

## I 分裂準備帯の形成機構と機能の解析

Analyses of development 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、高等植物体細胞分裂の分裂面挿入位置決定に関与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、電子線トモグラフィー法で分裂準備帯形成過程に於けるアクチン繊維と微小管の関係について詳細な解析を行い、微小管帯形成に関与しているアクチン繊維は比較的短いことを明らかにした。

## II 植物の細胞分裂と細胞質分裂に関与するナノマシンの解析

Analyses 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、あるいはより高次の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。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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -チューブリンに特徴的なアミノ酸残基を他の植物型あるいは酵母型のアミノ酸に変換した時の植物 $\gamma$ -チューブリンの機能の違いについて検討した。

## 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った。

## 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・玉置大介・竹内美由紀  
Yamauchi, D., Mineyuki, Y., Tamaoki, D., Takeuchi, M.

種子は乾燥していて休眠状態にあり、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。この技術を用いて細胞の並びと細胞間隙の発達を調べる目的で SPring-8 の BL20B2 および BL20XU 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子形成機構の解析

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子形成の誘導が、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子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。このセルラーゼの細胞内局在を調べるため、蛍光タンパク質 mCherry をコードした遺伝子をセルラーゼ遺伝子の下流に融合した。さらにこの融合タンパク質がセルラーゼ活性及び蛍光活性を有することを明らかにした。

#### 発表論文 List of Publications

- I-1 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)
- I-2 M. Takeuchi and Y. Mineyuki: Electron tomographic analysis of microtubule-microfilament interactions in the preprophase band, *International Symposium on Bioimaging and Surface Sciences, 20th Anniversary Joint-Symposium of School of Science, University of Hyogo (Kamigori)*, 2011
- I-3 竹内美由紀・峰雪芳宣: 電子線トモグラフィー法による分裂準備帯の微小管 - マイクロフィラメント相互作用の解析、植物電子顕微鏡若手ワークショップ (理研横浜・横浜)、2010
- I-4 竹内美由紀・峰雪芳宣: 電子線トモグラフィーによる微小管とアクチンの相互作用の解析、日本植物学会第74回大会シンポジウム “顕微鏡技術は植物科学の発展にどのように貢献できるか?” (中部大・春日井市)、2010
- I-5 M. Takeuchi, I. Karahara (富山大), N. Kajimura (阪大), A. Takaoka (阪大), K. Misaki (理研), S. Yonemura (理研), L. Staehelin (コロラド大) and Y. Mineyuki: Short actin filaments connected with microtubules are involved in preprophase band formation in onion epidermal cells, 第62回日本細胞生物学会大会 (大阪), 2010
- II-1 M. Takeuchi, K. Takabe (京大) and Y. Mineyuki: Immunoelectron microscopy of cryofixed and freeze-substituted plant tissues, in *Immuno-electron Microscopy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* eds by S. Schwartzbach and T. Osafune, The Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2010, pp. 155-164.
- II-2 峰雪芳宣: トモグラフィーによる植物のマイクロ・ナノ 3D イメージング、日本顕微鏡学会平成22年度「マテリアル電子線トモグラフィ研究部会講演会」(工学院大・東京)、2010
- II-3 宮本裕子・堀尾哲也 (カンザス大)・山内大輔・藤本祐作・玉置大介・中井朋則・嶋村正樹 (広島大)・紅 朋浩 (名古屋大)・峰雪芳宣: 分裂酵母での相補性を利用した  $\gamma$ -チューブリンにおける被子植物特異的なアミノ酸残基置換の影響について、日本植物学会第74回大会 (中部大・春日井市)、2010
- II-4 宮本裕子・堀尾哲也 (カンザス大)・山内大輔・藤本祐作・玉置大介・中井朋則・嶋村正樹 (広島大)・紅 朋浩 (名古屋大)・峰雪芳宣:  $\gamma$ -チューブリンにおける被子植物特異的なアミノ酸残基置換と形態変化について、日本植物形態学会第22回大会 (中部大学・春日井市)、2010
- II-5 K. Tsutsumi (浜松医大), A. Yuba-Kubo (慶応大), Y. Miyamoto, T. Horio (カンザス大), K. Ikegami (浜松医大), D. Yamauchi, Y. Mineyuki, Y. Konishi (慶応大) and M. Setou (慶応大): Comparison of function between two mammalian  $\gamma$ -tubulin isoforms, 第62回日本細胞生物学会大会 (大阪)、2010
- II-6 K. Tsutsumi (浜松医大), A. Yuba-Kubo (慶応大), Y. Miyamoto, T. Horio (カンザス大), K. Ikegami (浜松医大), D. Yamauchi, Y. Mineyuki, Y. Konishi (慶応大) and M. Setou (慶応大): TUBG2 has microtubule nucleating activity and is the major  $\gamma$ -tubulin isoform in matured

- mammalian brain, ASCB Annual Meeting 2010 (Philadelphia), 2010
- II-7 須藤宇道 (富山大)・唐原一郎 (富山大)・山口 駿 (富山大)・玉置大介・矢野幸子 (宇宙航空研究開発機構)・谷垣文章 (宇宙航空研究開発機構)・島津 徹 (日本宇宙フォーラム)・福井啓二 (日本宇宙フォーラム)・笠原春夫 (有人宇宙システム株式会社)・梶田大輔 (有人宇宙システム株式会社)・山内大輔・竹内美由紀・峰雪芳宣・上杉健太郎 (高輝度光科学研究センター)・笠原宏一 (東海大)・山田晃弘 (東大)・西谷和彦 (東北大)・保尊隆享 (大阪市立大)・西内 巧 (金沢大)・神阪盛一郎 (富山大) : Space Seed – 微小重力環境下におけるシロイヌナズナの生殖成長、第 27 回宇宙利用シンポジウム (相模原)、2011
- II-8 C. Nagasato (北大), N. Kajimura (阪大), C. Ueki (新日鐵), Y. Mineyuki, T. Motomura (北大) : Electron tomographic analysis of cytokinesis in *Silvetia babingtonii* zygotes. ECTOCARPUS 2010 A decade of algal genomics (Gent), 2010
- II-9 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・奥田一雄 (高知大)・本村泰三 (北大) : 褐藻における plasmodesmata の微細構造解析、日本植物学会第 74 回大会 (中部大・春日井市)、2010
- II-10 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・奥田一雄 (高知大)・本村泰三 (北大) : 電子線トモグラフィー法を用いた褐藻アミジグサの原形質連絡の微細構造解析、日本植物形態学会第 22 回大会 (中部大・春日井市)、2010
- II-11 長里千香子 (北大)・梶村直子 (阪大)・峰雪芳宣・本村泰三 (北大) : 電子線トモグラフィー法でみる褐藻エゾイシゲの細胞質分裂過程、日本植物学会第 74 回大会 (中部大・春日井市)、2010
- III-1 Y. Mineyuki, D. Tamaoki, M. Takeuchi, I. Karahara (富山大), and D. Yamauchi: 3-D image analysis of plant tissues and cells using tomography and global-local live imaging microscopy (GLIM). Internatinal Microscopy Congress 17 (Rio de Janeiro), 2010
- III-2 D. Tamaoki and Y. Mineyuki: Development of the global-local live imaging microscope (GLIM) System, International Symposium on Bioimaging and Surface Sciences, 20th Anniversary Joint-Symposium of School of Science, University of Hyogo (Kamigori), 2011
- III-3 峰雪芳宣: トモグラフィー法を用いた植物細胞・組織の 3D 解析, 認定 NPO 法人 第 7 回 可視化技術ワークショップ “急速に進化する 3D イメージングと 3D 構築法” (日本女子大学・東京), 2010
- III-4 D. Tamaoki, T. Saruwatari, K. Umano (三谷商事), K. Ishiwata (ニコンインステック) and Y. Mineyuki: Development of Global-Local Live Imaging Microscope (GLIM) system, 第 62 回日本細胞生物学会大会 (大阪)、2010
- III-5 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: 局所・大局ライブイメージング顕微鏡 (GLIM) システムの開発、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会 (名古屋国際会議場・名古屋市)、2010
- III-6 玉置大介・山内大輔・早見実人・唐原一郎 (富山大)・竹内美由紀・上杉健太郎 (高輝度光科学研究センター)・峰雪芳宣: X 線 CT によるシロイヌナズナ種子の内部構造の観察、第 31 回種子生理生化学研究会 (近江八幡市)、2010
- III-7 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)・米村重信 (理研)・L. A. Staehelin (コロラド大)・峰雪芳宣: 電子線トモグラフィー法による分裂準備帯形成時の微小管に付随するマイクロフィラメントの解析、日本植物形態学会第 22 回大会 (中部大学・春日井市)、2010
- III-8 長谷川雄基・玉置大介・峰雪芳宣・大隅 隆・廣瀬富美子: クロマチン再構成因子 Mi-2 $\alpha$  の SUMO 修飾による活性制御、第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸市)、2010
- III-9 峰雪芳宣・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) : GLIM (Global-local Live Imaging Microscope) システムによる細胞分裂全体の様子と細胞表層の局所での事象の並行観察、2011 年生体運動研究合同班会議 (大阪市立大・大阪市)、2011
- IV-1 唐原一郎 (富山大)・山内大輔 : X 線 CT による種子と実生の形態解析、日本植物学会第 74 回大会 (中部大・春日井市)
- IV-2 澤田 薫・山内大輔・早見実人・玉置大介・竹内美由紀・佐藤繭子 (理研)・豊岡公德 (理研)・西岡 洋・寺田靖子 (高輝度光科学研究センター)・上杉健太郎 (高輝度光科学研究センター)・唐原一郎 (富山大)・峰雪芳宣: X 線 CT によるミヤコグサ種子中のシュウ酸カルシウム結晶数の計測、第 31 回種子生理生化学研究会 (近江八幡市)、2010

- IV-3 D. Yamauchi, I. Karahara (富山大) : 3-D Image analysis of plant tissues and cells using X-ray computed tomography, international symposium on bioimaging and surface sciences, 20th anniversary joint-symposium of school of science, University of Hyogo (Kamigori), 2011
- IV-4 Y. Mineyuki: Development of 3D-imaging methods for analyses of plant cell arrangements, The Annual Review Conference for the Fiscal Year of 2010 (Kamigori), 2011
- V-1 須藤慶太 (九大) ・中井朋則・鷺尾賢司 (北大) ・和田正三 (九大) ・今井亮三 (農研機構) ・山内大輔: イネ発芽種子における Myb 型転写因子の細胞内局在性変化による加水分解酵素遺伝子の発現制御、第 31 回種子生理生化学研究会 (近江八幡市)、2010
- V-2 須藤慶太 (九大) ・鷺尾健司 (北大) ・今井亮三 (農研機構) ・和田正三 (九大) ・中井朋則・山内大輔: イネ・プロテアーゼ遺伝子 *Rep1* のジベレリン応答を制御する転写因子複合体の解析、第 51 回日本植物生理学会年会 (東北大・仙台市)、2011
- VII-1 T. Nakai, S. Tsuji, T. Imai (京大), J. Sugiyama (京大), H. Sakakibara (情報通研), K. Oiwa (情報通研), M. Takeuchi, D. Yamauchi, Y. Mineyuki: Cellulase-disruptant strain of *Gluconacetobacter xylinus* produces highly twisted fibrils of cellulose II. 第 62 回日本細胞生物学会大会 (大阪)、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

櫻井友馬: 分裂準備帯の微小管端構造の解析

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

澤田 薫: X線 CT を用いたミヤコグサ種子内部構造の観察

田中克尚: カニクサ造精器形成機構の解析

田中卓樹: 植物セルラーゼにおける酢酸菌セルラーゼ遺伝子破壊株の機能補完

## 科学研究費補助金等

- 1 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成 22 年度～23 年度) 挑戦的萌芽研究  
 研究課題 Planer Cell Polarity 研究のための実験系確立の試み  
 研究代表者 峰雪芳宣  
 研究分担者 山内大輔
- 2 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～平成 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
- 3 兵庫県立大学特別教育研究助成金 (平成 22 年度) 教育改善に関する研究等  
 研究課題 書写キャンパスでのピコバイオロジーを目的とした電子顕微鏡教育の充実  
 研究代表者 峰雪芳宣