

I 分裂準備帯の形成機構と機能の解析

Analysis of developmental mechanisms and function of preprophase bands

峰雪芳宣・竹内美由紀
Mineyuki, Y., Takeuchi, M.

分裂準備帯(preprophase band)は高等植物の体細胞分裂の分裂面挿入位置を決定する微小管でできた装置である。この装置はG2期に出現し、前期に完成するが、核膜崩壊前後に消失する。しかし、この装置が存在した位置になんらかの位置情報が残され、細胞分裂の最後で、確実に細胞板はこの位置に向かって伸長する。我々は、どのようにして微小管が将来の分裂面の位置に分裂準備帯として並ぶのか、分裂準備帯が消失した後に残るメモリーは何か、また、そのメモリーの蓄積機構は何か、を明らかにすることを目的として研究を行っている。今年度は、昨年度報告した分裂準備帯でクラスリンを介したエンドサイトーシスが活発な事実をもとに、分裂面の位置メモリー蓄積におけるエンドサイトーシスの役割に関するモデルを提唱し、報告した。

II 植物の細胞分裂と細胞質分裂に関するナノマシンの解析

Analysis of nano-machines involved in plant cell division and cytokinesis

峰雪芳宣・竹内美由紀・山内大輔・中井朋則
Mineyuki, Y., Takeuchi, M., Yamauchi, D., Nakai, T.

生命体を構成する生体分子は集合してナノマシン、あるいはより高次なナノシステムを形成し、生命活動を行っている。植物の細胞質分裂に関与する微小管・アクチン繊維・膜系からなるナノマシン・ナノシステムの構築と制御機構を様々な顕微鏡を使って解析している。特に、国内外の幾つかの研究室と共同で、加圧凍結・2軸電子線トモグラフィー法を使ったナノマシンの~7nmレベルでの解析を行っている。今年度は、微小管とマイクロフィラメント(アクチン繊維)との関連を定量的に解析した。また、中心体なしで微小管の構築が行われる植物独特の微小管構築機構を明らかにするために、中心体構成分子 γ チューブリンの構造と機能に関する比較を行い、被子植物 γ -チューブリンに特徴的なアミノ酸残基が存在することを見つけた。

III 局所・大局ライブイメージング顕微鏡(GLIM)システムの開発

Development of Global -Local Live Imaging Microscope (GLIM) system

峰雪芳宣・玉置大介
Mineyuki, Y., Tamaoki, D.

対物レンズの交換なしに、高倍率狭視野(局所)での蛍光ラベルした分子の挙動変化と、広視野(大局)で細胞全体の構造変化を同時並行で記録することで、細胞の局所で起こっている分子の挙動と、大局での

状態変化との関係を記録、解析できる Global-Local Live Imaging Microscope (GLIM) システムの開発を行い、プロトタイプを作製した。

IV 種子内部構造の X 線 CT による解析

Analysis of internal structure of seeds using X-ray computed tomography

山内大輔・峰雪芳宣・竹内美由紀
Yamauchi, D., Mineyuki, Y., Takeuchi, M.

種子は乾燥して休眠状態にあり、吸水すると、その中の胚は生命活動を再開して発芽する。その過程に起こる種子中での構造変化を観察する時に、種皮が種子の周りを覆っており、支障となっている。しかし、X 線 CT 技術を用いれば、固定や切片作製をしなくても種子内部構造を観察可能である。この技術を用いてミヤコグサの種子内部に集積したシュウ酸カルシウム結晶の種子形成及び発芽の過程での時空間的变化を調べる目的で SPring-8 の BL20B2 で X 線 CT 撮影を行い、それらの画像データの分析を行った。

V 種子発芽時における遺伝子発現機構の解析

Analysis of gene expression during seed germination

山内大輔・中井朋則
Yamauchi, D., Nakai, T.

種子貯蔵物質は、発芽時に分解され、芽や根の成長に利用される。この分解に関わる加水分解酵素の遺伝子発現は、植物ホルモンであるジベレリンに誘導される。イネ種子プロテアーゼ遺伝子のジベレリン応答発現に関わる転写因子の複合体形成について、蛍光タンパク質再構成法を用いて、解析を進めた。

VI シダの前葉体における造精器形成機構の解析

Analysis of formation of antheridium in prothallia of fern

山内大輔・峰雪芳宣
Yamauchi, D., Mineyuki, Y.

シダの前葉体における造精器形成の誘導が、カニクサではジベレリンによって行われていることがよく知られているが、その機構についてはよくわかっていない。そこで、カニクサよりジベレリン受容体やその結合タンパク質である DELLA タンパク質をコードした cDNA を単離した。さらに、これらの遺伝子発現について、*an-1* というジベレリンがなくても造精器を形成する突然変異体の培養細胞と前葉体との比較を行った。

VII 細菌由来セルロースの合成機構

Mechanism of cellulose production from bacteria

中井朋則・峰雪芳宣
Nakai, T., Mineyuki, Y.

酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* が生産するセルロースは、他の細菌が合成するセルロースと比較して、高等植物のセルロースと結晶構造が近く、その合成機構の解明は植物由来セルロースの合成機構の解明にも直結している。特に、セルロース分解酵素であるセルラーゼが植物でも細菌でもセルロースの合成に深く関与していることが知られている。すでに作成しているセルラーゼ遺伝子を破壊した酢酸菌を電子顕微鏡で観察したところ、野生株と異なる菌体外不溶性繊維を非常に低頻度で排出していることを明らかにした。その繊維をアルカリ洗浄した後、C-NMR 及び FI-IR により解析した。その結果、不溶性繊維にセルロース II が含まれていることが示唆された。

発表論文 List of Publications

- I -1 I. Karahara (富山大), L. A. Staehelin (コロラド大), and Y. Mineyuki: A role of endocytosis in plant cytokinesis. *Communicative & Integrative Biology*, 3, 1-3 (2010)
- I -2 I. Karahara (富山大), J. Suda (富山大), Y. Masuta (富山大), H. Tahara, E. Yokota, T. Shimmen, K. Misaki (理研 CDB), S. Yonemura (理研 CDB), L. A. Staehelin (コロラド大), and Y. Mineyuki: The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase of onion cotyledon epidermis. *Plant J.*, 57, 819-831 (2009)
- I -3 I. Karahara (富山大), J. Suda (富山大), L. A. Staehelin (コロラド大), Y. Mineyuki: Quantitative analysis of vesicles in the preprophase band by electron tomography. *Cytologia*, 74, 113-114 (2009)
- I -4 唐原一郎 (富山大)・峰雪芳宣: 高等植物の分裂準備帯におけるクラスリンが関与するエンドサイトーシス、 *Plant Morphology*, 22, 47-55, (2010)
- II -1 M. Takeuchi, K. Takabe (京大) and Y. Mineyuki, *Immuno-electron Microscopy: Methods and Protocols*, The Humana Press Inc., pp155-165, 2010
- II -2 竹内美由紀・唐原一郎 (富山大)・峰雪芳宣: 分裂準備帯における微小管とマイクロフィラメントの観察、*阪大超高压センター 2009 年年報*, 38, 40-43 (2009)
- II -3 M. Takeuchi, I. Karahara (富山大), N. Kajimura (阪大), A. Takaoka (阪大), K. Misaki (理研 CDB), S. Yonemura (理研 CDB), L. A. Staehelin (コロラド大) and Y. Mineyuki: Electron tomographic analysis of microtubule-microfilament interactions in the epidermal cell cortex of onion cotyledons. 第 61 回日本細胞生物学会大会 (Nagoya), 2009
- II -4 M. Takeuchi, I. Karahara (富山大), N. Kajimura (阪大), A. Takaoka (阪大), K. Misaki (理研 CDB), S. Yonemura (理研 CDB), L. A. Staehelin (コロラド大) and Y. Mineyuki: Electron tomographic analysis of microtubule-microfilament interactions in the epidermal cell cortex of high pressure frozen onion cotyledons. *ASCB Annual Meeting 2009* (San Diego), 2009
- II -5 M. Takeuchi and Y. Mineyuki: Electron tomographic analysis of microtubule-microfilament interactions in the cell cortex. *Global COE Symposium "Microscopy and Cell Biology"* (Kamigori), 2010
- II -6 M. Takeuchi, I. Karahara (富山大), N. Kajimura (阪大), A. Takaoka (阪大), K. Misaki (理研 CDB), S. Yonemura (理研 CDB), L. A. Staehelin (コロラド大) and Y. Mineyuki: Microtubule-microfilament interactions during preprophase band formation of onion cotyledon epidermal cells analyzed by electron tomograph. *ASCB/JSCB/RIKEN CDB 2009*

- Meeting (Kyoto), 2009
- II-7 櫻井友馬・竹内美由紀・仲道和真・藪内隆俊・玉置大介・峰雪芳宣：ミオシン阻害剤 2, 3-butanedione monoxime はタマネギの核と細胞を肥大させる、日本植物学会第 73 回大会 (山形)、2009
- II-8 櫻井友馬・竹内美由紀・仲道和真・藪内隆俊・玉置大介・峰雪芳宣：ミオシン阻害剤 2,3-butanedione monoxime によるタマネギの核と細胞を肥大、日本植物形態学会第 21 回大会 (山形)、2009
- II-9 竹内美由紀・唐原一郎 (富山大)・梶村直子 (阪大)・美崎佳寿代 (理研 CDB)・米村重信 (理研 CDB)・L. A. Staehelin (コロラド大)・峰雪芳宣：電子線トモグラフィ法によるタマネギ表皮細胞の微小管-マイクロフィラメント相互作用の解析、2010 年生体運動研究合同班会議 (東京)、2010
- II-10 Y. Mineyuki: Characterization of microtubule-end structure and γ -tubulin in plants. RIKEN CDB seminar (Kobe), 2009
- II-11 Y. Miyamoto, T. Horio (カンザス大), D. Yamauchi, T. Okada (徳島文理大), S. Sekita (徳島文理大), N. Futamura (森林総合研), K. Shinohara (森林総合研), Y. Fujimoto, T. Nakai, T. Shimmen, T. Saruwatari, M. Shimamura (広島大), T. Akashi (名古屋大) and Y. Mineyuki: Characterization of plant γ -tubulin: unique amino acid residues and function. ASCB Annual Meeting 2009 (San Diego), 2009
- II-12 Y. Miyamoto, T. Horio (カンザス大), D. Yamauchi, T. Okada (徳島文理大), S. Sekita (徳島文理大), N. Futamura (森林総合研), K. Shinohara (森林総合研), Y. Fujimoto, T. Nakai, T. Shimmen, M. Shimamura (広島大), T. Akashi (名古屋大) and Y. Mineyuki: Changes in function and amino acid residues of γ -tubulin in the evolution of green plants. 第 61 回日本細胞生物学会大会 (Nagoya), 2009
- II-13 寺内 真 (北大)・梶村直子 (阪大)・長里千香子 (北大)・C. Katsaros (アテネ大)・峰雪芳宣・本村泰三 (北大)：褐藻アミジグサにおける細胞質分裂時に形成される plasmodesmata の微細構造解析、日本藻類学会第 34 回大会 (つくば)、2010
- II-14 長里千香子 (北大)・梶村直子 (阪大)・植木知佳 (北大)・峰雪芳宣・本村泰三 (北大)：電子線トモグラフィ法を用いた褐藻エゾイシゲの細胞質分裂における膜構造変化の解析、日本藻類学会第 34 回大会 (つくば)、2010
- III-1 峰雪芳宣：オーストラリアの顕微鏡関連装置共同利用システム AMMRF の視察報告、Plant Morphology, 21,13-16, (2009)
- III-2 峰雪芳宣：デジタル画像処理技術と細胞の分裂、シンポジウム “形を見る” 技術は植物科学の発展にどのように寄与してきたか? (山形)、2009
- III-3 猿渡 徹・玉置大介・馬野且元 (三谷商事)・石渡一之 (ニコンインステック)・峰雪芳宣：細胞の局所と細胞全体での構造変化を並行して記録するシステムの構築、日本植物形態学会第 21 回大会 (山形)、2009
- III-4 玉置大介・猿渡徹・峰雪芳宣：局所・大局同時並行タイムラプスシステムを使用した植物体と細胞のライブ観察の可能性の検討、2009 年度日本植物学会近畿支部会・藻類談話会合同大会 (神戸)、2009
- III-5 玉置大介・猿渡徹・馬野且元 (三谷商事)・石渡一之 (ニコンインステック)・峰雪芳宣：細胞の局所での構造変化と細胞全体の様子を並行して記録する顕微鏡システムの開発、第 51 回日本植物生理学会年会 (熊本)、2010
- IV-1 唐原一郎 (富山大)・坂東理史 (富山大)・須藤宇道 (富山大)・玉置大介・上杉健太郎 (高輝度科学研究センター)・山内大輔・峰雪芳宣：イネ種子根における通気組織の発達に側方マンニトール処理が与える影響-X 線 CT による通気組織の可視化、日本植物形態学会第 21 回大会 (山形)、2009
- IV-2 坂東理史 (富山大)・唐原一郎 (富山大)・須藤宇道 (富山大)・玉置大介・上杉健太郎 (高輝度科学研究センター)・山内大輔・峰雪芳宣：X 線 CT によるイネ種子根における通気組織の可視化の試み、第 31 回根研究集会 (秋田)、2009
- IV-3 坂東理史 (富山大)・唐原一郎 (富山大)・須藤宇道 (富山大)・玉置大介・上杉健太郎 (高輝度科学研究センター)・山内大輔・峰雪芳宣：X 線 CT によるイネ一次根における通気組織の可視化、第 51 回日本植物生理学会年会 (熊本)、2009

- IV-4 峰雪芳宣・早見実人・唐原一郎（富山大）・玉置大介・竹内美由紀・佐藤繭子（理研・植物）・豊岡公德（理研・植物）・上杉健太郎（高輝度科学研究センター）・山内大輔：X線CTを使った植物種子内部構造解析の可能性の検討、日本顕微鏡学会第65回学術講演会（仙台）、2009
- IV-5 山内大輔・早見実人・澤田薫・玉置大介・唐原一郎（富山大）・竹内美由紀・佐藤繭子（理研・植物）・豊岡公德（理研・植物）・上杉健太郎（高輝度科学研究センター）・峰雪芳宣：X線CTによるミヤコグサ種子中の細胞内含有物の観察、日本植物学会第73回大会（山形）、2009
- IV-6 山内大輔・早見実人・玉置大介・唐原一郎（富山大）・澤田薫・竹内美由紀・佐藤繭子（理研・植物）・豊岡公德（理研・植物）・西岡洋・寺田靖子（高輝度科学研究センター）・上杉健太郎（高輝度科学研究センター）・峰雪芳宣：X線CTによるミヤコグサ種子中の結晶構造の観察、第30回種子生理生化学研究会（福岡）、2009
- V-7 山内大輔・早見実人・玉置大介・澤田薫・竹内美由紀・佐藤繭子（理研・植物）・豊岡公德（理研・植物）・西岡洋・寺田靖子（高輝度科学研究センター）・上杉健太郎（高輝度科学研究センター）・唐原一郎（富山大）・峰雪芳宣：X線CTによるミヤコグサ種子の結晶体の分布変化の時空間的解析、日本植物形態学会第21回大会（山形）、2009
- VII-1 中井朋則・辻暁・今井友也（京大・生存研）・杉山淳司（京大・生存研）・榊原 斉（情報通研・神戸）・大岩和弘（情報通研・神戸）・峰雪芳宣：酢酸菌セルラーゼ欠損変異株が分泌するねじれたセルロース様繊維の特徴、第51回日本植物生理学会年会（熊本）、2010

大学院生命理学研究科

博士後期課程

藪内隆俊：植物の細胞分裂面の位置メモリーに関する分子の研究

博士前期課程

猿渡 徹：植物培養細胞を使った局所・大局同時並列タイムラプスシステムの構築

早川基実：高等植物の微小管ダイナミクスの研究宮本裕子：陸上植物における γ -チューブリン機能の進化

櫻井友馬：分裂準備帯の微小管構造とダイナミクス

藤本祐作：藻類から陸上植物への進化過程における γ -チューブリン遺伝子構造の変化

科学研究費補助金等

- 日本学術振興会科学研究費補助金（平成20年度～21年度）挑戦的萌芽研究
研究課題 X線CTを利用した種子発芽過程解析法の検討
研究代表者 峰雪芳宣
研究分担者 山内大輔
- 科学技術振興機構先端計測分析技術・機器開発事業（平成20年度～22年度）機器開発プログラム（領域特定型）
研究課題 局所・大局同時並行タイムラプスシステムの開発
研究代表者 峰雪芳宣
- 兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成21年度）特別研究
研究課題カニクサ前葉体より分泌されるフェロモンに対する受容体の解析
研究代表者山内大輔