

植物細胞核内アクチン繊維の解析

Analysis of nuclear actin microfilaments in plants

(日本植物学会推薦)

代表研究者 大阪公立大学 稲田のりこ Osaka Metropolitan University Noriko INADA

Cellular cytoskeleton Actin microfilaments (AF) primarily locates beneath the cellular membrane and function in regulation of cell shape and intracellular transport. Recent research using mammalian cultured cells has revealed a presence of nuclear AF that functions in regulation of chromatin organization, transcription and DNA repair. However, it is not clear whether the presence and function of nuclear AF are conserved in other organisms, including plants. The organization and function of AF are regulated by a number of actin binding proteins (ABPs), including ACTIN DEPOLYMERIZING FACTORS (ADFs). We previously reported that model plant *Arabidopsis thaliana* ADFs localize in the nucleus and function in regulation of pathogen response. Furthermore, we recently showed that *A. thaliana* *adf* mutants exhibited alterations in nuclear organization and gene expression. Based on our results and recent research on nuclear AF in mammalian cells, we hypothesized that nuclear AF functions in regulation of gene expression in plant cells. To test this hypothesis, in this study, we established *A. thaliana* transgenic lines to visualize nuclear AF. We found that the frequency of cells with nuclear filaments tended to increase in *adf* mutants. Furthermore, we found that histone modification pattern was changed in *adf* mutants. Our future research will focus on detailed characterization of plant nuclear ADFs, as well as function of ADF and nuclear ADFs in regulation of histone modification and gene expression.

研究目的

本研究の目的は、植物の細胞核内アクチン繊維 (Actin microfilaments, AF) の構造および機能を明らかにすることである。細胞骨格の一種である AF は、真核生物の細胞膜直下に主に局在し、細胞形態の制御や細胞内の物質輸送に働いている。一方、動物培養細胞を用いた近年の研究では、血清投与や DNA 損傷誘導などの様々な刺激、また細胞分裂直後に一過的に細胞核内に AF が形成され、遺伝子発現制御や損傷 DNA 修復、細胞核サイズとクロマチンの形態制御などに機能することが報告されている¹。植物においては、AF を構成するアクチンタンパク質が細胞核内に局在すること自体は報告されているものの²、細胞核内に AF が形成されるという報告はなく、真核生物における細胞核内 AF の一般性は明らかになっていない。

AF の構造・動態は、アクチンに結合する多数のタ

ンパク質 (Actin Binding Protein, ABP) によって制御されている³。アクチン脱重合因子 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR, ADF) は、真核生物全体に保存されている ABP であり、AF の分解に機能する^{3,4}。シロイヌナズナのゲノム上には 11 個の ADF 遺伝子がコードされており、アミノ酸配列の類似性から 4 つのサブクラスに分けられる。サブクラス I のグループは、*ADF1*、*ADF2*、*ADF3*、*ADF4* の 4 つの ADF 遺伝子を含んでおり、いずれも植物体全体で比較的高い発現を示す⁴。

我々のグループではこれまでに、シロイヌナズナの *ADF4* の欠損変異体 (*adf4*) およびサブクラス I の 4 つの ADF 遺伝子の発現を全て抑制した形質転換体 (*ADF1-4* 発現抑制株) が、糸状菌病原体であるうどんこ病に対して抵抗性の亢進を示すこと⁵、野生型よりも植物サイズが増大すること⁶を報告してきた。*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株は、細胞表層 AF の目立っ

た構造変化を示さず、相補実験の結果、うどんこ病に対する応答には ADF4 の細胞核局在が重要であることがわかっている⁵。この結果と、上述の動物培養細胞における知見をあわせ、我々は、ADF によって制御される植物の細胞核内 AF が遺伝子発現を制御することにより、病害応答や植物サイズの制御に関わっている、との仮説を立てた。

この仮説を検証するため、本研究では植物細胞核内 AF の可視化系の確立と、細胞核内高次構造および遺伝子発現と細胞核内 AF との関係解明を到達目標とした。

研究経過

細胞核内高次構造と遺伝子発現制御におけるシロイヌナズナ ADF の機能解析

本助成研究を開始する前に、我々は、シロイヌナズナの *adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株において、細胞核内高次構造であるヘテロクロマチンのサイズが減少することを見出していた (図 1)。成熟葉を固定後、DNA に結合する蛍光色素 DAPI で染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、表皮細胞内の細胞核において、DAPI で強く染色されるヘテロクロマチンと、弱く染色されるユークロマチンの 2 つの領域が見られる (図 1A)。蛍光画像を用いた定量解析の結果、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株では、ヘテロクロマチンのサイズが野生型と比較して有意に減少していた (図 1B)。

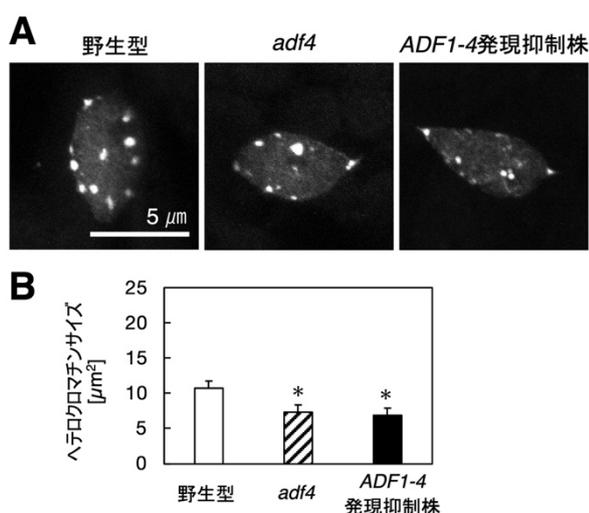


図 1. ヘテロクロマチン解析。(A) DAPI で染色した野生型・*adf4*・*ADF1-4* 発現抑制株細胞核の蛍光像。強く染色されているドットがヘテロクロマチン。(B) ヘテロクロマチンサイズの定量解析。
* : Student's *t*-テストにより、野生型と比較して $P < 0.05$ を示したサンプル (Matsumoto et al. 2023 より改変)。

また、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株の成熟葉においては、合計 1,818 個の遺伝子の発現が変化しており、そのうち発現上昇を示す遺伝子は 911 個、発現低下を示す遺伝子は 907 個であることがわかった。これらの発現変化を示す遺伝子は、*adf4* と *ADF1-4* 発現抑制株との間で一部重複を示した。また、発現変化を示した遺伝子の Gene Ontology 解析の結果、病害応答関連の遺伝子が多く見つかった。植物と病原性微生物との相互作用において、病原体はエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主植物細胞内に送り込み、宿主植物の防御応答を抑制しようとするが、植物は Nuclear binding leucine rich repeat (NLR) と呼ばれるタンパク質を持ってエフェクターを認識し、より強い防御応答を発動させる。シロイヌナズナのゲノム上には 200 個以上の NLR 遺伝子がコードされており、それぞれが異なるエフェクターを認識すると考えられている⁷。*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株では、合計 22 個の NLR 遺伝子が発現低下しており、この中には、以前 *adf4* において発現低下することが報告されている *RPS5* も含まれていた⁸。

以上の成果を、本助成支援期間内に論文として発表した⁹。

植物細胞核内 AF 可視化系の確立と形成条件の同定
上述の通り、植物では細胞核内 AF の形成条件や詳細な構造・機能は不明である。我々は、植物細胞核内 AF の観察のため、AF 結合ペプチド Lifeact¹⁰ に蛍光タンパク質 GFP と核局在シグナルペプチド NLS を融合させたタンパク質 (Lifeact-GFP-NLS) を発現するシロイヌナズナ形質転換体 (野生型および *adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株) を作成した。本助成研究開始前の予備的結果として、野生型と *ADF1-4* 発現抑制株の根の細胞核内で繊維状構造が観察されることを確認していた。本助成研究では、細胞核内の繊維状構造について更に詳細に解析するとともに、野生型と *adf4*・*ADF1-4* 発現抑制株との違い、また、細胞核内繊維状構造の形成が誘導される条件について検討を行った。

播種後 7 日目から 14 日目の Lifeact-GFP-NLS 発現シロイヌナズナの幼芽を使った観察では、根の先端 (根端) において、細胞核内にドット状、あるいは繊維状の蛍光構造が観察され、その構造が観察される頻度は、野生型よりも *ADF1-4* 発現抑制株で高

い傾向にあった。葉（子葉）では、ドット状・繊維状、いずれの細胞核内構造も観察できなかった。

adf4 変異体は得られたライン数が少なく、またいずれのラインも蛍光が弱く観察に適さなかったため、現在さらにライン数を増やして解析を進めている。

細胞核内の繊維状構造が AF であるかどうかの確認のため、同じく AF に結合するナノボディ Chromobody に GFP を結合させ、NLS を融合したタンパク質（Nuclear Actin-Chromobody、

<https://www.ptglab.co.jp/news/blog/new-nuclear-actin-chromobody-plasmid/>) を野生型と *adf4*・*ADF1-4* 発現抑制株で発現する形質転換体を作成した。形質転換体の観察の結果、Lifeact-GFP-NLS 発現株と同様の細胞核内繊維状構造が観察された。Nuclear Actin-Chromobody 強制発現株では、野生型においても高い頻度で細胞核内繊維状構造が観察されたものの、植物の生育が著しく阻害されたため、現在低い発現量で恒常的に発現するプロモーターを用いたベクターを作成中である。

動物培養細胞においては、DNA 損傷誘導薬剤処理時に細胞核内 AF が一過的に形成される¹。植物において DNA 損傷を誘導する薬剤として知られているゼオシンで Lifeact-GFP-NLS 発現植物を処理したところ、野生型と *ADF1-4* 発現抑制株の両方において、細胞核内繊維状構造の形成頻度が上昇する傾向が見られた。しかし、統計処理の結果、有意な差は得られなかった。また、根の長さを指標として、ゼオシンに対する感受性を調べたところ、野生型と *adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株との間で有意な差は見られなかった。

遺伝子発現と細胞核内の遺伝子の位置との関連解析
細胞核内 AF は、細胞核内における遺伝子の位置を調整することにより、遺伝子発現制御に関わっている可能性がある¹。*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株において、細胞核内の遺伝子位置の変化が発現変化を引き起こしている可能性を検証するため、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株において発現が変化する *NLR* 遺伝子を対象に、細胞核内の一遺伝子の位置を可視化できる Padlock FISH 法¹¹ を用いた解析を行った。

野生型、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株それぞれの成熟葉から細胞核を抽出し、ガラス面に固定して、目的遺伝子をプローブとした Padlock FISH 解析を行った。ポジティブコントロールとして、セントロメア

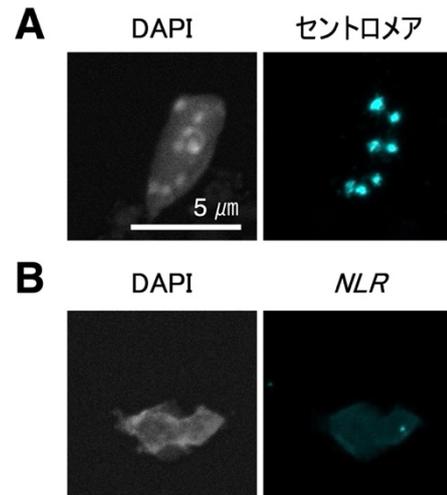


図 2. Padlock FISH 解析結果。(A) ポジティブコントロールとしてセントロメア領域の配列を用いた Padlock FISH 法による標識。左が DAPI 蛍光像、右がセントロメア領域の Padlock FISH 像。(B) NLS 遺伝子配列をプローブに用いた Padlock FISH 解析。

領域の配列をプローブとした解析を行ったところ、DAPI で染色されるヘテロクロマチン領域に良好なシグナルを示した (図 2A)。複数の *NLR* 遺伝子を用いて同解析を試みたが、非常に低い頻度 (一回の実験につき 1~2 個の細胞核) でしかシグナルが得られず、シグナルが得られた細胞核は、いずれも細胞核の形態が保たれていなかった (図 2B)。以上の結果から、*NLR* 遺伝子はプローブによって認識されにくいクロマチン領域にあると結論付け、この手法による解析は中止することとした。

ヒストン修飾と遺伝子発現との関連解析

ヒストン修飾は、ヘテロクロマチンのサイズや形、さらに遺伝子発現に影響を与える¹²。*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株におけるヘテロクロマチンのサイズ変化と遺伝子発現変化は、ヒストン修飾が変化することによって引き起こされている可能性がある。

この可能性を検証するため、植物においてヘテロクロマチンのマーカーとして使用されているヒストン 3 の 9 番目リシンのメチル化 (H3K9me2) に対する抗体を用いた解析を行った。まず成熟葉から抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロッティング解析を行ったところ、有意差は得られなかったものの、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株で H3K9me2 の量が増加する傾向が見られた。また、野生型と変異体とで、細胞核内の標識パターンに違いが見られるかどうかを明らかにするため、成熟葉から抽出した細胞核を

ガラス面に固定し、抗 H3K9me2 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。野生型においては、既報の通り、DAPI で強く染色されるヘテロクロマチンにおいて強い H3K9me2 シグナルが観察された (図 3A、B)。一方、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株では、野生型と同様の標識パターンを示す細胞核に加え、H3K9me2 でラベルされるヘテロクロマチンの形がドーナツ型に変化している細胞核や、ユークロマチンにも H3K9me2 のシグナルが見られる細胞核が多数観察された (図 3C、D)。

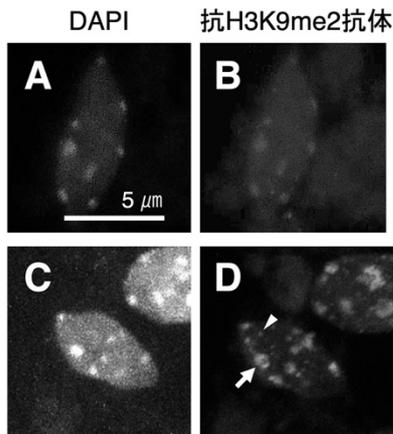


図 3. 抽出した細胞核と抗 H3K9me2 抗体を用いた免疫蛍光染色。
(A、B) 野生型に多く見られる細胞核。抗 H3K9me2 抗体のシグナル (B) は、DAPI で染色されるヘテロクロマチン (A) を標識する。(C、D) *adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株で多く見られる細胞核。ポジティブコントロールとしてセントロメア領域の配列を用いたドーナツ型のシグナル (矢印) や、ユークロマチンでのシグナル (矢頭) が観察される。

考察

本研究では、シロイヌナズナの *adf4* 変異体、*ADF1-4* 発現抑制株において、ヘテロクロマチンサイズが減少し、遺伝子発現が変化するという助成期間前に得られていた結果について、論文としてまとめ報告した⁹。また、シロイヌナズナにおいて細胞核内 AF を可視化する 2 つの系 (Lifeact-GFP-NLS、Chromobody-GFP-NLS) を作成し、*ADF1-4* 発現抑制株において細胞核内 AF の頻度や長さが長くなる傾向にあることを見出した。ヒストン修飾の変化は、ヘテロクロマチン構造や遺伝子発現に影響を与える。ヘテロクロマチンマーカーである H3K9me2 を標識する抗体を用いた解析の結果、*adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株では野生型と比較して細胞核内の標識パターンに変化が見られ、*adf4*・*ADF1-4* 発現抑制株における遺伝子発現変化が、ヒストン修飾パターンの変化と

相関があることが差された。

adf4・*ADF1-4* 発現抑制株における遺伝子発現の変化では、病原体エフェクター認識に関わる *NLR* 遺伝子が多数発現低下を示した。シロイヌナズナ *adf4* 変異体は、うどんこ病菌 *Golovinomyces orontii* に対しては抵抗性の亢進を示すものの⁵、細菌性病原体 (*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 AvrPphB) に対しては罹病性の亢進を示す⁸。またコムギにおいては、*TaADF3* の発現抑制はさび病菌 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* に対して抵抗性の亢進を示すのに対し¹³、*TaADF7* の発現抑制は逆に罹病性の亢進をもたらす¹⁴。異なる *ADF* の欠損が、病原体の種類によって異なる表現型をもたらすのは、*ADF* によって制御される *NLR* 遺伝子が異なるためだと考えられる。

細胞核内 AF を可視化する Lifeact-GFP-NLS ラインを用いた観察において、*ADF1-4* 発現抑制株では DNA 損傷誘導薬剤の処理で細胞核内繊維状構造の形成頻度が上昇する傾向が観察された。現在のところ、薬剤未処理時と処理時、野生型と *ADF1-4* 発現抑制株とで有意な差は得られていないものの、使用薬剤や処理条件を変えて更に解析を進めている。また、形質転換体のライン数を増やす、発現量が低く細胞毒性が低下した Chromobody-GFP-NLS ラインを作成するなどの方法により、植物細胞核内 AF 可視化系を更に展開し、細胞核内繊維状構造が形成される組織の種類、発生時期、形成頻度や長さについて詳細な解析を進める予定である。

ADF や細胞核内 AF が遺伝子発現を制御する仕組みについて、本研究では、ヒストン修飾の変化が関与する可能性を示唆する結果を得た。今後は、抗 H3K9me2 抗体を用いた免疫蛍光染色の結果について更に詳細な解析を進めるとともに、他のヒストン修飾 (植物のヘテロクロマチンマーカーである H3K20me、ユークロマチンマーカーである H3K27me3・H4K20me2 など) についても同様の解析を進める。また、*adf4*・*ADF1-4* 発現抑制株でや野生型と比較して変化が見られたヒストン修飾について ChIP-seq 解析を行い、野生型と *adf4*、*ADF1-4* 発現抑制株におけるヒストン修飾パターンを全ゲノムレベル比較する。

参考文献

- Hurst et al. (2019) *Trend. Cell Biol.* 29, 462-476
- Kandasamy et al. (2010) *Cytoskeleton* 67, 729-743

3. Henty-Ridilla et al. (2013) *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 678-687
 4. Inada (2017) *J. Plant Res.* 130, 227-238
 5. Inada et al. (2016) *Plant Physiol.* 170, 1420-1434
 6. Inada et al. (2021) *J. Plant Res.* 134, 1291-1300
 7. Pok Man Ngou, B. et al. (2022) *Plant Cell* 34, 1447-1478
 8. Porter et al. (2009) *PLOS Pathog.* 8, e1003006
 9. Matsumoto et al. (2023) *Plant Cell Physiol.* 64, 1231-1242
 10. Era et al. (2009) *Plant Cell Physiol.* 50, 1041-1048
 11. Feng et al. (2014) *Mol. Cell* 55, 694-707
 12. Cutter&Hayes (2015) *FEBS Lett.* 589, 2914-2922
 13. Tang et al. (2015) *Front. Plant Sci.* 6, 1214
 14. Fu et al. (2014) *Plant J.* 78, 16-30
1. 松本朋子、檜垣匠、高塚大知、朽名夏磨、尾形義之、馳澤盛一郎、梅田正明、稲田のりこ「シロイヌナズナのサブクラスIアクチン脱重合因子は細胞核内構造と遺伝子発現を制御する」第 64 回日本植物生理学会年会 2023 年 3 月 10 日～17 日（東北大学）
 2. 松本朋子、稲田のりこ「病害応答時の遺伝子発現制御におけるシロイヌナズナアクチン脱重合因子の機能解析」日本植物学会第 87 回大会 2023 年 9 月 4 日～9 日（北海道大学）

誌上発表

1. Matsumoto, T., Higaki, T., Takatsuka, H., Kutsuna, N., Ogata, Y., Hasezawa, S., Umeda, M., and Inada, N. (2023) *Arabidopsis thaliana* subclass I ACTIN DEPOLYMERIZING FACTORS regulate nuclear organization and gene expression. *Plant Cell&Physiology* 64, 1231-1242

研究の発表

口頭発表