

オリオン公募研究（公募研究 a）

- 1) 研究課題名 動的な微小管がロバストな紡錘体を作る機構の解明（生命動秩序研究領域）
- 2) 研究代表者 村田隆（准教授）
基礎生物学研究所、生物進化研究部門

3) 研究概要

細胞骨格はタンパク質が重合した微細な繊維で、細胞内の骨組みとして配置されることにより、細胞の構成要素が細胞内の空間で秩序だった挙動をすることに働く。細胞骨格の特徴はダイナミックな再編成を繰り返すことである。たとえば、細胞が分裂する時には細胞骨格は崩壊し、再編成して遺伝物質や細胞質の分配に働く。この再編成は細胞骨格タンパク質の脱重合、再重合、繊維間の滑り移動により起こっているが、これらの素過程の空間、時間分布の定量的解析は困難な場合が多いため、素過程と細胞骨格全体の再編成の関係は不明な点が多い。主要な細胞骨格の1つである微小管は、極性を持つ中空繊維で、チューブリンタンパク質が重合してできている。本研究では、微小管再編成の素過程について定量解析し、動的な微小管が集まってロバストな構造体がどのようにして作られるのか理解することを目指す。この目的のため、植物の紡錘体における微小管のダイナミクスを測定し、得られた結果をもとにコンピューターシミュレーションを行って紡錘体構築機構の理解を目指す。本年度は、i) 微小管ダイナミクスの測定のためのプラスミド DNA 構築と安定形質転換体の作製、ii) 2光子スピニングディスク顕微鏡の条件設定、iii) コンピューターシミュレーションのための研究打ち合わせ、を行った。

i) プラスミド DNA 構築と安定形質転換体の作製：これまで使用していた微小管マーカーは光退色に弱いこと、複数のマーカーを同時に形質転換すると微小管形成が異常になることなどが明らかになったので、微小管の立体構造を考慮して、蛍光タンパク質を融合させるタンパク質を α チューブリンから β チューブリンに変更し、微小管伸長端マーカー EB1 の蛍光タンパク質融合部位を N 末端から C 末端に変更した。また、TagRFP チューブリンを光退色に強い TagRFP-T に改変するため、プラスミドの突然変異導入を行った。C 末端融合型の EB1-Citrine（改変 YFP）は安定形質転換体が得られた。他はプラスミド DNA 構築中である。

ii) 2光子スピニングディスク顕微鏡の条件設定：微小管伸長端マーカー EB1 の紡錘体中でのトラッキングのため、北大・根本研との共同研究により、2光子スピニングディスク顕微鏡の観察条件設定を行った。使用する波長を 900 nm から 1040 nm に変更する必要が生じたため、1040 nm で励起可能かつ光退色の少ない EB1-Citrine 標識ライン（詳細は上述）を作製した。

iii) コンピューターシミュレーションのための研究打ち合わせ：EMBL の Nedelec 研究室を訪問し、シミュレーションソフト Cytosim の使用について研究打ち合わせを行った。

4) 国際会議発表リスト

T. Murata, “Intracellular organization: organization of microtubules in the absence of a microtubule organizing center” 4th Multidisciplinary Science Forum, Washington D. C. (U.S.A.) February 2014.

5) 招待講演

村田隆 微小管の定量的な動態解析で明らかになった植物細胞分裂の仕組み 日本顕微鏡学会第38回関東支部講演会、東京、2014年3月

村田隆 光退色法によるタンパク質動態の定量的解析 日本植物生理学会第55回年会、富山、2014年3月