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、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ことを示し、それ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

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）に注目して研究を行った。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、中心体の有無で微小管系に大きな違いがある裸子植物の代表的な種に関して、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った。

Ⅲ　局所・大局同時並行タイムラプスシステムの開発

Development of a time-lapse systemrecording local and global eventsin parallel

峰雪芳宣
Mineyuki, Y.

１台の顕微鏡に、１分子イメージング用の光学系と、細胞全体を観察するための光学系を装備し、この２つの光学系を外部から１つのコンピューターによって制御させ、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、解析できるシステムの開発を始めた。

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。その過程において種子中に含まれる多量の貯蔵物質が分解される。このような発芽過程に起こる一連の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、化学固定や切片作製なしで種子内部構造を観察できる。この技術を用いてミヤコグサ、シロイヌナズナ、タマネギなどの種子内部構造を調べる目的で SPring-8 の BL20B2 で X 線を照射し、それらの画像データを得た。

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で誘導される。インゲンマメ種子中においてこのホルモン応答に関わる転写因子 PvGAI2 と緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質をタバコ BY2 培養細胞で発現させて、その細胞内での局在性を調べた。また、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も解析を進めた。

Ⅵ　ホウライシダ EST の解析

Analysis of expressed sequence tags in *Adiantumcapillus-veneris*

山内大輔
Yamauchi, D.

シダ植物のゲノムに関する研究は、種子植物と比較して進展していない。光形態形成の研究に用いられてきたホウライシダをシダのモデル植物として位置づけるために、その胞子体や配偶体などで発現している遺伝子配列(EST) の解析を進めている。これまでに決定した約30,000 クローンの塩基配列を統合データベース整備事業のTogoDB においてホウライシダ EST データベース AcEST（<u>A</u>*diantum*<u>c</u>*apillus-veneris*EST）として公開した。

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 *Gluconacetobacterxylinum* 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。その繊維を市販のセルラーゼで処理したところ、還元力の増加が検出され、不溶性繊維にセルロース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), J.Suda(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),Y. Mineyuki: The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. Plant J., 57, 819-831 (2009)

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), Y. Mineyuki: Preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase of onion cotyledon epidermis.9th Asia-Pacific Microscopy Conference (Jeju), 2008

I-3　I.Karahara (富山大), J.Suda (富山大), H.Tahara, E. Yokota, T. Shinmen, K. Misaki (理研 CDB), S. Yonemura (理研 CDB), L. A.Staehelin (コロラド大), Y. Mineyuki:Electron tomographic analysis of the plant cell cortex: The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis. Asia-Pacific Congress on Electron Tomography (Brisbane), 2009

I-4　峰雪芳宣・唐原一郎（富山大）: 電子線トモグラフィー画像の定量解析で見えて来た植物細胞分裂面の位置情報蓄積機構日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会（京都）、2008

II-1　唐原一郎（富山大）・須田甚将（富山大）・峰雪芳宣 : 電子線トモグラフィーとは何か : ナノスケールでの３D バイオイメージング. in 電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ　ナノワールドに迫るパワフル技術入門、(藤本豊士、山本章嗣　編)、秀潤社 pp. 77-82、2008

II-2 Y. Miyamoto, D. Yamauchi, R. Kuno, T.Nakai, N. Futamura (森林総合研), K. Shinohara (森林総合研), T. Shinmen, M.Shimamura (広島大), T. Akashi (名古屋大), T.Horio, Y. Mineyuki: Plant γ-tubulins have gradually lost the function that is essential for unikonts cells during their evolution. 2nd International Symposium on Bio-nanosystems (Tokyo), 2008

II-3 M. Takeuchi, I. Karahara (富山大), N. Kajimura (大阪大), A. Takaoka (大阪大), K. Misaki (理研 CDB), S. Yonemura (理研 CDB), L.A. Staehlin (コロラド大), Y. Mineyuki: Electron tomographic analysis of microtubule-microfilament interactions in the epidermal cell cortex of high pressure frozen cotyledons. Asia-Pacific Congress on Electron Tomography (Brisbane), 2009

II-4 峰雪芳宣・唐原一郎（富山大）・竹内美由紀：電子線トモグラフィー法による植物細胞表層の膜・細胞骨格ナノシステムの解析　第 60 回日本細胞生物学会大会ミニシンポジウム"細胞機能の 3 次元ナノイメージング"（横浜）、2008

II-5 唐原一郎（富山大）・峰雪芳宣：植物細胞表層の電子線トモグラフィー解析.　日本植物学会第 72 回大会（高知）、2008

II-6 竹内美由紀・唐原一郎（富山大）・梶村直子（大阪大）・鷹岡昭夫（大阪大）・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：加圧凍結・電子線トモグラフィー法によるタマネギ子葉表皮細胞微小管・アクチン相互作用の解析　日本植物学会第 72 回大会（高知）、2008

II-7 宮本裕子・山内大輔・久野亮太・中井朋則・二村典宏（森林総合研）・篠原健司（森林総合研）・新免輝男・嶋村正樹（広島大）・紅朋浩（名古屋大）・堀尾哲也・峰雪芳宣：陸上植物γ　−チューブリンのアミノ酸配列変化と機能変遷　日本植物学会第 72 回大会（高知）、2008

II-8 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　日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会冠シンポジウム認定 NPO 法人綜合画像研究支援ワークショップ"ライフサイエンス領域における微細形態計測装置共同利用ネットワーク創設に向けて"（京都）、2008

II-9 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　日本植物学会第 72 回学術講演会　認定 NPO 法人綜合画像研究支援ワークショップ"ライフサイエンス領域における微細形態計測装置共同利用ネットワーク創設に向けて"（高知）、2008

IV-1 早見実人・山内大輔・唐原一郎（富山大）・早川基実・竹内美由紀・佐藤繭子（理研・植物）・豊岡公徳（理研・植物）・上杉健太郎（高輝度科学研究センター）・篭島靖・峰雪芳宣：X 線 CT による乾燥種子内部の観察　日本植物学会第 72 回大会（高知）、2008

IV-2 山内大輔・早見実人・唐原一郎（富山大）・早川基実・竹内美由紀・佐藤繭子（理研・植物）・豊岡公徳（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内部構造の観察日本植物生理学会年会（名古屋）、2009

V-1 山内大輔："種子の生理概論"種子生理生化学研究会編　種子の科学とバイオテクノロジー、23-24 (2009)

V-2 山内大輔："種子タンパク質の分解"種子生理生化学研究会編　種子の科学とバイオテクノロジー、70-73 (2009)

V-3 山内大輔・峰雪芳宣・赤松哲弥（赤松工業）・小林督典（兵庫工業会）：除草剤を用いない抑草技術開発への検討　兵庫県立大学シンポジウム—産学共生への挑戦—はりま産学交流会産学パートナーズシップ（姫路）、2008

V-4 J. -W. Kim(Microplant Co., Ltd.)・J. -K. Kim(Microplant Co., Ltd.)・山内大輔：バイオリアクターによるジャガイモ種芋の大量生産及び畑での栽培　第 26 回日本植物細胞分子生物学会大会（大阪）、2008

VII-1 中井朋則・竹内美由紀・榊原斉（情報通研・神戸）・大岩和弘（情報通研・神戸）・梶村直子（大阪大）・峰雪芳宣：セルラーゼ遺伝子破壊酢酸菌の合成するセルロース様リボンの形態解析　日本植物学会第

72 回大会（高知）、2008

VII-2　T.Nakai, M. Takeuchi, H.Sakakibara (情報通研・神戸), K.Oiwa (情報通研・神戸),N.Kajimura (大阪大), Y. Mineyuki: Bacterial cellulase in the cellulose synthesizing nanomachine and twisting of cellulose fibrils. 2nd International Symposium on Bio-nanosystems (Tokyo), 2008

VII-3　中井朋則 : 酢酸菌のセルロース生合成におけるセルラーゼの関与. 第 6 回さざなみコンファレンス（姫路）、2008

大学院生命理学研究科

博士前期課程

早見実人 : インゲンマメにおけるジベレリン応答抑制因子の合成・分解と細胞内局在の解析
藪内隆俊 : 分裂準備帯の細胞分裂面挿入位置記憶に関する研究
早川基実 : 高等植物の微小管ダイナミクスの研究
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
宮本裕子 : 陸上植物におけるγ-チューブリン機能の進化

科学研究費補助金等

1　文部科学省科学研究費補助金（平成 17〜20 年度）　基盤研究(A)（一般）
研究課題　微小管端のダイナミクスとナノレベルの構造からみた陸上植物の微小管形成機構の進化
研究代表者　峰雪芳宣
研究分担者　中井朋則

2　日本学術振興会科学研究費補助金（平成 20〜21 年度）　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

3　科学技術振興機構　先端計測分析技術・機器開発事業（平成 20〜22 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

4　兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成 20 年度）特別研究
研究課題　ジベレリン応答性遺伝子発現に関わる転写因子複合体の解析
研究代表者　山内大輔