

表層微小管「列」：自己組織化する繊維

村田隆

基礎生物学研究所 生物進化研究部門

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 3 8

Takashi Murata

Cortical arrays of microtubules: self-organizing filaments

Key words: microtubules, self-organization

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

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

1 はじめに

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

2 表層微小管列とは

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

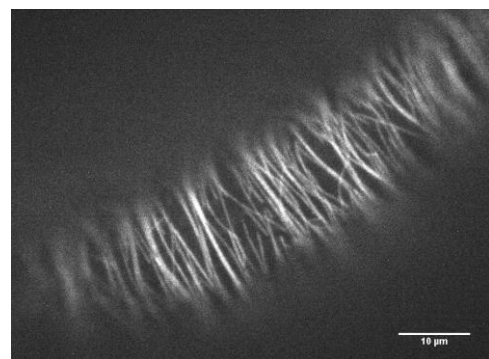


図 1 タバコ培養細胞の表層微小管列。微小管は YFP チューブリン (Yasuhara & Oe 2011) で標識した。スケールバーは 10 μm。

セルロース微繊維の並び方向を介して植物の形に大きく影響する。

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

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

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

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

4 微小管の衝突による束化と脱重合：配列した繊維が生き残る仕組み

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

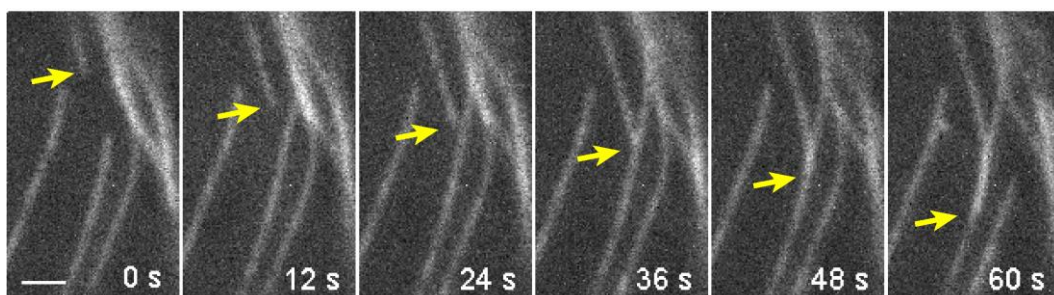


図2 微小管の衝突による束化。スケールバーは 2 μm 。

小管が衝突したとき、何が起こるのだろうか？

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

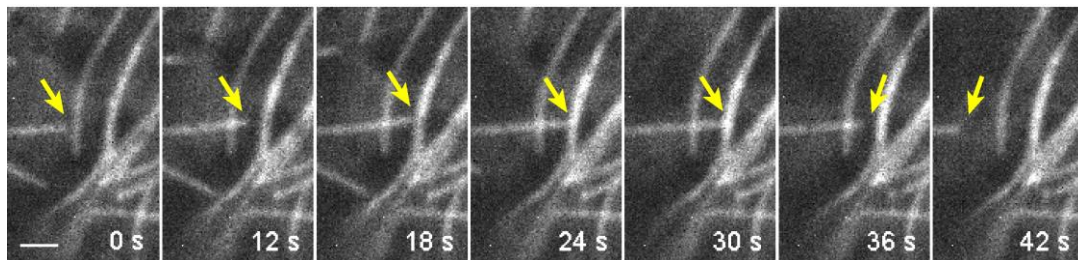


図 3 微小管の衝突によるカタストロフ。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ 。

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

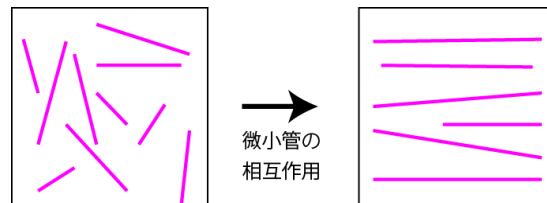


図 4 表層微小管が相互作用によって並ぶ過程。

5 微小管並び方向が変化する機構

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

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

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

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

6 伸長軸に沿った微小管の並びは細胞隅の脱重合効果により説明できる

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

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

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

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

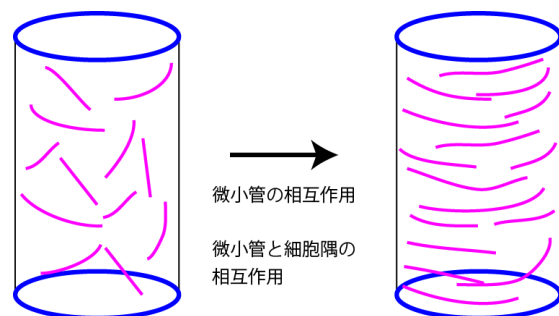


図 5 細胞の隅部が微小管列の向きにおよぼす影響。カタストロフを誘導する隅部を青で示す。

ている。

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

7 3次元的な細胞の微小管並びを理解することが試みられている

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

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

8 3Dタイムラプスによる微小管配列過程の実測の試み

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

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

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

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

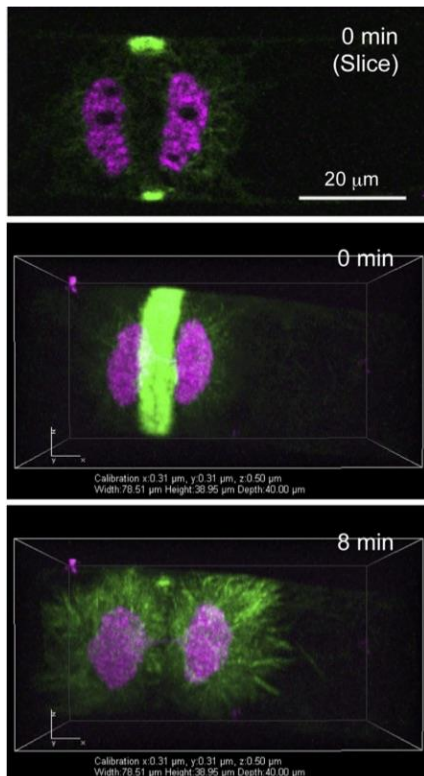


図6 2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡による細胞分裂終了時の3Dタイムラプス観察 (村田, 大友, 長谷部, 根本 未発表データ)。緑: 微小管, マゼンタ: 細胞核。上: 分裂終了直前の細胞。円筒状の細胞の中央部にフォーカスした光学切片像。中: 同じ細胞の3D再構成像 (側面から見た立体像)。細胞の上から下までの光学切片像81枚を再構成した。下: 同じ細胞の8分後の3D再構成像。

謝辞

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

引用文献

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

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

- Ledbetter, M. C. & Porter, K. R. 1963. A "microtubule" in plant cell fine structure. *J. Cell Biol.* 19: 239-250.
- Lindeboom, J. J., Lioutas, A., Deinum, E. E., Tindemans, S. H., Ehrhardt, D. W., Emons, A. M., Vos, J. W. & Mulder, B. M. 2013a. Cortical microtubule arrays are initiated from a nonrandom prepattern driven by atypical microtubule initiation. *Plant Physiol* 161: 1189-1201.
- Lindeboom, J. J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Ketelaar, T., Emons, A. M., Mulder, B. M., Kirik, V. & Ehrhardt, D. W. 2013b. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* 342: 1245533.
- Mirabet, V., Krupinski, P., Hamant, O., Meyerowitz, E. M., Jonsson, H. & Boudaoud, A. 2018. The self-organization of plant microtubules inside the cell volume yields their cortical localization, stable alignment, and sensitivity to external cues. *PLoS computational biology* 14: e1006011.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T. I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T. & Hasebe, M. 2005. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* 7: 961-952.
- Murata, T. & Wada, M. 1989. Organization of cortical microtubules and microfibril deposition in response to blue-light-induced apical swelling in a tip-growing *Adiantum* protonema cell. *Planta* 178: 334-341.
- Nakamura, M., Ehrhardt, D. W. & Hashimoto, T. 2010. Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array. *Nat. Cell Biol.* 12: 1064-1070.
- 中村匡良 & 八木慎宜 2018. 青色光に応答した微小管ダイナミクス. *BSJ Review* 9C3: 120-129.
- Nedelec, F. J., Surrey, T., Maggs, A. C. & Leibler, S. 1997. Self-organization of microtubules and motors. *Nature* 389: 305-308.
- Nick, P., Bergfeld, R., Schafer, E. & Schopfer, P. 1990. Unilateral Reorientation of Microtubules at the Outer Epidermal Wall during Phototropic and Gravitropic Curvature of Maize Coleoptiles and Sunflower Hypocotyls. *Planta* 181: 162-168.
- Otomo, K., Hibi, T., Murata, T., Watanabe, H., Kawakami, R., Nakayama, H., Hasebe, M. & Nemoto, T. 2015. Multi-point scanning two-photon excitation microscopy by utilizing a high-peak-power 1042-nm laser. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 31: 307-313.
- Paredez, A. R., Somerville, C. R. & Ehrhardt, D. W. 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312: 1491-1495.
- Shaw, S. L., Kamyar, R. & Ehrhardt, D. W. 2003. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 300: 1715-1718.

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