

木部道管細胞の分化を支える表層微小管ダイナミクス

佐々木武馬¹, 小田祥久^{1,2}

¹ 国立遺伝学研究所 新分野創造センター

² 総合研究大学院大学 生命科学研究科 遺伝学専攻

〒411-8540 静岡県三島市谷田1-1-1

Takema Sasaki¹, Yoshihisa Oda^{1,2}

Cortical microtubule dynamics during xylem vessel cell differentiation

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

¹Center for Frontier Research, National Institute of Genetics

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

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

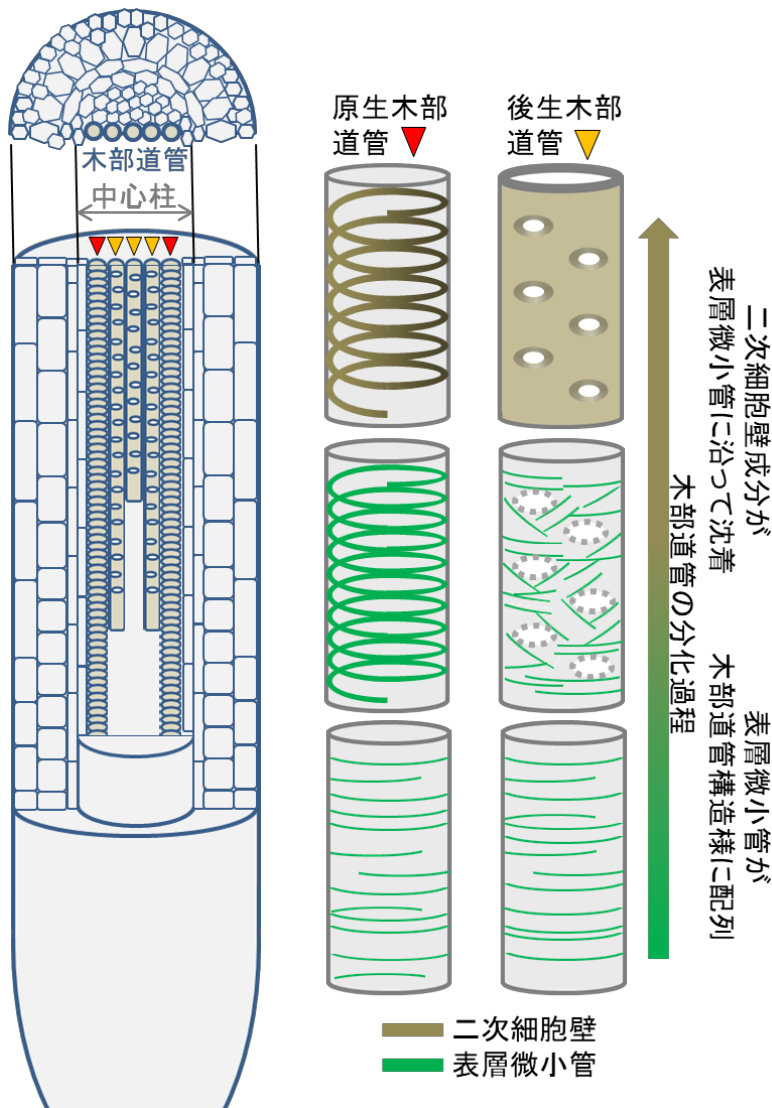
1. はじめに

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

2. シロイヌナズナの根における木部道管の形成

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

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



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

図1 シロイヌナズナの根における木部道管の形成

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

3. 二次細胞壁パターンを制御する微小管付随タンパク質

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

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

4. 後生木部道管の二次細胞壁パターンを制御する微小管付随タンパク質

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

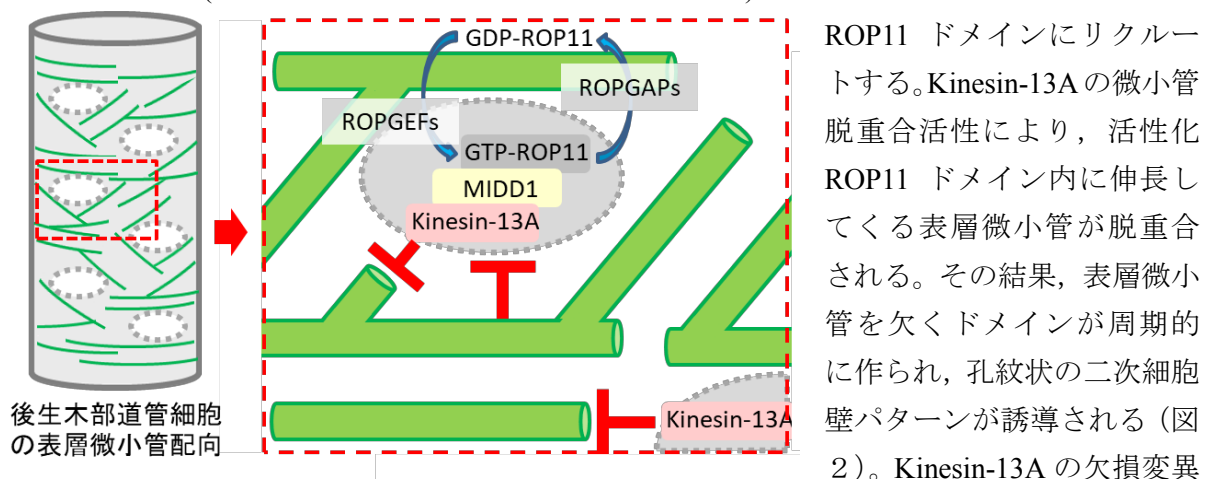


図 2 後木部道管細胞において表層微小管の配向パターンを作り出す分子機構 (左) 後生木部細胞の分化初期における表層微小管配向パターン。灰色の点線内の領域は微小管が失われ壁孔となる。(右) 左図の赤点線内の拡大図。壁孔を形成する領域における表層微小管の配向制御機構を示す。

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

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

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

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

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

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

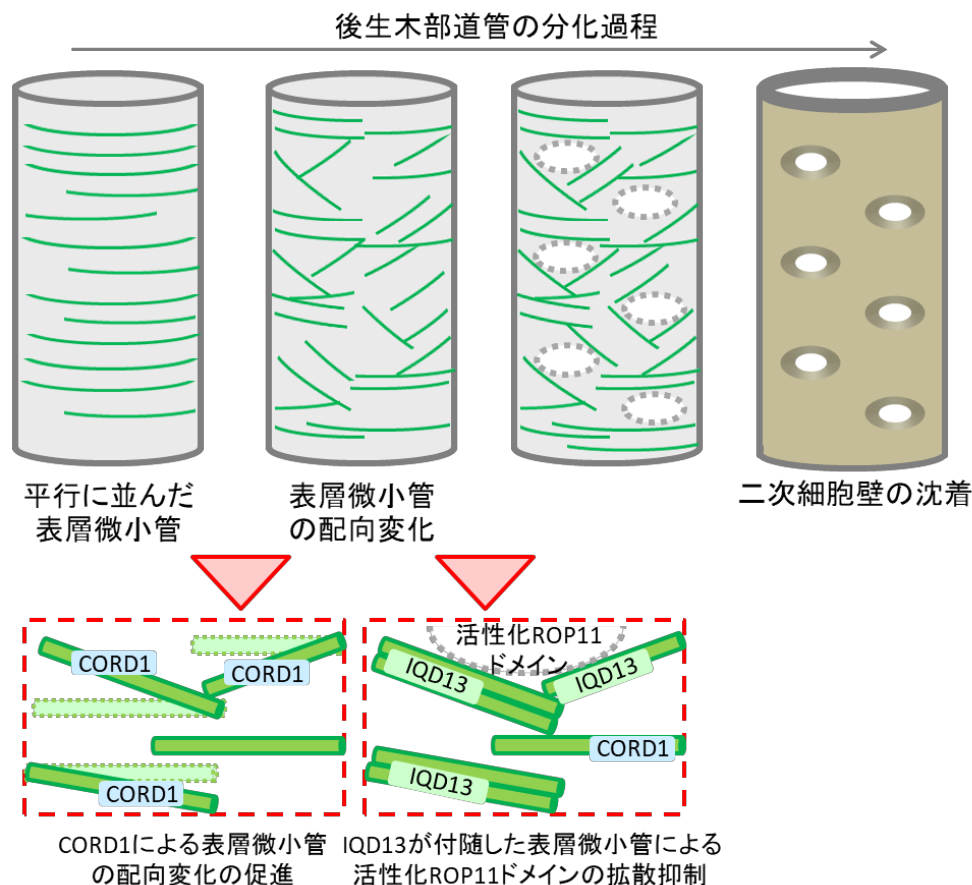


図 3 木部道管分化過程における *CORD1* と *IQD13* の役割

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

5. 表層微小管に沿った細胞壁成分の輸送に関わるタンパク質

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

6. おわりに

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

引用文献

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

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