

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

唐原一郎¹, 峰雪芳宣²

¹ 富山大学大学院理工学研究部 (理学) 〒 930-8555, 富山市五福 3190

² 兵庫県立大学大学院生命理学研究科 〒 671-2280 兵庫県姫路市書写 2167

要旨: 分裂準備帯(プレプロフェーズバンド, PPB)は, 植物細胞の細胞表層における将来の細胞分裂面の位置を決定する構造である. 細胞表層に存在するPPB微小管は前中期には消失するが, その消失後も何らかの位置情報がPPBの位置に残ると考えられている. 最近の研究から, PPBが完成すると, 特定の細胞骨格関連タンパク質がPPBの位置から排除され, その位置のネガティブ・メモリーとして残ることが報告されている. しかしこれらの細胞骨格タンパク質の排除域が形成されるしくみはまだわかっていない. 私達は最近の論文において, 加圧凍結法と二軸電子線トモグラフィー法を組み合わせ, タマネギ子葉表皮細胞のPPBの形成時における, クラスリンで被覆されたピットおよび小胞の分布を定量的に解析した. その結果, PPB領域においてクラスリンの関わるエンドサイトーシスの頻度が高まっていることが示された. この事実に基づき, エンドサイトーシスによって何らかの膜タンパク質が除去されることによりPPBのネガティブ・メモリーが形成される, という仮説を提唱した.

Clathrin-mediated endocytosis in preprophase bands of higher plants

Ichirou Karahara¹, Yoshinobu Mineyuki²

¹ Department of Biology, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, 3190 Gofuku, Toyama 930-8555, Japan

² Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 2167 Shosha, Himeji, Hyogo 671-2280 Japan

Author for correspondence: Ichirou Karahara (karahara@sci.u-toyama.ac.jp)

Summary: The preprophase band (PPB) of microtubules marks the site of the future division plane on the plant cell cortex where the cell plate will fuse during the final stage of cytokinesis. Although the PPB microtubules on the cell cortex disappear during prometaphase, some unknown positional information is considered to remain in the PPB site after the disappearance of the PPB microtubules. Recent studies have shown that cytoskeletal proteins are known to be excluded from the PPB site. These depleted zones of cytoskeletal proteins are potential candidates for a “negative memory” system formed in the PPB site. However, the processes that produce these depleted zones of the cytoskeletal proteins are still unknown. In our recent paper, we have quantified the distribution of clathrin-coated pits and vesicles as well as of secretory structures during PPB formation of epidermal cells of onion cotyledons using a combination of high-pressure freezing and dual-axis electron-tomography techniques. Our results demonstrated that the rate of clathrin-mediated endocytosis is higher in PPB regions. We postulate that the removal of some membrane proteins by endocytosis plays a role in the creation of PPB “negative memory” structures.

Key words: preprophase band of microtubules, endocytosis, electron tomography, clathrin coated pits and vesicles, cytokinesis

はじめに

高等植物の形態形成において, 細胞分裂方向の制御は非常に重要である(Sinnott and Bloch 1941). 分裂準備帯(プレプロフェーズバンド, PPB)は母細胞の細胞膜上で将来細胞板が合着する位置を予告し, 細胞分裂の位置決定に関わると考えられている(Pickett-Heaps and Northcote 1966a, 1966b, Gunning and Wick 1985, Mineyuki 1999, Dixit and Cyr 2002). PPBは細胞周期におけるG2期の間細胞膜の直下において幅の広い

帯状の微小管として出現し(Mineyuki et al. 1988), 幅が徐々に狭くなり前期の後半には幅が最も狭くコンパクトな状態となり形成が完了する. 前中期になるとPPBは消失し, チューブリンは紡錘体微小管へとリサイクルされる(Wick et al. 1981). 有糸分裂の終期に形成される細胞板は, この幅の狭いPPBが存在した位置で合着することから, PPBがこの位置の細胞膜に何らかの情報もしくは記憶(メモリー)を残すと考えられている(Mineyuki and Gunning 1990, Mineyuki 1999). またPPBの幅が

狭くなる過程は、それ自体も重要な機能をもつ(Mineyuki and Palevitz 1990).

最近, *tangled (tan)* 遺伝子の産物やRanGAP1がPPBに蓄積し, PPB微小管が消失した後もそこに留まることが報告されている(Walker et al. 2007, Xu et al. 2008). また, MineyukiとGunning (1990)は, PPBによって印づけられる細胞表層領域が細胞板を真直ぐにする因子を含んでいることを示したが, その候補として, 細胞板が外側に成長し細胞表層に接着する時に, 微小管関連タンパク質であるAIR9 (Buschmann et al. 2006)や, 小胞の被覆タンパク質のドメインに似た領域を持つTPLATE (Van Damme et al. 2006)などが見つかった.

他方, PPBのメモリーに関しては, これらのポジティブなメモリーに加えて, ネガティブなメモリー(PPB以外の領域に残されるメモリー)も残すと考えられている. PPBの幅が狭くなった後, 細胞表層全体にまんべんなく分布している表層アクチンが, PPBの領域から消失する(Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992). キネシン様分子KCA1もこの領域から消失する(Vanstraelen et al. 2006). しかし, どのようにしてこのようなネガティブ・メモリーが形成され, 将来細胞板が細胞膜と合着する位置を規定するのかについてはまだわかっていない.

化学固定した試料を用いた初期の電子顕微鏡観察によって, 細胞のPPB直下の細胞質における電子密度の高い小胞の存在が報告されていた(Burgess and Northcote 1968, Packard and Stack 1976, Gunning et al. 1978). PPB近傍で観察される小胞内部の電子密度が隣接する細胞壁のそれと似ていること(Packard and Stack 1976), 多糖染色により染色されること(Galatis 1982), またあるマメ科の植物ではPPBに隣接する部分の細胞壁が肥厚していること(Galatis et al. 1982)などの事実から, メモリーを形成する分子は分泌輸送で細胞外に蓄積されるという仮説が長い間提唱されてきた. しかし, 非PPB領域の直下の細胞質においても同様の小胞が観察されていることから, PPB形成における分泌輸送の関与については疑問視されてきたのも事実である(Galatis and Mitrakos 1979, Galatis et al. 1982). またタバコBY-2細胞においてbrefeldin Aを用いた実験により, ゴルジ体からの分泌輸送はPPBにおけるメモリー形成に必要なことも示されている(Dixit and Cyr 2002).

植物のエンドサイトーシスにおけるクラスリンの直接

的な役割は, まだ実験的には証明されてはいないものの, 動物や菌類においてはクラスリン被覆小胞が膜タンパク質を選択的に除去することに機能することが示されている(Kirchhausen 2000, Bonifacino and Traub 2003). またエンドサイトーシスにより特定の分子が取り込まれていることは植物でも示されている(Shah et al. 2002, Russinova et al. 2004, Gifford et al. 2005, Kim et al. 2006). PPB近傍の細胞質において小胞が観察されることを報告した電子顕微鏡観察のうち, 被覆小胞が観察されたのはマメ科の孔辺母細胞においてのみである(Galatis and Mitrakos 1979, Galatis et al. 1982).

電子線トモグラフィー法は, 試料を電子顕微鏡レベルで三次元的に定量できる新しい方法である. 私達は, 加圧凍結した試料を用いて電子線トモグラフィー法で観察することで, クラスリン被覆をもつピットや小胞, および分泌構造などの分布を定量的に解析することを可能にした. そこでPPB領域においてエンドサイトーシスの頻度が増加しているのか否かを検証するために, これらの方法を組み合わせてタマネギ分裂組織の子葉表皮細胞におけるクラスリン被覆をもつピットや小胞, および分泌構造の分布を定量的に調べた.

結果

加圧凍結・凍結置換法により調製された細胞におけるクラスリン被覆ピットの観察

PPBの発達の観察にこれまでもよく用いられてきたタマネギ実生の, 3日齢における子葉表皮細胞を観察した. 子葉基部では表皮細胞の約3%が分裂期の細胞である. これらの細胞の分裂のほとんどは垂層分裂の等分裂であり, 任意の方向からPPBの切片を切って観察することができる. また, 幅が狭くなったPPBを持つ前期後半の細胞はクロマチンの濃縮具合により判断した(図1a, b).

加圧凍結・凍結置換法により調製した試料(試料作製方法の詳細は(峰雪芳宣 et al. 2001)参照)から切り出した, 表皮細胞の表層の接線方向の超薄切片においては, クラスリン被覆ピットと微小管の構造が非常によく保存されていた. このことは, クラスリン被覆の示す五角形・六角形の格子構造が観察されたことから判断された(Karahara et al. 2009). 幅が狭くなったPPBを同定するために, 細胞の中央部を通る縦断切片を切って核のクロマチンの様子とPPBの横断面を観察した後

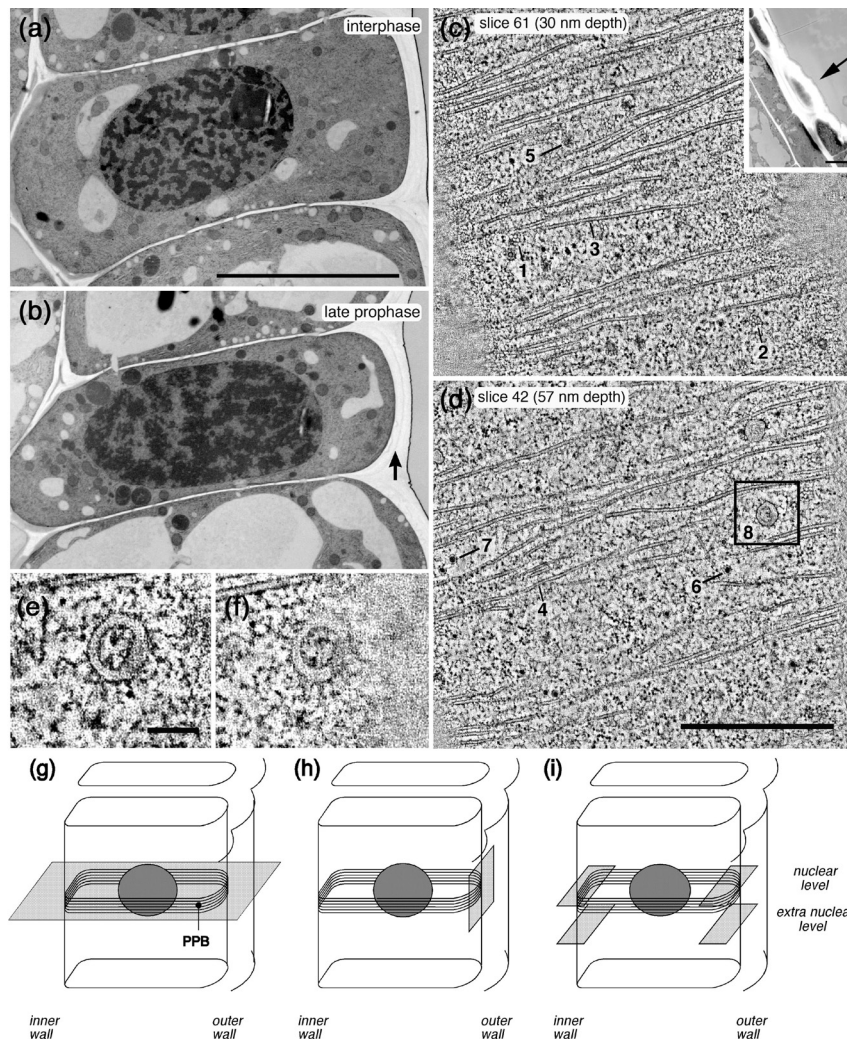


図1 加圧凍結されたタバコ葉表皮細胞の電子顕微鏡像。(a, b) 核の位置で切った横断切片の電子顕微鏡像。(c, d, e, f) 前期後半の細胞における核の位置の外側壁側(b, 矢印)において接線方向に切ったトモグラフィックスライス。トモグラムは全部で110枚のスライスを含む。スライスの番号が高いほど細胞膜に近い。構造1および2: 成熟し小胞の形に近くなったクラスリン被覆ピット。構造3および4: 2つの微小管。構造5: 膜から離れたクラスリン被覆小胞。構造6: クラスリン被覆ピットにおける浅いクラスリンの格子。構造7: 被覆を持たない小胞。構造8: 馬蹄形の細胞膜の折れ込み。

(a) 間期細胞。(b) クロマチンの濃縮具合で判断された前期後半の細胞。矢印: 外側細胞壁。Bar = 10 μm 。

(c, d) 二つの1.42 nmの厚さのトモグラフィックスライス。Inset: トモグラム作製に用いた250 nmの厚さの切片の全体像。Barは1 μm もしくは10 μm (Inset)。

(e, f) (d)の黒い囲いに示す馬蹄形の細胞膜の折れ込みの、高倍のトモグラフィックスライス像。(e) (slice 54)および(f) (slice 60)は(d)に示す同じ馬蹄形構造の異なる位置での切片。Bar = 0.1 μm 。

(g, h, i) 表皮細胞における観察する切片の位置を示した模式図。

(g) 核の位置における横断切片。前期後半の細胞の場合はPPBを含む。

(h) 核の位置における外側壁側の接線切片。前期後半の細胞の場合はPPBを含む。

(i) 核の位置における横断切片の内側壁側と外側壁側の表層(前期後半の細胞の場合はPPBを含む)、および核外における横断切片の内側壁側と外側壁側の表層。

Karahara et al. (2009)を改変。

に接線切片を作成し、電子線トモグラフィーを行った(電子線トモグラフィーの詳細は(峰雪芳宣 et al. 2004)参照)。これにより通常の超薄切片よりも高い解像度での、被覆されたピットや小胞、および微小管のマッピングやモデリングが可能となり(図1c, d および図2), クラスリン

被覆をもつピットおよび小胞の分布を定量的に解析することができた。前期後半および間期の細胞における核に最も近い位置の細胞表層において、クラスリン被覆ピットの分布密度を比較するといずれの場合でも約4個 μm^{-2} であり、ほとんど変わらなかった。それに対し、

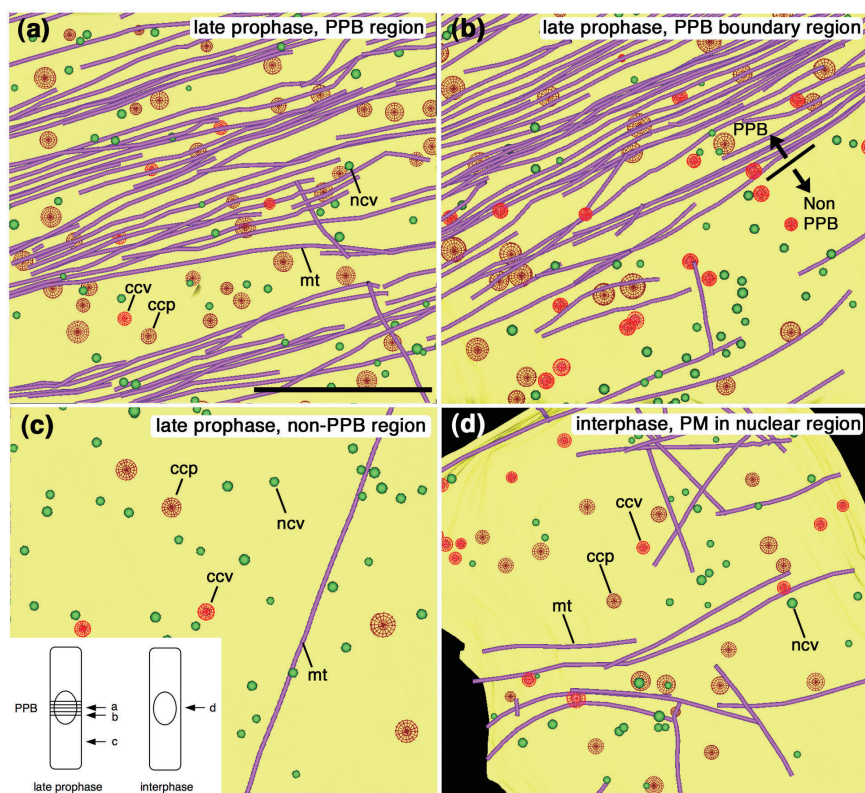


図2 前期後半の細胞における核の位置(a)(つまりPPB領域)、PPBと非PPBの間の境界領域(b)、核外の位置(c)、および間期細胞の核の位置(d)におけるそれぞれ表層領域のトモグラフィーに基づく再構成。(c)のinsetは、それぞれのモデルの細胞の中における位置を示す模式図。ccv, クラスリン被覆小胞(明るい赤); ccp, クラスリン被覆ピット(濃い赤); ncv, 被覆を持たない小胞(緑); mt, 微小管(紫); pm, 細胞膜(黄)。Bar = 1 μ m. Karahara et al. (2009)を改変。

前期後半の細胞内における核の位置(すなわちPPB領域)と核から離れた位置(PPBの外側の領域)で比較した場合、PPBの外側の領域においてはクラスリン被覆ピットの分布密度が有意に低下していた(表1)。

表1 前期後半および間期の細胞における核の位置(PPB領域)と核外の位置(非PPB領域)におけるクラスリン被覆をもつピットおよび小胞、被覆を持たない小胞の分布頻度

	interphase		late prophase	
	nuclear (non-PPB)	nuclear (PPB region)	nuclear (PPB region)	extra nuclear (non-PPB)
clathrin-coated pits ^A	4.0 \pm 0.6	4.1 \pm 0.5 ^a	4.1 \pm 0.5 ^a	1.6 \pm 0.4 [*]
clathrin-coated vesicles ^B	13.4 \pm 1.7 [*]	26.6 \pm 9.9 ^a	26.6 \pm 9.9 ^a	7.2 \pm 0.1 ^{**}
non-coated vesicles ^A	25.1 \pm 4.1 [*]	87.8 \pm 16.5 ^a	87.8 \pm 16.5 ^a	84.6 \pm 15.4

これらの結果はトモグラフィーのデータセットに基づく。分布頻度の単位は、クラスリン被覆ピットの場合は個数/ μ m²であり、小胞の場合は個数/ μ m³である(mean \pm SEM, n=4-6)。それぞれの列の中でPPB(すなわち前期後半の細胞の核の位置)とそれ以外で多重比較を行った(**, P < 0.01; *, P < 0.05)。

^A Dunnett's parametric multiple comparison test.

^B Steel's nonparametric multiple comparisons test.

Karahara et al. (2009)を改変。

PPBの外側の領域におけるクラスリン被覆小胞の分布頻度の、PPB形成に伴う低下

クラスリン被覆をもつピットや小胞の内容物は高いコントラストで染色された。クラスリン被覆ピットの内容物が高い電子頻度で染色され、クラスリン被覆小胞や、被覆をもたない小胞も同様の高い電子密度で染色されていた。これらのことから、被覆を持たないが濃く染まるコアをもつ小胞が、クラスリン被覆小胞に由来するものであることが示唆された。

クラスリン被覆小胞および、被覆を持たないが濃く染まるコアをもつ小胞の分布頻度を調べたところ(表1)、前期後半の細胞内で見えた場合、クラスリン被覆小胞の分布頻度はPPBの外側の領域においてはPPB領域と比べて非常に低くなっていた。前期後半の細胞内での核の位置(PPB領域)におけるクラスリン被覆小胞の分布頻度は、間期における核の位置のそれと比べて2倍の高さであった。さらに前期後半の細胞内での核の位置(PPB領域)における、被覆を持たないが濃く染まるコアをもつ小胞の分布頻度は、間期における核の位置

と比べて3倍の高さであった。

蛍光抗体法による細胞質中のクラスリンを含む構造の観察

PPB領域にクラスリン分子が存在することを確認するために、タマネギ表皮の間期と前期の細胞において、クラスリン重鎖に対する抗体を用いた蛍光抗体法によるコンフォーカル観察を行った。その結果、これらの細胞においては蛍光強度の高い(明るい)大きな構造と、蛍光強度の低い(暗い)小さな点状構造の2種類が検出された。この明るい大きな構造の方は細胞質全体に分布していたのに対し、暗い小さな構造の方は、いずれの細胞においても主に細胞表層に見られた(図3)。このことから、暗い小さな点状構造は超薄切片におけるクラスリン被覆をもつピットおよび小胞(図1, 2)に対応すると考えられた。

コンフォーカル観察の場合、クラスリン被覆をもつピットおよび小胞は、間期細胞においては細胞表層全体に均一に広がっていたのに対し、前期後半の細胞においてはPPBに多く分布していた(図3)。これらの構造の分布頻度をPPB領域(前期後半の細胞における核の

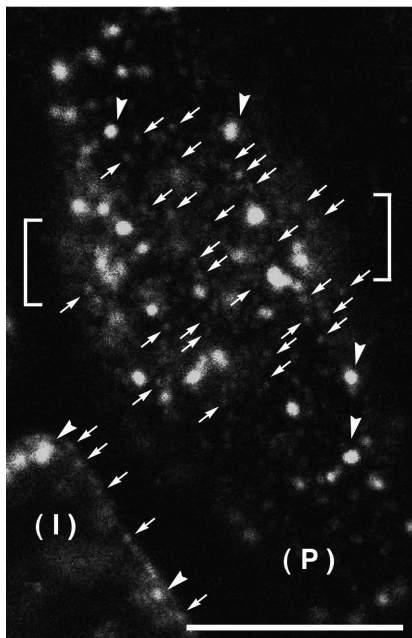


図3 加圧凍結されたタマネギ子葉表皮細胞における、免疫蛍光抗体法により検出されたクラスリン分子の局在。前期後半の細胞の表層(P)および間期細胞の中央部の縦断切片(I)。矢尻は蛍光強度の高い大きな構造を、矢印は蛍光強度の低い小さな点状構造を示す。枠はPPBの位置。Bar = 10 μm 。Karahara et al. (2009)を改変。

位置)と非PPB領域(前期後半の細胞における核の外側の位置, および間期細胞における核の位置)で比較したところ、クラスリンを含む暗く小さい構造はPPBにおいて多く分布していた。クラスリンを含む暗く小さい構造の単位面積あたりの数は電子線トモグラフィーで調べられた、クラスリン被覆をもつピットおよび小胞の単位面積あたりの数と比べても低いことから、おそらく一つの蛍光の点はクラスリン被覆を持つピットおよび小胞がいくつか集合したものに对应していると考えられる。また注意深く観察すると、前期細胞においてクラスリン被覆をもつピットおよび小胞の分布の高い領域はPPBの微小管帯の端の外側まで広がっていた(図3)。このことは電子線トモグラフィーで得られた結果(図2b)と一致している。

表皮細胞の接線方向の内壁と接線方向の外壁におけるエンドサイトーシス構造の分布頻度の比較

図1aにも示されているように、表皮細胞の外側接線壁(外側壁)は内側接線壁(内側壁)と比べて厚くなり、さらにクチクラでカバーされている。PPBを含みPPBの面に沿った切片を作製し、小胞が細胞膜からどの程度の距離まで分布しているのかということ、および小胞の分布が外側壁側と内側壁側で異なっているか否かを調べた(表2)。小胞の多くは細胞膜から400 nmの深さま

表2 連続超薄切片において調べた、PPB領域(前期後半の細胞の核の位置における内側壁側と外側壁の表層)と非PPB領域(前期後半の細胞の核の外側の位置, および間期細胞の核の位置と核外の位置における、内側壁側と外側壁側の表層)における、濃く染まるコアをもつ表層小胞の分布頻度

cell stage	interphase		late prophase	
	nuclear (non-PPB)	extra nuclear (non-PPB)	nuclear (PPB region)	extra nuclear (non-PPB)
outer	14.5 \pm 3.1 *	10.9 \pm 2.8 *	36.5 \pm 2.4 ^a	18.2 \pm 3.1 *
inner	10.6 \pm 2.2 *	17.2 \pm 4.4 *	36.7 \pm 8.4 ^b	13.8 \pm 2.6 *

濃く染まるコアを持つ表層小胞の分布頻度を表皮細胞の外側と内側の表層で比較した。分布頻度の単位は個数/ μm^3 (mean \pm SEM, n=5)。各切片の厚さは70-90 nm。細胞膜からの深さは400 nm。切片の向きは図1iに表した。それぞれの列においてSteel's nonparametric multiple comparisons testを行った。前期後半の細胞の核の位置における外側もしくは内側と、同じ列のそれ以外との間で比較した(*, $P < 0.05$)。さらに、それぞれの位置における内側壁側と外側壁側の間で、Mann-Whitney U-test (two-tailed)を行ったがいずれの場所においても有意差は見られなかった。Karahara et al. (2009)を改変。

での細胞質に分布していた(図4)。しかしこれらの観察のためには細胞の全領域を調べる必要があり、かかる目的のための電子顕微鏡写真の解像度ではクラスリン被覆を漏らさず識別することはできなかった。このため表2では、濃く染まるコアをもつクラスリン被覆小胞および被覆を持たないが染まるコアをもつ小胞をあわせた、濃く染まるコアをもつ表層小胞全体の分布頻度として示した。この表層小胞の分布頻度を、前期後半の細胞と間期細胞の、核の位置と核の外側の位置において比較したところ、PPBを持つ前期後半の細胞の核の位置においては間期細胞のそれよりも高くなっていたが、核の外側の位置においては差は見られなかった。またいずれの位置においても外側壁側と内側壁側の間に分布頻度の差はみられなかった。

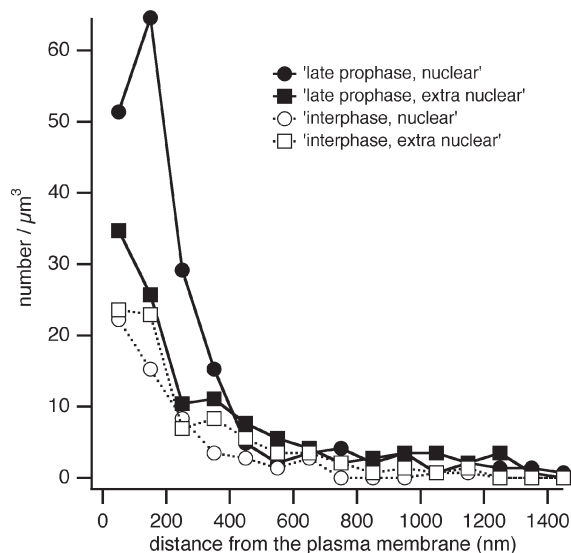


図4 超薄横断切片における、PPB領域(前期後半の細胞の核の位置における内側と外側接線壁周辺の表層)と非PPB領域(前期後半の細胞の核の外側の位置、および間期細胞の核の位置と核外の位置における内側壁側と外側接線壁側の表層)における、濃く染まるコアをもつ表層小胞の細胞膜からの距離に伴う分布。それぞれのデータ点は3つの細胞の平均値。Karahara et al. (2009)を改変。

エキソサイトーシスに関わる馬蹄形構造のPPB近傍における分布

エキソサイトーシスにはゴルジ体が重要なはたらきをしていると考えられている。植物細胞には膨圧があり、細胞膜が細胞壁に押しつけられているため、分泌小胞が細胞膜に融合する際には、内側に折れ曲がった構造になると考えられる。実際、エキソサイトーシスによ

り球状の小胞が細胞膜と融合する際には円盤状になったのち、内側に細胞膜が折れ込んだ馬蹄形の構造に変化することが観察されている(Stachelin and Chapman 1987)。特徴的なこの馬蹄形構造は、急速凍結した細胞では明瞭に観察することができるため(図1e, f)、これを指標としてエキソサイトーシス活性を定量的に評価することができる。そこで、この馬蹄形構造の分布頻度を連続超薄切片において定量的に調べたところ、核の位置、核の外側の位置のいずれにおいても前期後半の細胞と間期細胞の間に有意な差は見られなかった。このことから、PPBにおいて特にエキソサイトーシスが活発になっているわけではないことが示唆された。

連続超薄切片におけるゴルジ体の分布の観察

エキソサイトーシスにはゴルジ体が重要な働きをしていると考えられている。タバコ培養細胞のPPBにおいてはゴルジ体の分布頻度が10%高まることが報告されている(Dixit and Cyr 2002)。タマネギ表皮細胞においてそのことを確かめるため、連続超薄切片を用いて、細胞膜から400 nmの深さまでの細胞質においてゴルジ体の分布頻度を定量的に調べた。その結果、核の位置、核の外側の位置のいずれにおいても前期後半の細胞と間期細胞の間に有意な差は見られなかった。このことから、タマネギ表皮細胞のPPBにおいては特にゴルジ体の分布頻度が高まっているわけではないことが示唆された。

考察

PPBが将来の分裂面挿入位置をどのようにマークするのかについては、1966年にPPBが発見されて以来の重要な課題である(Pickett-Heaps and Northcote 1966a, 1966b, Gunning and Wick 1985, Mineyuki 1999, Dixit and Cyr 2002)。今回のPPBにおけるクラスリン被覆をもつピットおよび小胞、およびエキソサイトーシス小胞の分布解析により、PPBにおいてはクラスリン被覆に媒介されるエンドサイトーシスにより何らかの特定の細胞膜分子が除去され、それにより細胞膜の構成が変化しているという可能性が示唆された。

クラスリン被覆小胞によるエンドサイトーシスはPPBの中央ほど高まる

クラスリン被覆小胞に媒介されるエンドサイトーシス

においては小胞が出芽する前には特定の細胞膜分子が濃縮されることが知られており(Kirchhausen 2000, Bonifacino and Traub 2003), かかるエンドサイトーシスはPPBにおいて細胞膜の組成を変えるしくみとなる可能性がある。エンドサイトーシスの蛍光マーカーであるFM4-64を用いた研究により, PPBにおいてエンドサイトーシスが起きているという報告はあるが(Dhonukshe et al. 2005), FM4-64はエンドサイトーシス以外のしくみによっても細胞内に入りうることから(Bolte et al. 2004), その報告の妥当性には疑問が残される。本研究では, クラスリン被覆小胞の分布頻度は非PPB領域と比べてPPBにおいては3.7倍に増加しており(表1), また表層小胞の分布頻度はPPBにおいては外側壁側および内側壁側のいずれにおいても増加していた(表2)。

電子線トモグラフィ(図2b)および免疫染色(図3)の両方の結果から, クラスリン被覆をもつピットおよび小胞はPPB微小管が存在する領域の端を越えて分布していることがわかった。従ってPPB微小管と, クラスリン被覆をもつピットおよび小胞の間には直接的な関係はなさそうである。PPBの位置に“集合中心”のようなものがあり, 微小管やクラスリン被覆をもつピットおよび小胞等PPBに局在するといわれている分子や構造はその“集合中心”に向かって集まってきていると考えられる。幅が狭くなったPPBの微小管は最終的な分裂位置の決定に関わると考えられているが(Mineyuki et al. 1989, Mineyuki 1999), Marcusら(2005)が指摘しているように, PPB初期の研究で提案された「PPBの微小管はその後そこで起こることに直接的に関わらずにそのことを予言する天気予報のようなものである」(Pickett-Heaps 1974)という考えが正しいのかもしれない。PPBに局在するp34^{cdc2}キナーゼホモログの分布がPPBの幅よりも狭いという事実(Mineyuki et al. 1991, Mineyuki 1999)もこのアイデアに矛盾しない。PPBはクラスリンの関わるエンドサイトーシスが活発化するための環境を用意し, 将来の分裂位置における膜組成の変化に結びつける役割を果たしているのであろう。

植物においては, エンドサイトーシスされた小胞はMultivesicularタイプのエンドソーム区画に輸送され, そこで分子がリサイクルもしくは分解されることが示されている(Low and Chandra 1994, Jurgens 2004, Tse et al. 2004)。最近のシロイヌナズナの頂端分裂組織における研究により, クラスリン被覆小胞による細胞板からの

エンドサイトーシスによってMultivesicular Bodyの増加が引き起こされることが示されている(Segui-Simarro and Stachelin 2006)。しかし今回の研究において, 観察したタマネギ表皮細胞においてはMultivesicular Bodyの数は非常に少なく, またその有意な増加も認められなかったことから, エンドサイトーシスされた小胞の行方に関する情報は得られなかった。

PPB領域の内外における分泌輸送の活性に有意な違いはない

急速凍結・凍結置換により調製した試料を用いて電子線トモグラフィを行った本研究においては, これまでの化学固定により行われていた以前の研究と比べて, PPBで起こる膜系の変化について, はるかに信頼性が高い定量的な結果が得られた。馬蹄形のエキソサイトーシス構造の分布頻度はPPBの内外で特に有意差がなかったことから, 今回細胞表層で観察された小胞はエキソサイトーシスではなくエンドサイトーシスに関わるものであることが強く示唆された。PPBにおいて特にエキソサイトーシス構造が増加していないという今回の結果は, PPBにおけるマーキングにゴルジからの分泌減少は必要としなかったという先行研究の結果(Dixit and Cyr 2002)と矛盾しない。

エンドサイトーシスがPPBにおけるメモリー構造の形成を助ける可能性

PPBにおいては膜結合のアクチン繊維(Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992,)やキネシン様タンパク質KCA1が消失すること(Vanstraelen et al. 2006)から, PPBにおいては細胞膜組成に局所的な変化がおこることが示唆される。今回, PPB形成時にエンドサイトーシス頻度が高まることが示唆されたが, ではどのようなタイプの細胞膜分子がクラスリン被覆小胞により選択的に除去されるのであろうか。例えば, アクチン繊維消失の場合に考えられる一つの候補タンパク質は, アクチン繊維形成の核となるformin homology (FH) タンパク質であろう(Banno and Chua 2000, Favery et al. 2004)。シロイヌナズナのゲノムには21のFH遺伝子が同定されており, またいくつかの植物forminもアクチン繊維形成の核となる能力をもつ。グループ1のforminであるAtFH1の過剰発現により非常にたくさんのアクチンケーブルが細胞膜から生じることが知られている(Cheung and Wu

2004). また線虫の寄生により誘導された巨細胞において, AtFH6タンパク質は細胞膜にアクチン繊維をアンカーすることが示されている(Favery et al. 2004). これらのことから, PPBにおいて活発になるエンドサイトーシスののはたらきは, PPBのドメインからアクチン形成・結合タンパク質の除去してアクチン排除域を作り出し, 拡大する細胞板の融合に備えるという可能性がある(図5)(Karahara et al. 2010). またこれに似たようなしくみは, KCA1の排除についても想定される. 本研究の成果により, PPBにおけるネガティブ・メモリー形成の仕組みを説明することは可能である.

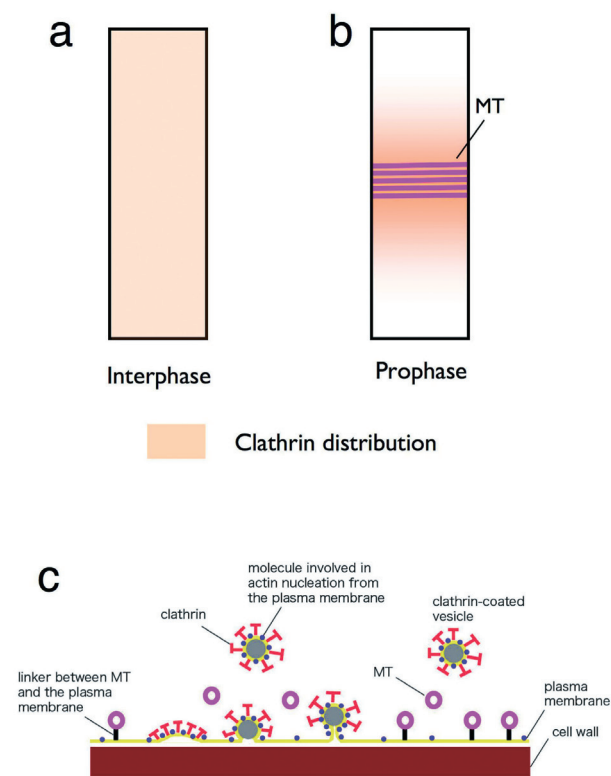


図5 クラスリン被覆をもつピットおよび小胞がPPBにおいて形成される様子を示す模式図. (a, b)間期と前期の表皮細胞におけるクラスリン分子の分布を長軸に沿って表した図. 間期においてはクラスリン分子は細胞表層全体に均一に分布しているが, 前期においてはPPBを中心に集まってくる. (c)PPBの部分の横断面を拡大して示した図. このモデルでは, PPBにおけるエンドサイトーシス活性は, アクチン繊維形成の核となるもしくはアクチンに結合するタンパク質を除去することで, アクチン排除域を形成することにはたらくとしている. Karahara et al. (2010)を改変.

謝辞

本総説の内容は平瀬賞の対象になった論文である(Karahara et al. 2009)の内容を中心に扱った. 共同研

究者および研究遂行にあたりお世話になった方々に深く感謝申し上げます.

引用文献

- Banno H, Chua NH (2000) Characterization of the Arabidopsis formin-like protein AFH1 and its interacting protein. *Plant Cell Physiol* 41: 617-626
- Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microscopy* 214: 159-173
- Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72: 395-447
- Burgess J, Northcote DH (1968) The relationship between the endoplasmic reticulum and microtubular aggregation and disaggregation. *Planta* 80: 1-14
- Buschmann H, Chan J, Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA, Doonan JH, Lloyd CW (2006) Microtubule-associated AIR9 recognizes the cortical division site at preprophase and cell-plate insertion. *Curr Biol* 16: 1938-1943
- Cheung AY, Wu H (2004) Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell* 16: 257-269
- Cleary AL, Gunning BES, Wasteneys GO, Hepler PK (1992) Microtubule and F-actin dynamics at the division site in living *Tradescantia* stamen hair cells. *J Cell Sci* 103: 977-988
- Dhonukshe P, Mathur J, H Iskamp M, Gadella TWJ (2005) Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biology* 3: 11
- Dixit R, Cyr R (2002) Golgi secretion is not required for marking the preprophase band site in cultured tobacco cells. *Plant J* 29: 99-108
- Favery B, Chelysheva LA, Lebris M, Jammes F, Marmagne A, de Almeida-Engler J, Lecomte P, Vaury C, Arkowitz RA, Abad P (2004) Arabidopsis formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *Plant Cell* 16: 2529-2540
- Galatis B (1982) The organization of microtubules in guard cell mother cells of *Zea mays*. *Can J Bot* 60: 1148-1166
- Galatis B, Apostolakis P, Katsaros C, Loukari H (1982) Preprophase microtubule band and local wall thickening in guard cell mother cells of some Leguminosae. *Ann Bot* 50: 779-791
- Galatis B, Mitrakos K (1979) On the differential divisions and preprophase microtubule bands involved in the development of stomata of *Vigna sinensis* L. *J Cell Sci* 37: 11-37
- Gifford ML, Robertson FC, Soares DC, Ingram GC (2005) ARABIDOPSIS CRINKLY4 function, internalization, and turnover are dependent on the extracellular crinkly repeat domain. *Plant Cell* 17: 1154-1166

- Gunning BE, Wick SM (1985) Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis. *J Cell Sci* (Suppl 2) 2: 157
- Gunning BES, Hughes JE, Hardham AR (1978) Formative and proliferative cell divisions, cell differentiation, and developmental changes in the meristem of *Azolla* roots. *Planta* 143: 121–144
- Jurgens G (2004) Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Develop Biol* 20: 481–504
- Karahara I, Staehelin A, Mineyuki Y (2010) A role of endocytosis in plant cytokinesis. *Comm Int Biol* 3: 1–3
- Karahara I, Suda J, Tahara H, Yokota E, Shimmen T, Misaki K, Yonemura S, Staehelin LA, Mineyuki Y (2009) 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
- Kim ST, Zhang K, Dong J, Lord EM (2006) Exogenous free ubiquitin enhances lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix and may facilitate endocytosis of SCA. *Plant Physiol* 142: 1397–1411
- Kirchhausen T (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69: 699–727
- Liu B, Palevitz BA (1992) Organization of cortical microfilaments in dividing root cells. *Cell Motil Cytoskel* 23: 252–264
- Low PS, Chandra S (1994) Endocytosis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 45: 609–631
- Mineyuki Y (1999) The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int Rev Cytol* 187: 1–49
- Mineyuki Y, Gunning BES (1990) A role for preprophase bands of microtubules in maturation of new cell walls, and a general proposal on the function of preprophase band sites in cell division in higher plants. *J Cell Sci* 97: 527–537
- Mineyuki Y, Marc J, Palevitz BA (1989) Development of the preprophase band from random cytoplasmic microtubules in guard mother cells of *Allium cepa* L. *Planta* 178: 291–296
- Mineyuki Y, Palevitz BA (1990) Relationship between preprophase band organization, F-actin and the division site in *Allium* Fluorescence and morphometric studies on cytochalasin-treated cells. *J Cell Sci* 97: 283–295
- Mineyuki Y, Wick SM, Gunning BES (1988) Preprophase bands of microtubules and the cell cycle: kinetics and experimental uncoupling of their formation from the nuclear cycle in onion root-tip cells. *Planta* 174: 518–526
- Mineyuki Y, Yamashita M, Nagahama Y (1991) p34 cdc2 kinase homologue in the preprophase band. *Protoplasma* 162: 182–186
- Packard MJ, Stack SM (1976) The preprophase band: possible involvement in the formation of the cell wall. *J Cell Sci* 22: 403–411
- Pickett-Heaps JD (1974) Plant microtubules. *Dynamic aspects of plant ultrastructure*: 219–251
- Pickett-Heaps JD, Northcote DH (1966a) Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. *J Cell Sci* 1: 109–120
- Pickett-Heaps JD, Northcote DH (1966b) Cell division in the formation of the stomatal complex of the young leaves of wheat. *J Cell Sci* 1: 121–128
- Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, Chory J, de Vries SC (2004) Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* 16: 3216–3229
- Seguí-Simarro JM, Staehelin LA (2006) Cell cycle-dependent changes in Golgi stacks, vacuoles, clathrin-coated vesicles and multivesicular bodies in meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*: a quantitative and spatial analysis. *Planta* 223: 223–236
- Shah K, Russinova E, Gadella TW, Jr., Willemse J, De Vries SC (2002) The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. *Genes Dev* 16: 1707–1720
- Sinnott EW, Bloch R (1941) The relative position of cell walls in developing plant tissues. *Am J Bot* 28: 607–617
- Staehelin LA, Chapman RL (1987) Secretion and membrane recycling in plant cells: novel intermediary structures visualized in ultrarapidly frozen sycamore and carrot suspension-culture cells. *Planta* 171: 43–57
- Tse YC, Mo B, Hillmer S, Zhao M, Lo SW, Robinson DG, Jiang L (2004) Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* 16: 672–693
- Van Damme D, Coutuer S, De Rycke R, Bouget FY, Inze D, Geelen D (2006) Somatic cytokinesis and pollen maturation in *Arabidopsis* depend on TPLATE, which has domains similar to coat proteins. *Plant Cell* 18: 3502–3518
- Vanstraelen M, Van Damme D, De Rycke R, Mylle E, Inz D, Geelen D (2006) Cell cycle-dependent targeting of a kinesin at the plasma membrane demarcates the division site in plant cells. *Curr Biol* 16: 308–314
- Walker KL, Muller S, Moss D, Ehrhardt DW, Smith LG (2007) *Arabidopsis* TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Curr Biol* 17: 1827–1836
- Wick SM, Seagull RW, Osborn M, Weber K, Gunning BE (1981) Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells. *J Cell Biol* 89: 685–690
- Xu XM, Zhao Q, Rodrigo-Peiris T, Brkljacic J, He CS, Muller S, Meier I (2008) RanGAP1 is a continuous marker of the *Arabidopsis* cell division plane. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18637–18642
- 峰雪芳宣, 須田甚将, 唐原一郎 (2004) 電子線トモグラフィ。 *Plant Morphology* 16: 21–30
- 峰雪芳宣, 唐原一郎, 村田隆, Otegui M, Giddings TH (2001) 植物組織の高圧(加圧)凍結。 *電子顕微鏡* 36: 105–107