

花粉管におけるアクチン系細胞骨格のダイナミクス

姫路工業大学理学部教授

新免 輝男

花粉管におけるアクチン系細胞骨格のダイナミクス

1 研究の背景と目的

動植物において細胞の機能発現に細胞骨格タンパク質が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。本研究者はテッポウユリの花粉管を用いて、アクチン系細胞骨格の生理・生化学的な研究を行っている。花粉は雌しべの柱頭に付着すると、花粉管をのばし、子房にある卵細胞まで精核を輸送する。これは植物の受精において、最も重要な過程の一つであるといえる。花粉管内では活発な原形質流動が見られるが、これはさまざまな細胞小器官や核などの輸送に不可欠である。花粉管は先端が伸びる、いわゆる先端成長を行うが、原形質流動によって成長に必要な様々な物質が先端に運ばれることが不可欠である。花粉管内においては多数のアクチンフィラメントが束を形成して長軸方向に配列している。原形質流動は細胞小器官に結合したミオシンがアクチンフィラメントの上を滑り運動することによって起こるものと考えられている。本研究者はテッポウユリの花粉管を用いて、植物から初めてアクチンフィラメントとの滑り活性を持つミオシンを精製することに成功している。

本研究では①ミオシンのカルシウムによる制御機構、②アクチン結合タンパク質の精製とその機能解析、③オカダ酸による原形質流動の阻害、④花粉管における核の輸送機構についての解析を行った。

2 研究方法・研究内容

花屋から購入したテッポウユリから雄しべを集め、2～3日間、室温で乾燥させ、その後-80度で保存した。この条件で保存すると、1年後も高い発芽率が保たれる。

粗抽出液の調製: ミオシンまたはアクチン結合タンパク質を精製する場合は4リットルの培養液(7%蔗糖、1.27 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、162 μM ホウ酸、0.99 mM KN O_3 、3mM KH_2PO_4)に15～20gの花粉を加えて通気しながら1～2時間培養した。発芽した花粉をろ過によって集めて、これを10 mM EGTA、6 mM MgCl_2 、0.5 mM PMSF、100 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin、2 mM DTT、30 mM PIPES-KOH、0.6 % casein、250 mM sucrose (pH 7.0)を含む液に懸濁し、ホモジナイザーによって破碎した。これを10,000gで10分間遠心することによって、粗抽出液を得た。この粗抽液からミオシン及びアクチン結合タンパク質を精製した。

ミオシンの精製: ミオシンは次に示す方法によって精製した。粗抽出液にニワトリ骨格筋から精製したアクチンフィラメントを加えてミオシンをこれに結合させた。超遠心によってアクチンフィラメントを集め、これを0.2 M KClで処理することによって、非特異的に結合している成分を除いた。ミオシンなどが結合しているアクチンフィラメントを0.5 mM ATPで処理することによってミオシンを抽出した。超遠心によってアクチンフィラメントを除き、ミオシンを含む上澄を得た。この試料から、ハイドロキシアパタイトカラム、セファクリル S-30カラム、セファクリル S-300カラムによって精製を進めた。この操作によって170kDaペプチドを重鎖とするミオシンが精製された。カラムによる精製の段階で、ミオシンを含む分画は下に述べるin vitro motility assayによって同定した。

in vitro motility assay: カバーガラスの表面にミオシンを固定する。これにローダミンファロイジンで蛍光染色したニワトリ胸肉のアクチンフィラメントを加える。Mg-ATPを加えるとアクチンフィラメントはミオシンで被覆されたカバーガラスの表面を滑り運動する。その運動は超高感度ビデオカメラを装備した蛍光顕微鏡で観察できる。

アクチン結合タンパク質の精製: 0.5M KClを含む液中で花粉管を破碎して、それを遠心することにより、粗抽出液を得た。これにニワトリ胸筋から調製したアクチンフィラメントを加え、アクチン結合タンパク質をアクチンフィラメントに結合させた。遠心によってアクチンフィラメントを集めたあと、0.5M KClでアクチン結合タンパク質を抽出した。遠心によってアクチンフィラメントを除いた上澄から、ハイドロキシアパタイトカラム、セファクリル S-300カラム、DE-52イオン交換カラム、ハイドロキシアパタイトカラムによって目的とするアクチン結合タンパク質を精製した。

アクチンフィラメント及び微小管の蛍光観察: 花粉管を4%パラフォルムアルデヒドで固定した後、セルラーゼ処理をした。ポリ-L-リジンで表面を被覆したスライドガラスの表面にセルラーゼ処理した花粉管を固定した。これを抗チューブリン抗体およびローダミンで処理することによって、微小管とアクチンフィラメントを蛍光染色した。この試料を蛍光顕微鏡によって観察し、写真によって記録した。

3 研究結果

(1) ミオシンのカルシウムによる制御

精製したミオシンはin vitro motility assayによって毎秒 $7\mu\text{m}$ の速度でアクチンフィラメントを動かした。この速度は生きている花粉管においてみられる原形質流動の速度とほぼ同じである。このことは、我々が精製したミオシンが原形質流動の力発生に関与していることを示唆する。また、このミオシンのATPase活性はニワトリ骨格筋のアクチンフィラメントによって60倍にまで高められた。これはいわゆるactin-activated ATPaseであり、ミオシンの大きい特徴である。この結果についてはすでに報告済みである(Yokota and Shimmen 1994)。

in vitro motility assayによってミオシンの運動活性のカルシウム感受性を調べた。運動活性は μM 程度のカルシウムによって阻害された。また、ATPaseの活性に対するカルシウムの作用についても調べた。ミオシン単独でのATPase活性はほとんどカルシウムの影響を受けなかった。ところがactin-activated ATPaseは μM 程度のカルシウムで強く阻害された。カルシウム濃度をさらに高くしてもactin-activated ATPase活性はある程度残った。

このようににミオシンにカルシウム感受性があることが分かったのでその機構について解析した。ミオシンの試料には170kDaの重鎖の他に、15kDa程度のポリペプチドが含まれていることが分かった。この低分子成分はハウレンソウのカルモジュリンに対する抗体で認識されることが分かった。また、電気泳動においてその移動度がカルシウム濃度によって変わることも分かった。これらのことからこの15kDa成分がカルモジュリンであると結論される。カルシウム濃度を非常に高くすると、15kDa成分はミオシン重鎖から離れる。SDA-PAGEにおいてこの成分は重鎖から離れるが、これにハウレンソウのカルモジュリンを加えるとそれが結合することが分かった。以上の結果より、テッポウユリ花粉管のミ

オシンの軽鎖の一つはカルモジュリンであると結論される。

(2) アクチン結合タンパク質の精製と解析

135kDaのポリペプチドよりなるアクチン結合タンパク質を精製することに成功した。ゲルろ過クロマトグラフィーによって調べたところ、その分子量は260kDaであることが分かった。即ち、生理的な条件ではこのアクチン結合タンパク質はホモダイマーを形成しているものと考えられる。また、アクチンとの比率を調べたところ、20分子のアクチンモノマー当たり、1分子のアクチン結合タンパク質が結合していることが分かった。

ニワトリ胸筋から精製したアクチンフィラメントにこのアクチン結合タンパク質を加えるとアクチンフィラメントが束化することが分かった。すなわち、我々が精製したアクチン結合タンパク質はアクチン束化因子であるといえる。

このアクチン結合タンパク質に対する非常に特異的なポリクローナル抗体を作製することに成功した。アクチン抗体との二重染色によって花粉管における局在を調べた。以前にアクチンフィラメントの束は花粉管のほぼ全体に存在するが、先端部にはほとんど束が形成されていないことが報告されている。本研究においてもこれを支持する結果が得られた。アクチン結合タンパク質の局在はアクチンフィラメントの局在とほとんど一致することが分かった。即ち、先端部以外は花粉管全体に存在した。また、イミュノゴールド法によって調べると、このアクチン結合タンパク質はアクチンフィラメントが束を形成している部分にのみ局在していることが分かった。

(3) オカダ酸による原形質流動の阻害

タンパク質フォスファターゼの阻害剤であるオカダ酸の原形質流動に対する効果を調べた。テッポウユリ花粉管をオカダ酸で処理すると1 μ M以上のオカダ酸で原形質流動が完全に阻害された。オカダ酸の細胞内ATP濃度に対する作用を調べたところ、1 μ Mのオカダ酸処理によってATP濃度は約半分に減ることが分かった。また、オカダ酸はアクチンフィラメントの構造には影響を与えないことがわかった。

(4) 花粉管内における核の移動

テッポウユリの花粉管においては、原形質の光学密度が高いために、光学顕微鏡で核を観察できない。このために、蛍光染色によって核を観察することにした。核の蛍光染色は一般的にはDAPIが用いられる。しかしながら、DAPIで核を染色するためには細胞膜をpermeabilizeして細胞を殺す必要がある。しかしながら、SYTO 11という蛍光色素を用いると細胞を殺すことなく、核を生体染色できる。

花粉管核は毎分約10 μ m程度の速度で移動している。これに、アクチンフィラメントの阻害剤であるサイトカラシンを加えると原形質流動は完全に停止し、核の移動速度は毎分2 μ m程度にまで低くなった。また、微小管の重合阻害剤であるプロピザマイドで花粉管を処理したところ、花粉管核の移動速度はコントロールの約80%に低下した。次に、サイトカラシンとプロピザマイドの同時処理を行った。これによって、花粉管核の移動速度は著しく低下した。しかしながら、完全に停止することはなかった。サイトカラシン処理によってアクチンフィラメントが、プロピザマイド処理によって微小管が完全に破壊された。

4 研究結果の考察および今後の展望

アクチンフィラメントとの滑り運動活性を示すミオシンを植物から精製したのは我々が始めてである(Kohno et al., 1992, Yokota and Shimmen 1994)。また、山本ら(1994)はオウシャジクモから滑り運動活性を示すミオシンを精製した。我々が精製したミオシンにはカルシウム感受性があることが分かった。カルシウム感受性のあるミオシンを植物細胞から精製したのも我々が始めてである。また、植物ミオシンにおいて軽鎖を同定したのも我々が始めてである。

いくつかの植物において原形質流動がカルシウムによって阻害されることが報告されている。テッポウユリ花粉管においても原形質流動はカルシウムによって阻害される。花粉管を破碎して得た細胞小器官はシャジクモ類のアクチンフィラメントの上を滑り運動をするが、その運動はカルシウムによって阻害される。シャジクモ類のアクチンフィラメントにはカルシウム感受性がないことから、花粉管ミオシンにはカルシウム感受性があると推論した(Kohno and Shimmen 1990)。本研究において、ミオシンがカルシウム感受性をもつことを分子レベルで証明することに成功した。遺伝子の解析において植物ミオシンがカルモジュリン結合部位を持つことが示唆されていたが、本研究によってカルモジュリンが軽鎖として結合していることが明らかになった。このミオシンは調べたすべての高等植物においてその存在が確認されたことから、本研究で得られたミオシンのカルシウム阻害は高等植物に普遍的なものであることが考えられる。シャジクモ類において、脱膜モデルを用いた実験から原形質流動はミオシンのカルシウム依存性リン酸化によって阻害されることが示唆されていた。山本らがオウシャジクモから精製したミオシンはカルシウム感受性を持たない。その試料にリン酸化酵素が含まれていないためであると考えられる。このように、シャジクモ類と高等植物では原形質流動のカルシウム阻害における分子機構は異なるようである。また、テッポウユリのミオシンとオウシャジクモのミオシンはその抗原性が全く異なることが分かっている。

花粉管の先端では原形質流動がほとんど見られない。また、先端部では遊離カルシウム濃度が高いことが知られている。なんらかの操作で先端のカルシウム濃度が低くなると、先端まで原形質流動が進むようになり、同時に花粉管の先端成長も停止する。このように、ミオシンのカルシウムによる阻害はなんらかの形で花粉の先端成長に関与しているものと思われる。

オカダ酸によって原形質流動が阻害されたことから、未同定のタンパク質のリン酸化が原形質流動の停止に関与しているものと考えられる。抽出したミオシンはオカダ酸によってその運動活性が影響を受けないことから、ミオシンはリン酸化酵素のターゲットではないと考えられる。

本研究においてアクチン束化タンパク質を精製することに成功したが、これは植物においては始めてである。ほとんどの植物においてアクチンフィラメントは束を形成している。このアクチン束化タンパク質はこのようなアクチンの束化を行う、きわめて普遍性のあるアクチン調節タンパク質である可能性がある。

花粉管核の移動がサイトカラシン及びプロピザマイドによって阻害されることから、アクチンフィラメントと微小管が花粉管核の移動に関与しているものと考えられる。また、両阻害剤の同時処理によってアクチンフィラメントと微小管の両方を破壊しても、遅いながらも花粉管核が移動を続けることから、未

確認の核輸送メカニズムが存在する可能性がある。

5 生活や産業への貢献および波及効果

植物は地球上の生産者としてその存在は非常に重要であり、その増殖の促進は食物の確保や地球の環境保持に不可欠である。植物の増殖において、受粉とそれに続く受精は最も重要な段階である。受精が起こるためには、花粉管を延ばして、精核を卵細胞まで送り届ける必要がある。原形質流動は花粉管の先端成長に不可欠である。このように、原形質流動の力発生に関与しているアクチン系細胞骨格の機能発現の機構を解析することは重要な課題である。

花粉のみならず、植物の非常にさまざまな生理機能に細胞骨格が関与していることが明らかとなっている。花粉管は細胞骨格の研究に適した材料であり、その成果は花粉管以外の分野にも大きい貢献をするものと思われる。

6 発表論文

- Kohno, T. and Shimmen, T. (1988) Mechanism of Ca inhibition of cytoplasmic streaming in lily pollen tubes. *J. Cell Sci.* **91**, 501-509
- Kohno, T. and Shimmen, T. (1988) Accelerated sliding of pollen tube organelles along Characeae actin bundles regulated by Ca. *J. Cell Biol.* **106**, 1539-1543
- Kohno, T., Ishikawa, R., Nagata, T., Kohama, K. and Shimmen, T. (1992) Partial purification of myosin from lily pollen tubes by monitoring with in vitro motility assay. *Protoplasma* **170**, 77-85
- Yokota, E. and Shimmen, T. (1994) Isolation and characterization of plant myosin from pollen tubes of lily. *Protoplasma* **177**, 153-162
- Yokota, E., McDonald, A.R., Liu, B., Shimmen, T. and Palevitz, B.A. (1995) Localization of a 170 kDa myosin heavy chain in plant cells. *Protoplasma* **185**, 178-187
- Yokota, E., Mimura, T. and Shimmen, T. (1995) Biochemical, immunohistochemical and immunohistochemical identification of myosin heavy chains in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1541-1547

本研究で得られた成果は3編の論文として現在準備中である。