

# 主論文

ヒメツリガネゴケにおける誘導型 RNAi 系の確立  
および微小管生成因子の機能解析

名古屋大学大学院  
理学研究科 生命理学専攻

中岡 由貴

# 目次

目次.....	1
要旨.....	2
序論.....	4
言葉の定義.....	12
結果.....	13
第一章.....	13
第二章.....	18
第三章.....	22
考察.....	33
第一章.....	33
第二章.....	35
第三章.....	40
材料と方法.....	47
謝辞.....	52
参考文献.....	53
図.....	66
表.....	104
動画の説明.....	119

## 要旨

細胞骨格である微小管は細胞の伸長方向の制御や先端成長、細胞内の物質輸送、細胞分裂などに必須の役割を果たしている。細胞内において微小管の動態は非常にダイナミックであり、生成や消失を繰り返している。微小管生成に関わる因子の欠損は多くの場合致死性の表現型を示すが、微小管生成様式は細胞型や生物種により異なることが知られている。100年以上前に中心体が発見されて以来、長い間中心体が微小管を中心的に形成している考えられてきた。しかしながら、最近の研究から、中心体非依存的に生成される微小管の重要性が明らかになりつつある。にもかかわらず、その解析は一部の細胞型に限定されている。

そこで、進化の過程で中心体を失ったと考えられている陸上植物における微小管生成機構の解明を目指した。そのためには、①微小管生成に関わる因子が予想される因子の機能阻害、②微小管生成過程の詳細な観察、の2つのアプローチを併用することが必要であると考えた。そこでまず、高解像度での生細胞観察が比較的容易なヒメツリガネゴケに着目し、誘導型 RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) 系を確立した。

次に、確立した系を用いていくつかの微小管関連因子の発現を抑制し、細胞分裂期の微小管生成に与える影響を調べた。3次元でのタイムラプス観察から、オーグミンタンパク質複合体および微小管重合核形成因子である  $\gamma$ -tubulin 複合体 ( $\gamma$ -tubulin ring complex;  $\gamma$ -TuRC) サブユニットのノックダウンにより、スピンドルおよびフラグモプラストの微小管増加がほぼ完全に抑制された。また、オーグミンのノックダウンにより  $\gamma$ -tubulin のスピンドル局在が減少したことから、分裂期において新規に生成される大部分の微小管は、オーグミンが  $\gamma$ -TuRC を既存の微小管上にリクルートして生成されることが示唆された。

さらに、間期における微小管生成機構を調べた。微小管一本一本の動態を観察できる斜光照明蛍光顕微鏡法を導入し、細胞表層付近で微小管が生成される過程を観察したところ、分裂期とは異なり、既知の微小管上からの生成だけではなく細胞質内のさまざまな場所からも生成されることがわかった。微小管が生成される際、大部分の微小管は  $\gamma$ -tubulin の微小管末端への局在が確認できたが、興味深いことに、一部の微小管については  $\gamma$ -tubulin との共局在が認められ

なかった。また、 $\gamma$ -tubulin をノックダウンした細胞においても、全体の微小管量や生成頻度に差は認められなかったことから、間期には  $\gamma$ -tubulin 以外の何らかの微小管生成機構が存在することも示唆された。本研究から、ヒメツリガネゴケ原糸体細胞では分裂期と間期で異なった機構により微小管を生成することで、適切な場所で適切な量の微小管を形成している可能性が示唆された。

## 序論

### 微小管

細胞骨格微小管(microtubule)は細胞内で様々な機能を担っており、細胞分裂や細胞の成長、細胞内の物質輸送などに必須の役割を果たす。微小管は真核生物で広く保存されており、細胞周期を通じて分布や動態が制御されている。微小管は  $\alpha/\beta$ -tubulin ヘテロダイマーを最小構成単位としたタンパク質重合体である(図 0-1A)。細胞内では神経の機械受容器などを除き、大部分の微小管は 13 本のプロトフィラメントからなる、直径約 25 nm の筒状の繊維を形成している(Chalfie and Thomson, 1979; Tilney et al., 1973)。ヘテロダイマーが規則的に並んだ構造をとっているため、微小管は極性を持つ。 $\beta$ -Tubulin が外側の方をプラス端、 $\alpha$ -tubulin が外側の方をマイナス端と呼ぶ(図 0-1A)。プラス端はマイナス端にくらべて動的であり、微小管の動態は微小管結合タンパク質(microtubule-associated protein; MAP)などにより制御されている。

### 細胞分裂について

細胞分裂は細胞の数や種類の増加を担っており、これにより発生や個体の成長、生命体の維持が可能となる。細胞分裂では複製された DNA を 2 つの娘細胞に均等に分配することで、遺伝情報が正確に娘細胞に伝達される。細胞分裂は核分裂と細胞質分裂(cytokinesis)に分けられる。核分裂は前期(prophase)、前中期(prometaphase)、中期(metaphase)、後期(anaphase)および終期(telophase)からなる。ヒメツリガネゴケ原糸体細胞における細胞分裂の様子を図 0-2 に示した。前期では、DNA の凝縮により染色体が形成される。前中期では、核膜崩壊(nuclear envelop break down; NEBD)が起こり、微小管が染色体の周りに集積し、分裂期スピンドル(以下スピンドル)が形成される。中期ではすべての染色体が微小管と正確に結合することで、染色体が赤道面に整列し、樽型の中期スピンドルが形成される。後期には中央に整列した姉妹染色分体が両極側へ分離し、終期に核膜が再び形成され、2 つの娘核となる。細胞質分裂では分離した染色体の中央領域にフラグモプラスト(phragmoplast)という細胞質分裂装置が形成される(詳細は図 2-5 参照、(Lambert and Bajer, 1972))。フラグモプラストは微小管を主要な構成成分としており、中央領域に細胞板が形成されることで新たな細胞壁が形成さ

れる。フラグモプラストは細胞の中央から遠心状に拡張し、上下の親細胞壁に到達する。

細胞分裂において動物と植物には2つの大きな違いが存在する。1つ目は中心体(centrosome)の有無である。スピンドル形成において、動物は中心体を主要な微小管形成中心(microtubule organizing center; MTOC)として使用するが、陸上植物にはそのような構造体は存在せず、中心体に依存しない機構によりすべての微小管を形成する(Murata and Hasebe, 2007)。しかしながら、植物細胞におけるスピンドル微小管生成機構の理解はそれほど進んでいない。2つ目は細胞壁の有無による細胞質分裂の様式の違いである。動物細胞には細胞壁が存在しないため、アクチン繊維から構成された収縮環が細胞膜をくびり切ることにより細胞質分裂を完了させる。その際、セントラルスピンドルと呼ばれる主に微小管から構成された構造が分配された娘核の間に形成され、正確な細胞質分裂を可能にする。一方、植物細胞には細胞壁が存在するため、細胞板が親細胞壁に到達することにより細胞質分裂を完了する。その際、分配された娘核の間にフラグモプラストが形成され、細胞板形成を確実にする。フラグモプラストとセントラルスピンドルの微小管が同じ機構により生成されているかは興味深い問題である。

### 微小管生成機構について

微小管は細胞周期を通してダイナミックに、生成と消失を繰り返す(図 0-1A)。微小管は試験管内においては高濃度の  $\alpha/\beta$ -tubulin ヘテロダイマーを混合するだけで生成されることが知られているが(Sui and Downing, 2010; Zheng et al., 1995)、細胞内では一般に MTOC から形成される(Luders and Stearns, 2007)。中心体は動物細胞における主要な MTOC であり、1 対の中心小体と中心小体を取り巻く周辺物質(pericentriolar material; PCM)からなる。中心小体は 9 回転対称の円筒状の構造体であり、中心体内では 2 つの中心小体が垂直に配置された L 字型の構造をとっている。中心小体の構築に必須の遺伝子の欠損は中心体の欠損を引き起こすことが知られている(Marshall and Rosenbaum, 1999)。中心体は 100 年以上前に発見されて以来、主要な MTOC であることから、細胞分裂や細胞小器官の配置、細胞内輸送や細胞の極性の確立に重要な役割を果たすと考えられてきた(Kellogg et al., 1994)。実際に、*C. elegans* では中心体を欠損させると胚性致死の

表現型を示す(O'Connell et al., 2001)。しかしながら、驚くべきことに中心体を欠損させたショウジョウバエは成体まで生育する(Basto et al., 2006)。中心体を欠損させた細胞において分裂が正常に起こることは、中心体非依存的な機構で微小管が形成されることを意味する。中心体非依存的な微小管形成機構は、動植物の様々な種類の細胞で細胞分裂や極性化といった細胞機能に必須の役割を果たすことが明らかになってきた(Bartolini and Gundersen, 2006; Goshima and Kimura, 2010)。しかしながら、その生成様式の理解は一部の生物種にとどまっている。陸上植物は進化の過程で中心体を失っており、中心体非依存的にすべての微小管を生成する。このことは、陸上植物が中心体非依存的な微小管生成機構の研究に適したモデルシステムになりうることを示している。

### **$\gamma$ -Tubulin について**

$\gamma$ -Tubulin は現在、細胞内において微小管重合核形成因子(microtubule nucleator)であることが確実に示されている唯一のタンパク質である。 $\gamma$ -Tubulin は糸状菌(*Aspergillus nidulans*)の遺伝子スクリーニングから  $\beta$ -tubulin 変異体のサプレッサーとして同定された(Oakley and Oakley, 1989)。 $\gamma$ -Tubulin は中心体を含む数々のMTOCに局在し、染色体からの微小管形成機構(Mishra et al., 2010)や中心体を持たない植物細胞での微小管生成機構(Murata et al., 2005)も含めて、現在知られている微小管生成機構のほとんどに必要である。

$\gamma$ -Tubulin は細胞内において  $\gamma$ -tubulin 複合体を構成している。 $\gamma$ -Tubulin 複合体は  $\gamma$ -tubulin、GCP2、GCP3 からなる  $\gamma$ -tubulin small complex ( $\gamma$ -TuSC)と  $\gamma$ -TuSC およびGCP4、GCP5、GCP6 からなる  $\gamma$ -tubulin ring complex ( $\gamma$ -TuRC)に分けられる(図0-1A (Kollman et al., 2011))。NEDD1/GCP-WD は  $\gamma$ -TuRC の補助タンパク質であり、活性化や局在に影響を与える(Haren et al., 2006; Luders et al., 2006)。電子顕微鏡を用いた研究から、 $\gamma$ -TuRC がリング構造を形成することが示された(Kollman et al., 2010; Zheng et al., 1995)。このとき、 $\gamma$ -tubulin は13個で1回転する構造をとっており、微小管の構造と一致する。それゆえに、 $\gamma$ -TuRC は微小管が伸びる鋳型を提供することで微小管重合核として機能するというテンプレートモデルが支持されている(Kollman et al., 2015; Kollman et al., 2010)。

## 分裂期における中心体非依存的な微小管生成機構

中心体を用いないスピンドルの形成は、動物細胞では卵母細胞の減数分裂期やマウスの初期胚において観察される。しかしながら、中心体の存在しないこれらのシステムでは高解像度での顕微鏡観察と遺伝子機能阻害を組み合わせた細胞生物学的解析が難しいため、中心体非依存的なスピンドル形成機構の理解はそれほど進んでいない。そのため、中心体のないスピンドル形成に対する現在の知見は、主に *Xenopus laevis* の卵から得られた細胞抽出液や人工的に中心体を欠損させた動物の体細胞から得られている(Goshima et al., 2008; Walczak and Heald, 2008)。これらのシステムを用いた研究により、Ran-GTP やオーロラ B キナーゼに依存した染色体からの微小管形成機構やオーグミン複合体による微小管依存的な微小管生成機構が明らかになった(Goshima et al., 2008; Heald et al., 1996)。

オーグミンは近年同定された 8 サブユニット(Aug1-8)からなるタンパク質複合体であり、中心体を持つハエやヒトの体細胞において微小管重合核形成因子である  $\gamma$ -TuRC のスピンドル微小管上への局在と分裂期スピンドル内での微小管依存的な微小管生成に必要である(図 0-1B (Goshima et al., 2008; Uehara and Goshima, 2009))。現在、脊椎動物、ハエ(*Drosophila melanogaster*)、植物(*Arabidopsis thaliana*、*Physcomitrella patens*)、糸状菌(*Aspergillus nidulans*)において、オーグミン複合体の存在が報告されており、すべての種で 8 サブユニットからなる複合体であることが報告されている(糸状菌では現在 6 つのサブユニットしか見つかっていないが、ゲル濾過クロマトグラフィーから得られた結果は植物と同程度の大きさの複合体を形成していることが示唆されており、まだ同定されていない 2 つのサブユニットが存在すると考えられる(Edzuka et al., 2014; Goshima et al., 2008; Hotta et al., 2012; Lawo et al., 2009; Uehara et al., 2009))。

中心体を持つ細胞においてオーグミンをノックダウンすると、染色体の整列異常やスピンドルの単極化、多極化、セントラルスピンドル微小管数の減少とそれに伴う細胞質分裂の失敗など様々な分裂異常がもたらされる(Goshima et al., 2008; Lawo et al., 2009; Uehara et al., 2009)。オーグミンノックダウンの表現型は中心体の欠損により更に重篤になることがハエ培養細胞で報告されている(Goshima et al., 2008)。これはハエ培養細胞では中心体依存的な機構と中心体非依存的かつ、オーグミン依存的な機構の両方がスピンドル形成に協働して働いていることを意味する。一方、中心体を持たないハエの卵の減数第一分裂にお



いて、オーグミン変異体では染色体整列には異常が見られるが、スピンドル微小管形成には異常が見られないと報告された(Meireles et al., 2009)。さらに、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のオーグミン変異体では、スピンドル形成異常やフラグモプラスト形成異常が報告されたが(Ho et al., 2011; Hotta et al., 2012)、動物の体細胞のように微小管生成機能の欠損かどうかは明らかになっていない。オーグミンが中心体を持たない植物細胞において微小管生成に寄与しているのかは興味深い問題である。

### 細胞小器官からの微小管生成

中心体を持たない陸上植物だけでなく、中心体を持つ動物細胞においても中心体非依存的な微小管形成機構により微小管が生成されることが分かってきた。間期に観察される中心体非依存的な微小管形成機構の一つに、細胞小器官からの微小管形成機構が知られている。これまでにゴルジ体(Chabin-Brion et al., 2001)、ペルオキシソーム(Zekert et al., 2010)、核(Shimamura et al., 2004)、色素体、ミトコンドリア(Noguchi et al., 2011)が MTOC として報告されている。ゴルジ体からの微小管生成は最も注目されている中心体非依存的な微小管形成機構の一つである(Chabin-brion, 2001)。この機構は  $\gamma$ -TuRC 依存的な機構であり、微小管のプラス端結合タンパク質である CLASP および中心体とゴルジ体に局在する AKAP450 が必要である(Efimov et al., 2007; Rivero et al., 2009)。神経細胞では中心体非依存的な機構により微小管が生成されており、ゴルジ体が MTOC として機能していることが示された(Ori-McKenney et al., 2012)。他の細胞小器官にも  $\gamma$ -tubulin が局在することは知られているが、その詳細な局在化機構は不明である。

### 間期植物細胞での微小管形成機構

陸上植物においてこれまで最も研究されてきた間期微小管形成機構は、顕花植物であるシロイヌナズナやタバコ(*Nicotiana tabacum*)培養細胞(bright yellow-2 cell; BY-2 細胞)での表層微小管(cortical microtubule)の形成機構である。表層微小管は、セルロース合成酵素の進行方向を制御しており、細胞膜に結合して細胞の伸長方向に対して垂直に配向されている(Dixit and Cyr, 2004)。表層付近で生成され、平行に束化されることで微小管の配向が形成、維持されている(Lloyd and

Chan, 2008)。生細胞観察や変異体の解析、数理モデルにより、この過程の詳細な機構が明らかにされてきた(Fishel and Dixit, 2013; Lindeboom et al., 2013a; Murata et al., 2005; Nakamura et al., 2010; Nakamura and Hashimoto, 2009; Wasteney and Ambrose, 2009)。この機構は大きく2つに分けられる。一つは微小管依存的な微小管生成(microtubule-dependent microtubule nucleation; branching nucleation)である。Branching nucleationは表層微小管の主要な微小管生成モードであり、新しい微小管(娘微小管)は既存の微小管(母微小管)の側面から生成される。この反応には $\gamma$ -TuRCが必要であり、微小管の側面に一時的に局在する。表層微小管ネットワークでは、娘微小管は母微小管に対し $40^\circ$ もしくは $0^\circ$ の角度で正確に形成されることから、微小管の平行な配向を維持する機構が存在することを示している。鋭角に微小管を形成することにより、積極的に平行に近い微小管を生み出し、配向を維持しているのかもしれない。鋭角のbranching nucleationには脱リン酸化酵素である TONNEAU2/FASS (TON2)のような調節因子が必要である。TON2のシロイヌナズナ変異体では $40^\circ$ のbranchingが減少し、 $0^\circ$ のbranchingが増加する(Kirik et al., 2012)。さらに、最近、オーグミンが間期の表層細胞において $\gamma$ -tubulinを表層微小管上にリクルートすることでbranching nucleationに関わっていることが示された(Liu et al., 2014)。

二つ目はカタニン依存的な微小管の切断である。カタニンはATP依存的に微小管を側面から切断する(McNally and Vale, 1993)。カタニンは酵素活性を持つp60サブユニットと補助サブユニットであるp80サブユニットから構成されている。シロイヌナズナにおいて生細胞観察によりカタニンが交差した微小管を優先的に切断し、切断により生じた新しいプラス端の15–20%が再び伸長することが示された(Lindeboom et al., 2013b; Zhang et al., 2013)。Branching nucleationにより生成された娘微小管はカタニンに切断されることで母微小管から切り離される(Nakamura et al., 2010)。このように、カタニンは微小管の増幅だけでなく、微小管の配向にも重要な役割を果たす。

これまで間期の微小管形成機構の研究には表層微小管が用いられてきたが、陸上植物の内胚乳、花粉管、根毛などの細胞では典型的な表層微小管とは異なった微小管ネットワークを形成している(Brown et al., 1994; Wasteney and Ambrose, 2009; Wasteney and Galway, 2003)。微小管の免疫染色と生細胞観察からこれらの細胞が典型的な表層微小管ではなく「endoplasmic 微小管」を細胞質中に形成することが示された。Endoplasmic 微小管は間期において形成される微

小管であり、3 次元的に細胞内に存在する。Endoplasmic 微小管はコケ原糸体細胞の伸長に決定的な役割を果たすが(Doonan et al., 1985; Doonan et al., 1988; Hiwatashi et al., 2014)、その生成機構は不明である。

### ヒメツリガネゴケについて

本研究を始めるにあたり、ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)が理想的な細胞生物学のモデルシステムになり得ると考えた。ヒメツリガネゴケには以下の細胞生物学的に有用な特徴を持つ。一つ目は遺伝子配列が解読され、データベース化されていることである(Rensing et al., 2008)。ヒメツリガネゴケは 27 本の染色体を持ち、ゲノムサイズは 500 Mb ほどである。二つ目はその生涯のほとんどを一倍体で過ごし、相同組換え効率が高いことである。そのため、遺伝子のノックアウトや内在性遺伝子への蛍光タンパク質タグの付加により、直接的にタンパク質の機能や局在を調べるのが容易である。さらに、RNA 干渉(RNA interference; RNAi)も働くことが報告され、原糸体細胞の生育に必須な遺伝子の機能解析も可能となった(Bezanilla et al., 2003; Bezanilla et al., 2005; Cove et al., 2006; Prigge and Bezanilla, 2010)。ヒメツリガネゴケの胞子は出芽後、原糸体と呼ばれる繊維状の構造をとる。原糸体細胞はクロロネマ細胞とカウロネマ細胞の 2 種類に分けられる。このうちカウロネマ細胞は少数の小さな葉緑体を持つため、自家蛍光による影響が少なく、蛍光タンパク質を付加した融合タンパク質の生細胞観察に適している(Vidali et al., 2009a; Vidali et al., 2009b)。また、分裂周期も 5-8 時間ほどと短いため、細胞分裂のタイムラプス観察にも適している(Hiwatashi et al., 2008)。一方で、クロロネマ細胞は大きな多数の葉緑体を持ち、細胞分裂周期が 24 時間ほどと長い(Cove, 2005)。さらに、原糸体は頂端細胞の先端成長により伸長するが(Menand et al., 2007)、クロロネマ細胞はカウロネマ細胞に比べて伸長速度が遅い。また、原糸体細胞は先端細胞の細胞分裂と先端から数細胞基部側の細胞の分裂(分枝)により 2 次元的に成長する。分枝により生じる細胞の大部分はクロロネマ細胞であるが、数%は葉、茎からなる茎葉体や仮根を形成する幹細胞(芽、bud)となる。

ヒメツリガネゴケにおける従来の RNAi 解析は、恒常的に発現するプロモーターの下流に発現後二本鎖 RNA(double-strand RNA; dsRNA)を形成する配列を組み込んだプラスミドを一過的にプロトプラストに導入することにより行われる。

この系を用いて、アクチン制御因子がプロトプラストの再生過程の初期段階に現れるクロロネマ細胞の先端成長に関わることが示された(Augustine et al., 2008; Vidali et al., 2007; Vidali et al., 2009b)。しかしながら、クロロネマ細胞における分裂周期は長く(24 時間に 1 回程度)、RNAi と生細胞観察を組み合わせることによる細胞分裂の観察には成功していない。また、生育に必須の遺伝子では dsRNA が恒常的に発現する形質転換体は得られない可能性が高い。同じ理由で、一倍体で多くの時を過ごすコケ植物では相同組換えによる遺伝子欠損を用いる方法は生育に必須の遺伝子には適用できない。そのため、ヒメツリガネゴケにおいて RNAi を誘導的に引き起こす系の確立が必要だと考えた。

本研究では、まず、ヒメツリガネゴケにおいて誘導型 RNAi 系を確立した。これによりカウロネマ細胞において高解像度での生細胞観察と遺伝子の発現抑制を組み合わせることが可能となった。次に、確立した系を用いて細胞分裂期の微小管形成に関わる因子を同定し、オーグミン複合体が分裂前中期から細胞質分裂にかけてスピンドル微小管生成に重要であることを示した。さらに、間期の原糸体細胞において、微小管一本一本の動態を観察することが可能な、斜光照明蛍光顕微鏡法を用いて微小管生成ダイナミクスを観察、定量化した。その結果、これまで報告された顕花植物の表層微小管とは異なり、endoplasmic 微小管では branching nucleation と、既存の微小管に依存しない細胞質からの生成の 2 つが主要な微小管生成機構であった。どちらの機構も大部分は  $\gamma$ -tubulin 依存性であったが、意外なことに通常の培養条件で培養した細胞では  $\gamma$ -tubulin の発現を抑制しても微小管の配向や生成頻度に明らかな違いは認められなかった。このことから  $\gamma$ -tubulin に依存しない未知の微小管生成機構の存在も示唆された。

## 言葉の定義

本論文では、区別しにくい言葉について以下のように定義した。

### 微小管の組織化

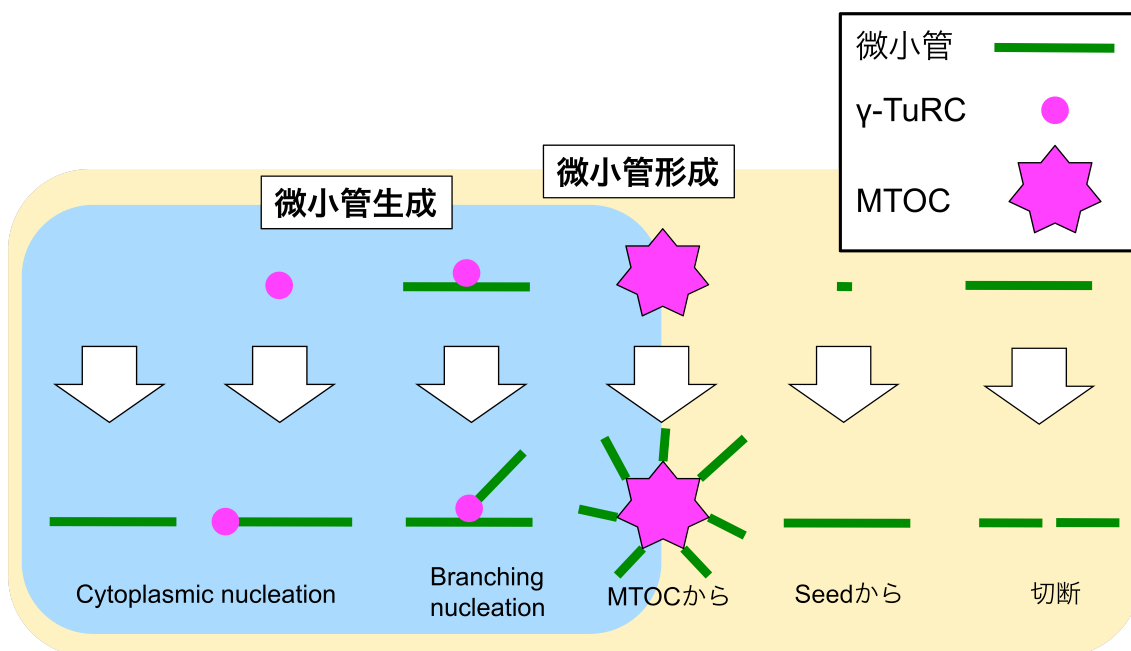
細胞内において多数の微小管がまとまった構造をとること。例えば、植物細胞の表層微小管は細胞膜直下に成長軸に対して垂直に配向された構造をとっている。また、ハエの培養細胞では、間期の微小管は細胞の中央付近から放射状に配向された構造をとっている。

### 微小管の配向

任意の物に対する微小管の方向性や微小管同士の並び方。例えば、表層微小管は成長軸に対して垂直に配向されている。微小管は極性を持つため、2本の微小管が並んだ場合には平行または逆平行の並び方となる。

### 微小管形成と微小管生成

微小管が生じること、増幅されることを微小管形成という。多くの場合、微小管は微小管形成中心から形成される。本論文では、 $\gamma$ -tubulin からの微小管形成や微小管がない場所からの微小管形成を特に微小管生成と呼ぶ。



## 結果

### 第一章 ヒメツリガネゴケにおける誘導型 RNAi 系の確立

#### 長時間イメージングによるヒメツリガネゴケ原糸体細胞の細胞分裂の観察

まず、多数の分裂する細胞を観察するために、10×対物レンズを用いて多点で3分ごとに長時間(~15時間)のタイムラプス観察を行った(図 1-1A; 動画 1)。観察には GFP-tubulin/ヒストン H2B-mRFP 発現株を用いた。カウロネマ細胞の細胞周期は6から8時間と報告されていたため(Cove, 2005)、長時間のイメージングにより2回以上の細胞分裂が観察されることを期待した。実際に、この観察条件では約5時間で分裂するカウロネマ細胞も存在し、観察中に1から3回分裂を行った。コントロール細胞の分裂は正確に一定の時間内で完了した。分裂中期に凝縮した染色体が赤道面に並ぶと、すぐに染色体分離が起こり、引き続き分離した染色体の間にフラグモプラスト形成が起こった。核膜崩壊から後期開始(染色体分離開始)までの時間は9.5分 ( $n = 103$ )であった(表 1)。

原糸体細胞の細胞分裂の各過程に要する時間は野生型では細胞間のばらつきが極めて小さかった(三木智博修士論文)。スピンドルの形成や染色体の整列に異常が起こった場合には、チェックポイント依存的な分裂遅延が起こる。そのため、この特徴は RNAi スクリーニングの際に分裂異常を検出する上で大きな利点になると考えられた。

#### ヒメツリガネゴケ原糸体細胞に対して微小管重合阻害剤 cremart が及ぼす効果

次に、微小管重合阻害剤である cremart (Doonan et al., 1988) の存在下で同様の観察を行った。Cremart 処理により、先端成長はほぼ完全に停止した(図 1-1B)。この結果は先端成長が微小管依存的であることを示している。また、スピンドルが分裂期に形成されず、凝縮した染色体が長時間(最大3時間程度)細胞内を散乱する様子が観察された(図 1-1B、+ cremart 552分、642分)。その後染色体の脱

凝縮が起こり、染色体分配に失敗した異常な核が形成された(図 1-1B、+ cremart 714 分)。これは分裂中期でチェックポイントが働き、後期への進行が抑制されたが、チェックポイントが 3 時間程度しか機能しないために起こったと考えられる。

## RNAi の有効性の確認

Bezanilla らにより、ヒメツリガネゴケにおいて RNAi の有効性が示され、クロロネマ細胞の先端成長にアクチン制御因子が必須であることが示された (Bezanilla et al., 2003)。微小管重合阻害剤である cremart を用いた実験から、微小管も原糸体の先端成長に重要であることが分かった(図 1-1B)。すでに確立されている一過的な RNAi 法により微小管制御因子が原糸体の成長に与える影響を評価できるか確かめるために、微小管ポリメラーゼ XMAP215/Dis1/MOR1 (Brouhard et al., 2008; Kinoshita et al., 2002)のノックダウンを行った(図 1-2)。ヒメツリガネゴケには XMAP215 のホモログが 2 つ存在する(*XMAP215-a*、*-b*)。用いた dsRNA 配列が標的以外の他の遺伝子発現を抑制する影響(オフターゲット)を排除するため、異なる領域を標的とした 2 つの RNAi コンストラクトを用いて独立に RNAi ノックダウンを行った(図 1-2A)。RNAi コンストラクトと遺伝子の配列の類似性は *XMAP215-a*、*-b* に対してコンストラクト 1 が 100%、89.5%、コンストラクト 2 が 89.8%、100%である。植物体の成長速度を比較するために、葉緑体の自家蛍光から推定される細胞の輪郭を用いて植物体の大きさを測定した(図 1-2B)。アクチン制御因子(ここではプロフィリンを使用した(Vidali et al., 2007))の RNAi や微小管重合阻害剤である cremart を加えた場合と同様に、XMAP215 のノックダウンによりクロロネマ細胞の成長が抑制された(図 1-2B と C、RFP RNAi はコントロールとして用いた)。このことは、ヒメツリガネゴケにおいて微小管制御因子を標的とした RNAi も可能であることに加えて、微小管制御因子が先端成長に関わっていることを示す。

## 誘導型 RNAi スクリーニング系の確立

細胞分裂はクロロネマ細胞においては 22 から 26 時間に一度しか起こらないため、前述の一過的に dsRNA を発現した細胞では観察が困難である。そこで、dsRNA を誘導的に発現できる細胞株を樹立し、細胞分裂の頻度が高いカウロネマ細胞での観察を試みた。シロイヌナズナですでに確立されていた XVE エストロゲン誘導系を導入することで誘導型 RNAi 系の確立に成功した(図 1-3 (Kubo et al., 2013; Zuo et al., 2000))。この系では、 $\beta$ -エストラジオールにより標的遺伝子と RFP 遺伝子の両方を標的とした dsRNA の転写が促進される。dsRNA は相補的な配列を持つ標的の mRNA を分解し、その結果、RFP 融合タンパク質と標的タンパク質の両方の発現が抑制される(図 1-3B)。このコンストラクトを GFP-tubulin、ヒストン H2B-mRFP を恒常的に発現している株に組み込んだ(この実験は五島剛太教授、富岡亜希子氏と共同で行った)。コンストラクトの挿入数や挿入位置は確認していないため、複数コピー組み込まれた株の存在が予想される。そこで、それぞれの形質転換体株において RNAi の効率を見積もるために、RFP 蛍光強度を当研究室で開発したコンピューターアルゴリズムを用いて定量した(藤岡竜太卒業論文)。ヒストンは安定なタンパク質であるため(Djondjurov et al., 1983)、RFP RNAi を誘導してから数日の間にヒストン H2B-mRFP の蛍光は完全には消失しないと考えた。そのため、標的タンパク質に対して RNAi が有効である期間(3-7 日)も、残存するヒストン H2B-mRFP のシグナルをもとに染色体の動きをとらえられることを期待した。

誘導型 RNAi 系の有効性を評価するために、ヒメツリガネゴケですでに機能が報告されている 2 つの遺伝子(*FtsZ* (Strepp et al., 1998)とプロフィリン(Vidali et al., 2007))を標的とする RNAi コンストラクトを作製した。PEG 法による形質転換に続き薬剤耐性による株の選抜を行った結果、前述の遺伝子に対してそれぞれ 12、14 株の RNAi 候補株が得られ、各 5 株において RFP 蛍光強度の減少が検出された(表 2; 図 1-4A、1-5A)。定量的リアルタイム逆転写-PCR (qRT-PCR)解析により、得られた *FtsZ* RNAi 株において  $\beta$ -エストラジオール依存的な mRNA 量の減少が確認された(図 1-4B)。表現型の観察から、*FtsZ*、プロフィリン RNAi 株において期待通りの表現型が現れることを確認した(図 1-4C と D、*FtsZ*: 葉緑体の分裂失敗による巨大な葉緑体の形成、図 1-5、プロフィリン: 先端成長の抑制による短い細胞の形成)。RFP 蛍光強度の平均と RNAi の表現型には相関があり、*FtsZ* RNAi



ラインでは観察した 12 株中 12 株、プロフィリン RNAi ラインでは観察した 7 株中 7 株で相関が見られた(図 1-4A、1-5A)。

次に、動物細胞においてノックダウンにより分裂異常を起こすことが報告されている 5 つの遺伝子ファミリー(XMAP215、 $\gamma$ -tubulin、GCP4/Grip75、Mis12、Aug3)を標的として RNAi コンストラクトを作製した(図 1-6)。XMAP215 は微小管ポリメラーゼであり、 $\gamma$ -tubulin と GCP4 は微小管重合核形成因子である  $\gamma$ -TuRC のサブユニットである(図 0-1A (Moritz and Agard, 2001))。Mis12 は真核生物に広く保存されたキネトコアタンパク質である(Goshima et al., 2003)。Aug3 はオーグミン複合体のサブユニットである(図 0-1B)。ヒメツリガネゴケには  $\gamma$ -tubulin と XMAP215 遺伝子が 2 つずつあり、それぞれのパラログ間で配列が良く似ていることから、重複して機能している可能性がある。そこで両方の遺伝子をノックダウンできる可能性が高いと予測される、相同性の高い領域を用いて dsRNA 配列を設計した。RNAi コンストラクトのオフターゲットによる影響を除くため、遺伝子の異なる領域を標的とした RNAi コンストラクトを GCP4、Aug3 について作製した(図 1-6)。

形質転換と薬剤耐性による選抜の結果、前述の遺伝子に対して 17 から 42 の RNAi 候補株が得られ、2 から 10 株において RFP 蛍光強度の減少が検出された(表 2)。GCP4 の RNAi 株において前述のように RFP 蛍光強度の平均と表現型の強度(分裂時間の延長、後述)の相関を調べ、11 株中 9 株で相関があった(図 2-1C)。さらに、免疫ブロットにより 61 から 81%のタンパク質量の減少または qRT-PCR により 58 から 90%の mRNA 量の減少が確認された(図 1-7、1-8)。 $\beta$ -エストラジオール非存在下でのタンパク質/mRNA 量の減少もいくつかの株で観察された(例えば  $\gamma$ -tubulin RNAi のコンストラクト 1、ライン#10)。これらの株では  $\beta$ -エストラジオールがない条件でも一定量の dsRNA が発現していることが示唆された。しかしながら、これらの株においても分裂異常は  $\beta$ -エストラジオール添加後にのみ検出された。分裂頻度の高い頂端のカウロネマ細胞では  $\beta$ -エストラジオール処理により、さらにタンパク質が減少し、より重篤な分裂異常を示すが、植物体全体を用いた免疫ブロットや qPT-PCR ではその差が検出できなかったと考えられる。

これまでに合計 9 遺伝子を試し、それぞれについて 2 株以上の独立の形質転換体株を得た(表 2)。すべての遺伝子についてタンパク質/mRNA 量の減少を直接的(8 遺伝子に対して免疫ブロットまたは qRT-PCR)または間接的(プロフィリン

遺伝子について期待された表現型の有無)に確かめた。選択した遺伝子が RNAi によるノックダウンを受けやすい遺伝子だった可能性もあるが、ここで観察された高い成功率はさらに大規模な RNAi スクリーニングが可能であることを示している。

## 第二章 ヒメツリガネゴケ原糸体細胞における分裂期微小管形成因子の機能解析

### スピンドル微小管およびフラグモプラスト微小管生成におけるオーグミン・ $\gamma$ -tubulin の機能

確立した誘導型 RNAi 系を用いてオーグミンおよび  $\gamma$ -TuRC のコケ原糸体細胞における役割を調べた。Aug3、 $\gamma$ -tubulin、GCP4 をそれぞれノックダウンした株において、長時間の生細胞観察により分裂遅延が検出された(図 2-1; 動画 2)。 $\gamma$ -Tubulin RNAi 株はノックダウン効率の異なる 2 つのライン(コンストラクト 1、ライン#10 とコンストラクト 2、ライン#24)について観察を行った。#10 株はタンパク質、mRNA とともに誘導前から減少していたが(図 1-7B、1-8A)、分裂の表現型は誘導後にのみ顕著に観察された。#24 は誘導後にタンパク質、mRNA が減少した株であった(図 1-7B、1-8A)。しかしながら、RNAi 誘導後の mRNA 量は #24 では #10 と比較して多く、これと一致して #10 は #24 に比べてより顕著な表現型が観察された。そのため、長時間イメージングの解析は #10 株を用いて行った。

コントロール株では核膜崩壊後すぐに両極性のスピンドルが形成され、続いて染色体分離、フラグモプラスト形成が起こった(図 2-1A と B; 表 1; 動画 2)。核膜崩壊から染色体分離までにかかる時間は 10 分程度であり、細胞間で大きなばらつきは見られなかった。一方、Aug3 をノックダウンした株では、9%の細胞で両極性が維持されず、長時間(2 時間以上)凝縮した染色体が細胞中に散乱した。5%の細胞では前中期での染色体整列異常および分裂遅延が観察され、染色体分離は起こるがフラグモプラスト形成が完全でなく、いったん分かれた染色体が元に戻り、細胞質分裂が失敗した様子が観察された。65%の細胞では前中期で分裂遅延( $44 \pm 29$  分)が観察されるが、その後染色体分離、フラグモプラスト形成が起こり分裂が完了した。これらの分裂異常が 2 つの重なりのない RNAi コンストラクトで観察された。

$\gamma$ -Tubulin を RNAi ノックダウンした株でも 28%で両極性スピンドルが維持されず、スピンドルの崩壊および染色体の散乱が、6%でフラグモプラスト形成異常が、38%で前中期での分裂遅延( $45 \pm 27$  分)が観察された(図 2-1A と B; 表 1; 動画 2)。GCP4 をノックダウンした場合にも、3 つの異なる RNAi コンストラクトで同様の表現型が観察された(図 2-1; 表 1; 動画 2)。 $\gamma$ -Tubulin RNAi 株において  $\beta$ -

エストラジオール非存在下ではそのような分裂異常は見られず、RNAi 耐性の  $\gamma$ -tubulin-*b* 遺伝子(dsRNA の標的配列をアミノ酸配列が変わらないように変えた)を  $\gamma$ -tubulin RNAi 株で強制発現することにより、表現型が部分的にレスキューされた(図 2-2; 表 1)。これらの結果は観察された表現型が RNAi のオフターゲットによるものではなく、 $\gamma$ -tubulin のノックダウンにより起こったことを示している。また、 $\gamma$ -tubulin と GCP4 のノックダウンで同様の表現型が得られたことは、ヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞の細胞分裂では  $\gamma$ -tubulin が GCP4 を含む  $\gamma$ -TuRC として専ら機能している可能性を示している。これは  $\gamma$ -tubulin は含むが GCP4 は含まない  $\gamma$ -TuSC が機能を持つショウジョウバエとは異なる(Verollet et al., 2006)。さらに、Aug3 と  $\gamma$ -TuRC サブユニットのノックダウンで同様の表現型が得られたことは、オーグミンと  $\gamma$ -TuRC が同じ経路でスピンドル形成に寄与していることを示している(詳細は後述する)。

次に、スピニングディスク型共焦点蛍光顕微鏡を用いて三次元での生細胞観察を行った(三木智博氏と共同で行った; 図 2-3; 動画 3)。分裂前期から核膜崩壊直前にかけて、コントロール、Aug3 RNAi 株の両方において、微小管は核膜周辺に徐々に集積した。核膜崩壊直後では、コントロール細胞において微小管の非対称性が観察された(図 2-3A、NEBD)。最初の 3 分では、スピンドル微小管は原糸体の先端側に多かった(図 2-3A)。染色体は最初投網のような形の微小管ネットワークに包まれ、その後微小管の分布は徐々に均等になり、核膜崩壊後 10 分以内に両極性のスピンドルが形成された(図 2-3A; 三木智博修士論文)。このスピンドルの形態変化は Aug3 のノックダウン細胞においても観察された(図 2-3B)。しかしながら、分裂前中期の初期段階(0-4 分)において、Aug3 をノックダウンした細胞ではコントロール細胞で観察された微小管の蛍光強度の急激な増加が観察されなかった(図 2-3B、NEBD-4 分)。核膜崩壊から 8 分後では、コントロール細胞では観察した 5 細胞すべてにおいて染色体は赤道面上に整列していた。一方、Aug3 を RNAi した細胞では観察した 7 細胞中 6 細胞において染色体の整列異常が確認された(図 2-3B、矢尻)。さらに、両極性の中期スピンドルの長さは 50%長くなっていた(表 1; 撮影および解析は三木智博氏が行った)。GCP4 をノックダウンした株でも Aug3 RNAi と同様に核膜崩壊後に微小管蛍光強度が増加せず、染色体の整列異常と長いスピンドルが観察された(図 2-3C; 表 1)。実際に、中期スピンドルにおいて微小管の蛍光強度を測定したところ、Aug3 RNAi、GCP4 RNAi 細胞ではコントロール細胞に比べて微小管蛍光強度が低かった(図 2-3D)。

しかしながら、Aug3 RNAi の場合とは異なり、GCP4 を RNAi した細胞では核膜崩壊前の核周辺の微小管蛍光強度がコントロールに比べて低かった。このことは、 $\gamma$ -TuRC が間期や分裂前期におけるオーグミン非依存的な微小管生成に必要であることを示している(図 2-3A-C)。

微小管生成におけるオーグミンの必要性を調べるために、オーグミンノックダウン細胞において  $\gamma$ -tubulin の免疫染色を行った。Aug3 RNAi 細胞ではスピンドル微小管上への  $\gamma$ -tubulin の局在が減少した(図 2-4)。これらの結果は分裂前中期でオーグミンが  $\gamma$ -tubulin のスピンドル上へのリクルートに関わっていること、 $\gamma$ -tubulin を介したスピンドル微小管生成に重要であることを示している。

**オーグミン依存的な機構は主にフラグモプラスト微小管生成に寄与している**

コントロール細胞では核膜崩壊後約 10 分で姉妹染色分体の分離が起こり、その後キネトコア微小管の脱重合により中央領域の微小管の蛍光強度は減少した(図 2-5A、0-2 分; 動画 4)。しかし、すぐに分離した染色体の中間にフラグモプラスト微小管が現れ、細胞板の形成を伴ってリング型の構造が拡張する様子が観察された(図 2-5A、9-27 分; 動画 5)。これに対し、Aug3 を RNAi した細胞では細胞質分裂初期の中央領域を除き、細胞質分裂を通して微小管蛍光強度が減少した(図 2-5B、5-19 分)。分裂後期開始前から微小管が少なかったことが原因の一つとして考えられる。コントロール細胞のフラグモプラスト形成過程で微小管の蛍光強度が増加した(図 2-5A、1-9 分)ことは、この段階で新たな微小管生成が起こっており、この過程にオーグミンが中心的に働いていることを示唆する。この解釈と一致して、Aug3 RNAi 細胞ではフラグモプラスト微小管の蛍光強度はフラグモプラストが側面の細胞壁に到達する前に減少し(図 2-5B、19-29 分; 動画 4)、その後消失した。Aug3 のノックダウン細胞におけるフラグモプラスト微小管の増加異常はスピンドルの両極性が維持されたまま後期に進行した 12 細胞中 8 細胞で観察された。分裂後期に進行した細胞は分裂後期以前にスピンドル崩壊を起こした細胞よりも RNAi 後の残存するオーグミン量が多かったと仮定すれば、このデータはフラグモプラスト微小管の形成はオーグミン量の影響を強く受けることを示唆している。このことからオーグミンが細胞分裂後

期以降の微小管生成にきわめて重要な役割を果たしていると結論づけた。

$\gamma$ -Tubulin ノックダウン細胞においても Aug3 RNAi と同様の表現型が観察された(図 2-5C)。姉妹染色分体の分離後、中央領域においてフラグモプラスト微小管の顕著な増加は起こらなかった。フラグモプラストの拡張も起こらず、フラグモプラスト微小管は徐々に減少し、最終的に消失した(図 2-5C; 動画 4)。 $\gamma$ -Tubulin と Aug3 のノックダウンにより同じ表現型が得られたことは、フラグモプラスト形成においてオーグミンと  $\gamma$ -TuRC が同じ経路で働いている可能性を強く示唆している。

### オーグミンと $\gamma$ -TuRC の分裂期の局在

分裂期における  $\gamma$ -TuRC とオーグミンの機能を調べるために、局在解析を行った。 $\gamma$ -Tubulin とオーグミン複合体サブユニット Aug2/CEP27 に対する抗体を用いた免疫染色により、 $\gamma$ -TuRC とオーグミンの局在を調べたところ、分裂期スピンドル全体に点状のシグナルが検出された(図 2-6)。さらに、分裂後期では  $\gamma$ -tubulin が染色体分離後の中間領域へ局在し、その後の細胞質分裂の段階でフラグモプラスト全体への局在が観察された。次に、ヒメツリガネゴケの高い相同組換え効率を利用し、内在性のタンパク質の局在を生細胞観察により調べた。 $\gamma$ -Tubulin-b (TubG2)とオーグミン複合体サブユニット Aug4/C14orf94 のカルボキシル末端に Citrine を付加した(図 2-7A)。相同組換えが正しく行われていることはサザンブロットと免疫ブロットにより確認した(図 2-7B と C)。免疫染色から得られた結果と同様に、分裂期スピンドルおよびフラグモプラスト全体への局在が観察された(図 2-8; 撮影は三木智博氏が行った)。後期の初期には染色体が分離した後の中央領域への強い局在も認められた。この局在パターンは  $\gamma$ -tubulin やオーグミンが極付近に多く局在するヒト体細胞や、オーグミンが極に集中するハエの減数分裂期とは異なっていた(Lecland and Luders, 2014; Meireles et al., 2009; Uehara et al., 2009)。Aug3 RNAi でスピンドル上の  $\gamma$ -tubulin が減少していたことと合わせると、オーグミンと  $\gamma$ -TuRC が前中期から細胞質分裂の完了までの間、スピンドルおよびフラグモプラスト内において分裂期微小管の生成に協働して働いている可能性が示唆された。

### 第三章 ヒメツリガネゴケにおける間期微小管形成機構

ヒメツリガネゴケ原糸体細胞の **endoplasmic** 微小管では 3 種類の微小管形成機構が観察される

間期における微小管形成機構を調べるために、まずスピニングディスク型共焦点蛍光顕微鏡を用いて原糸体細胞の **endoplasmic** 微小管を観察した。共焦点蛍光顕微鏡による観察は顕花植物を用いた微小管生成の可視化に中心的に用いられてきた方法である(Lindeboom et al., 2013b; Murata et al., 2005; Nakamura and Hashimoto, 2009; Zhang et al., 2013)。しかしながら、自家蛍光によるバックグラウンドが高いため、鮮明な画像が得られなかった。そこで、斜光照明蛍光顕微鏡法(oblique illumination fluorescence microscopy)という、傾けた薄層状の光を細胞の限られた領域に照射することで背景光を抑え、鮮明な画像を得ることができる方法を取り入れた(Konopka and Bednarek, 2008; Tokunaga et al., 2008)。全反射蛍光顕微鏡法(total internal reflection fluorescence microscopy; TIRFM)では光を全反射させた際に生じるエバネッセント光を用いる。エバネッセント光の強さはガラス面から指数関数的に減少するためガラス面から 300 nm 以下の狭い範囲の観察に適している。これに対し、斜光照明蛍光顕微鏡法は全反射しない条件で行うため、細胞壁があるために原形質がガラス面から遠い植物細胞の観察に適している。斜光照明蛍光顕微鏡法を用いることにより、1 本 1 本の **endoplasmic** 微小管のダイナミクスを鮮明に可視化することが可能となった(図 3-1; 動画 6)。

次に、微小管生成過程における  $\gamma$ -tubulin の局在を調べるために、内在性の  $\gamma$ -tubulin に Citrine を付加した株を作成した(図 3-2)。微小管の局在を同時に観察するために、mCherry- $\alpha$ -tubulin を発現した株を親株とし、相同組換えにより  $\gamma$ -tubulin-b (TubG2)のカルボキシル末端に Citrine を付加し、 $\gamma$ -tubulin-b-Citrine 株を得た。さらに、得られた株を親株とし、 $\gamma$ -tubulin-a (TubG1)を相同組換えにより欠損させた。これにより、細胞内のすべての  $\gamma$ -tubulin タンパク質が Citrine で標識されていることになる。免疫ブロットにより、発現しているすべての  $\gamma$ -tubulin に Citrine が付加されていることを確認した(図 3-2C)。取得した mCherry- $\alpha$ -tubulin/ $\gamma$ -tubulin-b-Citrine/ $\gamma$ -tubulin-a $\Delta$  株の原糸体および茎葉体が野生型と遜色なく生育したことは、少なくともこの培養条件では Citrine を付加した

$\gamma$ -tubulin は機能的であることを示している(図 3-2D)。

3 秒ごとに 10–12 分間撮影した 28 以上の細胞を観察し、3 種類の微小管形成モードを同定した。①微小管の切断、②微小管の側面からの微小管生成(branching nucleation)、③細胞質からの微小管生成(cytoplasmic nucleation)である。以下にそれぞれの微小管形成モードについて記述する。

#### ①カタニン依存的な微小管切断

一つ目は微小管の切断(severing)である。1 本の微小管が側面から切断され、2 本の微小管になる様子が観察された(図 3-3A; 動画 7)。微小管切断により生じたマイナス端のうち 76%は安定化されるかゆっくりと脱重合( $<1.5 \mu\text{m}/\text{分}$ ,  $n = 47$ )し、残りの 24%のマイナス端は速い速度で脱重合した( $>1.5 \mu\text{m}/\text{分}$ ,  $n = 15$ )。時にはトレッドミル(プラス端の伸長とマイナス端の短縮が同時に起こり、見た目上微小管が移動しているように見える状態)をする微小管も観察された。一方で、切断された微小管プラス端の大部分はまず脱重合した。22%の確率で短縮から伸長への転換(rescue)が起こり、再び伸長が起こる様子が観察された。残りの 78%の微小管のうち、大部分は観察範囲もしくは観察面から消え、一部は観察範囲内で完全に脱重合した。このことは、限定的ながら、微小管切断が微小管増幅に寄与することを示唆する。

しかし、微小管の切断は後述する他の微小管形成モードに比べて観察される頻度が低かった(28 細胞中 63 イベント)。カタニンは表層微小管において、微小管切断を行う主要なタンパク質であることから(Lindeboom et al., 2013b; Zhang et al., 2013)、ヒメツリガネゴケで観察された微小管切断にもカタニンが関わっていると推測した。そこでカタニン p60 サブユニットの 2 つのパラログ遺伝子(*p60-a*、*-b*)の欠損株を作製した(図 3-3B–D)。得られたカタニン *p60* 二重欠損株の原糸体細胞 10 細胞を観察した限りでは、微小管の切断は観察されなかった。この結果は、野生型で観察された微小管切断がカタニン依存であることを示している。次に、カタニン p60 の欠損がカウロネマ先端細胞の分裂と先端成長に与える影響を調べた。この 2 つのイベントには微小管が必要であり、微小管阻害剤や微小管のダイナミクスに関わる遺伝子の欠損により異常をきたすことがこれまでの観察から明らかとなっている(Doonan et al., 1985; Doonan et al., 1988; Hiwatashi et al., 2014)。観察の結果、分裂前中期–分裂中期の時間が少し長くなっていること(核膜崩壊から分裂後期開始までの時間が、コントロールでは 8.0 分 [ $n = 10$ ])



だったのに対し、カタニン p60 二重欠損株では 10.7 分 [ $n = 10$  ]、先端成長の速度が若干低下していること(図 3-4A)が分かった。しかしながら、免疫染色からは微小管の配向にカタニン p60 欠損の影響は認められなかった(図 3-5)。これらの結果は、原糸体細胞ではカタニン依存的な微小管切断は微小管増加に対して限定的にしか貢献していないという仮説と一致している。

一方で、茎葉体の形態には重篤な異常が認められた。カタニン *p60-b* のみを欠損させた場合には野生型と差は認められなかったが、カタニン p60 二重欠損株では茎葉体の葉は小さくなり、個々の細胞は異常に膨らんだ形であった(図 3-4B-D)。カタニン p60 の欠損による微小管への影響を調べるために、茎葉体で発現する GFP-tubulin (EF1- $\alpha$  プロモーターにより発現させた)を組み込んだ新たな形質転換体を取得し、スピニングディスク型共焦点蛍光顕微鏡を用いて茎葉体の微小管を観察した。GFP-tubulin の z-スタックの最高輝度プロジェクション画像において、コントロールの細胞では長軸方向に対して垂直に配向された微小管が観察されたのに対し、p60 を欠損した細胞では微小管の配向は無秩序であった(図 3-4D)。この結果はシロイヌナズナのカタニン p60 変異体で観察された表現型と一致している(Burk et al., 2001)。さらに、茎葉体で微小管切断が起こっているかを斜光照明蛍光顕微鏡法により評価した。コントロール株では、6つの茎葉体細胞で 34 の微小管切断イベントが観察されたが、カタニン p60 を欠損した茎葉体細胞では、8 細胞を観察しても微小管切断は 1 ヶ所しか観察されなかった(データは示さない)。この結果は、茎葉体においてカタニン依存的な微小管切断が活発に起こっていることを示唆している。

これらの結果に基づき、カタニン依存的な微小管切断がコケ植物における微小管形成に機能していることが結論づけられた。しかしながら、カタニンの寄与の度合いは原糸体細胞(比較的少ない)と茎葉体細胞(大きい)で異なるようである。

## ②Branching nucleation

二つ目は、branching nucleation (microtubule-dependent microtubule nucleation)と呼ばれる、既存の微小管の側面から新たな微小管が生成されるモードである(図 3-6A; 動画 8; 28 細胞中 182 イベント)。 $\gamma$ -Tubulin-Citrine はほとんどの場合において微小管生成箇所と共局在した(図 3-6E)。シロイヌナズナやタバコの表層微小管において、微小管の branching nucleation は  $0^\circ$  または  $40^\circ$  にピークを持って観察

される(Fishel and Dixit, 2013; Lindeboom et al., 2013a; Murata et al., 2005; Nakamura et al., 2010; Nakamura and Hashimoto, 2009; Wasteney and Ambrose, 2009)。ヒメツリガネゴケ原糸体細胞でも同じ様式で形成されているかを調べるために、母微小管と娘微小管の間の角度を 2 次元で計測した。表層微小管と同様に、 $0^\circ$ の branching nucleation(平行な生成: 11%)や  $20^\circ$ – $60^\circ$ の角度の branching nucleation (36%)が観察された(図 3-6A、C、D)。一方で、 $90^\circ$ 以上を含む様々な角度の branching nucleation も観察された(図 3-6D; 2本の微小管の交差と branching を明確に区別することが難しいため、 $0^\circ$ 、 $180^\circ$ 、 $90^\circ$ 付近の branching の割合は低く見積もられている可能性がある)。この結果は、原糸体細胞の母微小管と娘微小管の間の角度は表層微小管に比べて多様であることを示している。

まれに branching した微小管の branching 部位が固定されておらず、娘微小管が母微小管に沿って動く様子が観察された(9.3%,  $n = 182$  branching イベント; 図 3-6B; 動画 8)。Branching 部位は  $2.6 \mu\text{m}/\text{分}$  ( $n = 17$ )の速度で移動した。母微小管の極性が同定できた 14 例中 13 例において、娘微小管は母微小管をマイナス端方向へと移動した。このことはマイナス端方向モータータンパク質による娘微小管の輸送を示唆している。この動きはヒトのスピンドルや植物のフラグモプラストで観察された娘微小管のマイナス端に結合した  $\gamma$ -tubulin の母微小管に沿ったスピンドル極方向への移動を思い起こさせる(図 3-7 (Lecland and Luders, 2014; Murata et al., 2013))。興味深いことに、マイナス端方向に移動した 13 例中 11 例では移動後に娘微小管と母微小管の角度が小さくなった(図 3-7)。このことは娘微小管の輸送が微小管の配向を平行に近づけるメカニズムの一つである可能性を示唆する。このような娘微小管の動きは表層微小管では報告されていない。

表層微小管の branching nucleation では、娘微小管はマイナス端付近がカタニンに切断されることで母微小管から離れる(Nakamura et al., 2010)。原糸体細胞において娘微小管の母微小管からの切り離し機構と、カタニンがこの過程に関わっているかを調べた。 $\gamma$ -Tubulin-b-Citrine/mCherry- $\alpha$ -tubulin 株を用い、33 の娘微小管の状態を生成から最大 12 分間追跡した。生成後の娘微小管の振る舞いは 3 種類に分類された(図 3-6E)。21 例では娘微小管は母微小管の脱重合により細胞質へと切り離された(上段)。12 例では母微小管が残っている状態で、娘微小管は完全に脱重合した(中段)。残りの 3 例では娘微小管は母微小管が残っている状態で切り離された。しかしながら、この切り離しの過程で、明確な微小管切断

は認められなかった。むしろ、娘微小管全体が  $\gamma$ -tubulin と同時に nucleation 部位から離れた(下段; 動画 9、78 秒; 微小管の解離と同時に  $\gamma$ -tubulin シグナルが移動した)。同様にカタニン p60 二重欠損株において娘微小管の振る舞いを観察した。追跡した 30 例の娘微小管のうち、20 例は母微小管の脱重合により切り離され、9 例では娘微小管は切り離されることなく完全に脱重合した。母微小管からの娘微小管の解離は 1 例のみ観察された。この組換え体では  $\gamma$ -tubulin は可視化していないが、総合的に見ると娘微小管の解離にカタニンの関与はほとんどなく、仮にあったとしてもごく僅かであることが強く示唆された。これらの結果は、ヒメツリガネゴケの原糸体細胞では娘微小管の切り離しは主に母微小管の脱重合によって起こっていることを示している。

以上の結果は、ヒメツリガネゴケの原糸体細胞では顕花植物の表層微小管とは異なった様式の branching nucleation を起こしていることを示している。

### ③Cytoplasmic nucleation

三つ目のモードとして、細胞質の微小管がない様々な場所から新たな微小管が現れる様子を観察した(図 3-8; 28 細胞で 310 イベント)。これを「cytoplasmic nucleation (細胞質からの微小管生成)」と名付けた。このモードでは、まず点状の GFP-tubulin シグナルが現れ、1 本の微小管へと伸長した(図 3-8; 動画 10)。一つの可能性として、観察された点状の GFP-tubulin が焦点面の外側から現れた伸長中の微小管のプラス端であると解釈することもできる。本研究では、図 3-9 で示した基準を用いて微小管生成イベントを判断した。点状の GFP-tubulin が観察された時、観察されたシグナルが焦点面外から伸長した微小管のプラス端ではないかに特に注意した。次の条件を満たした時に、焦点面で生成した微小管断片であると判断した。①点状のシグナルが 2 次元に拡散する動きを示した時は(図 3-9A)、長い微小管のプラス端ではこのような動きは認められないため(図 3-9B)、微小管生成だと判断した。②拡散的な動きが認められなかった場合でも、微小管断片の両端の GFP 蛍光強度が急激に減少していた場合は、新しく生成された短い微小管断片であると判断した(図 3-9A)。一方で、短い微小管断片の GFP 蛍光強度の低下が片側のみ緩やかだった場合は、焦点面の外側から伸長した微小管のプラス端だと判断した(図 3-9B)。この基準と一致して、 $\gamma$ -tubulin と微小管を同時に観察した場合、 $\gamma$ -tubulin が局在する mCherry- $\alpha$ -tubulin の短い微小管断片の両側の蛍光強度は急激に減少していた(図 3-9C)。

$\gamma$ -Tubulin-b-Citrine/mCherry- $\alpha$ -tubulin 株において、cytoplasmic nucleation の 96% は  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine の点から起こった(図 3-8B)。 $\gamma$ -Tubulin-b-Citrine のシグナルのうち 51%は微小管が完全に脱重合するまで継続して微小管末端に観察された( $n = 33$ ; 図 3-8B、上段)。残りの 49%では、 $\gamma$ -tubulin は微小管生成から平均 2 分後に微小管のマイナス端から解離した( $n = 32$ )。  $\gamma$ -Tubulin の解離後、47%のマイナス端は脱重合し(下段)、53%のマイナス端は安定化もしくはゆっくりと脱重合した(中段)。

### 微小管形成可視化アッセイの確立

通常培養した細胞(微小管重合阻害剤未処理)の endoplasmic 微小管は量が非常に多く、すべての微小管形成イベントを同定できないため、各微小管形成モードの頻度を正確に決定することは困難であった。そこで、すべての微小管形成イベントを検出し、微小管ダイナミクスのパラメーターを定量するため、薬剤により微小管を完全に脱重合させた後に薬剤除去を行う微小管脱重合-再形成 (regrowth)アッセイ(以下 regrowth アッセイ)を用いて微小管形成過程を評価した(図 3-10)。

この実験では微小管を完全に脱重合する必要がある。以前のタバコ BY-2 細胞やシロイヌナズナを用いた研究では、高濃度の微小管重合阻害剤(20  $\mu$ M oryzalin)で処理し、GFP-tubulin シグナルが消失した後も微小管の「seed」が残っていることが示唆されている(Lindeboom et al., 2013a)。そこで、seed を残さず、完全に微小管を脱重合できる薬剤を決定するために 3 種類の微小管重合阻害剤、propyzamide、cremart、oryzalin を用いて微小管 regrowth アッセイを行った。すべての薬剤において、GFP-tubulin シグナルの消失が確認された(図 3-11A)。しかしながら、Citrine を付加した微小管ポリメラーゼ XMAP215 (微小管の端と側面に結合)を観察したところ、propyzamide 処理後に XMAP215-a-Citrine の鮮明な点状のシグナルが観察された。わずかだが cremart 処理後にも観察された(図 3-11A)。一方で、oryzalin 処理の場合には XMAP215-a-Citrine シグナルは完全に消失した(図 3-11A)。この結果は、propyzamide や cremart 処理後には、微小管の「seed」が残っているが、oryzalin 処理後には完全に消失したと解釈できる。Propyzamide 処理では薬剤除去後の微小管再形成が oryzalin 処理の場合よりも早期に起こ

た(propyzamide 処理では 1-2 分だったのに対し、oryzalin 処理後は 4-6 分だった)ことは、この解釈と一致している(図 3-11B)。

この予備実験の結果を踏まえ、GFP-tubulin を発現する原糸体細胞を高濃度の oryzalin で処理し、微小管の消失を確認した後、培地を薬剤が入っていないものに交換することにより oryzalin を除去し、微小管の再形成過程を斜光照明蛍光顕微鏡法により観察した(図 3-10A)。サンプルの作製法は図 3-12 に記載した。薬剤除去後 4-6 分で微小管が再び現れた(図 3-10B; 動画 11)。微小管重合阻害剤未処理の細胞と同様に、明るい GFP の点状のシグナルが最初に現れ、続いて 1 本の微小管へと伸長した。薬剤除去開始から 7 分後までは新たな微小管の大部分は cytoplasmic nucleation により生成され (87%; 28 細胞、121 イベント)、branching nucleation による生成は少なかった(13%)。さらに、*in vitro* 実験でのオーグミン依存的な微小管の増幅において観察されたような、扇形の微小管増幅はほとんど観察されなかった(Petry et al., 2013)。まれに、oryzalin 除去後も安定化された微小管が残っていることがあった。しかしながら、これらの場合でも cytoplasmic nucleation は残存する微小管からの branching nucleation より高い割合で観察された(図 3-10C; 動画 12)。微小管の切断は微小管再形成の初期段階では全く観察されなかった。これらの結果から、この実験系では cytoplasmic nucleation が最初の微小管形成の主要なモードであると結論づけた。

Regrowth アッセイにより微小管再形成ダイナミクスを評価できるか確かめるために、低濃度の微小管重合阻害剤を含む培地を用いて高濃度の微小管重合阻害剤の除去を行った。低濃度の微小管重合阻害剤は脱重合を促進し、微小管形成を抑制することが期待される。2  $\mu\text{M}$  oryzalin 入りの培地を用いて 20  $\mu\text{M}$  oryzalin を除去したところ、微小管再形成に遅延が認められた(図 3-10D)。これにより、この系を用いた微小管生成に関わる因子の探索が可能であることが確かめられた。

## 微小管は特定の細胞小器官から生成されているわけではない

ゴルジ体やミトコンドリア、葉緑体が MTOC として機能することが知られている。そこで、観察された細胞質からの微小管生成が実際には特定の細胞小器官から起こっている可能性を調べるために、GFP-tubulin と mCherry (または RFP)

を付加した細胞小器官マーカー(ペルオキシソーム、ミトコンドリア、ゴルジ体、ER)を発現した形質転換体を作製した。得られた株を用いて regrowth アッセイを行ったところ、細胞小器官の近くから生成された微小管もあったが、細胞小器官から離れた位置からの生成イベントも多く観察された(図 3-13; 動画 13)。これらのデータは微小管の生成は特定の細胞小器官から起こるわけではないことを示している。

### **$\gamma$ -Tubulin は効率的な微小管生成に必要である**

微小管生成に関わる可能性のある因子の能力を評価するために、いくつかの RNAi 株や遺伝子欠損株に対して regrowth アッセイを行った(図 3-15)。 $\gamma$ -Tubulin は他のサブユニットとともに大きな複合体( $\gamma$ -TuRC)を形成しており、すべての細胞型、細胞周期において主要な微小管重合核形成因子として働いている(Moritz and Agard, 2001)。オーグミンは  $\gamma$ -tubulin をスピンドルやフラグモプラストの微小管上にリクルートすることで、微小管生成に関わる。ヒメツリガネゴケの原系体細胞では、オーグミン- $\gamma$ -tubulin の機構はスピンドルやフラグモプラスト微小管の生成に主要な役割を果たしている(図 2-2、2-3)。XMAP215 は主要な微小管ポリメラーゼであり、少なくとも *in vitro* では微小管の形成中心として働く(Popov et al., 2002)。オーグミン、 $\gamma$ -tubulin、XMAP215 の機能は第一章、第二章で作製した RNAi 株を、カタニンの機能は前述のカタニン p60 二重変異体を用いて評価した。

RNAi は 12-17 日間誘導し、RNAi ノックダウンの効率は細胞の成長(XMAP215) やスピンドルの長さ( $\gamma$ -tubulin と Aug3)で評価した。RNAi が効いていることを確認したサンプルについて oryzalin を用いた regrowth アッセイを行った。薬剤除去後 1 分ごとに微小管数を定量したところ、微小管再形成は  $\gamma$ -tubulin RNAi により著しく遅れたが、他の因子のノックダウンでは変化しなかった(図 3-14)。コントロールと同様に、各 RNAi 株における最初の微小管生成の大部分は cytoplasmic nucleation であった。この結果から原系体細胞では  $\gamma$ -tubulin は cytoplasmic nucleation の主要な因子であるが、カタニンによる微小管の切断は微小管の増幅にほとんど関わっていないと結論づけた。また、間期の微小管増幅の機能には残存するタンパク質量で十分な可能性もあるが、オーグミンや XMAP215 は原系

体細胞でのゼロからの微小管生成に重要ではない可能性が強く示唆された。

### **$\gamma$ -Tubulin は大部分の微小管生成箇所に局在する**

$\gamma$ -Tubulin のシグナルは大部分の微小管生成箇所に認められた。しかしながら、通常の培養条件で観察した細胞(微小管重合阻害剤未処理)では微小管量が多く、すべての微小管生成イベントの同定が困難である。また、微小管がない状態での  $\gamma$ -tubulin の局在解析も行えない。そこでまず、*oryzalin* 存在下で  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine の局在観察を行った(動画 14)。興味深いことに、点状の  $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルは撮影範囲全体に観察され、大部分の点状シグナルの蛍光強度は同程度だった。これはマウスの卵で観察される MTOC やヒトの上皮細胞で観察されるゴルジ体からの微小管生成とは異なる(Efimov et al., 2007; Schuh and Ellenberg, 2007)。短い間隔(~0.2 秒)で撮影したところ、細胞質中を拡散していると考えられる動くシグナルや(図 3-15A、黒矢尻)、何かの構造体に固定されていると考えられる 20 秒以上にわたって動かないシグナルが観察された(図 3-15A、青矢尻; 動画 14)。

続いて、*oryzalin* を除去し 3 秒ごとに微小管の再形成過程を撮影した(図 3-15B; 動画 15)。予想通り、mCherry- $\alpha$ -tubulin で標識された微小管が cytoplasmic nucleation により生成された。12 分間の撮影の間、大部分の cytoplasmic nucleation は  $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルとの共局在が観察されたが(82%,  $n = 148$ )、すべての  $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルが mCherry-tubulin のシグナルと共局在するわけではなかった。一方で、全体の微小管生成イベントのうち 18%は  $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルが検出できなかった(図 3-15B 右)。Branching nucleation については、 $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルは 18 例中 17 例で共局在しており、ほとんどの branching nucleation も  $\gamma$ -tubulin 依存的であることを示唆している。

数理モデルによると **regrowth** アッセイにおける微小管ダイナミクスの再現には 3 種類の微小管形成モードで十分である

次に、数理モデルを用いて、観察された 3 つの微小管形成モードが **regrowth**

アッセイで測定した微小管の増加を説明できるかを調べた。このために、3種の微小管形成モードを含む11個の固定されていないパラメーターを用いて微小管再形成の変化を示す数理モデルを構築した(図 3-16A; 表 3、4; 数理モデルの構築および解析は木村暁博士が行った。実験データは申請者が解析した)。次に、微小管再形成の結果をよく模倣するパラメーターセットの探索を行った(パラメーターセットの探索は木村暁博士が行った)。微小管 regrowth アッセイの結果を再現する31セットのパラメーターを独立に得(図 3-16B)、これら31セット中9セットのパラメーターにおいて、cytoplasmic nucleation が他の2つの形成モードと比較して主要な微小管形成モードであった(図 3-16B)。細胞内では cytoplasmic nucleation が主要な微小管形成モードであるため、これら9セットを選んでこれ以降の解析に使用した(図 3-17A)。

得られたパラメーターの妥当性を評価するために、9セットのパラメーターを用いて微小管の伸長・短縮速度の平均値を予測した(図 3-17B; パラメーター値の推定は木村暁博士が行った)。実験的に測定した伸長速度は  $0.093 \mu\text{m}/\text{秒}$  [ $n = 30$ ]、短縮速度は  $0.39 \mu\text{m}/\text{秒}$  [ $n = 30$ ]であり、推定されたパラメータ値のオーダーと一致した(図 3-17B、赤棒: 実験データ、円: 予測されたパラメータ値、黒棒: 予測されたパラメータ値の平均; 表 5)。In vivo の結果と数理モデルで得られた値が近かったことは、3つの微小管形成モードが微小管再形成のデータを説明するのに十分であることを示唆している。

### 通常の状態の細胞における微小管生成には $\gamma$ -tubulin やオーグミンは必要ではない可能性がある

微小管 regrowth アッセイは人工的な実験系であり、通常培養条件の原糸体細胞の状態(微小管重合阻害剤未処理)を表しているわけではない。そこで、 $\gamma$ -tubulin やオーグミンのノックダウンが微小管生成と微小管切断に与える影響を微小管重合阻害剤未処理の細胞で調べた。意外なことに、 $\gamma$ -tubulin やオーグミンをノックダウンしても微小管形成モードや頻度に明らかな影響は認められなかった(表 6、7)。Branching の角度の分布にも明らかな違いは認められなかった(図 3-18; p 値は 0.2 以上、Mann-Whitney U-test)。RNAi が誘導されていることは、実験前に同じサンプルで紡錘体の形態異常の有無を観察することにより確認し



た。この結果は、免疫染色により頂端細胞において endoplasmic 微小管の微小管量の減少や配向異常が検出されなかった結果(図 3-5B と C)と一致している。微小管 regrowth アッセイの結果と合わせて考えると、 $\gamma$ -tubulin は効率的に微小管を生成するため、存在した時には  $\gamma$ -tubulin 依存的に大部分の微小管が生成されるものの、 $\gamma$ -tubulin 非依存的な微小管生成機構も存在するため、 $\gamma$ -tubulin 依存的な微小管生成は endoplasmic 微小管の生成に必須なわけではないことを示唆している。

## 考察

本研究はヒメツリガネゴケの原糸体細胞を用いて、分裂装置を構成する微小管および間期の endoplasmic 微小管の微小管生成機構を明らかにすることを目的とした。まずヒメツリガネゴケにおいて誘導型 RNAi 系を確立し、高解像度での生細胞観察と遺伝子の発現抑制を組み合わせた実験を行った。次に、確立した誘導型 RNAi 系を用いて、分裂期のスピンドルおよびフラグモプラストの微小管形成に  $\gamma$ -tubulin とオーグミンが重要な役割を果たしていることを明らかにし、オーグミンが  $\gamma$ -tubulin のスピンドル上への局在化に必要であることを示した。さらに、間期の原糸体細胞の endoplasmic 微小管の形成には 3 種類の微小管形成モードが関わっていることを示し、 $\gamma$ -tubulin は微小管生成に中心的な役割を果たすが、 $\gamma$ -tubulin 以外の未知の機構が存在する可能性も示唆された。確立した RNAi 系の有効性とヒメツリガネゴケ原糸体細胞での分裂期および間期の微小管生成機構を他のシステムと比較しながら考察する。

## 第一章 ヒメツリガネゴケにおける誘導型 RNAi 系の確立

### 誘導型 RNAi 系の有用性

本研究で確立された誘導型 RNAi 系はヒメツリガネゴケにおける細胞分裂や微小管生成を制御する分子の同定に利用可能であり、植物細胞と動物細胞における細胞分裂機構や微小管形成機構の共通性や独自性の理解につながると期待される。また、誘導型 RNAi 系は誘導型 RNAi コンストラクトが作成できれば、一般的な安定株の選抜手順により 6 週間ほどで RNAi 候補株を得ることができる。一度株を得ることができれば、培地に  $\beta$ -エストラジオールを添加するだけで容易に dsRNA を誘導できる。それゆえ、この系は高解像度イメージングや生化学的な実験にも利用可能である。さらに、重複した遺伝子が存在する場合も、dsRNA の標的配列を相同性の高い領域に設計するか、各パラログ遺伝子の部分配列を結合した dsRNA を作成することで同時にノックダウンできるため、重複した遺伝子の解析にも適している。実際に、この誘導型 RNAi 系を用いて kinesin ファミリーの RNAi スクリーニングが行われた(Miki et al., 2015)。この研究では

ヒメツリガネゴケの全 kinesin、78 遺伝子のうち、61 遺伝子について RNAi コンストラクトを作成し、RNAi 株を得た。長時間イメージングにより、いくつかの遺伝子で興味深い表現型が得られている。このような大規模スクリーニングを短期間で行うことは他の植物システムでは困難である。さらに、遺伝子が 4 つ存在する kinesin-5 や 3 つ存在する kinesin 7-II、5 つのうち 3 つが主として原糸体細胞で発現している MAP65 についても有効であった(Kosetsu et al., 2013; Miki et al., 2014; Naito and Goshima, 2015)。この点で、この系は細胞生物学的に一般的な動物培養細胞と同様に扱いやすいと言える。

本研究では得られた RNAi 株のプラスミドの挿入数や挿入位置を確認していないため、一部の株では複数コピーのプラスミドが相同組換えにより組み込まれていると予想される。本研究で使用した XVE エストロゲンプロモーターは  $\beta$ -エストラジオール非存在下でもわずかではあるが転写が起こる(Kubo et al., 2013)。その結果、複数のプラスミドが挿入された形質転換体では  $\beta$ -エストラジオール非存在下でも dsRNA が発現したと考えられる。FtsZ RNAi #11 株において、 $\beta$ -エストラジオールを添加しない条件でも mRNA 量の減少と葉緑体の表現型が認められた結果はこの仮定と一致する(図 1-4B と C)。一方で、 $\gamma$ -tubulin RNAi #10 では  $\beta$ -エストラジオール非存在下で mRNA 量やタンパク質量の減少が認められたにも関わらず、分裂異常は  $\beta$ -エストラジオール添加後にのみ顕著に認められた。これは、 $\beta$ -エストラジオール非存在下で分裂異常を示す株は成長が遅く、形質転換体の選抜段階で見逃されたが、生育に必須でない FtsZ 遺伝子の RNAi 株は成長速度に影響がなく、選抜されたためと考えられる。

## 第二章 ヒメツリガネゴケ原糸体細胞における分裂期微小管形成因子の機能解析

オーグミンはヒメツリガネゴケにおいて中期スピンドル微小管生成に重要である

高解像度での3次元イメージングの結果、オーグミンおよび $\gamma$ -TuRCサブユニットのRNAiノックダウンにより、中期スピンドルの微小管蛍光強度の低下と染色体の整列異常が観察された(図 2-3B-D)。このことから、オーグミンおよび $\gamma$ -TuRCが分裂期スピンドル微小管の形成に重要であることが示された。この結果はスピンドル形成において、オーグミン依存的な微小管形成機構が、中心体を用いずにスピンドルを形成する多くの細胞で保存されている可能性を示している。実際、中心体非依存的にスピンドルを形成する *Xenopus* の卵抽出液においてもオーグミンの免疫除去により微小管量は減少する(Petry et al., 2011)。 $\gamma$ -TuRCは真核生物において主要な微小管重合核形成因子であるが、ヒメツリガネゴケにおいても同様であり、特に分裂期の微小管形成に重要であると考えられる。 $\gamma$ -Tubulinの免疫染色の結果、分裂後期に分配された姉妹染色分体の中間領域への点状の局在が観察されたが(図 2-6A)、同様の局在が内在性の $\gamma$ -tubulinにCitrineを融合したタンパク質の生細胞観察により確認された(図 2-8)。この局在の生理的な意味は分かっていないが、フラグモプラスト形成における微小管の増幅に関わっている可能性がある。オーグミンも $\gamma$ -tubulinと同様の局在を示した(図 2-8)、オーグミンのRNAiにより分裂期スピンドルに局在する $\gamma$ -tubulinが減少したことから(図 2-4)、分裂期においてオーグミン複合体が $\gamma$ -TuRCをスピンドル上にリクルートすることで、新たな微小管形成が起こっていると推測される。この結果は中心体の存在する動物体細胞や *Xenopus* の卵抽出液を用いた *in vitro* での研究から得られた結果と一致している(Goshima et al., 2008; Lawo et al., 2009; Petry et al., 2011; Uehara et al., 2009)。また、動物の体細胞ではスピンドル微小管に結合したオーグミンが $\gamma$ -TuRCの活性化にも関わっている(Uehara et al., 2009)。動植物において間期の微小管は分裂期の前に壊れ、分裂期に再構成されることが知られている。この再構成の過程において、動物では最初の微小管を増やすための足場となる微小管は中心体と核膜崩壊後に染色体から形成される微小管だとの仮説がある(Petry et al., 2011)。しかしながら、ヒメツリガネゴケでの生細胞観察の結果は核膜崩壊前に核膜を取り巻く微小管が

主要な足場となりうることを示唆する(図 2-3)。実際に、オーグミンのノックダウンでは核膜周辺の微小管量の減少は認められなかったことから、この核膜周辺の微小管形成はオーグミン依存的ではないと考えられる(図 2-3B)。脊椎動物の細胞では、オーグミンは分裂前中期にポロ様キナーゼによって活性化される(Johmura et al., 2011)。ゲノムにポロ様キナーゼを持たない陸上植物において同様の活性化機構があるかを調べる必要がある。また、光退色後蛍光回復法(FRAP)により微小管やオーグミンの動態を調べることで、微小管の形成速度やタンパク質の結合の安定性を推測できる。ヒメツリガネゴケではFRAPが行えるため、誘導型 RNAi 系や内在性タンパク質の蛍光タンパク質による可視化と組み合わせることでさらに詳細な機能解析が可能である(三木智博修士論文)。

動物細胞およびシロイヌナズナにおいてオーグミンの阻害により多極や単極のスピンドルがしばしば認められることから、スピンドルの極形成におけるオーグミンの機能がこれらの生物種で提唱された(Goshima et al., 2008; Ho et al., 2011; Petry et al., 2011)。ヒメツリガネゴケにおいてもまれに両極性のスピンドルの崩壊が観察されたことは、カウロネマ細胞においてもオーグミンが極の維持に必要であることを示唆している。しかしながら、スピンドルの崩壊は分裂前中期で長い分裂遅延が起こった後に検出されている。それゆえに、ヒメツリガネゴケにおけるオーグミンの主な役割はスピンドルにおいて十分量の微小管を供給することであり、観察された極形成の異常は微小管の数が減少した結果である可能性が高い。実際に、極の崩壊は単に極での微小管同士を束化するタンパク質が機能しないことはもちろん、キネトコアと微小管の結合や(Manning and Compton, 2007)、微小管プラス端のダイナミクス(Goshima et al., 2005)のような、他の経路の欠失でも起こることが示されている。

## オーグミンは分裂後期以降の微小管生成に必須である

近年の FRAP 解析を用いた研究から、タバコ BY-2 細胞ではフラグモプラスト微小管は絶えず生成されていることが示唆された(Murata et al., 2013; Smertenko et al., 2011)。しかしながら、分裂後期以降の微小管形成に関わる分子は同定されていなかった。本研究からコケ原糸体細胞のフラグモプラストの形成と拡張の過程において微小管生成が絶えず起こっており、大部分がオーグミンと  $\gamma$ -tubulin

依存的であることが示唆された(図 2-5; 動画 4)。この結果は、コケにおいてオーグミンがフラグモプラスト微小管形成の主要な因子であり、分裂期の  $\gamma$ -TuRC の活性化に関わっていることを強く示唆している。分裂中期からの微小管の持ち込み(すなわちキネトコア微小管以外の微小管)が分裂後期以降のオーグミン- $\gamma$ -TuRC による新たな微小管形成の足場となっているのかもしれない。

オーグミン依存的な機構が分裂後期以降の微小管形成の主要機構であることは、これまで植物細胞では示されていない。シロイヌナズナでオーグミンや  $\gamma$ -TuRC を欠損後に固定した細胞の観察や表現型の弱い  $\gamma$ -tubulin 変異体の生細胞観察による報告では微小管の組織化の欠陥は示されたが(Binarova et al., 2006; Ho et al., 2011; Kong et al., 2010; Pastuglia et al., 2006)、微小管形成異常は報告されていない。この相違は生物種や細胞型の違いによるものかもしれない。あるいは、シロイヌナズナで観察された微小管の組織化の異常も微小管形成異常と関係している可能性もある。実際に、任意の時点で Aug3 や  $\gamma$ -tubulin を RNAi ノックダウンした細胞のスピンドルの構造を観察すると、シロイヌナズナの変異体で観察されたような長い微小管の束化を伴った組織化の崩壊が認められた。長い微小管が現れたことは微小管の生成箇所が減少すると個々の微小管が長くなるという数理モデルと一致している(Goshima and Kimura, 2010)。

動物の体細胞では生物種で異なった結果が報告されている。ショウジョウバエを用いた研究からはオーグミンノックダウンによるセントラルスピンドル微小管の減少は報告されていないが(Goshima et al., 2008; Meireles et al., 2009; Wainman et al., 2009)、ヒトの HeLa 細胞では、セントラルスピンドル微小管の 60–70%がオーグミン依存的に生成されることが示された(Uehara and Goshima, 2010; Uehara et al., 2009)。しかしながら、HeLa 細胞においても、約 40%の微小管はオーグミン非依存的な機構により生成される。中心体がない場合のセントラルスピンドル形成におけるオーグミンの寄与は動物ではまだ研究されていないが、陸上植物における中心体の欠失はオーグミン依存的な機構を強化することで補償されたと推測される。このように、種によるオーグミンノックダウンの表現型の違いは、オーグミンノックダウン効率だけでなく、MTOC や微小管形成機構の比重の違いによるものだと解釈できる。実際に、分裂期において MTOC として中心体を使用しているハエ培養細胞では中心体の欠損によりオーグミンの表現型は重篤になる(Goshima et al., 2008)。ヒメツリガネゴケにおいて、分裂中期の表現型が顕著に現れなかったのは、分裂前期に核膜周辺に形成され

る微小管量が比較的多いためかもしれない。

## オーグミンはスピンドル微小管の配向に関わっている可能性がある

スピンドルやフラグモプラストにおいて、微小管は平行に配向されている。配向を維持するためには、スピンドルやフラグモプラスト微小管上で生成される微小管依存的な微小管生成においても狭い角度で微小管を生成する必要がある。電子顕微鏡や *Xenopus* の卵抽出液を用いた実験から、オーグミン依存的な機構では微小管はスピンドル内において  $20^\circ$ 以下の角度で生成されることが分かっていた(Kamasaki et al., 2013; Petry et al., 2013)。植物細胞においてはBY-2細胞を用いたフラグモプラスト微小管の観察から、フラグモプラストにおいて微小管は安定な束化された微小管上に局在する  $\gamma$ -tubulin から生成されていることが示唆された(Murata et al., 2013)。この過程にオーグミンが関与しているかどうかは報告されていないが、本研究の結果と合わせると、植物細胞においてもオーグミンが平行な微小管生成に関与していると推測される。

## オーグミン以外の $\gamma$ -TuRC 活性化因子が存在する可能性

ヒメツリガネゴケにおいてオーグミン以外の因子もスピンドル形成に関わっているかもしれない。カウロネマ細胞においてオーグミンが減少した状態でもスピンドルの両極性は確立され、大部分の染色体は短時間で中央に整列した(図 2-3B)。オーグミンのノックダウン効率を上げることによりスピンドル微小管が完全に消失する可能性もあるが、カウロネマ細胞には  $\gamma$ -TuRC の活性化に関わるような、スピンドル微小管や分裂前期の微小管を形成する異なる機構があると仮定される(Choi et al., 2010; Samejima et al., 2008)。しかしながら、動物細胞で報告されているような  $\gamma$ -TuRC の活性化に関わるタンパク質(例えば CDK5RAP)のホモログは植物では見つかっておらず、植物において未同定のタンパク質が  $\gamma$ -TuRC 依存的な微小管形成を誘導していることが示唆される。興味深いことに、オーグミンや染色体、中心体に依存しない微小管形成経路は動物細胞においても示唆されており、これまで調べられたすべての中心体を持たないシステムにおいて、染色体から離れた位置の微小管はオーグミンがない状態でも形成され

る(Goshima et al., 2008; Meireles et al., 2009; Petry et al., 2011)。基本的な分子生物学的、細胞生物学的手法が行えるようになったので、ヒメツリガネゴケにおいて新たな微小管生成に関わる因子の探索は興味深い。最近、弱い結合や一過的にしか結合しないタンパク質を免疫沈降により同定する方法が報告された。(Firat-Karalar et al., 2014)。この手法を用いて  $\gamma$ -TuRC の免疫沈降を行うことで、今まで結合が一過的であるために同定できなかった活性化タンパク質を検出できる可能性がある。

## 中心体を持たない細胞での細胞分裂を研究するための新しいモデルシステム

カウロネマ細胞の細胞分裂過程を観察したことにより、これまで他の生物種で研究されてきた中心体を用いないスピンドル形成とは異なる見解が生じた。カウロネマ細胞の細胞分裂での目立った特徴は、分裂前中期の間に単極性から両極性のスピンドルへの転換(三木智博修士論文)のように非常にダイナミックな微小管の再構成が起こるにもかかわらず、スピンドル形成にかかる時間が他の生物種に比べて非常に短く、野生株ではほとんどすべての細胞で正確な細胞分裂が起こる点である(99%以上)。27本の染色体が正確に微小管と結合する必要があるが、核膜崩壊から後期開始までは10分しかかからず、この時間はたばこBY-2細胞(中期まで45分)やマウスの卵母細胞(数時間(Kitajima et al., 2011))、*Xenopus*の卵抽出液(30分以上(Petry et al., 2011))、中心体を欠損させた*Drosophila* S2細胞(~30分)といった他の中心体を持たない系にくらべ、非常に短い。オーグミンをロックダウンした細胞では特に分裂前中期において分裂遅延が起こることから、オーグミン依存的な微小管生成が短時間でスピンドル形成を行うために必要であることが分かる。しかしながら、オーグミン量が減少したカウロネマ細胞においても、多くの場合両極性のスピンドルが形成され、染色体の赤道面への整列が起こる。このことから、ヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞にはこのような過程を確実にする他の機構も働いていると予想され、それにはまだ同定されていない分裂制御因子が関わっている可能性がある。



### 第三章 ヒメツリガネゴケにおける間期微小管形成機構

#### Cytoplasmic nucleation のメカニズム

Cytoplasmic nucleation は表層微小管では滅多に観察されないが(表層微小管では全体の生成イベントの 1 から 2% (Nakamura et al., 2010))、ヒメツリガネゴケの原糸体細胞では最も高頻度で起こっていた(60%以上; 表 6)。微小管形成因子の発現抑制や観察を通して、ヒメツリガネゴケ原糸体細胞での cytoplasmic nucleation に関して 4 つの結論を得た。

一つ目は、cytoplasmic nucleation は主に  $\gamma$ -tubulin 依存的ということである。各  $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルは同程度の蛍光強度であり(図 3-15A)、1 つのシグナルから複数の微小管が生成される様子はほとんど観察されなかったことから、これらのシグナルが 13-17 の  $\gamma$ -tubulin サブユニットを含む 1 つの  $\gamma$ -TuRC (Choi et al., 2010; Erlemann et al., 2012; Kollman et al., 2010)に対応していると思われる。まれに、複数の微小管が生成される  $\gamma$ -tubulin-Citrine のシグナルも観察されたが、そのシグナル強度はは微小管が 1 本しか生成されないシグナルと比較して顕著に明るかった。そこで、私は 1 つの  $\gamma$ -TuRC が様々な場所で 1 本の微小管を生成できるというモデルを提唱する(図 3-19)。この生成機構は *in vitro* において  $\gamma$ -TuRC と tubulin を反応させた時に観察されている(Choi et al., 2010; Zheng et al., 1995)。しかしながら、これは中心体やマウスの卵母細胞で観察される中心体非依存的な MTOC とは異なっている(Schuh and Ellenberg, 2007)。単一の  $\gamma$ -TuRC からの微小管生成は可視化技術の制約によりこれまでの研究では見過ごされてきた可能性がある。本研究で示したように斜光照明蛍光顕微鏡法と薬剤処理を組み合わせることで、植物や動物の様々な細胞型における個々の生成イベントの可視化が可能になるかもしれない。今後この技術を用いてどの程度この生成機構が保存されているかを解明する必要がある。

二つ目は、cytoplasmic nucleation はダイナミックなイベントであり、ランダムな場所で起こりその後もランダムな方向に伸長しているように見えることである。20 秒以上動かない  $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルもあり(図 3-15A)、これらは細胞表層や細胞小器官の表面といった、ほとんど変化しない構造体に結合していることを示唆している。しかしながら、動かない  $\gamma$ -tubulin だけでなく、動的な  $\gamma$ -tubulin も同様に微小管を生成した。 $\gamma$ -Tubulin の動態により生成効率が異なる

かは分からないが、生成核は細胞質内のランダムな場所に分布して微小管を生成しているのかもしれない。この仮説は最近行われたタバコ培養細胞での表層微小管形成の観察結果とは異なる(Lindeboom et al., 2013a)。この先行研究によると、細胞分裂中にもパターン化された微小管が細胞質に残っており、細胞分裂後新たな微小管生成の足場となることで、効率的に表層微小管の配向を確立できるとしている。

三つ目は、cytoplasmic nucleation は、ある程度細胞周期で調節されているように見えることである。Cytoplasmic nucleation は間期において頻繁に観察され、このステージでの大部分の微小管生成を説明することができるが(図 3-16B)、分裂期微小管の大部分はオーグミン依存的な branching nucleation により生成される(図 2-3、2-5)。この結果から、cytoplasmic nucleation の間期特異的な活性化機構もしくは分裂期特異的な不活性化機構が存在している可能性がある。この調節機構を明らかにするためには更なる生化学的な研究が必要である。

四つ目は、 $\gamma$ -tubulin-Citrine が検出できない微小管生成が観察されたことである(図 3-15A)。私は顕微鏡とカメラの感度の問題で、弱い  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine のシグナルが検出されなかったことが原因ではないと考えている。蛍光タグをしていない  $\gamma$ -tubulin-a 存在下では観察される  $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルの蛍光強度は弱くなるが、検出可能であったからである。他の可能性として、一部の微小管は  $\gamma$ -tubulin 非依存的に生成したか、もしくは  $\gamma$ -tubulin は微小管が検出限界以下の時に一瞬局在したというものである。通常培養した細胞(微小管重合阻害剤未処理)において  $\gamma$ -tubulin のノックダウンは微小管生成に影響しなかったこと(表 6、7)、 $\gamma$ -tubulin-Citrine シグナルは微小管が生成してから平均 2 分間存在し続けたことから(図 3-8B)、私は  $\gamma$ -tubulin に依存しない微小管生成機構が存在する可能性が高いと考えている。明らかなことは、どちらの場合でも、 $\gamma$ -tubulin-Citrine にキャップされていない微小管のマイナス端は他のタンパク質により脱重合から守られなければならないということである。近年、動物において CAMSAP/Patronin/Nezha ファミリーが微小管マイナス端の安定化を行っていることが示された(Goodwin and Vale, 2010; Meng et al., 2008)。現在のところ植物では CAMSAP のホモログは見つかっていない。しかしながら、一部の  $\gamma$ -tubulin がキャップしていない微小管のマイナス端は安定であったことから(図 3-8B)、同様の機能を持つタンパク質は存在するかもしれない。 $\gamma$ -Tubulin と結合していない微小管のマイナス端がどのように生成され、安定化されているかは興味深い

研究課題である。微小管の安定化機構を調べる手がかりとして、切断された微小管や  $\gamma$ -tubulin がはずれた微小管のマイナス端を詳細に観察する必要があると考える。超解像や電子顕微鏡、斜光照明蛍光顕微鏡法により得られた画像を重ね合わせ、 $\gamma$ -tubulin が結合しているマイナス端と比較することにより、構造の違いや安定化タンパク質の存在が予測できるかもしれない。

## Branching nucleation のメカニズム

Branching nucleation は本研究において高い頻度で観察されたもう一つの機構であり、私はこのモードが中心体を持たないシステムにおいて微小管増幅に一般的に用いられる微小管生成モードであるという考えを支持する(Goshima and Kimura, 2010; Murata et al., 2005)。しかしながら、他の場合とは異なり、原糸体細胞での branching の角度は多様であった(図 3-6C と D)。さらに、分裂期において狭い角度の branching に必要なオーグミンをロックダウンしても間期の branching の角度分布に影響はなかった(図 3-18)。特定の角度の branching による微小管生成は微小管を増やすだけでなく、極性のある微小管ネットワークを形成するための有効な手段だと考えられる(Janson et al., 2005; Kamasaki et al., 2013; Murata et al., 2005; Petry et al., 2013)。表層微小管において、特定のタンパク質の変異により branching の角度が変わることが知られている。脱リン酸化酵素 2A の B''サブユニットである TON2 の変異体では、微小管の生成頻度には影響は見られないが、40°付近の branching が有意に減少し、0°の branching が増加する。TON2 の変異で branching の角度がランダムにはならないことは、表層微小管には TON2 以外にも branching の角度を決める調節因子やアダプタータンパク質が存在することを示唆する。ヒメツリガネゴケは branching の角度が多様であることから、調節因子が存在しない可能性やアダプタータンパク質の性質が異なる可能性がある。本研究の結果は、原糸体細胞ではこの機構を単に微小管数を増やすために利用していることを示唆している。Endoplasmic 微小管の長軸方向への配向は、微小管生成後に別の手段を通して起こっているのかもしれない。

$\gamma$ -Tubulin シグナルはほとんどの branching 部位に検出された。表層微小管では、 $\gamma$ -TuRC は新たな微小管を生成する際に細胞膜に直接結合するのではなく、微小管上に効率的にリクルートされて微小管を生成していることから、このシステ

ムにおいて、微小管上に  $\gamma$ -TuRC のアダプターもしくは活性化タンパク質が存在することが示唆されている(Nakamura et al., 2010)。最近、シロイヌナズナにおいてオーグミンやNEDD1/GCP-WDの欠損により  $\gamma$ -TuRCのリクルートやbranching nucleation 頻度が著しく損なわれたことから、オーグミンと NEDD1/GCP-WD がアダプターの候補として提唱されている(Liu et al., 2014; Walia et al., 2014)。しかしながら、ヒメツリガネゴケにおいてオーグミンの RNAi 後に branching nucleation の頻度に差は認められなかったこと(表 6、7)から、原糸体細胞はオーグミンとは異なった種類のアダプター・活性化タンパク質を利用しているのかもしれない。

約 10%の娘微小管は生成後母微小管に沿って移動する様子が観察された(図 3-6B)。14 例中 13 例で娘微小管はマイナス端方向に移動したことから、この移動にはマイナス端方向モータータンパク質が関わっていると考えられる。植物はマイナス端方向モーターである cytoplasmic dynein を持たないため、この移動はもう一つのマイナス端方向モーターである kinesin-14 が行っていると考えられる(Endow and Waligora, 1998)。ヒメツリガネゴケでは 15 遺伝子が kinesin-14 ファミリーに属している(Miki et al., 2014)。局在解析や遺伝子の発現抑制による表現型解析から、娘微小管の移動の意義や制御する分子が同定できると考えられる。

## カタニンによる微小管切断の役割

本研究はコケ植物で初めてカタニンの機能欠損の表現型を調べた。p60 二重欠損株において茎葉体が小さくなり、微小管の配向も乱れたことから、カタニン依存的な微小管切断が茎葉体の表層微小管の組織化に重要であることが示された(図 3-4B-D)。しかしながら、原糸体細胞ではカタニン p60 の微小管の切断と増幅への寄与は小さいことが確認された(図 3-4A)。これは endoplasmic 微小管の形成モードが表層微小管とは異なっているという考えを裏付けている。カタニンは青色光やオーキシン依存的な微小管の再配向に必要であることが報告されている(Chen et al., 2014; Lindeboom et al., 2013b)。この過程では交差した微小管のうち、新しい微小管が選択的に切断されることにより、効率的に微小管再配向が起きると考えられている(Lindeboom et al., 2013b)。原糸体細胞においてもカタ

ニンは機能していることから、微小管の再配向の過程に役割を果たしている可能性がある。微小管重合阻害剤除去後、微小管が再配向される過程の観察や微小管の再配向を促す処理を確立することにより、検証が可能である。

### Endoplasmic 微小管における微小管配向機構について

ヒメツリガネゴケ原糸体の頂端細胞では endoplasmic 微小管は細胞の伸長方向に配向されている(Doonan et al., 1985; Hiwatashi et al., 2014)。しかしながら、微小管は細胞内のランダムな場所で起こる cytoplasmic nucleation と、90°以上を含む様々な角度の branching nucleation により生成される(図 3-6、3-8)。このことは、頂端細胞では微小管生成以外の機構により微小管の配向を形成、維持していることを示している。実際、頂端細胞の先端部分において、植物特異的な kinesin、KINID1 が微小管の束化に関わっていることが報告されており(Hiwatashi et al., 2014)、また、本研究において XMAP215 RNAi により微小管の長さが短くなり、微小管の配向が乱れることが示された(図 3-5)。これらのことから、微小管のダイナミクスや束化が微小管の配向に関わっている可能性が考えられる。さらに、一部の娘微小管の角度は娘微小管の移動により変化した。この時、娘微小管と母微小管の間の角度は平行に近くなる方向へと変化した(図 3-7A)。この結果は娘微小管の角度は生成後にも変化しうることを示している。微小管の束化やダイナミクス、輸送による角度の変化を通して微小管の配向を決定しているのかもしれない。

### $\gamma$ -Tubulin が不在状態での endoplasmic 微小管形成機構

すべての真核細胞において  $\gamma$ -tubulin は微小管生成に主要な役割を果たしていること、微小管 regrowth アッセイの早い段階(図 3-15)や分裂期(図 2-3、2-5)には  $\gamma$ -tubulin の RNAi により明らかな異常が観察されたことを考えると、 $\gamma$ -tubulin RNAi 細胞において間期の微小管生成頻度に劇的な欠陥が認められなかったことは(表 6)、意外な結果であった。RNAi 後に残存する  $\gamma$ -tubulin (25%以下)が間期の微小管生成には十分である可能性も排除できない。しかしながら、未知の機

構が  $\gamma$ -tubulin が不在で微小管生成を促進したという可能性もある。実際に、 $\gamma$ -tubulin 存在下においても、18%の微小管生成が  $\gamma$ -tubulin 非依存的であった(図 3-15B)。さらに、regrowth アッセイにおいて  $\gamma$ -tubulin RNAi によって微小管生成は遅れたが、最終的には微小管生成が起こりコントロールと遜色ないレベルまで回復した(図 3-14A)。 $\gamma$ -Tubulin 非依存的な機構は  $\gamma$ -tubulin に比べて微小管の生成に時間を要するのかもしれない。 $\gamma$ -Tubulin 存在下において  $\gamma$ -tubulin 非依存的な機構が観察されたことから、 $\gamma$ -tubulin 非依存的な機構は  $\gamma$ -tubulin 存在下でも活性化されており、 $\gamma$ -tubulin 依存的な機構と独立に機能しているのかもしれない。興味深いことに *Drosophila* S2 細胞において同様の結果が報告されている。S2 細胞は間期には中心体非依存的な機構により微小管を生成する(Rogers et al., 2008)。この実験では、RNAi により免疫ブロットで検出できないレベルまで  $\gamma$ -tubulin をノックダウンした状態で regrowth アッセイを行っており、その結果、微小管再形成は遅れ、また、細胞分裂異常は認められたが、間期の微小管量に変化はなかった(Rogers et al., 2008)。*C. elegans* でも星状体微小管の一部は  $\gamma$ -tubulin に依存せず、オーロラ A キナーゼが関わる未知の機構により生成されることが知られている(Motegi et al., 2006; Toya et al., 2011)。ヒメツリガネゴケは  $\gamma$ -TuRC のノックダウン後も間期の微小管生成頻度が低下しない上に、間期の微小管一本一本の生成の様子を可視化できるという特徴がある。ヒメツリガネゴケを用いることで  $\gamma$ -tubulin に依存しない未知の微小管生成機構の解明が可能になるかもしれない。

微小管は細胞の生育に必須であるにも関わらず、現在知られている微小管生成機構の大部分は  $\gamma$ -TuRC 依存的である。しかしながら、微小管の重要性を考えると、予備の機構が存在しても不思議ではない。*Xenopus* 卵抽出液を用いた研究から、オーロラ A キナーゼや XMAP215 を付着させたビーズは微小管形成能力を持つことが報告された(Popov et al., 2002; Tsai and Zheng, 2005)。特に XMAP215 を付着させたビーズはオーロラ A キナーゼの場合と比較して  $\gamma$ -tubulin を免疫除去した後にも高い割合で微小管を形成した(Tsai and Zheng, 2005)。XMAP215 は遊離 tubulin に結合する能力があるため(Ayaz et al., 2012; Widlund et al., 2011)、空間内の遊離 tubulin 濃度を高めることで微小管を生成しているのかもしれない。また、オーロラ A キナーゼが付着したビーズも  $\gamma$ -tubulin の免疫除去により微小管生成能が低下したが、完全にはなくならなかったこと、*C. elegans* において  $\gamma$ -tubulin に依存しないかつオーロラ A キナーゼ依存的に微小管生成機構が存在

することを合わせると、オーロラ A キナーゼ依存的、 $\gamma$ -tubulin 非依存的な微小管生成機構は他の種でも保存されている可能性がある。また、ゴルジ体からの微小管生成には CLASP による微小管 seed の安定化が必要であることが報告されている (Efimov et al., 2007)。CLASP は微小管を安定化することで、偶然微小管核が形成された時に、微小管核を壊れにくくすることによって微小管を生成しているのかもしれない。 $\gamma$ -Tubulin とこれらの遺伝子の欠損を組み合わせることで、微小管の生成は劇的に阻害されるかもしれない。

## 材料と方法

### コケの培養と形質転換

通常の培養は BCDAT 寒天培地を用い、白色蛍光灯下、25°Cで行った。観察時の原糸体細胞は以下の条件で 3-7 日間培養して使用した。35 mm ガラスボトムディッシュに BCD 寒天培地を 3 mL 入れて固め、中心のガラス部分にある寒天培地を取り除き、約 50  $\mu$ L の BCD 寒天培地で薄くコートし、コケを置いて 25°C 白色蛍光灯下で培養した。RNAi の表現型の観察には、BCD 寒天培地に  $\beta$ -エストラジオール(最終濃度 1  $\mu$ M)を加え、同様に 3-7 日間培養した。斜光照明蛍光顕微鏡法を用いた実験にはセロハンを敷いた BCD 寒天培地上で培養した原糸体細胞を用いた。RNAi の表現型を観察するため、1  $\mu$ M  $\beta$ -エストラジオール存在下で原糸体細胞を 12-17 日培養した。

形質転換は一般的なポリエチレングリコール(PEG)を用いた方法に従った(Nishiyama et al., 2000)。株の選抜において、成長障害や形態的欠陥を示していないこと、倍数体ではないことを確認した。

### 使用した株

7113 プロモーター(Mitsuhara et al., 1996)にヒトのヒストン *H2B-mRFP* 融合遺伝子を直接結合し、GFP-tubulin 株、GTU14 (Hiwatashi et al., 2008)に組み込んだ。形質転換株には成長障害や形態的欠陥は検出されなかった。

本研究で使用したヒメツリガネゴケの形質転換体を表 8 に記した。RNAi は GFP-tubulin/ヒストン H2B-mRFP、Citrine タグの付加は mCherry-tubulin 発現株に対して行った。 *$\gamma$ -Tubulin-a* は  *$\gamma$ -tubulin-b-Citrine* 発現株において相同組換えにより欠損させた。2 つのカタニン *p60* 遺伝子(*p60-a* と *p60-b*)の欠損は GFP-tubulin 株に対して行った。

### プラスミド

誘導型 RNAi プラスミドは以下のように作製した。pENTR/D-TOPO ベクターに 300-1000 bp の標的遺伝子の配列を挿入した。使用可能な場合には、PCR のテンプレートに cDNA を使用し、そうでない場合はゲノム DNA を使用した。次に、Gateway システム(Invitrogen)を用いて組換えカセット配列を持つ誘導型 RNAi ベクター(pGG626)に組み込み、誘導型 RNAi コンストラクトを作製した。pGG626



の大まかなマップを図 1-3A に示した。RNAi コンストラクト作製に用いたプライマー配列を表 9 に示した。 $\gamma$ -Tubulin のレスキューに使用したプラスミドは dsRNA と異なる配列へとコドンを変えた  $\gamma$ -tubulin-*b* 遺伝子を合成して作製した。

Citrine タグの付加には内在性の  $\gamma$ -tubulin-*b* と *XMAP215-a* 遺伝子のカルボキシル末端と 3'UTR の約 1 kb を含んだプラスミドを使用した。ベクター (pCTRN-nptII) に制限酵素サイトを用いて組み込んだ。使用したプライマーを表 11 にまとめた。

### RNAi 株の選択とレスキュー実験

RNAi プラスミドは制限酵素処理(PmeI)後、GFP-tubulin/ヒストン H2B-mRFP 発現株のプロトプラストに PEG 法により導入した。使用したプラスミドはゲノム上の *PIG1* 遺伝子座に導入されるようにデザインされているが、ヒメツリガネゴケは相同組換え効率が非常に高いために、それぞれの RNAi 株には異なったコピー数の RNAi カセットが挿入されていると予測される。*PIG1* サイトは遺伝子をコードしていない領域であり、コケの生存に不要であることが知られている (Okano et al., 2009)。RNAi 株の選抜はコンストラクトの挿入位置および挿入数を確認せずに行った。そのため、いくつかの株では予想外の位置に RNAi プラスミドが挿入されている可能性がある。しかしながら、2 つ以上の重複領域のない RNAi 配列が利用可能であり、各コンストラクトに対して 2 株以上の株を得るため、表現型の評価には十分に有効である(図 1-3、1-4; 表 2)。異常なプラスミドの挿入の結果、 $\beta$ -エストラジオール添加後に dsRNA が発現されない場合もあると考えられる。レスキュー実験では、RNAi 耐性を持つ  $\gamma$ -tubulin-*b* 遺伝子、またはプロモーターと薬剤耐性カセットのみを持つコントロールベクターを  $\gamma$ -tubulin RNAi 株 #10 に形質転換し、それぞれ 5、7 株の安定な株を得た。これらの株を  $\beta$ -エストラジオール存在下で培養し、10×対物レンズを用いた多点でのタイムラプス観察を行った。

### RNAi の評価

形質転換後得られた株はヒストン H2B-mRFP 蛍光強度により RNAi の効率を評価した。蛍光強度の低下が確認された株について長時間タイムラプス観察を行い、表現型を調べた。表現型が認められた株に対し、免疫ブロットまたは qRT-PCR によりタンパク質量または mRNA 量が減少していることを確認した。

## 生化学

RNAi 細胞の抽出液を用いて以下のように SDS-PAGE を行った。まず、 $\beta$ -エストラジオールを含まない BCDAT プレート上で原糸体の培養を行った。次に  $\beta$ -エストラジオール存在下で 5-6 日ごとにガラスビーズを用いて原糸体の破砕を行いながら培養した。 $\beta$ -エストラジオール添加後 9-11 日で原糸体を液体窒素を用いて凍結破砕し、SDS を含むバッファーを用いて細胞抽出液を作製した。原糸体の破砕と培養を繰り返すことで、多くの細胞が成長過程に維持されることを期待した。免疫ブロットは抗  $\gamma$ -tubulin 抗体(G9、1:5000 (日本体育大学の堀尾哲也博士、名古屋大学の紅朋浩博士に頂いた))、GFP 抗体(JL8)、アフィニティー精製した XMAP215 抗体(ウサギ(#2)ポリクローナル、1:100)、Mis12 抗体(ウサギ(#1)ポリクローナル、1:100)を用いて行った。qRT-PCR は原糸体から抽出した RNA と Power SYBR Green PCR Master Mix、7500 Real-Time PCR システム(モデル 7500 ; Applied Biosystems)を用いて行った。得られた結果を TUA1 ( $\alpha$ -tubulin)の結果で標準化した。表 10 にプライマー配列を記した。

## 顕微鏡

### 長時間イメージング

広域撮影顕微鏡 TE2000 (Nikon)に自動ステージと冷却 CCD カメラ Micromax (Roper)が取り付けられた顕微鏡を長時間イメージングに使用した(10 × 0.30 NA 対物レンズ)。画像は多点で 3 分ごとに、FITC 用と TRITC 用の 2 つのフィルターを用いて撮影した。一部の観察は画像撮影中、500 lx の白色光をつけ、光合成が行えるようにした。

### 分裂期の高解像度イメージング

TE2000 (Nikon)に自動ステージとスピニングディスクユニット CSU-X (Yokogawa)、冷却 CCD カメラ ImageEM (Hamamatsu)が取り付けられた顕微鏡を使用した。

### 斜光照明蛍光顕微鏡法での微小管イメージング

原糸体細胞は BCD 培地上で 5-7 日間成長させた物を用いた。細胞は破砕後、2 枚のセロハン(フタムラ科学工業から頂いた)で挟み、BCD 寒天培地で 5-7 日間培養した。2 枚のセロハンで挟むことにより、細胞が平たく成長するため、薬剤処理やイメージングに適している。培地交換のためのチャンバーの組み立ては

図 3-12 に示した。原糸体細胞は 1  $\mu$ L の BCDATG 培地とともに 2 つの穴を空けたスライドガラスの上に置き、両面テープを用いてカバーガラスと接着させた。薬剤有りまたは無しの培地は Harvard Apparatus Pump 11 Elite Syringe Pump を用いて 50  $\mu$ L/分の速度で流した。撮影には、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM、Ti, 100 $\times$  1.39 NA レンズ、Nikon)に EMCCD カメラ Evolve (Roper)又は iXON (DU888E; Andor) を取り付けた物を斜光照明条件で用いた。撮影は 24–25 $^{\circ}$ Cで行った。最もカバーガラスに近いクロロネマ細胞(まれに頂端細胞)の原形質に焦点を当てた。顕微鏡は Micromanager software もしくは NIS-Elements (Nikon)で制御した。

### 画像解析

得られた画像は ImageJ と IMOD ソフトウェアパッケージ(Kremer et al., 1996) 中の 3DMOD プログラムを用いて行った。プログラムでは、個々の微小管の数や長さの情報を得た (撮影範囲より外へ伸びている微小管もあったため、実際の微小管の長さは測定した物より長いはずである)。面積、branching の角度、伸長・短縮速度は ImageJ により測定した。娘微小管の末端が既存の微小管上に検出された時にのみ branching nucleation と判断した。それ以外の場合は微小管のクロスリンクであると判断した。ダイナミックな微小管の端の大部分はプラス端だと予測されるので、母微小管の極性はダイナミックな先端が検出できた時にのみ決定した。ダイナミックな先端が検出できない時は角度の定量は行わなかった。

### 免疫染色

$\gamma$ -Tubulin と CEP27 の免疫染色は以下のように行った。GFP-tubulin/ヒストン H2B-mRFP 発現株を薄く BCD 寒天培地(RNAi 株の場合は 1  $\mu$ M  $\beta$ -エストラジオールを添加)を塗り広げたガラスボトムディッシュ上で培養する。細胞を 8% PFA、0.01% NP-40、50 mM EGTA を含む PME で 30 分固定した。その後の操作は Hiwatashi et al. (2008)に従った。この方法を用いることにより、すべての細胞が染色される訳ではないが、一部のクロロネマ細胞では分裂装置の観察可能である。染色には抗  $\gamma$ -tubulin 抗体(G9 抗体、マウス、1:1000)、CEP27 抗体(ウサギポリクローナル、1:200)を用いた。DNA は DAPI (1 mg/mL を 1:1000 に希釈)で染色した。

## サザンブロット

相同組換えの確認のためのサザンブロットは以下のように行った。NucleoSpin Plant II Midi キットを用いて精製したゲノム DNA 1.5–2.0  $\mu\text{g}$  を制限酵素処理した (12 時間以上)。制限酵素処理は 100–300  $\mu\text{L}$  の容量で行った。反応後 1–5  $\mu\text{L}$  を泳動し、完全に消化されていることを確認した。制限酵素処理した DNA を精製し、0.8%のアガロースゲルで泳動した。泳動後、アガロースゲルを 0.25N HCl で 10–15 分間処理した後、0.4 M NaOH および 1.5 M NaCl を含む溶液で 1 時間処理した。ナイロンメンブレン(Amersham Hybond-N<sup>+</sup>)に転写後 AlkPhos Direct Labelling and Detection System および CDP-Star を用いて検出した。

## 免疫沈降

破砕培養(ソニケーション)した原糸体細胞、プレート 2 枚分を液体窒素存在下で乳鉢および乳棒を用いて凍結破砕し、1.7 mL の HB100 (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、100 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、1 mM DTT、1% NP-40、1 × プロテアーゼインヒビター、1 mM PMSF)に溶解した。22,000 g で 30 分間 4°C で遠心後、上清を GFP 抗体を結合したアガロースビーズ(10  $\mu\text{L}$ 、MBL)と混合し、4 時間 4°C で反応させた。ビーズを 4 mL の HB100 (DTT および NP-40 は含まない)で洗浄し、100  $\mu\text{L}$  の SDS を含む溶液でボイルした。その後、免疫ブロットによりタンパク質の結合を確認した。

## 系統樹の作製

操作は基本的に Miki et al., (2014)に従った。推定したアミノ酸配列を MAFFT ver. 7.157b (Kato et al., 2002; Kato and Standley, 2013) を用いて並べ、MacClade ver. 4.08 OSX.を用いて手動で修正した。図 3-3B は 473 アミノ酸残基を 5 遺伝子の進化的距離の計算に使用した。計算は Jones-Taylor-Thornton (JTT)モデル(Jones et al., 1992)により行い、MEGA5 ソフト(Tamura et al., 2011)を用いて系統樹を作成した。

## 遺伝子 ID

本研究に用いたヒメツリガネゴケの遺伝子を表 14 に記した。ヒメツリガネゴケの遺伝子配列は遺伝子 ID を「キーワード」に入力することにより phytozome で検索できる。

## 謝辞

名古屋大学理学研究科五島剛太教授には研究室に配属されてから6年間、日々ご指導頂き、その時々で必要な課題を与えてくださいました。ありがとうございました。

五島研究室の皆様には日常の議論を通じ、多くの知識や示唆を与えていただきました。ありがとうございました。

西山朋子特任講師には多くの知識や示唆を与えていただきました。また、実験方法をご指導頂き、実験装置を使わせていただきました。ありがとうございました。

遺伝研の木村暁准教授には、数理モデルという未知の領域を丁寧に説明していただき、論文にすることができました。ありがとうございました。

MBLの谷知巳博士には、実験計画や実験方法をご指導頂きました。ありがとうございました。

基礎生物学研究所の長谷部光泰教授、宮城大学の日渡祐二博士、奈良先端科学技術大学院大学の久保稔博士にはヒメツリガネゴケについてたくさんのお話を教えて頂きました。また、プラスミドや形質転換株を頂きました。ありがとうございました。

最後に、遠くから温かく見守ってくれた家族に感謝致します。

## 参考文献

- Augustine, R.C., L. Vidali, K.P. Kleinman, and M. Bezanilla. 2008. Actin depolymerizing factor is essential for viability in plants, and its phosphoregulation is important for tip growth. *Plant J.* 54:863-75.
- Ayaz, P., X. Ye, P. Huddleston, C.A. Brautigam, and L.M. Rice. 2012. A TOG:alphabeta-tubulin complex structure reveals conformation-based mechanisms for a microtubule polymerase. *Science.* 337:857-60.
- Bartolini, F., and G.G. Gundersen. 2006. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci.* 119:4155-63.
- Basto, R., J. Lau, T. Vinogradova, A. Gardiol, C.G. Woods, A. Khodjakov, and J.W. Raff. 2006. Flies without centrioles. *Cell.* 125:1375-86.
- Bezanilla, M., A. Pan, and R.S. Quatrano. 2003. RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.* 133:470-4.
- Bezanilla, M., P.F. Perroud, A. Pan, P. Klueh, and R.S. Quatrano. 2005. An RNAi system in *Physcomitrella patens* with an internal marker for silencing allows for rapid identification of loss of function phenotypes. *Plant Biol (Stuttg).* 7:251-7.
- Binarova, P., V. Cenklova, J. Prochazkova, A. Doskocilova, J. Volc, M. Vrlik, and L. Bogre. 2006. Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18:1199-212.
- Brouhard, G.J., J.H. Stear, T.L. Noetzel, J. Al-Bassam, K. Kinoshita, S.C. Harrison, J. Howard, and A.A. Hyman. 2008. XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell.* 132:79-88.
- Brown, R.C., B.E. Lemmon, and O.A. Olsen. 1994. Endosperm Development in Barley: Microtubule Involvement in the Morphogenetic Pathway. *Plant Cell.* 6:1241-1252.
- Burk, D.H., B. Liu, R. Zhong, W.H. Morrison, and Z.H. Ye. 2001. A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell.* 13:807-27.
- Chabin-Brion, K., J. Marceiller, F. Perez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Durand, and C. Pous. 2001. The Golgi complex is a

- microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell*. 12:2047-60.
- Chalfie, M., and J.N. Thomson. 1979. Organization of neuronal microtubules in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*. 82:278-89.
- Chen, X., L. Grandont, H. Li, R. Hauschild, S. Paque, A. Abuzeineh, H. Rakusova, E. Benkova, C. Perrot-Rechenmann, and J. Friml. 2014. Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. *Nature*. 516:90-3.
- Choi, Y.K., P. Liu, S.K. Sze, C. Dai, and R.Z. Qi. 2010. CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the gamma-tubulin ring complex. *J Cell Biol*. 191:1089-95.
- Cove, D. 2005. The moss *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Genet*. 39:339-58.
- Cove, D., M. Bezanilla, P. Harries, and R. Quatrano. 2006. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu Rev Plant Biol*. 57:497-520.
- Dixit, R., and R. Cyr. 2004. The cortical microtubule array: from dynamics to organization. *Plant Cell*. 16:2546-52.
- Djondjurov, L.P., N.Y. Yancheva, and E.C. Ivanova. 1983. Histones of terminally differentiated cells undergo continuous turnover. *Biochemistry*. 22:4095-102.
- Doonan, J.H., D.J. Cove, and C.W. Lloyd. 1985. Immunofluorescence microscopy of microtubules in intact cell lineages of the moss, *Physcomitrella patens*. I. Normal and CIPC-treated tip cells. *J Cell Sci*. 75:131-47.
- Doonan, J.H., D.J. Cove, and C.W. Lloyd. 1988. Microtubules and microfilaments in tip growth: evidence that microtubules impose polarity on protonemal growth in *Physcomitrella patens*. *Journal of Cell Science*. 89.
- Edzuka, T., L. Yamada, K. Kanamaru, H. Sawada, and G. Goshima. 2014. Identification of the augmin complex in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*. 9:e101471.
- Efimov, A., A. Kharitonov, N. Efimova, J. Loncarek, P.M. Miller, N. Andreyeva, P. Gleeson, N. Galjart, A.R. Maia, I.X. McLeod, J.R. Yates, 3rd, H. Maiato, A. Khodjakov, A. Akhmanova, and I. Kaverina. 2007.

- Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell*. 12:917-30.
- Endow, S.A., and K.W. Waligora. 1998. Determinants of kinesin motor polarity. *Science*. 281:1200-2.
- Erlemann, S., A. Neuner, L. Gombos, R. Gibeaux, C. Antony, and E. Schiebel. 2012. An extended gamma-tubulin ring functions as a stable platform in microtubule nucleation. *J Cell Biol*. 197:59-74.
- Firat-Karalar, E.N., N. Rauniyar, J.R. Yates, 3rd, and T. Stearns. 2014. Proximity interactions among centrosome components identify regulators of centriole duplication. *Curr Biol*. 24:664-70.
- Fishel, E.A., and R. Dixit. 2013. Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *Plant J*. 75:270-7.
- Goodwin, S.S., and R.D. Vale. 2010. Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. *Cell*. 143:263-74.
- Goshima, G., and A. Kimura. 2010. New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle. *Curr Opin Cell Biol*. 22:44-9.
- Goshima, G., T. Kiyomitsu, K. Yoda, and M. Yanagida. 2003. Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol*. 160:25-39.
- Goshima, G., M. Mayer, N. Zhang, N. Stuurman, and R.D. Vale. 2008. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol*. 181:421-9.
- Goshima, G., F. Nedelec, and R.D. Vale. 2005. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J Cell Biol*. 171:229-40.
- Haren, L., M.H. Remy, I. Bazin, I. Callebaut, M. Wright, and A. Merdes. 2006. NEDD1-dependent recruitment of the gamma-tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *J Cell Biol*. 172:505-15.
- Heald, R., R. Tournebise, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts.



- Nature*. 382:420-5.
- Hiwatashi, Y., M. Obara, Y. Sato, T. Fujita, T. Murata, and M. Hasebe. 2008. Kinesins are indispensable for interdigitation of phragmoplast microtubules in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*. 20:3094-106.
- Hiwatashi, Y., Y. Sato, and J.H. Doonan. 2014. Kinesins have a dual function in organizing microtubules during both tip growth and cytokinesis in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*. 26:1256-66.
- Ho, C.M., T. Hotta, Z. Kong, C.J. Zeng, J. Sun, Y.R. Lee, and B. Liu. 2011. Augmin plays a critical role in organizing the spindle and phragmoplast microtubule arrays in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23:2606-18.
- Hotta, T., Z. Kong, C.M. Ho, C.J. Zeng, T. Horio, S. Fong, T. Vuong, Y.R. Lee, and B. Liu. 2012. Characterization of the *Arabidopsis* augmin complex uncovers its critical function in the assembly of the acentrosomal spindle and phragmoplast microtubule arrays. *Plant Cell*. 24:1494-509.
- Janson, M.E., T.G. Setty, A. Paoletti, and P.T. Tran. 2005. Efficient formation of bipolar microtubule bundles requires microtubule-bound gamma-tubulin complexes. *J Cell Biol*. 169:297-308.
- Johmura, Y., N.K. Soung, J.E. Park, L.R. Yu, M. Zhou, J.K. Bang, B.Y. Kim, T.D. Veenstra, R.L. Erikson, and K.S. Lee. 2011. Regulation of microtubule-based microtubule nucleation by mammalian polo-like kinase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:11446-51.
- Jones, D.T., W.R. Taylor, and J.M. Thornton. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci*. 8:275-82.
- Kamasaki, T., E. O'Toole, S. Kita, M. Osumi, J. Usukura, J.R. McIntosh, and G. Goshima. 2013. Augmin-dependent microtubule nucleation at microtubule walls in the spindle. *J Cell Biol*. 202:25-33.
- Katoh, K., K. Misawa, K. Kuma, and T. Miyata. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*. 30:3059-66.

- Katoh, K., and D.M. Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 30:772-80.
- Kellogg, D.R., M. Moritz, and B.M. Alberts. 1994. The centrosome and cellular organization. *Annu Rev Biochem.* 63:639-74.
- Kinoshita, K., B. Habermann, and A.A. Hyman. 2002. XMAP215: a key component of the dynamic microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 12:267-73.
- Kirik, A., D.W. Ehrhardt, and V. Kirik. 2012. TONNEAU2/FASS regulates the geometry of microtubule nucleation and cortical array organization in interphase Arabidopsis cells. *Plant Cell.* 24:1158-70.
- Kitajima, T.S., M. Ohsugi, and J. Ellenberg. 2011. Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell.* 146:568-81.
- Kollman, J.M., C.H. Greenberg, S. Li, M. Moritz, A. Zelter, K.K. Fong, J.J. Fernandez, A. Sali, J. Kilmartin, T.N. Davis, and D.A. Agard. 2015. Ring closure activates yeast gammaTuRC for species-specific microtubule nucleation. *Nat Struct Mol Biol.*
- Kollman, J.M., A. Merdes, L. Mourey, and D.A. Agard. 2011. Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:709-21.
- Kollman, J.M., J.K. Polka, A. Zelter, T.N. Davis, and D.A. Agard. 2010. Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature.* 466:879-82.
- Kong, Z., T. Hotta, Y.R. Lee, T. Horio, and B. Liu. 2010. The {gamma}-tubulin complex protein GCP4 is required for organizing functional microtubule arrays in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell.* 22:191-204.
- Konopka, C.A., and S.Y. Bednarek. 2008. Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *Plant J.* 53:186-96.
- Kosetsu, K., J. de Keijzer, M.E. Janson, and G. Goshima. 2013. MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN65 is essential for

- maintenance of phragmoplast bipolarity and formation of the cell plate in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*. 25:4479-92.
- Kremer, J.R., D.N. Mastronarde, and J.R. McIntosh. 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*. 116:71-6.
- Kubo, M., A. Imai, T. Nishiyama, M. Ishikawa, Y. Sato, T. Kurata, Y. Hiwatashi, R. Reski, and M. Hasebe. 2013. System for stable beta-estradiol-inducible gene expression in the moss *Physcomitrella patens*. *PLoS One*. 8:e77356.
- Lambert, A.M., and A.S. Bajer. 1972. Dynamics of Spindle Fibers and Microtubules during Anaphase and Phragmoplast Formation. *Chromosoma (Berl.)*. 39:101-144.
- Lawo, S., M. Bashkurov, M. Mullin, M.G. Ferreria, R. Kittler, B. Habermann, A. Tagliaferro, I. Poser, J.R. Hutchins, B. Hegemann, D. Pinchev, F. Buchholz, J.M. Peters, A.A. Hyman, A.C. Gingras, and L. Pelletier. 2009. HAUS, the 8-subunit human Augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity. *Curr Biol*. 19:816-26.
- Lecland, N., and J. Luders. 2014. The dynamics of microtubule minus ends in the human mitotic spindle. *Nat Cell Biol*. 16:770-8.
- Lindeboom, J.J., A. Lioutas, E.E. Deinum, S.H. Tindemans, D.W. Ehrhardt, A.M. Emons, J.W. Vos, and B.M. Mulder. 2013a. Cortical microtubule arrays are initiated from a nonrandom prepatter driven by atypical microtubule initiation. *Plant Physiol*. 161:1189-201.
- Lindeboom, J.J., M. Nakamura, A. Hibbel, K. Shundyak, R. Gutierrez, T. Ketelaar, A.M. Emons, B.M. Mulder, V. Kirik, and D.W. Ehrhardt. 2013b. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science*. 342:1245533.
- Liu, T., J. Tian, G. Wang, Y. Yu, C. Wang, Y. Ma, X. Zhang, G. Xia, B. Liu, and Z. Kong. 2014. Augmin triggers microtubule-dependent microtubule nucleation in interphase plant cells. *Curr Biol*. 24:2708-13.
- Lloyd, C., and J. Chan. 2008. The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. *Curr Opin Plant Biol*. 11:641-6.

- Luders, J., U.K. Patel, and T. Stearns. 2006. GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat Cell Biol.* 8:137-47.
- Luders, J., and T. Stearns. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:161-7.
- Manning, A.L., and D.A. Compton. 2007. Mechanisms of spindle-pole organization are influenced by kinetochore activity in mammalian cells. *Curr Biol.* 17:260-5.
- Marshall, W.F., and J.L. Rosenbaum. 1999. Cell division: The renaissance of the centriole. *Curr Biol.* 9:R218-20.
- McNally, F.J., and R.D. Vale. 1993. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell.* 75:419-29.
- Meireles, A.M., K.H. Fisher, N. Colombie, J.G. Wakefield, and H. Ohkura. 2009. Wac: a new Augmin subunit required for chromosome alignment but not for acentrosomal microtubule assembly in female meiosis. *J Cell Biol.* 184:777-84.
- Menand, B., G. Calder, and L. Dolan. 2007. Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *J Exp Bot.* 58:1843-9.
- Meng, W., Y. Mushika, T. Ichii, and M. Takeichi. 2008. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell.* 135:948-59.
- Miki, T., H. Naito, M. Nishina, and G. Goshima. 2014. Endogenous localizome identifies 43 mitotic kinesins in a plant cell. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:E1053-61.
- Miki, T., M. Nishina, and G. Goshima. 2015. RNAi screening identifies the armadillo repeat-containing kinesins responsible for microtubule-dependent nuclear positioning in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.*
- Mishra, R.K., P. Chakraborty, A. Arnaoutov, B.M. Fontoura, and M. Dasso. 2010. The Nup107-160 complex and gamma-TuRC regulate microtubule polymerization at kinetochores. *Nat Cell Biol.* 12:164-9.
- Mitsuhara, I., M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohshima, T. Murakami, Y. Gotoh,

- Y. Katayose, S. Nakamura, R. Honkura, S. Nishimiya, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki, and Y. Ohashi. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37:49-59.
- Moritz, M., and D.A. Agard. 2001. Gamma-tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr Opin Struct Biol.* 11:174-81.
- Motegi, F., N.V. Velarde, F. Piano, and A. Sugimoto. 2006. Two phases of astral microtubule activity during cytokinesis in *C. elegans* embryos. *Dev Cell.* 10:509-20.
- Murata, T., and M. Hasebe. 2007. Microtubule-dependent microtubule nucleation in plant cells. *J Plant Res.* 120:73-8.
- Murata, T., T. Sano, M. Sasabe, S. Nonaka, T. Higashiyama, S. Hasezawa, Y. Machida, and M. Hasebe. 2013. Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nat Commun.* 4:1967.
- Murata, T., S. Sonobe, T.I. Baskin, S. Hyodo, S. Hasezawa, T. Nagata, T. Horio, and M. Hasebe. 2005. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol.* 7:961-8.
- Naito, H., and G. Goshima. 2015. NACK Kinesin Is Required for Metaphase Chromosome Alignment and Cytokinesis in the Moss *Physcomitrella Patens*. *Cell structure Function.*
- Nakamura, M., D.W. Ehrhardt, and T. Hashimoto. 2010. Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array. *Nat Cell Biol.* 12:1064-70.
- Nakamura, M., and T. Hashimoto. 2009. A mutation in the *Arabidopsis* gamma-tubulin-containing complex causes helical growth and abnormal microtubule branching. *J Cell Sci.* 122:2208-17.
- Noguchi, T., M. Koizumi, and S. Hayashi. 2011. Sustained elongation of sperm tail promoted by local remodeling of giant mitochondria in *Drosophila*. *Curr Biol.* 21:805-14.
- O'Connell, K.F., C. Caron, K.R. Kopish, D.D. Hurd, K.J. Kempfues, Y. Li,

- and J.G. White. 2001. The *C. elegans* *zyg-1* gene encodes a regulator of centrosome duplication with distinct maternal and paternal roles in the embryo. *Cell*. 105:547-58.
- Oakley, C.E., and B.R. Oakley. 1989. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*. 338:662-4.
- Okano, Y., N. Aono, Y. Hiwatashi, T. Murata, T. Nishiyama, T. Ishikawa, M. Kubo, and M. Hasebe. 2009. A polycomb repressive complex 2 gene regulates apogamy and gives evolutionary insights into early land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:16321-6.
- Ori-McKenney, K.M., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2012. Golgi outposts shape dendrite morphology by functioning as sites of acentrosomal microtubule nucleation in neurons. *Neuron*. 76:921-30.
- Pastuglia, M., J. Azimzadeh, M. Goussot, C. Camilleri, K. Belcram, J.L. Evrard, A.C. Schmit, P. Guerche, and D. Bouchez. 2006. Gamma-tubulin is essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 18:1412-25.
- Petry, S., A.C. Groen, K. Ishihara, T.J. Mitchison, and R.D. Vale. 2013. Branching microtubule nucleation in *Xenopus* egg extracts mediated by augmin and TPX2. *Cell*. 152:768-77.
- Petry, S., C. Pugieux, F.J. Nedelec, and R.D. Vale. 2011. Augmin promotes meiotic spindle formation and bipolarity in *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:14473-8.
- Popov, A.V., F. Severin, and E. Karsenti. 2002. XMAP215 is required for the microtubule-nucleating activity of centrosomes. *Curr Biol*. 12:1326-30.
- Prigge, M.J., and M. Bezanilla. 2010. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development*. 137:3535-43.
- Rensing, S.A., D. Lang, A.D. Zimmer, A. Terry, A. Salamov, H. Shapiro, T. Nishiyama, P.F. Perroud, E.A. Lindquist, Y. Kamisugi, T. Tanahashi, K. Sakakibara, T. Fujita, K. Oishi, I.T. Shin, Y. Kuroki, A. Toyoda, Y. Suzuki, S. Hashimoto, K. Yamaguchi, S. Sugano, Y. Kohara, A. Fujiyama, A. Anterola, S. Aoki, N. Ashton, W.B. Barbazuk, E. Barker,

- J.L. Bennetzen, R. Blankenship, S.H. Cho, S.K. Dutcher, M. Estelle, J.A. Fawcett, H. Gundlach, K. Hanada, A. Heyl, K.A. Hicks, J. Hughes, M. Lohr, K. Mayer, A. Melkozernov, T. Murata, D.R. Nelson, B. Pils, M. Prigge, B. Reiss, T. Renner, S. Rombauts, P.J. Rushton, A. Sanderfoot, G. Schween, S.H. Shiu, K. Stueber, F.L. Theodoulou, H. Tu, Y. Van de Peer, P.J. Verrier, E. Waters, A. Wood, L. Yang, D. Cove, A.C. Cuming, M. Hasebe, S. Lucas, B.D. Mishler, R. Reski, I.V. Grigoriev, R.S. Quatrano, and J.L. Boore. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*. 319:64-9.
- Rivero, S., J. Cardenas, M. Bornens, and R.M. Rios. 2009. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J*. 28:1016-28.
- Rogers, G.C., N.M. Rusan, M. Peifer, and S.L. Rogers. 2008. A multicomponent assembly pathway contributes to the formation of acentrosomal microtubule arrays in interphase *Drosophila* cells. *Mol Biol Cell*. 19:3163-78.
- Samejima, I., V.J. Miller, L.M. Grocock, and K.E. Sawin. 2008. Two distinct regions of Mto1 are required for normal microtubule nucleation and efficient association with the gamma-tubulin complex in vivo. *J Cell Sci*. 121:3971-80.
- Schuh, M., and J. Ellenberg. 2007. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell*. 130:484-98.
- Shimamura, M., R.C. Brown, B.E. Lemmon, T. Akashi, K. Mizuno, N. Nishihara, K. Tomizawa, K. Yoshimoto, H. Deguchi, H. Hosoya, T. Horio, and Y. Mineyuki. 2004. Gamma-tubulin in basal land plants: characterization, localization, and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. *Plant Cell*. 16:45-59.
- Smertenko, A.P., B. Piette, and P.J. Hussey. 2011. The origin of phragmoplast asymmetry. *Curr Biol*. 21:1924-30.
- Strepp, R., S. Scholz, S. Kruse, V. Speth, and R. Reski. 1998. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the

- bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4368-73.
- Sui, H., and K.H. Downing. 2010. Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure.* 18:1022-31.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731-9.
- Tilney, L.G., J. Bryan, D.J. Bush, K. Fujiwara, M.S. Mooseker, D.B. Murphy, and D.H. Snyder. 1973. Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol.* 59:267-75.
- Tokunaga, M., N. Imamoto, and K. Sakata-Sogawa. 2008. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat Methods.* 5:159-61.
- Toya, M., M. Terasawa, K. Nagata, Y. Iida, and A. Sugimoto. 2011. A kinase-independent role for Aurora A in the assembly of mitotic spindle microtubules in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat Cell Biol.* 13:708-14.
- Tsai, M.Y., and Y. Zheng. 2005. Aurora A kinase-coated beads function as microtubule-organizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly. *Curr Biol.* 15:2156-63.
- Uehara, R., and G. Goshima. 2009. [Mitotic spindle formation mediated by augmin protein complex]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 54:1850-5.
- Uehara, R., and G. Goshima. 2010. Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase. *J Cell Biol.* 191:259-67.
- Uehara, R., R.S. Nozawa, A. Tomioka, S. Petry, R.D. Vale, C. Obuse, and G. Goshima. 2009. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:6998-7003.
- Verollet, C., N. Colombie, T. Daubon, H.M. Bourbon, M. Wright, and B. Raynaud-Messina. 2006. *Drosophila melanogaster* gamma-TuRC is

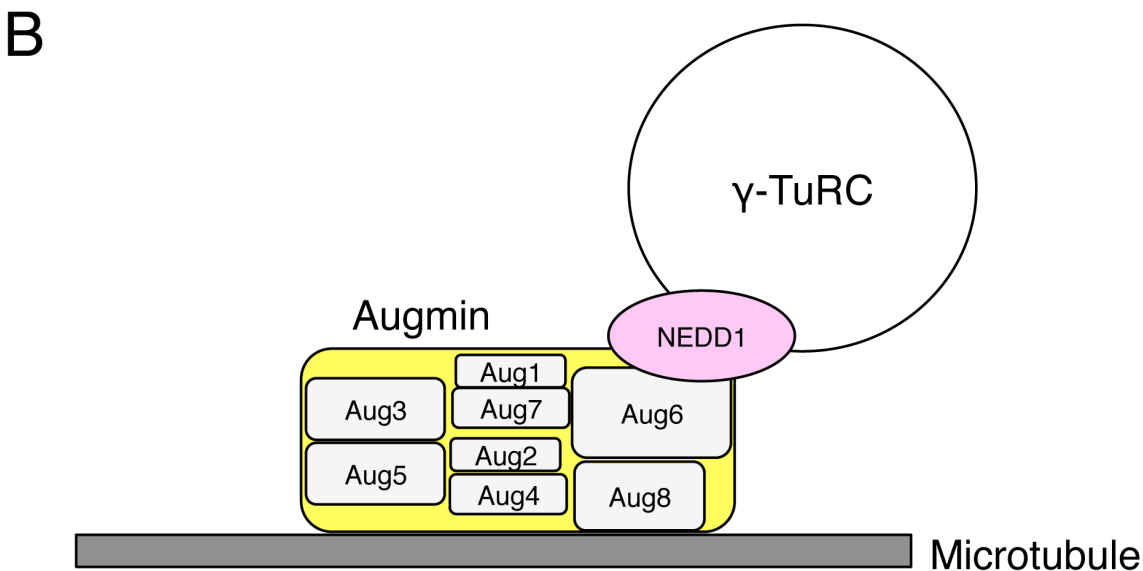
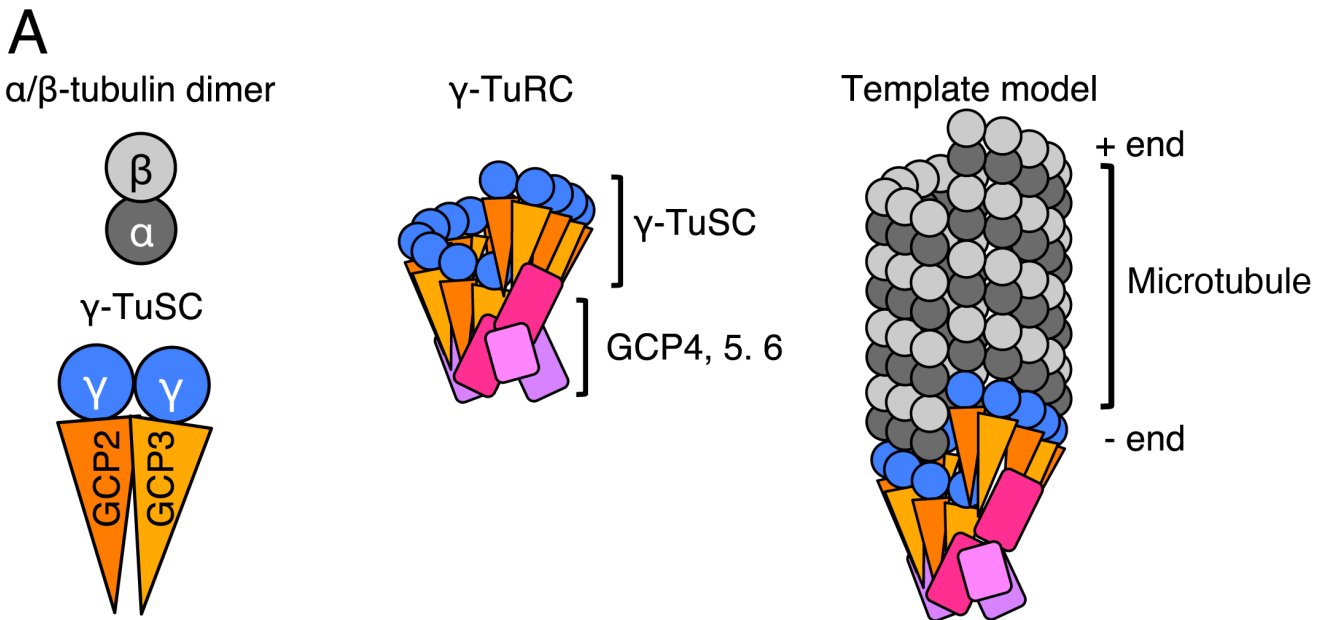


- dispensable for targeting gamma-tubulin to the centrosome and microtubule nucleation. *J Cell Biol.* 172:517-28.
- Vidali, L., R.C. Augustine, K.P. Kleinman, and M. Bezanilla. 2007. Profilin is essential for tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell.* 19:3705-22.
- Vidali, L., C.M. Rounds, P.K. Hepler, and M. Bezanilla. 2009a. Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells. *PLoS One.* 4:e5744.
- Vidali, L., P.A. van Gisbergen, C. Guerin, P. Franco, M. Li, G.M. Burkart, R.C. Augustine, L. Blanchoin, and M. Bezanilla. 2009b. Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:13341-6.
- Wainman, A., D.W. Buster, T. Duncan, J. Metz, A. Ma, D. Sharp, and J.G. Wakefield. 2009. A new Augmin subunit, Msd1, demonstrates the importance of mitotic spindle-templated microtubule nucleation in the absence of functioning centrosomes. *Genes Dev.* 23:1876-81.
- Walczak, C.E., and R. Heald. 2008. Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int Rev Cytol.* 265:111-58.
- Walia, A., M. Nakamura, D. Moss, V. Kirik, T. Hashimoto, and D.W. Ehrhardt. 2014. GCP-WD mediates gamma-TuRC recruitment and the geometry of microtubule nucleation in interphase arrays of *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 24:2548-55.
- Wasteneys, G.O., and J.C. Ambrose. 2009. Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19:62-71.
- Wasteneys, G.O., and M.E. Galway. 2003. Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annu Rev Plant Biol.* 54:691-722.
- Widlund, P.O., J.H. Stear, A. Pozniakovsky, M. Zanic, S. Reber, G.J. Brouhard, A.A. Hyman, and J. Howard. 2011. XMAP215 polymerase activity is built by combining multiple tubulin-binding TOG domains and a basic lattice-binding region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:2741-6.

- Zekert, N., D. Veith, and R. Fischer. 2010. Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryot Cell*. 9:795-805.
- Zhang, Q., E. Fishel, T. Bertroche, and R. Dixit. 2013. Microtubule severing at crossover sites by katanin generates ordered cortical microtubule arrays in *Arabidopsis*. *Curr Biol*. 23:2191-5.
- Zheng, Y., M.L. Wong, B. Alberts, and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*. 378:578-83.
- Zuo, J., Q.W. Niu, and N.H. Chua. 2000. Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J*. 24:265-73.

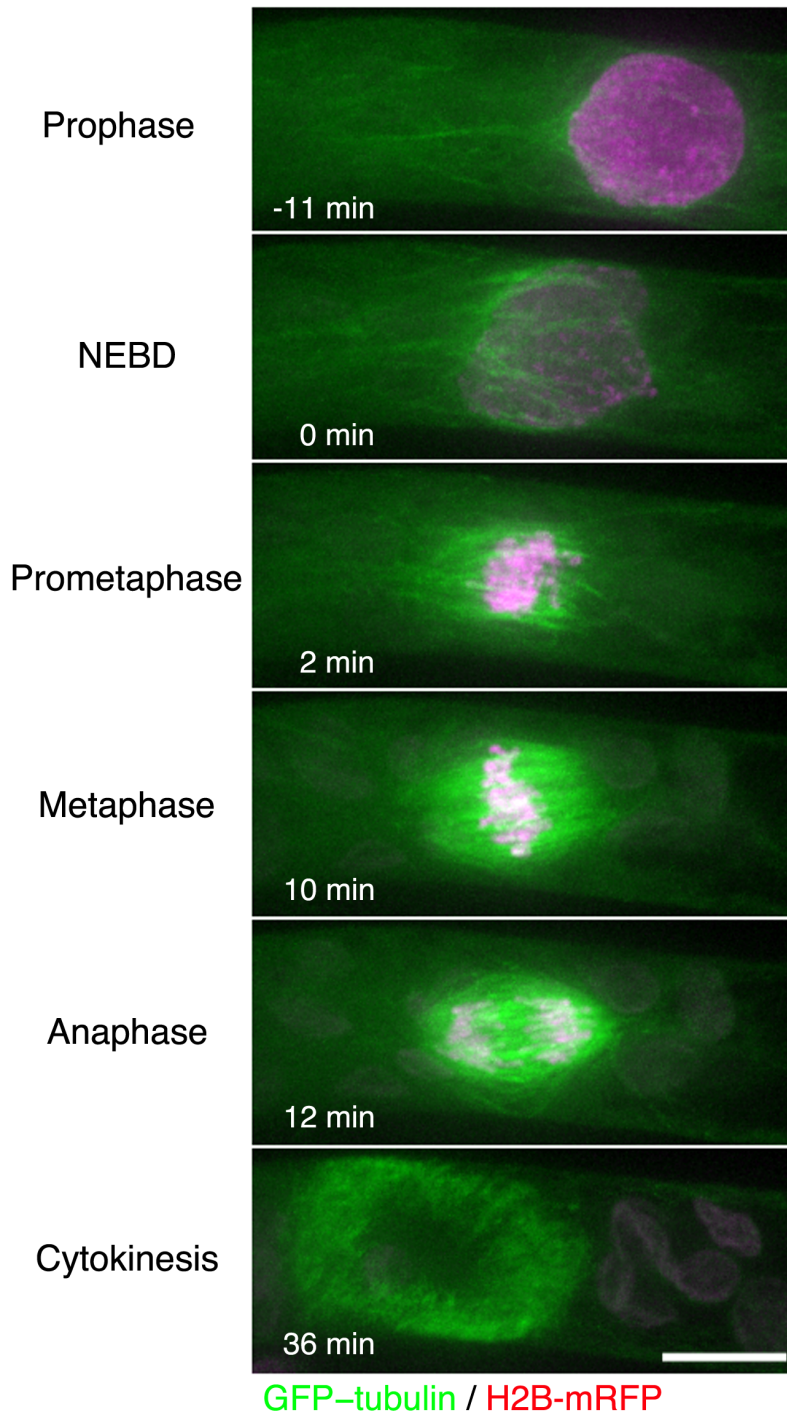
三木智博、「ヒメツリガネゴケにおけるスピンドル微小管形成過程の高解像度ライブ観察」、名古屋大学修士論文

藤岡竜太、「ヒメツリガネゴケにおける RNAi スクリーニングに向けた自動画像解析プログラムの開発」、名古屋大学卒業論文



**図 0-1  $\gamma$ -Tubulin 複合体とオーグミン複合体の模式図**

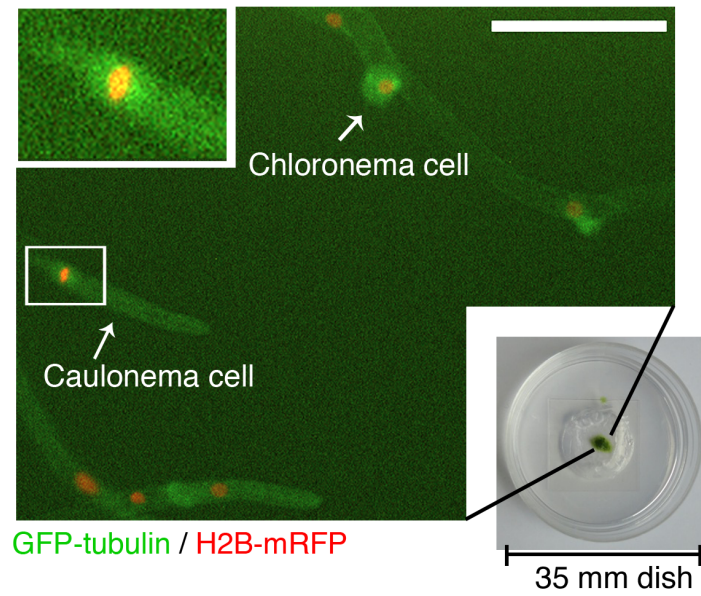
(A)微小管および  $\gamma$ -tubulin 複合体( $\gamma$ -TuRC)の模式図。 $\gamma$ -TuRC がリング状の構造を形成することから、テンプレートモデルが提唱されている(Zheng et al., 1995)。 $\gamma$ -TuRC が微小管のマイナス端と結合していること(Moritz and Agard, 2001)が報告されている。Kollman et al., (2011)の図 2 を改変。(B)オーグミンの模式図。Dgt4/Hice1/HAUS8 サブユニット(この図では Aug8 と表した)が直接微小管と結合すること(Tsai et al., 2011; Wu et al., 2008)、Dgt6/FAM29A/HAUS6 サブユニット(この図では Aug6 と表した)が NEDD1 を介して  $\gamma$ -TuRC と結合すること(Uehara et al., 2009)、オーグミン複合体が Y 字型の構造をとること(Hsia et al., 2014)が報告されている。



**図 0-2 ヒメツリガネゴケ原系体細胞における細胞分裂の様子**

GFP-tubulin (緑)/H2B-mRFP (赤)発現株を用いた分裂期の生細胞観察。13枚のzスタック(1 μm ごと)を最高輝度プロジェクションした。核膜崩壊を0分とした。スケールバーは10 μm。

A



B

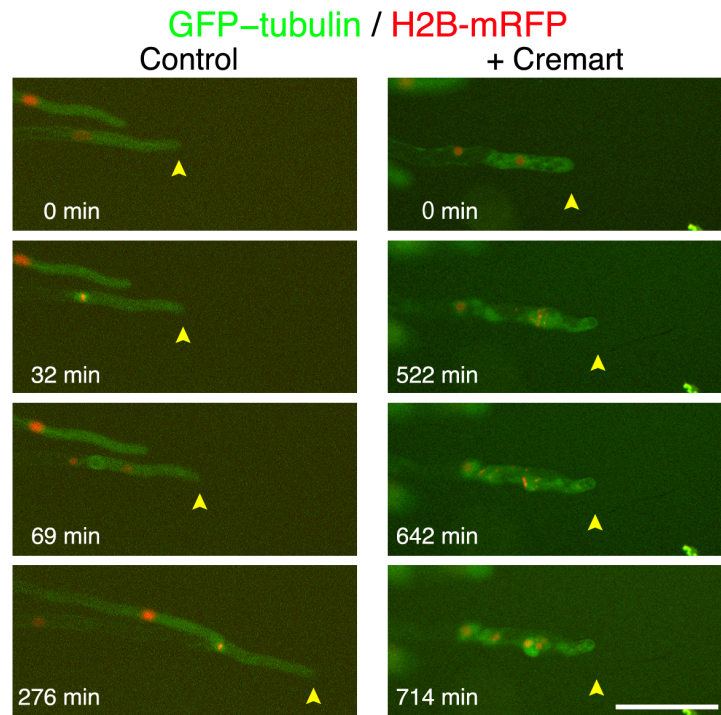
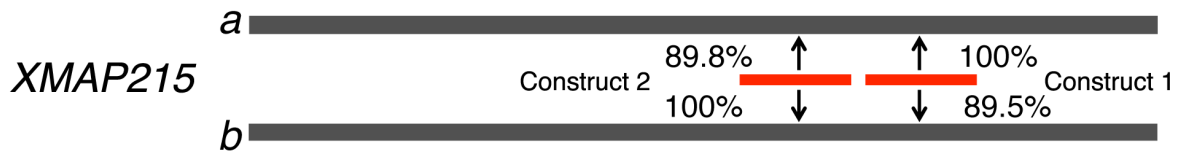


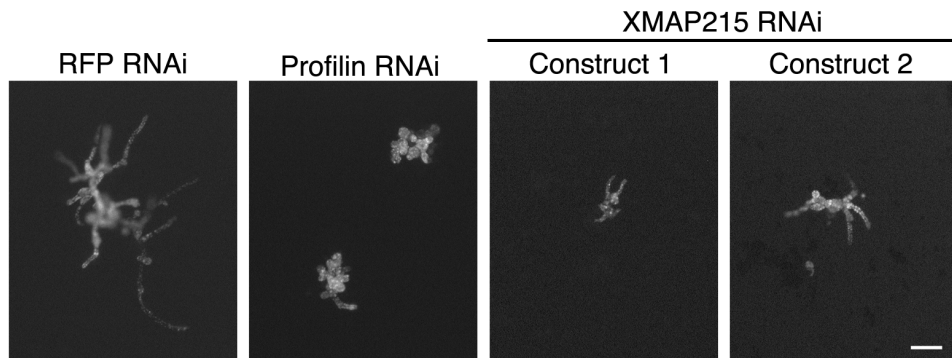
図 1-1 低解像度でのタイムラプスイメージング

(A) 10 ×対物レンズを用いた GFP-tubulin (緑)/H2B-mRFP (赤)発現株の原糸体のタイムラプス観察画像。左上にスピンドルの拡大図を示した。(B) 0分で観察を開始し、観察直前に微小管重合阻害剤 cremart (最終濃度 20 μM)を加えた。スケールバーは 100 μm。

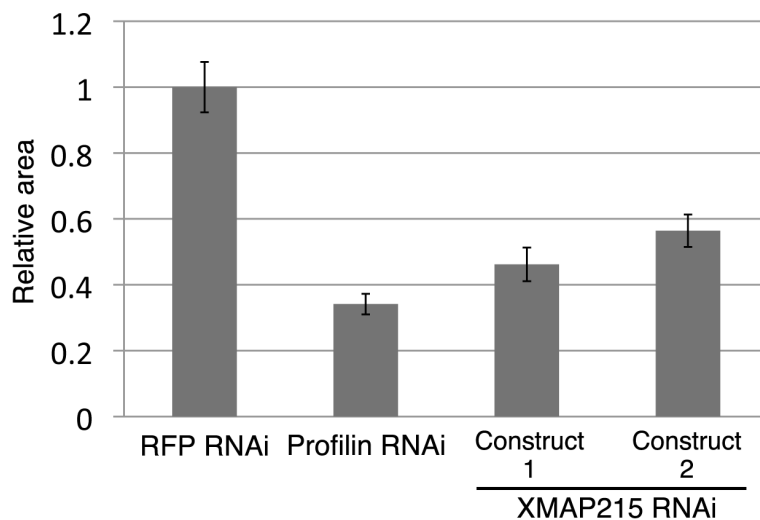
A



B



C



**図 1-2 従来の RNAi 法による XMAP215 のノックダウン**

(A)この実験で使用した、 $XMAP215$  遺伝子に対する RNAi コンストラクトの模式図。ヒメツリガネゴケの  $XMAP215$  には相同性の高いパラログ(-a と -b、アミノ酸配列の 92%が相同)が存在する。灰色と赤色のバーはそれぞれ cDNA と dsRNA を示す。図中の数字(%)は dsRNA と cDNA との塩基配列の相同性を示す。(B)  $XMAP215$  RNAi コンストラクトの形質転換によりコントロールである RFP RNAi と比較してプロトプラストから再生された細胞の長さが短くなり、コロニーも小さくなった。先端成長を抑制することが知られている profilin RNAi でも同様に細胞の長さが短くなり、コロニーも小さくなった。CY5 フィルターを用いて撮影された葉緑体の自家蛍光を示す。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。(C)葉緑体の自家蛍光により得られた画像から面積を測定し、1つのプロトプラストから再生したコロニーの大きさを比較した縦軸は RFP RNAi のコロニーの面積を 1 とした時の相対値を示す。  $n = 42-68$ 。

A



B

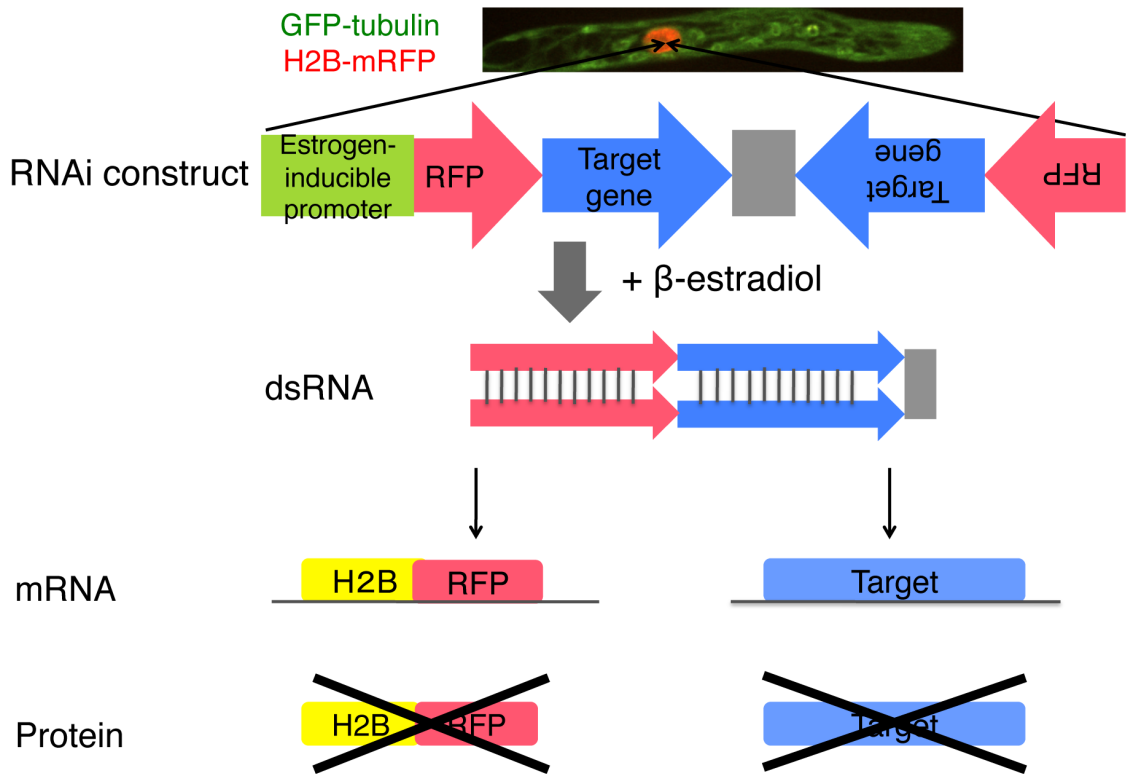


図 1-3 ヒメツリガネゴケにおける誘導型 RNAi 系の模式図

(A) 誘導型 RNAi 系のベクター(pGG626)マップ(プラスミドは五島剛太教授、久保稔博士によって作成された)。標的遺伝子の部分配列を LR 反応により ccdB 配列と入れ替えることで、RFP と標的遺伝子の両方の dsRNA を発現するコンストラクトを容易に作製できる。(B) 誘導型 RNAi 系の流れ。誘導的に発現を制御するプロモーターと dsRNA の配列を GFP-tubulin/H2B-mRFP 発現株に組み込んだ。培地に  $\beta$ -エストラジオールを添加することにより転写が起こり、H2B-mRFP と標的遺伝子の両方に対する dsRNA が形成される。

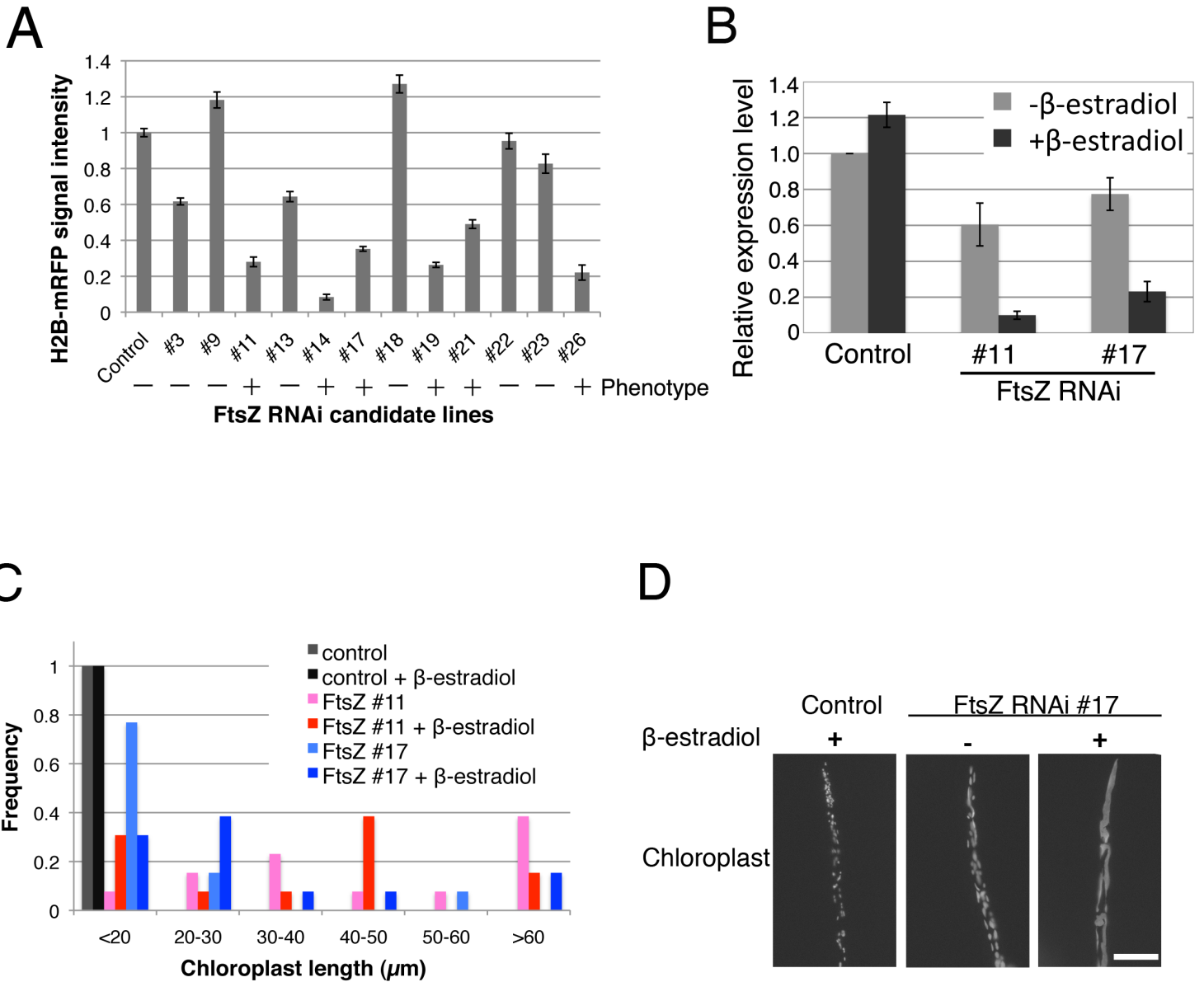
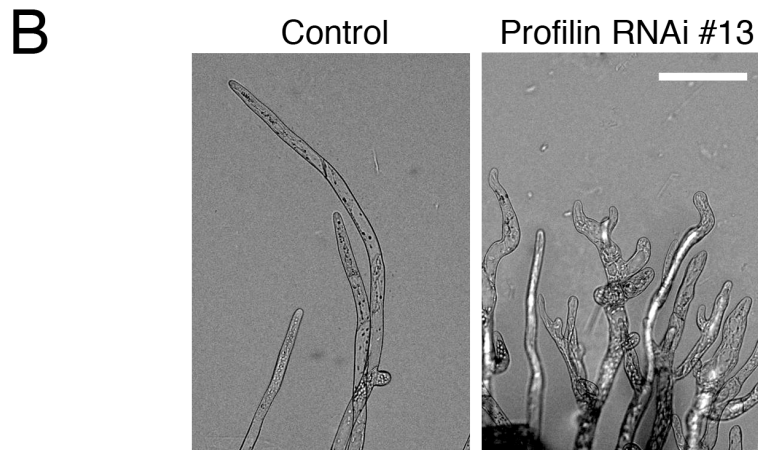
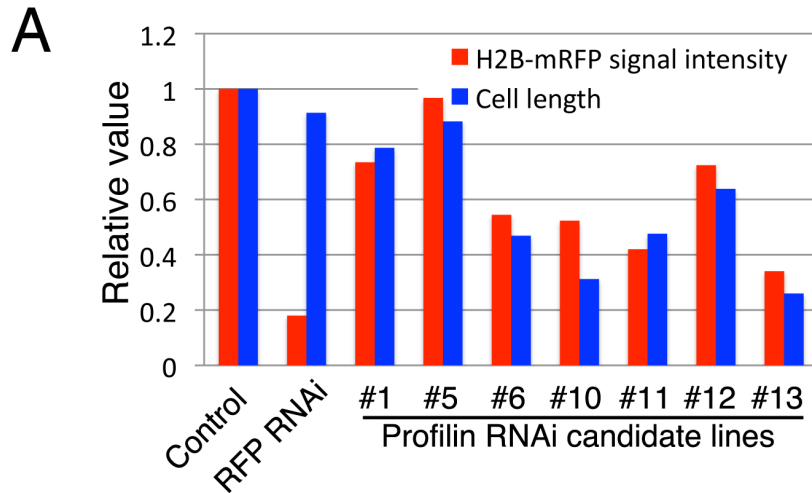


図 1-4 FtsZ RNAi 株における誘導型 RNAi 系の有効性の確認

(A) FtsZ RNAi 株の RFP 蛍光強度による株の選抜例。安定な 12 株の形質転換体 (RNAi 候補株) を、5 日間  $\beta$ -エストラジオールを含む培地で培養し、H2B-mRFP 蛍光強度を定量した。コントロールには  $\beta$ -エストラジオールを含む培地で培養した親株(GFP-tubulin/ヒストン H2B-mRFP 発現株)を使用した。同時に葉緑体サイズを目で見て評価した。+ は表現型が出ている(葉緑体が大きくなっている)ことを示す。コントロールを 1 としたときの H2B-mRFP 蛍光強度の相対値を SEM とともに示した( $n = 84-459$ )。 (B) qRT-PCR による FtsZ の mRNA 量の定量。RNAi 株において  $\beta$ -エストラジオール依存的に mRNA 量が減少した。 (C) 2 つの FtsZ RNAi 株 #11、#17 における表現型の定量。 $\beta$ -エストラジオールの有無での葉緑体サイズを測定した。先端から 2 番目の細胞で最も大きな葉緑体の長さを測定した。#11 では  $\beta$ -エストラジオールを添加しない条件でも非常に長い葉緑体が観察されたのに対し、#17 では  $\beta$ -エストラジオールを添加した場合のみ長い葉緑体が認められた。コントロールには RFP RNAi 株(pGG626 を形質転換した株)を用いた。(D) FtsZ RNAi #17 株において  $\beta$ -エストラジオール依存的に巨大な葉緑体が出現した。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。





**図 1-5 プロフィリン RNAi 株では RFP シグナル強度と表現型に相関がある**

**(A)** プロフィリン RNAi 株の選択。7つの形質転換体(RNAi 候補株)を、 $\beta$ -エストラジオールを含む培地で5日間培養後、H2B-mRFP 蛍光強度と細胞の長さ(先端から2番目の細胞を用いた)を計測した( $n = 24-36$ )

**(B)** RNAi を誘導したプロフィリン RNAi #13 株では短い細胞が観察された。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

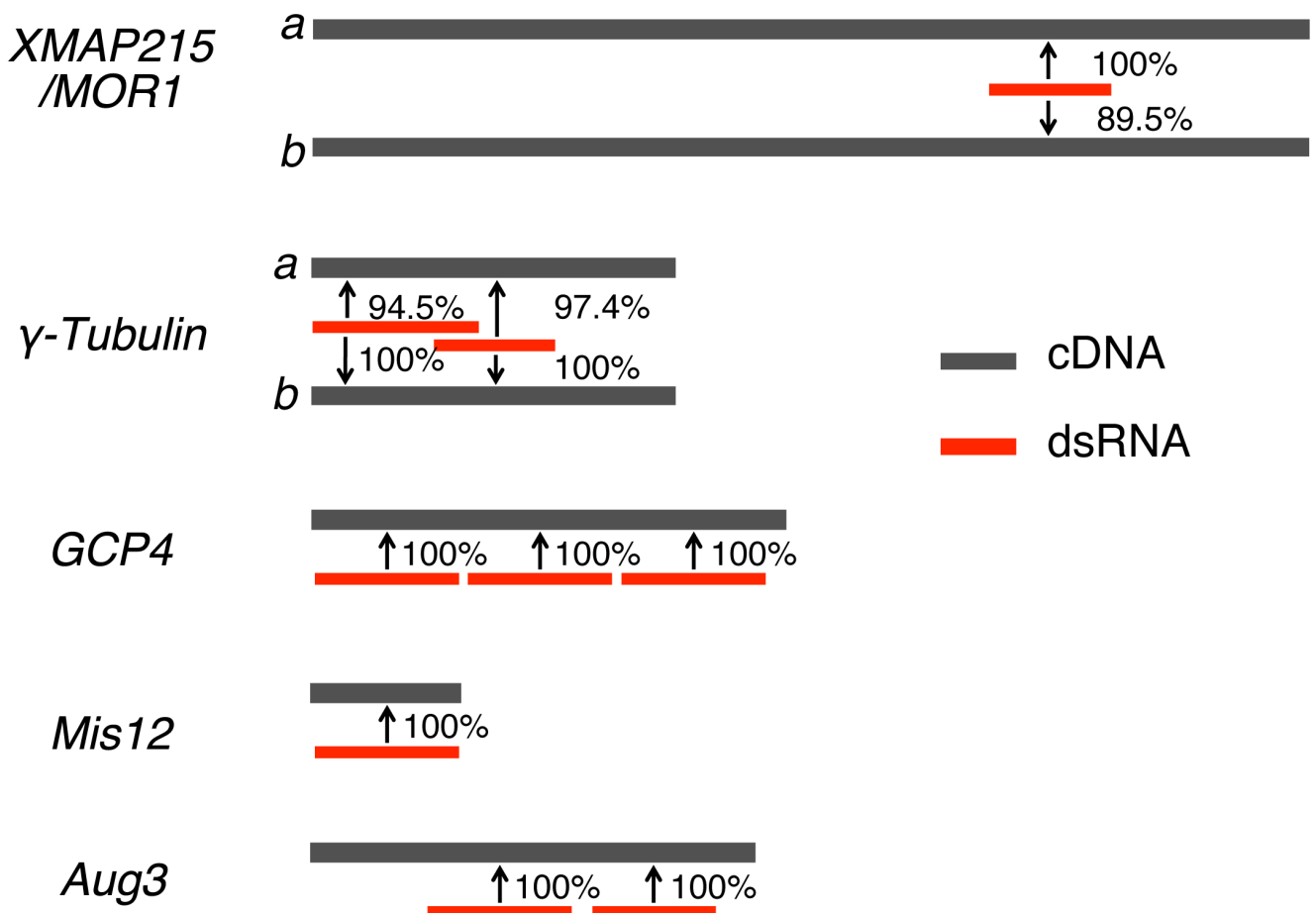


図 1-6 標的とした遺伝子の RNAi コンストラクト

結果の第一章、第二章で標的とした遺伝子と標的部位の模式図。灰色と赤色はそれぞれ cDNA と dsRNA を示す。ヒメツリガネゴケの XMAP215 と  $\gamma$ -tubulin には相同性の高い 2 つのパラログが存在する。 $\gamma$ -tubulin-a (TubG1) と  $\gamma$ -tubulin-b (TubG2) は 475 アミノ酸のうち 99% が相同であり、XMAP215-a (2,006 aa) と XMAP215-b (2,002 aa) はアミノ酸配列の 92% が相同である。これらの遺伝子に対しては両方の遺伝子で相同性の高い領域を用いて RNAi コンストラクトを設計した。図中の数字(%)は dsRNA と cDNA との塩基配列の相同性を示す。

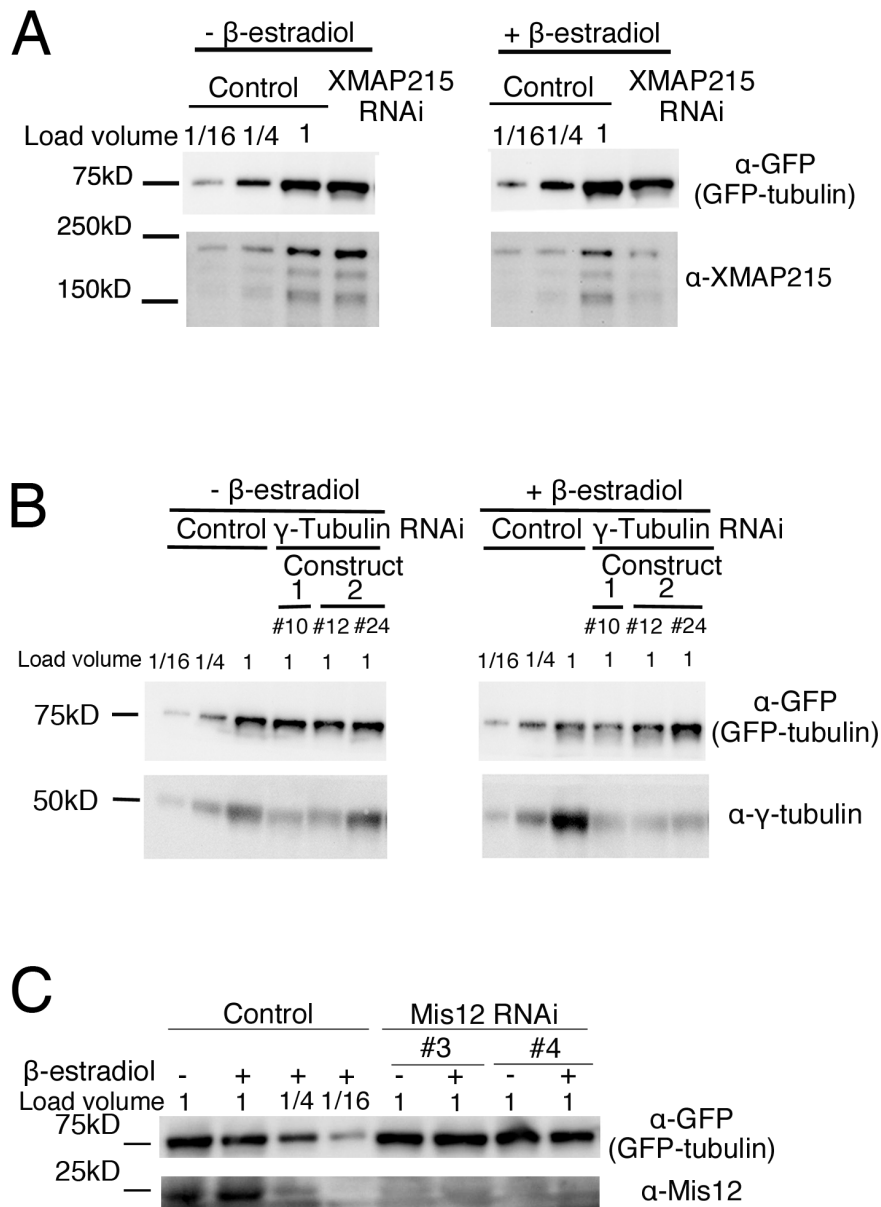
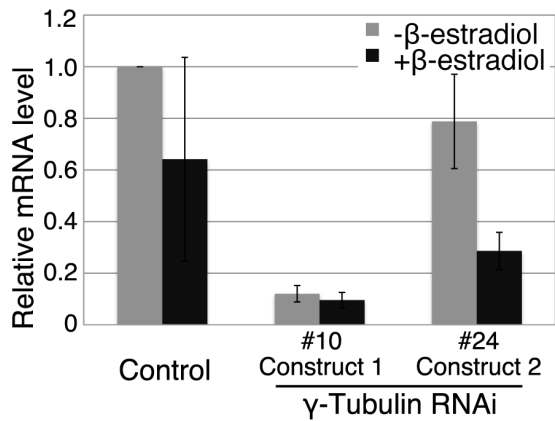
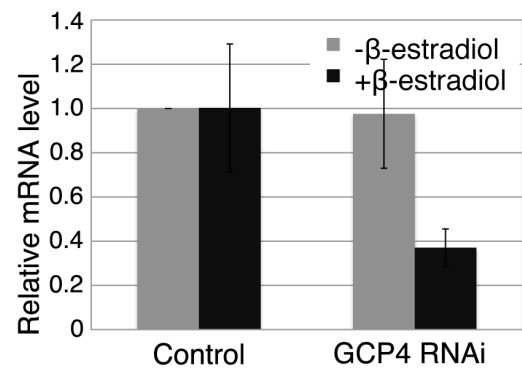
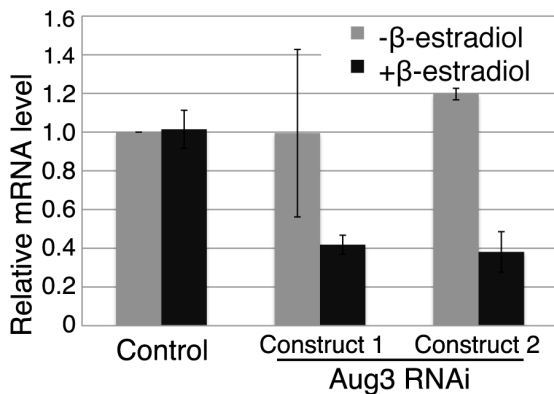


図 1-7 免疫プロットによる標的遺伝子の RNAi ノックダウンの確認

(A-C) 原系体細胞の細胞抽出液を用いた XMAP215、 $\gamma$ -tubulin、Mis12 の免疫プロット。内在性コントロールとして GFP-tubulin タンパク質を用いた。RNAi 株で標的の遺伝子産物が減少した(61–81%)。 $\beta$ -エストラジオール依存的に標的遺伝子産物の減少が確認された株もあったが(例えば XMAP215)、中には  $\beta$ -エストラジオール添加後の減少が顕著でない株もあった(例えば  $\gamma$ -tubulin #10)。

**A****B****C**

### 図 1-8 qRT-PCR による標的遺伝子の RNAi ノックダウンの確認

(A-C) qRT-PCR により  $\gamma$ -tubulin、GCP4、Aug3 の RNAi 株において mRNA 量の定量を行い、 $\beta$ -エストラジオール依存的な mRNA 量の減少を確かめた。 $\gamma$ -Tubulin RNAi のコンストラクト 1 ライン#10 では  $\beta$ -エストラジオールを添可しない条件でも mRNA 量の減少が確認されたが、分裂異常は  $\beta$ -エストラジオール添加後に顕著に確認された。

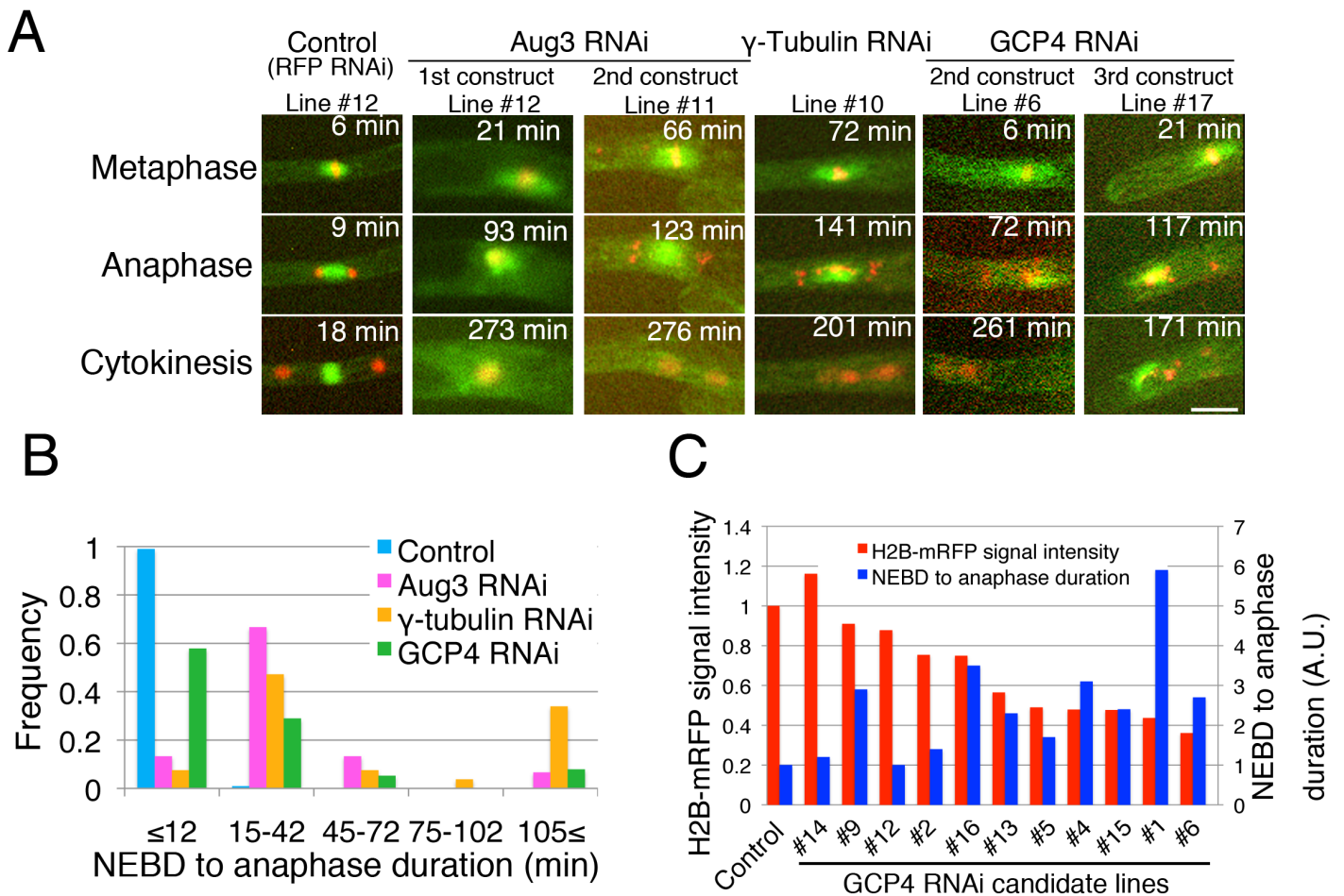
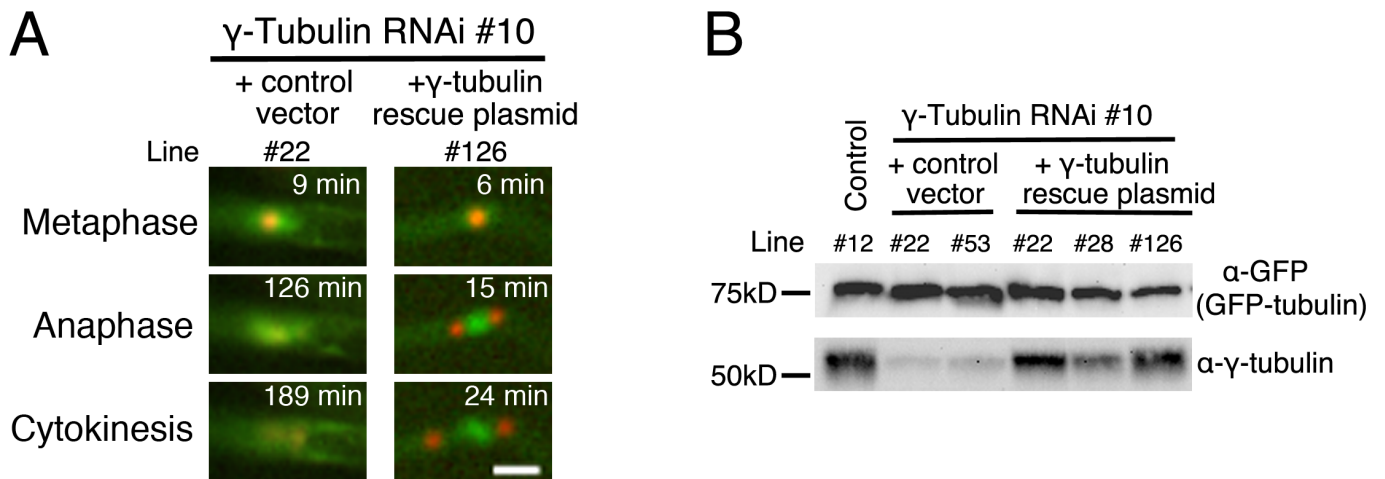


図 2-1 オーグミン、 $\gamma$ -TuRC のノックダウンにより細胞分裂に異常が生じる

(A) Aug3 (オーグミンサブユニット)、 $\gamma$ -tubulin、GCP4 ( $\gamma$ -TuRC のサブユニット)の RNAi 株の RNAi 誘導後の細胞分裂の様子。緑で GFP-tubulin、赤で H2B-mRFP を示した。核膜崩壊を 0 分とした。スケールバーは 20  $\mu$ m。(B) Aug3、 $\gamma$ -tubulin、GCP4 のノックダウン後に細胞分裂の遅延が観察された。分裂時間(核膜崩壊から後期開始)は 3 分ごとに撮影したタイムラプス観察画像をもとに算出した。(C) GCP4 RNAi 株においても RFP 蛍光強度と表現型には相関がみられた。11 株の安定な形質転換体を選び(RNAi 候補株)  $\beta$ -エストラジオールで 5 日間処理した後、H2B-mRFP 蛍光強度を定量した。5-7 日間  $\beta$ -エストラジオールで処理した株において核膜崩壊から後期開始までの所要時間を測定した( $n = 6-38$ )。



**図 2-2 RNAi 耐性の  $\gamma$ -tubulin-b 遺伝子の強制発現により分裂異常はレスキューされる**

(A)  $\gamma$ -Tubulin RNAi により生じる分裂異常は RNAi に耐性を持つ  $\gamma$ -tubulin-b 遺伝子の強制発現によりレスキューされた。緑で GFP-tubulin、赤で H2B-mRFP を示した。核膜崩壊を 0 分とした。スケールバーは 20  $\mu$ m。(B) 原糸体細胞の細胞抽出液を用いた  $\gamma$ -tubulin の免疫プロット。独立の数株でタンパク質量を調べた。

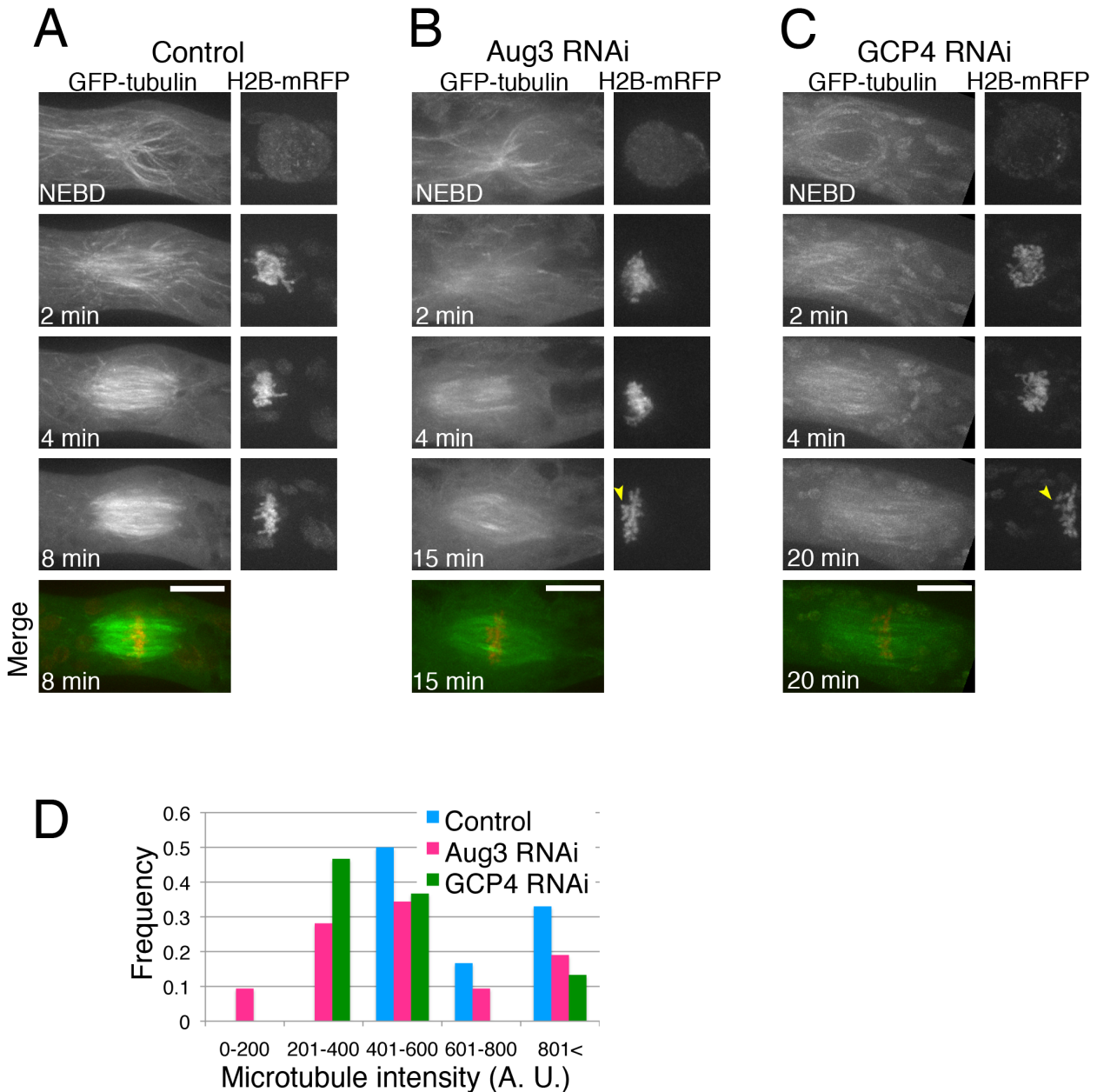
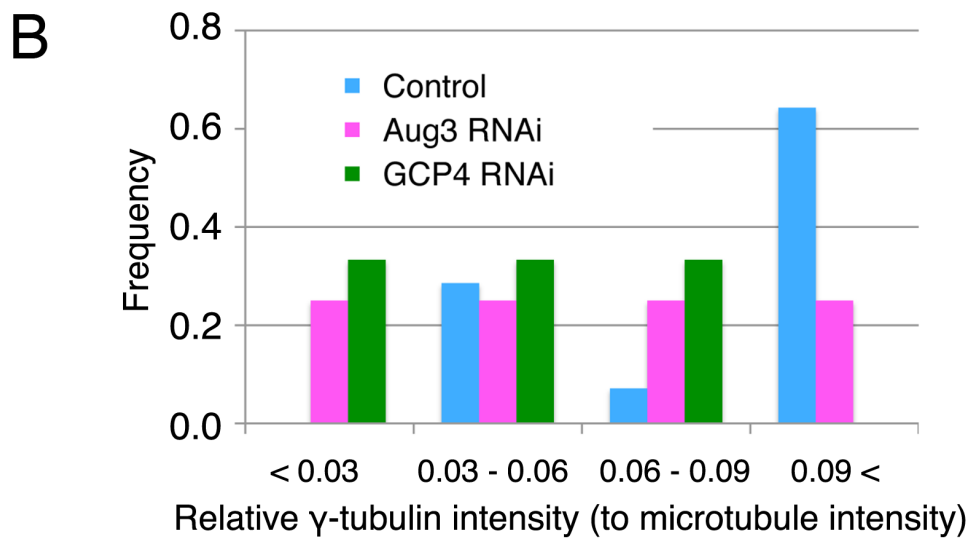
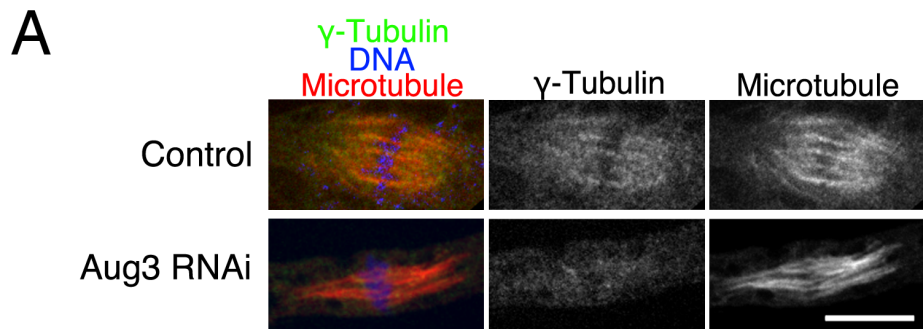


図 2-3 オーグミンおよび  $\gamma$ -TuRC の RNAi ノックダウンにより分裂前中期スピンドルの微小管蛍光強度が減少する

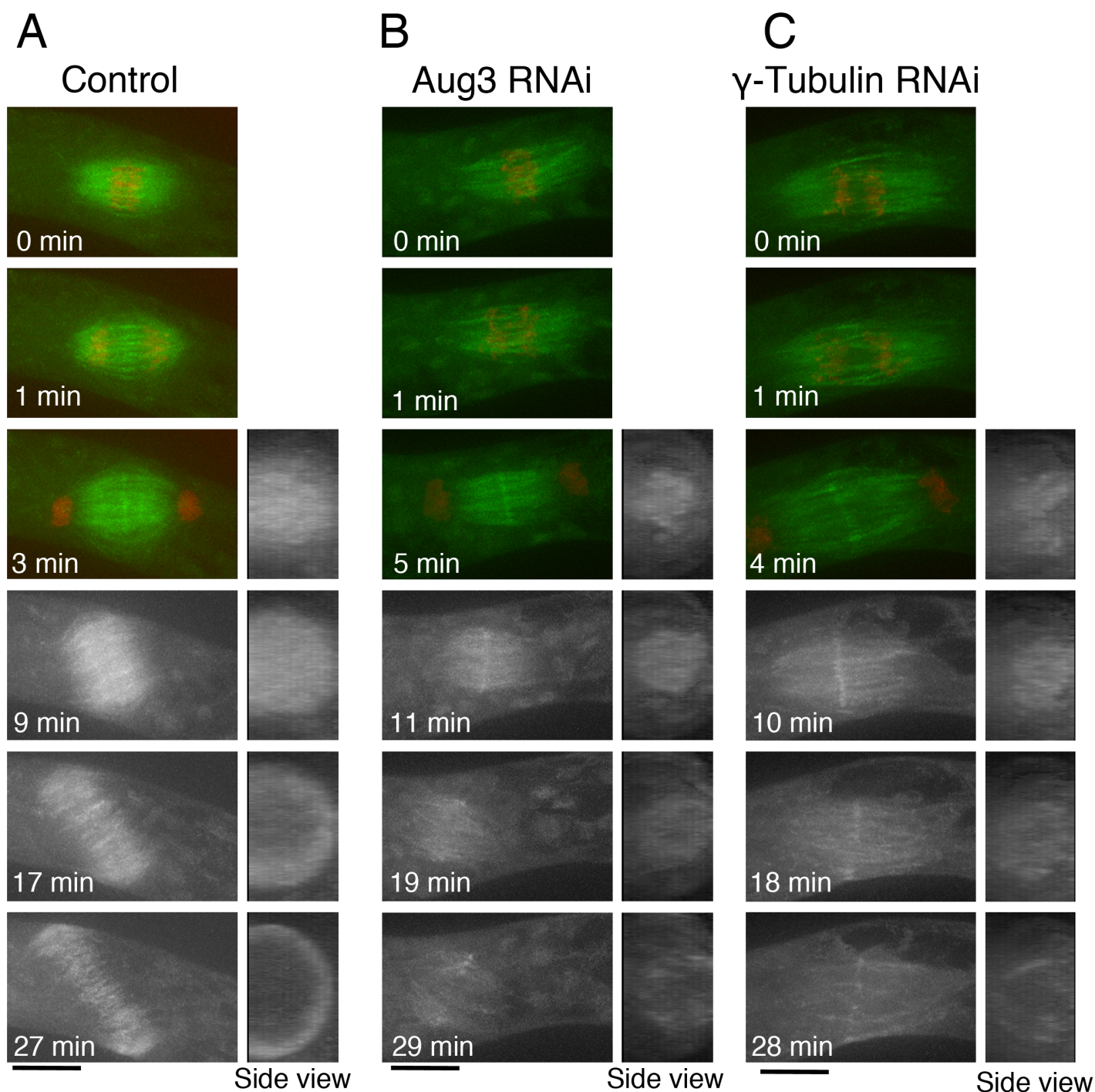
(A–C) GFP-tubulin(緑)および H2B-mRFP(赤)を発現したカウロネマ細胞のスピニングディスク型共焦点蛍光顕微鏡によるタイムラプス観察像。コントロールは 10 細胞、Aug3 RNAi は 9 細胞、GCP4 RNAi は 11 細胞を観察し、その代表的な像を示した。図は 1 分ごとに撮影した 13 枚の z スタック(1  $\mu$ m ごとに撮影)の最高輝度プロジェクション画像である。矢尻は整列異常の染色体を表す。核膜崩壊を 0 分とした。スケールバーは 10  $\mu$ m。(D) Aug3 および GCP4 の RNAi ノックダウンによりスピンドル微小管の蛍光強度が減少した( $n = 18$ –32)。GFP-tubulin の蛍光強度は染色体から 2  $\mu$ m と 7  $\mu$ m の地点で測定した。この実験は三木智博氏と共同で行った。



**図 2-4 オーグミンのノックダウンによりスピンドル上の  $\gamma$ -tubulin が減少する**

(A)  $\gamma$ -Tubulin の免疫染色像。Aug3 の RNAi ノックダウンによりスピンドル上の  $\gamma$ -tubulin の局在の減少が認められた。微小管は GFP-tubulin の蛍光を用いて撮影した。スケールバーは 10  $\mu$ m。 (B) Aug3、GCP4 を RNAi した細胞のキネトコア微小管上の微小管あたりの  $\gamma$ -tubulin の蛍光強度を測定した。染色体から 20 pixel の 2 地点を測定した。





**図 2-5 オーグミンおよび  $\gamma$ -tubulin の RNAi ノックダウンによりフラグモプラスト微小管の形成が劇的に抑制される**

(A–C) GFP-tubulin (緑)および H2B-mRFP (赤)を発現したカウロネマ細胞のスピニングディスク型共焦点蛍光顕微鏡によるタイムラプス観察像。図は 1 分ごとに撮影した 13 枚の z スタック(1  $\mu$ m ごとに撮影)の最高輝度プロジェクション画像である。分裂後期以降の表現型を観察するため、大部分の細胞が分裂後期に進行する表現型の弱い  $\gamma$ -tubulin RNAi #24 株を用いた(8 細胞中 5 細胞がこの表現型を示した)。13 枚の z スタックは細胞の幅よりも狭いため、コントロール細胞ではフラグモプラストのリング構造が部分的にしか観察できていない。染色体分離が起こったフレームを 0 分とした。スケールバーは 10  $\mu$ m。この実験は三木智博氏との共同でおこなった。

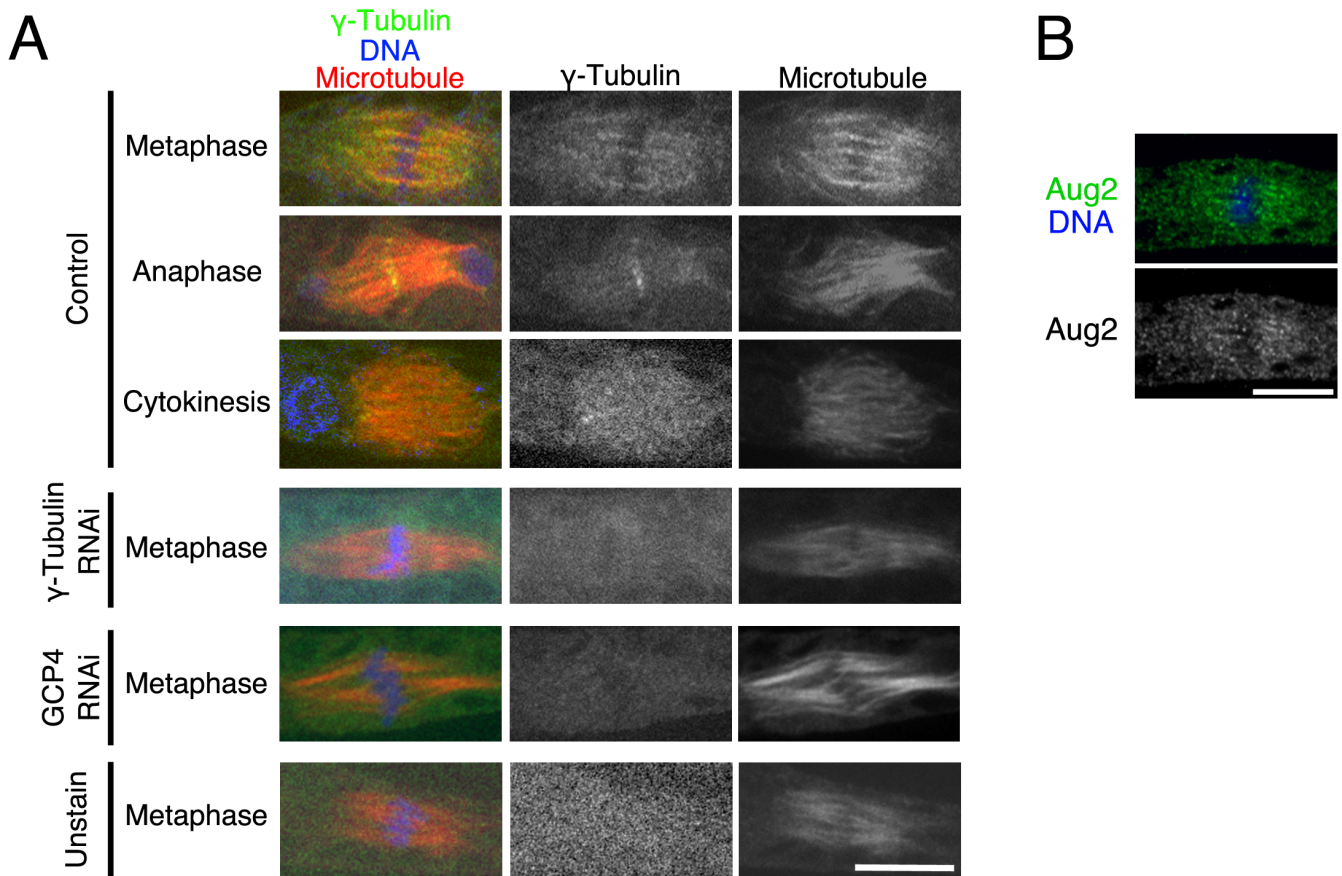
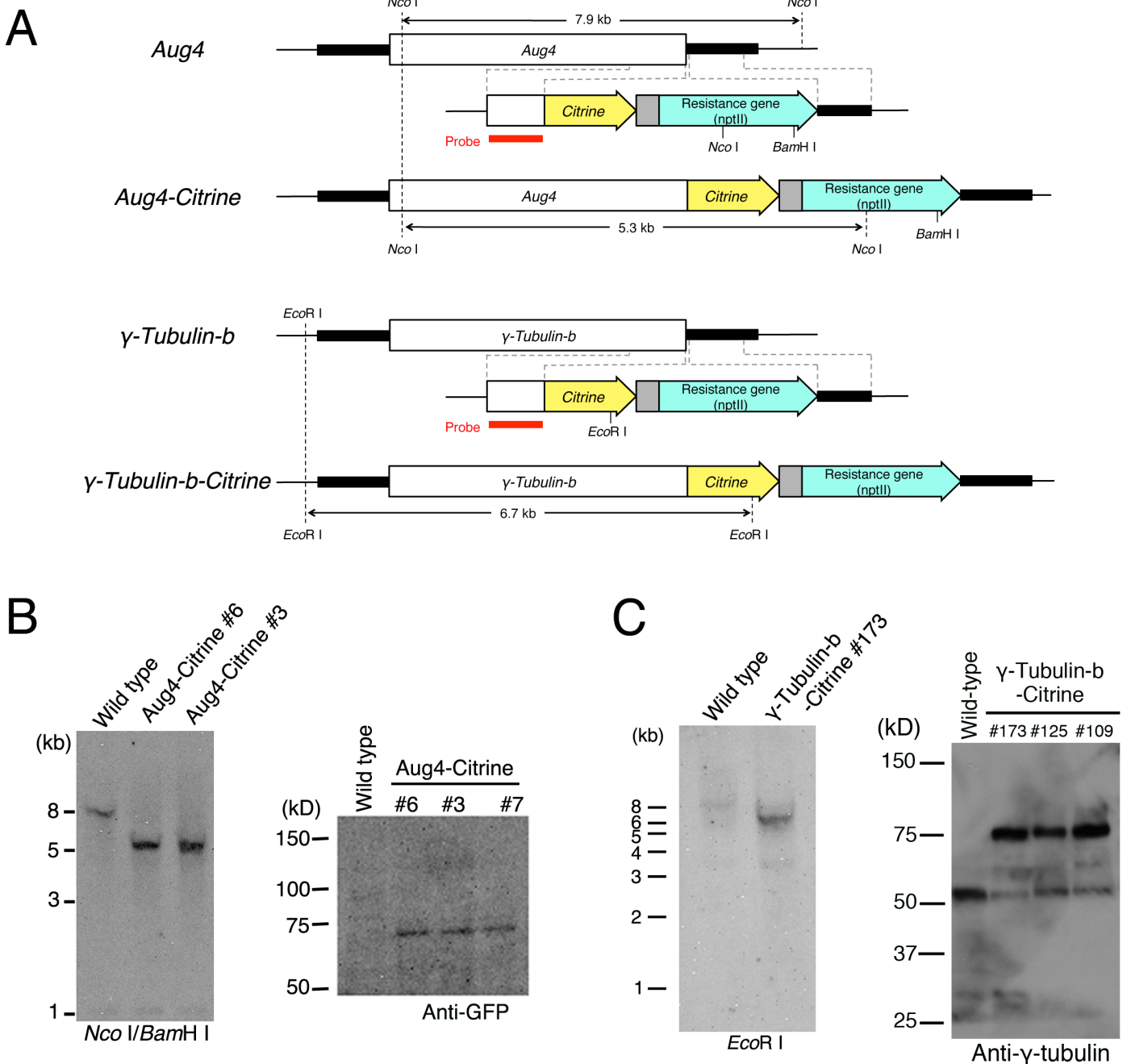


図 2-6 免疫染色による  $\gamma$ -tubulin とオーグミンの分裂期の局在

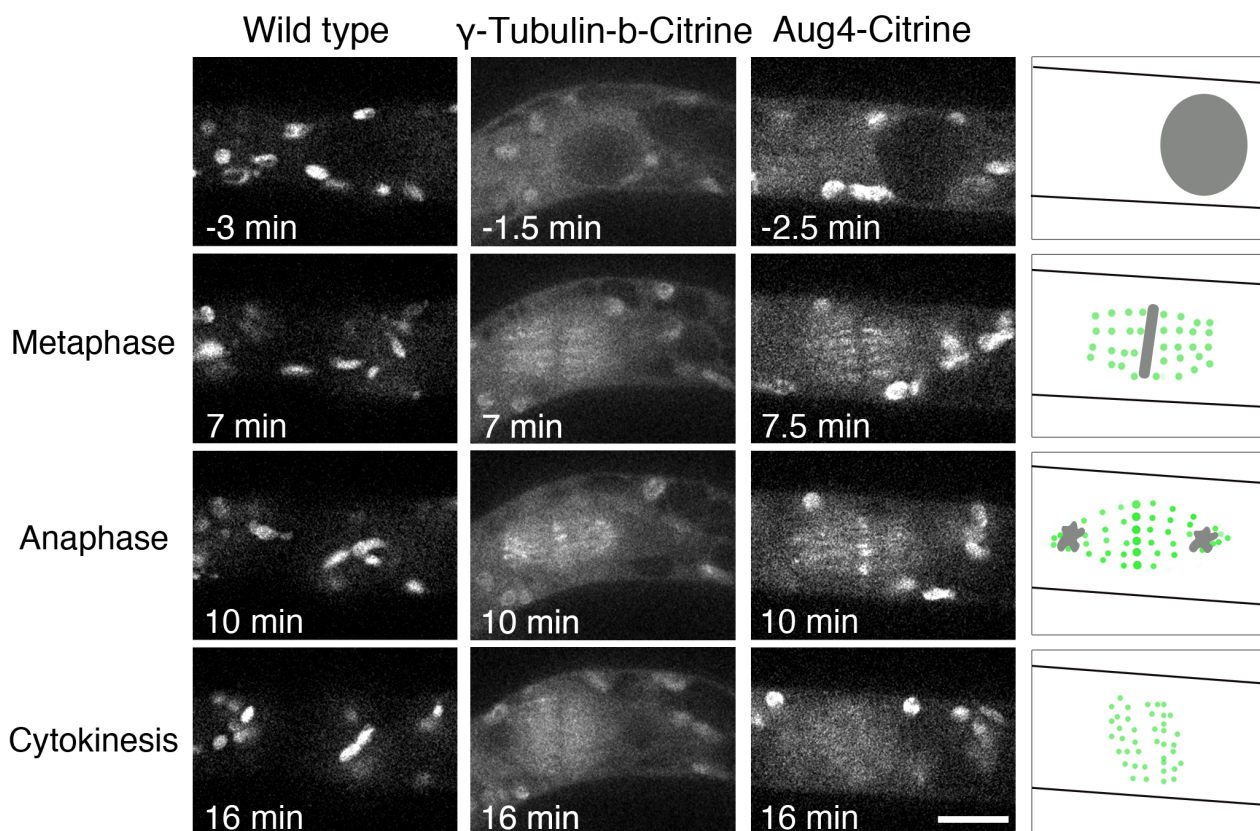
(A) 分裂期の  $\gamma$ -tubulin の局在。  $\gamma$ -Tubulin、GCP4 の RNAi により  $\gamma$ -tubulin の局在の消失が観察されたことから抗体の特異性が確かめられた。コントロールの分裂中期の画像は図 2-4A の画像と同じ物である。

(B) Aug2 (オーグミンサブユニット) の分裂期での局在。スケールバーは 10  $\mu$ m。



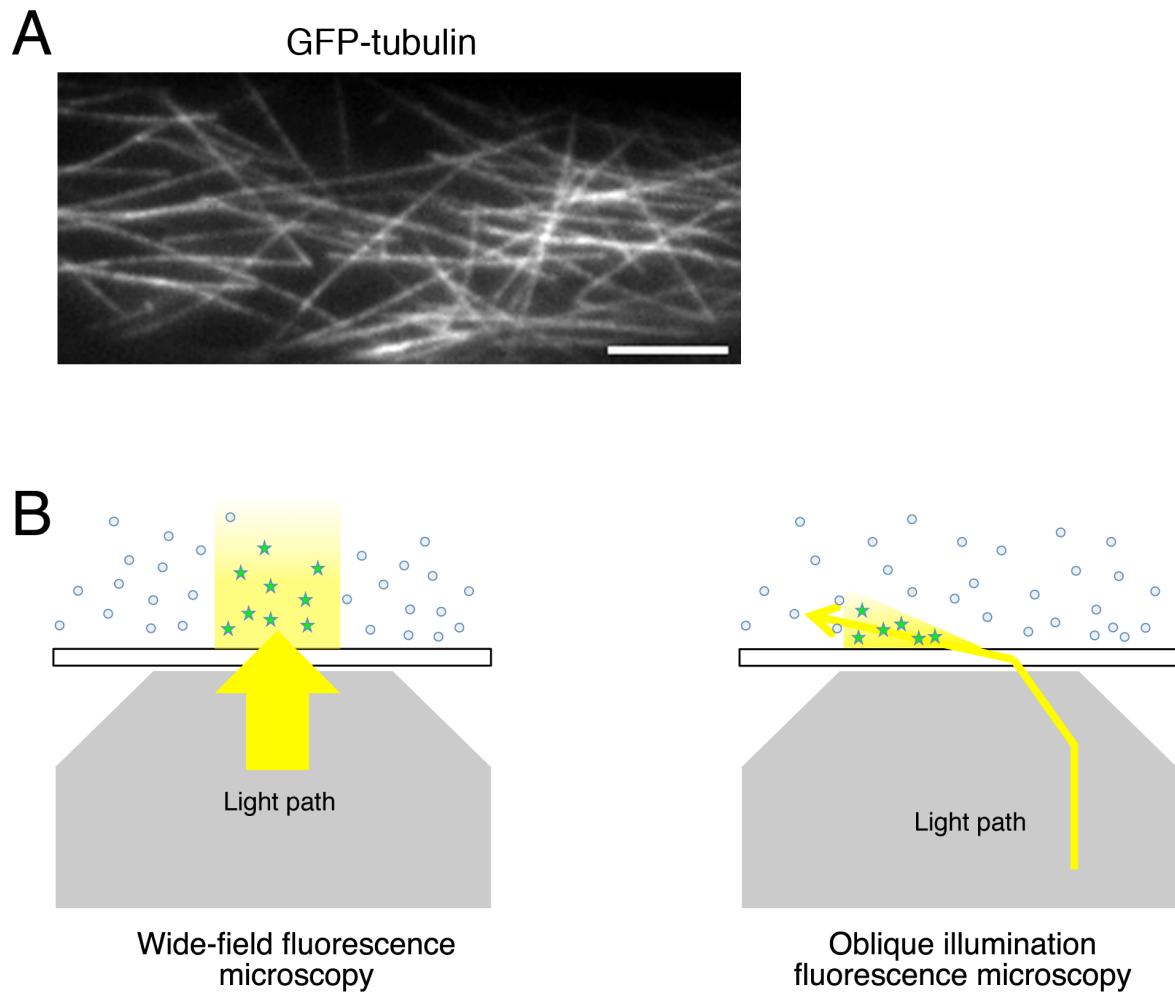
**図 2-7 内在性タンパク質への Citrine 融合株の作製**

(A) (上) Aug4-Citrine 株作製の模式図。相同組換えにより内在性の Aug4 のカルボキシル末端に Citrine を付加した。相同組換えは灰色の点線で示した位置で起こっていると予想される。黒い箱は推測上の 3'UTR と 5'UTR の位置を示す。赤いバーはサザンブロットに使用したプローブの位置を示す(プラスミド、株の作製、免疫ブロットは三木智博氏により行われた)。(下) 相同組換えにより内在性の  $\gamma$ -tubulin-b のカルボキシル末端に Citrine を付加した。相同組換えは灰色の点線で示した位置で起こっていると予想される。黒い箱は推測上の 3'UTR と 5'UTR の位置を示す。赤いバーはサザンブロットに使用したプローブの位置を示す(プラスミド、株の作製は五島剛太教授、富岡亜希子氏によって行われた)。(B) (左) Aug4-Citrine 株のサザンブロットと免疫ブロットによる相同組換えの確認。Citrine を認識する抗 GFP 抗体を用いて発現を確認した。観察にはライン#6 を使用した。(右)  $\gamma$ -Tubulin-b-Citrine 株のサザンブロットと免疫ブロットによる相同組換えの確認。免疫ブロットでは Citrine を付加した  $\gamma$ -tubulin に相当する約 75 kD のバンド以外にも約 50 kD のバンドが観察された。これは  $\gamma$ -tubulin-a が発現しているためと考えられる。観察にはライン#173 を使用した。



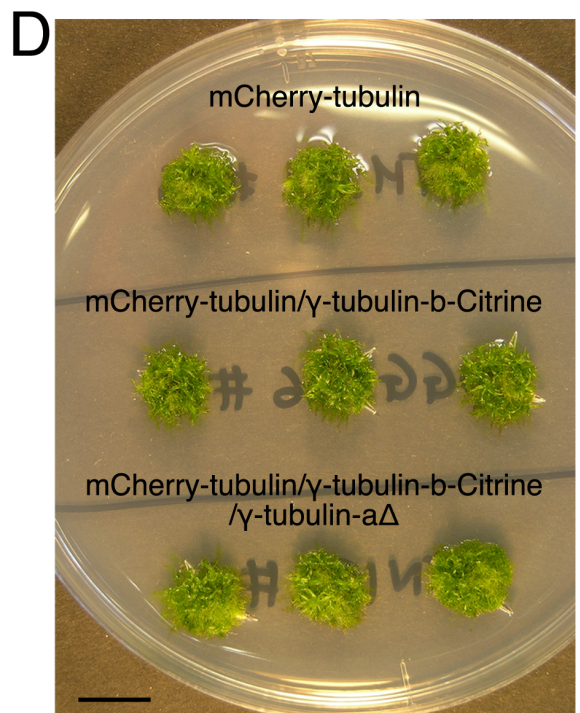
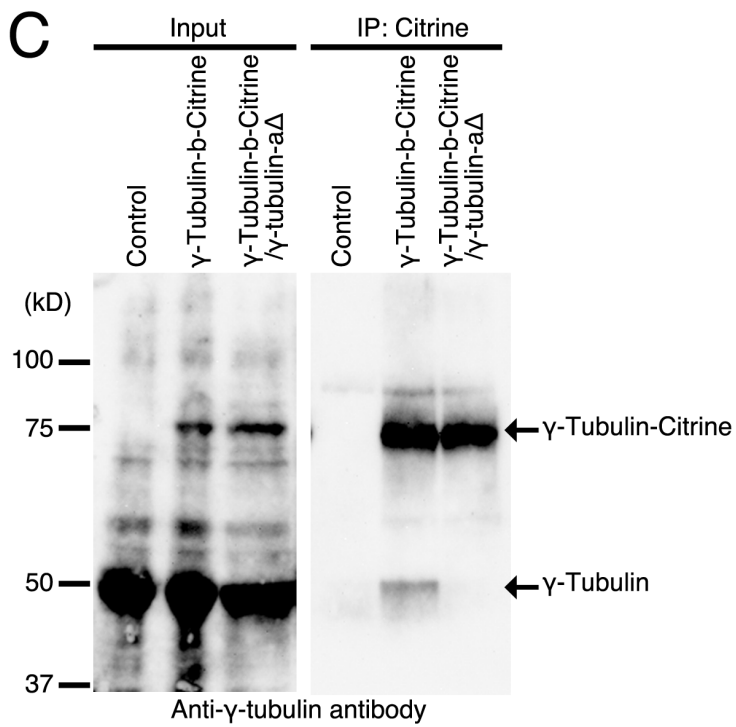
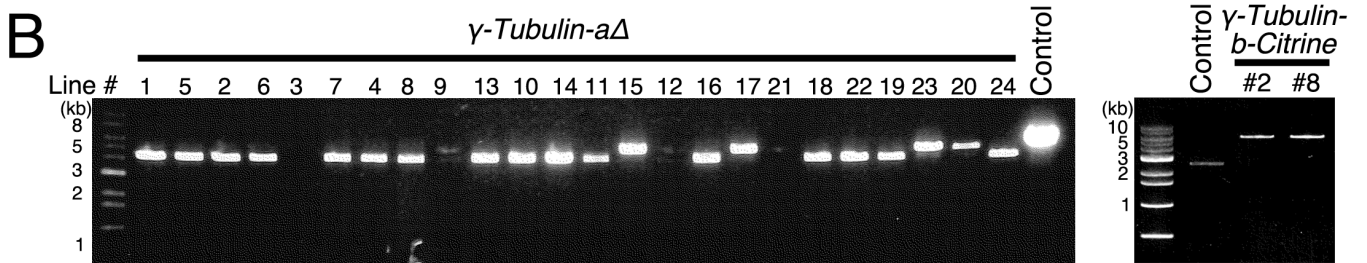
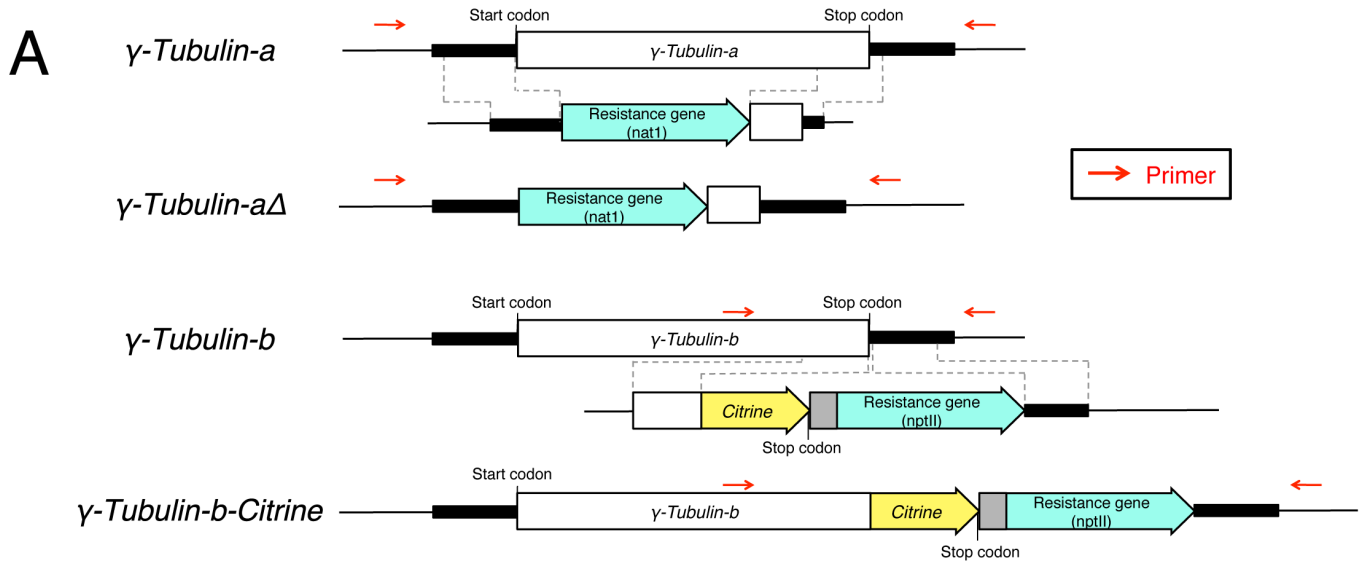
**図 2-8 内在性タンパク質への Citrine タグによる  $\gamma$ -tubulin とオーグミンの分裂期の局在の観察**

Aug4-Citrine はスピンドルとフラグモプラスト上に局在した。分裂後期には一時的に中央領域に強い局在が見られた。 $\gamma$ -Tubulin-b-Citrine も同様の局在を示した。これらの局在は免疫染色の結果と一致した。野生型でも観察される蛍光は葉緑体の自家蛍光によるものである。一番右に Aug4-Citrine の局在の模式図を示した。撮影は三木智博氏によって行われた。核膜崩壊を 0 分とした。スケールバーは 10  $\mu$ m。



**図 3-1 斜光照明蛍光顕微鏡法を用いた endoplasmic 微小管の観察**

(A) GFP-tubulin で標識した原糸体細胞の endoplasmic 微小管。斜光照明蛍光顕微鏡法を用いることで、1本1本の微小管をはっきりと識別できる。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。(B) Wide-field 蛍光顕微鏡法(wide-field epifluorescence microscopy)と斜光照明蛍光顕微鏡法(Oblique illumination fluorescence microscopy)の模式図。Konopka et al., (2008)の図 1 を改変。



### 図 3-2 $\gamma$ -Tubulin-Citrine のみを発現する株の作製手順

**(A)**  $\gamma$ -Tubulin-a $\Delta$ / $\gamma$ -tubulin-b-Citrine 株作製の模式図。ヒメツリガネゴケには 2 つの  $\gamma$ -tubulin 遺伝子 ( $\gamma$ -tubulin-a、-b)が存在し、両方とも原糸体細胞で発現している(図 2-7)。相同組換えにより内在性の  $\gamma$ -tubulin-b 遺伝子に Citrine を付加し、 $\gamma$ -tubulin-a を欠損させることで、Citrine を付加した  $\gamma$ -tubulin のみを発現する組換え体を得た。相同組換えは点線で示した位置で起こっていると予想される。黒い箱は推測上の 3'UTR と 5'UTR の位置を示す。赤矢印は PCR チェックで使用したプライマーの位置を示す。**(B)** (左)PCR による  $\gamma$ -tubulin-a のノックアウトの確認。 $\gamma$ -Tubulin-b-Citrine #8 に対して  $\gamma$ -tubulin-a のノックアウトを行った。コントロールには野生型を用いた。コントロールでは 5 kb のバンド、 $\gamma$ -tubulin-a $\Delta$  株では 4.3 kb のバンドが予想される。(右) PCR による  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine の相同組換えの確認。mCherry-tubulin 株に対して  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine の形質転換を行った。コントロールには野生型を用いた。コントロールでは 2.3 kb のバンド、 $\gamma$ -tubulin-b-Citrine 株では 5.4 kb のバンドが予想される。**(C)**免疫ブロットによる  $\gamma$ -tubulin-a $\Delta$ / $\gamma$ -tubulin-b-Citrine 株の確認。 $\gamma$ -Tubulin (約 50 kD)を認識する G9 抗体は約 50 kD のタンパク質と非特異的に結合するため、Citrine を付加していない  $\gamma$ -tubulin-a が完全になくなっていることの確認が困難である。そこでまず、免疫沈降を行った。抗 GFP 抗体を用いて  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine を免疫沈降した。 $\gamma$ -Tubulin-b-Citrine と Citrine を付加していない  $\gamma$ -tubulin-a を発現したコントロール株では、 $\gamma$ -tubulin-b-Citrine のバンド(約 75 kD)と  $\gamma$ -tubulin-a のバンド(約 50 kD)の両方が検出された。細胞内において、 $\gamma$ -tubulin は 13 個以上の  $\gamma$ -tubulin を含む  $\gamma$ -TuRC として存在しているため(Choi et al., 2010; Erlemann et al., 2012; Kollman et al., 2010)、 $\gamma$ -tubulin-a と  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine は結合していると予想される。一方で、 $\gamma$ -tubulin-a を欠損させた株では 50 kD 付近のバンドは検出されなかったことから、この株では Citrine を付加した  $\gamma$ -tubulin-b のみが発現していることが確かめられた。斜光照明蛍光顕微鏡法を用いた  $\gamma$ -tubulin-Citrine の観察にはこの株を使用した。**(D)**  $\gamma$ -tubulin-a $\Delta$ / $\gamma$ -tubulin-b-Citrine 株は親株である mCherry-tubulin 株と遜色なく生育した。画像は BCDAT 寒天培地で 3 週間以上原糸体細胞を培養したものである。スケールバーは 10 mm。

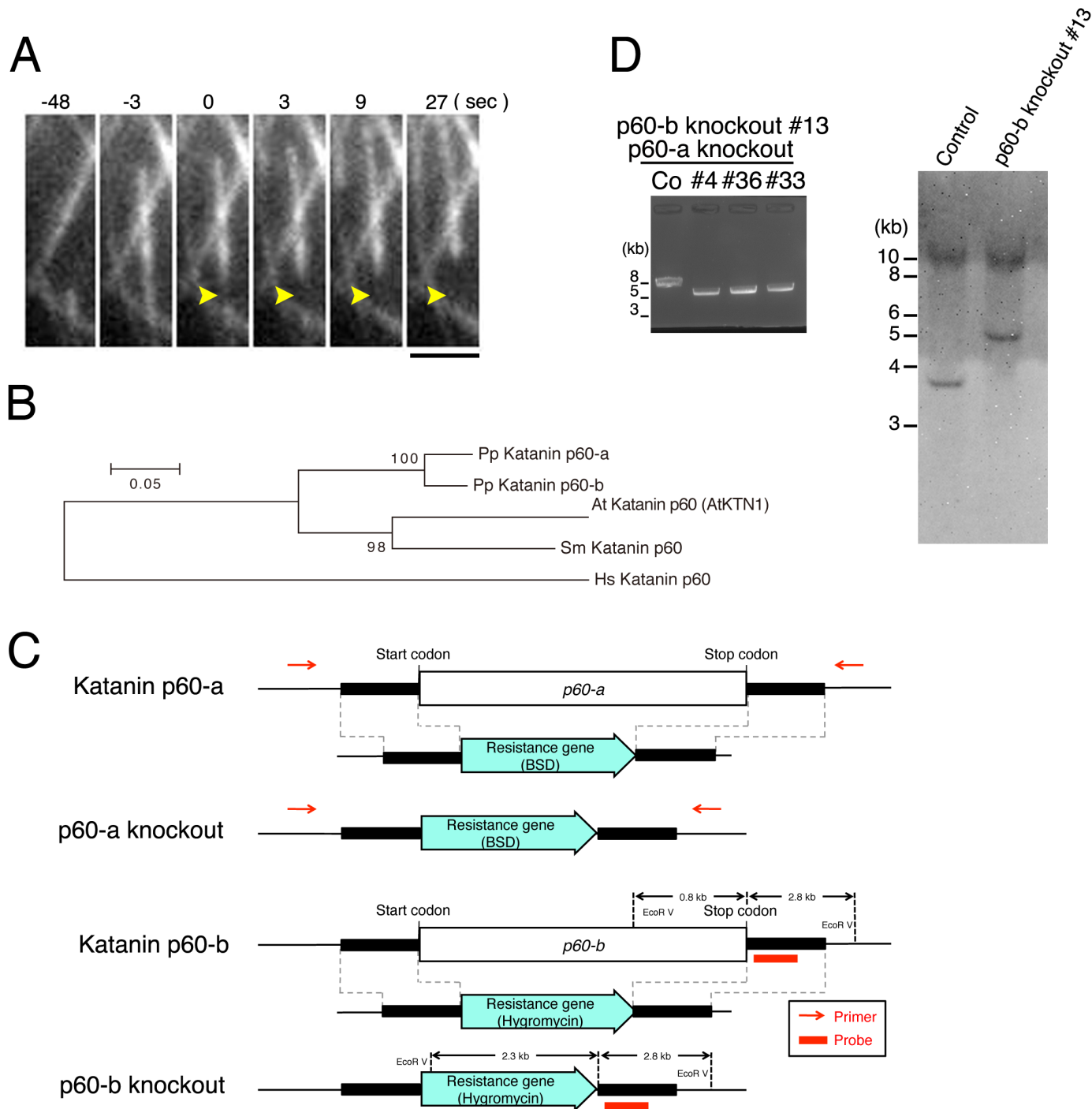
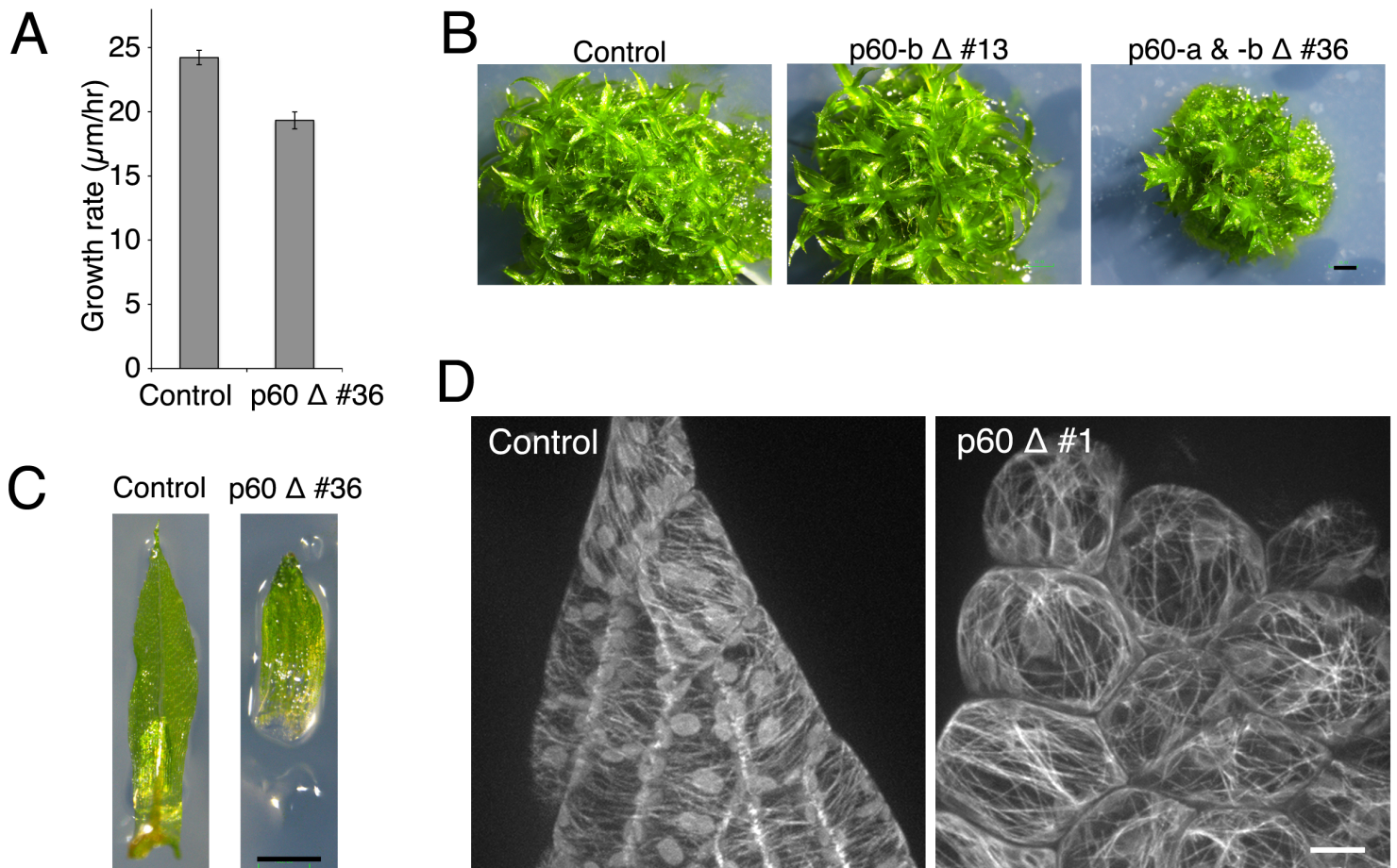


図 3-3 ヒメツリガネゴケにおけるカタニン依存的な微小管切断

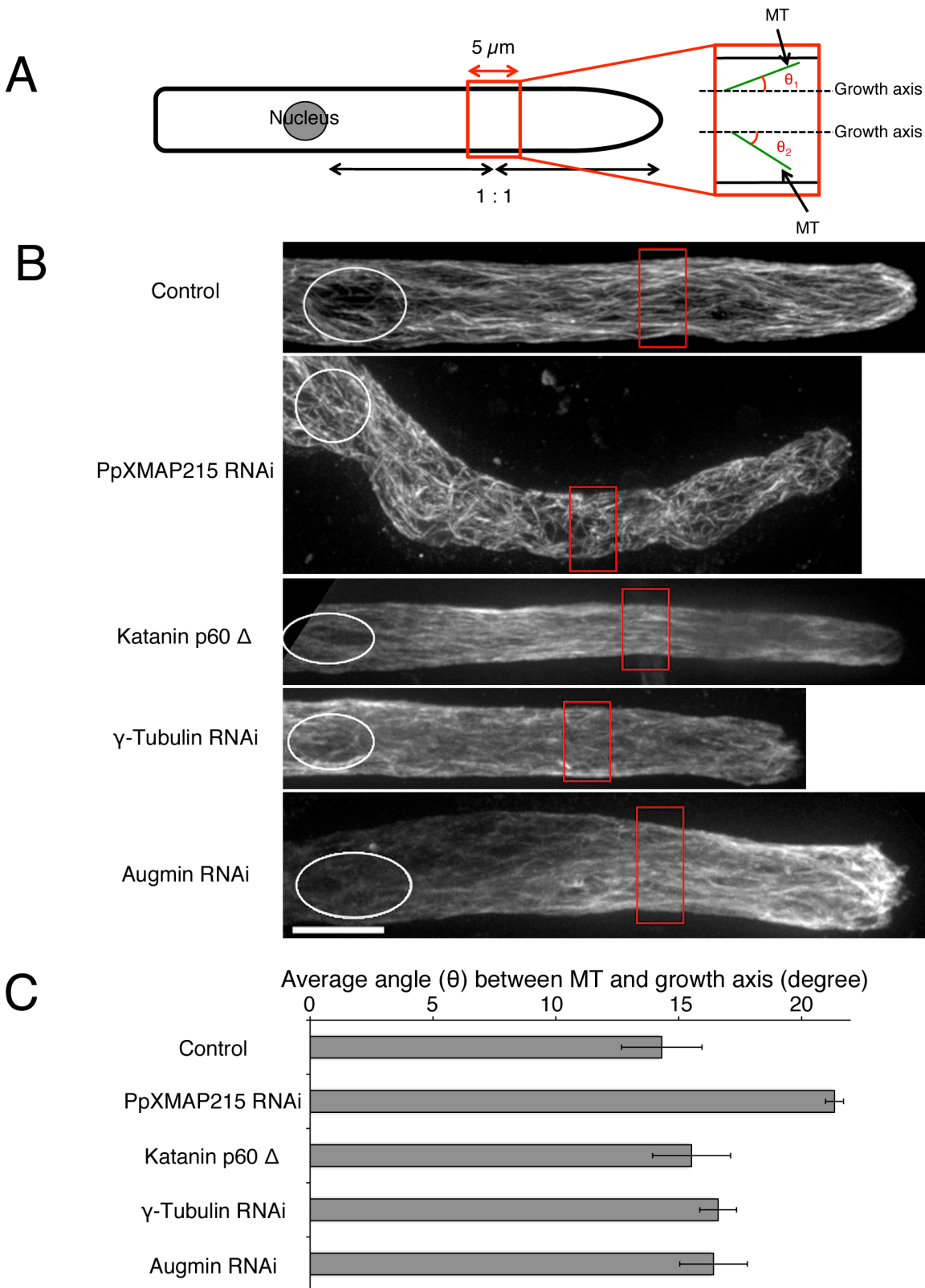
(A) 微小管の切断の例。微小管の切断が起こったフレームを 0 秒とした。矢尻は微小管切断が起こった位置を示す。スケールバーは 2  $\mu$ m。(B) カタニン p60 サブユニットの系統樹。Pp: ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、At: シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、Sm: イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*)、Hs: ヒト (*Homo sapiens*) を示す。手順の詳細は「材料と方法」に記載している。分岐箇所の数値はその場所での bootstrap の確率を表す。枝分かれば 1000 回あたりの各 bootstrap の値を示す。水平方向の枝分かれば相対的な進化上の距離を表す。スケールバーは各箇所でのアミノ酸置換の頻度を示す。ヒメツリガネゴケには 2 つの相同性の高いカタニン p60 サブユニット (p60-a と p60-b) が存在する。(C) カタニン p60 二重欠損株作製 (p60 $\Delta$ ) の模式図。相同組換えは黒い箱で示した、5'UTR と 3'UTR の位置で起こっていると予測される。赤い箱はサザンプロットで用いたプローブの位置を、赤い矢印は PCR による確認で使用したプライマーの位置を示す。(D) (右) サザンハイブリダイゼーションにより p60-b のノックアウトを確認した。コントロールには親株である GFP-tubulin を発現した株を使用した。(左) PCR による p60-a ノックアウトの確認。p60-b ノックアウト株 #13 に対して p60-a のノックアウトを行った。Co はコントロールを意味する。コントロールでは 6.8 kb のバンド、p60-a のノックアウト株では 5.3 kb のバンドが予想される。





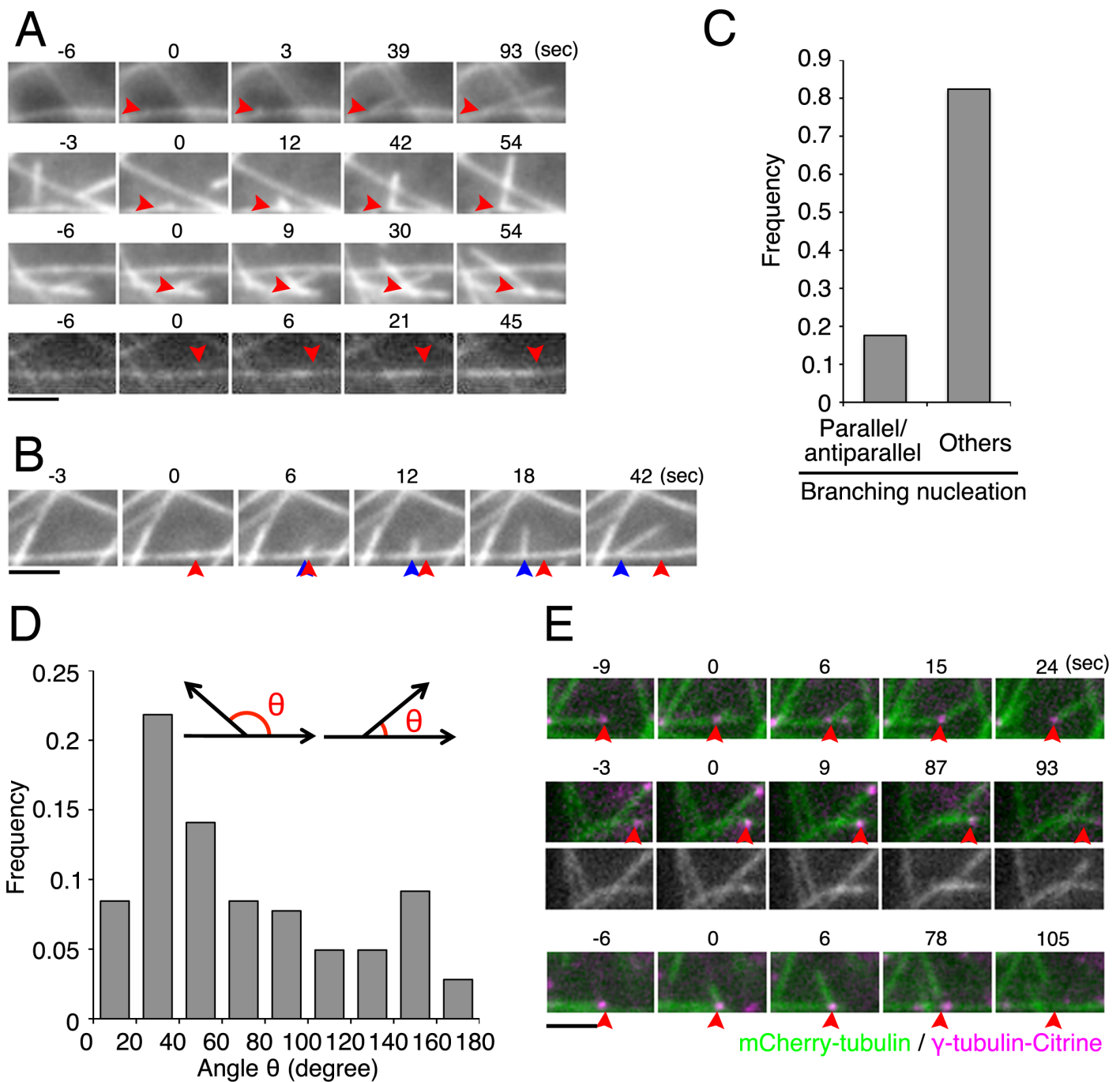
### 図 3-4 カタニン p60 二重欠損株では莖葉体が小さくなる

(A)カタニン p60 二重欠損株(p60 $\Delta$ )ではカウロネマ細胞の伸長速度が少し低下した( $\pm$ SEM)。コントロールは  $n = 94$ 、p60 二重欠損株は  $n = 83$  (p 値は 0.0001 以下、Student t-test)。(B)カタニン p60 二重欠損株では莖葉体の成長が抑制された。スケールバーは 1 mm。(C)カタニン p60 二重欠損株ではコントロール細胞に比べて葉の長さが短くなった。スケールバーは 0.5 mm。(D) GFP-tubulin で標識した莖葉体の細胞の表層微小管。36 枚の z スタック(0.5  $\mu\text{m}$  ごとに撮影)の最高輝度プロジェクション画像を示した。コントロール細胞では細胞の長軸に対して垂直方向に配向した表層微小管が観察されたが、p60 を欠損した細胞では細胞が膨らんだ形になり、微小管の配向は乱れた。丸い構造体は自家蛍光により観察された葉緑体である。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。



**図 3-5  $\gamma$ -Tubulin や Aug3 の RNAi ノックダウン細胞では endoplasmic 微小管の配向に明らかな異常は認められない**

(A)微小管の細胞成長軸(growth axis)に対する角度(0–90°)を測定した。(B)代表的な微小管の免疫染色画像最高輝度プロジェクションにより 27 枚の z スタック画像(0.5  $\mu$ m ごとに撮影)を重ね合わせた。核(白)と解析範囲(赤)を記した。XMAP215 を RNAi ノックダウンした細胞では曲がった形をした先端細胞が高頻度で観察されたが、他の遺伝子をノックダウンした細胞では曲がった先端細胞が観察される頻度は低かった。そのため、XMAP215 を RNAi ノックダウンした株については曲がった形をした細胞を解析に使用し、その他の RNAi 株は曲がっていない細胞を解析に使用した。スケールバーは 10  $\mu$ m。(C)各 RNAi 株における成長軸に対する微小管の配向のグラフ。1 細胞につき約 60 本の微小管を解析し、各 RNAi ノックダウン株につき 3–6 細胞を解析した。解析は z スタックの 3 フレームごとに 3–4 フレーム行った。XMAP215 のノックダウン( $p = 0.022$ )以外は微小管の極性に明らかな差は認められなかった(Student t-test、 $p$  値は 0.2 以上、 $\pm$ SEM)。



**図 3-6 Branching nucleation**

(A) 代表的な branching nucleation を示す。最下段は逆平行な branching nucleation の例である。Branching nucleation が起こったフレームを 0 秒とした。Branching が起こった位置を矢尻で示した。各画像において母微小管のプラス端を右に配置した。(B) 微小管の branching 部位が母微小管にそって移動した例。赤矢尻は微小管生成が起こった位置を、青矢尻は移動した branching 部位の位置を示す。母微小管のプラス端を右側に配置した。(C) Branching nucleation を平行/逆平行なものと同様に分類した。(D) 母微小管と娘微小管の branching の角度。角度  $\theta$  は微小管生成が起こってから 9–15 秒後に計測した。90°以上を含む、様々な角度の branching が観察された。母微小管の極性は微小管の動態から判断した。(E) 代表的な branching nucleation の例。生成の様子とその後の娘微小管の状態を示した。マゼンダは  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine、緑は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す。Branching nucleation が起こったフレームを 0 秒とし、branching が起こった場所を矢尻で示した。各画像において母微小管のプラス端を右に配置した。点状の  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine のシグナルは branching 部位に局在した。(上段) 娘微小管は母微小管の脱重合により切り離された。(中段) 娘微小管は切り離されることなく母微小管上で完全に脱重合された。逆平行な branching nucleation の例。(下段) 娘微小管は  $\gamma$ -tubulin の解離と同時に母微小管から切り離された(78 秒の時点)。スケールバーは 2  $\mu$ m。

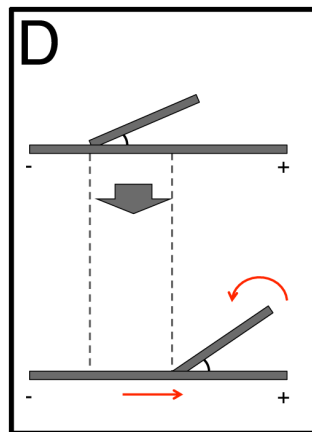
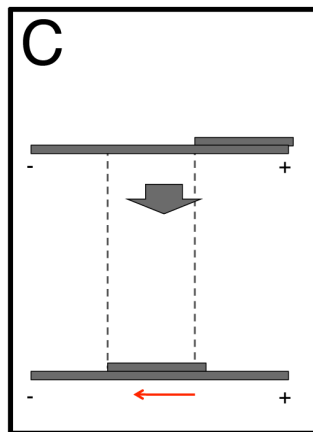
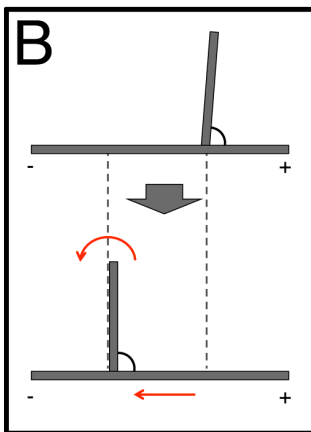
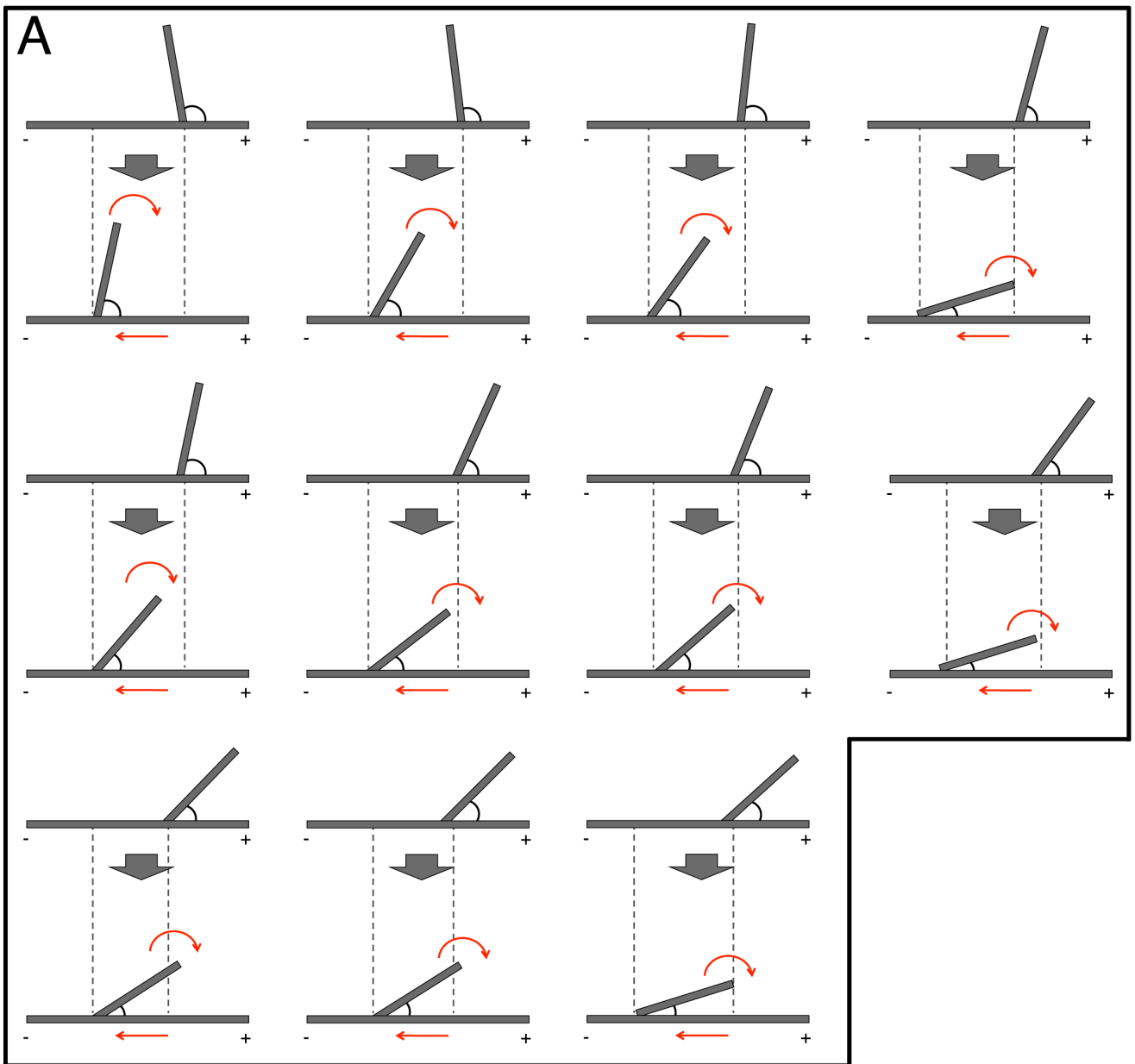
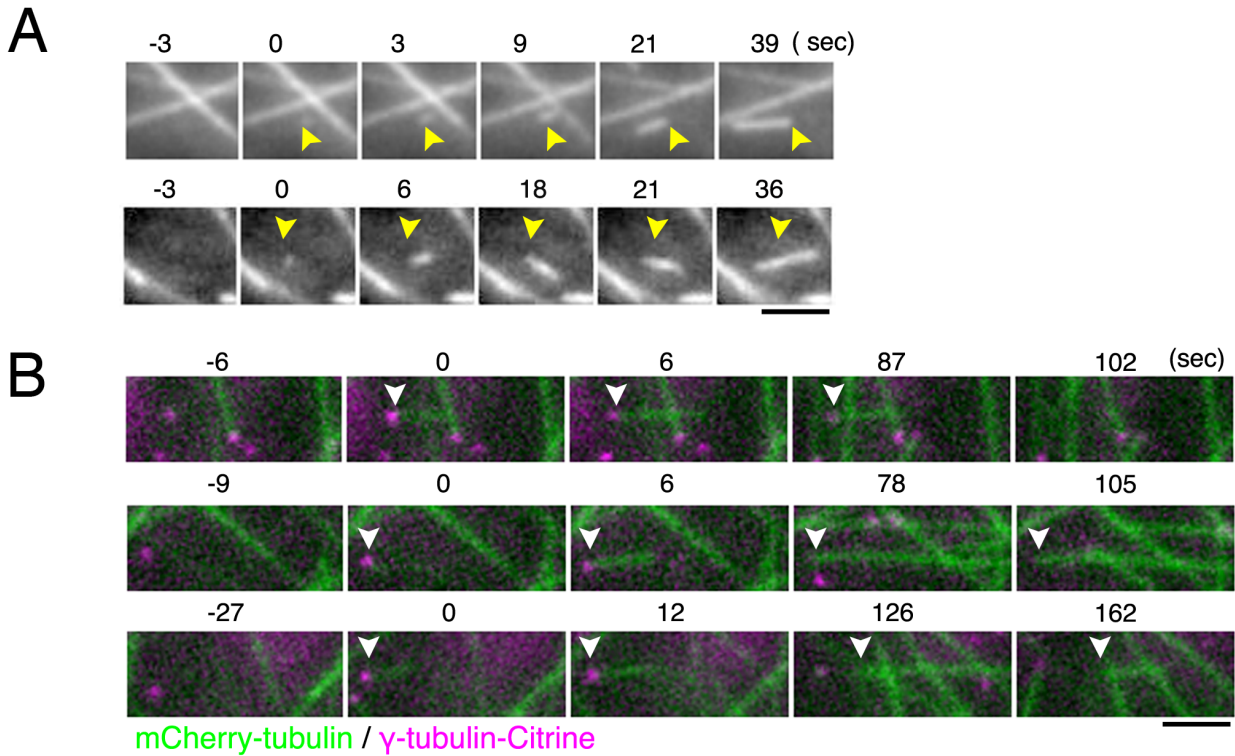


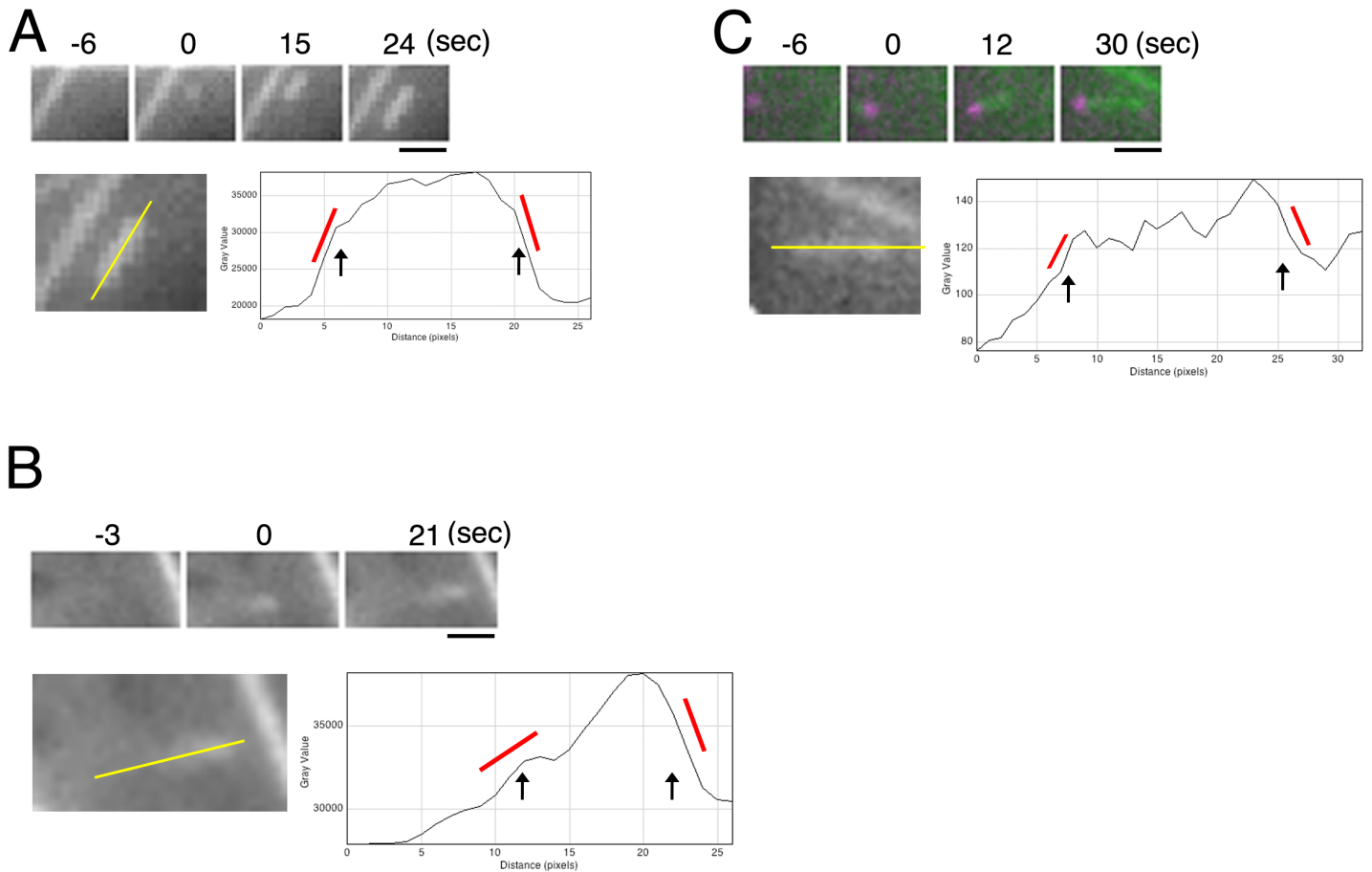
図 3-7 移動した branching nucleation のまとめ

母微小管上を移動した娘微小管 17 本のうち、母微小管の極性を決定することができた 14 例を 4 種に分類した。(A-C)母微小管のマイナス端方向に移動したものは 13 例あった。そのうち 11 例は移動に伴い母微小管と娘微小管の間の角度が小さくなった(A)。移動に伴い角度が大きくなったのは 1 例(B)、角度が変わらなかったのは 1 例(平行な branching nucleation) (C)であった。(D)プラス端方向に移動した微小管は 1 例しか観察されなかった。



**図 3-8 Cytoplasmic nucleation**

(A) 代表的な cytoplasmic nucleation。微小管生成が起こったフレームを 0 秒とした。黄の矢尻は微小管生成が起こった位置を示す。(B) Cytoplasmic nucleation により生成された微小管をマイナス端の状態により 3 種に分類した。マイナス端の位置を矢尻で示した。緑で mCherry- $\alpha$ -tubulin を、マゼンダで  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine を示した。微小管生成が起こったフレームを 0 秒とした。 $\gamma$ -Tubulin-b-Citrine の点状のシグナルから微小管生成が起こる様子が観察された。(上段)  $\gamma$ -tubulin は微小管の生成時から完全に消失するまでマイナス端に結合していた。(中段) 微小管生成後  $\gamma$ -tubulin は解離したが、マイナス端は安定化された。(下段) 微小管生成後  $\gamma$ -tubulin は解離し、マイナス端は脱重合した。スケールバーは 2  $\mu$ m。



### 図 3-9 Cytoplasmic nucleation の見分け方

微小管生成が起こったフレームを 0 秒とした。(A) (上) GFP-tubulin 発現株における細胞質からの微小管生成の例。(下) 24 秒での微小管断片にそった蛍光輝度(強度)プロファイル。GFP シグナルの蛍光強度は両端で急激に減少した。赤線で傾斜を、黒矢印で微小管の端を示した。(B) (上) GFP-tubulin 発現株における伸長中の微小管プラス端の例。(下) 21 秒での微小管にそった蛍光プロファイル。GFP シグナルの蛍光強度は左端では急激に減少したが、右端の蛍光強度の減少は緩やかだった。赤線で傾斜を、黒矢印で微小管の端を示した。(C) (上) mCherry- $\alpha$ -tubulin(緑)/ $\gamma$ -tubulin-b-Citrine(マゼンダ)/ $\gamma$ -tubulin-a $\Delta$  株における cytoplasmic nucleation の例。微小管の片側が  $\gamma$ -tubulin-b-Citrine にキャップされている。0 秒から 12 秒の間で微小管が回転した。(下) 30 秒での微小管断片にそった蛍光プロファイル。mCherry シグナルは微小管の両端で急激に減少した。赤線で傾斜を、黒矢印で微小管の端を示した。スケールバーは 1  $\mu$ m。

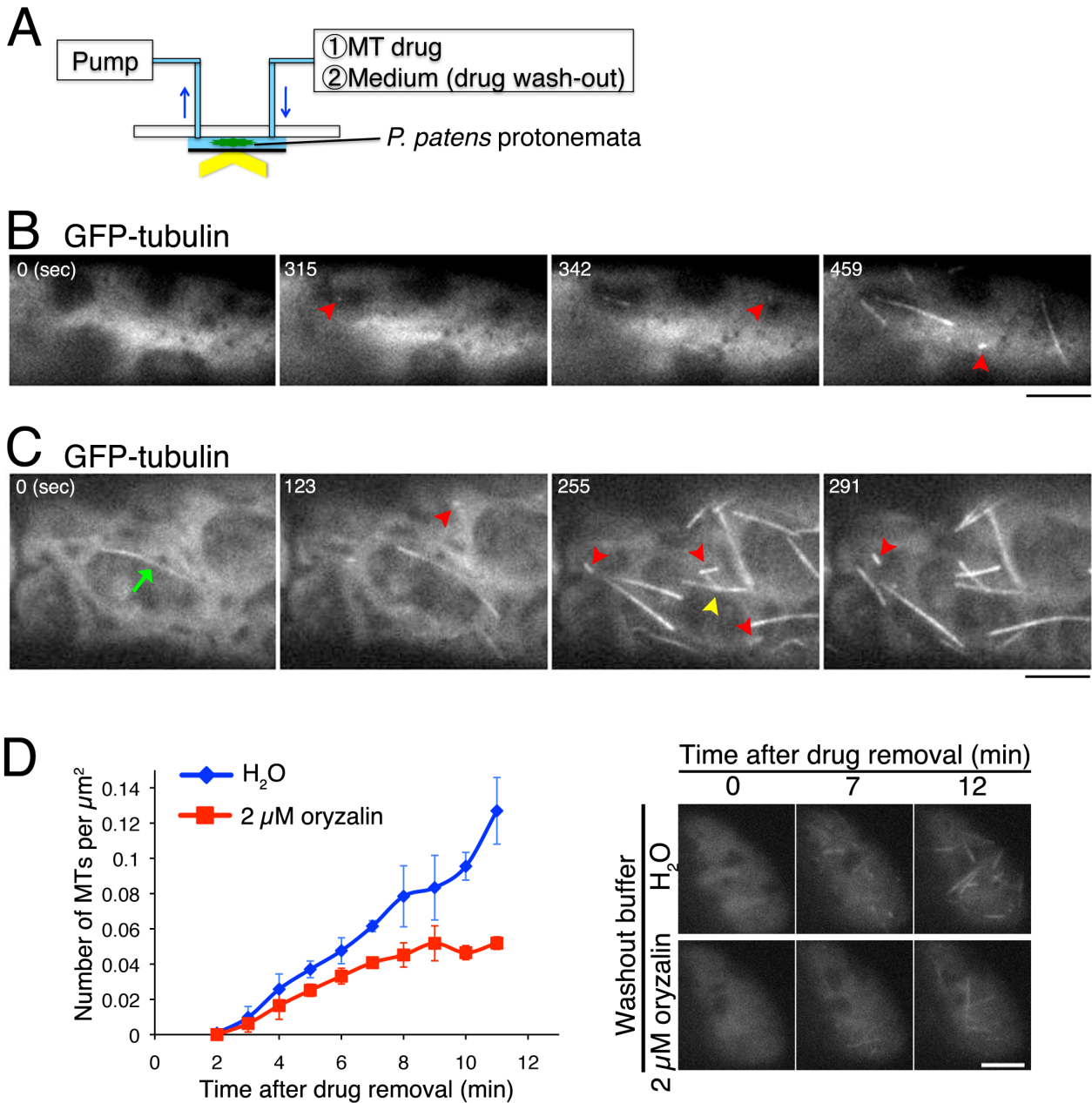
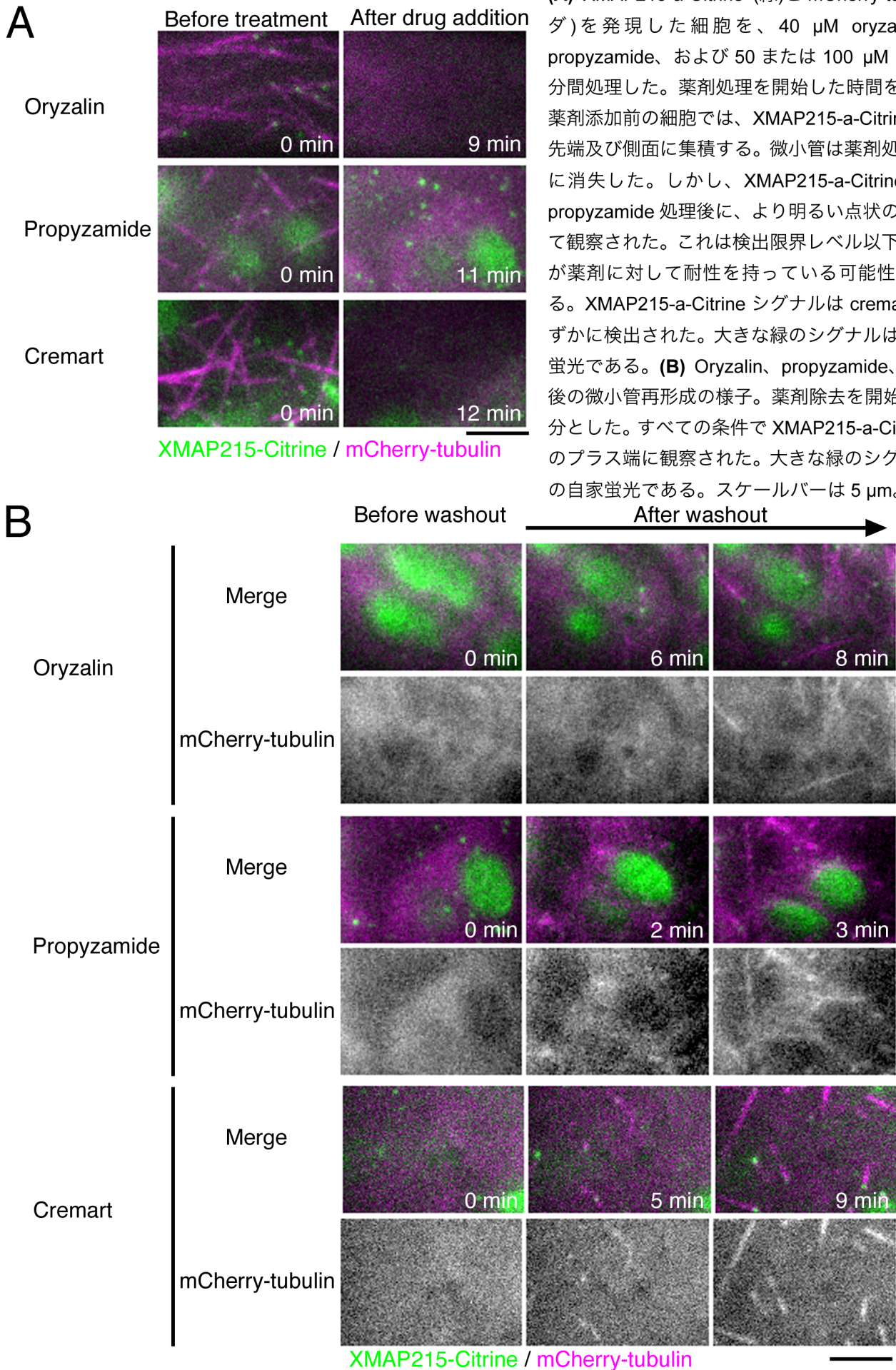


図 3-10 微小管生成を可視化するための微小管脱重合-再重合(regrowth)アッセイ

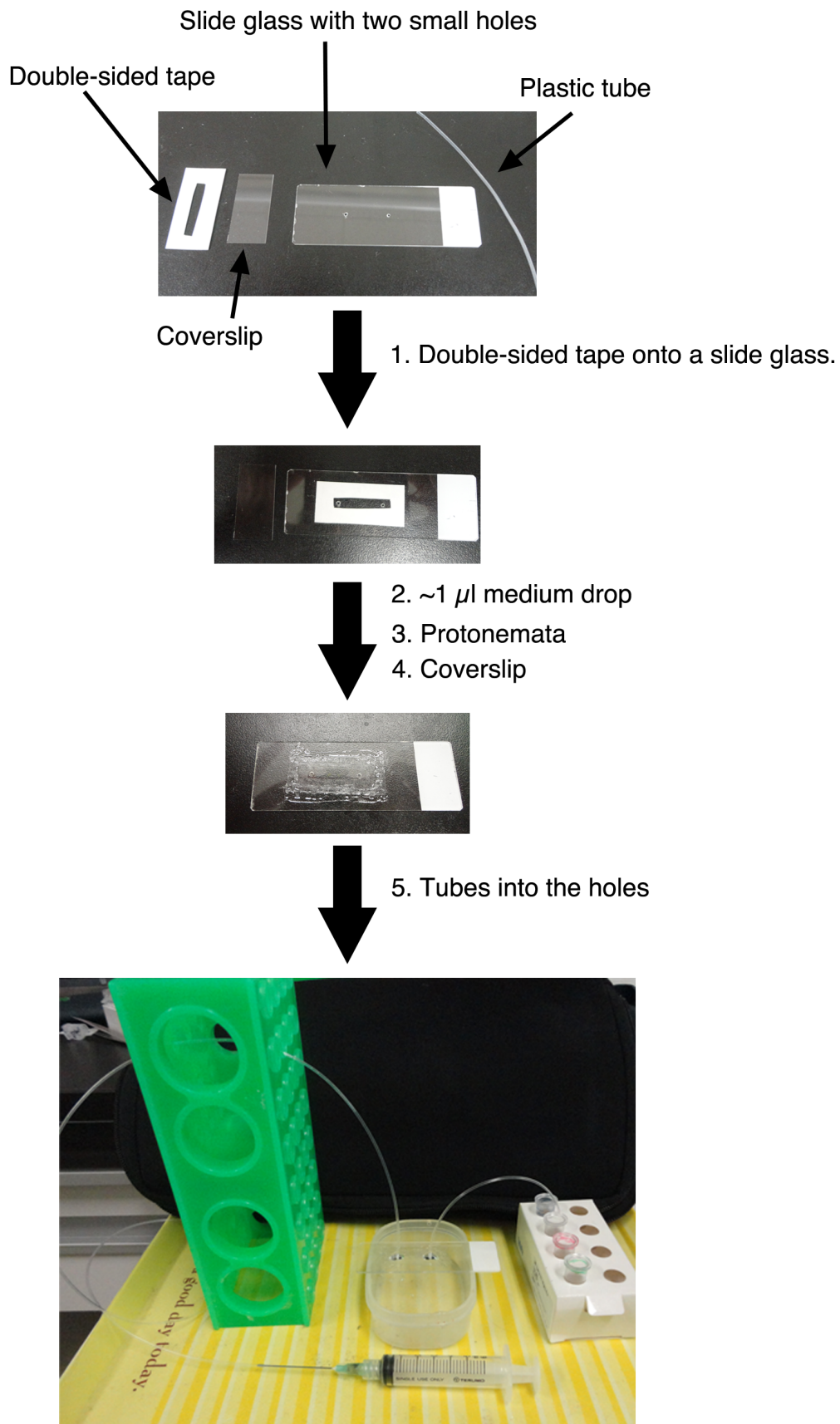
(A)微小管 regrowth アッセイの模式図。対物レンズ上で細胞を微小管阻害剤で処理し、微小管が完全に脱重合されたことを確認した。その後 BCDATG 培地を用いて微小管阻害剤を除去し、微小管が再形成される過程を観察した。シリンジポンプを用いて一定の速度で培地交換を行った。(B と C)微小管重合阻害剤 oryzalin を用いた微小管 regrowth アッセイ。Oryzalin 除去を開始した時間を 0 秒とした。新しい微小管は oryzalin 除去から約 5 分で生じた。ほとんどの細胞では微小管は完全に脱重合したが(B)、一部の細胞では oryzalin 処理後も微小管が残っていた(C)。緑の矢印で残った微小管を示した。どちらの場合でも cytoplasmic nucleation (赤)は branching nucleation (黄)より高い割合で起こった。(D)低濃度の oryzalin を含む培地で高濃度の oryzalin を除去したところ、微小管生成に遅延が認められた。(左) 高濃度 oryzalin 除去後 2 分から 11 分まで 1 分ごとに微小管数を測定し、SEM とともに示した。 $n = 4, 5$  (H<sub>2</sub>O、2  $\mu\text{M}$  oryzalin)。 (右) 高濃度 oryzalin 除去後の GFP-tubulin。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。

図 3-11 3種類の微小管重合阻害剤の有効性

(A) XMAP215-a-Citrine (緑)と mCherry-tubulin (マゼンダ)を発現した細胞を、40  $\mu$ M oryzalin、200  $\mu$ M propyzamide、および 50 または 100  $\mu$ M cremart で 12 分間処理した。薬剤処理を開始した時間を 0 分とした。薬剤添加前の細胞では、XMAP215-a-Citrine は微小管の先端及び側面に集積する。微小管は薬剤処理により完全に消失した。しかし、XMAP215-a-Citrine シグナルは propyzamide 処理後に、より明るい点状のシグナルとして観察された。これは検出限界レベル以下の微小管断片が薬剤に対して耐性を持っている可能性を示唆している。XMAP215-a-Citrine シグナルは cremart 処理後もわずかに検出された。大きな緑のシグナルは葉緑体の自家蛍光である。(B) Oryzalin、propyzamide、cremart 除去後の微小管再形成の様子。薬剤除去を開始した時間を 0 分とした。すべての条件で XMAP215-a-Citrine は微小管のプラス端に観察された。大きな緑のシグナルは葉緑体の自家蛍光である。スケールバーは 5  $\mu$ m。

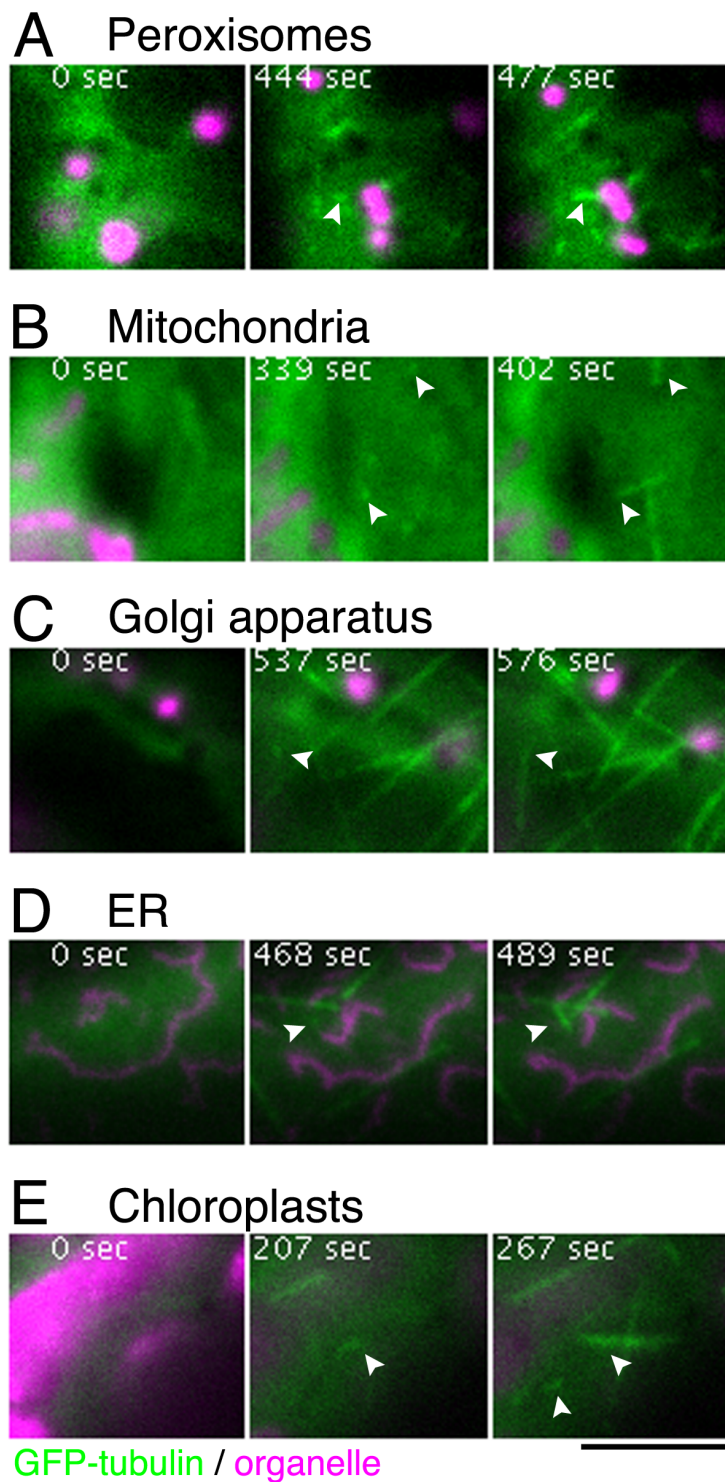






**図 3-12 シリンジポンプを用いた微小管 regrowth アッセイの手順**

実験にはプラスチックチューブ、両面テープ、カバーガラス、2カ所に穴を空けたスライドガラスを用いた。原糸体細胞を2つの穴の間におき、その上にカバーガラスをかぶせ両面テープと接着剤で固定した。スライドガラスの穴に通したプラスチックチューブとシリンジポンプを用いて  $50 \mu\text{L}/\text{分}$  の速度で培地を交換した。プラスチックチューブの片方は2 mL チューブと、もう片方は5 mL シリンジとつないだ。シリンジポンプは Harvard Apparatus Pump 11 Elite を使用した。



**図 3-13 Cytoplasmic nucleation は特定の細胞小器官からは起こらない**

微小管 regrowth アッセイを細胞小器官マーカー発現細胞で行った。Oryzalin 除去を開始した時間を 0 秒とした。(A)ペルオキシソーム、(B)ミトコンドリア、(C)ゴルジ体、(D)小胞体。微小管は GFP-tubulin(緑)で標識し、各オルガネラは mCherry 又は RFP タグで標識した。(E)葉緑体は 640 nm のレーザーの照射により自家蛍光を観察した。矢尻は標識したオルガネラ以外の箇所からの cytoplasmic nucleation が起こった位置を示す。スケールバーは 5  $\mu$ m。

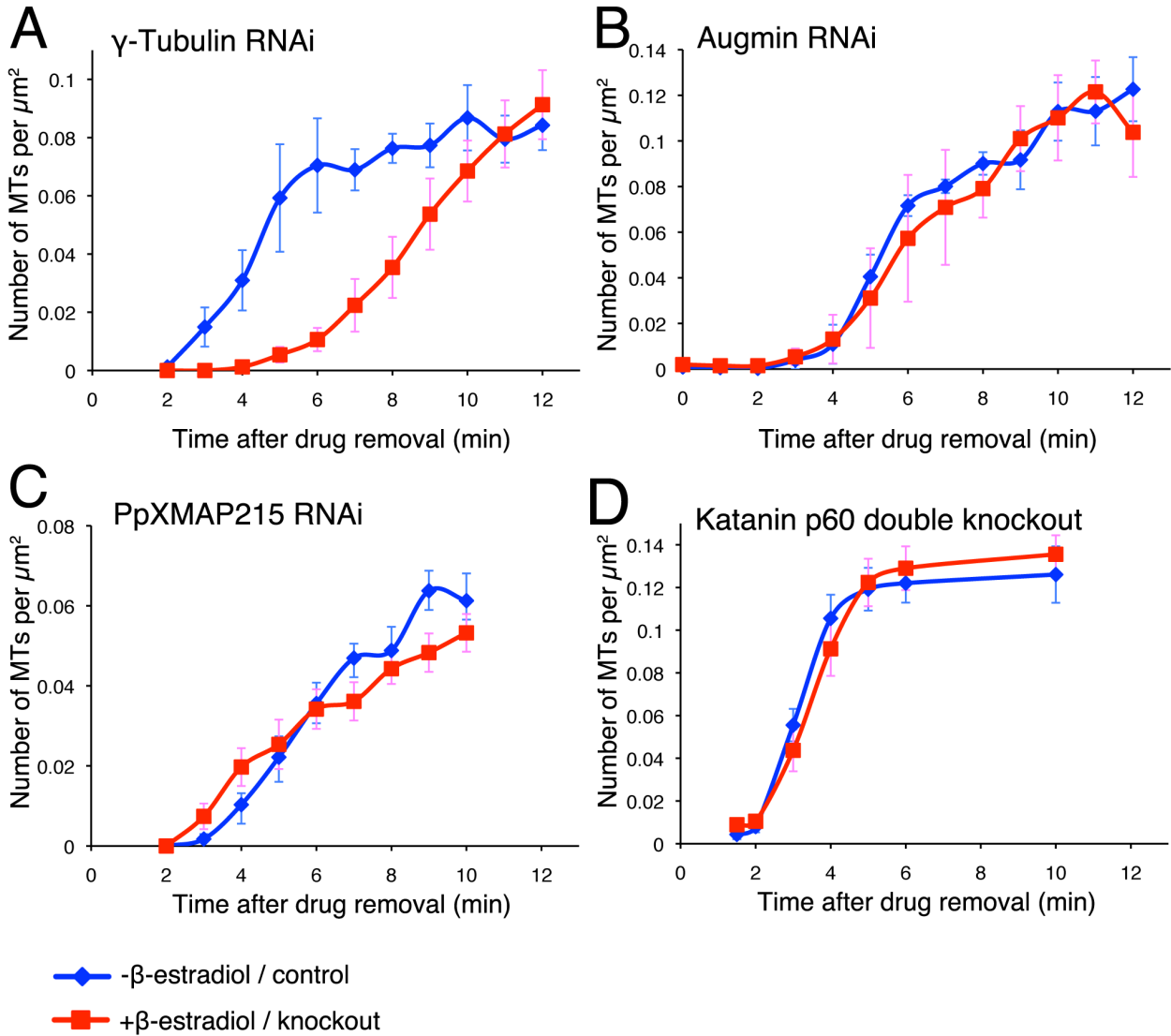
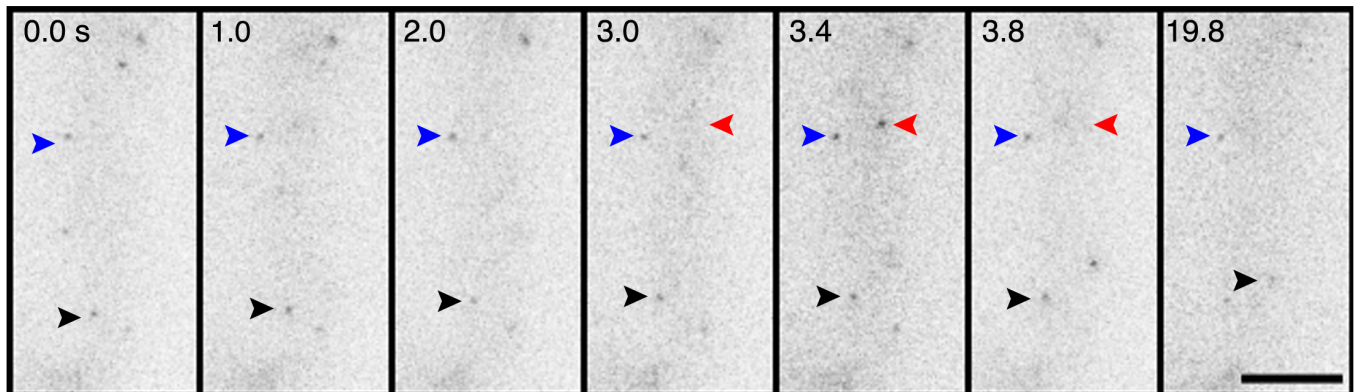


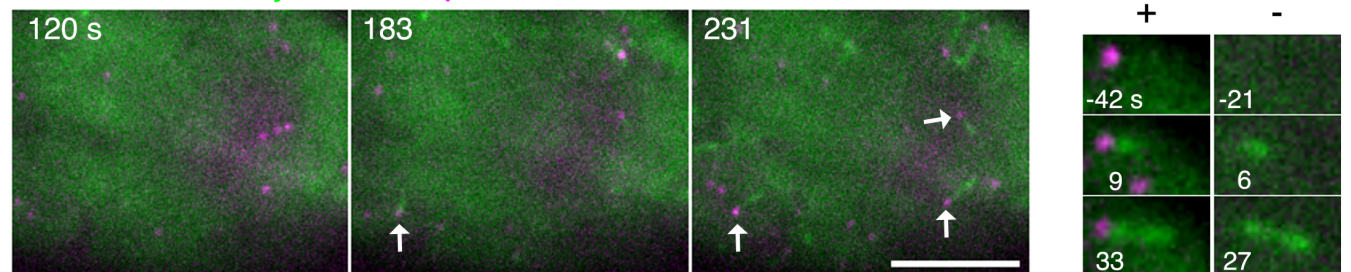
図 3-14  $\gamma$ -Tubulin は速い微小管生成に必要である

$\gamma$ -Tubulin (A)、オーグミンサブユニット Aug3 (B)、XMAP215 (C)、を標的とした誘導型 RNAi 株およびカタニン p60 サブユニット二重欠損株(D)において regrowth アッセイを行った。単位面積( $1 \mu\text{m}^2$ )あたりの微小管数を 1-4 分ごとに定量し、微小管密度を $\pm$ SEM とともに記した。各細胞は $\sim 300 \mu\text{m}^2$ を解析した。RNAi は培地に  $\beta$ -エストラジオールを添可することで誘導した(赤線)。 $\beta$ -エストラジオール未処理の細胞をコントロールとして使用した(青線)。カタニン p60 欠損株は GFP-tubulin #14 株(GTU14 (Hiwatashi et al., 2008))をコントロールとして使用した。(A-C)は oryzalin のみを使用、(D)は oryzalin 処理後、 $200 \mu\text{M}$  propyzamide を含んだ培地により oryzalin を除去し、続いて propyzamide を除去した。(この実験は oryzalin 処理が強力であることを知らなかった時に行った。現在ではこの 2 種類の薬剤による処理は必要ないと考えている。)  $n = 8, 7$  (A: コントロール, RNAi)、 $n = 4, 4$  (B: コントロール, RNAi)、 $n = 8, 10$  (C: コントロール, RNAi)、 $n = 22, 21$  (D: コントロール, p60 二重欠損株)。

## A $\gamma$ -Tubulin-Citrine



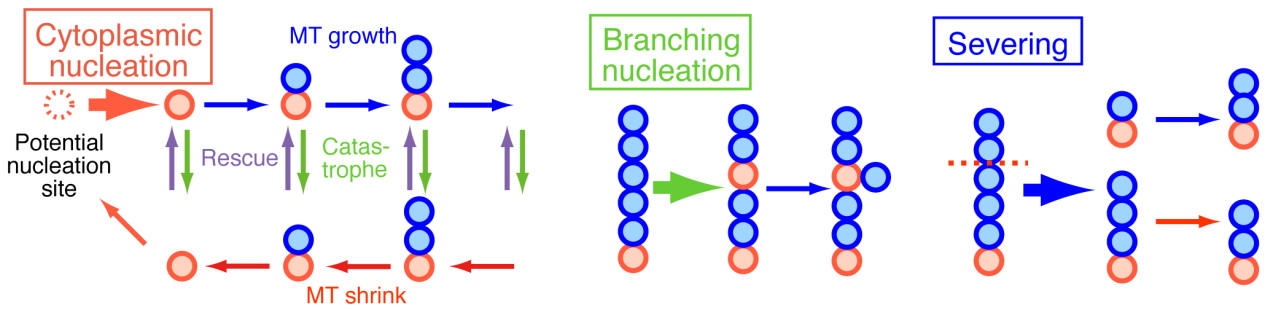
## B mCherry-tubulin / $\gamma$ -tubulin-Citrine



**図 3-15 Cytoplasmic nucleation において、 $\gamma$ -tubulin はすべてではないが、大部分の微小管末端に局在する**

**(A)** 微小管がない状態での  $\gamma$ -tubulin の動態。  $\gamma$ -Tubulin-b-Citrine を 0.2 秒ごとに 20 秒間撮影した。 20 秒以上同じ場所に局在し続けた  $\gamma$ -tubulin シグナルを青矢尻で、拡散した動きを示したシグナルのうち、一瞬焦点面に現れたシグナルを赤矢尻で、二次元での動きを示したシグナルを黒矢尻で示した。 **(B)** (左) 微小管 regrowth アッセイでの  $\gamma$ -tubulin の局在。 微小管が生成した  $\gamma$ -tubulin シグナルを白矢印で示した。 しかしながら、18%の cytoplasmic nucleation は右の拡大図で示したように、 $\gamma$ -tubulin シグナルが検出されなかった。 Oryzalin 除去を開始した時間を 0 秒とした。 スケールバーは 5  $\mu$ m。

A



B

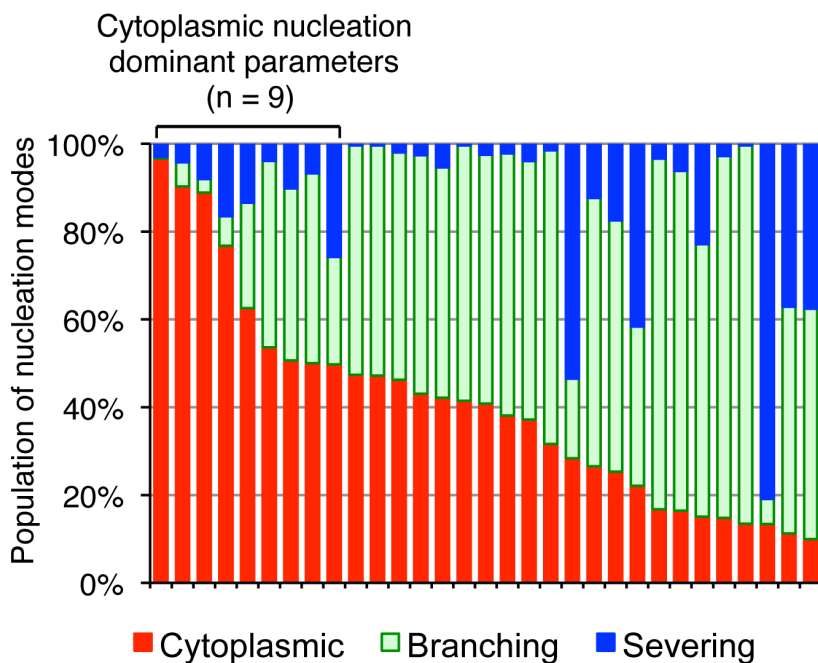


図 3-16 数理モデルの実験データへの適用

(A) 微小管の生成・消失、伸長・短縮を表した数理モデルの模式図。Cytoplasmic nucleation は赤い点線の丸で表した生成核から確率的に起こる。いったん生成が起こると(赤丸)、微小管は動的不安定性により生成箇所から伸長・短縮を行う。Branching nucleation と微小管切断は微小管の長さ按比例した確率で起こる。(B) シミュレーションにより薬剤除去から7分後までに観察された3つの微小管形成モードの割合。各棒グラフは31の独立に得られたパラメータセットによる結果を示す。Cytoplasmic nucleation が主要な生成モードであるパラメータセットは9セットであった。赤：cytoplasmic nucleation、緑：branching nucleation、青：微小管切断。モデルの構築および解析は木村暁博士によって行われた。

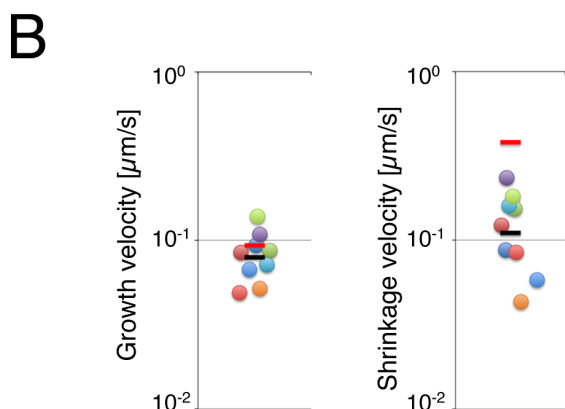
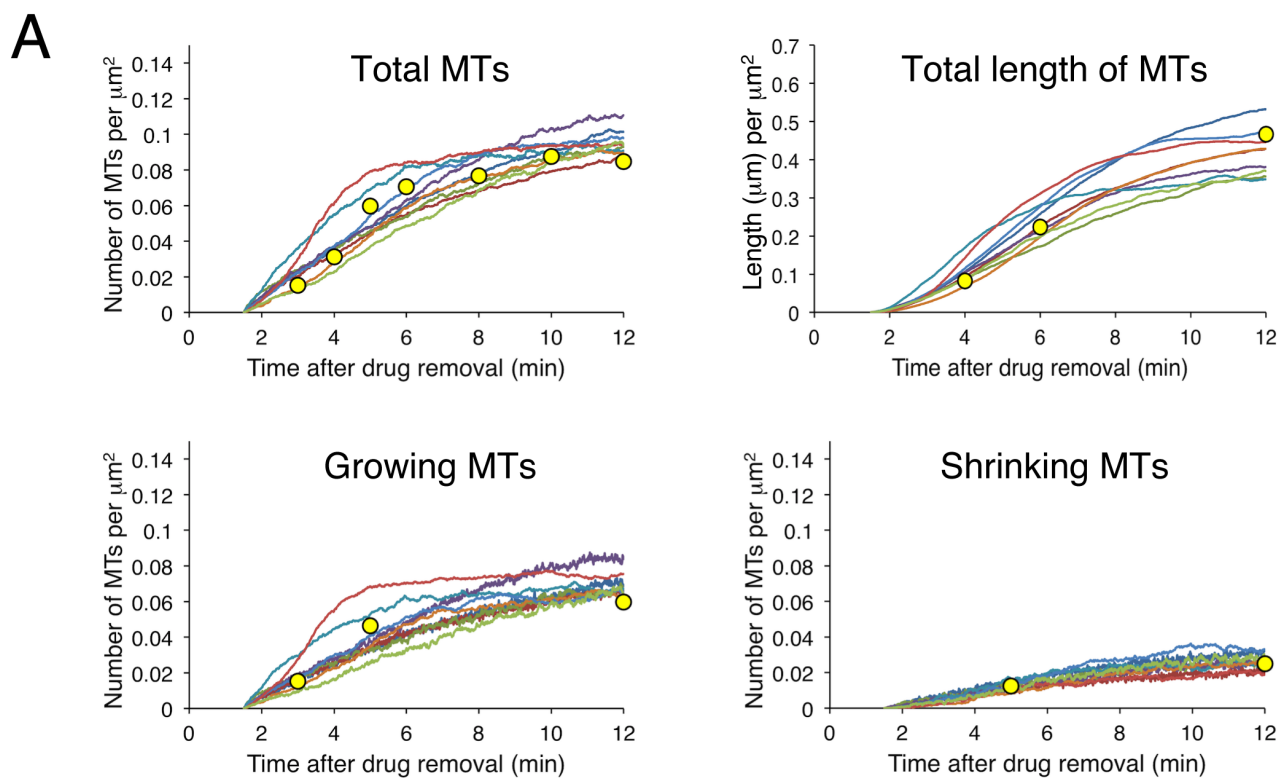


図 3-17 数理モデルによる実験データの再現

(A) 微小管 regrowth アッセイにより微小管の本数、微小管の長さの合計、伸長・短縮中の微小管の本数を測定し、実験データをよく模倣するパラメータセットを得た(図 3-17B)。実験結果と一致した 9 つのパラメータセットによるシミュレーション結果を示した。黄色い円は実験結果を表す。(B) 数理モデルによる伸長・短縮速度の推測値。各点は独立のフィッティングにより得られた予測値( $n = 9$ )を表す。黒いバーは予測値の平均値を、赤いバーは実験値を示す。縦軸は対数表示になっている。解析および図の作成は木村暁博士によって行われた。

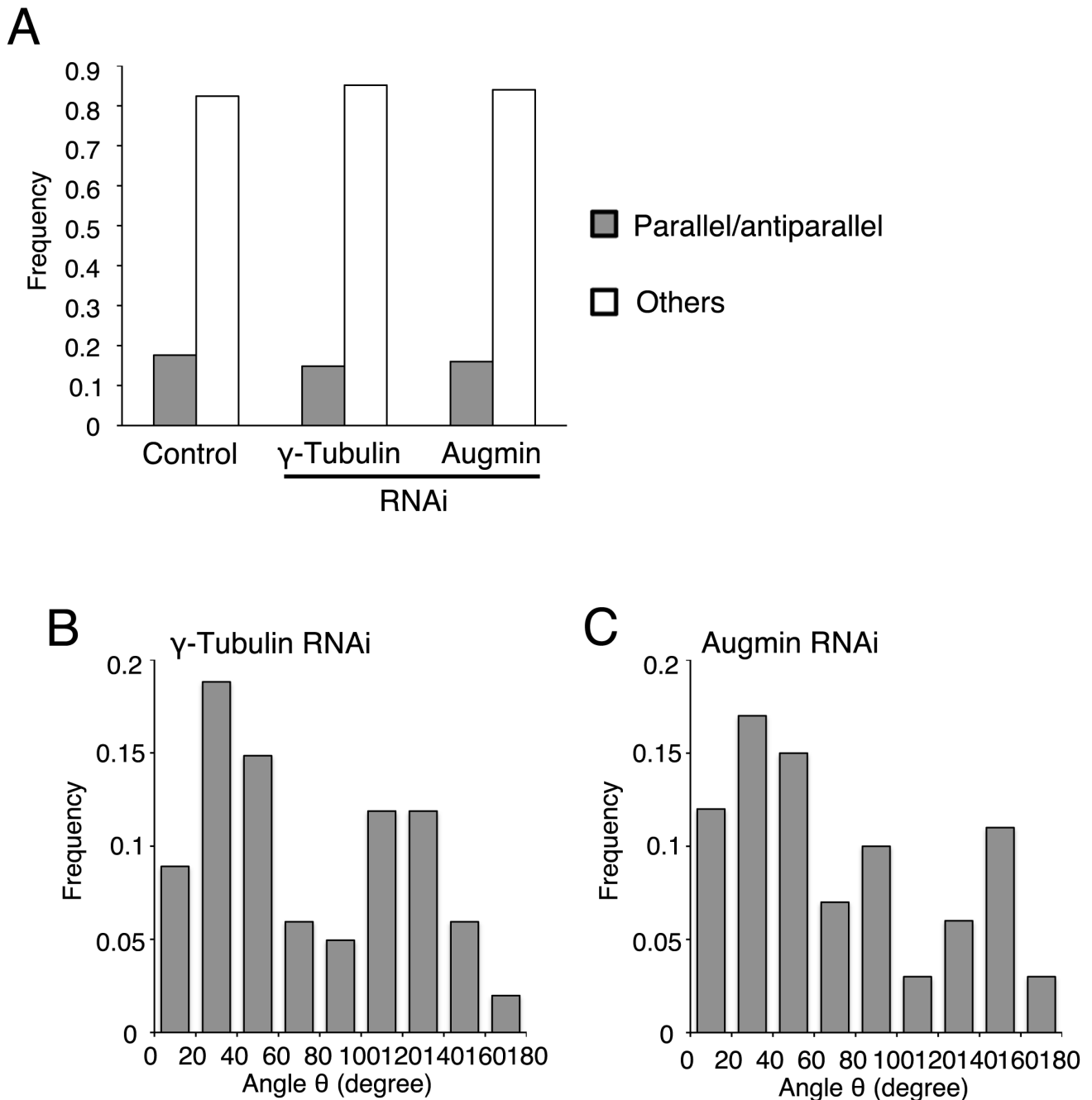


図 3-18  $\gamma$ -Tubulin および Aug3 の RNAi ノックダウンにより branching の角度分布の変化は認められない

(A) Branching nucleation を平行/逆平行なものと同様に分類した。0°から 180°までのものに分類した。 $\gamma$ -Tubulin および Aug3 の RNAi ノックダウンによる影響は認められなかった。コントロール細胞は図 3-6C で使用したデータと同一の物を使用した。(B)  $\gamma$ -Tubulin ( $n = 86$ ) および Aug3 ( $n = 84$ ) の RNAi ノックダウン細胞における 0°から 180°までの branching の母微小管と娘微小管の間の角度の分布。平行/逆平行なものは除いた。角度は娘微小管が生成してから 9–15 秒で測定した。90°以上を含む様々な角度の branching が観察された。これらの分布はコントロールとの比較により明らかな差は認められなかった(Mann-Whitney U-test、 $p$  値は 0.2 以上。比較には図 3-6D のデータを用いた)。

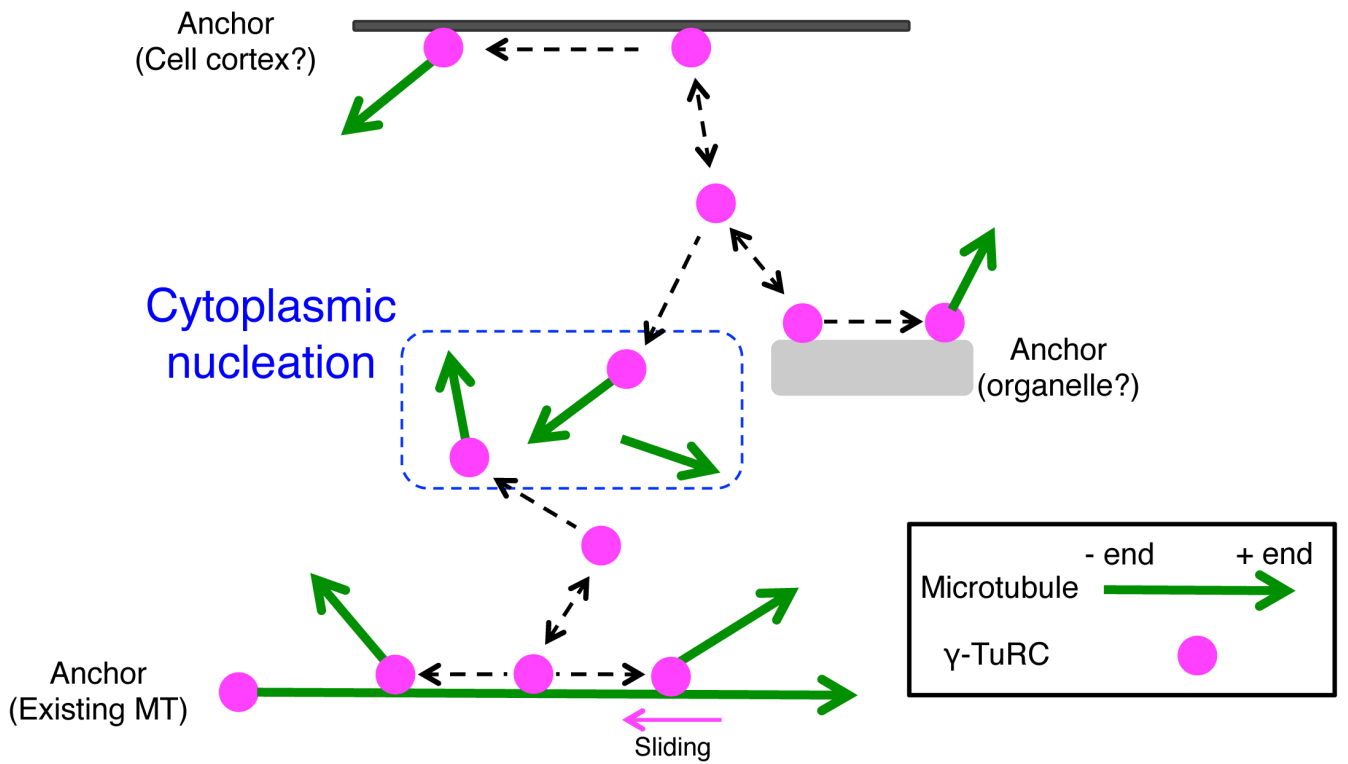


図 3-19 Endoplasmic 微小管の微小管生成モデル

Cytoplasmic nucleation は原糸体細胞において主要な微小管生成機構であるというモデルを提案する。このモデルでは  $\gamma$ -tubulin 複合体( $\gamma$ -TuRC)は細胞表層、オルガネラ表面、既存の微小管または細胞質中に 1 分子として存在する。1 つの  $\gamma$ -TuRC は 1 本の微小管を生成する。



表 1. コントロールと RNAi 細胞における細胞分裂所要時間とスピンドルの長さ

細胞ライン	核膜崩壊-後 期開始(分) * <sup>1</sup> (n)	中期スピンドルの 長さ (μm) (n)
コントロール	9.5 ± 1.7 (103)	12.3 ± 1.0 (8) * <sup>2</sup>
		12.1 ± 1.5 (11) * <sup>3</sup>
γ-Tubulin RNAi	69 ± 55 (53)	16.3 ± 3.1 (5)
GCP4 RNAi	27 ± 41 (38)	17.0 ± 2.4 (13)
Aug3 RNAi	48 ± 46 (66)	18.5 ± 4.0 (14)
γ-Tubulin RNAi + コントロールベク ター	56 ± 23 (7 ライン, 各 >13 細胞)	n.d.
γ-Tubulin RNAi + γ-tubulin レスキュー プラスミド	17 ± 5 (5 ライン, 各 >9 細胞)	n.d.

平均 ± SD

\*<sup>1</sup> 3分ごとの長時間のイメージングにより得られたデータを基に算出した。

\*<sup>2</sup> コントロール RNAi ベクターを形質転換した GFP-tubulin/ヒストン H2B-mRFP 株を用いて得られたデータを基に算出した。

\*<sup>3</sup> GFP-tubulin/ヒストン H2B-mRFP 株を用いて得られたデータを基に算出した。中期スピンドル長は三木智博氏が撮影、解析を行った。

n.d.は測定していないことを意味する。

表 2. RNAi 形質転換体選択のまとめ

遺伝子	パラログ (相同性)	RNAi コン ストラクト	RFP 蛍光強 度の測定(株)	RFP 蛍光強 度の減少* <sup>1</sup>	イメー ジング	検出された 表現型* <sup>2</sup>
(ベクター)	-	-	11	3	3	0
FtsZ	2	1st	12	5	5	5
Profilin	3	1st	14	5	5	4
XMAP215	2 (91%)	1st	17	10	6	3* <sup>3</sup>
γ-Tubulin	2 (99%)	1st	18	6	2	1* <sup>4</sup>
		2nd	23	6	6	4
GCP4	1	1st	21	7	2	2
		2nd	25	8	5	3
		3rd <sup>#</sup>	42	11	10	3
Mis12	1	1st <sup>#</sup>	19	8	6	0* <sup>5</sup>
Aug3	1	1st	32	11	6	4
		2nd <sup>#</sup>	23	4	4	3

\*<sup>1</sup> ほとんどの場合、コントロールと比較して 60%以上減少している株を選択した。

\*<sup>2</sup> まず、RFP 蛍光強度が減少していた株に対して RNAi 誘導後 3–4 日で表現型の観察を行った。分裂に関する表現型が観察されなかった場合、誘導後 6–7 日でイメージングを行った。6–7 日間の誘導により 1 株以上が分裂期異常を示した場合、他の株については表現型の評価を行わなかった。したがって、長期間 RNAi を行えば、表に示した株よりも多くの株が表現型を示す可能性がある。6–7 日間誘導を行ったコンストラクトに#を記した。FtsZ とプロフィリン RNAi は誘導後 5 日で観察した。

\*<sup>3</sup> 細胞成長の表現型がもう一つの RNAi コンストラクト(図 1-2A、コンストラクト 2)を一過的にプロトプラストに発現させた場合に観察された。

\*<sup>4</sup> 1 ラインしか得られていないが、レスキュー実験により表現型がγ-tubulin のノックダウンにより起こっていることを確認した。

\*<sup>5</sup> この結果はカウロネマ細胞において Mis12 は染色体分離に必要ないか、RNAi 後に残っている Mis12 が機能に十分であることを示している。

表 3. パラメータフィッティングに用いた regrowth アッセイの定量データ

	薬剤除去後の時間 [分]	値 [ $\times 10^{-2}$ ]
微小管の数 [ $\mu\text{m}^2$ ]	3	1.5
	4	3.1
	5	5.9
	6	7.1
	8	7.7
	10	8.7
	12	8.4
伸長中の微小管の数 [ $\mu\text{m}^2$ ]	3	1.5
	5	4.7
	12	6.0
短縮中の微小管の数 [ $\mu\text{m}^2$ ]	5	1.3
	12	2.5
微小管の長さの合計 [ $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ]	4	8.2
	6	22
	12	47

表 4. シミュレーションに用いたパラメーター

記号		探索範囲
Tubulin 濃度		
<b>TubTot</b>	単位面積あたりの tubulin ダイマーの数* (1 unit = 0.25 $\mu\text{m}$ の微小管)	3,000-10,000
シミュレーションに特異的なパラメーター		
<b>NucTot</b>	単位面積あたりの潜在的な生成核の数	200-400
Cytoplasmic nucleation		
<b>NucRate</b>	Cytoplasmic nucleation の頻度 [1/s area] は次	0 - 1
<b>NucAlpha</b>	のように定義した。 $\text{NucTot} \times \text{NucRate} \times (\text{FreeTub}/\text{TubTot})^{\text{NucAlpha}}$ . $\text{FreeTub}$ [unit] = $\text{TubTot}$ [unit] - 微小管の全長 [unit].	0 - 10
Branching nucleation		
<b>MDMNRate</b>	Branching nucleation の頻度 [1/s $\mu\text{m}$ of MT] は	0 - 0.1
<b>MDMNAIpha</b>	次のように定義した。 $\text{MDMNRate} \times (\text{FreeTub}/\text{TubTot})^{\text{MDMNAIpha}} \times 4$ .	0 - 10
微小管切断		
<b>SevRate</b>	切断(severing)の頻度[1/s $\mu\text{m}$ of MT] は次のように定義した。 $\text{SevRate} \times 4$ .	0 - 0.1
微小管の動的不安定性		
<b>FreqCat</b>	Catastrophe 頻度 [1/s]	0 - 1
<b>FreqRes</b>	Rescue 頻度 [1/s]	0 - 1
<b>Kgrowth</b>	微小管の伸長速度 [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ]は次のように定義した。 $\text{Kgrowth} \times (\text{FreeTub}/\text{TubTot}) \times 0.25$ .	0 - 2
<b>Kshrink</b>	微小管の短縮速度[ $\mu\text{m}/\text{s}$ ] は次のように定義した。 $\text{Kshrink} \times 0.25$ .	0 - 2

シミュレーションに用いた単位面積は 1,120  $\mu\text{m}^2$

MT は微小管を意味する。

この実験は木村暁博士によって行われた。

表 5. 数理モデルにより予測された微小管生成頻度と動的不安定性の値

	Mean ( $1\sigma$ -range) <sup>*1</sup>
MT growth velocity [ $\mu\text{m/s}$ ] <sup>*1</sup>	0.079 (0.058 – 0.11)
MT shrinkage velocity [ $\mu\text{m/s}$ ]	0.11 (0.065 – 0.19)
Catastrophe frequency [/s]	0.041 (0.0097 – 0.17)
Rescue frequency [/s]	0.071 (0.011 – 0.47)
Cytoplasmic nucleation [ $\times 10^{-4}$ /s $\mu\text{m}^2$ ] <sup>*2</sup>	3.2 (2.1 – 5.0)
Branching nucleation [ $\times 10^{-4}$ /s $\mu\text{m}^2$ ] <sup>*3</sup>	0.49 (0.074 – 3.3)
Severing [ $\times 10^{-4}$ /s $\mu\text{m}^2$ ] <sup>*3</sup>	1.4 (0.57 – 3.4)

$n = 9$

\*1  $1\sigma$  は標準偏差を意味する。平均および標準偏差は対数を用いて計算した。

\*2 遊離 tubulin の濃度が最も高いシミュレーション開始時の値。

\*3 微小管の長さが最も長い、シミュレーション終了時(薬剤除去後 12 分に相当)の値。

この実験は木村暁博士によって行われた。

表 6. 通常の細胞(微小管重合阻害剤未処理)での 3 種の微小管形成モードの頻度 (1  $\mu\text{m}^2$  あたり)

	頻度 ( $\times 10^{-4}/\text{s } \mu\text{m}^2$ ) (p-値)			N	解析した 面積 ( $\mu\text{m}^2$ )
	Cytoplasmic nucleation	Branching nucleation	切断		
コントロール	0.33 $\pm$ 0.19	0.21 $\pm$ 0.18	0.12 $\pm$ 0.19	21 細胞	11223
	0.34 $\pm$ 0.16	0.20 $\pm$ 0.12	0.11 $\pm$ 0.10	6 回の実験	
$\gamma$ -Tubulin RNAi	0.24 $\pm$ 0.19 (0.12)	0.15 $\pm$ 0.16 (0.24)	0.10 $\pm$ 0.12 (0.76)	21 細胞	9421
	0.26 $\pm$ 0.19 (0.47)	0.19 $\pm$ 0.19 (0.92)	0.08 $\pm$ 0.04 (0.58)	4 回の実験	
Aug3 RNAi	0.29 $\pm$ 0.19 (0.59)	0.22 $\pm$ 0.16 (0.95)	0.05 $\pm$ 0.09 (0.26)	12 細胞	4583
	0.30 $\pm$ 0.19 (0.76)	0.24 $\pm$ 0.06 (0.64)	0.04 $\pm$ 0.01 (0.29)	3 回の実験	

値 = 平均  $\pm$  SD。SD は細胞間 (上段) または実験ごと(下段)のばらつきを示す。

表 7. 通常の細胞(微小管重合阻害剤未処理)での branching nucleation と切断の起こる頻度(微小管 1- $\mu\text{m}$  あたり)

	頻度( $\times 10^{-4}/\text{s } \mu\text{m}$ ) <sup>*1</sup> (p-値)		N	微小管の 全長 ( $\mu\text{m}$ )
	Branching nucleation	切断		
コントロール	$0.22 \pm 0.18$	$0.14 \pm 0.22$	21 細胞	9705
	$0.21 \pm 0.12$	$0.12 \pm 0.10$	6 回の実験	
$\gamma$ -Tubulin RNAi	$0.15 \pm 0.14$ (0.17)	$0.10 \pm 0.11$ (0.53)	21 細胞	8956
	$0.19 \pm 0.17$ (0.85)	$0.08 \pm 0.05$ (0.54)	4 回の実験	
Aug3 RNAi	$0.28 \pm 0.21$ (0.42)	$0.06 \pm 0.08$ (0.25)	12 細胞	3269
	$0.31 \pm 0.07$ (0.21)	$0.05 \pm 0.01$ (0.33)	3 回の実験	

値 = 平均  $\pm$  SD。SD は細胞間 (上段) または実験ごと(下段)のばらつきを示す。

\*1 撮影開始時(0分)と撮影終了時(12分)のフレームを用いて微小管の長さを測り、その平均値を計算に用いた。

表 8. 本研究で用いた形質転換体株の一覧

遺伝子	ライン #	親株	情報源
XMAP215 RNAi	#7		This study
$\gamma$ -Tubulin RNAi	#12	GFP-tubulin/H2B-mRFP	This study
Aug3 RNAi	#12		This study
Katanin p60 deletion	#36	GFP-tubulin	This study
$\gamma$ -Tubulin-b (TubG2) -Citrine/ $\gamma$ -tubulin-a (TubG1) $\Delta$	#1	mCherry-tubulin	This study
XMAP215 -a-Citrine	#7		This study
Mitochondrion-mRFP (tagged to $\gamma$ ATPase)	#1		(Uchida et al., 2011)
ER-mCherry	#21		Gift of Shu-Zon Wu and Magdalena Bezanilla
Golgi-mRFP (tagged to <i>P. patens</i> Man1's N-terminus)	#3	GFP-tubulin	Constructed in this study, referring to (Furt et al., 2012)
Peroxisome-mCherry (mCherry-SKL expression)	#2		This study



表 9. RNAi コンストラクト作製に用いたプライマー配列

遺伝子	5' プライマー	3' プライマー
RFP	CACCCAGACCGCCAAGC	TGCTGCTAGCTCGTCCATGCCG CCGGT
FtsZ	CACCAATAATTGCGGGTGTG	CCCTATGCCCATCAAAGATG
Profilin* <sup>1</sup>	CACCGGCTGTTTTTGGGAGGAGC	ATTGGCACATCGCACATGG
XMAP215	CACCGGAAAATGCGGATCGCACA TC	CTGAAGGTTGAGATCGATGTAG
	CACCAGGTGAACTTTTTATGAGCT	GAATACTCGAATAAGCTCCAAT
	CACCTATTTTTTCGCAGGGAGAG	TGGCGCTCTACAGTAAGTGCC
γ-Tubulin	CACCTACAGGTGGGACAATGCGG GAAC	CTAGCTGACATAACGGTAGACA C
	CACCATGTTGCACGAGCTGTTGC TG	ATGACATTTAGCATGTAGCAG
GCP4	CACCGGAGCTGCAAGCTTGCATG	ACCACCAACTTCCATAGATG
	CACCCATATGGACCTCATTGGGC ACCTG	CTTGGTGGAAACCGAGCAAGC
Mis12	CACCATGGAAGTTGATACGCGCG AC	GAGTGCATCGCTTGTATCAGC
Aug3	CACCAGTTTATAGGCTTTTTGG	AGGTCATTGATGCACTTATG
	CACCAAGCATGTAATAAAGTTC	GGATCCGCTGTGAGATGTAGTA TTCCTGC
CLASP* <sup>2</sup>	TATAgcgccgcAAAAAaggatccGCT CTGGAAGCTGATGAGAAGC	ATATggcgccgcccAAAAAAGATCTC CTCACTCATTGCATCTGAGC
	TATAgcgccgcAAAAAaggatccGGA GATGAGCTTGTACGTCATC	ATATggcgccgcccAAAAAAGATCT GCACTGGCAGGAAAGTTTCC
	TATAgcgccgcAAAAAaggatccGAG ACTCATCTATTCTTCTGTC	ATATggcgccgcccAAAAAAGATCT GTCTCTGGCTGATTGTAAAAGC
	TATAgcgccgcAAAAAaggatccCTG ACGGAGTTCTCTCATGCC	ATATggcgccgcccAAAAAAGATCTC GAGGACGATCCCATTCTTGC

\*<sup>1</sup> (Vidali et al., 2007)

\*<sup>2</sup>CLASP は 2 つのパラログを持つため、2 つの遺伝子の標的配列を制限酵素でつなげることで、確実に両方の遺伝子を標的とするコンストラクトを作成した。

制限酵素サイトを小文字で示した。

表 10. qRT-PCR に使用したプライマー配列

遺伝子	5' プライマー	3' プライマー
TUA1 (コントロール) <sup>#</sup>	CGTAGGAGGGACCAGTTTGG	TGCATTCATCCCCGAGTCA
FtsZ	GGGCGGGAATCCAGAAATA	CGCGTAGGGCTTCTTCCA
TubG2 ( $\gamma$ -tubulin)	GTCGTACGCAAGAACAAAGGAA	CTTCGCCCTGAATGATGTTGA
Aug3	TAGCGAGTGGTTCTCCAAACAA	GGCACATTTTCGATTTTCCTTCT
GCP4	GACCGCGATGACACTGCTAAT	CCGGACACGCCACATAGG

<sup>#</sup> (Hiwatashi et al., 2008)

表 11. プラスミド作製に用いた PCR プライマー配列

Gene	5' primer	3' primer
XMAP215	AAAggtaccCCTCAGGTGCGAAG CTTGTGC	AAAatcgatATACTCTGAACCCC CGCCAGC
-a-Citrine	AAAggatccCCACCTGAAGACGA TAATCATTTC	AAAtctagaAGCCCTGGAACGT CCTAGGGACTG
$\gamma$ -Tubulin-a (TubG1) knockout	AAActcgagCCAACCACCAAGTG AGTGAGACTTC AAAggatccCAATGCGAATGGAG GTTGCAGG	AAAgatataCTTGGTCGCGCTTT CTTCAGACC AAAccgaggCGTGCTCAGACCA GATGTGTG
PpMan1-RFP	ATAgcggccgcCCCCTTCACCAT GGCAATTCAGAGTCGAAGATC	TATggcgcgccCACCCCTTATTAT GGCGATCCCATAGGAAG
Peroxisome- mCherry	ATAgcggccgcCCCCTTCACCAT GGTTTCTAAAGGAGAAGA CAATATG	TATggcgcgccCACCCCTTTTACA ACTTAGATTTATACAATTCAT CCATTCCTCCAG
Katanin p60-a knockout	GGggtaccGATTCTCACTCACGC CATCACG CGggatccGCTTCTGATGTAAAC GATGGAGC	CCGctcgagACTGTTCTCGTCC CGCAATCAC TCCccgaggACTTCGCATGTGA GAGCCACC
Katanin p60-b knockout	GGggtaccGCCATTCAAGCCATT CGAGAATGG CGggatccGATCAGGATGTAAAT GATGCATCTGG	CCGctcgagGCTGTCCTCCTCG TCCCGCAAC TCCccgaggGCACATGAACTTA CATAAGTGGTGC

制限酵素サイトを小文字で示した

表 12. 相同組換えの確認に使用したプライマー配列

遺伝子	5' プライマー	3' プライマー
γ-Tubulin-a (TubG1) knockout	CAGCCTTGACATGTGGAGATAG TTG	ATGCTTGGCAGCAGTGGAGAA GCTC
γ-Tubulin-b (TubG2) -Citrine	GGTTGGGAATAGGTTACAAAA GTC	TAATACATGGTCTTTTTAAATTT CATC
XMAP215 -a-Citrine	GCTGCAGTGTTCAAGAAGATCG GTG	GCAGAGCAGGAGCCCATCAGC GAG
Katanin p60-a knockout	CATCGAGTTCTTGTCTTGACAC ATACTC	GAGGTTGATATCTAAGAGATGA TCAAAGCAC

表 13. 本研究で用いたオーグミンおよび  $\gamma$ -TuRC サブユニットの一覧

遺伝子名	タンパク質複合体	オーソログ
<i>Aug2</i>		CEP27/HAUS2 (Hs)
<i>Aug3</i>	Augmin	Aug3 (At), Dgt3 (Dm), hDgt3/C4orf15/HAUS3 (Hs)
<i>Aug4</i>		Aug4 (At), C14orf94/HAUS4 (Hs)
<i><math>\gamma</math>-Tubulin-a/TubG1</i>		$\gamma$ -Tubulin (Hs, At, Dm)
<i><math>\gamma</math>-Tubulin-b/TubG2</i>	$\gamma$ -TuRC	$\gamma$ -Tubulin (Hs, At, Dm)
<i>GCP4</i>		GCP4 (Hs, At), Dgrip75 (Dm)

Hs; ヒト (*Homo sapiens*), At; シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*), Dm; キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)

表 14. 本研究で使用了した遺伝子の遺伝子 ID

遺伝子名	遺伝子 ID
<i>γ-Tubulin-a/TubG1</i>	Pp1s234_17
<i>γ-Tubulin-b/TubG2</i>	Pp1s266_15
<i>Aug2</i>	Pp1s14_257
<i>Aug3</i>	Pp1s9_108
<i>Aug4</i>	Pp1s105_58
<i>XMAP215/MOR1-a</i>	Pp1s66_170
<i>Katanin p60-a</i>	Pp1s213_118
<i>Katanin p60-b</i>	Pp1s99_113
<i>PpMan1</i>	Pp1s387_34
<i>CLASP-a</i>	Pp1s16_248
<i>CLASP-b</i>	Pp1s212_83
<i>CLASP-c</i>	Pp1s55_289
<i>FtsZ</i>	Pp1s80_60
<i>Profilin (PRFa)</i>	Pp1s3_19
<i>GCP4</i>	Pp1s34_188

## 動画の説明

### 動画 1 ヒメツリガネゴケ原糸体細胞の長時間タイムラプス観察画像

GFP-tubulin (緑)/ヒストン H2B-mRFP (赤)発現株を 3 分ごとに観察した。撮影開始を 0 分とした。10 ×対物レンズを使用した。スケールバーは 100 μm。

### 動画 2 オーグミン(Aug3 サブユニット)、γ-TuRC (γ-tubulin、GCP4 サブユニット) のノックダウンにより、分裂の遅延、異常なスピンドルの形成、細胞質分裂の失敗が起こる

10 ×対物レンズを用いて GFP-tubulin (緑)/ヒストン H2B-mRFP (赤)を 3 分ごとに観察した。激しい表現型を示す細胞(上段)と弱い表現型を示す細胞(下段)が確認された。0 分は核膜崩壊を示す。スケールバーは 20 μm。

### 動画 3 核膜崩壊から分裂後期開始までのタイムラプス観察

コントロール、Aug3 RNAi、γ-tubulin RNAi 細胞においてスピニングディスク型共焦点蛍光顕微鏡により GFP-tubulin (緑)/ヒストン H2B-mRFP (赤)を 1 分ごとに観察した。1 μm ごとに撮影した 13 枚の z スタック画像を最高輝度プロジェクションした。左側に細胞の先端を配置した。0 分は核膜崩壊を示す。撮影は三木智博氏と共同で行った。スケールバーは 10 μm。

### 動画 4 分裂後期開始から細胞質分裂期までのタイムラプス観察

コントロール、Aug3 RNAi、γ-tubulin RNAi 細胞においてスピニングディスク型共焦点蛍光顕微鏡により GFP-tubulin (緑)/ヒストン H2B-mRFP (赤)を 1 分ごとに観察した。1 μm ごとに撮影した 13 枚の z スタック画像を最高輝度プロジェクションした。左側に細胞の先端を配置した。染色体分離が起こったフレームを 0 分とした。撮影は三木智博氏と共同で行った。スケールバーは 10 μm。

### 動画 5 フラグモプラスト微小管の 3 次元構築像

図 2-5A の 27 分、図 2-5B の 29 分、図 2-5C の 28 分の時点のフラグモプラストを 3 次元構築した。コントロール細胞では細胞幅は 13 μm 以上あるため、この撮影条件ではフラグモプラストのリングの一部しか観察できていない。撮影は三木智博氏と共同で行った。



### 動画 6 Endoplasmic 微小管の動態

斜光照明蛍光顕微鏡法を用いて 3 秒ごとに GFP-tubulin を観察した。撮影開始を 0 秒とした。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 7 微小管の切断

3 秒ごとに原糸体細胞の GFP-tubulin を観察した。0 秒で微小管が切断された。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 8 Branching nucleation

代表的な branching nucleation を示した。3 秒ごとに原糸体細胞の GFP-tubulin を観察した。Branching 部位を矢尻で示した。多様な角度の branching nucleation が観察された。一番右の例では娘微小管は母微小管に沿って移動した。母微小管のプラス端を右側に配置した。Branching nucleation が起こったフレームを 0 秒とした。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 9 娘微小管の母微小管からの切り離し

図 3-6E 下段の branching nucleation を示した。3 秒ごとに  $\gamma$ -tubulin-Citrine (マゼンダ) および mCherry- $\alpha$ -tubulin (緑) を観察した。Branching nucleation が起こったフレームを 0 秒とした。78 秒で娘微小管の切り離しが起こった。母微小管のプラス端を右側に配置した。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 10 Cytoplasmic nucleation

代表的な cytoplasmic nucleation を示した。3 秒ごとに原糸体細胞の GFP-tubulin を観察した。細胞質から微小管が生成された。Cytoplasmic nucleation が起こったフレームを 0 秒とした。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 11 微小管 regrowth アッセイ

GFP-tubulin 発現株において oryzalin 処理により微小管をすべて脱重合させた後 oryzalin を除去し、微小管再形成過程を 3 秒ごとに観察した。0 秒で oryzalin の除去を開始した。大部分の微小管は cytoplasmic nucleation (赤) で、一部は braching nucleation (黄) により生成された。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 12 安定な微小管が存在した状態での regrowth アッセイ

GFP-tubulin 発現株において oryzalin 処理により微小管を脱重合させた後 oryzalin を除去し、微小管再形成過程を 3 秒ごとに観察した。0 秒で薬剤の除去を開始した。安定な微小管が存在する場合でも大部分の微小管は cytoplasmic nucleation (赤)により生成され、branching nucleation (黄)による生成はほとんど観察されなかった。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 13 細胞小器官以外の場所からの微小管生成

細胞小器官(マゼンダ)に mCherry または RFP を付加した形質転換体において regrowth アッセイを行った。葉緑体は自家蛍光を撮影した。緑は GFP-tubulin を示す。0 秒で oryzalin の除去を開始した。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 14 微小管重合阻害剤 oryzalin 存在下での $\gamma$ -tubulin の動態

Oryzalin 存在下で  $\gamma$ -tubulin の動態を 0.2 秒ごとに 20 秒間撮影した。動く点(赤と黒)と動かない点(青)が観察された。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。

### 動画 15 $\gamma$ -Tubulin 依存的な微小管生成

$\gamma$ -Tubulin-b-Citrine (マゼンダ)/mCherry- $\alpha$ -tubulin (緑)発現株での微小管再形成の様子。微小管が生成した  $\gamma$ -tubulin の-Citrine シグナルを矢印で示した。0 秒で oryzalin の除去を開始した。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。