SUN/WIP/WIT 複合体を介して核膜に結合し、根の細胞でアクチン依存的に核を運搬する (Tamura *et al.*, 2013)。このように、核の動きは細胞骨格を介した仕組みで制御されているが、一概に仕組みを規定することはできず、細胞種や発生段階によって多様である。

ヒメツリガネゴケの原糸体細胞は、微小管依存的な仕組みで核配置を制御している (Doonan *et al.*, 1986)。核の配置は細胞周期に応じて変化し、間期の先端細胞では核は相対的な細胞の中心位置を維持しながら細胞の成長速度に合わせて先端側へと移動する (図 2)。染色体分配後に娘核は先端細胞の中心に向かって急速に移動した後、新生された細胞壁方向に少し移動する。その後、染色体分配直後と比べるとゆっくりとした速度で再び細胞の中心へと移動する (Miki *et al.*, 2015)。

植物特異的なプラス端方向性キネシンである Armadillo repeat-containing kinesin (ARK) を RNAi でノックダウンすると細胞分裂後に娘核は分裂面から一旦離れるものの、中心に移動することなく新生された細胞壁近傍まで戻ってくる (Miki *et al.*, 2015)。細胞壁近傍はマイナス端が集積する場所であり、ARK の欠損によりプラス端方向性の輸送が欠損したため、核がマイナス端側に移動したことを示唆する。また、ARK の表現型とは対照的に、キネシン 14 サブファミリーに属する *Kinesin with calponin homology domain (KCH)* の遺伝子破壊株で

は、細胞分裂後に細胞の中心まで輸送された核がその場に止まることなく細胞先端まで移動する (Yamada & Goshima, 2018)。キネシン 14 は他のプラス端方向性キネシンとは異なり、マイナス端方向性のモーター活性を示すことで特徴づけられる (Jonsson *et al.*, 2015)。KCH が ARK とは逆方向性のモーターであることと、両変異体の表現型が対照的であることから、ARK と KCH が拮抗して機能することで、間期の核配置を維持しているというモデルが考えられる (Wu *et al.*, 2018)。このことは同時に、細胞質ダイニンの代わりにキネシン 14 がマイナス端方向性の輸送を代替することで両方向性輸送が行われていることを示しており、植物がユニークな輸送機構を獲得したことを示唆している。

間期にはプラス端とマイナス端方向性キネシンによる両方向性の核配置制御が行われる一方で、分裂期には異なる制御機構が存在する。分裂期には紡錘体形成のために微小管が再構築され、細胞内の微小管極性が変化する (図 2)。微小管のプラス端が細胞分裂面に向けて配向し、細胞の中心に向かってマイナス端が配向する (図 2)。分裂期後期には姉妹染色分体/核は微小管のマイナス端が集積する細胞中心へと移動する。植物特異的なマイナス端方向性キネシン 14 である *Kinesin like calmodulin binding protein (KCBP)* の遺伝子破壊株では、染色体分離後の姉妹染色分体/核の移動が大幅に遅延する (Yamada *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2019)。染色体分離

後に KCBP が姉妹染色分体/核に強く局在すること、姉妹染色分体/核の輸送がマイナス端方向であることを考え合わせると、KCBP が染色体分離後に姉妹染色分体/核を輸送するモーターであることが示唆される。また、詳細な KCBP の局在解析から、

SUN1 (核膜と細胞骨格を架橋する LINC 複合体の構成因子) や CROWNa (植物の核ラミナ) に先んじて KCBP が局在することが示された (Chang *et al.*, 2015; Pradillo *et al.*, 2019; Yoshida *et al.*, 2019)。この結果は、KCBP が核膜再形成前の姉妹染色分体に結合し、輸送を行っていることを示唆しており、一般的に知られている LINC 複合体とは異なる結合様式で KCBP が輸送を担う可能性が高い。

4. ヒメツリガネゴケの葉緑体輸送

葉緑体は光合成に必須な細胞小器官である。光合成効率を最適化するために葉緑体の配置も細胞内で制御されており、光の強弱によって葉緑体運動が誘導される。ヒメツリガネゴケの原糸体細胞では、アクチンと微小管の両細胞骨格が葉緑体運動に関与するが (Sato *et al.*, 2001), 微小管を介した分子機構についてはあまり分かっていなかった。興味深いことに、

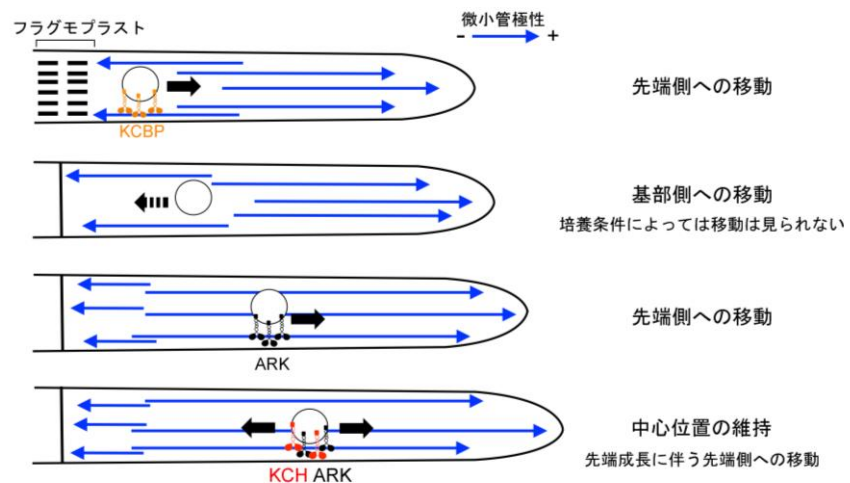


図 2. 細胞周期に伴う微小管極性の変化と核配置

KCBP 遺伝子破壊株では先端細胞の細胞先端で葉緑体の蓄積が認められる (Yamada *et al.*, 2017)。細胞先端では微小管のプラス端が集積することと、*KCBP* がマイナス端方向性のモーターであることから、*KCBP* が葉緑体をマイナス端方向へ輸送するモーターであることが分かる。そして、*KCBP* 遺伝子破壊株で、微小管のプラス端が集積する細胞先端で葉緑体の蓄積が観察されたことから、*KCBP* に拮抗して葉緑体を輸送するプラス端方向性モーターの存在が想定されるが、今のところ間期に葉緑体を輸送するプラス端方向性キネシンの報告はなされていない。

5. おわりに

逆遺伝学と細胞生物学を取り入れた近年の研究によって、アクチンとミオシンによる原形質流動が細胞内輸送の主要な駆動力だと考えられてきた植物においても、微小管依存的な細胞内輸送の存在が解明され始めた。表現型解析から輸送を司るモーター分子や輸送されるカーゴについての理解は深まりつつあるものの、輸送のルールとなる微小管の極性制御機構や、輸送モーターの活性制御、モーター分子とカーゴ間における相互作用の分子機構など、まだまだ未解明な部分も多い。今後、微小管依存的な輸送さらなる解析により、植物細胞内での輸送機構の全容解明が期待される。

6. 引用文献

- Adames, N.R., & Cooper, J.A. 2000. Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 149:863-874.
- Allan, V.J. 2011. Cytoplasmic dynein. *Biochemical Society transactions.* 39:1169-1178.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., & Gruenberg, J. 1993. Cytoplasmic Dynein-dependent Vesicular Transport from Early to Late Endosomes. *J Cell Biol.*
- Cai, G., & Cresti, M. 2012. Are kinesins required for organelle trafficking in plant cells? *Front Plant Sci.* 3:170.
- Chang, W., Worman, H.J., & Gundersen, G.G. 2015. Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J Cell Biol.* 208:11-22.
- Cianfrocco, M.A., DeSantis, M.E., Leschziner, A.E., & Reck-Peterson, S.L. 2015. Mechanism and regulation of cytoplasmic dynein. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 31:83-108.
- Doonan, J.H., Jenkins, G.I., Cove, D.J., & Lloyd, C.W. 1986. Microtubules connect the migrating nucleus to the prospective division site during side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Eur J Cell Biol.* 41:157-164.
- Ferenz, N.P., Paul, R., Fagerstrom, C., Mogilner, A., & Wadsworth, P. 2009. Dynein antagonizes eg5 by crosslinking and sliding antiparallel microtubules. *Curr Biol.* 19:1833-1838.
- Grill, S.W., & Hyman, A.A. 2005. Spindle positioning by cortical pulling forces. *Dev Cell.* 8:461-465.
- Gundersen, G.G., & Worman, H.J. 2013. Nuclear positioning. *Cell.* 152:1376-1389.
- Hall, D.H., & Hedgecock, E.M., 1991. Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell.* 65:837-847.

- Hancock, W.O. 2014. Bidirectional cargo transport: moving beyond tug of war. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:615-628.
- 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.
- Holt, C.E., & Bullock, S.L. 2009. Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science.* 326:1212-1216.
- 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.
- Kardon, J.R., & Vale, R.D. 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:854-865.
- Kariki, S., & Holzbaur, E.L. 1999. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol.*
- Kiyomitsu, T. 2015. Mechanisms of daughter cell-size control during cell division. *Trends Cell Biol.* 25:286-295.
- Kong, Z., Ioki, M., Braybrook, S., Li, S., Ye, Z.H., Julie Lee, Y.R., Hotta, T., Chang, A., Tian, J., Wang, G., & Liu, B. 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.
- Lawrence, C.J., Morris, N.R., Meagher, R.B., & Dawe, R.K. 2001. Dyneins have run their course in plant lineage. *Traffic.* 2:362-363.
- Lee, Y.R., & Liu, B. 2004. Cytoskeletal motors in Arabidopsis. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiol.* 136:3877-3883.
- McNally, F.J. 2013. Mechanisms of spindle positioning. *J Cell Biol.* 200:131-140.
- 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.
- Nakaoka, Y., Kimura, A., Tani, T., & Goshima, G. 2015. Cytoplasmic nucleation and atypical branching nucleation generate endoplasmic microtubules in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell.* 27:228-242.
- Pradillo, M., Evans, D., & Graumann, K. 2019. The nuclear envelope in higher plant mitosis and meiosis. *Nucleus.* 10:55-66.
- Reck-Peterson, S.L., Provance, D.W., Jr., Mooseker, M.S., & Mercer, J.A. 2000. Class V myosins. *Biochim Biophys Acta.* 1496:36-51.
- Reddy, A.S., & Day, I.S. 2001a. Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biol.* 2:Research0024.
- Reddy, A.S., & Day, I.S. 2001b. Kinesins in the Arabidopsis genome: a comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics.* 2:2.
- Romagnoli, S., Cai, G., & Cresti, M. 2003. In vitro assays demonstrate that pollen tube organelles use kinesin-related motor proteins to move along microtubules. *Plant Cell.* 15:251-269.

- Ryan, J.M., & Nebenführ, A. 2018. Update on Myosin Motors: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Plant Physiol.* 176:119-127.
- Sato, Y., Wada, M., & Kadota, A. 2001. Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor. *J Cell Sci.* 114:269-279.
- Shen, Z., Collatos, A.R., Bibeau, J.P., Furt, F., & Vidali, L. 2012. Phylogenetic analysis of the Kinesin superfamily from *Physcomitrella*. *Front Plant Sci.* 3:230.
- Shimmen, T., & Yokota, E. 2004. Cytoplasmic streaming in plants. *Curr Opin Cell Biol.* 16:68-72.
- Tamura, K., Iwabuchi, K., Fukao, Y., Kondo, M., Okamoto, K., Ueda, H., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. 2013. Myosin XI-i links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 23:1776-1781.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., & Hirokawa, N. 1998. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell.* 93:1147-1158.
- Tanenbaum, M.E., Vale, R.D., & McKenney, R.J. 2013. Cytoplasmic dynein crosslinks and slides anti-parallel microtubules using its two motor domains. *Elife.* 2:e00943.
- Tran, P.T., Marsh, L., Doye, V., Inoué, S., & Chang, F. 2001. A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol.* 153:397-411.
- Vale, R.D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell.* 112:467-480.
- Vidali, L., & Bezanilla, M. 2012. *Physcomitrella patens*: a model for tip cell growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology.* 15:625-631.
- Vidali, L., Burkart, G.M., Augustine, R.C., Kerdavid, E., Tüzel, E., & Bezanilla, M. 2010. Myosin XI is essential for tip growth in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell.* 22:1868-1882.
- Wickstead, B., & Gull, K. 2007. Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. *Traffic.* 8:1708-1721.
- Wu, S.Z., Yamada, M., Mallett, D.R., & Bezanilla, M. 2018. Cytoskeletal discoveries in the plant lineage using the moss *Physcomitrella patens*. *Biophys Rev.*
- 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.
- 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. *The Journal of Cell Biology.* 216:1705-1714.
- Yoshida, M.W., Yamada, M., & Goshima, G. 2019. Moss Kinesin-14 KCBP Accelerates Chromatid Motility in Anaphase. *Cell Struct Funct.* 44:95-104.
- Zhao, T., Graham, O.S., Raposo, A., & St Johnston, D. 2012. Growing microtubules push the oocyte nucleus to polarize the *Drosophila* dorsal-ventral axis. *Science.* 336:999-1003.
- 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.

ヒメツリガネゴケ微小管関連因子から探る植物細胞の分裂と伸長の制御

日渡 祐二

宮城大学・食産業学群

〒982-0215 仙台市太白区旗立 2-2-1

Regulation of cell division and expansion mediated by microtubule associated proteins in the moss *Physcomitrella patens*

Yuji Hiwatashi

School of Food Industrial Sciences, Miyagi University, 2-2-1 Hatatate,
Taihaku-ku, Sendai 982-0215, JapanKey words: moss, *Physcomitrella patens*, cell division, cell expansion,
microtubule-associated protein

DOI: 10.24480/bsj-review.11b5.00187

1. はじめに

植物の細胞は動物細胞とは異なり、硬い細胞壁を持っているため、動物細胞のように移動する能力がない。そのため、細胞分裂によって生じた娘細胞は、分裂が生じた位置に存在し続ける。細胞が分裂した後、細胞の体積は伸長を介して大きくなるので、細胞がどのように分裂し、どのように体積が拡大するかに依存して、植物個体の形は決まってくる。従って、植物の形づくりの理解には、細胞の分裂と伸長のしくみを解明することが不可欠である。さらに、道端に自生している植物をざっと眺めてみると、さまざまな形をもつ植物が存在していることがわかるはずである。このような植物の複雑な形は、それぞれの植物の形づくりの過程で細胞の分裂や伸長が時空間的に組み合わさることにより、出来上がる。陸上植物の形の多様化を考える際にも、植物種ごとに細胞の分裂や伸長の仕方を見出していくことが重要である。

微小管は細胞の分裂や伸長の進行に不可欠で、これらの過程で特徴的な微小管構造体を形成する。例えば、被子植物の体細胞では、細胞周期の各過程で、表層微小管、分裂準備帯 (Preprophase band: PPB)、スピンドル (紡錘体)、フラグモプラスト (隔膜形成体) といった、異なった微小管構造体を形成する (図1)。

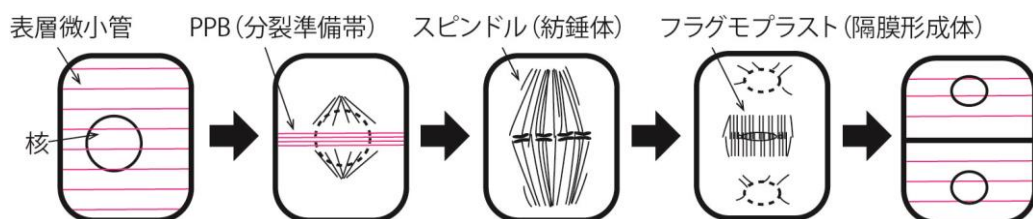


図1. 植物細胞の分裂過程の微小管構造体の模式図

表層微小管は、細胞表層付近の細胞質に張り巡らされた微小管である。この微小管はある方向性を持って配向することで細胞の伸長方向を規定する役割を持つ (Fishel and Dixit, 2013)。例えば、素早く伸長する細胞では、伸長軸に対して垂直方向へ平行に配向した表層微小管が重要であることがわかっている。PPB は、将来の細胞質分裂面に局在し、分裂面を規定する微小管である。PPB は、G₂ 期に核を囲むように環状に形成される表層微小管の束であり、前中期には核膜崩壊と同時に消失する。また、PPB はスピンドルの空間的位置や、フラグモプラストによる細胞分裂面の形成位置に関与することが知られている。従って、植物細胞の表層微小管の配向制御機構は、細胞の伸長と形態形成の制御系として、また PPB は、分裂面制御系として重要である。スピンドルとフラグモプラストは、M 期で構築される微小管構造体で、スピンドルは染色体を娘細胞に分配する役割を持ち、フラグモプラストは細胞質を二分する細胞板形成の足場として機能する (de Keijzer *et al.* 2014)。スピンドルが「核分裂装置」とすれば、フラグモプラストは「細胞質分裂装置」である。陸上植物の細胞質分裂は、後生動物の細胞質分裂とは細胞の仕切れ方が異なっている。後生動物では、細胞分裂面に収縮環とよばれる構造体が形成され、細胞の外側から内側に向かって「求心的」に細胞質が括れ切られる。一方、陸上植物では、細胞内部にてスピンドルがあった位置にフラグモプラストが形成され、この構造体が細胞の内側から外側へ拡大することで、細胞板が「遠心的」に拡大し細胞質が仕切られる。

これらの微小管構造体の形成や維持には、どのような制御機構がはたらくのだろうか？制御機構解明のアプローチとして、微小管関連因子に着目した解析が考えられる。微小管関連因子は微小管に共局在する因子で、微小管に直接的あるいは間接的に作用することによって、微小管構造体の形成や維持に機能する (Hamada 2014)。モデル被子植物であるシロイヌナズナを材料とした研究から、様々な微小管関連因子が見出されており、これらの因子は真核生物に共通にみられるものから、被子植物といった分類群にだけ存在するものまで、様々な種類の因子が同定されている。筆者らのグループは、陸上植物における細胞の分裂と伸長制御の共通基盤を明らかにするために、基部陸上植物ヒメツリガネゴケの細胞分裂や細胞伸長に対する微小管関連因子群の機能解析を行っている。本稿では、ヒメツリガネゴケの配偶体の分裂と伸長の実験系を紹介するとともに、微小管関連因子の機能解析の結果に基づいて、陸上植物の細胞分裂や細胞伸長に対する微小管制御の共通性と多様化について論じる。

2. ヒメツリガネゴケの細胞分裂と細胞伸長の解析系：原糸体と茎葉体

ヒメツリガネゴケでは、胞子が発芽すると原糸体と呼ばれる糸状構造の組織が形成される (図 2)。原糸体はクロロネマ細胞 (図 2b) とカウロネマ細胞 (図 2c) と呼ばれる 2 種類の細胞からなる。クロロネマ細胞は、胞子発芽後の原糸体細胞で、糸状組織の頂端に位置するクロロネマ頂端幹細胞が先端成長と細胞分裂することにより、クロロネマ組織を生み出す (Kofuji & Hasebe 2014)。その後、クロロネマ頂端幹細胞は、カウロネマ頂端幹細胞へと分化する。カウロネマ頂端幹細胞は、クロロネマ頂端幹細胞と同様に、先端成長と細胞分裂を行うことにより、カウロネマ組織からなる原糸体が形成される。これらの頂端幹細胞の細

胞分裂は細胞内のほぼ一定の位置で起こり、分裂面は細胞短軸方向に生じる。特に、カウロネマ頂端幹細胞は、クロロネマ頂端幹細胞に比べて、細胞周期が短く伸長速度が速いため、細胞の分裂や伸長を解析する対象として適している。クロロネマ細胞、カウロネマ細胞ともに基部側の細胞において頂端側の隔壁近傍で分裂が起こり、側枝始原細胞 (図 2d) が形成される。カウロネマ細胞の側枝始原細胞は主にクロロネマ頂端幹細胞 (図 2e) か、または茎葉体頂端幹細胞 (図 2g) となる。クロロネマ頂端幹細胞の場合は、先端成長と細胞分裂を繰り返し、2 次元的な原糸体組織 (図 2f) が形成される。一方、茎葉体頂端幹細胞は拡散成長しながら、3 面の分裂面となるような細胞分裂を行い、3 次元的な茎葉構造 (図 2h) を生み出す。また、茎葉体頂端幹細胞の分裂により生じた細胞の一部から葉頂端幹細胞が形成され、2 面の分裂面となる細胞分裂を行って、葉が形成される (Kofuji & Hasebe 2014)。

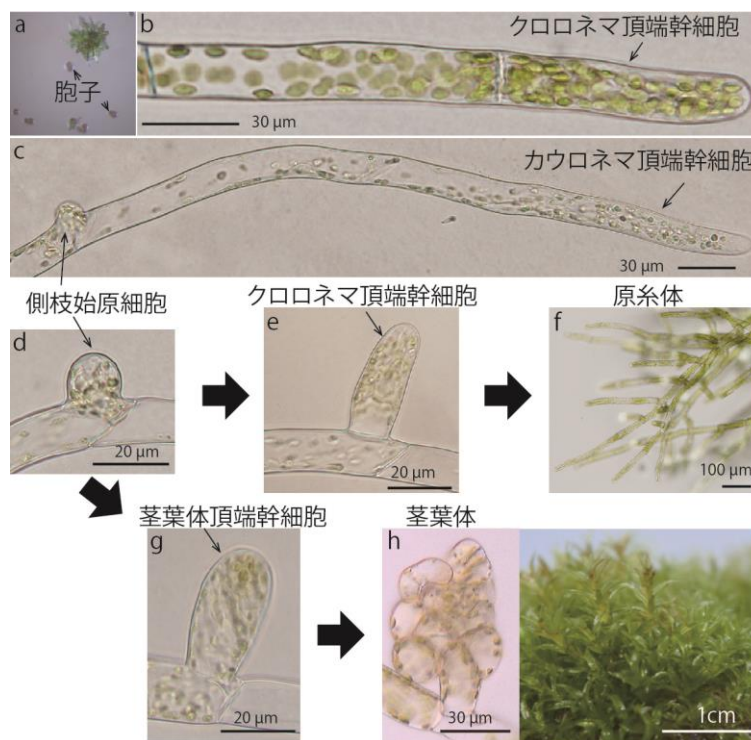


図 2. ヒメツリガネゴケの孢子発芽からの原糸体と茎葉体

ヒメツリガネゴケの原糸体や茎葉体の細胞分裂や細胞伸長において、微小管はどのように組織化されているだろうか？原糸体頂端幹細胞では細胞長軸に沿って微小管が配向している。この微小管は被子植物でみられる表層微小管とは異なり、細胞内部に存在する細胞質微小管 (endoplasmic microtubules) である (Nakaoka *et al.* 2015)。原糸体頂端幹細胞の伸長領域中央部には、微小管の重合端 (プラス端) が集合した微小管束 (MT foci) が形成される。この構造体は伸長速度が速いカウロネマ頂端幹細胞 (図 2c) で顕著にみられ、先端成長の方向性の制御に関与する (Hiwatashi *et al.* 2014)。また原糸体頂端幹細胞の分裂では、被子植物の体細胞でみられる PPB が形成されない (Doonan *et al.* 1987)。一方、茎葉体の微小管の組織化は原糸体とは大きく異なっている。側枝始原細胞から形成される初期の茎葉体 (図 2g) には表層微小管はない。また、分裂期の細胞には PPB は形成されず、分裂前期に

頂端側にガメトソーム (gametosome) と呼ばれる雲状の微小管構造体が形成される。このガメトソームが微小管形成中心となり、細胞分裂面の決定に関与する。茎葉体の発生が進み、茎が作られる茎葉体 (図 2h) になると、間期の細胞には表層微小管が観察されるとともに、分裂期の細胞ではガメトソームおよび PPB が形成される (Doonan *et al.* 1987, Spinner *et al.* 2010, Kosetsu *et al.*, 2017)。なお、ガメトソームが形成される一方、PPB が形成されない細胞もあり、ガメトソームと PPB は独立に機能しているようである (Kosetsu *et al.*, 2017)。以上のように、原系体と茎葉体では細胞分裂や細胞伸長の様式が異なり、またそれぞれの細胞において微小管の組織化の様相も違っている。

3. 細胞分裂面決定に関与する PP2A 制御因子 FASS によるヒメツリガネゴケ茎葉体細胞の分裂と伸長の制御

FASS は Protein phosphatase 2A (PP2A) 調節サブユニットで、シロイヌナズナの *fass* 変異体から同定された。この *fass* 変異体では植物体がきわめて矮性になり、PPB が形成されず細胞分裂面のランダム化が生じる (Torres-Ruiz & Jurgens 1994, Camilleri *et al.* 2002)。また、FASS をコードする遺伝子は、シロイヌナズナ、イネ、イヌカタヒバ、ヒメツリガネゴケに 1 つずつオーソログが存在する (Banks *et al.* 2011)。シロイヌナズナ FASS は、他の PP2A サブユニットに加えて TON1 や TRM (TON1-recruiting motif protein) とともにタンパク質複合体 TTP (TON1/TRM/PP2A) を形成し、細胞分裂の分裂面制御に機能している

(Spinner *et al.* 2013)。ヒメツリガネゴケでは、TON1 のオーソログ PpTON1 を遺伝子破壊すると茎葉体が矮化し、茎葉体の細胞分裂において PPB が形成されなくなり、またシロイヌナズナ *TON1* 遺伝子をヒメツリガネゴケの *ppton1* 遺伝子破壊系統に発現させると、これらの表現型が相補される (Spinner *et al.* 2010, Kosetsu *et al.* 2017)。我々もヒメツリガネゴケにおいて FASS の機能を欠失させたところ、PpTON1 の遺伝子破壊体と同様に、茎葉体が矮化し、細胞分裂で PPB が形成されないことがわかった。これらの結果は、TTP を構成するサブユニットの機能が、シロイヌナズナとヒメツリガネゴケにおいて保存されていることを示している。さらに、ヒメツリガネゴケの茎葉体において TTP 複合体が形成され、細胞分裂面を制御する可能性も考えられる。

ヒメツリガネゴケ FASS の遺伝子欠失体では、茎葉体細胞の表層微小管が異常になり、短い微小管がランダムに存在する (図 3)。従って、分裂期のみならず間期の微小管制御にも関与している。シロイヌナズナ *fass* 変異体では間期の表層微小管の分枝が乱れ、細胞形態が異常となることから (Kirik *et al.* 2012)、ヒメツリガネゴケとシロイヌナズナで FASS は表層微小管にも作用し、細胞伸長に関与するようである。

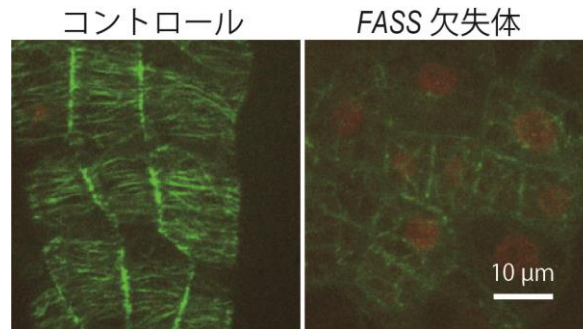


図3. ヒメツリガネゴケ FASS の機能欠失体の茎葉体細胞の間期微小管。微小管と DNA が緑色、赤色で示されている。コントロールでは表層微小管が見られるのに対して、欠失体は短い微小管が検出される。

4. 植物特異的キネシン KINID1a と KINID1b による原系体細胞の分裂と伸長の制御

植物特異的なキネシン KINID1a は原系体や茎葉体の分裂細胞で発現するタンパク質としてジーントラップ法で同定された分子モーターである (Hiwatashi *et al.* 2001, Hiwatashi *et al.* 2008)。キネシンは真核生物に分布する微小管依存的な分子モーターで、遺伝子の系統解析により、複数のサブファミリーに分類されている (Shen *et al.* 2012)。KINID1a と KINID1a 類似タンパク質 KINID1b (以下、KINID1a と KINID1b を合わせて KINID1a/1b とする) はどのサブファミリーにも属さず、植物特異的なグループ (以下、KINID1a/1b キネシングループとする) を形成する。原系体頂端幹細胞の分裂に対する KINID1a/1b の機能を調べたところ、KINID1a/1b はフラグモプラスト赤道面で微小管重合端を架橋することで、細胞質分裂の進行を制御することがわかった (Hiwatashi *et al.* 2008)。さらに、先端成長の伸長領域では、KINID1a/1b が微小管重合端を架橋することで微小管束を維持し、先端成長の方向性制御に関与することが明らかになった (Hiwatashi *et al.* 2014)。このことは、KINID1a/1b が細胞質分裂と先端成長を同時に調節する微小管制御因子であることを示している (図4)。

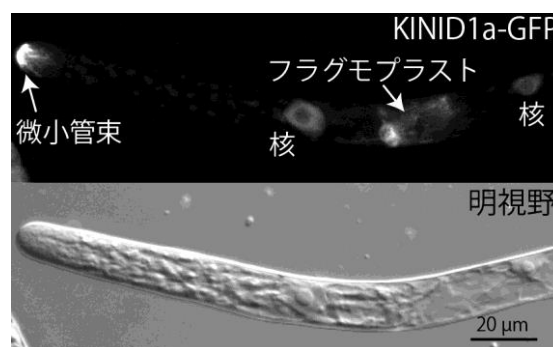


図4. カウロネマ頂端幹細胞における KINID1a-GFP の細胞内局在

細胞質分裂と先端成長は細胞の異なる場所に起こる現象であることから、KINID1a/1b は、それぞれフラグモプラストと微小管束にリクルートされて微小管重合端に作用しなければならない。KINID1a/1b は核局在シグナルを有し、核にも蓄積する (図4)。蛍光タンパク質 (FP) を用いたライブイメージング解析によって、KINID1a/1b が核膜崩壊後にスピンド

ル形成に伴ってスピンドル赤道面に局在後、フラグモプラスト赤道面に蓄積することが示された (Hiwatashi *et al.*, 2008)。そのため、フラグモプラストへのリクルートはタンパク質レベルでの移動である可能性が高い。一方、伸長領域の微小管束へのリクルートについては、FP でラベルした KINID1a の解析では細胞質から微小管束への移動が検出できないこと、FP を融合した KINID1a において 5'UTR を欠失した mRNA を発現させると FP 融合 KINID1a はフラグモプラストには蓄積するが、微小管束には蓄積しないことから、タンパク質の移動と異なるメカニズムによる可能性がある。神経細胞では mRNA の長距離移動と局所的翻訳によるタンパク質の局在化メカニズムが知られている (Bramham & Wells 2007)。

KINID1a/1b のリクルートは、伸長領域への mRNA の移動と局所的翻訳によるのかもしれない。Dendra2 のような光変換タンパク質によって KINID1a/1b の移動を詳細に解析すれば (Kitagawa & Fujita 2013)、局在化のメカニズムの一端を明らかにできると考えられる。

シロイヌナズナ PAKRP2 は KINID1a/1b キネシングループのオーソログで、ゲノムに 1 遺伝子のみ存在する (Lee *et al.* 2001)。PAKRP2 はフラグモプラストにドット状に蓄積することから、細胞板形成のための小胞を輸送する機能が提唱されている (Lee *et al.* 2001, Gicking *et al.* 2019)。また、ヒメツリガネゴケでは、PAKRP2 は KINID1a/1b の機能を代替できないことから (Hiwatashi *et al.* 2008)、KINID1a/1b キネシングループの機能はコケ植物と被子植物で異なっている可能性が高い。それでは、KINID1a/1b キネシングループの祖先的な機能は、微小管架橋あるいは小胞輸送のどちらであろうか? KINID1a/1b キネシングループの祖先的な機能は、陸上植物に近縁な緑藻を用いて解析すれば推定できるかもしれない。実際にシャジクモ (*Chara braunii*) のゲノム (Nishiyama *et al.* 2018) には、KINID1a/1b のオーソログが存在する。細胞分裂や細胞伸長に対するシャジクモオーソログの機能解析は、この植物特異的なキネシングループの祖先的機能を理解する上で興味深いと考えられる。

5. 微小管依存的微小管生成タンパク質複合体オーグミンによる細胞分裂制御

微小管は、微小管形成中心体 (microtubule-organizing center: MTOC) と呼ばれる構造から形成される。MTOC では、 γ -tubulin リング複合体 (γ -tubulin ring complex: γ TuRC) が微小管重合の核となり、 γ TuRC を起点として微小管が形成される。動物細胞では中心体が主要な MTOC として機能し、中心体に存在する γ TuRC から微小管が形成される。一方、陸上植物の体細胞では中心体が存在しないため、微小管形成を担う分子メカニズムは動物細胞に比べて不明な点が多い (Hashimoto 2013)。

近年、既存の微小管上から微小管が形成されることが報告され (Murata *et al.* 2005)、この微小管依存的微小管形成に動物および植物細胞に共通なタンパク質複合体オーグミンが機能することが明らかになった (Goshima *et al.* 2008, Petry *et al.* 2011, Nakaoka *et al.* 2012)。オーグミンは微小管に結合するタンパク質複合体で、微小管重合の核となる γ TuRC をリクルートして新規の微小管形成を促進する。オーグミン複合体は 8 種類のサブユニットで構成されており、それぞれのサブユニットの機能解析が進んでいる。ヒメツリガネゴケにおいても、オーグミンサブユニット AUG3 の機能解析が行われ、フラグモプラスト微小管生成にオーグミンが機能することがわかった (Nakaoka *et al.* 2012)。分裂後期の動物細胞でも、

細胞質分裂に生じる中央スピンドルの微小管生成にオーグミンが作用することから、細胞質分裂の微小管生成に対するオーグミンの機能は動植物で保存されていると言える。8種類のオーグミンサブユニットのうち、AUG1からAUG4、かつAUG7はヒメツリガネゴケゲノムに1種類、AUG5は3種類、AUG6は2種類の遺伝子が存在する。AUG8の遺伝子は4種類であり、サブユニットの中では最も遺伝子数が多い(図5)。AUG8をコードする遺伝子数の増加は被子植物で顕著であり、例えばシロイヌナズナにおいて、AUG1からAUG7まではゲノムに1遺伝子しか存在しないが、AUG8には10種類のパラログな遺伝子が認められる(図5)。また、AUG8のアミノ酸配列は動物のAUG8と類似性がみられず、植物特異的な配列である。

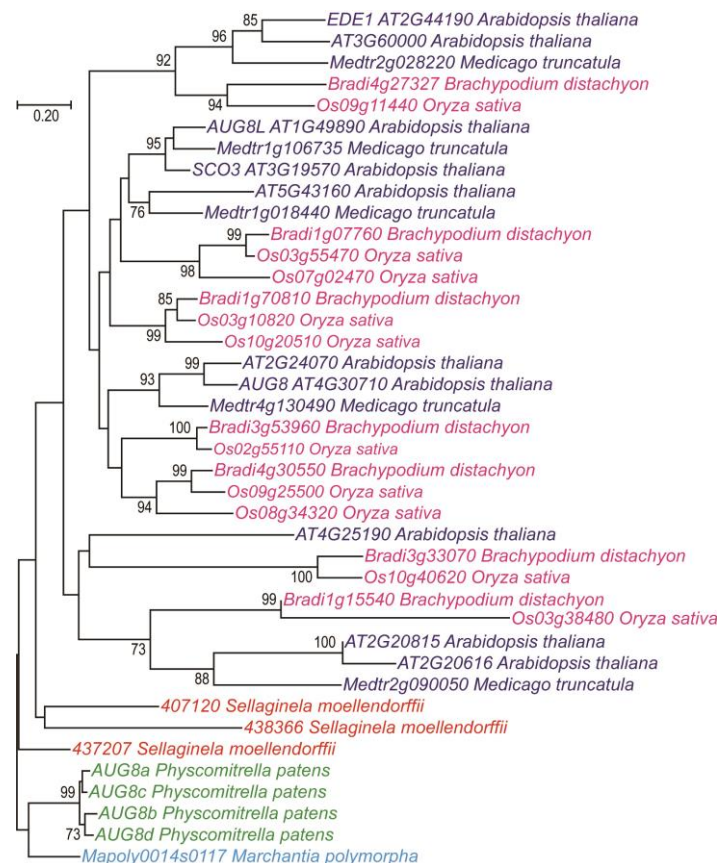


図5. 近隣結合法による陸上植物オーグミンサブユニットAUG8の遺伝子系統解析。ブートストラップ値が70%以上の場合のみ枝上に示してある。

シロイヌナズナ AUG8のうち、EDE1(AT2G44190)はスピンドルとフラグモプラストの微小管の組織化に関与する。このEDE1の機能は、パラログの1つであるAUG8(AT4G30710)では代替できないことから、分裂期のオーグミンの機能はEDE1に依存することが示唆される(Lee *et al.* 2017)。EDE1の機能を完全に欠失した変異体は分裂異常を示し致死になるが(Pignocchi *et al.* 2009)、AUG8の機能欠失変異体は分裂や成長に異常は見られない(Lee *et al.* 2017)。このことも分裂期特異的なEDE1の機能を支持している。また、別なパラログのSCO3は、間期の細胞で微小管とペルオキシソームにターゲットし葉緑体の発達に関与する(Albrecht *et al.* 2010)。これらの結果から、シロイヌナズナのAUG8

は遺伝子数の増加に伴って、分裂期や間期で特異的に作用するように、それぞれの AUG8 機能が多様化している可能性が考えられる。AUG8 には微小管結合ドメインを有するため、オーグミンは AUG8 を介して微小管に結合することが示唆されている (Nakaoka *et al.* 2012, Lee *et al.* 2017)。従って、細胞周期に応じてオーグミンを構成する AUG8 サブユニットが変わり、オーグミンの微小管結合性を時空間的に制御しているのかもしれない。

ヒメツリガネゴケの 4 種類の AUG8 (AUG8a, AUG8b, AUG8c, AUG8d) の機能が、シロイヌナズナ AUG8 のように多様化しているかを明らかにするために、それぞれの遺伝子欠失体を作成した。それぞれの遺伝子を欠失させた一重欠失体、遺伝子を組み合わせた二重欠失体は正常な原系体および茎葉体を形成し、野生型と同様な形態を示した (図 6)。さらに三重欠失体を作成すると、AUG8a, AUG8b, AUG8d の組合せ、また AUG8b, AUG8c, AUG8d の組合せでは欠失体が得られなかった。これらの遺伝子の組み合わせでは、原系体が致死になる可能性を示している。また、AUG8a, AUG8c, AUG8d の組合せでの欠失体では、微小管脱重合剤依存的に原系体先端成長の伸長速度が低下し、これらの AUG8 は先端成長の伸長に関与することがわかった。従って、ヒメツリガネゴケの AUG8 の機能は重複しているものの、4 種類の AUG8 の間で機能に対する寄与度が違っているようである。今後は AUG8 の条件的機能阻害実験から、分裂や伸長における微小管への作用を解析することが必要である。

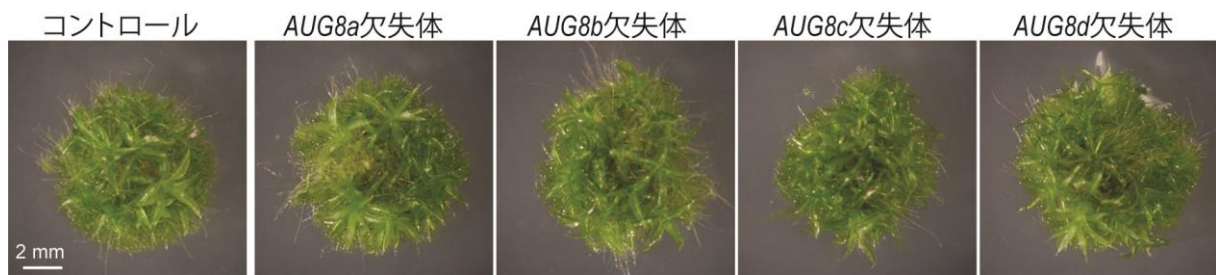


図 6. ヒメツリガネゴケ AUG8 の一重遺伝子欠失体の植物体

ヒメツリガネゴケ AUG8 でも示唆されたように、AUG8 は分裂で機能するが、どのパラログが分裂期の微小管に作用するのかは特定されていないことが多く、分裂期のパラログの特徴や普遍性はわかっていない。それぞれの植物種で AUG8 パラログの詳細な機能解析を行うことによって、分裂期の微小管に対してどのパラログが機能を持つかわかるはずである。また、間期での AUG8 の機能についても、AUG8 を介した細胞伸長の制御機構を解析することにより、どのパラログが間期の微小管に対してどのような機能を持つか、知見が得られだろう。コケ植物と被子植物の AUG8 パラログの機能解明は、微小管関連因子の遺伝子数増加と微小管制御の関連性を考える上で、モデル的な研究になると思われる。

6. おわりに

ヒメツリガネゴケの原系体や茎葉体は、細胞分裂や細胞伸長に対する微小管制御の解析が容易であるため、これらの微小管関連因子の共通性を探る上で優れている。実際にヒメツリ

ガネゴケで微小管関連因子の解析を行うと、FASSのようにヒメツリガネゴケとシロイヌナズナでゲノムの遺伝子数はほとんど変わらず機能も類似しているもの、KINID1a/1bのようにヒメツリガネゴケとシロイヌナズナでゲノムの遺伝子数はほとんど変わらないが、その機能に差異があるもの、またAUG8ではシロイヌナズナの遺伝子数が増加しており、そのうちヒメツリガネゴケとシロイヌナズナでパラログの機能が類似するものもあれば、シロイヌナズナで特異的な機能をもつもの、などいろいろなケースがある。このように微小管関連因子の種類により、細胞分裂や細胞伸長に対する機能は類似していたり、異なっていたりする。それぞれの植物群での機能解析が進めば、細胞の分裂や伸長における微小管制御の普遍的分子基盤が見えてくるのかもしれない。普遍的分子基盤が明らかになれば、植物種に特徴的な分裂様式や伸長様式に特異的に機能する因子群も見出されるはずで、これらの因子群のはたらかにより植物の多様な形態形成の理解が進むと期待される。この点を踏まえると、基部陸上植物ヒメツリガネゴケの微小管関連因子を介した細胞分裂と細胞伸長の解析は、重要な布石であると考えられる。

7. 謝辞

本稿で紹介した研究成果の一部は、European Commission FP-PEOPLE-2010-IIF (275257)、日本学術振興会・科学研究費(16K07406)、宮城大学指定研究費の支援を受けて実施したものである。また、顕微鏡観察は、先端バイオイメージングプラットフォーム(ABiS)の支援を受けている。また、Aberystwyth大学National Plant Phenomics Centreの皆様、宮城大学食産業学群植物分子遺伝育種学研究室の皆様、基礎生物学研究所生物進化研究部門の皆様には、研究の遂行にあたり多大な支援を受けた。心からの感謝の意を表したい。

8. 引用文献

- Albrecht, V., Simkova, K., Carrie, C., Delannoy, E., Giraud, E., Whelan, J., Small, I.D., Apel, K., Badger, M.R., & Pogson, B.J. 2010. The cytoskeleton and the peroxisomal-targeted snowy cotyledon3 protein are required for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 3423-3438.
- Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V.A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B.A., Ashton, N.W., Axtell, M.J., Barker, E., Barker, M.S., Bennetzen, J.L., Bonawitz, N.D., Chapple, C., Cheng, C., Correa, L.G., Dacre, M., DeBarry, J., Dreyer, I., Elias, M., Engstrom, E.M., Estelle, M., Feng, L., Finet, C., Floyd, S.K., Frommer, W.B., Fujita, T., Gramzow, L., Gutensohn, M., Harholt, J., Hattori, M., Heyl, A., Hirai, T., Hiwatashi, Y., Ishikawa, M., Iwata, M., Karol, K.G., Koehler, B., Kolukisaoglu, U., Kubo, M., Kurata, T., Lalonde, S., Li, K., Li, Y., Litt, A., Lyons, E., Manning, G., Maruyama, T., Michael, T.P., Mikami, K., Miyazaki, S., Morinaga, S., Murata, T., Mueller-Roeber, B., Nelson, D.R., Obara, M., Oguri, Y., Olmstead, R.G., Onodera, N., Petersen, B.L., Pils, B., Prigge, M., Rensing, S.A., Riano-Pachon, D.M., Roberts, A.W., Sato, Y., Scheller, H.V., Schulz, B., Schulz, C., Shakirov, E.V., Shibagaki, N., Shinohara, N., Shippen, D.E., Sorensen, I., Sotooka, R., Sugimoto,

- N., Sugita, M., Sumikawa, N., Tanurdzic, M., Theissen, G., Ulvskov, P., Wakazuki, S., Weng, J.K., Willats, W.W., Wipf, D., Wolf, P.G., Yang, L., Zimmer, A.D., Zhu, Q., Mitros, T., Hellsten, U., Loque, D., Otilar, R., Salamov, A., Schmutz, J., Shapiro, H., Lindquist, E., Lucas, S., Rokhsar, D., & Grigoriev, I.V. 2011. The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960-963.
- Bramham, C.R., & Wells, D.G. 2007. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 776-789.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., & Bouchez, D. 2002. The Arabidopsis *TONNEAU2* gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* 14: 833-845.
- de Keijzer, J., Mulder, B.M., & Janson, M.E. 2014. Microtubule networks for plant cell division. *Syst. Synth. Biol.* 8: 187-194.
- Doonan, J.H., Cove, D.J., Corke, F.M.K., & Lloyd, C.W. 1987. Pre-prophase band of microtubules, absent from tip-growing moss filaments, arises in leafy shoots during transition to intercalary growth. *Cell Motil. Cytoskeleton* 7: 138-153.
- Fishel, E.A., & Dixit, R. 2013. Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *Plant J.* 75: 270-277.
- Gicking, A.M., Wang, P., Liu, C., Mickolajczyk, K.J., Guo, L., Hancock, W.O., & Qiu, W. 2019. The Orphan kinesin PAKRP2 achieves processive motility via a noncanonical stepping mechanism. *Biophys. J.* 116: 1270-1281.
- Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N., & Vale, R.D. 2008. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J. Cell Biol.* 181: 421-429.
- Hamada, T. 2014. Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 312: 1-52.
- Hashimoto, T. 2013. A ring for all: gamma-tubulin-containing nucleation complexes in acentrosomal plant microtubule arrays. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 698-703.
- 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.
- Hiwatashi, Y., Nishiyama, T., Fujita, T., & Hasebe, M. 2001. Establishment of gene-trap and enhancer-trap systems in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 28: 105-116.
- Hiwatashi, Y., Obara, M., Sato, Y., Fujita, T., Murata, T., & Hasebe, M. 2008. Kinesins are indispensable for interdigitation of phragmoplast microtubules in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 20: 3094-3106.
- 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.
- Kitagawa, M., & Fujita, T. 2013. Quantitative imaging of directional transport through plasmodesmata

- in moss protonemata via single-cell photoconversion of Dendra2. *J. Plant Res.* 126: 577-585.
- Kofuji, R., & Hasebe, M. 2014. Eight types of stem cells in the life cycle of the moss *Physcomitrella patens*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 13-21.
- Kosetsu, K., Murata, T., Yamada, M., Nishina, M., Boruc, J., Hasebe, M., Van Damme, D., & Goshima, G. 2017. Cytoplasmic MTOCs control spindle orientation for asymmetric cell division in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114: E8847-E8854.
- Lee, Y.J., Hiwatashi, Y., Hotta, T., Xie, T., Doonan, J.H., & Liu, B. 2017. The mitotic function of augmin is dependent on its microtubule-associated protein subunit EDE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 27: 3891-3897.
- Lee, Y.R., Giang, H.M., & Liu, B. 2001. A novel plant kinesin-related protein specifically associates with the phragmoplast organelles. *Plant Cell* 13: 2427-2439.
- 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.
- Nakaoka, Y., Kimura, A., Tani, T., & Goshima, G. 2015. Cytoplasmic nucleation and atypical branching nucleation generate endoplasmic microtubules in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 27: 228-242.
- Nakaoka, Y., Miki, T., Fujioka, R., Uehara, R., Tomioka, A., Obuse, C., Kubo, M., Hiwatashi, Y., & Goshima, G. 2012. An inducible RNA interference system in *Physcomitrella patens* reveals a dominant role of augmin in phragmoplast microtubule generation. *Plant Cell* 24: 1478-1498.
- Nishiyama, T., Sakayama, H., de Vries, J., Buschmann, H., Saint-Marcoux, D., Ullrich, K.K., Haas, F.B., Vanderstraeten, L., Becker, D., Lang, D., Vosolsobe, S., Rombauts, S., Wilhelmsson, P.K.I., Janitza, P., Kern, R., Heyl, A., Rumpler, F., Villalobos, L., Clay, J.M., Skokan, R., Toyoda, A., Suzuki, Y., Kagoshima, H., Schijlen, E., Tajeshwar, N., Catarino, B., Hetherington, A.J., Saltykova, A., Bonnot, C., Breuninger, H., Symeonidi, A., Radhakrishnan, G.V., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Chang, C., Karol, K.G., Hedrich, R., Ulvskov, P., Glockner, G., Delwiche, C.F., Petrasek, J., Van de Peer, Y., Friml, J., Beilby, M., Dolan, L., Kohara, Y., Sugano, S., Fujiyama, A., Delaux, P.M., Quint, M., Theissen, G., Hagemann, M., Harholt, J., Dunand, C., Zachgo, S., Langdale, J., Maumus, F., Van Der Straeten, D., Gould, S.B., & Rensing, S.A. 2018. The *Chara* genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization. *Cell* 174: 448-464.
- Petry, S., Pugieux, C., Nedelec, F.J., & Vale, R.D. 2011. Augmin promotes meiotic spindle formation and bipolarity in *Xenopus* egg extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 14473-14478.
- Pignocchi, C., Minns, G.E., Nesi, N., Koumproglou, R., Kitsios, G., Benning, C., Lloyd, C.W., Doonan, J.H., & Hills, M.J. 2009. ENDOSPERM DEFECTIVE1 is a novel microtubule-associated protein essential for seed development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 90-105.
- Shen, Z., Collatos, A.R., Bibeau, J.P., Furt, F., & Vidali, L. 2012. Phylogenetic analysis of the kinesin superfamily from *Physcomitrella*. *Front. Plant Sci.* 3, 230.

- Spinner, L., Pastuglia, M., Belcram, K., Pegoraro, M., Goussot, M., Bouchez, D., & Schaefer, D.G. 2010. The function of TONNEAU1 in moss reveals ancient mechanisms of division plane specification and cell elongation in land plants. *Development* 137: 2733-2742.
- Spinner, L., Gadeyne, A., Belcram, K., Goussot, M., Moison, M., Duroc, Y., Eeckhout, D., De Winne, N., Schaefer, E., Van De Slijke, E., Persiau, G., Witters, E., Gevaert, K., De Jaeger, G., Bouchez, D., Van Damme, D., & Pastuglia, M. 2013. A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nat Commun.* 4: 1863.
- Torres-Ruiz, R.A., & Jurgens, G. 1994. Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in Arabidopsis development. *Development* 120: 2967-2978.

受精卵の極性化動態とその制御機構

木全 祐資

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

The dynamics and molecular pathway regulating the zygote polarization

Yusuke Kimata

Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

Keywords: axis formation, cytoskeleton, live imaging, vacuole, zygote polarization

DOI: 10.24480/bsj-review.11b6.00188

1. はじめに

初期胚発生は植物の形態形成の基盤となるプロセスである。植物は非常に複雑な形態をもつが、それらは全て一つの始原細胞である受精卵に由来する。受精卵から複数回の細胞分裂を経て胚が形成されていく過程で、将来の様々な器官の基礎となる構造のパターンが形作られる。この際に重要になるのが胚の内部での方向性、つまり体軸の確立である。受精卵が無秩序に分裂していくだけでは単なる細胞塊でしかなく、体軸に沿って胚の各細胞が秩序だつて細胞分裂・分化を行うことで、適切なパターン形成が可能となる。

植物の主要な体軸は、葉や花といった地上部と根からなる地下部を結ぶ上下の方向性を決める「頂端-基部軸」である。これまで、モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究から、頂端-基部軸が形成される過程が明らかになってきた (図 1)。卵細胞は頂端側に核、基部側に巨大な液胞を配するという頂端-基部方向の極性を持つが、受精後には核が細胞の中央に移動するとともに、液胞が細胞全体に散在する (脱極性化) (Faure *et al.*, 2002)。その後、受精卵は急激に細胞伸長し、核が頂端側に、液胞が基部側へと再び配置される (再極性化) (Ueda *et al.*, 2011)。細胞伸長が完了すると、移動した核の位置に細胞分裂面が形成されるので、受精卵は上下に不等分裂して 1 細胞期胚となる (Mansfield & Briarty, 1991)。不等分裂によって生み出された小さな頂端細胞は、特徴的なパターンで分裂を繰り返して胚体を形成し、将来的に植物体のほぼ全体を構成する一方で、大きな基部細胞から形成される胚柄は、最上部の細胞が根の一部となる以外はアポトーシスで死滅する (Jürgens & Mayer, 1994)。したがって、受精卵が不等分裂するための極性化の過程こそが、頂端-基部軸を形成するための原点であると言える。このように受精卵の不等分裂によって頂端-基部軸を形成する過程は、ヒバマタのような藻類でも観察されることから植物に広く共通した仕組みであると考えられるが (Goodner & Quatrano, 1993)、その詳細な制御機構は未だに十分に理解されていない。

これまで受精卵の極性化過程の解析が進展していなかったのには、大きく 2 つの原因があ

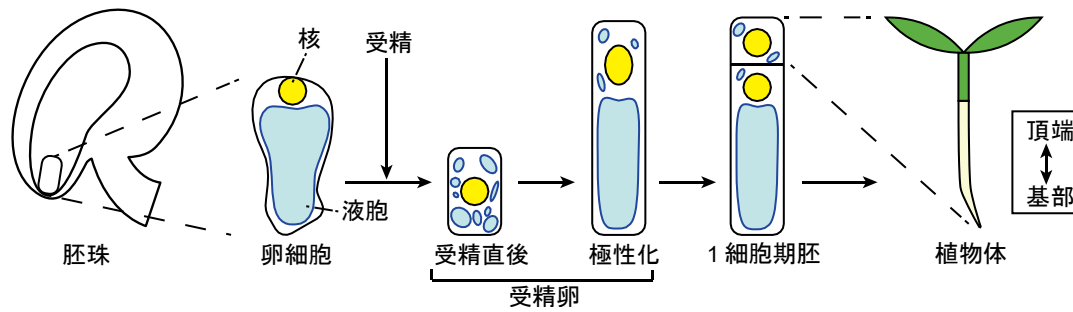


図1 シロイヌナズナの胚発生過程の模式図

固定サンプルの観察から推測されていた胚発生過程。受精卵が極性化して不等分裂することにより、将来の植物体の頂端-基部軸が形成される。

ると考えられている。まず第一に、植物の受精卵は動物とは異なり、母組織である胚珠に含まれているため、観察が困難であるという点である。前述のように、受精卵が極性化する際には、核や液胞といった細胞の内部構造の形態や配置がダイナミックに変化すると考えられている。しかしながら、この過程を生きたまま直接観察することができていなかったため、これまでの知見は固定サンプルの観察結果から断片的に推測されたにすぎない。そのため、受精卵内部のどのような動態が極性化に寄与するのかという、時空間な知見は全く得られていなかった。第二に、植物では遺伝子の冗長性が比較的高いため、変異体探索に基づく制御因子の同定が難しいことが挙げられる。そのため、単一遺伝子の欠損で極性化や不等分裂に表現型が現れず、逆に発生に重要な遺伝子群が欠損すると、その多くが胚性致死となってしまう。これらが原因で、受精卵で極性化に失敗する変異体はわずかしき得られておらず (Bayer *et al.*, 2009, Lukowitz *et al.*, 2004, Ueda *et al.*, 2011, Ueda *et al.*, 2017), 制御因子もほとんど同定されてこなかった。したがって、極性化がどのような分子機構によって制御されているのかも、ほとんど不明であった。

そのような中、近年これらの難点を克服できる新たな解析手法が開発されたことで、極性化の制御機構について、従来法では得られなかった新たな発見がなされつつある。本稿ではそれらについて概説し、頂端-基部軸をはじめとする、植物の体軸の形成機構に関する今後の展望を議論する。

2. 微小管とアクチン繊維は受精前後に大きく配向が変化する

極性化の過程での受精卵の内部動態を詳細に理解するために、受精卵をライブイメージングできる手法の確立が望まれていた。Gooh ら (2015) は胚珠を顕微鏡下で長期間培養できる液体培地の組成を見出し、受精卵が心臓型胚まで発生していく際の核の動態を、胚珠越しに詳細に観察することに成功した。Kimata ら (2016) はこの手法をさらに応用し、植物組織の深部観察に適した二光子励起顕微鏡 (Mizuta *et al.*, 2015) を用いることで、受精卵の内部構造までも鮮明に観察することを可能にした。

Kimata ら (2016) はまず、微小管やアクチン繊維といった細胞骨格の配向に注目して観察した (図 2A)。一般的に、これらの細胞骨格は力学的な細胞の形態制御や、小胞輸送の方向

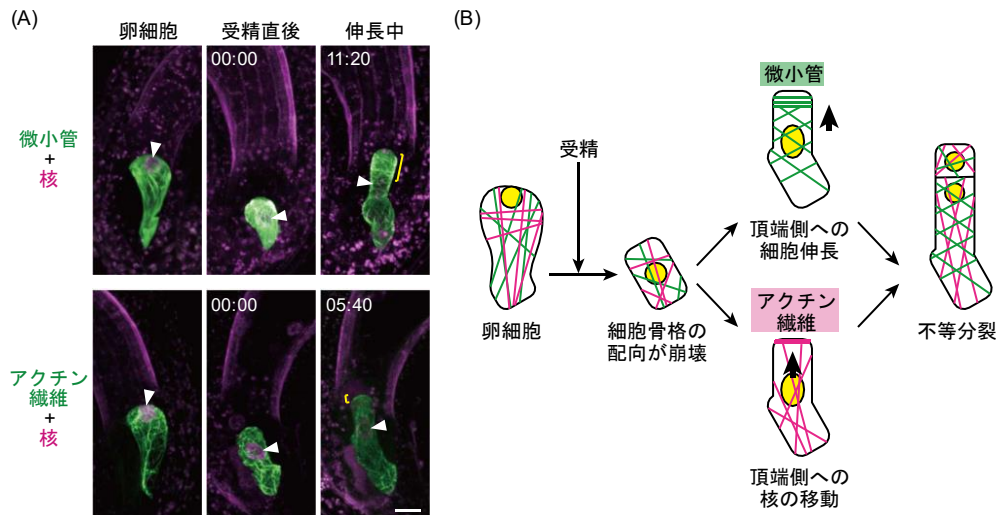


図2 受精卵での細胞骨格の動態と役割

(A) 微小管マーカーライン (上) とアクチンマーカーライン (下) の卵細胞のスナップショットと受精卵のタイムラプス像。二光子励起顕微鏡で撮影した。左上の数字は撮影開始からの経過時間 (時間:分), 白矢尻は核, 黄色括弧は微小管のリング構造 (上) とアクチン繊維のキャップ状の蓄積 (下) をそれぞれ示す。スケールバー=10 μm 。(B) 微小管とアクチン繊維の動態と役割のモデル図。(画像の一部は Kimata *et al.*, (2016), PNAS 113 (49), 14157-14162 から転用。)

制御などを担うことで, 細胞内の極性を生み出すのに重要な役割を果たすと考えられている。そこで, 受精卵での微小管の動態を可視化するべく, チューブリンとヒストンタンパク質の蛍光マーカーを卵細胞と受精卵で特異的に発現する EC1 プロモーター (Sprunck *et al.*, 2012) 下で発現させることで, 核の位置から極性化の進行度合いを把握しながら微小管の動態を観察できる二重マーカーライン (ECp::TUA6-mClover+ECp::H2B-tdTomato) が作出された。まず, このマーカーラインで卵細胞を観察した結果, 核は頂端側に位置しており, 微小管は頂端-基部方向に沿って配向することがわかった。一方で, 受精直後には細胞全体が縮小して, 核が細胞の中央に移動するとともに, 微小管の配向が崩れてバラバラになることが見出された。その後, 受精卵が伸長する際には, 微小管が頂端側でリング状の構造を形成し, 基部側では螺旋状に配向することが明らかになった。細胞伸長が完了すると, このリング構造は消失した。不等分裂の過程では, 微小管はスピンドル (紡錘糸) などの分裂装置に集中して局在した。次に, アクチン繊維についても, アクチン結合タンパク質とヒストンタンパク質の二重蛍光マーカー (ECp::Lifeact-VENUS+ ECp::H2B-tdTomato) を用いて同様に観察された。その結果, 卵細胞ではアクチン繊維がメッシュ状に配向するが, 受精後には微小管と同様に配向が崩れることが判明した。伸長中の受精卵においては, アクチン繊維は頂端側でキャップ状に蓄積するとともに次第に頂端-基部方向に沿って配向した。

Kimata ら (2016) はこれらの細胞骨格の配向を可視化するに留まらず, 細胞形態の抽出や, 細胞骨格の繊維抽出 (Higaki *et al.*, 2010, Ueda *et al.*, 2010) といった画像処理によって, 細胞のサイズや, 細胞骨格繊維の密度・平均角度・平行度・束化度 (太さ) を詳細に定量解析し

た。これによって、受精後に細胞のサイズが小さくなることに加え、卵細胞での微小管とアクチン繊維の配向が受精直後にともに崩壊することや、伸長中の受精卵で微小管が頂端側でリング状に、アクチン繊維が頂端-基部方向に沿って配向することが定量的に確認された。さらに、Kimata ら (2016) は細胞骨格の重合阻害剤の存在下で受精卵の極性化過程を観察したことで、微小管が頂端側への方向性をもった細胞伸長を、アクチン繊維が頂端側への核の移動を、それぞれ独立して制御することを突き止めた (図 2B)。

以上のように、受精卵での細胞骨格のライブイメージングが達成されたことで、微小管やアクチン繊維の配向が受精にともなって崩れ、その後、それぞれが独自のパターンで再配向することが見出された。つまり、核の位置だけでなく、細胞骨格の配向という観点からも、受精後に脱極性化が起きていると考えられる。さらに、微小管とアクチン繊維が、極性化においてそれぞれ別の現象を制御することもはじめて明らかになった。

3. 液胞は柔軟に変形しながら受精卵の基部側に不等分配される

前述のように、固定サンプルの観察では受精前後で液胞の配置がダイナミックに変化することから、液胞が受精卵内部の極性を制御するうえで重要な役割を担うことが示唆されていた (Ueda *et al.*, 2011)。そこで Kimata ら (2019) は、液胞膜に局在するピロホスファターゼ VHP1 の蛍光マーカー (Segami *et al.*, 2014) とヒストンタンパク質の蛍光マーカーを同時に導入した二重マーカーライン (EC1p::VHP1-mGFP + ECp::H2B-tdTomato) をライブイメージ

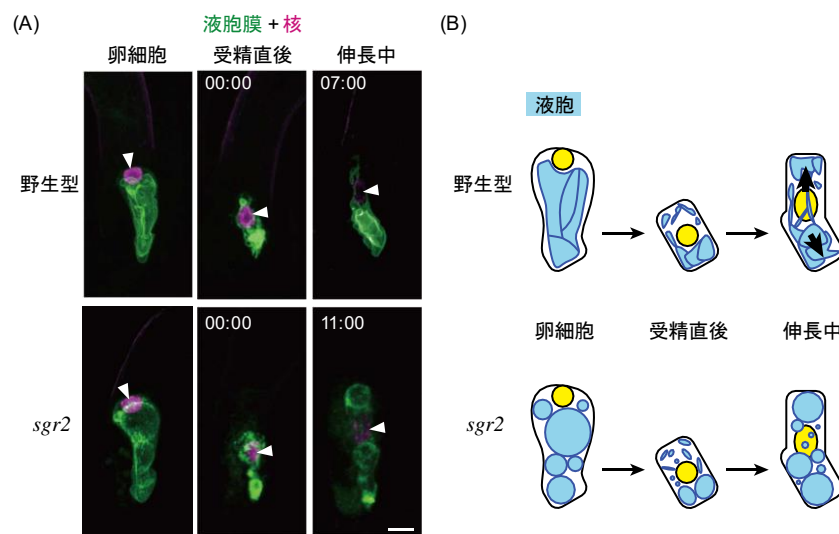


図3 受精卵での液胞の動態

(A) 野生型 (上) と *sgr2* 変異体 (下) における液胞マーカーラインの卵細胞のスナップショットと受精卵のタイムラプス像。二光子励起顕微鏡で撮影した。左上の数字は撮影開始からの経過時間 (時間:分), 白矢尻は核をそれぞれ示す。スケールバー=10 μm 。(B) 野生型 (上) と *sgr2* 変異体 (下) の液胞の動態のモデル図。野生型では液胞が柔軟に変形しながら基部側に偏ることで核が頂端側へ移動できる。一方で、*sgr2* 変異体では巨大な液胞が頂端側に残留するため、核が頂端側へ移動できない。(画像の一部は Kimata *et al.*, (2019), PNAS 116 (6), 2338-2343 から転用。)

グすることで、受精卵での液胞の動態を可視化した (図 3A)。すると、卵細胞で基部側に観察された巨大な液胞が、受精後に急激に縮小して細胞全体に拡散することが判明した。つまり、液胞の配置についても、受精によってその極性が崩れると考えられる。その後、伸長中の受精卵では、液胞が核の周辺でチューブ状の構造を形成しながら、最終的に大部分の液胞が基部側に偏って分配された (図 3B)。

Kimata ら (2019) は、このダイナミックな液胞の動態の意義を探るべく、液胞膜の柔軟性が損なわれる *sgr2* 変異体 (Kato *et al.*, 2002, Toyota *et al.*, 2013) でも同様に受精卵を観察した (図 3A)。まず *sgr2* 変異体の卵細胞では液胞が球に近い形状をしていたものの、受精後の液胞の縮小と細胞全体への拡散には顕著な異常は認められなかった。しかしながら、受精卵が伸長し始めると、核周辺の液胞のチューブは観察されず、頂端側に巨大な丸い液胞が残留し、核も細胞の中央付近に留まった。結果として、受精卵は野生型に比べてより対称的な分裂を示した。このような野生型と *sgr2* 変異体の液胞形態の違いについても、画像解析によって液胞の真円度、周長、面積を比較することで確認された。さらに、アクチン重合阻害剤の存在下では、野生型の受精卵においても核周辺の液胞のチューブが消失するのに加えて、頂端側により多くの液胞が残留して等分裂に近い分裂が観察された。以上のことから、液胞のライブイメージングによって、液胞が核の周辺でチューブ状になるなど、柔軟にその形態を変化させながら基部側に偏ることが受精卵自体の極性化にも必要であることが明らかにされた (図 3B)。また、そのような液胞の動態はアクチン繊維によって制御されることも示唆された。

4. 受精後の転写活性化が受精卵の極性化に重要である

前章までで述べたように、細胞骨格や液胞などの動態が受精卵の極性化に寄与することが明らかになってきた。したがって、受精後にこれらの動態を精密に制御する分子機構が存在すると考えられるが、そのような役割を担う因子は同定されていない。しかしながら、受精卵の極性化および不等分裂に異常を示す突然変異体がわずかではあるが得られており、極性化に関与するシグナル経路が徐々に解明されてきた (図 4)。

まず、極性化を制御するシグナルの活性化に重要な役割を担うのが、細胞膜に局在する偽キナーゼの SHORT SUSPENSOR (SSP) である (Bayer *et al.*, 2009)。SSP は精細胞では mRNA の状態で蓄積しており、受精卵で翻訳されると MAPKK キナーゼである YODA (YDA) を活性化する。YDA は MAPK キナーゼである MKK4/5, MAP キナーゼである MPK3/6 からなる MAP キナーゼ経路を介して、受精卵の極性化を制御している (Lukowitz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2017)。SSP やこれらの MAP キナーゼ経路の構成因子が欠損すると、受精卵の細胞伸長が異常になるとともに等分裂に近い分裂が観察され、その後の胚のパターン形成も損なわれる。また、SSP は BRASSINOSTEROID SIGNALING KINASE (BSK) ファミリーに属しており、同じファミリーに含まれる BSK1/2 も受精卵で YDA の活性化を担うことが示されている (Neu *et al.*, 2019)。BSK ファミリーは SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) 型受容体様キナーゼと複合体を形成して機能することが知られている (Majhi *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2019a)。しかしながら、シロイヌナズナを含むアブラナ

科に特異的な因子である SSP は、進化の過程で BSK ファミリーが持つ自己抑制機能を失ったことで、受容体を介さずに単独で YDA を活性化できるようになったと考えられている (Neu *et al.*, 2019)。一方で、BSK1/2 が受精卵においてどの受容体と協同して機能するのかは明らかになっていない。

MAP キナーゼ経路の下流では、WRKY2 転写因子がリン酸化によって活性化される (Ueda *et al.*, 2017)。活性化された WRKY2 は、雌側から持ち込まれる HOMEODOMAIN GLABROUS 11/12 (HDG11/12) 転写因子とともに、WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 8 (WOX8) 転写因子の転写を促進する (Ueda *et al.*, 2011, Ueda *et al.* 2017)。さらに Ueda ら (2017) は、WRKY2 や HDG11/12 の欠損株が MAP キナーゼ経路の欠損株と同様に受精卵の極性化に失敗するものの、受精卵で WOX8 を強制発現させればこれらの異常を相補できることも発見した。したがって、SSP・BSK1/2 によって活性化される MAP キナーゼ経路、およびその下流での WOX8 の転写活性化こそが、受精卵の極性化において中心的な役割を果たす経路であるといえる。つまり、雄側から持ち込まれる因子によって活性化される転写因子と、雌側から持ち込まれる転写因子が揃うことで、下流の実働因子群が一斉に転写され、はじめて正常な発生が可能になるのである。

WOX8 は冗長的に機能する WOX9 とともに、胚発生の過程で転写活性化因子として働くと考えられている (Breuninger *et al.*, 2008, Dolzblasz *et al.*, 2016)。しかしながら、WOX8/9 の下流でどんな遺伝子の転写が活性化されるのか、また WRKY2 や HDG11/12 が WOX8/9 の他にどんな遺伝子の転写を活性化するのかは依然として不明である。Zhou ら (2018) は、胚珠を細胞壁分解酵素で処理してから解剖することで、受精卵や初期胚を単離・回収する手法を確立した。そして、Zhao ら (2019b) はこの技術を用いて回収した卵細胞や受精卵から RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、各遺伝子の受精前後における発現量の変動についてのタイムコースを網羅的に明らかにした。これによって、受精後に 3000 近い遺伝子が発現上昇することが示されており、WRKY2 や HDG11/12、および WOX8/9 の下流遺伝子もこの中に含まれていることが期待される。実際に、Zhao ら (2019b) は阻害剤によって受精直後から新規転写を阻害した条件下では、極性化の進行が大幅に遅延することも示した。

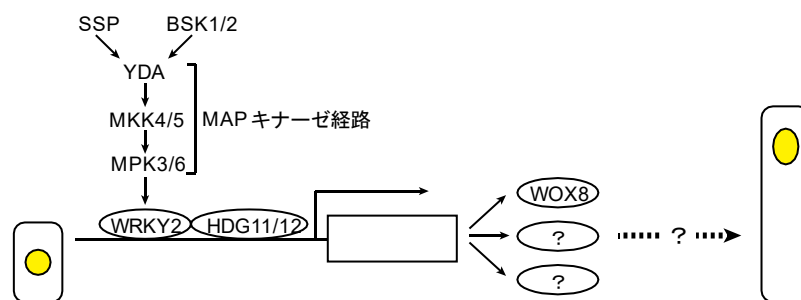


図4 受精卵の極性化を制御する分子機構

これまで明らかになっている極性化を制御する経路の模式図。受精後に活性化される MAP キナーゼ経路の下流で、極性化を制御する実働因子群の転写が活性化される。

5. おわりに

植物の頂端-基部軸の形成の端緒である、受精卵の極性化のメカニズムの解明に向けて、まず受精卵内部のライブイメージングが実現された。これによって、卵細胞での細胞骨格や液胞の極性が受精にともなって一旦崩壊し、その後それぞれが特異的なパターンで再構築されることで極性化に寄与することが明らかになった。特に液胞はこれまで受動的に細胞のサイズの変化に寄与することは知られていたものの (Krüger & Schumacher, 2018, Scheuring *et al.*, 2016)、受精卵で見出されたような、液胞が積極的に形態を変化させることで発生に寄与するという事実は予想外の発見であった。今後、ミトコンドリアなどの他のオルガネラの動態や、細胞周期、カルシウムなどのイオン濃度、ヒストン修飾などのエピジェネティック状態といった多様な動態を網羅的に可視化することで、受精卵が極性化して不等分裂に至るまでに細胞内で起こる様々な現象とその意義を理解できるであろう。

一方で、極性化を制御する分子機構については、これまで受精後にいくつかの転写活性化因子が働くことが見出されてきたものの、それらの下流で具体的にどんな遺伝子の転写が活性化されるのか、さらには受精卵という微小空間において、細胞骨格や液胞の動態がどのように精密に制御されるのかなど、未だに不明な点は多い。これらについても、まず既知因子の欠損株で受精卵内部のライブイメージングを行うことで、MAP キナーゼ経路や転写活性化因子群の下流でどのような動態が制御されているのかが明らかになるだろう。受精後に転写が活性化される未知因子については、順遺伝学的な手法での探索から同定できる期待は小さいと考えられる。RNA-seq 解析によって受精前後での網羅的な遺伝子発現プロファイルが明らかにされていることから、今後は何らかの手法で候補遺伝子を絞り込み、逆遺伝学的に制御因子を探索することが有効かもしれない。

また、今回紹介したようなライブイメージングやトランスクリプトーム解析といった手法は、植物のもう一つの体軸である放射軸（内外軸）の形成機構の解明にも有効であると考えられる。放射軸は1細胞期胚から発生が進んで、8細胞期胚が16細胞期胚となる過程で、胚体の各細胞が内外方向に分裂することで形成されると考えられている (Jürgens & Mayer, 1994)。しかしながら、この分裂方向を制御する因子は全く同定されておらず、放射軸の形成機構はほとんど解明されていない。そのような状況ながら、この時期の胚では細胞骨格や各種オルガネラなどの蛍光マーカーラインが既に整備されている (Liao & Weijers, 2018)。したがって、受精卵で用いられた手法を応用してこれらのマーカーラインを観察することで、放射軸の形成に寄与する細胞内動態を明らかにできると考えられる。さらに、細胞種特異的な核の単離により、これらの時期の胚における詳細なトランスクリプトームデータも取得されていることから (Palovaara *et al.*, 2017)、逆遺伝学的な制御因子の同定も期待できる。実際に初期胚のトランスクリプトーム解析から、胚発生における機能は未だ不明であるが、細胞膜上で偏って局在するタンパク質群である SOSEKIs が新規因子として同定された例もある (Möller *et al.*, 2017, Yoshida *et al.*, 2019)。

以上のように、受精卵においてライブイメージングやトランスクリプトーム解析が実現したことで、胚発生の過程での詳細な細胞内動態やそれらを制御する分子機構を理解するための道が拓けた。今後はこれらを足がかりとして、頂端-基部軸の形成機構、さらには植物の体

軸形成の根本原理の解明につながることを期待される。

6. 謝辞

本稿で紹介した研究成果の一部は、筆者が名古屋大学の東山哲也教授、植田美那子博士の指導のもと、名古屋大学の栗原大輔博士、佐藤良勝博士、山田朋美さん、瀬上紹嗣博士、前島正義教授、熊本大学の檜垣匠博士、東京大学の馳澤盛一郎教授、University of Kentucky (米国)の河島友和博士、Gregor Mendel Institute (オーストリア)のFrederic Berger教授、奈良先端科学技術大学院大学の加藤壮英博士、田坂昌生教授、基礎生物学研究所の森田美代教授らとの共同研究として行ったものである。これらの研究は、JSPS 科研費と科学技術振興機構 (JST)、Austrian Science Fund (FWF) の支援を受けて実施した。

7. 引用文献

- Bayer, M., Nawy, T., Giglione, C., Galli, M., Meinel, T., & Lukowitz, W. 2009. Paternal Control of Embryonic Patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 323: 1485–1488.
- Breuninger, H., Rikirsch, E., Hermann, M., Ueda, M., & Laux, T. 2008. Differential Expression of WOX Genes Mediates Apical-Basal Axis Formation in the Arabidopsis Embryo. *Dev Cell* 14: 867–876.
- Dolzblasz, A., Nardmann, J., Clerici, E., Causier, B., van der Graaff, E., Chen, J., Davies, B., Werr, W., & Laux, T. 2016. Stem Cell Regulation by Arabidopsis WOX Genes. *Mol Plant* 9: 1028–1039.
- Faure, J., Rotman, N., Fortuné, P., & Dumas, C. 2002. Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: Developmental stages and time course. *Plant Journal* 30: 481–488.
- Goodner, B., & Quatrano, R.S. 1993. Fucus Embryogenesis: A Model to Study the Establishment of Polarity. *Plant Cell* 5: 1471–1481.
- Gooh, K., Ueda, M., Aruga, K., Park, J., Arata, H., Higashiyama, T., & Kurihara, D. 2015. Live-Cell Imaging and Optical Manipulation of Arabidopsis Early Embryogenesis. *Dev Cell* 34: 242–251.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Kondo, N., & Hasezawa, S. 2010. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in Arabidopsis guard cells. *Plant Journal* 61: 156–165.
- Jürgens, G., & Mayer, U. 1994. Arabidopsis. Bard, J (eds.) EMBRYOS, Color Atlas of Development. pp. 7–21. Mosby-Year Book Ltd., London.
- Kato, T., Morita, M., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama, M., & Tasaka, M. 2002. SGR2, a Phospholipase-Like Protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, Are Involved in the Shoot Gravitropism of Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 33–46.
- 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* 113: 14157–14162.
- Kimata, Y., Kato, T., Higaki, T., Kurihara, D., Yamada, T., Segami, S., Morita, M.T., Maeshima, M., Hasezawa, S., Higashiyama, T., & Ueda, M. 2019. Polar vacuolar distribution is essential for accurate asymmetric division of Arabidopsis zygotes. *Proc Natl Acad Sci* 116: 2338–2343.

- Krüger, F., & Schumacher, K. 2018. Pumping up the volume—vacuole biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 80: 106–112.
- Liao, C.Y., & Weijers, D. 2018. A toolkit for studying cellular reorganization during early *Arabidopsis thaliana* embryogenesis. *Plant Journal* 93: 963–976.
- Lukowitz, W., Roeder, A., Parmenter, D., & Somerville, C. 2004. A MAPKK Kinase Gene Regulates Extra-Embryonic Cell Fate in Arabidopsis. *Cell* 116:109–119.
- Majhi, B.B., Sreeramulu, S., & Sessa, G. 2019. BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE5 associates with immune receptors and is required for immune responses. *Plant Physiology* 180: 1166–1184.
- Mansfield, S., & Briarty, L. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany* 69: 461–476.
- Mizuta, Y., Kurihara, D., & Higashiyama, T. 2015. Two-photon imaging with longer wavelength excitation in intact Arabidopsis tissues. *Protoplasma* 252: 1231–1240.
- Möller, B.K., ten Hove, C.A., Xiang, D., Williams, N., López, L., Yoshida, S., Smit, M., Datla, R., & Weijers, D. 2017. Auxin response cell-autonomously controls ground tissue initiation in the early Arabidopsis embryo. *Proc Natl Acad Sci* 114: E2533–E2539.
- Neu, A., Eilbert, E., Asseck, L.Y., Slane, D., Henschen, A., Wang, K., Bürgel, P., Hildebrandt, M., Musielak, T.J., Kolb, M., Lukowitz, W., Grefen, C., & Bayer, M. 2019. Constitutive signaling activity of a receptor-associated protein links fertilization with embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* 116: 5795–5804.
- Palovaara, J., Saiga, S., Wendrich, J.R., van Hofland, N., van Schayck, P.J., Hater, F., Mutte, S., Sjollem, J., Boekschoten, M., Hooiveld, G.J., & Weijers, D. 2017. Transcriptome dynamics revealed by a gene expression atlas of the early Arabidopsis embryo. *Nature Plants* 3: 894–904.
- Scheuring, D., Löffke, C., Krüger, F., Kittelmann, M., Eisa, A., Hughes, L., Smith, R.S., Hawes, C., Schumacher, K., & Kleine-Vehn, J. 2016. Actin-dependent vacuolar occupancy of the cell determines auxin-induced growth repression. *Proc Natl Acad Sci* 113: 452–457.
- Segami, S., Makino, S., Miyake, A., Asaoka, M., & Maeshima, M. 2014. Dynamics of Vacuoles and H⁺-Pyrophosphatase Visualized by Monomeric Green Fluorescent Protein in Arabidopsis: Artfactual Bulbs and Native Intravacuolar Spherical Structures. *Plant Cell* 26: 3416–3434.
- Shi, H., Yan, H., Li, J., & Tang, D. 2013. BSK1, a receptor-like cytoplasmic kinase, involved in both BR signaling and innate immunity in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* 8: e24996.
- Sprunck, S., Rademacher, S., Vogler, F., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., & Dresselhaus, T. 2012. Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science* 338: 1093–1097.
- Toyota, M., Ikeda, N., Sawai-Toyota, S., Kato, T., Gilroy, S., Tasaka, M., & Morita, M. 2013. Amyloplast displacement is necessary for gravisensing in Arabidopsis shoots as revealed by a centrifuge microscope. *Plant Journal* 76: 648–660.
- Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., & Hara-Nishimura, I. 2010. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin

- organization in plant cells. *Proc Natl Acad Sci* 107: 6894–6899.
- Ueda, M., Zhang, Z., & Laux, T. 2011. Transcriptional Activation of Arabidopsis Axis Patterning Genes *WOX8/9* Links Zygote Polarity to Embryo Development. *Dev Cell* 20: 264–270.
- Ueda, M., Aichinger, E., Gong, W., Groot, E., Verstraeten, I., Vu, L., De Smet, I., Higashiyama, T., Umeda, M., & Laux, T. 2017. Transcriptional integration of paternal and maternal factors in the Arabidopsis zygote. *Genes Dev* 31: 617–627.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J., & Zhang, S. 2007. Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 63–73.
- Yoshida, S., van der Schuren, A., van Dop, M., van Galen, L., Saiga, S., Adibi, M., Möller, B., ten Hove, C.A., Marhavy, P., Smith, R., Friml, J., & Weijers, D. 2019. A SOSEKI-based coordinate system interprets global polarity cues in Arabidopsis. *Nature Plants* 5: 160–166.
- Zhang, M., Wu, H., Su, J., Wang, H., Zhu, Q., Liu, Y., Xu, J., Lukowitz, W., & Zhang, S. 2017. Maternal control of embryogenesis by MPK6 and its upstream MKK4/MKK5 in Arabidopsis. *Plant Journal* 92: 1005–1019.
- Zhao, P., Zhou, X., Shen, K., Liu, Z., Cheng, T., Liu, D., Cheng, Y., Peng, X., & Sun, M. 2019b. Two-Step Maternal-to-Zygotic Transition with Two-Phase Parental Genome Contributions. *Dev Cell* 49: 882–893.e5.
- Zhao, Y., Wu, G., Shi, H., & Tang, D. 2019a. RECEPTOR-LIKE KINASE 902 Associates with and Phosphorylates BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 to Regulate Plant Immunity. *Mol Plant* 12: 59–70.
- Zhou, X., Shi, C., Zhao, P., & Sun, M. 2018. Isolation of living apical and basal cell lineages of early proembryos for transcriptome analysis. *Plant Reproduction* 32: 105–111.

オーキシン輸送体の局在制御因子が関わる発生制御

松浦 友紀¹・田中 博和²

¹大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻
〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

²明治大学 大学院農学研究科 生命科学専攻
〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

Developmental regulation of auxin transporter by membrane trafficking factors

Yuki Matsuura¹, Hirokazu Tanaka²

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University
1-1 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

²Department of Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Meiji University
1-1-1 Higashimita, Tama, Kawasaki, Kanagawa 214-8571, Japan

Key words: *Arabidopsis thaliana*, auxin, PIN

DOI: 10.24480/bsj-review.11b7.00189

1. はじめに

オーキシンは方向性を持って輸送される植物ホルモンであり、植物の発生と成長の様々な場面において重要な役割を担っている。オーキシンの適切な勾配と蓄積によって胚は形成され、地上部は光に向かって育ち、根は伸長し側根が形成される。オーキシンは受動的に細胞に取り込まれるだけでなく、細胞膜に分布するオーキシン輸送体によって、細胞膜を介した細胞への取り込みと、細胞外への排出が制御されている。これらの輸送体の多くは細胞膜において偏った分布を示し、特に、PIN ファミリーのオーキシン排出輸送体の分布は植物個体内のオーキシンの極性輸送の方向性と一致することなどから、排出依存的なオーキシン輸送系の働きは組織や個体レベルでのオーキシンの流れを規定する主要な要因であると考えられている。本総説では、PIN ファミリーのオーキシン輸送体の局在を制御する因子の機能と発生制御機構についての最近の知見を紹介する。

2. シロイヌナズナのオーキシン輸送体

オーキシンの極性輸送を分子レベルで説明する仮説としては、オーキシンを細胞から排出する輸送体が偏って局在するという、いわゆる化学浸透説が 1970 年代から提唱されていた。その後、分子遺伝学的研究の発展に伴い、国内外の研究グループによりオーキシンの極性輸送や応答に異常を示す変異体の研究が精力的に進められ、細胞膜に局在するオーキシン輸送体として PIN-FORMED (PIN) ファミリーのタンパク質や、AUXIN1/LIKE AUX1 (AUX/LAX) ファミリーのタンパク質が同定された。実際に、PIN タンパク質にはオーキシン排出活性が

あることが、タバコ BY-2 細胞や、HeLa 細胞を用いた実験系で実証されている (Petrasek *et al.* 2006)。一方、AUX/LAX ファミリータンパク質はオーキシン取り込み活性を持つことが、異種細胞を用いた実験系により実証されている (Yang *et al.* 2006, Swarup *et al.* 2008, Swarup & Peret 2012)。これらに加えて、ABC トランスポータータンパク質も細胞膜に局在し、オーキシンの輸送活性を持つことが報告されている (Geisler *et al.* 2017)。

3. PIN タンパク質の発生における役割

PIN タンパク質は種々の組織で発現し、多くの細胞の細胞膜において偏った分布を示す (Tanaka *et al.* 2006, Grunewald & Friml 2010)。花茎や根の中心柱におけるオーキシンの基部側 (根の先端側) への輸送や、根の表皮における頂端側 (地上部側) への輸送の方向性は PIN ファミリーのオーキシン排出タンパク質の局在様式と矛盾がなく (Benkova *et al.* 2003), PIN タンパク質の機能欠損変異によりオーキシンの極性輸送が減衰すること、さらに遺伝子工学的手法や薬理学的手法により PIN タンパク質の局在を攪乱すると、それによってオーキシンの分布が乱れることが明らかになっており (Wisniewska *et al.* 2006, Kleine-Vehn *et al.* 2008, Huang *et al.* 2010), PIN タンパク質の局在はシロイヌナズナにおけるオーキシンの極性輸送に中心的な役割を担っていると考えられている。

シロイヌナズナにおいて、細胞膜に局在しオーキシンの輸送に関与している PIN タンパク質は PIN1, 2, 3, 4, 7 である (Grunewald & Friml, 2010)。根では、PIN1 は根端分裂組織付近の中心柱に主に発現し、細胞の基部側の細胞膜に局在している。PIN2 は根端分裂組織付近の表皮、皮層そして側方根冠に発現し、表皮と側方根冠においては頂端側の細胞膜に局在している。PIN3, PIN4, PIN7 は根の先端近くの中心柱とコルメラ細胞で発現しており、複数のメンバーが部分的に重なるように発現している。PIN 遺伝子の単独機能欠損変異体は根の発生には強い異常を示さないが、*pin7* 変異体では胚発生の初期段階において原根層の細胞分裂パターンに異常を示し、*pin4* 変異体は根端分裂組織のパターンに異常を示すことが報告されている (Friml *et al.* 2002, Friml *et al.* 2003)。また、*pin2* 変異体や *pin3* 変異体は重力屈性に異常を示し (Müller *et al.* 1998, Friml *et al.* 2003), 発現部位の特異性や極性局在の特徴の違いにより、発生と成長の過程で独自の機能を担うと考えられる。一方、*pin1 pin2* 二重変異体では根端の分裂領域が小さくなり、根の成長が抑制され、*pin1 pin3 pin4 pin7* などの多重変異体ではさらに異常が強まり子葉や根の形成が阻害されることから、PIN タンパク質が冗長的に機能することが明らかにされている (Friml *et al.* 2003, Blilou *et al.* 2005, Vieten *et al.* 2005)。

地上部では、PIN1 は分裂組織と維管束組織、そして表皮の一部に極性を持って広く発現し、器官形成に主要な役割を担っている (Benkova *et al.* 2003)。PIN2, PIN3, PIN4 は葉原基での発現が検出されており、*pin1 pin4* 二重変異体は子葉や本葉の形成に強い異常を示すことが報告されている (Guenot *et al.* 2012)。

4. PIN タンパク質の細胞内輸送

定常状態では PIN1 タンパク質は主に細胞膜に分布しているが、小胞輸送の阻害剤である brefeldin A (BFA) を用いると 1 時間程度の短時間の処理により、ほとんどの PIN1 タンパク質

が細胞内に蓄積することがわかっている。この局在変化は可逆的であり、タンパク質合成阻害剤の存在下でも同様の変化が見られることから、PIN1 タンパク質は恒常的、かつ高速にエンドサイトーシスとリサイクリングによって輸送されていると考えられる (Geldner *et al.* 2001)。当初はこの細胞内輸送の意義については不明であったが、PIN の膜交通経路に参与する様々な膜交通因子が同定されており (図 1)、PIN タンパク質の細胞内輸送の特定の経路の意義を解析することが可能になってきている。

4-1. ARF GEF の BFA 感受性について

PIN タンパク質のエキソサイトーシス経路の膜の出芽に関わる因子として、低分子量 G タンパク質 ARF とその活性化因子である ARF GEF が同定されている。PIN タンパク質が恒常的にエキソサイトーシスとエンドサイトーシスにより輸送されていることを最初に示した Geldner らの実験 (Geldner *et al.* 2001) に用いられた阻害剤である BFA は、カビが生産する代謝物であり、低分子 G タンパク質 ARF と、Sec7 ドメインを持つグアニンヌクレオチド交換因子 (ARF GEF) の一部を標的として、真核生物の小胞輸送を阻害することが知られている (Gillingham & Munro, 2007)。

シロイヌナズナゲノムには、Sec7 ドメインを持つ ARF GEF として、GBF 型の ARF GEF (GNOM, GNL1, GNL2) と BIG 型の ARF GEF (BIG1-BIG5) がコードされている。GNOM の機能欠損変異体では、胚形成過程においてパターン形成が強く阻害され (Steinmann *et al.* 1999)、弱いアレルでは根の成長や側根形成の異常、重力屈性の異常が報告されている (Geldner *et al.* 2004, Okumura *et al.* 2013)。BFA 存在下でシロイヌナズナを生育させると、根の中心柱における PIN タンパク質の基部側への局在は阻害され、主根の成長阻害や重力屈性の異常が認められる (Geldner *et al.* 2003)。興味深いことに、GNOM の Sec7 ドメインは BFA に感受性の ARF GEF と共通のアミノ酸配列を持ち、特定のアミノ酸に変異を導入した変異型 GNOM (M696L) を発現する系統は、PIN1 の局在や根の成長に関する BFA 感受性が低下することが示されており、GNOM は BFA の主要な標的の一つであると考えられている (Geldner *et al.* 2003, Kleine-Vehn *et al.* 2008)。

アミノ酸配列からは、ARF GEF の一部 (GNL1, BIG3) は BFA に耐性をもつと予想されている (Geldner *et al.* 2003)。実際に、*gnl1* 変異体は植物体の生育が BFA に高感受性となり、アミノ酸置換により BFA 感受性に改変した GNL1 では *gnl1* 変異体の BFA 高感受性の表現型が回復しない (Richter *et al.* 2007)。GNOM と GNL1 はどちらも GBF1 型の ARF GEF であり、二重変異体は配偶体致死となることから、重複した機能を持つと考えられている (Richter *et al.* 2007, Teh *et al.* 2007)。また、GNOM と GNL1 はどちらも主にゴルジ体に局在し、BFA による機能阻害を受けるとトランスゴルジ網への分布が増加するという複雑な挙動を示すことが報告されている (Richter *et al.* 2007, Teh *et al.* 2007, Naramoto *et al.* 2014, 図 1)。

一方、BIG 型の ARF GEF では、BIG1-BIG4 は配列上の類似性が高く、BIG3 と BIG4 はトランスゴルジ網/初期エンドソーム (TGN/EE) に局在する (Richter *et al.* 2014)。また、多重変異体の解析から BIG1-BIG4 は冗長的に機能することが示されている (Richter *et al.* 2014)。これらの中では BIG3 のみが BFA 耐性であり、*big3* 単独変異体の根の生育は BFA に高感受性

を示す (Richter *et al.* 2014)。BIG5/BEN1 も TGN/EE に局在するが、その Sec7 ドメインはアミノ酸配列上は BFA 耐性の ARF GEF と BFA 感受性の ARF GEF の両方の特徴を持ち (Geldner *et al.* 2003), BIG5/BEN1 に M731L 変異を導入した解析の結果から、BIG5/BEN1 が BFA 感受性の ARF GEF であることが示唆されている (Xue *et al.* 2019, 図 1)。

4-2. PIN タンパク質の細胞内輸送を制御する因子

上述のような分子的背景により、BFA は複数の ARF GEF を同時に阻害することになる。野生型シロイヌナズナを BFA で処理することによって分泌経路や液胞輸送経路などの複数の膜交通経路が阻害され、TGN と小胞が凝集した BFA コンパートメントと呼ばれる構造が細胞の中に作られ、PIN1 を含む多くの膜タンパク質がこの区画に蓄積する。筆者らは、シロイヌナズナの根の中心柱において PIN1-GFP を BFA コンパートメントに蓄積しにくい変異体を順遺伝学的に単離し、*bfa-visualized endocytosis defective (ben)* 変異体と名付けた (Tanaka *et al.* 2009)。これらの変異体の解析の結果、*ben2* 変異体は TGN/EE に局在する Sec1/Munc18 タンパク質 VPS45 にアミノ酸置換 (D129N) を生じる変異を持っていた (Tanaka *et al.* 2013)。Sec1/Munc18 タンパク質は SNARE タンパク質の制御因子であると考えられており、BEN2/VPS45 も SYP4 SNARE タンパク質と結合することが明らかになっている。*ben2* 変異体では PIN1 や PIN2 が BFA コンパートメントに蓄積しにくいことから、TGN/EE への膜融合に異常が生じている可能性が考えられる。*ben1* 変異体と *ben3* 変異体は *BIG5* と *BIG2* にそれぞれ変異を持ち、これらの遺伝子の機能欠損により PIN1 が BFA コンパートメントに蓄積しにくくなると考えられた (Tanaka *et al.* 2009, Kitakura *et al.* 2017)。興味深いことに、*ben3* 変異体に *big3* 変異を導入した二重変異体では BFA による PIN1 の細胞内蓄積が見られるようになることから、BFA 耐性の ARF GEF (*BIG3*) と BFA 感受性の ARF GEF (*BEN3/BIG2*) のバランスにより BFA コンパートメントへの PIN1 の蓄積の度合いが制御されていることが示唆される (Kitakura *et al.* 2017)。*BIG* 型 ARF GEF は機能的冗長性が高く、BFA 処理と BFA 耐性因子の変異体を組み合わせた研究による、細胞生物学的な解析も進められている。その様なアプローチにより、*big3* 変異体では BFA 処理時に PIN1 および PIN2 の細胞膜への輸送が強く阻害されることが見出され、*BIG3* はこれらのタンパク質の分泌経路に関わると考えられている (Richter *et al.* 2014, Glanc

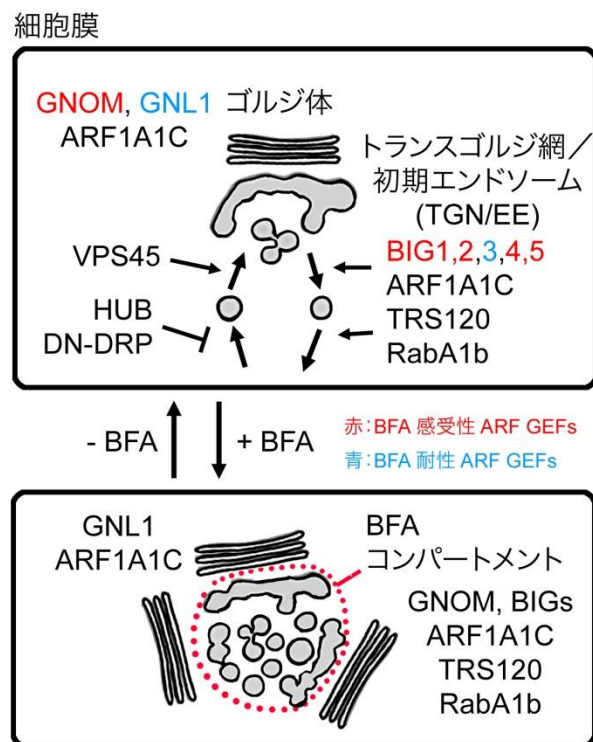


図 1. PIN タンパク質の細胞膜とエンドソームの間の輸送を制御する膜交通因子

et al. 2018)。

一方、PIN1-GFP を過剰に BFA コンパートメントに蓄積する変異体として単離された優性変異体 *bex1* には ARF ファミリーの低分子 G タンパク質 ARF1A1C に、アミノ酸置換(L34F)を引き起こす変異が生じていた (Tanaka *et al.* 2014)。ARF1A1C は TGN/EE とゴルジ体に局在し、GNOM, GNL1, BIG5 などの種々の ARF GEF と共局在することも示されており、PIN タンパク質の細胞膜局在の制御に関与する ARF であることが示唆される (Tanaka *et al.* 2014)。また、BEX1/ARF1A1C の優性変異型タンパク質の発現などにより ARF の機能が阻害された場合には、PIN1 タンパク質の細胞膜局在が減少し、それに伴いオーキシン応答のパターンが乱れ、胚のパターン形成やその後の成長に異常が生じることから、ARF1A1C は、機能的にもオーキシン依存的な発生制御に必須の役割を担っていると考えられる (Tanaka *et al.* 2014)。*bex1* 変異体と類似の優性の表現型を示す *bex5* 変異体では、Rab ファミリーの G タンパク質 RabA1b の GTP 結合部位にアミノ酸置換 (S156F) を引き起こす変異が生じていた (Feraru *et al.* 2012)。RabA1b の機能欠損変異体では強い表現型は見られなかったことから、RabA1b は他の RabA ファミリーのメンバーと冗長的に PIN タンパク質のエキソサイトーシスに関与すると考えられている。VAN4/TRS120 は TGN/EE に局在する Rab GEF のサブユニットである。VAN4 の変異体では PIN の局在に影響はないが、細胞内に PIN の蓄積が生じるため、PIN のエキソサイトーシスに関与していると示唆される。特に地上部と根の細胞分裂領域と葉の維管束細胞に強く発現しており、変異体では葉脈の形成を含む地上部と根の発生に異常をきたす (Naramoto *et al.*, 2014)。

シロイヌナズナの膜交通因子には機能的冗長性が高い場合が多く、それぞれの単独変異体では大きな発生の異常は示さないが、PIN タンパク質の膜交通に関わる因子との多重変異体にすることによって、根の成長が著しく阻害されることや、個体が矮小化することが報告されている (Tanaka *et al.* 2013, Tanaka *et al.* 2014, Richter *et al.* 2014, Kitakura *et al.* 2017, Xue *et al.* 2019)。多くの場合、変異体の発生異常がどのような積荷タンパク質に輸送の異常によるものなのかは十分に理解されておらず、今後明らかにすべき課題であろう。

4-3. 細胞膜近傍での PIN タンパク質の輸送制御

PIN タンパク質のエンドサイトーシスに関わる因子を特定するために、真核生物のエンドサイトーシスの主要な経路の逆遺伝学的解析が行われた。クラスリンは重鎖と軽鎖が複合体となり、トリスケリオン構造を形成し、さらにそれらが高次複合体を形成することによりカゴ状構造を作ることで小胞出芽の際の膜構造の変化を引き起こす働きがあると考えられている。また、ダイナミンは自己集合して螺旋状の構造をとる分子であり、小胞の出芽の際に、膜の切断に働くと考えられている。クラスリン依存的エンドサイトーシスとダイナミン依存的エンドサイトーシスを阻害するために、クラスリン重鎖の一部 (HUB) やクラスリン脱コートタンパク質、ドミナントネガティブ型ダイナミン (DRP1AK47A) を過剰発現させる実験が行われ、それにより植物細胞においてエンドサイトーシスが阻害されることが示されている (Kitakura *et al.* 2011, Yoshinari *et al.* 2016)。さらに、エンドサイトーシスを阻害した植物の根端では、中心柱における PIN1 タンパク質や表皮における PIN2 タンパク質の極性局在が

攪乱された (Kitakura *et al.* 2011, Glanc *et al.* 2018)。また、クラスリン重鎖の変異体においては PIN1 の局在に弱い異常が認められ (Kitakura *et al.* 2011), ダイナミンの変異体では細胞質分裂後に細胞板に PIN2 タンパク質が残り続けることが観察されており (Mravec *et al.* 2011), エンドサイトーシスは PIN タンパク質の極性局在に必要であると考えられる。

RHO of plants (ROP) ファミリーの G タンパク質とその相互作用因子も PIN タンパク質の細胞膜近傍における局在制御に関わることが示唆されている。ICR1/RIP1 は活性型 ROP と複合体を形成する ROP エフェクターであり、主に細胞膜に分布する (Hazak *et al.* 2010)。*icr1* 変異体は胚発生におけるパターン形成や、芽生えの形態に異常を示し、PIN の変異体と部分的に類似した表現型を示す。ROP と ICR1/RIP1 は細胞膜上に局在している。ICR1 の変異体では根の中心柱における PIN1 の極性局在の乱れや、皮層における PIN2 の極性局在異常が報告されている。また、*icr1* 変異体では BFA 処理により PIN2-GFP は BFA コンパートメントに蓄積するが、BFA 除去後にも細胞内の蓄積が残りやすいなどの異常が報告されている (Hazak *et al.* 2010)。一方、ROP GEF SPK1, ROP6, ROP エフェクター RIC1 の変異体においては BFA 処理後に PIN2 が BFA compartment に蓄積しやすいことが報告されており、ROP 依存的な経路が PIN2 の細胞内輸送に関わっていると考えられる (Lin *et al.* 2012)。さらに、光変換型蛍光タンパク質 EosFP を用いて、*spk1* 変異体においては PIN2-EosFP が細胞膜から消失しやすくなっていることが示されており、SPK1 は PIN2 のエンドサイトーシスを抑制する働きがあると推測されている (Lin *et al.* 2012)。

5. PIN タンパク質の極性局在の制御

PIN タンパク質は、細胞の種類やアミノ酸配列、修飾の違いにより、異なる様式で極性局在を示す (Tanaka *et al.* 2006, Grunewald & Friml 2010, Zwiewka *et al.* 2019)。PIN タンパク質が頂端側と基部側のどちらに局在するのかについては、リン酸化修飾の影響が強く、AGC キナーゼである PINOID, WAG1, WAG2 にリン酸化された PIN タンパク質は頂端側に局在し、これらのリン酸化酵素の変異体では地上部の表皮における PIN1 や、根の表皮における PIN2 など、本来は頂端側に局在する PIN タンパク質の局在が基部側にシフトすることが報告されている (Friml *et al.* 2004, Huang *et al.* 2010, Dhonukshe *et al.* 2010, Glanc *et al.* 2018)。また、興味深いことに、根の維管束中心柱で基部側に局在する PIN1 は、BFA により細胞膜局在が阻害されやすい傾向があり、表皮細胞で頂端側に局在する PIN2 タンパク質は BFA により局在が変化しにくいいため、PIN を頂端側と基部側に

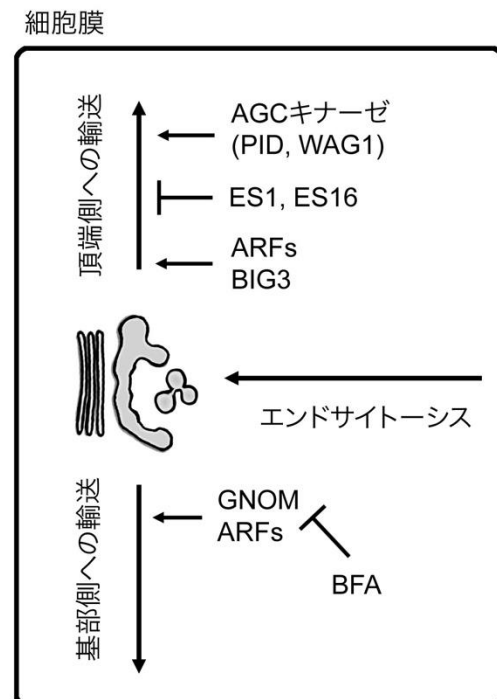


図2. PIN タンパク質の頂端側と基部側への局在に関わる輸送経路と制御因子

輸送する経路にはBFAに対する感受性の異なる輸送経路が働いているというモデルが提唱されている (Kleine-Vehn *et al.* 2008, 2009, 図2)。

gnom 変異体では胚の維管束前形成層や根の維管束中心柱においてPIN1が頂端側に分布し、それに伴い原根層や根端部でのオーキシンの蓄積が見られなくなることから、GNOMはPIN1の基部側への輸送と、それによるオーキシン依存的発生制御に中心的な役割を担うと考えられる (Kleine-Vehn *et al.* 2008, 図2)。GNOMはGBF型のARF GEFの中でも独自の機能を持っているらしく、GNOMプロモーターで*GNLI*を発現させても*gnom*変異体の発生異常は回復しない (Richter *et al.* 2007)。BFA処理時にはGNOMはBFAコンパートメントに蓄積し、リサイクリングに働くことから、GNOMはリサイクリングエンドソームに局在すると信じられてきたが、その後の研究によるとGNOMは主にゴルジ体に局在することが明らかになっている (Naramoto *et al.* 2014)。エンドサイトーシストレーサーを用いた実験では、細胞内に取り込まれた膜成分はTGN/EEに迅速に到達するが、ゴルジ体への輸送は確認されないため、細胞膜へのリサイクリングにゴルジ体が関わっているかどうかは不明である。そのため、GNOMはPIN1のリサイクリングには間接的に関わっているという可能性も指摘されており (Naramoto *et al.* 2014)、今後、GNOMにより制御される小胞輸送因子の働きが解明されることで、PIN1を基部側に輸送するリサイクリング経路の詳細が明らかになると期待される。

一方、頂端側にPINタンパク質を局在させるための膜交通因子については、十分に理解が進んでいない。根の表皮細胞において、PIN2は頂端型に局在させる経路はGNOMに依存せず、BFAにも耐性を示す。PIN2の局在を強く阻害する化合物が探索され、*endosidin1* (ES1) やES16などの化合物が頂端側への輸送経路を特異的に阻害することから、頂端側への輸送経路には特異的な膜交通因子が関与すると考えられる (Robert *et al.* 2008, Li *et al.* 2017)。ES1の標的は同定されていないが、ES1処理によるPIN2タンパク質の細胞内での蓄積はBEN2/VPS45に依存的であり、*ben1*変異体において顕著になることがわかっている (Tanaka *et al.* 2013)。また、ES16はRabA1やBIG型ARF GEFを介する経路を阻害する可能性が指摘されている (Li *et al.* 2017)。最近の研究により、PIN2の頂端側への局在に関わる位置情報についての知見を得るために、レーザーによる破壊実験が行われた。その結果、周囲と隔離された表皮細胞においても、PIN2は頂端側に輸送されたことから、表皮細胞には固有の細胞極性があり、それに従ってPIN2の配置が決定されると考えられる (Glanc *et al.* 2018)。細胞質分裂時には、PIN2は細胞板に蓄積し、その後、頂端側に主な局在部位が変化する。その過程においては、新規に合成されたPIN2タンパク質が頂端側に輸送されること、さらにその輸送はAGCキナーゼによるリン酸化やBIG3 ARF GEFに依存していることが示されている。興味深いことに、根の表皮細胞などにおいてPIN2と酷似した局在様式を示し、PIN2の輸送に関わることが示されているNPH様タンパク質MEL1 (Furutani *et al.* 2011)は、BFA処理によりBFAコンパートメントには移動せず、細胞質分裂の過程においても細胞板にもほとんど局在せずに、頂端側の細胞膜付近に局在する様子が観察されている (Furutani *et al.* 2011, Glanc *et al.* 2018)。この様なタンパク質が目印となり、その近傍においてPINタンパク質のエンドサイトーシスやエキソサイトーシスが局所的に制御されている可能性が高く、今後の解析が待たれる。

6. おわりに

上記のように、オーキシン輸送体の局在には低分子量 G タンパク質やそれを活性化する GEF などが大きく関わってくることを紹介した。これらは輸送体を目的地に運ぶ膜交通に機能している。様々な膜交通因子の解析の結果より、PIN タンパク質の極性局在にはエンドサイトーシスとエキソサイトーシスがどちらも重要な役割を果たしていることが示唆される。本稿では紹介しきれなかったが、重力屈性や光屈性の過程においても、様々な膜輸送因子やリン酸化酵素などが機能していることが徐々に明らかになってきている。しかし、オーキシン輸送体の局在を制御する分子機構は複雑であり、制御系の詳細についての理解はまだ十分ではない。今後、極性局在の分子機構が明らかになることによって、植物の発生と生長に重要な役割を果たすオーキシンの作用機序についてさらなる知見が得られることが期待される。

7. 謝辞

本稿で述べた著者たちのグループの研究は、科学研究費補助金（課題番号：23012026, 16H04806）、ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム (HFSP CDA) による支援を受けて行われた。

8. 引用文献

- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. 115(5):591-602.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., & Scheres, B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*. 433(7021):39-44.
- Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C.S., Mähönen, A.P., Kleine-Vehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B., & Offringa, R. 2010. Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development*. 137(19):3245-55.
- Feraru, E., Feraru, M.I., Asaoka, R., Paciorek, T., De Rycke, R., Tanaka, H., Nakano, A., & Friml, J. 2012. BEX5/RabA1b regulates trans-Golgi network-to-plasma membrane protein trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 24(7):3074-86.
- Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G., & Palme, K. 2002. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*. 108(5):661-73.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., & Jürgens, G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*. 426(6963):147-53.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P.J., Palme, K., & Offringa, R. 2004. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*. 306(5697):862-5.

- Furutani, M., Sakamoto, N., Yoshida, S., Kajiwara, T., Robert, H.S., Friml, J., & Tasaka, M. 2011. Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers. *Development*. 138(10):2069-78.
- Geisler, M., Aryal, B., di Donato, M., & Hao, P. 2017. A Critical View on ABC Transporters and Their Interacting Partners in Auxin Transport. *Plant Cell Physiol*. 58(10):1601-1614.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., & Jürgens, G. 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*. 112(2):219-30.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G., & Palme, K. 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*. 413(6854):425-8.
- Geldner, N., Richter, S., Vieten, A., Marquardt, S., Torres-Ruiz, R.A., Mayer, U., & Jürgens, G. 2004. Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of Arabidopsis. *Development*. 131(2):389-400.
- Gillingham, A.K., & Munro, S. 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23:579-611.
- Glanc, M., Fendrych, M., & Friml, J. 2018. Mechanistic framework for cell-intrinsic re-establishment of PIN2 polarity after cell division. *Nat Plants*. 4(12):1082-1088.
- Grunewald, W., & Friml, J. 2010. The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J*. 29(16): 2700–2714.
- Guenot, B., Bayer, E., Kierzkowski, D., Smith, R.S., Mandel, T., Žádníková, P., Benková, E., & Kuhlemeier, C. 2012. Pin1-independent leaf initiation in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 159(4):1501-10.
- Hazak, O., Bloch, D., Poraty, L., Sternberg, H., Zhang, J., Friml, J., & Yalovsky, S. 2010. A rho scaffold integrates the secretory system with feedback mechanisms in regulation of auxin distribution. *PLoS Biol*. 8(1):e1000282
- Huang, F., Zago, M.K., Abas, L., van Marion, A., Galván-Ampudia, C.S., & Offringa, R. 2010. Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell*. 22(4):1129-42.
- Jia, D.J., Cao, X., Wang, W., Tan, X.Y., Zhang, X.Q., Chen, L.Q., & Ye, D. 2009. GNOM-LIKE 2, encoding an adenosine diphosphate-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor protein homologous to GNOM and GNL1, is essential for pollen germination in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol*. 51(8):762-73.
- Kitakura, S., Adamowski, M., Matsuura, Y., Santuari, L., Kouno, H., Arima, K., Hardtke, C.S., Friml, J., Kakimoto, T., & Tanaka, H. 2017. BEN3/BIG2 ARF GEF is Involved in Brefeldin A-Sensitive Trafficking at the trans-Golgi Network/Early Endosome in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*. 58(10):1801-1811.
- Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Löffke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., & Friml, J. 2011. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23(5):1920-31.

- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P.B., Wiśniewska, J., Paciorek, T., Benková, E., & Friml, J. 2008. ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Curr Biol.* 18(7):526-31.
- Lin, D., Nagawa, S., Chen, J., Cao, L., Chen, X., Xu, T., Li, H., Dhonukshe, P., Yamamuro, C., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., & Yang, Z. 2012. A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots. *Curr Biol.* 22(14):1319-25.
- Li, R., Rodriguez-Furlan, C., Wang, J., van de Ven, W., Gao, T., Raikhel, N.V., & Hicks, G.R. 2017. Different Endomembrane Trafficking Pathways Establish Apical and Basal Polarities. *Plant Cell.* 29(1):90-108.
- Petrásek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanová, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benková, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschnig, C., Zazimalová, E., & Friml, J. 2006. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science.* 312(5775):914-8.
- Mravec, J., Petrásek, J., Li, N., Boeren, S., Karlova, R., Kitakura, S., Pařezová, M., Naramoto, S., Nodzyński, T., Dhonukshe, P., Bednarek, S.Y., Zažímalová, E., de Vries, S., & Friml, J. 2011. Cell plate restricted association of DRP1A and PIN proteins is required for cell polarity establishment in Arabidopsis. *Curr Biol.* 21(12):1055-60.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., & Palme, K. 1998. AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J.* 17(23):6903-11.
- Naramoto, S., Nodzyński, T., Dainobu, T., Takatsuka, H., Okada, T., Friml, J., & Fukuda, H. 2014. VAN4 encodes a putative TRS120 that is required for normal cell growth and vein development in Arabidopsis. 2014. *Plant Cell Physiol.* 55(4):750-63.
- Okumura, K., Goh, T., Toyokura, K., Kasahara, H., Takebayashi, Y., Mimura, T., Kamiya, Y., & Fukaki, H. 2013. GNOM/FEWER ROOTS is required for the establishment of an auxin response maximum for arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell Physiol.* 54(3):406-17.
- Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y.D., Rios, G., Konecz, C., Robinson, D.G., & Jürgens, G. 2007. Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature.* 448(7152):488-92.
- Richter, S., Kientz, M., Brumm, S., Nielsen, M.E., Park, M., Gavidia, R., Krause, C., Voss, U., Beckmann, H., Mayer, U., Stierhof, Y.D., & Jürgens, G. 2014. Delivery of endocytosed proteins to the cell-division plane requires change of pathway from recycling to secretion. *Elife.* 3:e02131.
- Robert, S., Chary, N., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N.V., & Hicks, G.R. 2008 Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 8464-8469.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., & Jürgens, G. 1999. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science.* 286(5438):316-8.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet,

- I., Vanneste, S., Levesque, M.P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J.D., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplaze, L., & Bennett, M.J. 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol.* 10(8):946-54.
- Swarup, R., & Péret, B. 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Front Plant Sci.* 3:225.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P.B., & Friml, J. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci.* 63(23):2738-54.
- Tanaka, H., Kitakura, S., Rakusová, H., Uemura, T., Feraru, M.I., De Rycke, R., Robert, S., Kakimoto, T., & Friml, J. 2013. Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 9(5):e1003540.
- Tanaka, H., Kitakura, S., De Rycke, R., De Groot, R., & Friml, J. 2009. Fluorescence imaging-based screen identifies ARF GEF component of early endosomal trafficking. *Curr Biol.* 19(5):391-7.
- Tanaka, H., Nodzyński, T., Kitakura, S., Feraru, M.I., Sasabe, M., Ishikawa, T., Kleine-Vehn, J., Kakimoto, T., & Friml, J. 2014. BEX1/ARF1A1C is required for BFA-sensitive recycling of PIN auxin transporters and auxin-mediated development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 55(4):737-49.
- The, O.K., & Moore, I. 2007. An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature.* 448(7152):493-6.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., & Friml, J. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development.* 132(20):4521-31.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P.B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquié, D., Benková, E., Scheres, B., & Friml, J. 2006. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science.* 312(5775):883.
- Xue, S., Zou, J., Liu, Y., Wang, M., Zhang, C., & Le, J. 2019. Involvement of BIG5 and BIG3 in BR11 Trafficking Reveals Diverse Functions of BIG-subfamily ARF-GEFs in Plant Growth and Gravitropism. *Int J Mol Sci.* 20(9). pii: E2339.
- Yang, Y., Hammes, U.Z., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., & Nielsen, E. 2006. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr Biol.* 16(11):1123-7.
- Yoshinari, A., Fujimoto, M., Ueda, T., Inada, N., Naito, S., & Takano, J. 2016. DRP1-Dependent Endocytosis is Essential for Polar Localization and Boron-Induced Degradation of the Borate Transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 57(9):1985-2000.
- Zwiewka, M., Bilanovičová, V., Seifu, Y., & Nodzyński, T. 2019. The Nuts and Bolts of PIN Auxin Efflux Carriers. *Frontiers in Plant Science* 10:985.