

電子線トモグラフィー法を使った植物のアクチン-微小管相互作用の解析

Electron Tomography Analysis of Actin-Microtubule Interaction in Plants

竹内 美由紀^{a*}, 峰雪 芳宣^b

Miyuki Takeuchi and Yoshinobu Mineyuki

^a 東京大学大学院農学生命科学研究科^b 兵庫県立大学大学院生命理学研究科

要旨 電子線トモグラフィー法は、試料を連続的に傾斜させて透過形電子顕微鏡で撮影を行い、得られた二次元の傾斜画像シリーズから三次元像を再構築する方法である。細胞内微細構造の三次元観察や定量的解析に利用されており、本稿では、細い繊維状の構造物であるアクチン繊維と微小管の細胞内分布やその相互作用の解析に応用した例を紹介する。分裂準備帯は高等植物体細胞分裂のG2期から前期に細胞表層に観察される、微小管が帯状に並んだ構造である。この分裂準備帯の微小管の配向制御にはアクチンが関与していると考えられているが、その機構はわかっていない。アクチンと微小管の相互作用を明らかにする上では、その細胞内での微細構造や配置は重要な情報である。電子線トモグラフィー法を用いた解析により、分裂準備帯の微小管やマイクロフィラメント一本一本を可視化し、これらの位置関係を調べることができた。

キーワード：アクチン-微小管相互作用、電子線トモグラフィー法、マイクロフィラメント、微小管、分裂準備帯

1. はじめに

微小管やアクチンは真核生物に共通の主要な細胞骨格であり、細胞の成長や分裂、運動等の活動に不可欠である。またこれらが相互作用して生命活動に重要な役割を果たすと考えられている例も多いが^{1,2)}、その詳細はほとんどわかっていない。

細胞内における細胞骨格の観察には、光学顕微鏡と電子顕微鏡が使用されてきた。蛍光顕微鏡による観察では、GFPなどで蛍光標識した分子を用いたライブイメージングにより、細胞内の細胞骨格の動態をリアルタイムに観察することが可能であり、さらに近年は光学顕微鏡の分解能が大きく向上し、高分解能のイメージングが行われている。しかし、微小管とアクチンの相互作用を理解するためには、微小管やアクチン繊維の一本一本を観察できる電子顕微鏡レベルの観察も求められる。電子線トモグラフィー法は、細胞内部の微細構造を三次元観察し、定量的に解析するための方法として発展し、葉状仮足内のアクチン³⁾や菌糸の微小管⁴⁾など細胞骨格の研究にも利用されている。本稿では、我々が電子線トモグラフィー法により行った高等植物の分裂準備帯の解析について紹介する⁵⁾。

分裂準備帯は、高等植物の体細胞分裂前期細胞表層に並ん

だ微小管の帯として観察される、分裂面位置決定に関わる構造である。微小管はG2期に核を取り巻く幅の広い帯として細胞表層に平行に並び始めて、徐々に幅が狭くなり、最終的には幅数マイクロメートルの帯となる。このときの微小管配向を制御する機構はわかっていないが、分裂準備帯にはアクチンが存在し、その形成に関与すると考えられている⁶⁾。アクチンは分裂準備帯では特徴的な分布を示す。形成初期には分裂準備帯の微小管と共局在するが、その後、分裂準備帯が成熟し幅が狭くなると、細胞表層の微小管が集合した領域からはアクチンが減少する(アクチン排除領域^{7,8)})。しかし阻害剤によりアクチンを破壊した場合には、分裂準備帯の幅は狭くならず、アクチンは分裂準備帯の領域に留まることがわかっている。これらのことから、分裂準備帯の形成過程でアクチンと微小管の相互作用が変化すると考えられる。そこで、このときアクチンがどのように微小管の配向制御に関わるのかを明らかにするため、電子線トモグラフィー法を用いて解析を行い、アクチン繊維と微小管の関係について考察した。

2. 加圧凍結法による試料作製と電子線トモグラフィー

電子線トモグラフィー法では試料を傾斜させて様々な方向から電子線を照射して多数の電子顕微鏡画像を撮影し、得られた二次元像の傾斜シリーズから立体像を再構築する。

氷晶に包埋した試料をそのまま低温下で観察するクライオ電子線トモグラフィー法では、アーティファクトの少ない、より本来に近い姿を観察できると考えられる。しかし、我々が目的とする分裂準備帯の観察のためには、植物組織内の特

^a 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-5270; FAX: 03-5841-5270

* E-mail: atakem@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

2016年8月25日受付, 2016年10月19日受理

定の細胞、そして細胞内の領域を選んで観察を行う必要があり、電子顕微鏡での予備観察が不可欠である。そこで我々は凍結固定した試料を樹脂包埋し、切片を作製した上で電子線トモグラフィー法による三次元像観察を行っている。以下にその方法を紹介する。

2.1 加圧凍結・凍結置換法による試料作製

電子線トモグラフィー法によりアクチン繊維や微小管の解析を行うためには、まずこれらの微細構造が良好に保存された試料を作製する必要がある。

アクチンは二重らせん状に分子が重合して幅 5–9 nm のアクチン繊維（マイクロフィラメント）を形成している。植物マイクロフィラメントは壊れやすく、安定して観察することが難しい構造であった。加圧凍結・凍結置換法を用いた固定法⁹⁾では、比較的安定して微小管やマイクロフィラメントを良好に保存できている。一般的に植物細胞は細胞膜の外側に細胞壁を持ち凍結固定が難しいが、加圧凍結法では数十 μm の細胞全体を良好に凍結することが可能である。

試料の調製方法は次の通りである：タマネギ (*Allium cepa* L. cv. Highgold Nigou) 種子を 0.05 M ショ糖溶液上で 2 日間、さらに 0.1 M ショ糖溶液上で 1 日間生育させ、子葉の基部を切り出して Bal-Tec HPM010 (BAL-TEC 社製) により加圧凍結を行う。凍結した試料は 2% 四酸化オスミウム・アセトン溶液中で -80°C 、3 日間凍結置換固定を行い、さらに電子顕微鏡像上で細胞骨格や細胞膜の鮮明な像を得るために 2% 四酸化オスミウム・アセトン溶液中で 40°C 、1 時間の処理、および 5% 酢酸ウラン・メタノール溶液で 4°C にて 2 時間処理する⁹⁾。その後 Spurr 樹脂に包埋、包埋試料から表皮細胞の 250 nm 厚連続切片を作製し、フォルムバル膜を貼ったグリッドに載せる。切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で染色して予備観察を行い、分裂準備帯を含む切片を選ぶ。電子線トモグラフィーに使用するグリッドには、三次元像再構築時にアライメント用のマーカーとして使用する、10 nm の金粒子を両面に載せて撮影を行う。

2.2 電子線トモグラフィー法

250 nm 厚の試料を 60° まで傾斜して観察するために、試料の観察は加速電圧 300 kV (Hitachi H-9500 あるいは FEI TF30) と 750 kV (JEM-1000) で行っている。 $+60^{\circ}$ から -60° まで 1° 間隔で試料を傾斜させて撮影を行い、これを 1 セットとする。電子線トモグラフィー法では、試料の傾斜角度に制限があるため、画像情報には欠落が生じてしまう。この欠落の程度を軽減するために、試料を水平方向に 90° 回転して直行する二つの傾斜軸について傾斜シリーズ像を取得し、得られた 121 枚 \times 2 セットの連続傾斜画像から三次元再構成像（トモグラム）を作製する。再構成および解析には IMOD software¹⁰⁾ を用いている。倍率 15000 倍で撮影したシリーズからは、 $2500 \times 2500 \times 250 \text{ nm}$ の領域が、x-y 断面像が z 軸方向に 200 枚程度重なり、1.23 nm/pixel で表示されたトモグラムが得られており、このトモグラム上で微小管とマイクロフィラメントをトレースして解析を行う。

3. 分裂準備帯におけるマイクロフィラメントと微小管の解析

植物細胞内に、微小管に近接して平行に配置したマイクロフィラメントや両者の間の架橋構造が存在していることは過去にも電子顕微鏡観察に基づき報告されている^{11–16)}が、限られた観察例に留まっていた。電子線トモグラフィー法を用いた三次元再構成像の観察により、分裂準備帯のマイクロフィラメントと微小管の微細構造や細胞内分布を調べ、定量的な解析を行うことができた。

3.1 微小管およびマイクロフィラメントの分布

間期細胞の表層微小管が細胞膜直下のほぼ同じ深さに分布するのに対し、分裂準備帯の微小管は細胞膜直下から 200 nm 程度までの間に分布する（図 1）。250 nm 厚の接線面切片を用いて電子線トモグラフィー法を行うことにより、分裂準備帯の深さ方向について全体像に近い様子を観察できる¹⁷⁾。

図 2A は分裂準備帯のトモグラムの断面像である。多数の微小管が細胞長軸に対して水平方向に、平行に並ぶ様子が観察される。このトモグラム上で微小管とマイクロフィラメントを抽出したモデルを図 2B に示す。多数のマイクロフィラメントが微小管近傍に検出され、これらには微小管に沿うものの他、片方あるいは両方の端が微小管と接触しているものが含まれていた。植物細胞においてマイクロフィラメントは、1 本の繊維として単独で存在するものと、繊維の束として存在する 2 種類の形態が知られているが、タマネギ子葉表皮の分裂準備帯では、すべて 1 本の繊維として単独に存在していた。

図 3 は細胞分裂過程の進行に伴うマイクロフィラメントと微小管の配置の変化を示す。過去に報告があるように、本研究で用いたタマネギ子葉基部の間期表皮細胞では表層微小管、マイクロフィラメントともに特定の方向への配向は見ら

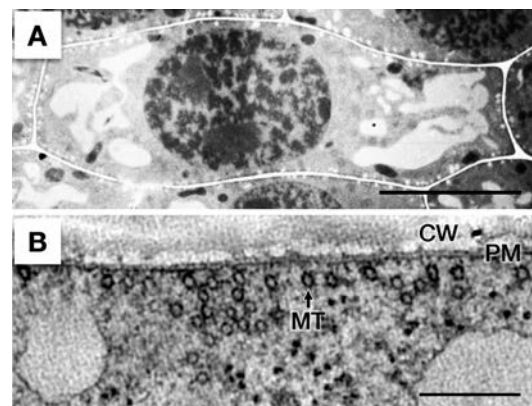


図 1 タマネギ子葉表皮の分裂前期細胞の透過型電子顕微鏡像（中央縦断面）。(A) 全体像。核内に染色体の凝集が観察される。スケールバー = 10 μm 。(B) 分裂前期の核周辺の細胞表層の拡大像。分裂準備帯の微小管 (MT) が集合している。CW, 細胞壁; PM, 細胞膜。微小管の断面が多数観察される。スケールバー = 200 nm。文献 18) より改変。

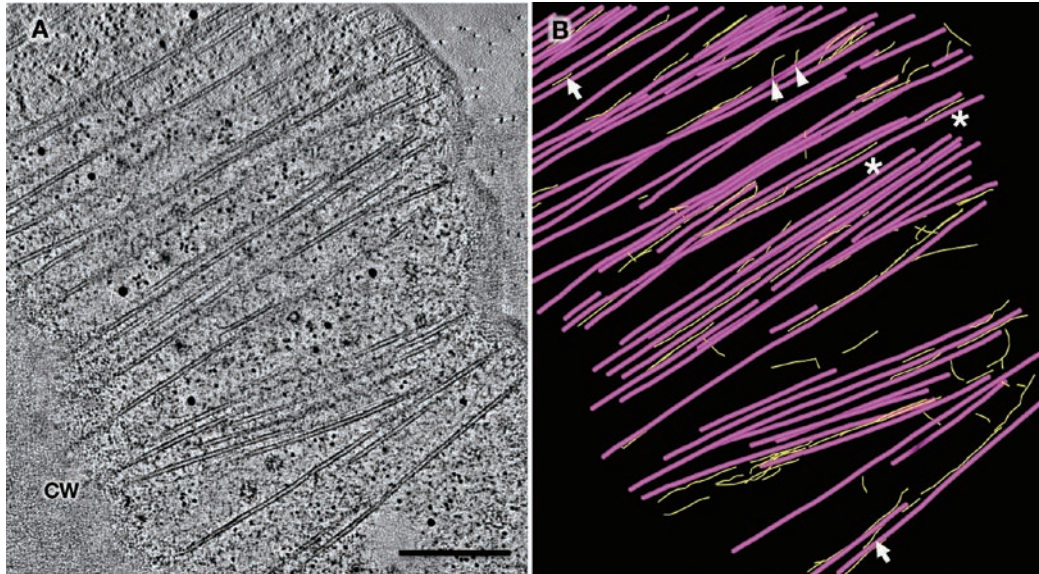


図2 タマネギ子葉表皮の分裂準備帯を持つ分裂前期細胞の細胞表面層接線面切片の撮影像から再構成したトモグラム。(A) 再構成したトモグラムの1視野。平行に配列した、分裂準備帯の微小管が多数観察される。(B) (A) のトモグラム上で微小管(マゼンタ)およびマイクロフィラメント(黄色)をトレースして作製したモデル。矢頭、マイクロフィラメント端が微小管に接触している；矢印、マイクロフィラメントの両端がそれぞれ別の微小管に接触している；アスタリスク、マイクロフィラメントは2本の平行な微小管の間に、これらと平行に配置しており、微小管との間には架橋が形成されている。スケールバー=500 nm。文献5)より改変。

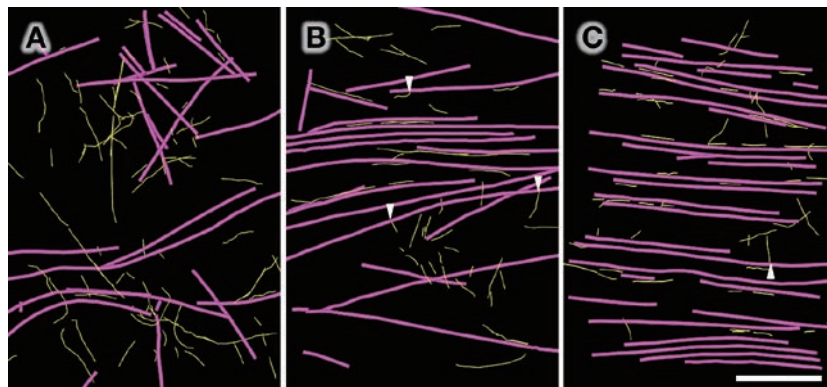


図3 タマネギ子葉表皮の分裂準備帯形成過程における微小管とマイクロフィラメント配置の変化。細胞表面層の接線面のトモグラムから作製したモデル。(A) 間期の細胞。表面微小管(マゼンタ)、マイクロフィラメント(黄色)ともランダムに分布しており、配向は見られない。(B) 細胞長軸に対して微小管が緩やかに水平方向に配向しており、分裂準備帯の形成が始まっていると考えられる。微小管に並んだマイクロフィラメントが観察される。(C) 分裂前期の細胞。分裂準備帯が形成されており、水平方向に配向した微小管に、多くのマイクロフィラメントが沿うように配置している。スケールバー=500 nm。文献5)より改変。

れず、ランダムに分布していた(図3A)。分裂準備帯形成初期には、微小管が細胞長軸方向に対して水平に配向して帯状に並び始める(図3B)。さらに分裂準備帯の形成が進行する時期には、微小管の配向が進み、2、3本の微小管が束を形成する(図3C)。微小管の配向が進むにつれ、微小管近傍に並び、微小管に結合したマイクロフィラメントが増加した。分裂前期後半にはさらに微小管が密集しての束化が進む。この微小管帯の領域ではマイクロフィラメントが減少し、それ以外の細胞表面層にはランダムに分布して、アクチン排除領域が観察された。

3.2 微小管とマイクロフィラメントの結合

図4はトモグラムの一部である。A、BおよびD-Fはマイクロフィラメントが2本の微小管に結合している箇所を切り出したものである。図4A、Bの上側の微小管は典型的な脱重合端を示している。マイクロフィラメントはこの微小管に平行に配置し、さらに隣接する別の微小管に接している。図4D-Fでは2本の平行に並んだ微小管の間にやはり平行にマイクロフィラメントが沿っており、微小管との間には15 nm前後の架橋構造が多数見られる。アクチンと微小管の相互作用に関わるとして報告されている分子は現在いくつか報告さ

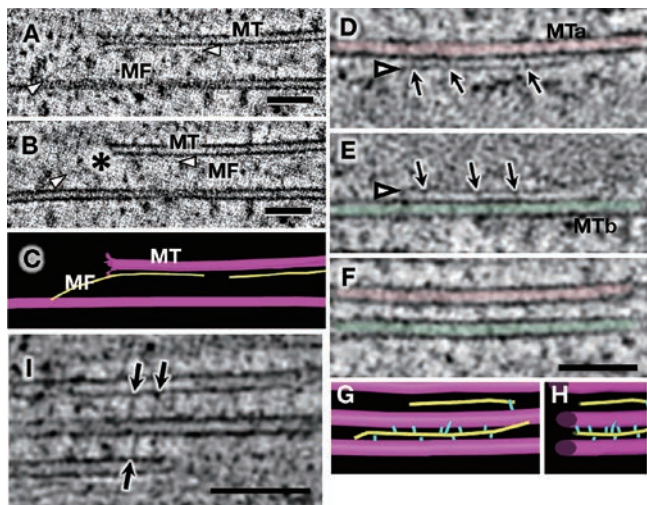


図4 分裂準備帯のトモグラムから抽出した微小管 (MT) とマイクロフィラメント (MF, 矢頭) の関係を示す画像。(A)–(C) マイクロフィラメントが上の微小管と結合している。(B) は (A) から約 10 nm 下にある視野である。(A) では微小管の表面に近い断面で並んだマイクロフィラメントが見えており、(B) では微小管の縦断面に近い像。*は脱重合中の端を示す。(D)–(F)。1本のマイクロフィラメントと2本の微小管を含んでいる。(D)、(E) マイクロフィラメントは隣接する微小管 MTa (D) あるいは MTb (E) と架橋 (矢印) を介して結合している。(D) のマイクロフィラメントを軸として、約 60° 回転させた面が (E) となる。(F) 同一トモグラム内の別の断面像。(D)、(E) の2本の微小管が平行に並んでいるが、この視野にはマイクロフィラメントは現れない。(G)、(H) (D)–(F) に含まれる微小管とマイクロフィラメントの配置。2本の微小管がマイクロフィラメントを介して束を形成していることがわかる。(I) 微小管の架橋構造。マゼンタ: 微小管, 黄色: マイクロフィラメント, 水色: 微小管とマイクロフィラメント間の架橋構造。スケールバー=100 nm。文献5) より改変。

れており¹⁹⁾、これらが架橋構造を形成する候補として考えられる。微小管の束化が進むと、微小管に付着したマイクロフィラメントは少なくなり、代わりに隣接した微小管の間には、はしご状に微小管を繋ぐ架橋(図4I 矢印)が多数観察された。

3.3 分裂準備帯のマイクロフィラメント長

マイクロフィラメントの配置だけでなく、その長さにも変化が見られた。間期の細胞表層には 500 nm を超える長いマイクロフィラメントが多数観察されたのに対し、分裂準備帯の微小管に結合したマイクロフィラメントは比較的短いものが大多数を占めており、その平均長は 168 ± 14 nm (9 個のトモグラムにおける平均値±標準誤差) であった。分裂前期の初期、幅の広い分裂準備帯では 100 nm 以下のものが多数観察され(図5A)、分裂準備帯の形成が進行して幅が狭くなると 100–200 nm 程度のマイクロフィラメントが増加した(図5B, C)。分裂準備帯形成初期にはまず短いマイクロフィラメント断片が微小管に結合し、この断片が伸長することが示唆された。アクチン阻害剤であるサイトカラシン D で処理した場合には、分裂準備帯の形成が進行した時期の細胞で、分裂準備帯にマイクロフィラメントは存在するものの、未処

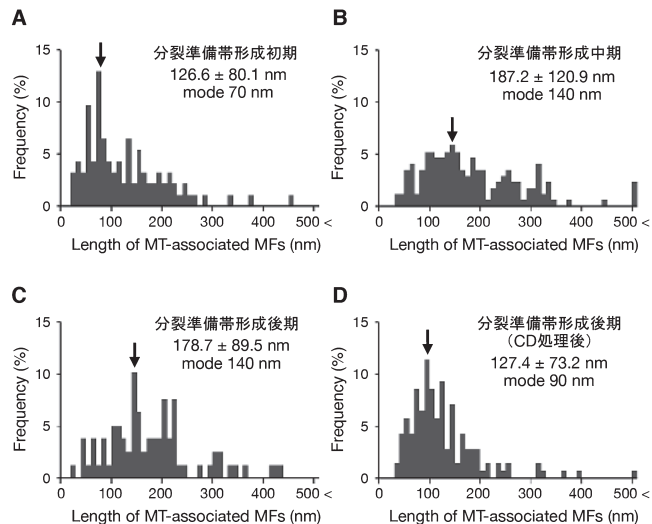


図5 微小管に結合したマイクロフィラメント長の変化。(A)–(C) それぞれ、分裂準備帯形成初期、中期、後期。初期と中期は核の状態と分裂準備帯の幅から、後期は核の状態に基づき分類した。(D) 20 μ M サイトカラシン D で 30 分間処理した後に固定した試料中の分裂準備帯形成後期の細胞。(C) と比較して分裂準備帯の幅は広い。(A)–(D) についてそれぞれ 93, 172, 79, 140 本のマイクロフィラメント長を計測した。文献5) より改変。

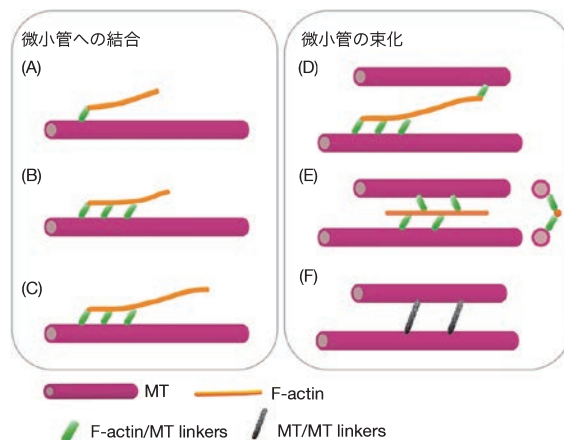


図6 分裂準備帯形成における微小管とマイクロフィラメントの関係を示すモデル図。(A) マイクロフィラメントの一方の端が微小管に付着する。(B) 架橋されて微小管に並ぶ。(C) マイクロフィラメントのもう一方の端が伸長する。(D) 伸長した端が別の微小管に付着する。(E) マイクロフィラメントと微小管の間に架橋が形成されて並び、マイクロフィラメントを介した微小管の束が形成される。(F) 25–30 nm の架橋構造によって微小管同士が繋がれて、束化が進行する。文献5) より改変。

理のものに比べて約 35% 短くなっていた(図5D)。伸長が阻害されるために微小管を架橋して正常な微小管束を形成することができず、分裂準備帯の幅が狭くならないと考えられる。

以上の結果から推測される分裂準備帯形成過程のモデルを図6に示す。まず、短いマイクロフィラメントの端が微小管に付着し、両者の間に架橋が形成される(図6A, B)。その後、マイクロフィラメントが伸長し、伸長した端が別の微

小管に付着することにより、マイクロフィラメントが2本の微小管を繋ぐ(図6C, D)。これらの微小管とマイクロフィラメントが架橋され、2本の微小管が近接して25–30 nmの距離で平行に配置する(図6E)と、これらの微小管の間には新たな架橋構造が形成されて、微小管の束化が進行すると考えられる。

4. おわりに

本稿では、我々が行った電子線トモグラフィー法による植物組織内のアクチン-微小管の相互作用解析について紹介した。透過形電子顕微鏡による連続超薄切片の観察や、近年の発展と利用の拡大が著しい連続スライス SEM など、様々な三次元観察法が観察対象に応じて利用され、多くの情報が得られている。加圧凍結・凍結置換と組み合わせた電子線トモグラフィー法では、それぞれ直径25 nm、6 nmの繊維である微小管やマイクロフィラメントの一本一本について立体配置や、定量的な解析が可能であり、細胞骨格や小胞のような微細構造の形態学的な解析は新たな知見を与えてくれるものと期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、主にコロラド大学と大阪大学の超高压電子顕微鏡施設および理研 CDB を利用して行ったものである。共同研究で有益な議論と助言をいただいた、これらの研究施設の方々、富山大学唐原一郎博士、およびコロラド大学 L. Andrew Staehelin 博士に謝意を表す。

文 献

- 1) Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M. and Waterman-Storer, C.M.: *Nat. Cell Biol.*, 5(7), 599–609 (2003)
- 2) Collings, D.A.: in P. Nick (Ed.), *Plant Microtubules*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, New York. 47–79 (2008)
- 3) Urban, E., Jacob, S., Nemethova, M., Resch, G.P. and Small, J.V.: *Nat. Cell Biol.*, 12(5), 429–435 (2010)
- 4) Gibeaux, R., Lang, C., Politi, A.Z., Jaspersen, S.L., Philippsen, P. and Antony, C.: *J. Cell Sci.*, 125(Pt 23), 5830–5839 (2012)
- 5) Takeuchi, M., Karahara, I., Kajimura, N., Takaoka, A., Murata, K., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelin, L.A. and Mineyuki, Y.: *Mol. Biol. Cell*, 27(11), 1809–1820 (2016)
- 6) Mineyuki, Y.: *International review of cytology*, 187, 1–49 (1999)
- 7) Liu, B. and Palevitz, B.A.: *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 23, 252–264 (1992)
- 8) Cleary, A.L., Gunning, B.E.S., Wasteneys, G.O. and Hepler, P.K.: *J. Cell Sci.*, 103, 977–988 (1992)
- 9) Murata, T., Karahara, I., Kozuka, T., Thomas, H.G. Jr., Staehelin, L.A. and Mineyuki, Y.: *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*, 51(2), 133–136 (2002)
- 10) Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. and McIntosh, J.R.: *J. Struc. Biol.*, 116, 71–76 (1996)
- 11) Seagull, R.W. and Heath, I.B.: *Eur. J. Cell Biol.*, 20(2), 184–188 (1979)
- 12) Hardham, A.R., Green, P.B. and Lang, J.M.: *Planta*, 149(2), 181–195 (1980)
- 13) Heath, I.B. and Seagull, R.W.: in C.W. Lloyd (Ed.), *The cytoskeleton and plant growth and development*, Academic Press: London, New York. 163–182 (1982)
- 14) Tiwari, S.C., Wick, S.M., Williamson, R.E. and Gunning, B.E.S.: *J. Cell Biol.*, 99(1), S63–S69 (1984)
- 15) Ding, B., Turgeon, R. and Partharathy, M.V.: *Protoplasma*, 165(1), 96–105 (1991)
- 16) Ding, B., Turgeon, R. and Partharathy, M.V.: *Protoplasma*, 165(1), 209–211 (1991)
- 17) Karahara, I., Suda, J., Tahara, H., Yokota, E., Shimmen, T., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelin, L.A. and Mineyuki, Y.: *Plant J.*, 57(5), 819–831 (2009)
- 18) 竹内美由紀, 唐原一郎, 峰雪芳宣: 大阪大学超高压電子顕微鏡センター年報, 38, 40–43 (2011)
- 19) Petrusek, J. and Schwarzerova, K.: *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12(6), 728–734 (2009)