

植物の細胞板挿入位置決定機構

2018

在間健悟

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

# 目 次

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 第 1 章 | 序論.....                                    | 3  |
| 第 2 章 | 細胞板挿入位置決定機構の解析のための実験系の開発.....              | 7  |
| 2-1   | 背景と目的.....                                 | 7  |
| 2-2   | 材料と方法.....                                 | 7  |
| 2-3   | 結果.....                                    | 9  |
| 2-4   | 考察.....                                    | 9  |
| 第 3 章 | 遠心により移動した分裂装置の位置復帰の live-cell imaging..... | 15 |
| 3-1   | 背景と目的.....                                 | 15 |
| 3-2   | 材料と方法.....                                 | 15 |
| 3-3   | 結果.....                                    | 16 |
| 3-4   | 考察.....                                    | 16 |
| 第 4 章 | 細胞板挿入位置決定機構における actin 繊維の構築変化の解析.....      | 20 |
| 4-1   | 背景と目的.....                                 | 20 |
| 4-2   | 材料と方法.....                                 | 20 |
| 4-3   | 結果.....                                    | 22 |
| 4-4   | 考察.....                                    | 23 |
| 第 5 章 | GLIM を用いた細胞表層における actin 繊維の構築変化の解析.....    | 30 |
| 5-1   | 背景と目的.....                                 | 30 |
| 5-2   | 材料と方法.....                                 | 30 |
| 5-3   | 結果.....                                    | 31 |
| 5-4   | 考察.....                                    | 32 |
| 第 6 章 | actin 繊維による力の発生を示唆する現象について.....            | 41 |
| 6-1   | 背景と目的.....                                 | 41 |
| 6-2   | 材料と方法.....                                 | 41 |
| 6-3   | 結果.....                                    | 42 |
| 6-4   | 考察.....                                    | 42 |
| 第 7 章 | 総合討論.....                                  | 48 |
|       | 遠心による分裂装置の移動とその復帰の比較法の開発.....              | 48 |
|       | 細胞質分裂装置の位置の矯正/保持における「遂行」の機構.....           | 48 |
|       | 細胞質分裂期の actin 繊維の役割.....                   | 49 |
| 参考文献  | .....                                      | 52 |
| 謝辞    | .....                                      | 56 |

## 第 1 章 序論

陸上植物の体を構成する葉や根等の器官やそれを構成する組織は多種多様な形状や機能をもっているが、これらは各種形状や機能をもった細胞が複雑に組み合わさって構成されている。これら組織の形態形成には、構成するどの細胞が、どのような形に分裂するか、また、分裂した細胞がどの方向に成長するかが大きく関わっている (Sinnott 1960, Lyndon 2012)。個々の細胞の成長様式には拡散成長 (diffuse growth) と先端成長 (tip growth) があり、拡散成長では伸長成長により細長い細胞となるか、肥大成長により丸い細胞となるかによって組織全体の形状も変化する (Mohr and Schopfer 1992)。茎や根等の細長い器官の細胞は細長く、果実や塊茎等の丸い器官の細胞は丸い物が多い。また、葉では複雑な形状を持つ細胞が組み合わさって種に独特な葉の形状を作り上げている。この肥大成長による細胞の形態形成機構には、細胞壁を構成するセルロース微繊維や表層微小管が大きくかかわっており (Green 1962, Shibaoka 1972, Gunning and Hardham 1982, Lloyd and Chan 2008)、微小管によるセルロース微繊維の合成方向の制御が中心的な役割を果たしている。また、組織内のどこの細胞がどの順序で分裂するのか、細胞内のどこがどの方向に分裂するのかが、細胞の配置を左右する。これらにより組織内の細胞の配置が決定される。細胞内の分裂位置には、母細胞が同じ大きさの 2 つの娘細胞に分裂する等分裂と、大きさの異なる細胞に分裂する不等分裂が存在する。また、分裂の方向によっても娘細胞の形は変化する。これらの組み合わせによって、組織内の様々な形態をもった複雑な細胞の並びが形成されている。したがって、分裂面がどのように挿入されるかが組織の形態に大きな影響を及ぼす (Gunning 1982, Mineyuki 1999)。

動物細胞の分裂では、核分裂後に細胞質がくびり切れることで 2 つの娘細胞へと分かたれるが、植物細胞の分裂では、核分裂後に 2 つの娘核の間に細胞板が挿入されることで細胞質分裂が起こる。細胞板は隔膜形成体によって作られる (Gunning and Wick 1985, Smertenko 2018)。ゴルジ体由来の小胞が隔膜形成体に存在する微小管に沿って隔膜形成体中央に運ばれ、融合して細胞板となる。細胞板は微小管によって取り囲まれており、ゴルジ小胞が細胞板縁に付加することによって拡大し、最終的に、親細胞の細胞膜と融合する。本論文では、この点、すなわち細胞板が親細胞の細胞膜のどの位置で融合するのか、という問題を取り上げる。

植物細胞の分裂位置は、分裂期前に微小管からなる分裂準備帯 (preprophase band; PPB) が現れることによってあらかじめ決定されていると考えられている (Mineyuki 1999)。PPB は分裂の方向を大枠で調整している (Schaefer et al. 2017)。そのおおよその分裂位置である cortical division zone (CDZ) において、決定された分裂位置を記憶するしくみは PPB 形成中に成立して PPB 消失後も保たれ、終期に細胞板はその正しい位置へと誘導される (Mineyuki and Gunning 1990, Van Damme et al. 2011)。しかし、PPB の具体的な作用機構や CDZ の記憶機構が成立する条件についてはまだわかっていない。CDZ に傷をつけたり (Gunning and Wick 1985)、光によって PPB を破壊したり (Mineyuki et al. 1991)、

遠心により PPB を異常な位置に形成させたり (Murata and Wada 1991) といった実験操作によって細胞板の拡大方向が異常になることから、細胞板の端の正しい位置への誘導に CDZ が関わっていることが示唆されている。

中期から終期の間、CDZ には他の細胞膜領域とは異なる分子構成が保たれている (Smertenko et al. 2017)。この時期の CDZ には微小管結合タンパク質 TANGLED (Walker et al. 2007, Cleary and Smith 1998) や、Ran GTPase 活性化タンパク質 RanGAP1 (Xu et al. 2008, Yabuuchi et al. 2015)、phragmoplast-orientating kinesins (POKs) (Lipka et al. 2014)、myosin VIII (Wu and Bezanilla 2014) 等が局在する事が報告されている。遺伝学的、薬理的な手段によりこれらのタンパク質を除去したり阻害したりすると細胞板が本来の分裂位置に挿入されないことがあるため、これらの物質は分裂位置の記憶に関わっていると考えられている。また、これらに加えて CDZ から特定の成分が抜け落ちるネガティブマーカーとして、核分裂中に CDZ から actin 繊維がなくなる actin-depleted zone (ADZ) (Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992) や kinesin 様タンパク質 KCA1 が CDZ からなくなる KCA-depleted zone が知られている (Vanstraelen et al. 2006)。さらに、タバコ培養細胞 BY-2 では、細胞表層の ADZ のすぐ外両側にある actin 繊維の帯である twin-peaks も報告されている (Sano et al. 2005)。これらの CDZ に存在する分子や構造が決定された分裂位置のマーカーであるとしても、細胞板が正しい位置に挿入される際、どのようにマーカーが働き、どのような機構を以って細胞板が正しい分裂位置へと到達し、予定された通りの位置での分裂を達成するのかという説明はまだ完全にはなされていない。また、細胞表層の actin 繊維の構築が ADZ のような分裂期に特異的なものから、いつ解消して間期のものに移り変わるのかははっきりとは示されてこなかった。

CDZ に何らかの位置記憶マーカーが存在していると仮定してみても、形成途中の細胞板が正しい分裂予定位置にたどり着くためには、細胞板と CDZ の間を仲介する別の要素が存在しなくてはならない。これまでに、CDZ と拡大中の隔膜形成体の間に actin 繊維 (Goosen-de Roo 1984, Kakimoto and Shibaoka 1987, Hasezawa et al. 1994, Molchan et al. 2002, Lloyd and Traas 1988, Sano et al. 2012) や微小管 (Goosen-de Roo 1984, Lipka et al. 2014) が存在することが報告されている。これらは、細胞板の位置決定とその形を保つのに必須であると考えられている。タマネギの孔辺母細胞では、細胞長軸に対して斜めであった細胞板が両端の細胞壁に平行に転回する。この転回が actin 阻害剤 cytochalasin B で阻害されることが報告されている (Palevitz and Hepler 1974)。この報告は actin 繊維が CDZ への細胞板の誘導に非常に重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、CDZ と actin 繊維の関係はいまだ不明である。ムラサキツユクサの雄蕊の毛の細胞では、細胞質分裂の最後に ADZ 中に actin 繊維の斑点が観察されており、これが隔膜形成体と細胞板の拡大方向を CDS へと誘導するための接続の一部が見えたものではないかとも考えられている (Valster and Hepler 1997)。しかし、通常の細胞では拡大中の隔膜形成体が CDZ に非常に近接しているため、隔膜形成体内の繊維と CDZ 周辺の細胞質中の繊維を区別できず、そ



の詳細な観察が困難である。そのため、これらの繊維がどのように CDZ と隔膜形成体を繋いでいるかは未解決のままである。

前述のように、遺伝的、薬理学的手法による位置記憶マーカーの正確な機能の調査が行われてきた。しかし、それらの実験下で確認された細胞板の位置異常は多くて 30%程であり、多くの細胞で細胞板は正しい位置で形成されていた (Vanstraelen et al. 2006, Sano et al. 2005, Kojo et al. 2013, 2014, Molchan et al. 2002, Wu and Bezanilla 2014, Walker et al. 2007, Cleary and Smith 1998, Lipka et al. 2014)。これらの結果は、材料とした細胞が通常等分裂をする細胞であり、紡錘体や隔膜形成体といった分裂装置は、通常は母細胞の中央に位置したままであることから、細胞板の精密な挿入位置決定のための機構が異常な状態であっても、位置の異常自身は別途に偶発的に起こるものであり、結果的に正しい分裂面近辺、CDZ の範囲内で分裂が起きることを反映していると考えられる。この偶発的な位置の異常の発生確率が明らかでないため、上記のような手法を用いて細胞板挿入位置の決定に対するマーカー物質の実際の寄与を定量化することは困難かつ非常に効率が悪いと考えられ、実際に行われたことはなかった。

本研究では、上述した様な CDZ 周辺の繊維の混雑による観察の困難さと各攪乱の効果の定量化の難しさといったこれらの問題を一举に解決するため、分裂期の細胞を遠心することで分裂装置を正しい位置から移動させ、その復帰と細胞板形成を追跡観察する実験系の構築を試みた。かつて Ôta (1961)は、ムラサキツユクサの雄蕊の毛の細胞を様々な時期に遠心することで分裂位置がどう変化するかを報告している。その中で、中期に遠心すると移動した紡錘体が、後期から終期の間本来の位置へと復帰することを報告している。このことから、遠心によって将来の分裂位置の記憶が乱されることはないと考えた。そして、分裂位置の記憶を保ったまま分裂装置を移動させることで、記憶された分裂予定位置と分裂装置の間に関連性を調べる系を構築できると仮定し実験を行った。

本論文では序論に続く第 2 章で、タバコ培養細胞 BY-2 を材料とした遠心を用いた実験系の確立について述べる。第 3 章では、live-cell imaging により細胞板形成中の分裂装置の運動に関して述べる。第 4 章では、同条件で actin 繊維の構築の変化を観察した。第 5 章では、遠心した BY-2 細胞の細胞質分裂中の actin 繊維の構築を調べるため、一般的な共焦点レーザー顕微鏡に加えて、局所・大局ライブイメージング顕微鏡 (global-local live imaging microscope; GLIM) システム (Tamaoki and Mineyuki 2012) を用いた。GLIM は高倍率での局地的な分子や構造の変化の観察 (局所) と低倍率での細胞全体の状態の確認が同時に可能な顕微鏡である。これらの技術を組み合わせることで、細胞質分裂中の CDZ の actin 繊維の構築を詳細に観察することができた。第 6 章では、本研究を通じて観察された細胞板誘導に伴う力の発生を示唆する観察を取り上げて記述した。これらの実験のために、既に確立された効率の良い同調培養法 (Nagata et al. 1982, Kakimoto and Shibaoka 1988) を用いて、分裂装置が移動した細胞質分裂期の細胞を大量に得た。さらに、live-cell imaging を効率よく行うため、遺伝子導入により微小管や actin 繊維を蛍光タンパク質で可視化した

BY-2 変異細胞の系を用いた。

## 第2章 細胞板挿入位置決定機構の解析のための実験系の開発

### 2-1 背景と目的

Ôta (1961)は、ムラサキツユクサの雄蕊の毛の細胞を中期に遠心することで紡錘体を移動させ、分裂装置が本来の位置へと復帰することを報告している。この章ではこれに倣った手法にタバコ培養細胞 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) を用いることができることを確かめるための実験を行った。この BY-2 細胞は、分裂期の細胞を大量に得ることができる同調培養法が確立されている (Nagata et al. 1982, Kakimoto and Shibaoka 1988)。大量に得た分裂期の細胞を遠心し、その遠心直後の細胞と、遠心後に培養した細胞を多数観察することで、細胞板挿入位置決定機構の働きを定量的に解析した。

### 2-2 材料と方法

#### 細胞

タバコ培養細胞 BY-2 はムラシゲ・スクーグ液体培地 (Murashige and Skoog et al. 1962) を 7 日ごとに 95 ml の培地に対し、1 ml ずつ植え継いだ。細胞懸濁液は巡回振盪培養機で 27°C、100 rpm、暗条件で培養した。

また、yellow fluorescent protein (YFP)- $\beta$ -tubulin、Lifeact-mCherry、histone H2B-tdCFP (tandem dimer cyan fluorescent protein) を発現したタバコ培養細胞の遺伝導入株 BY-YTHCLR2 (Yasuhara et al. 2014) は、関西大学 安原裕紀博士より提供いただいた。継代培養の際は上記とほぼ同様だが、植え継ぎ容量は 2 ml とした。

#### 同調培養

##### 一段階同調

Nagata et al. (1982) が記述した手法に倣い、7 日目の細胞 15 ml を新培地 95 ml に移植し、aphidicolin (5 mg/ml stock in dimethyl sulfoxide (DMSO), Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を最終濃度 2.7  $\mu$ g/ml で加えた。24 時間後に 3%(w/v) sucrose 水溶液 100 ml に移し、3 分間断続的に空気を送り込む洗浄法を sucrose 水溶液を入れ替えて 5 回行い、新培地に移した。aphidicolin 洗浄後 7.5~8 時間のものを実験に用いた。その時の分裂期率は約 60% だった。

##### 二段階同調

Kakimoto and Shibaoka (1988) に倣い、まず一段階同調と同様に 7 日目の細胞に対して aphidicolin 処理を 24 時間行い、aphidicolin 除去後 4 時間目に propyzamide (6 mM stock in DMSO, Wako Pure Chemical Industries Ltd.) を終濃度 4.8  $\mu$ M になるように加え、そこから 5 時間後に一段階と同様に 3%(w/v) sucrose 水溶液で洗った。実験には細胞分裂中期の細胞が最も多くなる propyzamide 洗浄後 30 分のものを用いた。この時の分裂期率は約 90% だった。

## 細胞整列処理

BY-2 細胞は細長い形状をしている。そのため、細胞長軸に平行な遠心をかけることで分裂装置を一方向に移動させられると考えた。そこで、遠心前に細胞の配向をそろえるために細胞整列処理を行った。0.25%(w/v) の polyethyleneimine を塗布したカバーグラスを、すべり台型の装置 (図 2-1A) 下部に設置し、細胞懸濁液と新培地を 1 ml ずつ交互に 2 回流し、貼り付けた。整列処理を行わないものについては、polyethyleneimine を塗布したカバーグラス上に細胞懸濁液を乗せ、3 分後に 1 ml の新培地で 2 回洗った。

細胞整列処理の効果を確かめるため、カバーグラス上の各細胞について、細胞長軸と短軸の差が 2 倍以上の長さをもつ細胞の長軸を遠心方向に対して基部側からおよそ 4 分割した (図 2-1D)。“区分 3 “の遠心方向に対する角度 ( $\theta$ ) を「細胞の角度」と定義して定量し、これをヒストグラムで表した (図 2-2)。

## 遠心処理

培地を満した遠心管に細胞の貼りついたカバーグラスを、上下を保ったまま専用の台を使って立てかけ (図 2-1B)、遠心した。遠心機は Hitachi himac CR 5B2 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) を使用し、27°C で 1600×g、3 分間遠心した。貼りつけ開始から遠心完了までで 10 分程度かかった。

## 遠心後培養

遠心後、分裂装置が移動した細胞のその後の反応を見るために、カバーグラスを培地で満した 6-well 細胞培養用マルチウェルプレート (Corning Inc., New York, New York, USA) に入れて 27°C、100 rpm、暗条件の旋回振盪培養機で 1 時間培養した。

## 顕微鏡観察

同一細胞の遠心直後と 1 時間培養後の像を得るため、経時観察のために作成したアクリルチャンバーを使用した (図 2-1C-d)。中央に 500~1000  $\mu$ l 容量のプールをもっており、ここに培地を満し、細胞が貼りついたカバーグラスを両面テープ (Scotch 665, 3M, Maplewood, Minnesota, USA) で固定して観察を行った。このチャンバーを使用することによって、細胞の乾燥と酸欠を防ぐことができ、細胞周期の進行が旋回培養時と同様に見られた。

観察には、蛍光顕微鏡 BX60、BX50 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan)、または共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)、TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いた。

画像解析には Fiji ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) を用いた。

## 分裂装置の位置の判定

遠心後、培養後の分裂装置の位置を評価するため、細胞長軸を 3 分割した中央の区域に紡錘体および細胞板の中心が入っているものを“分裂装置が中央にある”と定義して定量した (図 2-1E)。

## 2-3 結果

遠心による分裂装置の移動を効率化するため、細胞整列処理を行った (図 2-2)。まず、整列処理せずにカバーグラスに乗せた細胞は様々な方向に貼り付いていた (図 2-2A)。一方、細胞整列処理によってカバーグラス上に張り付けられた細胞はある程度配向が揃っているようにみえた。この配向の差を定量的に評価する為、「2-2 材料と方法」に示した方法で定めた細胞の角度 $\theta$ を各カバーグラス上の細胞について計測した。その結果、整列処理を行っていない細胞では細胞の角度の分布がランダムに分散していた (図 2-2A) のに対して、整列処理を行った細胞では $0^\circ$ に近い角度の細胞がある程度増加し、グラフは山型になっていた (図 2-2C)。これは、ランダムに配向していた細胞が整列処理によってある程度縦方向に揃えられたことを意味する。また、整列処理せずに細胞を貼り付けたカバーグラスを遠心しても細胞の配向はランダム (図 2-2B) であり、整列処理したものを遠心した場合もその前後で配向の傾向に変化はみられなかった (図 2-2D)。つまり、カバーグラスに貼り付いた細胞の角度は、遠心によってその分布を変えないことがわかった。

遠心による分裂装置の移動の影響とそれに対する細胞の反応を確かめる実験を行った。aphidicolin 処理のみを行う一段階同調と、aphidicolin と propyzamide 処理を行う二段階同調により細胞をそれぞれ調製し、整列処理ののち遠心した。また、一部のサンプルは遠心後のカバーグラスを培地を入れた容器に入れて 1 時間振盪培養した。その結果得られた遠心直後の紡錘体と 1 時間培養後の細胞板の位置を比較した (図 2-3)。一段階同調では、遠心直後、82%の細胞で紡錘体が細胞中央から移動していたが、1 時間培養後の細胞板は 70%の細胞で中央にあった (図 2-3A, C)。計算上、遠心により移動した分裂装置の 60%以上が細胞中央に戻ったことになる。このことは、BY-2 細胞において細胞板挿入位置の記憶機構が機能し、これが遠心では阻害されないこと、さらにはタバコ培養細胞でも人為的に移動させた分裂装置を記憶された CDZ 近傍まで移動する機構が保持されていることを意味する。一方、propyzamide 処理を行う二段階同調の細胞では、遠心直後、89%の細胞で紡錘体が移動しており、1 時間培養後は 86%の細胞板が移動後の位置で形成されていた (図 2-3B, C)。つまり、分裂装置の細胞中央への復帰は起こっていなかった。したがって、二段階同調は高い同調率が得られるものの本研究の分裂装置の復帰の観察という目的にはそぐわないため、以降の解析では微小管への攪乱を行わない一段階同調を用いて分裂期の細胞を準備した。

ではなぜ、二段階同調では復帰が起こらなかったのか。二段階同調を行っている間は、PPB の微小管が消失していた (図 2-4)。これらのことから、微小管重合阻害剤である propyzamide 処理による PPB の消失が、遠心により移動した分裂装置が細胞中央へと復帰しない原因になっていたのではないかと考えられる。

## 2-4 考察

異なる 2 つの同調法における細胞板挿入位置決定機構のはたらきを確かめるため、2 つの同調法で用意した細胞それぞれを遠心してその後の細胞板の形成位置の変化を比較した。

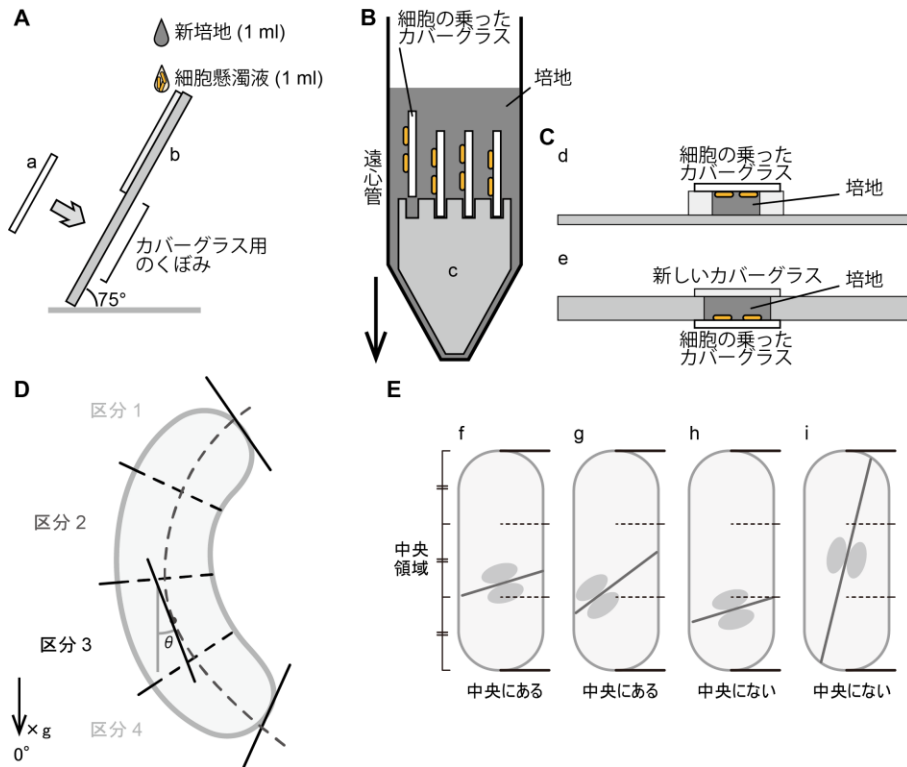
aphidicolin のみを用いた一段階同調で調製した BY-2 細胞では、移動した分裂装置の細胞中央への効率的な復帰が観察できた (図 2-3A、C)。しかし、propyzamide を用いた二段階同調の細胞では、分裂装置の復帰が起こらないことが観察された (図 2-3B、C)。Vanstraelen et al. (2006)でも報告されているように、propyzamide 処理された細胞では前期前に形成されるはずの PPB が形成されない (図 2-4)。PPB が形成されない場合でも、propyzamide を洗い落としてしまえば分裂周期は正常に進行するが、PPB は植物の細胞分裂位置、つまり細胞板の挿入位置 CDS をあらかじめ決定している構造であるため (Mineyuki 1999、Schaefer et al. 2017)、PPB の微小管が形成されなかったことで、決定した分裂位置の記憶への移行、もしくは位置決定そのものが起こらず、その結果、分裂装置の復帰が起こらなかったと考えられる。

この方法によって、本来の分裂位置から分裂装置が移動した分裂期の細胞を多量に観察できるようになった。この方法を用いることで、今後、分裂予定位置の「決定」や「記憶」に関する物質や構造の遺伝的、薬理的阻害の効果を定量化できると考えている。

この実験系では準備段階として、遠心によって分裂装置を効率よく移動させるために細胞整列処理を行った (図 2-2) が、その効果は期待よりは限定的であった。また、すでにカバーグラスに貼り付いた細胞が、整列処理をせずとも遠心によって整列する、または遠心により整列状態が崩れる可能性が考えられたが、図 2-2B、D のデータはこれを否定している。この処理を行うことで、主目的である整列効果に加えて、カバーグラスへの細胞の貼り付け処理の時間短縮と、カバーグラス上に細胞を均一に並べる効果もあると考えている。

図

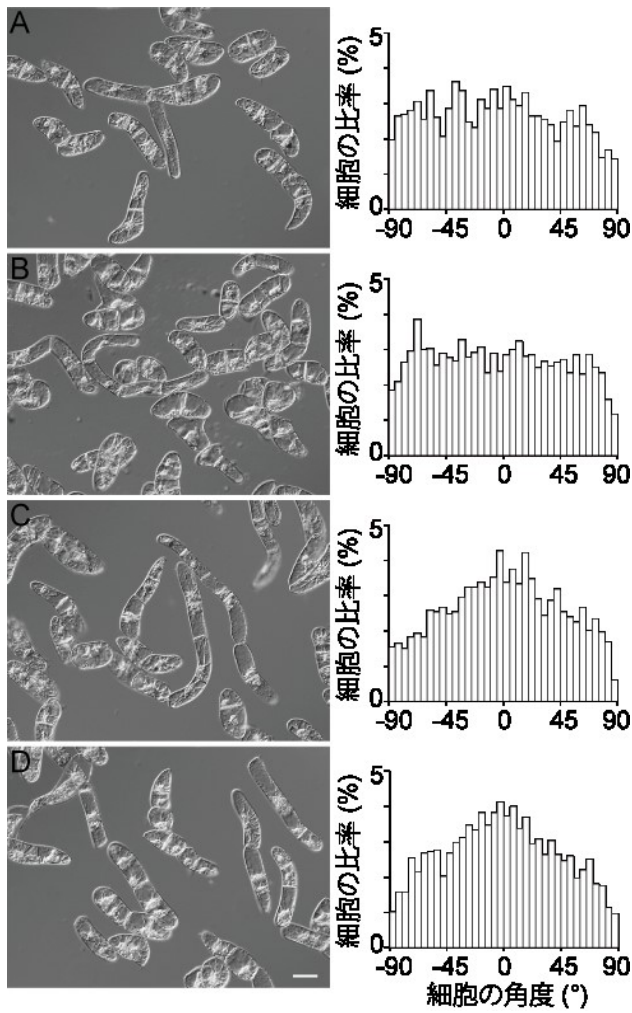
図 2-1



実験に用いた装置と細胞の角度の基準

(A) 細胞整列装置。polyethyleneimine を塗布したカバーガラス (a) を水平に対して 75° に固定したアクリルとカバーガラスで作成した滑り台状の装置 (b) の下部に設置した。細胞懸濁液 1 ml と新培地 1 ml を上から交互に流した。(B) 核分裂装置を移動させるための遠心に用いる装置。細胞の貼り付いたカバーガラスをアクリル製の台 (c) に乗せ、遠心管を培地で満たして遠心した。矢印は遠心力の方向。(C) 観察用チャンバー。遠心後、カバーガラスをアクリルで出来たチャンバーに設置して観察した。正立顕微鏡用 (d) と倒立顕微鏡用 (e)。(D) 細胞方向の判定基準。細胞長軸を 4 分割し、長軸の区分 3 の中点の接線と垂線のなす角度  $\theta$  を細胞の配向角度とした。(E) 分裂装置が細胞中央にあるかどうかの判定基準。細胞長軸を 3 分割した中央の領域に分裂装置が入っているかどうかを判定する。図では一例として、2 つの灰色の楕円で娘核を、その間の黒線分で細胞板を表してあり、これを一塊の分裂装置とみる。核膜再形成前の染色体や、紡錘体も同様に判断する。この分裂装置の像の面積の半分が中央の領域に入っていれば分裂装置が中央にある (f, g) と判断し、入っていないものを分裂装置が中央にない (h) とした。ただし、細胞板が両細胞端に跨るほど傾いたものは異常な配置であり、中央にない (i) と判断した。

図 2-2

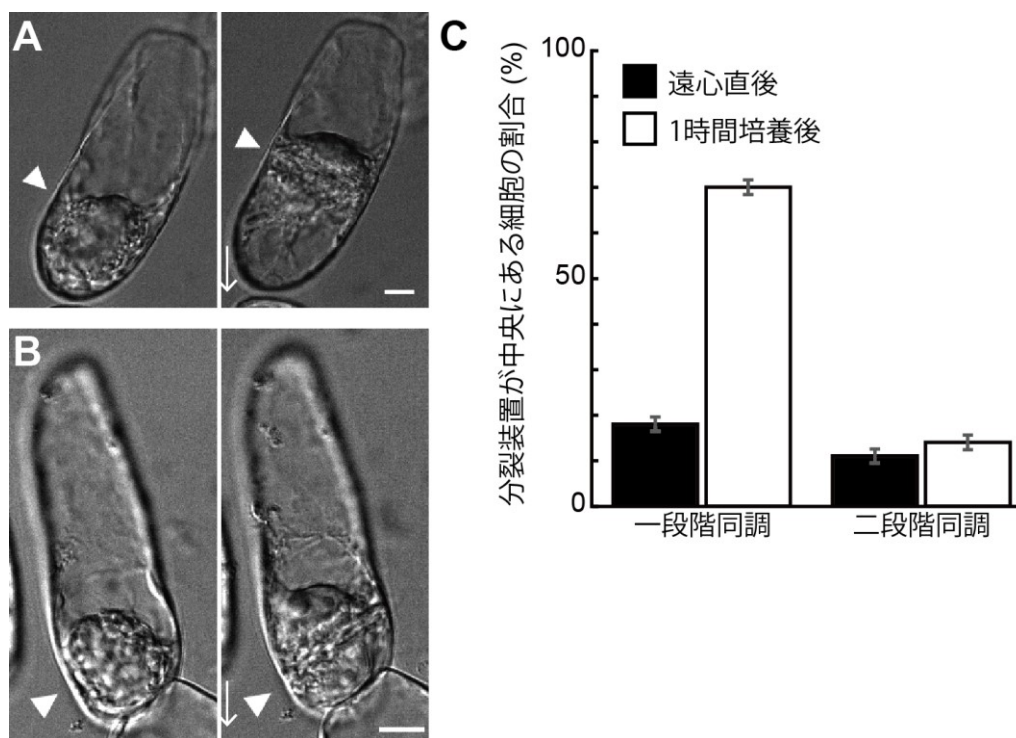


### 遠心方向に対する BY-2 の細胞の角度の分布

(A) 整列処理も遠心も行っていない細胞とその角度分布、(B) 整列処理をせずに遠心した細胞とその角度分布 (C) 整列処理をして遠心しなかった細胞とその角度分布 (D) 整列処理をして遠心した細胞とその角度分布。それぞれ左が位相差顕微鏡像、右が細胞の角度 $\theta$  (図 2-1D を参照) の細胞全体に占める比率の 5° 毎のヒストグラム。横軸は細胞の角度 $\theta$ の分布 (-90~90°)、縦軸は 5° 区切りの角度を持つ細胞の比率 (%)。各グラフとも実験セット 3 回で 2000 個以上 (2132~4706 個) の細胞を計測した平均。Scale bar=10  $\mu$ m。



図 2-3

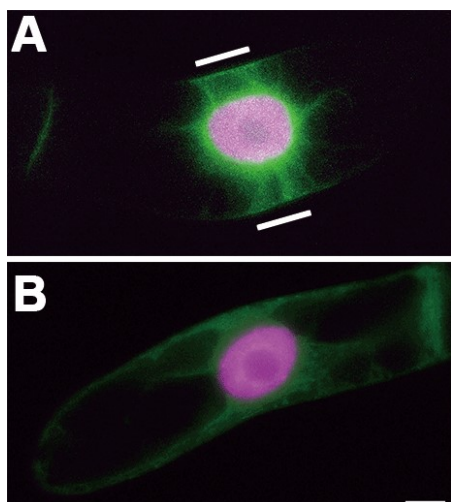


#### 同調培養法による分裂装置復帰率の比較

遠心した細胞を培養観察用のチャンバーに設置し、遠心直後と1時間培養後に観察した。

(A、B) 遠心直後(左)と1時間培養後(右)の共焦点顕微鏡画像。矢印は遠心方向。矢尻は紡錘体もしくは細胞板の中央。Scale bar=10 μm。(A) 一段階同調した細胞。(B) 二段階同調した細胞。(C) 2つの同調培養法それぞれにおける紡錘体及び細胞板の位置の比率。黒いカラムは遠心直後、白いカラムは1時間培養後の分裂装置が細胞中央にある割合をそれぞれ表す。エラーバーは平均値の標準誤差(n=4~6)。遠心直後と1時間培養後の間のt検定によるP値は、一段階同調は $2.4 \times 10^{-9}$ で有意差あり、二段階同調は0.32で有意差なしだった。

図 2-4



#### BY-YTHCLR2 の PPB の微小管に対する二段階同調の影響

BY-YTHCLR2 を一段階同調(A)と二段階同調(B)し、微小管と核の位置を YFP-β-tubulin (緑) と histone H2B-tdCFP (マゼンタ) でそれぞれ可視化した。(A) aphidicolin 除去後 6 時間、G<sub>2</sub>期の細胞。細胞分裂開始直前。(B) propyzamide 除去後 2 時間、G<sub>2</sub>期相当の細胞。核小体とクロマチンの状態から、A と同様の時期の細胞と考えられる。(A) では PPB が見えている(太い線)が、(B) には見えていない。Scale bar=10 μm。

## 第3章 遠心により移動した分裂装置の位置復帰の live-cell imaging

### 3-1 背景と目的

前章での、一段階同調の細胞では遠心により移動した分裂装置の位置が培養後には復帰しているという結果を受けて、遠心後の培養中の BY-2 細胞内の状態を継時観察することで、分裂装置がどのように復帰するのかを調べた。タマネギの孔辺母細胞において、斜めであった細胞板が両端の細胞壁に平行になり、最終的に PPB があった位置に融合するための転回が起こることが知られているが、この転回は actin 阻害剤で阻害されることが報告されている (Palevitz and Hepler 1974)。このことから、CDZ への細胞板の誘導には actin 繊維が重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、具体的にどのような actin 繊維関連構造がこの過程に関わるのか、より具体的にこの誘導の過程で分裂装置がどのように動くのか等は詳しく記述されていない。そこで、actin 結合タンパク質 fimbrin の GFP 融合タンパク質で actin 繊維を可視化した BY-2 細胞 (Sano et al. 2005) を用いた live-cell imaging を行った。actin 繊維の動態については次章以降で詳しく解析するが、まずこの章では、前章の分裂装置の位置の細胞中央への復帰の際に、どのような細胞内の運動が起こるのかを主に分裂装置の動態に注目し、actin 繊維の蛍光を分裂装置を標識として用いて観察した。

### 3-2 材料と方法

#### 細胞

GFP-fimbrin を安定発現したタバコ培養細胞の遺伝導入株 BY-GF11 (Sano et al. 2005) を東京大学 馳澤盛一郎教授より提供いただいて用いた。継代培養の際は、第2章の通常細胞と同様に培養した。

#### 同調培養

##### 一段階同調

第2章と同様に、Nagata et al. (1982) が記述した手法に従って、一段階同調を行い、aphidicolin 洗浄後 8~8.5 時間のものを実験に用いた。

#### 細胞整列処理

遠心による分裂装置の移動を効率的に行うため、第2章と同様に細胞整列処理を行った。

#### 遠心処理

第2章と同様に、細胞の貼り付いたカバーグラスを遠心した。

#### FM4-64 染色

拡大中の細胞板を可視化するため、過去の報告 (Higaki et al. 2008) に倣い、親油性色素 N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide (FM 4-64, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を用いて染色を行った。終濃度 16  $\mu\text{M}$  で培地に溶かし、遠心後の細胞が貼りついたカバーグラスに乗せて 3 分処理し、新しい培地で 2 回洗った。FM 4-64 はエンドサイトーシスによって取り込まれ、時間経過で細胞内の異なる膜を染色していく性質をもち、染色直後から数時間可視

化できるため、1~2時間程度で終了する細胞質分裂の観察中に現れる細胞板の観察に利用できた。

### 顕微鏡観察

経時観察のために、第2章と同じアクリルチャンバーを用いて観察を行った。観察には、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss Inc.) を用い、GFP-fimbrin を 488 nm、FM4-64 を 545nm の励起光を 4~10%、50~100%の出力でそれぞれ用いて観察した。

以下どの場合も、貼りつけ開始から遠心・染色を経て、観察に適した細胞を発見し、撮影を開始するまでおおよそ 30 分程度かかった。観察開始時の細胞周期は分裂中期後半~後期だった。

画像解析には Fiji ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) を用いた。

### 3-3 結果

遠心により細胞端に移動した分裂装置が元の位置に復帰する過程を live-cell imaging で観察するため、BY-GF11 を一段階同調した。Sano et al. (2005)が示したところによると、BY-GF11 では、GFP で標識された構造と rhodamine-phalloidin で染色された構造の位置がほぼ一致しており、cytochalasin 処理によって同様に消失することが確認されている。このことから、BY-GF11 において GFP-fimbrin は actin 繊維のほとんどを示していると考えられる。図 3-1 に示す通り、遠心直後は分裂装置は移動後の位置にある (図 3-1A, 00:00:00~00:22:30) が、後期終了後からは動き始めた (図 3-1A, 00:27:30~01:26:00、図 3-1C、D の矢印)。この時の分裂装置が細胞端から細胞中央へと向かう速度は 0.35  $\mu\text{m}/\text{分}$  だった。この移動の直前、分裂装置中央の FM 4-64 の蛍光が強くなり (図 3-1A, 00:27:30)、細胞板形成開始を示していた。細長い FM 4-64 の蛍光で示された拡大中の円盤状の細胞板は細胞の中央の位置まで動いていた (図 3-1A, 00:27:30 及び 00:43:00)。

本実験で観察した細胞の中には、本来の位置へと復帰できない分裂装置を持つ細胞も観察された。live-cell imaging で観察した細胞の 45%では、分裂装置が全く動かなかった (図 3-2A)。また、49%は不完全な復帰移動が起こる細胞だった。その例は図 3-2B で、細胞板の向きが細胞赤道面に対して平行に近い角度から転回して斜めになり、片側だけが CDZ へと近づいていた。図 3-1 のようにほぼ完全に細胞板位置が復帰する細胞は 6%だった。これは第2章の比較観察と比べると極端に少ない。

### 3-4 考察

分裂装置が元の位置に復帰する過程を actin 繊維を可視化できる GFP-fimbrin 融合タンパク質発現株と FM4-64 染色を用いて live-cell imaging で観察した。観察は培地を満たしたチャンバーで行った。チャンバーを用いることにより、長時間の観察における乾燥を防ぐことができ、また、この液量で 1~2 時間の観察中における酸欠による分裂過程の阻害を除くことができたと考えられる。実際、細胞周期の進行は振盪培養時と同様だった。

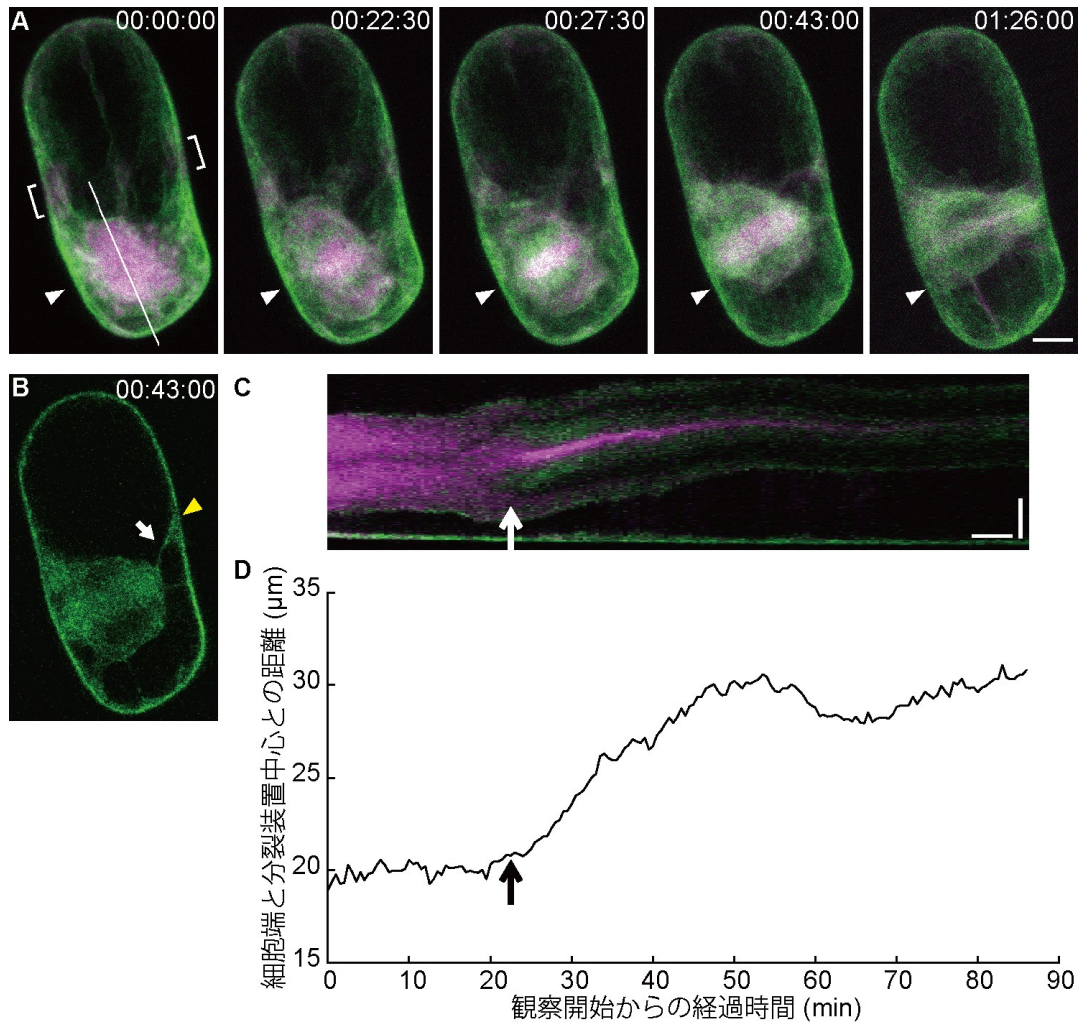
遠心によって細胞端に移動した分裂装置は分裂過程の進行と共に細胞中央へと移動した。FM4-64 による染色は、当初は分散しているが、途中から集積して線状の蛍光を示すようになった (図 3-1C の矢印)。このことは、赤道面に集積したゴルジ小胞が融合して細胞板を形成し始めたことを示している。また、分裂装置の細胞中央への移動の開始はこの時期とほぼ一致していた。このことは、細胞板形成開始時に細胞板と CDZ との連絡が完成する、あるいは CDZ への細胞板の誘導が開始されることを示唆している。このような知見は、遠心を用いた本研究の実験系で初めて得られたものであり、細胞板形成と細胞板挿入位置への誘導が細胞質分裂期初期に開始されることが示された。

CDZ と細胞板の間の連絡には、actin 繊維が重要な役割を果たしていると考えられる。図 3-1B に見られるように、細胞中央へ移動中の細胞板には CDZ と連絡する actin 繊維が観察された。actin 繊維の詳細な動態については、第 4 章で述べる。

live-cell imaging においては、本来の位置へと復帰できない分裂装置をもつ細胞が観察されたが、このような細胞の発生率は第 2 章の比較観察よりも高くなっていた。この不一致は live-cell imaging 中の何らかの不具合、特に蛍光観察のためのレーザーによる光傷害が原因なのではないかと考えている。

図

図 3-1

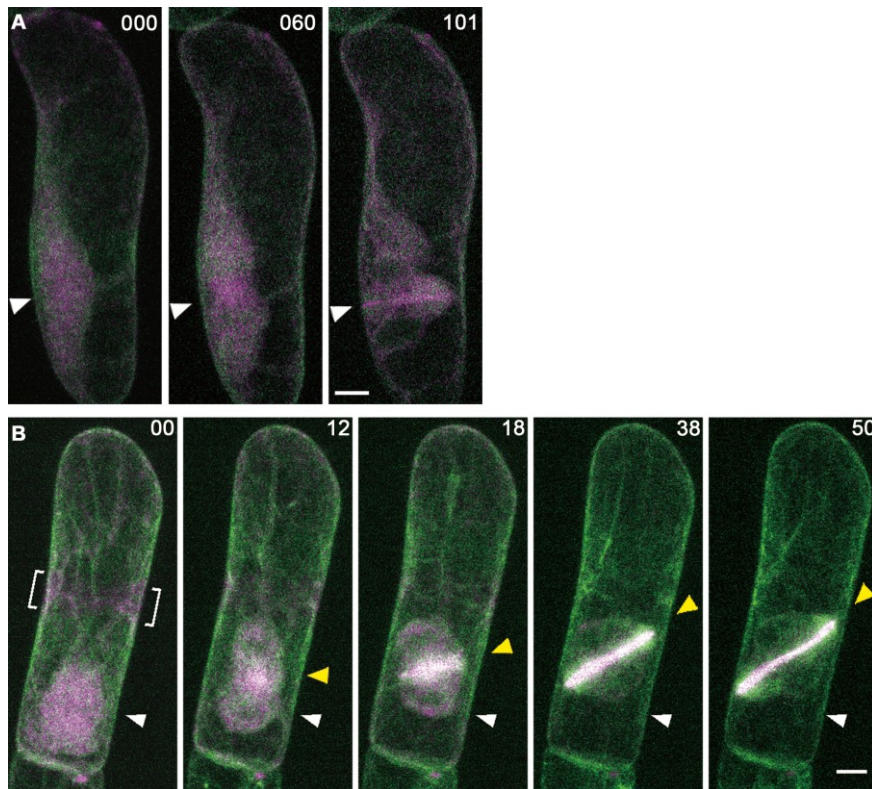


#### 遠心した細胞の分裂装置の復帰移動

一段階同調後に遠心した分裂期の BY-GF11 細胞を FM 4-64 で染色し、培養観察用チャンバーに乗せて顕微鏡で観察した。(A) 遠心により分裂装置が下方へ移動した細胞の GFP-fimbrin と FM 4-64 の蛍光の time-lapse 像。緑は GFP-fimbrin の蛍光を、マゼンタは FM 4-64 の蛍光像をそれぞれ示す。それぞれの画像は  $20.9 \mu\text{m}$  の幅で取得した光学切片 10 枚を z 軸方向に投影圧縮している。右上の数字は観察開始からの時間(時:分:秒)。00:00:00 = 細胞分裂中期、00:22:30 = 後期、00:27:30 = FM 4-64 蛍光が細胞板の形に凝集、01:26:00 = 細胞質分裂の終了。角括弧は ADZ の位置。白矢尻は 00:00:00 時点の紡錘体の中心。Scale bar =  $10 \mu\text{m}$ 。(B) A の 00:43:00 の光学切片画像 1 枚の GFP-fimbrin 蛍光。矢印は CDZ と隔膜形成体を繋ぐ actin cable。黄色矢尻は CDZ への actin 繊維の堆積。(C) A の線上での GFP-fimbrin (緑) と FM4-64 (マゼンタ) シグナルのキモグラフ。Scale bar : 縦 =  $10 \mu\text{m}$ 、横 = 5 分。(D) 線に沿った細胞下端と分裂装置の距離の変化のグラフ。C と D の矢印は分裂後期の染色体移動の終わり (00:22:30)。



図 3-2



**細胞質分裂装置が完全には CDZ のある領域に復帰しない細胞の細胞板挿入**

遠心により核分裂装置が移動した BY-GF11 細胞の内、分裂装置が CDZ に完全には復帰しない細胞の例。緑は GFP-fimbrin の、マゼンタは FM4-64 の蛍光をそれぞれ示す。右上の数字は観察開始からの時間 (分)。(A) 遠心後分裂装置が遠心により移動した先から動かず、細胞板がその場で形成された BY-GF11 細胞。ただし、細胞板は細胞長軸に垂直に配向。それぞれの画像は 33.2  $\mu\text{m}$  の幅で取得した光学切片 18 枚を z 軸方向に圧縮投影している。矢尻は 0 分の紡錘体の位置。000 (分) = 細胞分裂中期、060 = 後期、101 = 細胞板拡大期。

(B) 分裂装置がわずかに動くものの CDZ には届かない BY-GF11 細胞。この細胞では、細胞板は細胞長軸と垂直ではなく斜めに挿入される。それぞれの画像は 25.5  $\mu\text{m}$  の幅で取得した光学切片 18 枚を z 軸方向に圧縮投影している。角括弧は ADZ の位置。白矢印は 0 分の紡錘体位置。黄色矢尻は細胞板の中央。00 (分) = 中期、12~50 = 後期。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

## 第 4 章 細胞板挿入位置決定機構における actin 繊維の構築変化の解析

### 4-1 背景と目的

タマネギの孔辺母細胞では、拡大中細胞長軸に対して斜めであった細胞板が細胞長軸に平行になるように転回する。この転回が actin 阻害剤 cytochalasin B で阻害されることが報告されている (Palevitz and Hepler 1974)。この報告は actin 繊維が CDZ への細胞板の誘導に非常に重要な役割を果たしていることを示唆している。また、CDZ と拡大中の隔膜形成体の間に actin 繊維の存在が報告されており (Goosen-de Roo 1984, Kakimoto and Shibaoka 1987, Hasezawa et al. 1994, Molchan et al. 2002, Lloyd and Traas 1988, Sano et al. 2012)、actin 繊維は細胞板の位置決定に重要だとされている。分裂期の細胞表層では CDZ から actin 繊維がなくなるネガティブマーカーである ADZ (Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992) や、そのすぐ外側にある twin-peaks (Sano et al. 2005) が報告されている。このように、細胞板形成における actin の重要性は明らかにされているものの、その詳細な構築や分子機構は不明な点が多い。特に、actin 繊維が細胞板の位置決定に関わるのであれば、ADZ の存在によって actin 繊維が相対的に少ない CDZ においてどのように actin 繊維が働いているかに興味もたれる。これまでに actin 繊維の構築に関する報告は多数あるが、通常の細胞では密に actin 繊維の集積する拡大中の隔膜形成体が CDZ の近くに存在し、CDZ や CDZ と分裂装置の間の actin 繊維の詳細な観察は困難だった。

前章では、分裂装置の動態に注目して観察を行ったが、次にこの章では、上記の視点から、actin 繊維を可視化した BY-2 細胞を用いて、細胞質分裂中の細胞表層及び細胞質中の actin 繊維の構築の変化に着目した live-cell imaging 観察を行った。遠心により分裂装置が細胞中央から移動した細胞では細胞板と CDZ との間に空間が出来るため、CDZ 周辺で起こる現象と分裂装置周辺で起こる現象を個別に観察できるようになった。

### 4-2 材料と方法

#### 細胞

第 2 章同様に遺伝子導入されていない BY-2 細胞と、第 3 章同様に GFP-fimbrin を発現したタバコ培養細胞 BY-GF11 株を用いた。また、GFP-tubulin を安定発現したタバコ培養細胞の遺伝導入株 BY-GT16 (Kumagai et al. 2001) を東京大学 馳澤盛一郎教授より提供いただき用いた。継代培養の際は、第 2、3 章の通常細胞と同様に培養した。

#### 同調培養

##### 一段階同調

第 2、3 章と同様に、Nagata et al. (1982) が記述した手法に従って、一段階同調を行い、aphidicolin 洗浄後 8~8.5 時間のものを実験に用いた。

#### 遠心処理

第 2、3 章と同様に、整列処理を行った後、細胞の貼り付いたカバーガラスを遠心した。



### 遠心後培養時の latrunculin B 処理と分裂装置の位置の判定

第2章と同じく、遠心後の細胞の貼りついたカバーガラスを、培地で満たした 6-well 細胞培養用マルチウェルプレートに入れて 27°C、100 rpm、暗条件の巡回振盪培養機で 1 時間培養した。このとき終濃度 5  $\mu$ M の latrunculin B (LB、Wako Pure Chemical Industries Ltd.) と対照として 0.1% の DMSO をそれぞれ投入して 1 時間培養した。

第2章と同じく、遠心後、培養後の細胞において、細胞長軸を 3 分割した中央の区域に紡錘体および細胞板の中心が入っているものを“分裂装置が中央にある”と定義して定量した。

### FM4-64 染色

拡大中の細胞板を可視化するため、第3章と同様に FM 4-64 を用いて染色を行った。

### 免疫染色

分裂期の細胞の微小管の分布を明らかにするため、遺伝子導入されていない BY-2 細胞を免疫染色した。蛍光タンパク質発現細胞では、tubulin ダイマーも蛍光を発するため、微小管だけを正確に特定できないからである。

遠心 30 分後の細胞の貼りついたカバーガラスを酵素溶液 [0.1%(w/v) Cellulase Onozuka RS, (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), 0.02%(w/v) Pectolyase Y-23, (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), 0.06 M sorbitol, pH 5.5] で 5 分間処理し、ホルムアルデヒド溶液 [3.6%(v/v) formaldehyde, (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), 0.1%(v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), in phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)] で 1 時間処理した。その後、mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin 抗体 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) を含む 1 次抗体溶液 (PBS で希釈) で 1 時間処理し、Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen) を含む 2 次抗体溶液 (PBS で希釈) で 1 時間処理した。その後、PBS に 3 分間浸けにおいて洗浄し、スライドガラスにマウントして観察した。

### 顕微鏡観察

経時観察は第2、3章と同様に、アクリルチャンバーを用いて観察を行った。固定観察には蛍光顕微鏡 BX60、BX50 を、live-cell imaging には共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss Inc.)、TCS SP8 (Leica Microsystems) を用いた。

画像解析には Fiji ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) を、3D 表示には FluoRender (<http://www.sci.utah.edu/software/fluorender.html>) を用いた。

### 実験の順序

この章では複数の系を用いて実験を行っているため、それぞれの順序を記載する。

LB 処理の実験 (図 4-1) では、一段階同調した中期の多い BY-2 細胞を整列処理して遠心し、そのまま観察するものと、1 時間培養するものに分けた。培養するものは、それぞれ LB、DMSO を投入した培地内で培養し、1 時間後に観察した。その後、撮影した顕微写真を使って紡錘体及び細胞板の位置の計測比較を行った。

live-cell imaging (図 4-2、4-4) では、一段階同調した中期の多い BY-GF11 細胞を整列処理して遠心し、チャンバーにマウントして共焦点顕微鏡で撮影した。

微小管を確認するための観察として、一段階同調した中期 (図 4-3A) と前期前 (図 4-3B) の BY-GF16 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。また、一段階同調した中期 (図 4-3C) と間期 (図 4-3D) の細胞をそれぞれ抗体染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

### 4-3 結果

分裂装置の移動に actin 繊維がどのように関わっているかを明らかにするために細胞質分裂中の actin 繊維の構築の変化を経時観察した。まず、第 2 章と同様に細胞板挿入位置の比較を行い、actin 阻害剤が細胞板位置の復帰に影響を及ぼすかどうかを調べた。一段階同調した BY-2 細胞を遠心し分裂装置を移動させた後、actin 阻害剤である LB と DMSO をそれぞれ入れた培地中で 1 時間培養し、分裂装置の位置を比較した。遠心すると、細胞板が中央にある細胞は遠心直後はどちらも 10% 程だった。1 時間培養後、対照として溶媒である DMSO を入れて培養したものはこれが 74% まで回復していたが、LB 存在下で培養したものは 43% に留まった (図 4-1)。即ち計算上、通常 64% の細胞でみられた分裂装置の CDZ 近傍への復帰が、actin 阻害剤存在下では約半分 (33%) に減少していた。このことから、分裂装置の位置の復帰には actin 繊維が必要であると考えられる。

前章の live-cell imaging の画像を詳細に解析する中で、移動した隔膜形成体が CDZ へと復帰移動する間のある光学切片に、CDZ と隔膜形成体の間を接続する actin 繊維の接続が見られた (図 3-1B)。便宜上、ここではこの位置の細胞質上を横断する actin 繊維を actin cable と呼称する。しかし、図 3-1 が示すように分裂装置の周辺は actin 繊維を含む複雑な構造があるため、分裂装置が完全に CDZ 近傍に復帰する細胞の観察では、actin cable の詳しい構造は分からなかった。ここで、偶然にも遠心処理のもう一つの利点が活かされた。すなわち、遠心処理により、特に分裂装置の復帰が完全でない細胞で、CDZ の周辺から複雑な構造をなくせるため、この領域の細胞骨格の構造が鮮明に観察できるようになった。図 4-2 の細胞において、細胞板の片端はすでに親細胞壁に接触しており、すぐ融合してしまうが、もう一方の側は CDZ へと伸びていた。また、この隔膜形成体はその向きを細胞長軸に垂直に近い角度から CDZ の方へ向いた角度へと変えていた。この方向転換の間に、拡大中の隔膜形成体の先端 (図 4-2B, 黄色矢印) と CDZ (図 4-2A, 黄色矢印) の両方に actin 繊維からなる突起が現れ、最終的にはこれらと actin cable が接続した。しかし、この actin cable が CDZ と隔膜形成体のどちらから actin 繊維を伸ばしたのかを区別はできなかった。

遠心により分裂装置が移動した細胞において、CDZ と隔膜形成体の間を繋ぐ cytoplasmic strand の中に、actin 繊維と同じく微小管も存在するかを調査するため、まず GFP-tubulin を発現した BY-GT16 株を用いて観察を行った。隔膜形成体の微小管ははっきりと観察できたが、細胞表層と隔膜形成体の間には明瞭な繊維状の構造はみられなかった (図 4-3A)。次に、微小管のみを可視化するために、遠心した BY-2 細胞を抗 tubulin 抗体で免疫染色して

観察した。CDZ と十分に拡大した隔膜形成体の間にはやはり微小管の接続はみられなかった (図 4-3C)。分裂期前の細胞を双方の手法で観察すると、いずれの場合にも **cytoplasmic strand** の中に微小管が確認できた (図 4-3B、D)。このことから、遠心した細胞において CDZ と隔膜形成体とを結ぶ **cytoplasmic strand** に微小管がみられないのは技術的な問題に起因するわけではなく、そうした構造が無いことを示している。

興味深いことに、細胞板が CDZ へ戻ることができなかった細胞において、細胞分裂終期もしくは FM4-64 の蛍光が画像上で線分状になった時、つまり細胞板の拡大開始時に、CDZ に環状の **actin** 集積が見られた (図 4-4A 白矢印)。これを **actin band** と呼ぶこととする。この時の画像を 3 次元再構築で見ると、この **actin band** は内側に盛り上がった環状構造であることがわかった (図 4-4C マゼンタ破線円)。細胞表層の **actin** 繊維は、PPB のように細胞長軸に垂直や、隔膜形成体のように平行に列を作っていることも予想されたが、**actin band** とその周辺を含めて規則性なくランダムに配列していた。顕微鏡像や蛍光強度の計測から、この **actin band** の位置 (図 4-4A 白矢印、図 4-4B 水色矢印) は ADZ の位置 (図 4-4A、B 角括弧) に一致していた。即ち CDZ において、ADZ という **actin** 繊維の少ない状況がある時点で反転して **actin** 繊維の集積に変わることが示された。実際、図 4-4A において、ADZ や **twin-peaks** (Sano et al. 2005) は 8 から 10 分時点のパネルで消失しているように見え、**actin band** が 24 分時点のパネルで確認できる。図 4-4D は同じく、ADZ が **actin band** に置き換わる像である。この細胞では、細胞板は CDZ から離れた位置で斜めに挿入されており、**actin band** は隔膜形成体から独立して形成されている。図 4-4A の FM 4-64 蛍光から判断すると、ADZ や **twin-peaks** は細胞板拡大開始直前に消失している。これらの観察から、CDZ では、細胞分裂後期まで存在していた ADZ が細胞質分裂の開始時点で消失して環状の **actin band** にその場所を譲ることと、この **actin band** も分裂の終了時に消えることが分かった (図 4-4D)。

#### 4-4 考察

人為的に移動させた分裂装置の CDZ への復帰に **actin** 繊維が関わっていることを確かめるため、BY-GF11 を用いて **actin** 繊維に注目した **live-cell imaging** を行った。**actin** 繊維は CDZ と拡大中の隔膜形成体の間に観察されてきた (Goosen-de Roo et al. 1984, Kakimoto and Shibaoka 1987, Hasezawa et al. 1994, Molchan et al. 2002, Lloyd and Traas 1988, Sano et al. 2012) が、細胞板の誘導に関わる **actin** 繊維を観察するには、拡大中の隔膜形成体が CDZ に近過ぎるため、これらの **actin** 繊維の構築を正確に観察した事例はなかった。本研究で採用した遠心による紡錘体の移動によって、CDZ の周辺の細胞質を見晴らしの良い領域にすることができた。これにより、隔膜形成体や CDZ から現れる **actin** 繊維を鮮明に観察できるようになった。この手法による解析で、細胞板拡大中に ADZ があった場所である CDZ に **actin band** が一時的に出現し、細胞質分裂終了時に消失することを発見した (図 4-4A、D)。**actin band** は隔膜形成体が復帰しない細胞において、より鮮明に観察でき

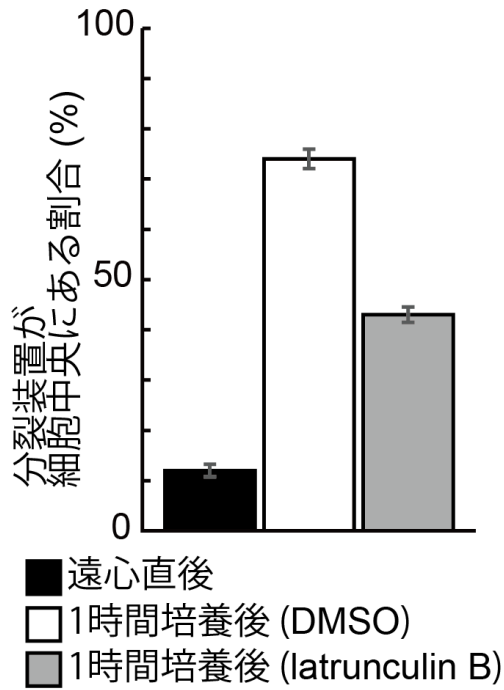
た (図 4-4D)。共焦点顕微鏡での観察により、actin band はランダムに配向した actin 繊維から成ることがわかった (図 4-4C)。細胞表層の actin 繊維の詳しい変化とそのタイミングについては次章で詳しく述べる。

加えて、CDZ と隔膜形成体の間に actin cable が観察された細胞では、CDZ と細胞板の伸長先端の両方に actin 繊維の突起が現れていた (図 3-1B、図 4-2)。この CDZ の actin 繊維の突起は actin band の一部と一致すると推測している。このことは、actin band は actin cable の足場としての機能があり、これにより actin cable が細胞板を正しい位置へと誘導することができることを示唆している。遠心後の分裂期の細胞で、actin 繊維を含む構造が現れることはホウライシダの原糸体細胞でも報告されている (Murata and Wada 1997) が、そこでは表層に actin band は観察されていない。

一方、微小管が細胞板挿入位置決定に関与しているという報告があるタバコ培養細胞 BY-2 では、微小管は細胞質分裂の最後に現れる (Sano et al. 2012) もの、actin 繊維が微小管の伸長を誘導していると考えられている。本研究でも、遠心により分裂装置が移動した細胞を用いて、細胞質分裂期の CDZ と隔膜形成体の間の細胞質に微小管が存在するかどうかを調べたが (図 4-3)、微小管がこの場所の細胞質に存在している像は得られなかった (図 4-3A、C)。微小管は親細胞壁にたどり着いた細胞壁の固定に関わるのみではないかと考えられる。



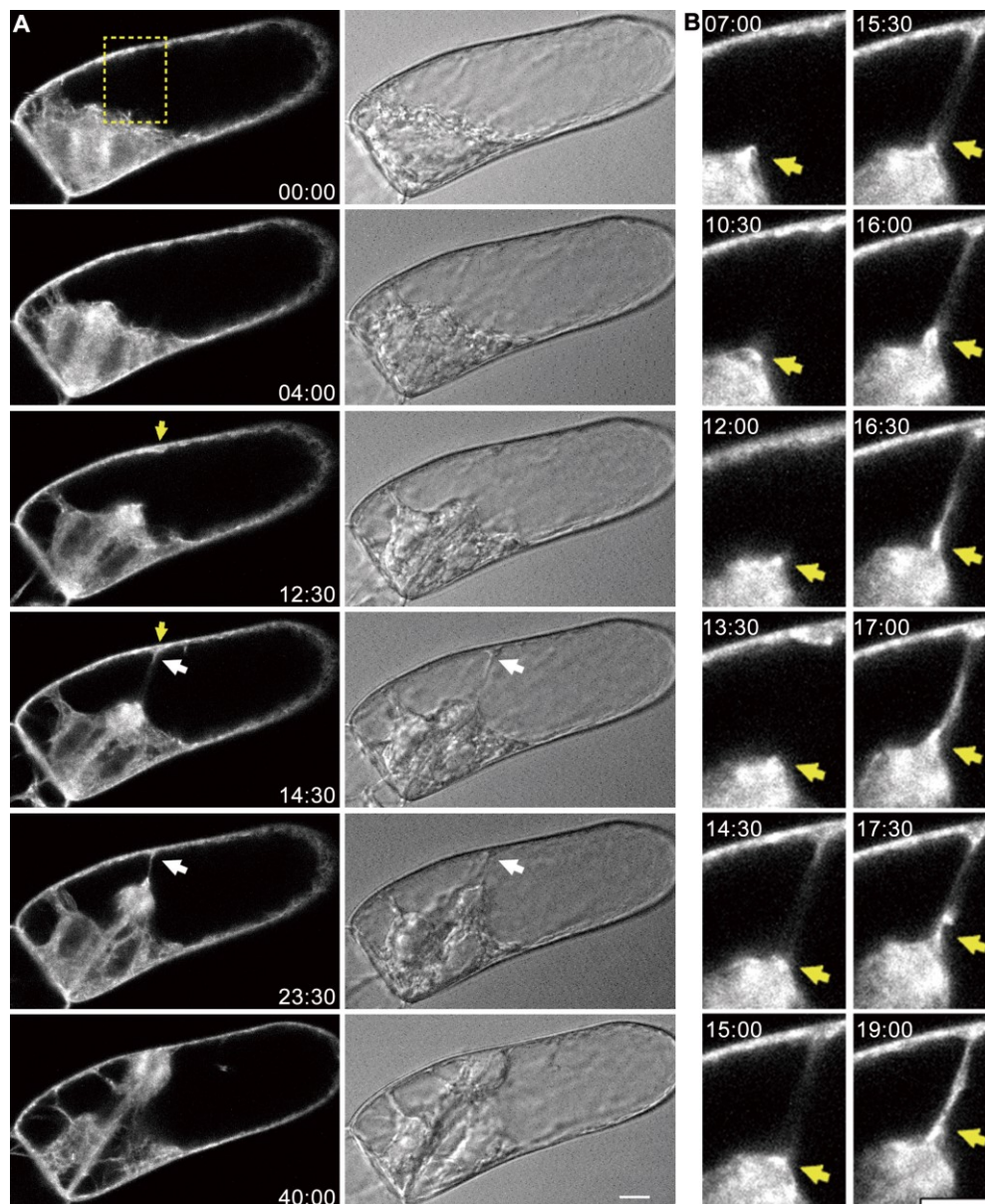
図 4-1



#### Latrunculin B 処理による分裂装置復帰率の比較

遠心した細胞を培養観察用のチャンバーに設置し、遠心直後と1時間培養後に観察した。遠心直後(黒いカラム)、DMSOを入れた培地内(白いカラム)とLBを入れた培地内(灰色のカラム)で1時間培養した細胞それぞれにおける紡錘体及びの細胞板が細胞中央にある割合。エラーバーは平均値の標準誤差 ( $n = 5 \sim 9$ )。t検定によるP値は、遠心直後と1時間培養後の間ではDMSOでは  $5.2 \times 10^{-7}$ 、LBでは  $2.7 \times 10^{-7}$ 、DMSOとLBの間では0.013で、全て有意差があった。

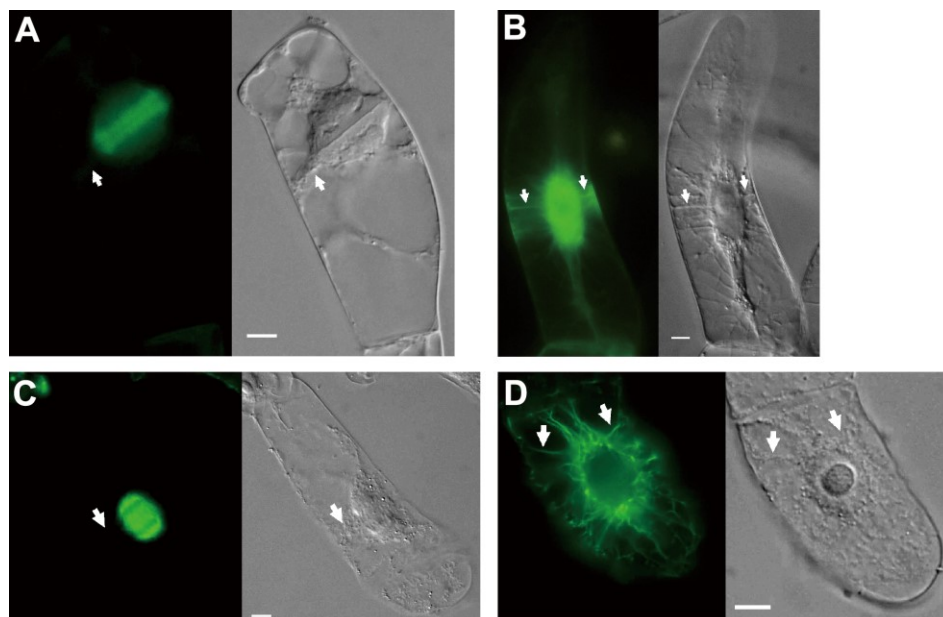
図 4-2



**BY-GF11 細胞における CDZ と隔膜形成体を繋ぐ actin cable の発達**

遠心した BY-GF11 細胞を FM 4-64 で染色し、培養観察用チャンバーに乗せて顕微鏡で観察した。(A) 遠心により核分裂装置が下方方向に移動した細胞の GFP-fimbrin 蛍光 (緑) と微分干渉の time-lapse 像。左側が GFP-fimbrin 蛍光像、右側が微分干渉像。右下の数字は観察開始からの時間(分:秒)。白矢印は CDZ と隔膜形成体の間に新たに現れた actin cable。黄色矢印は actin cable の細胞表層側基部に現れた突起。00:00=隔膜形成体の形成初期、40:00=隔膜形成体の親細胞壁への接触。(B) A の黄色破線矩形で囲った部分の拡大像。左上の数字は観察開始からの時間 (分:秒)。黄色矢印は actin cable を隔膜形成体に接続している actin 繊維からなる突起。蛍光から、この突起は隔膜形成体にみられる一対の逆平行 actin 繊維列とは独立しているように思われる。Scale bar=10 μm。

図 4-3



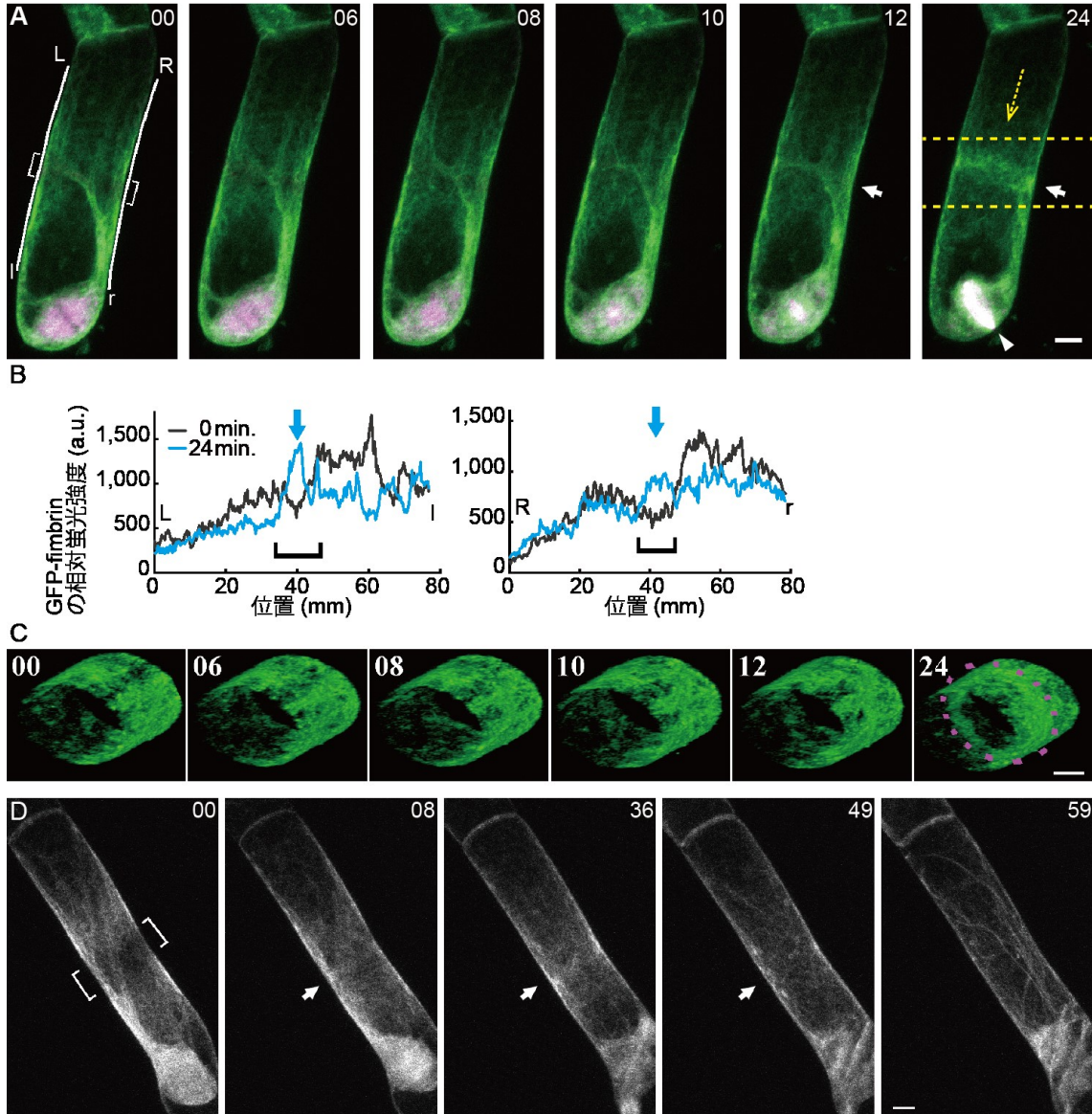
#### 細胞質分裂期の BY-2 の微小管の構築

(A、B) BY-GT16 生細胞の GFP-tubulin 像 (左) と DIC 画像 (右)。(C、D) 固定した BY-2 細胞の mouse monoclonal 抗 $\alpha$ -tubulin 抗体を用いた免疫染色により可視化した tubulin 像 (左) と DIC 画像 (右)。(A、C) 遠心後、隔膜形成体が十分に拡大した細胞。

(B、D) 分裂前の細胞。cytoplasmic strand の中に微小管がよく観察できる。矢印は細胞表層と分裂装置の間を繋ぐ cytoplasmic strand を示す。Scale bar = 10  $\mu$ m。



図 4-4



#### CDZ に一時的に現れる actin band

遠心後に FM4-64 染色した BY-GF11 細胞を培養観察用チャンバーに乗せて顕微鏡で観察した。A と D の右上、および C の左上の数字は観察開始からの時間 (分)。(A) 隔膜形成体 (白矢尻) が CDZ へ復帰しなかった細胞の GFP-fimbrin と FM 4-64 の蛍光の time-lapse 像。それぞれの画像は  $12.36 \mu\text{m}$  の幅で取得した光学切片 13 枚を z 軸方向に投影圧縮している。緑は GFP-fimbrin の蛍光を、マゼンタは FM 4-64 の蛍光を示す。00 分の角括弧は ADZ の位置、矢印は細胞質分裂初期に現れた actin band を示す。00 (分) = 中期、06 = 後期開始直後、12 = FM 4-64 の蛍光が板状に見えるはじめた時、24 = 細胞板拡大大期。Scale bar =  $10 \mu\text{m}$ 。(B) A で示した細胞の細胞表層の白い線 (L-l、R-r) 上の GFP-fimbrin の蛍光強度。00 分 (黒線) と 24 分 (水色線)。左のグラフは線 L-l に対応し、右は線 R-r に対応している。矢印は actin band。(C) A の黄色破線で挟まれた細胞の一部を黄色点線矢



印方向から見た 3D 画像。右端パネルのマゼンタ点線円は内側に actin 繊維の環があることを示す。Scale bar=10  $\mu\text{m}$ 。(D) 細胞板が CDZ から遠い所で斜めに挿入された細胞の GFP-fimbrin 蛍光の time-lapse 像。CDZ の actin 繊維の動向がはっきりと見える。それぞれの画像は 31.5  $\mu\text{m}$  の幅で取得した光学切片 18 枚を z 軸方向に投影圧縮している。右上の数字は観察開始からの時間 (分)。角括弧は ADZ の位置。矢印は細胞質分裂初期に現れた actin band。actin band がかつて ADZ があった所に出現していることに注目。00 (分) = 分裂中期、12 = 後期開始直後、59 = 細胞質分裂の終了。Scale bar=10  $\mu\text{m}$ 。

## 第 5 章 GLIM を用いた細胞表層における actin 繊維の構築変化の解析

### 5-1 背景と目的

前章までの共焦点顕微鏡を用いた live-cell imaging 観察によって、CDZ 周辺の細胞質内の actin 繊維の構築や変化を見ることができた。しかし、そこで用いた複数の光学切片画像の投影圧縮では、細胞表層、特に CDZ における actin 繊維の構築の変化を正確に記録するのは難しかった。また、複数枚の画像を撮影する共焦点顕微鏡の使用法では、一度の撮影に時間がかかることや、細胞に損傷を与えないためにレーザーの照射時間を減らすこと等、時間的制約も大きかった。この章では、玉置と峰雪によって開発された GLIM システム (Tamaoki and Mineyuki 2012) を用いることで、この問題を解決し、細胞表層の変化とその変化の時期が特定できる観察を行った。GLIM は大局と局所の 2 つの異なる光路を持っており、これをミラーで素早く切り替えることができる。高倍率の局所光路では細胞表層の変化を観察でき、低倍率の大局光路では細胞全体を見ることで細胞周期の確認ができる。大局と局所一組の撮影で 2 枚のみの撮影で、光路切り替え時間を含めても短い時間で済むため、一般的な共焦点顕微法よりも短い間隔で撮影でき、変化を見逃す可能性が下がる。また、一組の撮影中、励起レーザーの照射が局所撮影時一回のみであるため、光損傷や温度上昇を小さく抑えることができると思われる。この章では、遠心により分裂装置の移動した蛍光導入 BY-2 を GLIM で観察することで、細胞表層の actin 繊維の変化とその時の細胞周期の確認を行った。

### 5-2 材料と方法

#### 細胞

第 3、4 章同様に GFP-fimbrin を発現したタバコ培養細胞 BY-GF11 を用いた。

#### 同調培養

##### 一段階同調

第 2~4 章と同様に、Nagata et al. (1982) が記述した手法に従って、一段階同調を行い、aphidicolin 洗浄後 8~8.5 時間のものを実験に用いた。

#### FM4-64 染色

拡大中の細胞板を可視化するため、第 3、4 章と同様に FM 4-64 を用いて染色を行った。

#### 遠心処理

第 3、4 章と同様に、整列処理を行った後、細胞の貼り付いたカバーガラスを遠心した。

#### 顕微鏡観察

倒立顕微鏡上での経時観察のために 500~1000  $\mu$ l 容量のプールをもつアクリルチャンバーを作成した (図 2-1C-e)。第 2~4 章における正立顕微鏡上での観察同様、これに培地を満たし、細胞が貼り付いたカバーガラスを固定して観察を行った。観察には、峰雪芳宣教授と玉置大介博士が開発した局所・大局ライブイメージング顕微鏡 (Global-Local Live

Imaging Microscope; GLIM) を用いた (Tamaoki and Mineyuki 2012)。2 台分のカメラポートを備え付けた倒立顕微鏡 (ECLIPSE Ti, Nikon Corp., Tokyo, Japan) を本体として、大局画像用の光路 1 と局所画像用の光路 2 を用意した (図 5-1)。大局用の光路 1 に、緑色 (543 nm) He-Ne レーザー (C1plus, Nikon Corp.) を用いる共焦点レーザー顕微鏡システムを装着した。局所用の光路 2 には、EM-CCD カメラ (iXon<sup>EM+</sup> DU-897E-CS0-#BV, Andor Technology Ltd., Belfast, UK) と 2.5 倍拡大レンズ [C-mount TV adapter VM2.5× (MQD42120), Nikon Corp.] を装着し、その間に、spinning-disk scanning unit (CSU-X1-M, Yokogawa Electric Corp., Musashino, Japan) を 488 nm 固体レーザー (Sapphire 488-20 CDRH laser, Coherent, Inc., Santa Clara, California, USA) と共に装着した。専用ソフトウェア (GLIM Software, Mitani Corp., Fukui, Japan) を用いて光路やフィルター、光源を効率よく切り替えた。GLIM Software は局所画像を直接操作し、大局画像を EZ-C1 Software (Nikon Corp.) を通して間接的に操作している。これらのソフトウェアは Windows XP がインストールされたパソコン上で動作している。

画像解析には Fiji ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) を用いた。

### 5-3 結果

細胞質分裂時の表層の actin 繊維の変化を観察するため、遠心していない細胞を GLIM を用いて観察を行った。この観察により、遠心していない細胞の細胞分裂を通して、表層の actin 繊維をはっきりと観察し、CDZ における actin 繊維の消失や再出現と、分裂装置の構造変化を並行して記録することができた (図 5-2A, B)。本研究の GLIM を用いた観察ではさらに、局所画像から ADZ 内部にあたる部分 (図 5-2B のマゼンタ破線矩形内) の蛍光強度の変化のグラフ (図 5-2C) を作成し、大局画像、局所画像それぞれの細胞長軸に平行な線上 (図 5-2A, B の黄色破線矩形) から分裂装置の中心付近 (図 5-2D) と細胞表層の蛍光 (図 5-2E) のキモグラフを取得して解析を行った。二つのキモグラフを用いることにより、分裂装置の変化、特に核膜崩壊と 2 組の染色体の分離 (図 5-2D) や、PPB 上の actin 繊維の構築が ADZ へと変化していく時期 (図 5-2E) がはっきりと特定できた。前期には、横方向に並んだ actin 繊維の帯 (PPB の actin 繊維) が鮮明に見られた (図 5-2B, E の-01:28:00) が、CDZ の actin 繊維は前期後半頃の PPB 消失と共に減少し始め (図 5-2C)、核膜崩壊時 (前期から前中期への移行時、図 5-2D を参照)、actin 繊維はほとんどが CDZ からなくなり ADZ が出来上がっていた (図 5-2B, E の-01:03:00)。その後も actin 繊維のシグナルは緩やかに減少しつつあったが、細胞板形成開始 (図 5-2A, D の 00:00:00) を境に増加し始める。隔膜形成体周辺の actin 繊維の接近によりシグナルが急激に増大し、細胞表層の actin 繊維の独立したシグナル強度は計測不能となった (図 5-2B, C, E の 00:27:30)。細胞板完成後は、細胞板が融合したと思われる場所に細い線上のシグナルを残して細胞表層のシグナルは低下していった (図 5-2B, C, E の 01:24:30)。

遠心した細胞 (図 5-3, 図 5-4) でも、上記の遠心していない細胞 (図 5-2) と同様に、大

局、局所画像（図 5-3、図 5-4 それぞれの A と B）と共に、ADZ 内部にあたる部分の蛍光強度の変化のグラフ（図 5-3、図 5-4 それぞれの C）と分裂装置の中心付近と細胞表層の蛍光のキモグラフ（図 5-3、図 5-4 それぞれの E）を用いて解析を行った。遠心した細胞では、遠心していない細胞よりも ADZ がはっきりと判別できたので、GLIM を用いて、遠心後分裂装置が復帰する細胞（図 5-3）と復帰しない細胞（図 5-4）で CDZ における actin 繊維の再出現過程を調査した。遠心後、分裂装置の復帰が起こった細胞（図 5-3）では、ADZ のある時期、ADZ と CDZ 外側の actin 繊維のある領域（いわゆる twin-peaks）がシグナルの差ではっきりと区別できる（図 5-3E の 20:00）。このシグナルの差は細胞質分裂期の途中まで保たれていた（図 5-3E の 04:00）。この細胞では、細胞板の出現（図 5-3E の 00:00）の 4~5 分前（図 5-3E の後期開始時点付近）に CDZ の actin 繊維の再出現が起こり、細胞板出現の数分後には CDZ の外側には目立った actin 繊維の集積はなくなった（図 5-3E の 05:00）。同様の結果は遠心していない細胞でも見られた（図 5-2E の 00:00:00 と 00:02:30）。遠心していない細胞では、遠心後、分裂装置が復帰する細胞と同様に、CDZ の中央の領域に actin 繊維の顕著な蛍光が見えてくる（図 5-2E の 00:27:30）。この両者では、細胞質分裂の最終段階になると、CDZ に近づく隔膜形成体もつ actin 繊維の強い蛍光に埋もれてしまうため、CDZ の actin 繊維の再構築の観察は困難であった（図 5-2B、E の 00:27:30、図 5-3B、E の 26:30）。一方、分裂装置が復帰しない細胞（図 5-4）では、復帰した細胞同様、ADZ と CDZ 外側の領域が区別でき（図 5-4E の 18:00）、その差は細胞質分裂期の途中まで保たれていた（図 5-4E の 04:30）。細胞板の出現（図 5-4E の 00:00）の 2~4 分前（図 5-4E の後期開始と細胞板出現の間）に CDZ の actin 繊維の再出現が起こり、細胞板出現の数分後には CDZ の外側には目立った actin 繊維の集積はなくなった（図 5-4E の 05:00）。上記二者と違い、分裂装置が復帰しないこの細胞では、隔膜形成体もつ actin 繊維の強い蛍光が CDZ へと接近しないため、CDZ の actin 繊維の再出現が細胞質分裂終了まで鮮明に追跡できた（図 5-4B、C、E の 00:00~26:00）。GLIM を用いた局所観察では光学切片を複数枚取得しないためわかりづらいが、細胞板出現以降、CDZ 内部と外部の蛍光強度が ADZ 存在時と逆転し、CDZ 内部の蛍光が強くなっていることがわかる（図 5-4E の 00:00:00~00:15:00 付近）。この傾向は、判別しづらいが遠心していない細胞（図 5-2E の 00:00~20:00 付近）と遠心後分裂装置が復帰した細胞（図 5-3E の 00:00~15:00 付近）にも見ることができる。また、この actin 繊維の CDZ への復帰は CDZ 縁から徐々に ADZ を狭めるように起こるのではなく、CDZ 中央から外側へ広がるように見えた（図 5-4E の 00:00:00~00:15:00 付近）。

#### 5-4 考察

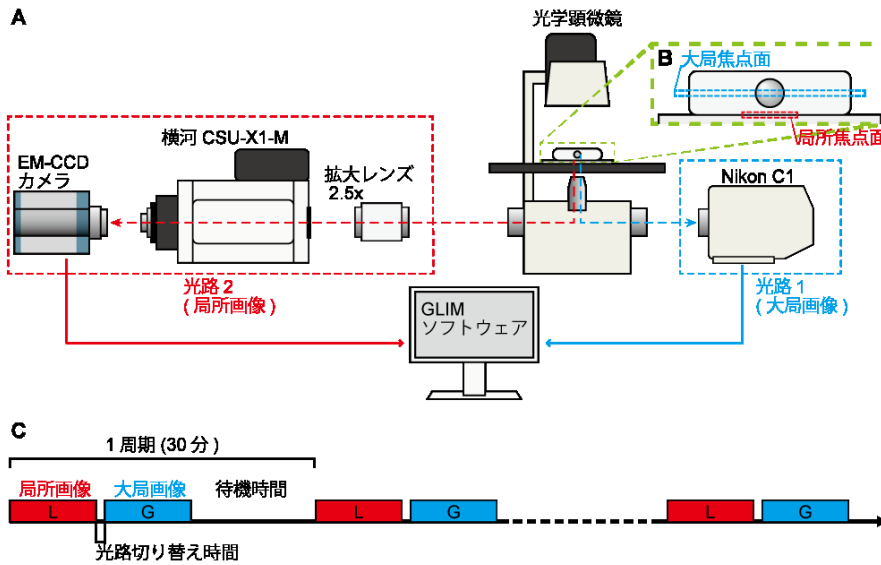
細胞分裂時の細胞表層の actin 繊維の構築の変化を分裂周期を特定しつつ観察するため、GLIM を用いた観察を行った。GLIM による遠心しない細胞（図 5-2）と遠心後分裂装置が復帰しない細胞（図 5-4）の観察によって、ADZ の出現と消失の時期を確認することができ

た。特に、ADZ の消失時期については、隔膜形成体周辺の actin 繊維の接近によって正確な観測ができないため、過去の報告を見渡してもはっきりと触れられることがなかった。本研究では、遠心した細胞、特に分裂装置が元の位置に復帰しない細胞を用いることで CDZ 周辺の actin 繊維の構築の変化をはっきりと観察することができ、ADZ が細胞質分裂開始と同時に消失を開始し、CDZ の内外の actin 繊維の存在比率が逆転して CDZ 内に actin 繊維が集積した状態になることがわかった (図 5-4)。この CDZ 内に actin 繊維の集積は、位置や時期、特徴の一致から、第 4 章の actin band に相当するものだと考えられる。隔膜形成体周辺の actin 繊維が接近しシグナルが急増するため最後までは観測できない遠心していない細胞 (図 5-2C の 00:00:00~00:15:00 付近) や遠心後分裂装置が復帰する細胞 (図 5-3C の 00:00~15:00 付近) でも、シグナルの急増による観測不能になるまでの間に、CDZ 内のシグナルの緩やかな増加が起こっており、これが復帰しない細胞における CDZ 内の actin 繊維の集積と一致することが強く示唆された。つまり、遠心による攪乱を受けていない状態 (図 5-2) や、攪乱を受けた状態から復帰したような (図 5-3) 正常な細胞においても、actin band が形成されると考えられる。第 4 章での考察も踏まえて考えると、actin band はやはり細胞質分裂期にのみ存在するため、その形成は細胞周期に依存し、細胞質分裂のために本来備わっている特徴だと考えられ、細胞質分裂期のこの場所では、actin 重合や actin 繊維の集積の活性が上昇していると考えられる。これらのことは、actin band が CDZ と分裂装置の間を接続する actin cable の足場であり、actin cable が細胞板の正常位置への挿入に深く関わっているという考えを支持している。

また、ADZ の消失方法、CDZ への actin 繊維の復帰方法はいくつかの可能性が考えられる。①ADZ 両脇 (twin peaks) から actin 繊維が順々に移動し外側から内向きに閉じるように復帰する、②CDZ 中央から新たに actin 繊維が現れ外向きに広がるように復帰する、③CDZ 内にランダムに actin 繊維が現れて復帰するなどが考えられる。分裂装置の位置が復帰しない細胞 (図 5-4) の観察より、CDZ 内の actin 繊維は外から内へと閉じるように復帰するわけではなく、内から外へと広がるように復帰するのだろうということがわかった。ただし、今回の観察結果からは、ランダムに復帰する可能性は完全には排除できず、さらなる観察が必要である。

図

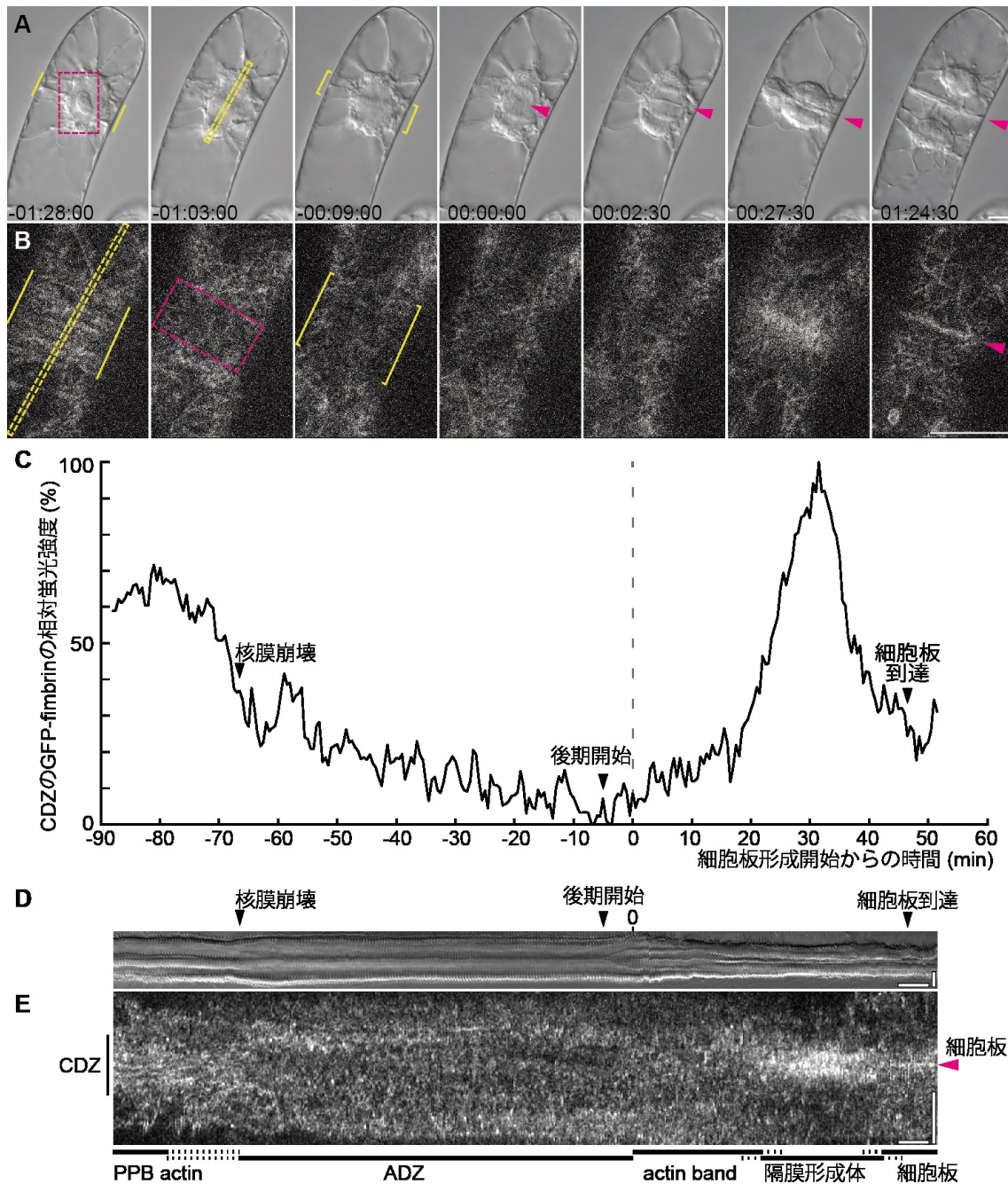
図 5-1



### GLIM システムの模式図

配置の概要 (A) と細胞試料の拡大図 (B) と像取得の時間配分 (C)。CDZ の actin 繊維の高倍率の共焦点顕微鏡画像 (局所、B の赤線) を光路 2 (顕微鏡左側、A の赤線) から得、広い視野の細胞全体の微分干渉像 (大局、B の青い点線の矩形) を光路 1 (顕微鏡右側、A の青線) から得た。局所の蛍光像を撮影後、大局の微分干渉像を撮影し、決められた時間待機するのを 1 順とし、これを細胞分裂が終了するまで繰り返した。1 順は 30 分に設定した (C)。

図 5-2



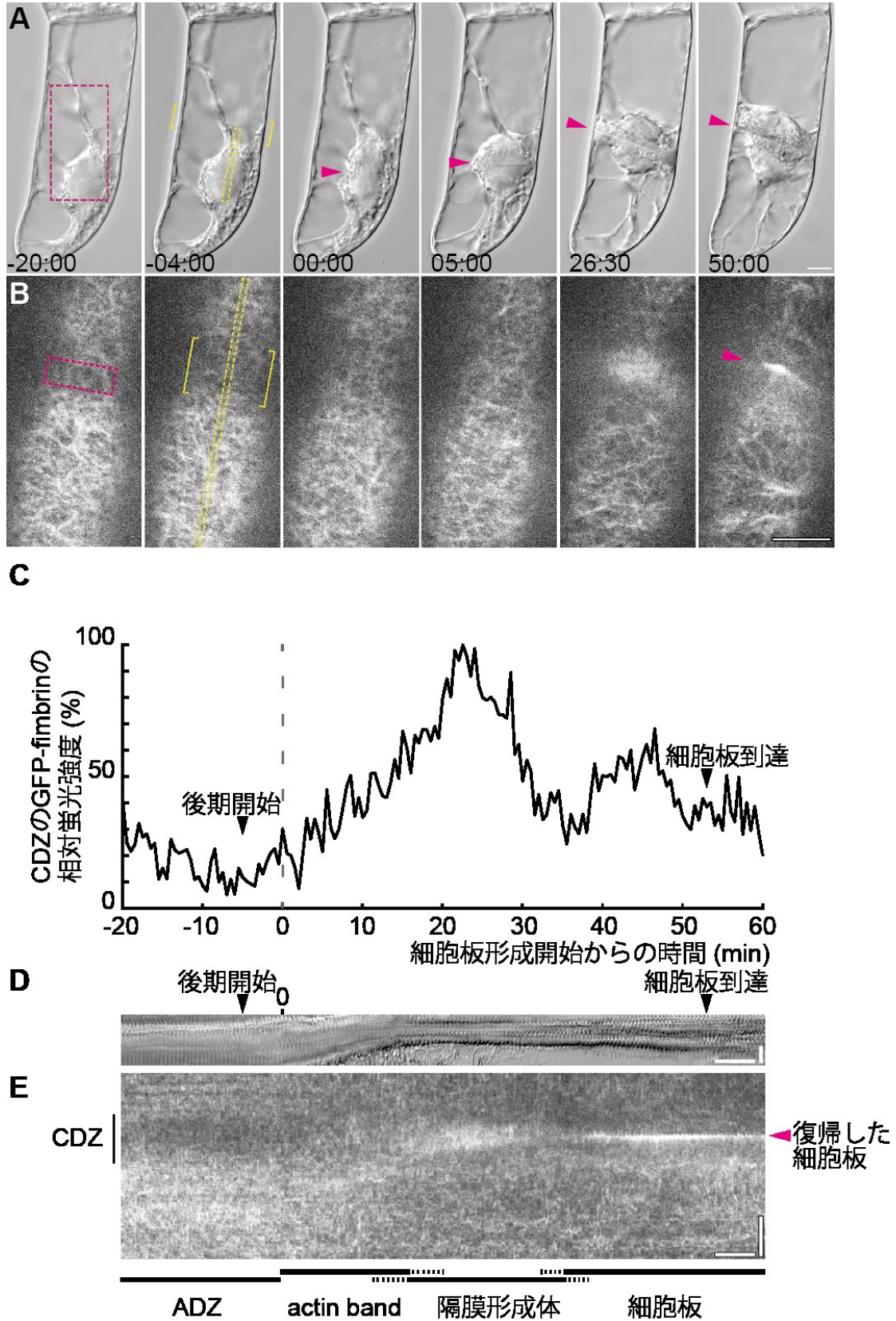
遠心していない細胞における CDZ の actin 繊維の動向の GLIM による解析

(A、B) GLIM によって観察した遠心した BY-GF11 細胞の全体 (大局) と CDZ (局所) の time-lapse 像。(A) 細胞全体の微分干渉像。(B) A のマゼンタ矩形で囲まれた部分の GFP-fimbrin 蛍光像。A の左下の数字は細胞板形成開始からの時間 (分:秒)。細胞両側の黄色線は PPB の位置、黄色角括弧は ADZ の位置を、マゼンタ矢尻は細胞板をそれぞれ示す。  
 -01:28:00=分裂前期前、-01:03:00=核膜崩壊直後、-00:09:00=中期、00:00:00=細胞板出

現時、00:02:30 と 00:27:30=細胞板拡大期、01:24:30=細胞質分裂終了後。Scale bar=10  $\mu\text{m}$ 。(C) B の CDZ のマゼンタ矩形で囲まれた部分の GFP-fimbrin の相対蛍光強度の変化。矢尻はそれぞれ核膜崩壊、後期開始、細胞板が親細胞壁に到達した時を示す。(D、E) A と B の黄色矩形内のキモグラフ。E の左側の黒い縦線は CDZ の位置。マゼンタ矢尻は細胞板。E の下の黒い横線はそれぞれの構造の存在時間。Scale bar : 縦=10  $\mu\text{m}$ 、横=5 分。



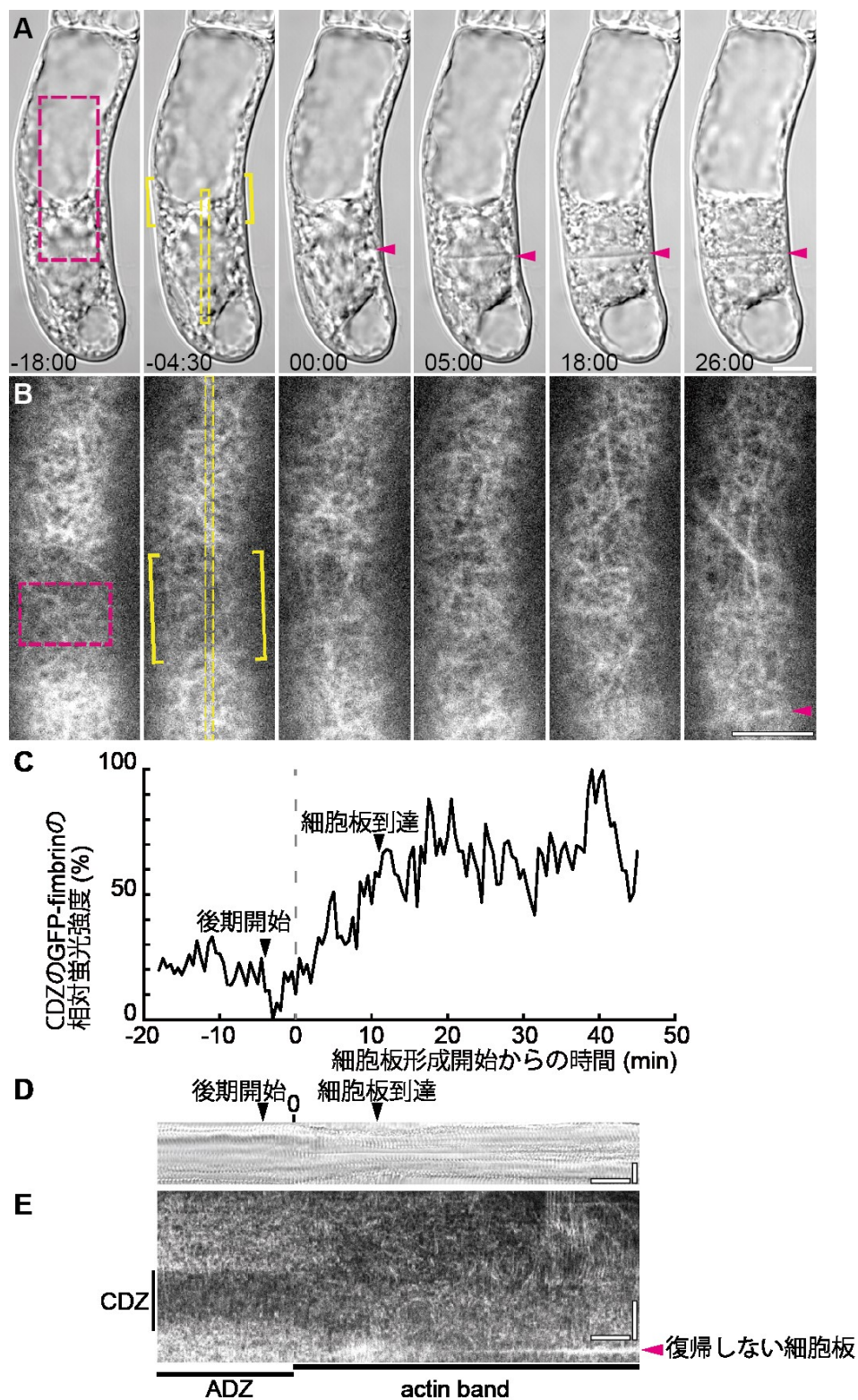
図 5-3



遠心後細胞板が復帰する細胞における CDZ の actin 繊維の動向の GLIM による解析

(A、B) 遠心した分裂期の BY-GF11 細胞のうち、隔膜形成体が CDZ まで復帰した細胞の GLIM による全体 (大局) と CDZ (局所) の tme-lapse 像。(A) 細胞全体の微分干渉像。(B) A のマゼンタ矩形で囲まれた部分の GFP-fimbrin 蛍光像。A の左下の数字は細胞板形成開始からの時間 (分:秒)。この細胞は 00:00 の 40 分前に遠心されている。マゼンタ矢尻は細胞板、黄色角括弧は ADZ の位置をそれぞれ示す。-20:00=分裂中期、-04:00=後期開始、00:00=細胞板出現直後、05:00 と 26:30=細胞板拡大期、50:00 細胞質分裂後。Scale bar=10  $\mu\text{m}$ 。(C) B の CDZ のマゼンタ矩形で囲まれた部分の GFP-fimbrin の相対蛍光強度の変化。矢尻はそれぞれ後期開始と細胞板が親細胞壁に到達した時。(D、E) A と B の黄色矩形内のキモグラフ。縦軸は矩形長軸と一致し、横軸は時間を表す。Scale bar : 縦=10  $\mu\text{m}$ 、横=5 分。マゼンタ矢尻は細胞板。細胞板は CDZ には到達していない。E の下の黒い横線はそれぞれの構造の存在期間。Scale bar : 縦=10  $\mu\text{m}$ 、横=5 分。

図 5-4



遠心後細胞板が復帰しなかった細胞における CDZ の actin 繊維の動向の GLIM による解析。

(A、B) 遠心した分裂期の BY-GF11 細胞のうち、隔膜形成体が CDZ まで復帰しなかった細胞の GLIM による全体 (大局) と CDZ (局所) の time-lapse 像。(A) 細胞全体の微分干渉像。(B) A のマゼンタ矩形で囲まれた部分の GFP-fimbrin 蛍光像。この細胞では隔膜形成体は CDZ へは戻らない。A の左下の数字は細胞板形成開始からの時間 (分:秒)。この細胞は 00:00 の 48 分前に遠心されている。マゼンタ矢尻は細胞板、黄色角括弧は ADZ の位置をそれぞれ示す。-18:00=分裂中期、-04:30=後期開始、00:00=細胞板出現直後、05:00 と 18:00=細胞板拡大期、26:00=細胞質分裂終了直後。Scale bar=10  $\mu$ m。(C) B の CDZ のマゼンタ矩形で囲まれた部分の GFP-fimbrin の相対蛍光強度の変化。矢尻はそれぞれ後期開始と細胞板が親細胞壁に到達した時。(D、E) A と B の黄色矩形内のキモグラフ。縦軸は矩形長軸と一致し、横軸は時間を表す。Scale bar : 縦=10  $\mu$ m、横=5 分。E の左側の黒い縦線は CDZ の位置。マゼンタ矢尻は細胞板。細胞板は CDZ には到達していない。E の下の黒い横線はそれぞれの構造の存在期間。

## 第 6 章 actin 繊維による力の発生を示唆する現象について

### 6-1 背景と目的

前章までで示したように、遠心によって細胞端に移動した分裂装置は細胞板形成開始と共に細胞中央へ移動を開始する。また、細胞板中心位置が細胞端から変化しない細胞でも、細胞板の転回が見られる。この時、CDZ と細胞板の間は actin cable で繋がれている。このような分裂装置の移動・転回や細胞板の CDZ への誘導はどのような仕組みで起こっているのだろうか。タバコ培養細胞 BY-2 では、CDZ に myosin が局在することが報告されている (Wu and Bezanilla 2014)。このことから、アクトミオシン系によって発生した力が細胞板を CDS へと牽引している可能性が考えられる。

この章では、第 3~4 章において取り上げなかった少数の観察結果を示し、この可能性について考察する。

### 6-2 材料と方法

#### 細胞

第 3~5 章同様に GFP-fimbrin を発現したタバコ培養細胞 BY-GF11 と、第 2 章同様に YFP- $\beta$ -tubulin、Lifeact-mCherry、histone H2B-tdCFP を発現した細胞 BY-YTHCLR2 を用いた。

#### 同調培養

一段階同調

第 2~5 章と同様に、Nagata et al. (1982) が記述した手法に従って、一段階同調を行、aphidicolin 洗浄後 8~8.5 時間のものを実験に用いた。

#### 細胞整列処理

遠心による分裂装置の移動を効率的に行うため、第 2~5 章と同様に細胞整列処理を行った。

#### FM4-64 染色

拡大中の細胞板を可視化するため、第 3、4 章と同様に FM 4-64 を用いて染色を行った。

#### 遠心処理

第 2~5 章と同様に、細胞の貼り付いたカバーグラスを遠心した。

#### 顕微鏡観察

第 2~5 章と同様に、経時観察のためにアクリルチャンバーを用いた観察を行った。観察には、蛍光顕微鏡 BX60、BX50、または共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 を用いた。

画像解析には Fiji ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) を用いた。



## 6-3 結果

### 細胞赤道面での細胞板拡大の方向転換

第 3,4 章の研究で、遠心した分裂期の BY-GF11 細胞や BY-YTHCLR2 細胞を用いて live-cell imaging を行っていると、しばしば拡大中の細胞質分裂装置が転回し、細胞長軸に平行に近いほど傾くことがあった (図 3-2 の類型)。このような分裂装置の細胞板が本来の分裂面である細胞赤道面にまで拡大した時、赤道面に沿うように隔膜形成体と細胞板が拡大方向を変え、結果的に屈折した細胞板を形成する現象が何例かみられた (図 6-1)。遠心後転回して平行に拡大する細胞板は偶然でしか得ることができないため、観察の母数は少ないが、平行に拡大する細胞板の内、比較的多くの細胞でこの屈折がみられた。多くの場合最終的に、細胞板は細胞中央の赤道面で直角に折れ曲がり、母細胞をおおよそ大きさ 1/4 と 3/4 程度に分割する形で娘細胞が出来上がった。

### CDZ に見られた繊維塊

また、遠心した分裂期の BY-GF11 細胞や BY-YTHCLR2 細胞を用いて live-cell imaging を行っていると、まれに CDZ 付近に GFP-fimbrin (Lifeact-mCherry) の蛍光シグナルが球状に集積しているものが見られた (図 6-2)。図 6-2A の BY-GF11 細胞においては、細胞板形成開始前後に CDZ 周辺の細胞質の蛍光が集積し、球状の塊となった。この球状の構造はその蛍光シグナルが繊維状シグナルの集まりに見えることから、actin 繊維の塊であると推測される。図 6-2B では、CDZ に出来た塊と拡大中の隔膜形成体の間に繊維状のシグナルによる接続が見られた。図 6-2C~E では細胞板形成開始とほぼ同時に CDZ に GFP-fimbrin の繊維状の蛍光の塊が複数形成され、周辺の繊維構造と接続を作って集合し、さらに大型化した。最終的に、CDZ の繊維塊は核周辺に発生した繊維塊と接続し、核が引き寄せられた。また、図 6-3 の BY-YTHCLR2 細胞では、細胞の両端の位置に発生した塊が本来の隔膜形成体と引き付け合うような動きが観察された。

## 6-4 考察

細胞端に移動した細胞板の細胞中央への移動や細胞板の転回には何らかの物理的な力が関与している可能性が高い。ここでは、低頻度ではあるが特徴的な現象を 2 つ取り上げた。

### 細胞赤道面で折れ曲がる細胞板について

遠心により分裂装置が移動した細胞において、途中で転回して細胞長軸に平行に伸びる細胞板が、細胞赤道面に沿って折れることがあった (図 6-1)。この現象は、拡大中の細胞板が偶然転回し、細胞長軸に平行に近い状態で拡大している時しか観測できないが、今までに 10 例ほど観測できている。いずれの場合もやはり赤道面かその近辺で隔膜形成体が赤道面に沿うように折れ曲がるのが観察できた。これは、支持なく拡大中だった隔膜形成体が、赤道面にある何らかの要素に触れることで、CDZ のマーカーの通りに拡大方向を誘導される状態に切り替わり、その時点から赤道面に合わせた細胞板挿入を実行するためこのような形になるのだと考えられる。第 4 章で示したように、分裂装置が復帰しない細胞では、CDZ

近傍に環状の actin 繊維の集積が見られた (図 4-4)。このことから、赤道面には薄い円盤状の細胞質が存在する可能性がある。細胞端から拡大してきた細胞板がこの部分に達すると、細胞板の拡大が細胞質の円盤に沿うように、すなわち直角に方向転換するのではないだろうか。この時、細胞板の端が CDZ から伸びている actin 繊維と融合するとも考えられる。この actin 繊維が牽引力を発生していれば細胞板は全体が転回するはずだが、円盤状の細胞質に接した部分以外の細胞板がすでに親細胞の細胞膜に融合して固定されていれば転回は起こらないはずであり、その結果が細胞赤道面で直角に折れ曲がった細胞板なのではないかと考えられる。

### 異常な繊維塊について

分裂装置が移動した細胞において、CDZ にしばしば GFP-fimbrin の繊維塊が見られた (図 6-2)。これは、本来 actin band になるべく CDZ に集積していた actin 繊維が正常に band 状にならずにただ一カ所に集まってしまったものだと考えられる。また、稀に CDZ 以外にも繊維塊は見られた (図 6-3)。これらの繊維塊と接続した繊維を含む構造の移動がみられることがあった (図 6-2,3)。これらのことから、細胞質分裂期の CDZ には actin 繊維集積能があることと、異常化してはいるが CDZ 周辺の actin 繊維には細胞質を引き寄せるような力が備わっていることが想像できる。

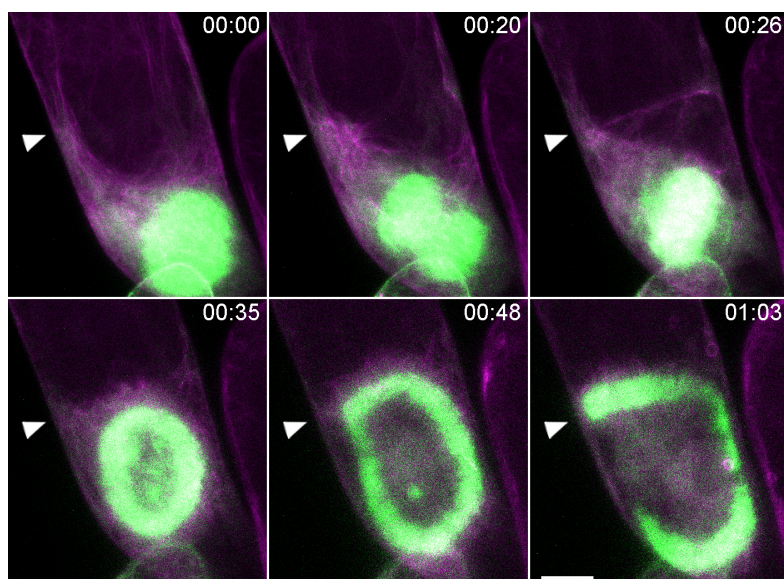
### その他の可能性の検討

細胞板の CDZ への誘導の機構として、細胞板拡大方向の制御が考えられる。細胞板はゴルジ体由来の小胞が融合して形成される。actin 繊維は細胞板と CDZ の間を繋いでいた。このことから、actin 繊維に沿って原形質糸としての細胞質が存在するはずである。ゴルジ小胞は細胞質に存在するので、必然的に細胞板の拡大は原形質糸に沿って起こるはずである。このようなことが現実に起こっているかもしれないが、この説では分裂装置の移動は説明できない。

また、分裂装置の細胞中央への移動は、遠心によってその構築が乱された液胞の復帰に伴うものだという可能性も考えられる。タバコ培養細胞 BY-2 では、液胞が非常に発達しており、分裂期には分裂装置は液胞中に浮かんでいる状態である。細胞を遠心すると分裂装置は液胞中を縦断するため、液胞の構造が乱されると考えられる。乱された液胞が元の構造に復帰する際、移動した分裂装置が細胞中央へ押し上げられる、というものである。しかし、液胞のこのような積極的な構造修復能は知られておらず、またこうした機構によって分裂装置が特異的に細胞中央に復帰することも考えにくい。またこの説は、遠心から一定時間ではなく、分裂周期依存的に分裂装置の復帰が起こるという本研究の考察と矛盾する。



図 6-1

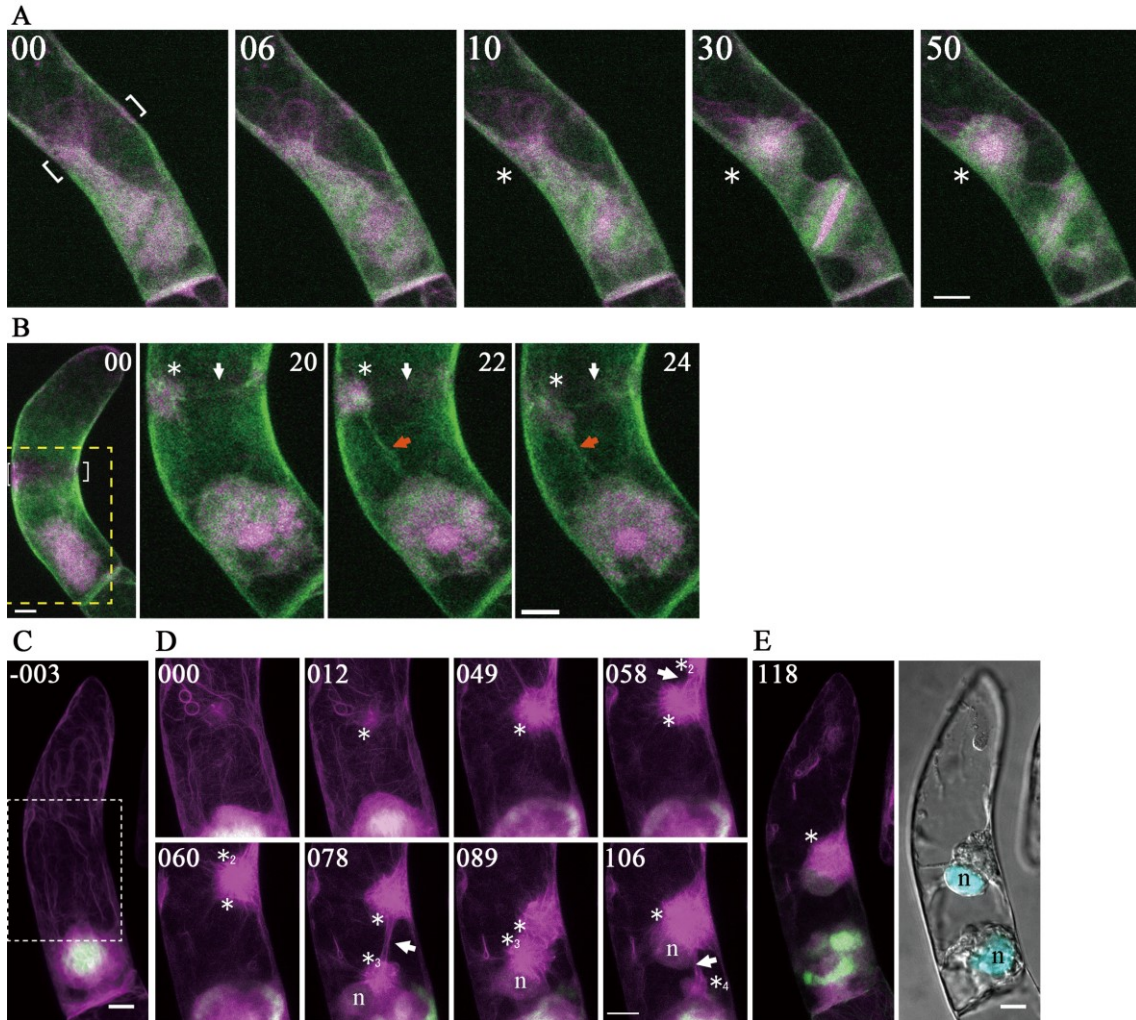


#### 細胞赤道面で曲がる隔膜形成体

遠心により核分裂装置が下方方向に移動した BY-YTHCLR2 細胞の YFP-fimbrin (緑) と lifeact-mCherry (マゼンタ) の蛍光の time-lapse 像。右上の数字は観察開始からの時間 (時:分)。矢尻は細胞赤道面。00:20=染色体の分離、00:28~00:35=細胞板拡大期、00:48=隔膜形成体が赤道面で方向を変えた時点、01:03=拡大終了の少し前、折れ曲がった隔膜形成体が存在している。Scale bar=10  $\mu\text{m}$ 。



図 6-2

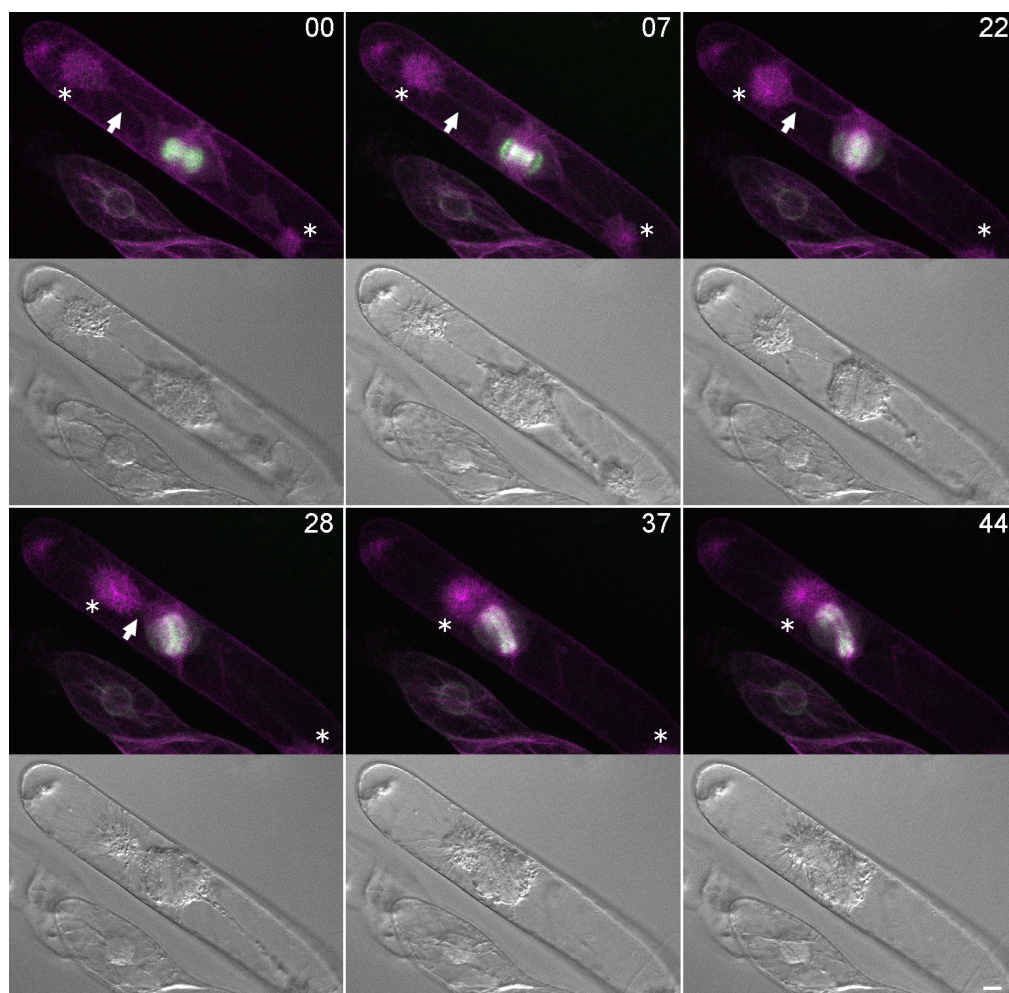


**CDZ に現れる球状の繊維塊**

(A) 遠心により核分裂装置が下方方向に移動した BY-GF11 細胞の GFP-fimbrin (緑) と FM 4-64 (マゼンタ) の蛍光の time-lapse 像。角括弧は ADZ の位置、アスタリスクは球状の繊維塊をそれぞれ示す。左上の数字は観察開始からの時間 (分)。00 (分) = 分裂中期、06 = 後期、10 = 細胞板形成開始、30 ~ 50 = 細胞板拡大期。(B) 遠心により核分裂装置が下方方向に移動した BY-GF11 細胞の GFP-fimbrin (緑) と FM 4-64 (マゼンタ) の蛍光の time-lapse 像。右上の数字は観察開始からの時間 (分)。00 (分) = 核分裂前、20 ~ 24 = 細胞板拡大期。20 分以降のパネルは 00 分のパネルの破線矩形内の拡大像。角括弧は ADZ の位置、アスタリスクは球状塊をそれぞれ示す。白矢印は赤道面上の actin 繊維、橙矢印は繊維塊と隔膜形成体の間を繋ぐ actin 繊維。(C ~ E) 遠心により核分裂装置が下方方向に移動した BY-YTHCLR2 細胞の time-lapse 像。右上の数字は観察開始からの時間 (分)。n は核、アスタリスクは球状の繊維塊、白矢印は繊維塊同士を繋ぐ actin 繊維をそれぞれ示す。(C) 細胞全体の YFP-fimbrin (緑) と lifeact-mCherry (マゼンタ) の蛍光像。(D) C の破線矩形内を拡大した time-lapse 像。矢印は繊維塊を繋ぐように現れた actin 繊維を示す。000 (分) =

分裂中期、012=後期、049~078=細胞板拡大期、089~106=細胞質分裂終了後。CDZに発生した繊維塊が肥大化していくと同時に、小さい繊維塊や他の細胞質の繊維と接続した。小さい塊は大きい塊に引き込まれるように動き、一塊となっていた。核の周りの繊維とも接続し、最終的には核が引き寄せられるように繊維塊の場所へと移動した。(E) 分裂終了後 (Dの撮影開始から118分後)の細胞。左はYFP-fimbrin (緑) lifeact-mCherry (マゼンタ)の蛍光像、右は微分干渉像とH2B-tdCFP 蛍光 (水色)の像を重ねたもの。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

図 6-3



#### 球状の繊維塊へ引き寄せられる隔膜形成体

遠心していない BY-YTHCLR2 細胞の YFP-fimbrin (緑) と lifeact-mCherry (マゼンタ) の蛍光の time-lapse 像。右上の数字は観察開始からの時間 (分)。アスタリスクは繊維塊、矢印は繊維塊と隔膜形成体を繋ぐ actin cable をそれぞれ示す。00 (分) = 分裂後期、07 = 細胞板形成開始、22~44 = 細胞板拡大期。細胞の両端付近に actin 繊維の球状塊が出来ており、その片方と形成を開始した隔膜形成体が繊維で繋がる。その後、繊維塊と隔膜形成体がお互いに引き合うように双方動き、くっつく。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

## 第7章 総合討論

### 遠心による分裂装置の移動とその復帰の比較法の開発

本研究では、一段階同調と二段階同調を用いて細胞分裂中期に調製した BY-2 細胞を整列処理後に遠心して分裂装置を細胞の一端に移動させ、その後細胞を培養することで (図 2-3)、本来の分裂位置である細胞赤道面から外れた位置にある分裂装置が赤道面に戻る様子を観察する、あるいは分裂装置周辺の多量の細胞骨格に邪魔されずに CDZ 近傍の細胞骨格系を細胞周期の進行に伴って観察する系を確立できた。これによって、BY-2 細胞において、細胞質分裂期特異的な細胞質中及び細胞膜上の actin 繊維の構築の変化と、それと同時に分裂装置の復帰が起こるということがわかった。また、aphidicolin のみを用いた一段階同調と、propyzamide を併せて用いた二段階同調において、遠心直後の紡錘体の位置と、培養 1 時間後の細胞板の位置を比較することで、過去の示唆されてきた PPB が細胞板挿入位置決定に必須である可能性 (Mineyuki 1999) をタバコ培養細胞 BY-2 においても明確に示した。このように、細胞板挿入位置決定に関わる特定の因子の寄与に関して、その影響を統計的に調べることができる系が確立できた。したがって、今まで細胞板挿入位置決定に関わるだろうという報告がある物質 (Walker et al. 2007, Cleary and Smith 1998, Xu et al. 2008, Yabuuchi et al. 2015, Lipka et al. 2014, Wu and Bezanilla 2014) 等に対する遺伝学的、薬理的な手法と、この比較法を組み合わせることによって、各物質がどの程度細胞板挿入位置決定に寄与しているかを定量的に確かめ、より中心的な役割を担う決定因子を絞り込むことができると思われる。当然、新規な関連因子の探索にも有効だと考えられる。

### 細胞質分裂装置の位置の矯正/保持における「遂行」の機構

従来の細胞板挿入位置の研究では、CDZ の位置の「決定」やその位置の「記憶」の機構が注目されてきた。しかし、通常状態では位置異常を修正する為の復帰移動が小さいので、分裂装置を正しい位置に保つ機構は詳しく分析されてこなかった。紡錘体と拡大中の隔膜形成体の位置は、たとえ人為的な操作がなくとも、偶発的、または計画的に傾くことがある (Sano et al. 2012, Kojo et al. 2014, Palevitz and Hepler 1974)。このことから、細胞質分裂中の復帰機構は、植物細胞の細胞質分裂装置の位置や向きの修正に重要な役割を果たしているように思われる。これに関連して、復帰移動は植物細胞に元々備わっている機能であり、細胞の遠心という人為的な操作によってのみ起こる現象ではないと思われる。

本研究では、CDZ と移動した隔膜形成体を接続する actin cable が CDZ と隔膜形成体の特定の場所から生じていることが明らかとなった (図 4-2)。このことは、この actin 繊維の関連する機構が復帰の過程を進行することに関わっていることを示唆している。これまで、植物の細胞板挿入位置の決定には、PPB やその前後に現れる物質に関わる分裂位置が等分裂か不等分裂か、細胞長軸に対して平行か垂直か出来上がる細胞板がまっすぐか曲がっているか等を組織の目的別に最初に「決定」する過程と、そこに残されたマーカー物質によってその位置を細胞質分裂期まで「記憶」する過程が存在しているとされてきた。偶発的な力



が働き、紡錘体の位置に異常が生じた場合でも、本来の分裂位置にはマーカー物質が存在しており、細胞板は導かれて正しい位置で分裂が起こると思われる。孔辺細胞形成時の細胞板 (Palevitz and Hepler 1974) がそうであるように、細胞板位置を修正する機構は普段より働いていると考えられる。本研究ではこの偶発的な分裂装置の位置の異常を、遠心により人工的に確実に発生させることで、定量的な比較や、その状態の観察を可能にした。このとき、マーカー物質の位置に従って細胞板の位置誘導が働いていると考えられる。これは新たに「力」を発生させる段階であり、「記憶」とは明らかに別の分類だと思われる。そこで、私はこれを、「決定」「記憶」に次ぐ第3の段階として、実際に物理的な力を働かせ、記憶された位置へと細胞板を導くことによって分裂を正しく「遂行」する過程と定義することを提唱する。ただし、「記憶」の一部段階と「遂行」の段階は交代ではなく同時に起こっていることになる。CDZと隔膜形成体の中の actin cable がおそらくこの過程で重要な役割を担っている。

### 細胞質分裂期の actin 繊維の役割

本研究では、遠心で移動させた分裂装置と CDZ を結ぶ actin cable を明確に観察することができ、また、actin 重合阻害剤である latrunculin B が分裂装置の CDZ への復帰を阻害するという結果を得た。actin の重合や脱重合の阻害によって細胞板の位置異常が起こることは過去にも報告されており (Hoshino et al. 2003, Sano et al. 2005, Kojo et al. 2013, 2014)、actin 繊維が CDZ と繋がっているという報告は昔からなされていた (例えば Lloyd and Traas 1988 の Figure 6)。本研究の結果を踏まえると、actin 重合阻害による細胞板位置の異常の発生が、ADZ や twin-peaks の破壊によるものなのか、CDZ と隔膜形成体の中を繋ぐ actin cable の阻害によるものなのか、その両方なのかをはっきりさせることが重要だと考えられる。

他方、ADZ の発見 (Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992) 以降、actin 繊維がどのように actin 繊維が存在していない CDZ と繋がっているのかが疑問になっていた。妥当な解釈としては、actin cable は ADZ には接続しておらず、ADZ の外側の actin 繊維の多い領域と繋がっているというものがある (例えば Smith 2001 の Figure 3)。BY-2 細胞の twin-peaks はこの考え方に合致する (Sano et al. 2012)。それに対して、ムラサキツユクサの雄蕊の毛の細胞では、分裂終期の ADZ の中に actin 繊維の斑点が見られたという報告 (Valster and Hepler 1997) や、BY-2 において CDZ の中に myosin VIII が局在しているという報告 (Wu and Bezanilla 2014) もあり、これは CDZ の内側の表層から actin cable が伸びていることを支持している。本研究では、細胞板形成開始時点で、CDZ が actin のない状態 (ADZ) から actin 繊維に満ちた状態 (actin band) へと劇的に変化する様子を鮮明に記録した。このとき同時に twin-peaks も消失していた。これらの観察結果は、actin cable の表層の接続位置が CDZ の内側であることを強く支持している。

以上の私の見解をまとめたものが図 7-1 である。CDZ の actin 繊維は、細胞分裂前期前

には PPB と同様の配置をしており (図 7-1i)、分裂中期に入ると ADZ や twin-peaks を形成する (図 7-1ii)。そして細胞質分裂期になると、ADZ に actin 繊維が再び分布すると共に、twin-peaks の actin 繊維は減って (図 7-1iii~iv)、逆に CDZ に顕著な集積を見せ (図 7-1v)、この集積と細胞板の間に actin cable が接続される (図 7-1vi)。分裂が完全に終了すると、actin 繊維の配置は表層にランダムに配置され、細胞質中を張り巡らさる間期の状態に戻る (図 7-1vii)。

細胞質分裂期の CDZ に actin 繊維が局在することから、CDZ のマーカー物質、もしくはそれに結合する物質が actin 結合タンパク質であり、表層の actin 繊維はこれによって CDZ に固定されていると考えられる。これを検証する方法として、細胞膜ゴーストを用いた実験が考えられる。細胞膜ゴーストはカバーガラスに細胞膜を除去した細胞であるプロトプラストを貼りつけ、付着部分の細胞膜だけをカバーガラスに残したものである (Sonobe and Takahashi 1994)。細胞膜ゴーストでは、細胞膜の内側が露出しているため、分裂期の細胞から細胞膜ゴーストを調製すれば、CDZ に存在する actin 結合タンパク質が露出しているはずである。既存の actin を塩、actin 脱重合剤などで除去した後、精製した actin を細胞膜ゴーストに加えることで、CDZ 特異的に actin 繊維が再結合する可能性がある。細胞膜ゴーストからタンパク質を抽出し、actin 結合タンパク質の生化学的な同定も可能かもしれない。さらに、同定された actin 結合タンパク質と相互作用するタンパク質を探索していくことで、細胞板挿入位置決定機構の上流、すなわち、「決定」と「記憶」の機構の解明につながることも期待できる。

遠心によって細胞端に移動した分裂装置が細胞中央へ移動する現象 (第 3 章) や、細胞板の傾きが変わる現象 (図 4-2) には、なんらかの物理的な力が働いていると考えられる。また、図 6-3 は異常な現象ではあるが、CDZ 近傍の actin 繊維には牽引力を発生させる機構が備わっていると考えられる。これらのことから、正常な細胞においても、細胞板と CDS を繋ぐ actin 繊維には牽引力が発生している可能性が高い。細胞質分裂期の CDZ に myosin が局在する (Wu and Bezanilla 2014) という報告もあり、この牽引力は actin-myosin 系によっても発生していると予測される。これを検証する方法として、レーザーアブレーションが考えられる。CDZ と移動や転回中と考えられる分裂装置を繋ぐ actin cable をレーザーで切断し、その後の分裂装置の動きから、どのような力が働いていたかを明らかにできるのではないだろうか。

今まで述べてきたように、本研究では新たな観察技法を開発することで、植物細胞における細胞板挿入位置の決定に関する新たな概念を提示するに至った。本研究の成果は、前段で述べたような解析によって、植物の細胞分裂を通じた形態形成機構のより深い理解につながるものであると考える。

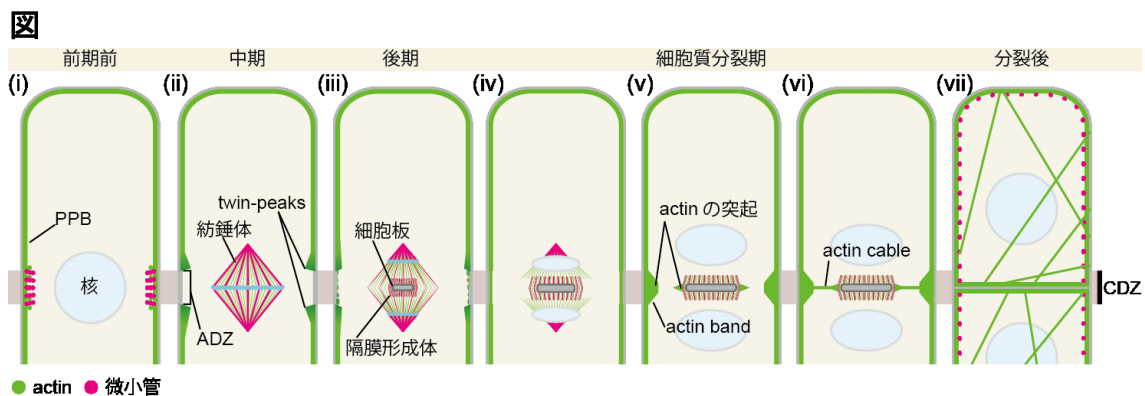


図 7-1

細胞分裂中の CDZ 周辺の actin 繊維の動向の模式図

緑は actin 繊維、マゼンタは微小管。細胞分裂前期前に、actin 繊維は CDZ の表層領域に存在している (i)。中期には、これらは消失し、ADZ と twin-peaks が形成されている (ii)。細胞板の形成開始時点には、actin 繊維は再出現し (iii)、CDZ 上に突起を形成する (v)。次に、actin cables が形成されて CDZ 上の actin 繊維の突起と細胞質分裂装置を接続する (vi)。細胞板形成完了後、actin 繊維は中期の actin 繊維の配置へと再構築される (vii)。

## 参考文献

- Cleary, A. L., Gunning, B. E. S., Wasteneys, G. O. and Hepler, P. K. (1992) Microtubule and F-actin dynamics at the division site in living *Tradescantia* stamen hair cells. *J. Cell Sci.* 103:977–988.
- Cleary, A. L. and Smith, L. G. (1998) The *Tangled1* gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays associated with cell division during maize leaf development. *Plant Cell* 10: 1875–1888.
- Goosen-de Roo, L. , Bakhuizen, R., van Spronsen, P. C. and Libbenga, K. R. (1984) The presence of extended phragmosomes containing cytoskeletal elements in fusiform cambial cells of *Fraxinus excelsior* L. *Protoplasma* 122:145–152.
- Green, P. B. (1962) Mechanism for plant cellular morphogenesis. *Science* 138(3548):1404–1405.
- Gunning, B. E. S. (1982) The cytokinetic apparatus: its development and spatial regulation. In *The cytoskeleton in plant growth and development*, Lloyd, C. W. (ed), Academic Press, London, pp 229–292.
- Gunning, B. E. S. and Wick, S. M. (1985) Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis. *J. Cell Sci.* 1985 (Supplement 2):157–179.
- Hasezawa, S., Sano, T. and Nagata, T. (1994) Oblique cell plate formation in tobacco BY-2 cells originates in double preprophase bands. *J. Plant Res.* 107:355–359.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T. and Hasezawa, S. (2008) Quantitative analysis of changes in actin microfilament contribution to cell plate development in plant cytokinesis. *BMC Plant Biol.* 8:80.
- Hoshino, H., Yoneda, A., Kumagai, F. and Hasezawa, S. (2003) Roles of actin-depleted zone and preprophase band in determining the division site of higher-plant cells, a tobacco BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Protoplasma* 222:157–165.
- Kakimoto, T., Shibaoka, H. (1987) Actin filaments and microtubules in the preprophase band and phragmoplast of tobacco cells. *Protoplasma* 140:151–156.
- Kakimoto, T., Shibaoka, H. (1988) Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nuclei complexes isolated from cultured tobacco cells. *Protoplasma* (Suppl. 2):95–103.
- Karahara, I., Staehelin, L. A. and Mineyuki, Y. (2012) The role of endocytosis in the creation of the cortical division zone in plants. In Ceresa, B. (ed) *Molecular Regulation of Endocytosis*, InTech, Croatia, pp 41–60.
- Kojo, K. H., Higaki, T., Kutsuna, N., Yoshida, Y., Yasuhara, H. and Hasezawa, S. (2013) Roles of cortical actin microfilament patterning in division plane orientation in plants. *Plant Cell Physiol.* 54:1491–1503.
- Kojo, K. H., Yasuhara, H. and Hasezawa, S. (2014) Time-sequential observation of



- spindle and phragmoplast orientation in BY-2 cells with altered cortical actin microfilament patterning. *Plant Signal. Behav.* 9:e29579.
- Kumagai, F., Yoneda, A., Tomida, T., Sano, T., Nagata, T. and Hasezawa, S. (2001) Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells. *Plant Cell Physiol.* 42:723–732.
- Lipka, E., Gadeyne, A., Stöckle, D., Zimmermann, S., De Jaeger, G., Ehrhardt, D. W., Kirik, V., Van Damme, D. and Müller, S. (2014) The phragmoplast-orienting kinesin-12 class proteins translate the positional information of the preprophase band to establish the cortical division zone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 26:2617–2632.
- Liu, B. and Palevitz, B. A. (1992) Organization of cortical microfilaments in dividing root cells. *Cell Motil. Cytoskel.* 23:252–264.
- Lloyd, C. W., Traas, J. A. (1988) The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. *Drug studies. Development* 102:211–221.
- Lloyd, C.W. and Chan, J. (2008) The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(6):641-646.
- Lyndon, R. F. (2012) *Plant development: the cellular basis* (Vol. 3). Springer Science & Business Media, Berlin.
- 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. and Gunning, B. E. S. (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., Murata, T. and Wada, M. (1991) Experimental obliteration of the preprophase band alters the site of cell division, cell plate orientation and phragmoplast expansion in *Adiantum protonemata*. *J. Cell Sci.* 100:551–557.
- Mineyuki, Y., Tamaoki, D., Umamo, K. and Ishiwata, K. (2017) Global-local Live Imaging Microscope (GLIM) system to record the local molecular dynamics and the whole cell events in parallel at a one-minute time-resolution. *Microscopy* 66 S1:i35.
- Mohr, H. and Schopfer, P. (1992) *Pflanzenphysiologie*. Springer-Lehrbuch, Berlin.
- Molchan, T. M., Valster, A. H. and Hepler, P. K. (2002) Actomyosin promotes cell plate alignment and late lateral expansion in *Tradescantia* stamen hair cells. *Planta* 214:683–693.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays

- with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Murata, T. and Wada, M. (1991) Effects of centrifugation on preprophase-band formation in *Adiantum protonemata*. *Planta* 183:391–398.
- Murata, T. and Wada, M. (1997) Formation of a phragmosome-like structure in centrifuged protonemal cells of *Adiantum capillus-veneris* L. *Planta* 201:273–280.
- Nagata, T., Okada, K. and Takebe, I. (1982) Mitotic protoplasts and their infection with tobacco mosaic virus RNA encapsulated in liposomes. *Plant Cell Rep.* 1:250–252.
- Ôta, T. (1961) The role of cytoplasm in cytokinesis of plant cells. *Cytologia* 26:428–447.
- Palevitz, B. A. and Hepler, P. K. (1974) The control of the plane of division during stomatal differentiation in *Allium*. II. Drug studies. *Chromosoma* 46:327–341.
- Sano, T., Hayashi, T., Kutsuna, N., Nagata, T. and Hasezawa, S. (2012) Role of actin microfilaments in phragmoplast guidance to the cortical division zone. *Curr. Top. Plant Biol.* 13:87–94.
- Sano, T., Higaki, T., Oda, Y., Hayashi, T. and Hasezawa, S. (2005) Appearance of actin microfilament ‘twin peaks’ in mitosis and their function in cell plate formation, as visualized in tobacco BY-2 cells expressing GFP-fimbrin. *Plant J.* 44:595–605.
- Schaefer, E., Belcram, K., Uyttewaal, M., Duroc, Y., Goussot, M., Legland, D., Laruelle, E., der Tazua-Moreau, M.-L., Pastuglia, M. and Bouchez, D. (2017) The preprophase band of microtubules controls the robustness of division orientation in plants. *Science* 356:186–189.
- Shibaoka, H. (1972) Gibberellin-colchicin interaction in elongation of azuki bean epicotyl sections. *Plant Cell Physiol.* 13:461–469.
- Sinnott, E. W. (1960). *Plant morphogenesis*. McGraw-Hill Book Company, Inc, New York.
- Smertenko, A. (2018) Phragmoplast expansion: the four-stroke engine that powers plant cytokinesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* in press.
- Smertenko, A., Assaad, F., Baluška, F., Bezanilla, M., Buschmann, H., Drakakaki, G., Hauser, M.-T., Janson, M., Mineyuki, Y., Moore, I., Müller, S., Murata, T., Otegui, M. S., Panteris, E., Rasmussen, C., Schmit, A.-C., Šamaj, J., Samuels, L., Staehelin, A., Van Damme, D., Wasteneys, G. and Žárský, V. (2017) Plant cytokinesis: terminology for structures and processes. *Trends Cell Biol.* 27:885–894.
- Smith, L. G. (2001) Plant cell division: building walls in the right places. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:33–39.
- Sonobe, S. and Takahashi, S. (1994) Association of microtubules with the plasma membrane of tobacco BY-2 cells in vitro. *Plant Cell Physiol.* 35:451–460.

- Tamaoki, D. and Mineyuki, Y. (2012) A microscope system for recording the local structural dynamics and the whole cell events in parallel. *Plant Morph.* 24:13–17 [in Japanese].
- Valster, A. H. and Hepler, P. K. (1997) Caffeine inhibition of cytokinesis: effect on the phragmoplast cytoskeleton in living *Tradescantia* stamen hair cells. *Protoplasma* 196:155–166.
- Van Damme, D., Gadeyne, A., Vanstraelen, M., Inzé, D., Van Montagu, M. C., De Jaeger, G., Russinova, E and Geelenc, D. (2011) Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:615–620.
- Vanstraelen, M., Van Damme, D., Rycke, R. D., Mylle, E., Inzé, D. and 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, K. L., Müller, S., Moss, D., Ehrhardt, DW. and Smith, L. G. (2007) Arabidopsis TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Curr. Biol.* 17:1827–1836.
- Wu, S.-Z. and Bezanilla, M. (2014) Myosin VIII associates with microtubule ends and together with actin plays a role in guiding plant cell division. *eLife* 3:e03498.
- Xu, X. M., Zhao, Q., Rodrigo-Peiris, T., Brkljacic, J., He, C. S., Müller, S. and Meier, I. (2008) RanGAP1 is a continuous marker of the *Arabidopsis* cell division plane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:18637–18642.
- Yabuuchi, T., Nakai, T., Sonobe, S., Yamauchi, D. and Mineyuki, Y. (2015) Preprophase band formation and cortical division zone establishment: RanGAP behaves differently from microtubules during their band formation. *Plant Signal. Behav.* 10:e1060385.
- Yasuhara, H. and Kitamoto, K. (2014) Aphidicolin-induced nuclear elongation in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 55:913–927.

本研究の一部は *J. Plant Res.* に投稿し、掲載されている。

「Displacement of the mitotic apparatuses by centrifugation reveals cortical actin organization during cytokinesis in cultured tobacco BY-2 cells」

(<https://doi.org/10.1007/s10265-018-1047-4>)

巻末にその原稿を付録する。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、以下の方々にお世話になった。

馳澤盛一郎 教授（東京大学）と安原裕紀 博士（関西大学）には、実験に用いるタバコ培養細胞の遺伝導入株をそれぞれ提供いただいた。

峰雪芳宣 教授と中井朋則 博士（生体高分子生合成）、玉置博士（富山大学）が開発したGLIM顕微鏡を使用させていただいた。

野中茂紀 博士（基礎生物学研究所）には実験を通してアドバイスをいただいた。

吉久徹 教授、園部誠司 先生、横田悦雄 先生（兵庫県立大学）、新免輝男 先生には、研究生活において直接詳しい指導をいただいた。

**Displacement of the mitotic apparatuses by centrifugation reveals cortical actin organization during cytokinesis in cultured tobacco BY-2 cells**

Corresponding author: Seiji Sonobe;

mailing address, Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo,

Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo, 678-1297 Japan;

phone number, +81-791-58-0176; fax number, +81-791-58-0175;

e-mail address, sonobe@sci.u-hyogo.ac.jp;

Membership holders: K. Arima, D. Tamaoki, Y. Mineyuki, H. Yasuhara, T. Shimmen, S. Sonobe.

Subject areas: (3) Morphology/Anatomy/Structural Biology.

Number of tables: 0.

Number of black and white figures: 1.

Number of color figures: 4.

Authors: Kengo Arima\*, Daisuke Tamaoki\*, Yoshinobu Mineyuki, Hiroki Yasuhara, Tomonori Nakai, Teruo Shimmen, Tohru Yoshihisa and Seiji Sonobe

\*equal contribution

**Title: Displacement of the mitotic apparatuses by centrifugation reveals cortical actin organization during cytokinesis in cultured tobacco BY-2 cells**

Affiliations and addresses:

K. Arima, T. Shimmen, T. Yoshihisa, S. Sonobe

Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo, 678-1297 Japan.

D. Tamaoki

Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, Gofuku 3190, Toyama-shi, Toyama 930-8555, Japan.

D. Tamaoki, Y. Mineyuki, T. Nakai

Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Shosha 2167, Himeji, Hyogo, 671-2201 Japan.

D. Tamaoki, Y. Mineyuki

JST SENTAN, Japan

H. Yasuhara

Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Suita, Osaka, 564- 8680 Japan.

**Abstract**

In plant cytokinesis, actin is thought to be crucial in cell plate guidance to the cortical division zone (CDZ), but its organization and function are not completely understood. To elucidate actin organization during cytokinesis, we employed an experimental system, in which the mitotic apparatus is displaced and separated from the CDZ by centrifugation and observed using a global-local live imaging microscope that enabled us to record behavior of actin filaments in the CDZ and the whole cell division process in parallel. In this system, returning movement of the cytokinetic apparatus in cultured-tobacco BY-2 cells occurs, and there is an advantage to observe actin organization clearly during the cytokinetic phase because more space was available between the CDZ and the distantly formed phragmoplast. Actin cables were clearly observed between the CDZ and the phragmoplast in BY-2 cells expressing GFP-fimbrin after centrifugation. Both the CDZ and the edge of expanding phragmoplast had actin bulges. Using live-cell imaging including the global-local live imaging microscopy, we found actin filaments started to accumulate at the actin-depleted zone when cell plate expansion started even in the cell whose cell plate failed to reach the CDZ. These results suggest that specific accumulation of actin filaments at the CDZ and the appearance of actin cables between the CDZ and the phragmoplast during cell plate formation play some important roles in the

guidance of cell plate edges to the CDZ.

**Keywords**

actin cable, actin-depleted zone, tobacco BY-2 cells, cortical division zone, global-local live imaging microscope, plant cytokinesis.

## Introduction

In plant morphogenesis, the cell division site is important for the design of tissue morphology and its function, and thought to be predetermined before the mitotic phase by the preprophase band (PPB) appearing on the future division site (Mineyuki 1999). The PPB controls the robustness of the division orientation (Schaefer et al. 2017). The cortical division zone (CDZ) is established during PPB formation, is maintained even after its disappearance, and functions in the guidance of the cell plate to the correct site in telophase (Mineyuki and Gunning 1990, Van Damme et al. 2011). However, the mechanism underlying establishment of the CDZ is not understood yet. Experimental manipulations of the CDZ, such as physical puncture at the CDZ (Gunning and Wick 1985), obliteration of PPB by light (Mineyuki et al. 1991) or PPB formation at an aberrant position by centrifugation (Murata and Wada 1991), caused unusual expansion of the cell plate suggesting involvement of the CDZ in the guidance of cell plate edges to the correct site.

CDZ maintains distinct molecular composition from other plasma membrane regions during metaphase–telophase (Smertenko et al. 2017). These molecules are microtubule-associated protein TANGLED (Walker et al. 2007, Cleary and Smith 1998), Ran GTPase activating protein RanGAP1 (Xu et al. 2008, Yabuuchi et al. 2015), phragmoplast-orientating kinesins (POKs) (Lipka et al. 2014), and myosin VIII (Wu and Bezanilla 2014). Because genetic or pharmacological ablation of these proteins caused misplacement of the cell plate, they are thought to be involved in memorization of the division site. In addition, some negative markers of the CDZ are known; characteristic cell surface status lacking particular components, such as the actin-depleted zone (ADZ), where actin is absent from the CDZ during mitosis (Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992), and the KCA-depleted zone, where kinesin like protein KCA1 is absent from the CDZ (Vanstraelen et al. 2006). Twin-peaks, which are the actin filament (AF) bands on the cell cortex just outside of the ADZ, are also reported in cultured-tobacco BY-2 cells (Sano et al. 2005). In spite of these findings of molecules and structures, we can not entirely explain how the cell plate is inserted to the correct site.

Previously, the presence of AFs (Goosen-de Roo 1984, Kakimoto and Shibaoka 1987, Hasezawa et al. 1994, Molchan et al. 2002, Lloyd and Traas 1988, Sano et al. 2012) and microtubules (Goosen-de Roo 1984, Lipka et al. 2014) between the CDZ and the expanding phragmoplast was reported. They are thought to be essential in maintaining the cell plate positioning and its normal architecture, but how these cytoskeletal filaments connect the CDZ and the phragmoplast remained unsolved, because the expanding phragmoplasts in normal cells are too close to the CDZ to observe these filaments in detail. In an onion guard mother cell, the cell plate rotates from oblique to longitudinal direction in telophase to be parallel to the lateral cell wall, and this rotational movement is inhibited by an actin inhibitor cytochalasin B (Palevitz and Hepler 1974). This report suggested that actin plays a crucial role in guidance of the cell plate to the CDZ, but the relationship between the CDZ and the actin cytoskeleton is still unclear. In *Tradescantia* stamen hair cells, cortical actin patches are often observed within the CDZ in the late stages of cytokinesis and are thought to play a role in guidance of the phragmoplast and cell plate expansion (Valster and Hepler 1997).



Investigations of precise function of markers for the positional memory by genetic or pharmacological approaches have been attempted. However, misplacement of the cell plate was observed in only a limited number of cells under observation, and the cell plates in the majority of cells were formed at the correct site (Vanstraelen et al. 2006, Sano et al. 2005, Kojo et al. 2013, 2014, Molchan et al. 2002, Wu and Bezanilla 2014, Walker et al. 2007, Cleary and Smith 1998, Lipka et al. 2014). These results may reflect the situation that the mitotic/cytokinetic apparatuses, such as the spindle and the phragmoplast, are usually positioned at the equatorial plane of the mother cell, and misplacement from the center occurs accidentally. Therefore, it would be hard to evaluate actual contribution of the marker molecules to determination of the cell division site. To overcome this difficulty, we tried to construct an experimental system, in which mitotic cells are centrifuged to displace the mitotic apparatus from its intrinsic site and followed returning of the apparatus and cell plate formation. Previously, Ota (1961) reported that the spindle returned to the original position during anaphase–telophase after centrifugation of the stamen hair cells in metaphase. Therefore, we expected that memorization of the future division site in the plant cell is not disturbed by centrifugation.

In this study, we examined actin organization during cell plate formation by live-cell imaging using an experimental procedure employing centrifugation, to obtain a large quantity of cytokinetic cells with the displaced mitotic/cytokinetic apparatus from synchronized cultured tobacco BY-2 cells, in which effective procedures for cell cycle synchronization have been established (Nagata et al. 1982, Kakimoto and Shibaoka 1988). In addition, transgenic BY-2 cell lines expressing fluorescent protein-fused markers for microtubules and AFs are available to carry out live-cell imaging (Sano et al. 2005, Yasuhara and Kitamoto 2014). To examine actin organization during cytokinesis of the centrifuged BY-2 cells, we employed not only a conventional point-scanning confocal microscope but also a global-local live imaging microscope (GLIM) system (Tamaoki and Mineyuki 2012, Mineyuki et al. 2017), which was developed to record local molecular/structural dynamics at the higher magnification (local event) and the whole cell event at the lower magnification (global event) in parallel in one system. Combination of these techniques enabled us to observe the organization of AFs on the CDZ during cytokinesis in detail.

## Materials and Methods

### *Plant materials*

Tobacco BY-2 cells (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) were cultured in the modified Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog et al. 1962, Nagata et al. 1982) at 27 °C in the dark on the rotary shaker at 120 rpm. Cell suspensions were diluted 95-fold with the medium at weekly intervals.

Transgenic cell lines BY-GF11, which expresses a GFP-fimbrin fusion protein (Sano et al. 2005), and BY-GT16, which expresses a GFP-tubulin fusion protein (Kumagai et al. 2001), were kindly provided by Prof. S. Hasezawa (The University of Tokyo). Another transgenic cell line BY-YTHCLR2, which expresses a yellow fluorescent protein (YFP)- $\beta$ -tubulin, Lifeact-mCherry and histone H2B-tdCFP (tandem dimer cyan fluorescent protein) simultaneously was obtained as previously described (Yasuhara and Kitamoto

2014).

#### *Cell cycle synchronization*

One-step cell cycle synchronization was performed according to Nagata et al. (1982). Fifteen milliliter of 7-day-old BY-2 cells were transferred into 95 ml of a fresh medium and cultured for 24 h with final concentration of 7.7  $\mu$ M aphidicolin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). The cells were washed with 3 % sucrose solution 5 times and then resuspended in the fresh medium. We used the cells 7.5–8 h after washing. Two-step synchronization was performed according to Kakimoto and Shibaoka (1988). Following 4–5 h after washing aphidicolin as the one-step method, final concentration of 4.8  $\mu$ M propyzamide (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) was added to the cell suspensions. After 4–5 h incubation, the cells were washed with 3 % sucrose solution and resuspended in the fresh medium. This inhibition term includes the time corresponding to the PPB-formation phase in the one-step method. We used the cells 30 min after release from propyzamide. Mitotic indexes were approximately 60 % (one-step) and 90 % (two-step), respectively.

#### *Displacement of mitotic apparatuses by centrifugation*

A cover slip coated with 0.25 % (w/v) polyethyleneimine was set on the lower pit of a slope (Supplementary Fig. S1a-A), and 1 ml of cell suspension was applied onto the upper region of the slope, and then 1 ml of the fresh culture medium was applied (Supplementary Fig. S1a-B). This process was carried out twice so that cells could attach to the cover slip in the lower pit.

The cover slip with cells was set perpendicularly on a stand in a centrifuge tube filled with the culture medium (Supplementary Fig. S1b) and centrifuged at 1,600 $\times$ g for 3 min at 27 °C. To incubate the cells after centrifugation, the cover slip was put into a multi-well tissue culture plate (Tissue culture plate, 6 well, Corning Inc., New York, New York, USA) filled with the culture medium and incubated at 27 °C in the dark on the rotary shaker at 100 rpm. For microscope observations, the cover slip with cells was set on the observation chamber (Supplementary Fig. S1c).

To evaluate positioning of the mitotic/cytokinetic apparatuses in the cells after centrifugation or incubation, we equally partitioned each cell into three regions along with its longitudinal axis, mapped the center of the spindle or cell plate in each cell, and counted the cells that have the apparatuses in the middle region of the cells. We counted at least 100 cells on each cover slip picked from each time point.

#### *FM 4-64 staining*

The cell plate was visualized according to Higaki et al. (2008) using a styryl dye *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide (FM 4-64, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) at 16  $\mu$ M of final concentration.

### *Immuno-staining*

To visualize the microtubules in the non-transgenic BY-2 cells, we used immuno-staining. The cells on the cover slips 30 min after centrifugation were incubated with enzyme solution [0.1%(w/v) Cellulase Onozuka RS, (Wako Pure Chemical Industries), 0.02%(w/v) Pectolyase Y-23, (Wako Pure Chemical Industries), 0.06 M sorbitol, pH 5.5] for 5 min. The cells were fixed with formalin solution [3.6%(v/v) formaldehyde, (Wako Pure Chemical Industries), 0.1%(v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), in phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)] for 1 h. The fixed cells were incubated with a primary antibody solution containing a mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin antibody (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) for 1 h and then with a secondary antibody solution containing Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen) for 1 h.

### *Microscopy*

To perform live-cell imaging, we prepared an incubation chamber for microscopic observation (Supplementary Fig. S1c). We filled the chamber with the culture medium. Samples were observed under fluorescence microscopes (BX60 and BX50, Olympus, Tokyo, Japan) or under a point-scanning confocal microscope (LSM510, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany and TCS SP8, Leica, Wetzlar, Germany). The GLIM system (Tamaoki and Mineyuki 2012, Mineyuki et al. 2017) was setup on an inverted microscope equipped with two camera ports (ECLIPSE Ti, Nikon Corp., Tokyo, Japan). One camera port was used for the optical path of global imaging (Optical system 1) and another for that of local imaging (Optical system 2). Outline of the GLIM system used in this experiment is shown in Supplementary Fig. S2. A point-scanning confocal microscope system with a green (543 nm) He-Ne laser (C1plus, Nikon Corp.) was set to acquire a wide field image (global image) and an EM-CCD camera (iXon<sup>EM+</sup> DU-897E-CS0-#BV, Andor Technology Ltd., Belfast, UK) with a 2.5 $\times$  additional magnification lens [C-mount TV adapter VM2.5 $\times$  (MQD42120), Nikon Corp.] was used to acquire a high magnification image (local image). A spinning-disk scanning unit (CSU-X1-M, Yokogawa Electric Corp., Tokyo, Japan) with a 488-nm solid-state laser (Sapphire 488-20 CDRH laser, Coherent, Inc., Santa Clara, California, USA) was set between the camera and the magnification lens. Custom-made software (GLIM software, Mitani Corporation, Fukui, Japan) was used for switching the optical paths, filters and light sources smoothly. The GLIM software directly controls devices for local imaging and indirectly controls global imaging system via EZ-C1 Software (Nikon Corp.). The above pieces of software were operated in Windows XP installed on a PC.

### *Image processing*

We analyzed the recorded images using Fiji ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) and rendered 3-dimensional images using FluoRender (<http://www.sci.utah.edu/software/fluorender.html>).

## **Results**

*Returning of the mitotic apparatus after centrifugal displacement in synchronized BY-2 cells*

We compared positions of the spindles just after centrifugation of BY-2 cells synchronized either by the one-step method or the two-step method with those of the cell plates 1 h after centrifugation (Fig. 1). Immediately before centrifugation, 95% and 97% of the cells synchronized by the one-step and two-step methods, respectively, harbored their spindles at the middle position. Without centrifugation, the cell plate was formed at the middle position in 95% and 91% of the cells synchronized by the one-step and two-step methods, respectively (Fig. 1c). Just after centrifugation, 82 % of cells synchronized by the one-step method had the displaced spindles (Fig. 1a, c). After 1 h incubation, the ratio of cells having the cell plates in the middle region was about 70 % (Fig. 1a, c). This means that more than 60 % of the displaced mitotic/cytokinetic apparatuses returned to the middle region of the cells and suggests that the mechanism underlying memorization of the cell plate insertion site is not disturbed by the centrifugation, and that BY-2 cells synchronized by the one-step method are equipped with a mechanism to bring the displaced mitotic/cytokinetic apparatuses back to the predetermined division site according to the “memory” even though the mitotic apparatuses were enforced to move to the either end of the cells.

On the other hand, in cells synchronized by the two-step method using a microtubule inhibitor propyzamide, 89 % of cells had displaced spindles just after centrifugation, and 86 % of cells had the cell plates in the displaced region even after 1 h incubation (Fig. 1b, c), that is, the recovery of the cytokinetic apparatus position to the middle region did not occur. During two-step synchronization, disappearance of PPB microtubules in preprophase (Supplementary Fig. S3) occurred.

*Kinetics of the returning movement of mitotic apparatus*

To investigate the returning process of displaced mitotic/cytokinetic apparatuses to the original position, BY-GF11 cells, expressing GFP-fimbrin fusion proteins, were synchronized by the one-step method and were subjected to live-cell imaging. Sano et al. (2005) demonstrated that structures labeled by GFP signals in the BY-GF11 cells were mostly co-stained with rhodamine-phalloidin and that both of the structures disappeared upon cytochalasin treatment, indicating that GFP-fimbrin indeed labels most of AFs in the BY-GF11 cells. As shown in Fig. 2 and Supplementary Movie S1, the mitotic/cytokinetic apparatus stayed for a while at the displaced position after centrifugation (Fig. 2a, 00:00:00–00:22:30), and then began to move after the end of anaphase (Fig. 2a, 00:27:30–01:26:00; Fig. 2c, d, arrows) at an approximate speed of 0.35  $\mu\text{m min}^{-1}$ . Just before the beginning of this movement, intensity of FM 4-64 fluorescence became high at the middle portion of the mitotic/cytokinetic apparatus (Fig. 2a, 00:27:30), indicating initiation of cell plate formation. The expanding cell plate, depicted by a flattened fluorescence signal of FM 4-64, moved toward the middle region of the cell (Fig. 2a, 00:27:30 and 00:43:00).

In the live-imaging experiments, the frequency of the cells that formed their cell plate at the CDZ (the former ADZ) as shown in Fig. 2, was 6%. In 45% of the cells, their displaced apparatuses did not move at all (Supplementary Fig. S4a; Supplementary Movie S2), and in 49% of the cells, displaced apparatus

showed incomplete returning to the correct division site (Supplementary Fig. S4b; Supplementary Movie S3). As described in the previous section (Fig. 1), the frequency of cells whose cell plate returned back to the proper position was around 70%, while that in live-imaging experiments was only 6%. This discrepancy might be due to cell damage caused by frequent exposure to laser irradiation during live-imaging.

#### *Actin organization during returning movement*

Next, we focused on actin organization in the returning movement. During returning movement of the displaced phragmoplast to the CDZ, we found that actin cables connecting the CDZ and the phragmoplast appeared (Fig. 2b). However, it was difficult to follow detailed organization of these actin cables in the cells of which the cytokinetic apparatuses completely returned to the original division plane, because abundance in actin-containing structures around the mitotic/cytokinetic apparatus disturbed observation as shown in Fig. 2. The displacement procedure had another advantage, that is, these complicated actin-containing structures were eliminated from vicinity of the CDZ, and this enabled us to observe the cytoskeletal network around this zone more clearly, especially in cells showing incomplete returning. In the cell shown in Fig. 3 and Supplementary Movie S4, one side of the cell plate had already attached to the parental cell wall at the basal region, but the other side was expanding to the CDZ. This phragmoplast changed its expanding direction to the CDZ. During this movement, actin bulges appeared at both the edges of the expanding phragmoplast (Fig. 3b, yellow arrows) and the CDZ (Fig. 3a, yellow arrows), and finally, actin cables linked these bulges. However, it is difficult to distinguish whether the actin cables consisted of only AFs extended either from the CDZ or from the phragmoplast, or from both.

To examine whether microtubules also exist in the cytoplasmic strands connecting between the CDZ and the phragmoplast in the centrifuged cells, we first observed BY-GT16 cells, which express GFP-tubulin, after their cytokinetic apparatus was displaced by the centrifugation. Although phragmoplast microtubules were clearly detectable, it was hard to see filamentous structures in the strands between the cell cortex and the phragmoplast (Supplementary Fig. S5a). Next, we examined microtubule distribution in centrifuged BY-2 cells by immuno-staining. In these cells, we could neither detect microtubule connections between the CDZ and the well-expanded phragmoplast in the centrifuged cells (Supplementary Fig. S5c). Of note, we confirmed the presence of microtubules in cytoplasmic strands of pre-mitotic cells by both methods (Supplementary Fig. S5b, d), indicating that the absence of microtubule structures in the centrifuged cells could not be attributable to any technical errors.

Interestingly, in cells whose cell plate did not reach the CDZ, a band-like accumulation of actin was observed at inside of their CDZs at the onset of telophase or just after focusing of FM 4-64 fluorescence signals on a straight line representing the beginning of cell plate expansion (Fig. 4a; Supplementary Movie S5). Three-dimensional observation of the band-like structure showed that the band consisted of randomly oriented cortical AFs and protruding into inside the cell (Supplementary Movie S6). Microscopic images and quantitative evaluation of fluorescence signals clearly indicate that the position of this actin band (Fig.

4a, white arrow; Fig. 4b, cyan arrow) corresponds to that of the ADZ (Fig. 4a, b, brackets). Indeed, the ADZ and the twin-peaks (Sano et al. 2005) seem to disappear in the frame of 8 or 10 min, and an actin band is visible in the frame of 24 min in Fig. 4a. Another example of the replacement of ADZ with the actin band is shown in Fig. 4c. In this cell, the cell plate was inserted obliquely far from the CDZ suggesting that the actin band can form independently from the phragmoplast. Judging from FM 4-64 staining in Fig. 4a, the ADZ and the twin-peaks are considered to disappear just before beginning of the cell plate expansion. These observations showed that the band-like AFs in the CDZ appeared at the initial stage of the cytokinesis and disappeared at the end of the cytokinetic phase (Fig. 4c; Supplementary Movie S7).

#### *Cortical actin organization around the CDZ observed on the GLIM system*

To examine relationships between changes of actin organization in the CDZ and that of the configuration in mitotic/cytokinetic apparatus more in detail, we introduced the GLIM system (Supplementary Fig. S2). Using this system, we could record the disappearance/re-appearance of cortical AFs in the CDZ and the structural changes in the mitotic/cytokinetic apparatus in parallel throughout the cell division of non-centrifuged cells (supplementary Fig. S6). The transversely aligned actin band (PPB actin) was clearly seen in prophase (-01:28:00 in Supplementary Fig. S6b), but the fluorescence signal of AFs in the CDZ started to decrease in late prophase (Supplementary Fig. S6c). When the nuclear envelope began to break down (prophase/prometaphase transition), most of the AFs were depleted from the CDZ to form the ADZ (-01:03:00 in Supplementary Fig. S6b).

As the ADZ was more clearly detectable in centrifuged cells (Fig. 5; Supplementary Fig. S7) than in the non-centrifuged cells (Supplementary Fig. S6), we examined the process of AF re-appearance in the CDZ of centrifuged cells with or without returning of their cytokinetic apparatuses using the GLIM system. AFs in the outside of the CDZ, where twin-peaks are usually located, were prominent in cells with the ADZ (-18:00 in Fig. 5e; -20:00 in Supplementary Fig. S7e). The ADZ and AFs outside the CDZ were kept until some stage of telophase (-04:30 in Fig. 5e; -04:00 in Supplementary Fig. S7e). AFs re-appeared in the CDZ a few min before the appearance of the cell plate (00:00 in Fig. 5e; 00:00 in Supplementary Fig. S7e), and prominent AFs were not observed anymore on the outside of the CDZ a few min after the appearance of the cell plate (05:00 in Fig. 5e; 05:00 in Supplementary Fig. S7e). Similar results were also observed in non-centrifuged cells (00:00:00 and 00:02:30 in Supplementary Fig. S6e). The prominent fluorescence signal of AFs also became visible in the central region of the CDZ (00:27:30 in Supplementary Fig. S6e) in the non-centrifuged cell as well as the cell whose cytokinetic apparatus returned after centrifugation. In the final stage of the cytokinesis, reorganization of AFs in the CDZ was difficult to observe, because signals of AFs on the CDZ became buried in the strong AF signals from the phragmoplast approaching to the CDZ (00:27:30 in Supplementary Fig. S6e; 26:30 in Supplementary Fig. S7e). On the other hand, in the cell whose cytokinetic apparatus did not return, reorganization of AFs on the CDZ was clearly traceable until the end of cytokinesis (26:00 in Fig. 5e). Based on observations of this type of cells in which the

phragmoplast edge attached apart from the CDZ, we concluded that AFs appeared in the middle part of the CDZ, and they expanded to the outside of the CDZ to form the actin band.

## Discussion

### *A new approach analyzing the cell plate positioning*

After centrifugation of cultured BY-2 cells synchronized by the one-step method with aphidicolin, efficient returning of the displaced cytokinetic apparatuses to the middle region of the cells was observed (Fig. 1a, c), while strong perturbation in returning of the mitotic/cytokinetic apparatuses was observed when the cells were synchronized by the two-step method using aphidicolin and propyzamide (Fig. 1b, c). The PPB was not properly formed during the two-step synchronization (Supplementary Fig. S3), as reported by Vanstraelen et al. (2006)(see below). We think that the defect of returning of the apparatuses is due to the absence of the PPB microtubules, although a possibility that it is caused by disturbance of mitotic and cytokinetic processes through pretreatment with propyzamide can not be completely excluded.

Observation of the returning movement after centrifugation is one of the effective methods to evaluate mechanisms of cell plate guidance. Our approach enables to analyze a large number of synchronized cells whose mitotic/cytokinetic apparatus is displaced from the intrinsic insertion site. Thus, it will provide excellent opportunities to evaluate effects of genetic and pharmacological perturbations of the molecules/structures involved in “determination” and “memorization” quantitatively.

Local live images obtained using the GLIM enable to examine changes in AF organization in detail (Supplementary Fig. S6), and the comparison of local images with global images helps to determine when changes of AF organization occurred. Combination of this live imaging method with the centrifugal method described here enables us to see more clearly how ADZ is replaced with the actin band in the CDZ (Fig. 5 and Supplementary Fig. S7).

### *Actin organization in returning movement*

Although AFs have been observed between the CDZ and the expanding phragmoplast (Goosen-de Roo et al. 1984, Kakimoto and Shibaoka 1987, Hasezawa et al. 1994, Molchan et al. 2002, Lloyd and Traas 1988, Sano et al. 2012), the organization of these AFs had not been properly analyzed, because the expanding phragmoplast is too close to the CDZ to observe AFs related to the cell plate guidance. Displacement of the mitotic apparatuses by centrifugation makes a clear region in the cytoplasm surrounding the CDZ. This enabled us to observe AFs emanating from the phragmoplast and those from the CDZ clearly (e.g. Figs. 3–5).

In addition, we found transient appearance of an actin band at the CDZ, where the ADZ existed, during the cell plate expansion, and this actin band disappeared at the end of cytokinesis (Fig. 4a, c). The actin band was more clearly observed in cells in which the phragmoplast did not return (Fig. 3; Supplementary Movie S6). Confocal microscopy revealed that the actin band consists of filamentous actin. Judging from

cortical actin organization (Fig. 5), the actin band at the CDZ in centrifuged cells might correspond to actin appeared at the ADZ in non-centrifuged cells. Because the actin band was present only during the cytokinetic phase, its formation is thought to be under cell cycle regulation, and it may be one of the intrinsic features for the cytokinesis. In the region where the actin band appears, some activities of actin polymerization and/or AF assembly might be elevated during the cytokinetic phase. On the other hand, in cells in which the actin cables were observed between the CDZ and the phragmoplast, actin bulges appeared at both the CDZ and the edge of the expanding phragmoplast (Fig. 2b, 3). We speculate that this actin bulge at the CDZ corresponds to a part of the actin band. In this context, the actin band might function as a scaffold of actin cables, and thus, the cell plate would be brought to the correct site by the actin cables. We could not exclude the possibility that the actin band observed in centrifuged cells is artifactually induced by centrifugal treatment. However, increment of GFP signals in the CDZ after cell plate appearance in the kymograph of a non-centrifuged cell (Supplementary Fig. S6e) supports the possibility that the actin band also exists even in non-centrifuged cells although the optical conditions are worse in non-centrifuged cells than in centrifuged cells. Appearance of actin-containing structures after centrifugation of mitotic cells was also reported in *Adiantum* protonemal cells (Murata and Wada 1997), but they did not observe the actin band in the cortical region.

It is indistinct whether inhibition of actin polymerization and depolymerization (Hoshino et al. 2003, Sano et al. 2005 and Kojo et al. 2013, 2014) leads misplacement of the cell plate via disruption of ADZ/twin-peaks or via inhibition of formation of the actin cables linking the CDZ and the phragmoplast. In the earlier work, actin cables were thought to connect to the CDZ (e.g. Figure 6 in Lloyd and Traas 1988). After the discovery of the ADZ (Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992), a question how actin cables can attach to the CDZ where actins are excluded, has arisen. The plausible explanation is that the actin cables do not connect to the ADZ but connect to the actin-rich region outside the ADZ (see e.g. Figure 3 in Smith 2001). The twin-peaks in tobacco BY-2 cells favor this idea (Sano et al. 2012). In contrast, observation of cortical actin patches within the ADZ in telophase in *Tradescantia* stamen hair cells (Valster and Hepler 1997) and the localization of myosin VIII inside the CDZ in tobacco BY-2 cells (Wu and Bezanilla 2014) favor the idea that actin cables extend to the cortex inside the CDZ. In the present study, we clearly showed that drastic change of the CDZ from the actin-excluded region (ADZ) to an actin-rich region (actin band) occurs when the cell plate starts to develop. The twin-peaks disappeared at a similar time point. These observations strongly support the idea that the anchoring site of the actin cables in the cell cortex is inside the CDZ. Supplementary Fig. S8 is a schematic depiction of AF organization on the CDZ during cell division. AFs exist in similar distribution of microtubules in PPB at preprophase, and then become absent from the CDZ (the ADZ) and form the twin-peaks in mitotic phase. At beginning of cytokinesis, AFs are re-organized at the CDZ and decrease at the twin-peaks. Subsequently, AFs accumulate at the CDZ and the actin cables connect between this accumulation and the cytokinetic apparatus. After the end of cell plate formation, the organization of AFs shift to the typical pattern seen in the interphase.



Although microtubules are also reported to be in transvacuolar strands (phragmosome) connecting the phragmoplast and the CDZ in some highly vacuolated cells (Goosen-de Roo et al. 1984; Lipka et al. 2014), microtubules were not observed between the phragmoplast and the CDZ from metaphase to cytokinetic phase in BY-2 cells (Sano et al 2012). This observation was also confirmed in our experiments (Supplementary Fig. S5). Therefore, microtubules might not take part in the cell plate guidance to the CDZ. Sano et al (2012) reported that microtubules appeared along with AFs at the final stage of cytokinesis and suggested a role of AFs for the guidance of these microtubules extension. It is possible that microtubules play a crucial role in the fixation of the position of the cell plate at the final stage of the cytokinesis.

#### *A process of “achievement” in correction/maintenance of the position of the cytokinetic apparatus*

Previous studies on positioning of the cell plate insertion site have been focused on the mechanisms of “determination” and “memorization” of the CDZ. However, the mechanism to keep the mitotic/cytokinetic apparatus at the precise position has not been analyzed in detail, because returning movement to compensate positional deviation is thought to be small under usual conditions. Positions of the spindle and the expanding phragmoplast are accidentally/intentionally tilted even without any artificial manipulation (Sano et al. 2012, Kojo et al. 2014; Palevitz and Hepler 1974; Karahara et al. 2012). Therefore, the returning mechanism during cytokinesis is likely to play an important role to restore the precise position and orientation of the cytokinetic apparatuses in plant cells. In this context, returning movement might be an intrinsic property of the plant cell, but not an artificial phenomenon.

In our study, actin cables connecting the CDZ and the displaced phragmoplast emanated from specific anchoring sites on the CDZ and the phragmoplast (Fig. 3), suggesting that this actin-related system might act to drive the returning process. We define this process as “achievement” of correct cytokinesis, that is, carrying out the cell plate positioning at the site that is determined and memorized by processes of “determination/memorization.” Actin cables between the CDZ and the phragmoplast probably play an important role in this process.

#### **Acknowledgement**

We thank Prof. S. Hasezawa (The University of Tokyo) for providing BY-GF11 cells. We also thank Dr. E. Yokota (University of Hyogo) and Dr. S. Nonaka (National Institute for Basic Biology) for fruitful discussions. We also thank Mr. Katsumoto Umamo (Mitani Corporation) and Mr. Kazuyuki Ishiwata (Nikon Instech Co. Ltd.) for their collaboration for the development of the GLIM system.

#### **References**

- Cleary AL, Gunning BES, Wasteney 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
- Cleary AL, Smith LG (1998) The *Tangled1* gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays

- associated with cell division during maize leaf development. *Plant Cell* 10: 1875–1888
- Goosen-de Roo L, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Libbenga KR (1984) The presence of extended phragmosomes containing cytoskeletal elements in fusiform cambial cells of *Fraxinus excelsior* L. *Protoplasma* 122:145–152
- Gunning BES, Wick SM (1985) Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis. *J Cell Sci* 1985 (Supplement 2):157–179
- Hasezawa S, Sano T, Nagata T (1994) Oblique cell plate formation in tobacco BY-2 cells originates in double preprophase bands. *J Plant Res* 107:355–359
- Higaki T, Kutsuna N, Sano T, Hasezawa S (2008) Quantitative analysis of changes in actin microfilament contribution to cell plate development in plant cytokinesis. *BMC Plant Biol* 8:80
- Hoshino H, Yoneda A, Kumagai F, Hasezawa S (2003) Roles of actin-depleted zone and preprophase band in determining the division site of higher-plant cells, a tobacco BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Protoplasma* 222:157–165
- Kakimoto T, Shibaoka H (1987) Actin filaments and microtubules in the preprophase band and phragmoplast of tobacco cells. *Protoplasma* 140:151–156
- Kakimoto T, Shibaoka H (1988) Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nuclei complexes isolated from cultured tobacco cells. *Protoplasma* (Suppl 2):95–103
- Karahara I, Staehelin LA, Mineyuki Y (2012) The role of endocytosis in the creation of the cortical division zone in plants. In Ceresa (ed) *Molecular Regulation of Endocytosis*, InTech, Croatia, pp 41–60
- Kojo KH, Higaki T, Kutsuna N, Yoshida Y, Yasuhara H, Hasezawa S (2013) Roles of cortical actin microfilament patterning in division plane orientation in plants. *Plant Cell Physiol* 54:1491–1503
- Kojo KH, Yasuhara H, Hasezawa S (2014) Time-sequential observation of spindle and phragmoplast orientation in BY-2 cells with altered cortical actin microfilament patterning. *Plant Signal Behav* 9:e29579
- Kumagai F, Yoneda A, Tomida T, Sano T, Nagata T, Hasezawa S. (2001) Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells. *Plant Cell Physiol* 42:723–732
- Lipka E, Gadeyne A, Stöckle D, Zimmermann S, De Jaeger G, Ehrhardt DW, Kirik V, Van Damme D, Müller S (2014) The phragmoplast-orienting kinesin-12 class proteins translate the positional information of the preprophase band to establish the cortical division zone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 26:2617–2632
- Liu B, Palevitz BA (1992) Organization of cortical microfilaments in dividing root cells. *Cell Motil Cytoskel* 23:252–264
- Lloyd CW, Traas JA (1988) The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. *Drug studies. Development* 102:211–221

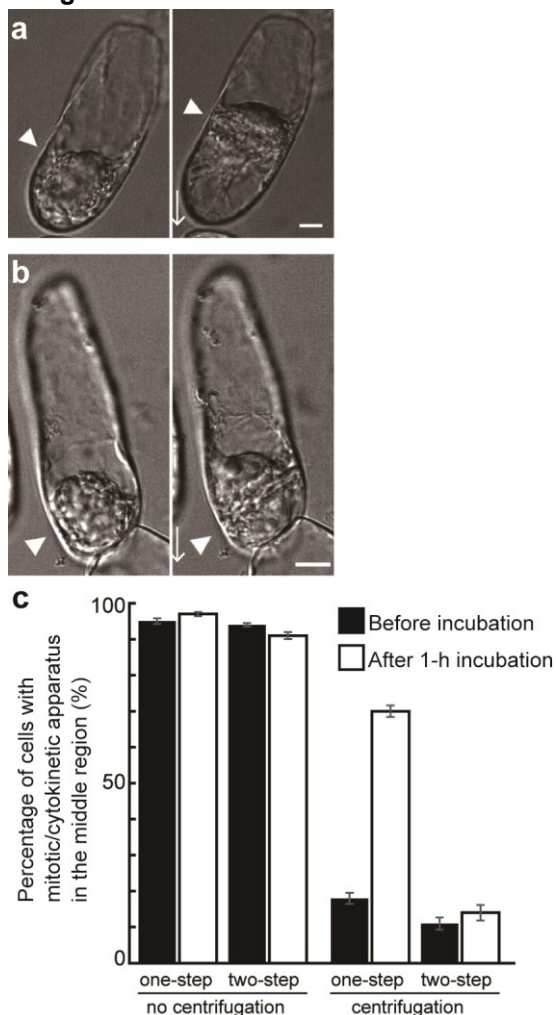
- Mineyuki Y (1999) The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int Rev Cytol* 187:1–49
- Mineyuki Y, Gunning BES (1990) A role for preprophase bands of microtubules in maturation of new cell walls, and a general proposal on the function of preprophase band sites in cell division in higher plants. *J Cell Sci* 97:527–537
- Mineyuki Y, Murata T, Wada M (1991) Experimental obliteration of the preprophase band alters the site of cell division, cell plate orientation and phragmoplast expansion in *Adiantum* protonemata. *J Cell Sci* 100:551–557
- Mineyuki Y, Tamaoki D, Umamo K, Ishiwata K (2017) Global-local Live Imaging Microscope (GLIM) system to record the local molecular dynamics and the whole cell events in parallel at a one-minute time-resolution. *Microscopy* 66 S1:i35
- Molchan TM, Valster AH, Hepler PK (2002) Actomyosin promotes cell plate alignment and late lateral expansion in *Tradescantia* stamen hair cells. *Planta* 214:683–693
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Murata T, Wada M (1991) Effects of centrifugation on preprophase-band formation in *Adiantum protonemata*. *Planta* 183:391–398
- Murata T, Wada M (1997) Formation of a phragmosome-like structure in centrifuged protonemal cells of *Adiantum capillus-veneris* L. *Planta* 201:273–280
- Nagata T, Okada K, Takebe I (1982) Mitotic protoplasts and their infection with tobacco mosaic virus RNA encapsulated in liposomes. *Plant Cell Rep* 1:250–252
- Ota T (1961) The role of cytoplasm in cytokinesis of plant cells. *Cytologia* 26:428–447
- Palevitz BA, Hepler PK (1974) The control of the plane of division during stomatal differentiation in *Allium*. II. Drug studies. *Chromosoma* 46:327–341
- Sano T, Hayashi T, Kutsuna N, Nagata T, Hasezawa S (2012) Role of actin microfilaments in phragmoplast guidance to the cortical division zone. *Curr Top Plant Biol* 13:87–94
- Sano T, Higaki T, Oda Y, Hayashi T, Hasezawa S (2005) Appearance of actin microfilament ‘twin peaks’ in mitosis and their function in cell plate formation, as visualized in tobacco BY-2 cells expressing GFP-fimbrin. *Plant J* 44:595–605
- Schaefer E, Belcram K, Uyttewaal M, Duroc Y, Goussot M, Legland D, Laruelle E, der Touzia-Moreau M-L, Pastuglia M, Bouchez D (2017) The preprophase band of microtubules controls the robustness of division orientation in plants. *Science* 356:186–189
- Smertenko A, Assaad F, Baluška F, Bezanilla M, Buschmann H, Drakakaki G, Hauser M-T, Janson M, Mineyuki Y, Moore I, Müller S, Murata T, Otegui M S, Panteris E, Rasmussen C, Schmit A-C, Šamaj J, Samuels L, Staehelin A, Van Damme D, Wasteneys G, Žárský V (2017) Plant cytokinesis: terminology for structures and processes. *Trends Cell Biol* 27:885–894

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.008>

- Smith LG (2001) Plant cell division: building walls in the right places. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:33-39
- Tamaoki D, Mineyuki Y (2012) A microscope system for recording the local structural dynamics and the whole cell events in parallel. *Plant Morph* 24:13–17 [in Japanese]
- Valster AH, Hepler PK (1997) Caffeine inhibition of cytokinesis: effect on the phragmoplast cytoskeleton in living *Tradescantia* stamen hair cells. *Protoplasma* 196:155–166
- Van Damme D, Gadeyne A, Vanstraelen M, Inzé D, Van Montagu MC, De Jaeger G, Russinova E, Geelen D (2011) Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:615–620
- Vanstraelen M, Van Damme D, Rycke RD, Mylle E, Inzé 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, Müller S, Moss D, Ehrhardt DW, Smith LG (2007) Arabidopsis TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Curr Biol* 17:1827–1836
- Wu S-Z, Bezanilla M (2014) Myosin VIII associates with microtubule ends and together with actin plays a role in guiding plant cell division. *eLife* 3:e03498
- Xu XM, Zhao Q, Rodrigo-Peiris T, Brkljacic J, He CS, Müller S, Meier I (2008) RanGAP1 is a continuous marker of the *Arabidopsis* cell division plane. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:18637–18642
- Yabuuchi T, Nakai T, Sonobe S, Yamauchi D, Mineyuki Y (2015) Preprophase band formation and cortical division zone establishment: RanGAP behaves differently from microtubules during their band formation. *Plant Signal Behav* 10:e1060385
- Yasuhara H, Kitamoto K (2014) Aphidicolin-induced nuclear elongation in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 55:913–927

Figures

**Fig. 1**

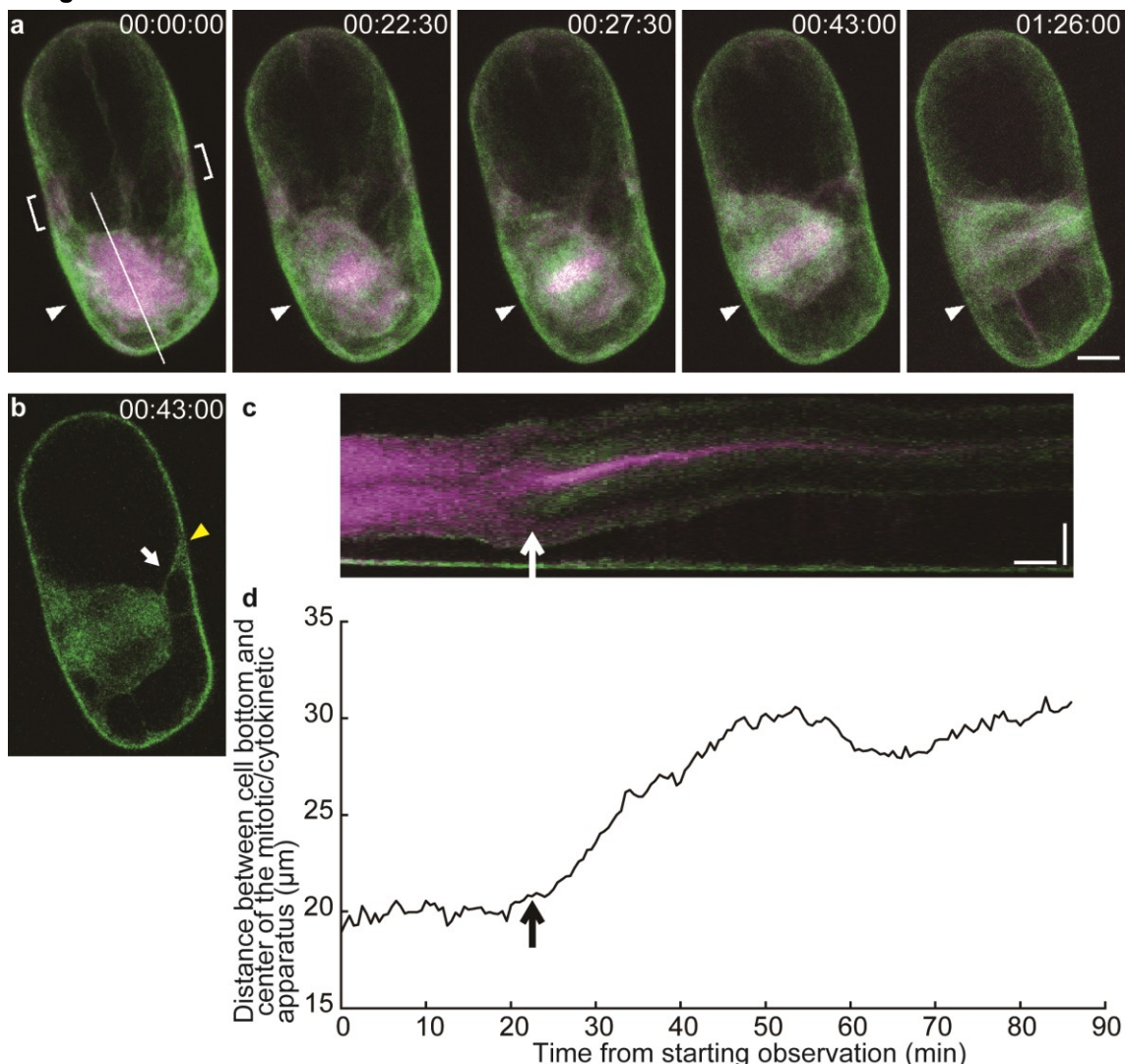


*A comparison of different cell cycle synchronization methods to induce the returning of mitotic/cytokinetic apparatuses back to the middle region. The centrifuged cells were put on an incubation chamber under the microscope and observed just after and 1 h after the centrifugal treatment. (a, b) DIC images of cells just after centrifugation (left) and those 1 h after centrifugation (right). The centrifugal direction is indicated by arrows. Arrowheads indicate the position of the spindle center or that of the cell plate. Scale bars 10  $\mu$ m. (a) A cell synchronized by the one-step method with aphidicolin. (b) A cell synchronized by the two-step method using aphidicolin and propyzamide. (c) A comparison of the above two synchronization procedures in the ratio of cells whose spindle or cell plate positioned in the middle region of the three-partitioned cells (see Materials and Methods). Black and white columns show percentages of cells with the mitotic/cytokinetic apparatuses positioned in the middle region before (black column) and after (white column) 1-h*

*incubation on the cells with/without centrifugation, respectively. Error bars indicate the standard errors of the means (n = 4–10)*

Figures

**Fig. 2**



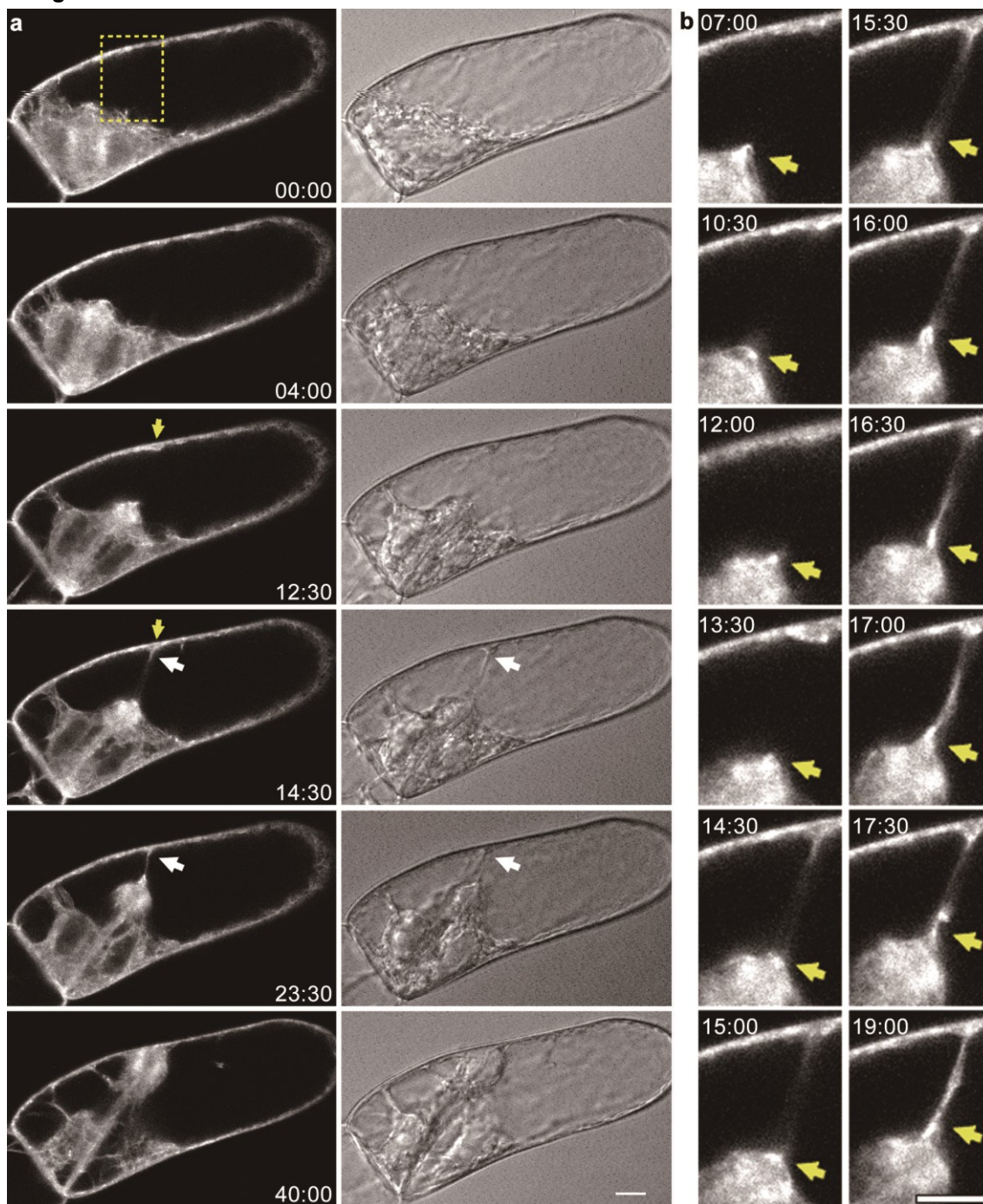
*Returning movement of a mitotic/cytokinetic apparatus in a centrifuged cell.* The centrifuged BY-GF11 cells stained with FM 4-64 were put on an incubation chamber under the microscope and observed. (a) Time-lapse images of FM 4-64 and GFP-fimbrin fluorescence in a cell whose mitotic apparatus was displaced downward by the centrifugation. Green and magenta indicate GFP-fimbrin and FM 4-64 fluorescence, respectively. Each image shows a z-projection of 10 optical sections encompassing 20.9 μm thickness. Numbers in the top right indicate time after starting observation (h:min:s). 00:00:00, metaphase; 00:22:30, anaphase; 00:27:30, fluorescence of FM 4-64 was accumulated in the growing cell plate; 01:26:00, end of cytokinesis. Brackets indicate the position of the ADZ. White arrowheads indicate the position of the center of the spindle at 00:00:00. Scale bar 10 μm. (b) A single section image of GFP-fimbrin at 00:43:00 in (a). An arrow indicates an actin cable connecting the CDZ and the phragmoplast. A yellow arrowhead indicates the actin deposition at the CDZ. (c) A kymograph at the line in (a). Scale bars; vertical bar 10 μm, horizontal bar 5 min. (d) A graph representing changes in distance between the cell bottom and the center of the apparatus along the line in (a). Arrows in (c) and (d) indicate the time point at the end of anaphase

chromosome movement (00:22:30). The corresponding movie is shown in Supplementary Movie S1



Figures

**Fig. 3**



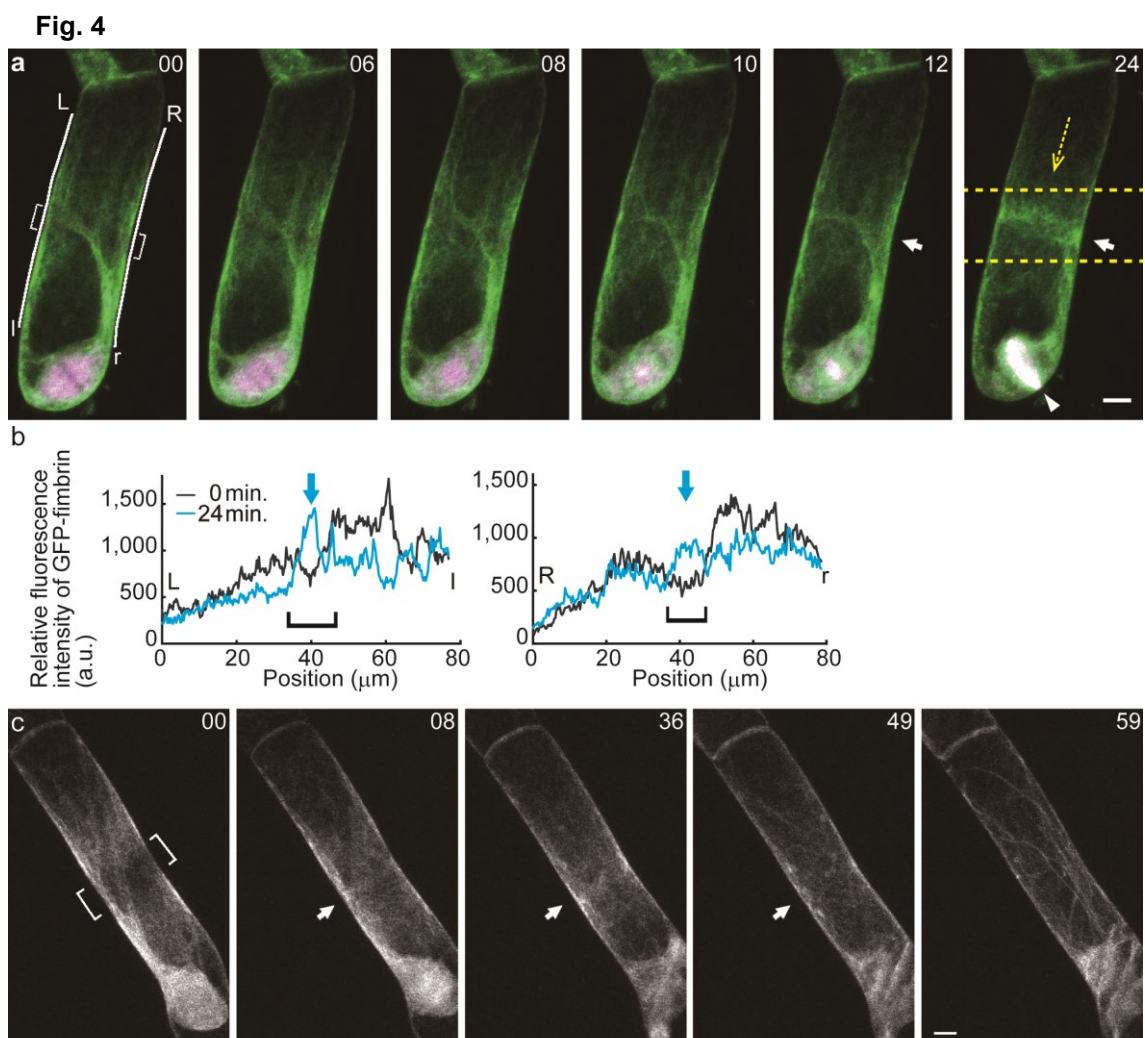
*Development of the actin cable connecting between the CDZ and the phragmoplast during cytokinesis of a centrifuged BY-GF11 cell. A centrifuged BY-GF11 cell was put on an incubation chamber under the microscope and observed. (a) Time-lapse images of GFP-fimbrin fluorescence and DIC images in a cell whose mitotic apparatus was displaced downward by the centrifugation. The left and right panels show GFP-fimbrin fluorescence and DIC images, respectively. Numbers in the bottom right indicate the time after starting observation (min:s). White arrows indicate an actin cable appearing *de novo* between the CDZ and the phragmoplast. Yellow arrows indicate a bulge appearing at the proximal end of the actin cable.*



## Figures

00:00, an early stage of phragmoplast formation; 40:00 phragmoplast attached to the parental cell wall. (b) The enlarged images of the area marked by a yellow dotted rectangle in (a), 00:00. Numbers in the top left indicate the time after starting observation (min:s). Yellow arrows indicate the actin bulge, connecting the actin cable to a leading edge of the phragmoplast. The bulge does not seem to be a part of the anti-parallel actin arrays of the phragmoplast, but looks like an independent structure for positioning the phragmoplast. The corresponding movie is shown in Supplementary Movie S4. Scale bars 10  $\mu\text{m}$

Figures



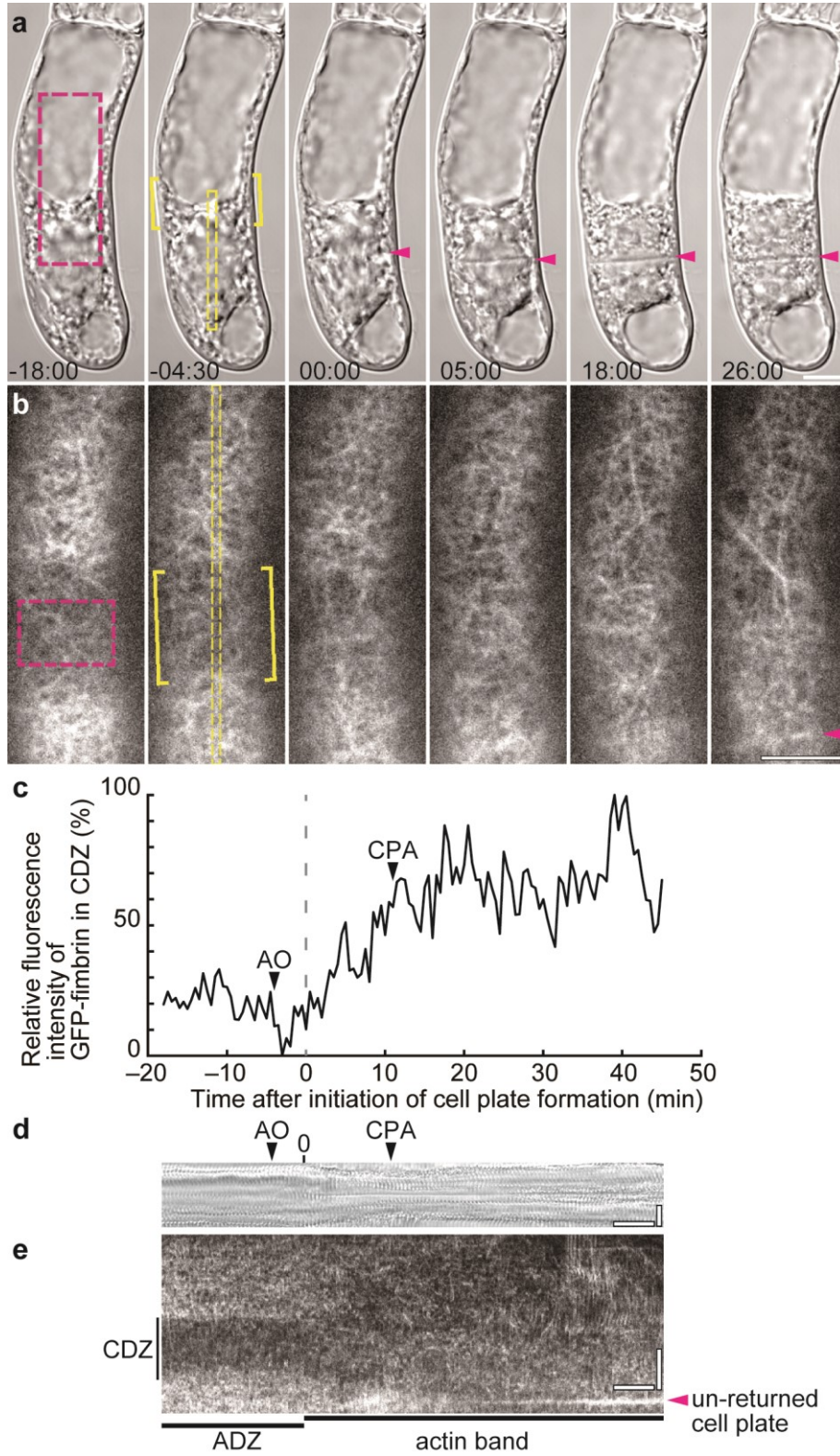
*Transient appearance of an actin band in the CDZ.* Centrifuged BY-GF11 cells stained with or without FM 4-64 were put on an incubation chamber under the microscope and observed. Numbers in the top right in (a) and (c) indicate the time after starting observation (min). (a) Time-lapse images of GFP-fimbrin and FM 4-64 fluorescence in a cell whose phragmoplast (white arrowhead) did not return to the CDZ. Each image shows a z-projection of 13 optical sections encompassing 12.36  $\mu\text{m}$  thickness. Green and magenta indicate GFP-fimbrin and FM 4-64, respectively. Brackets in 00 min indicate the position of the ADZ. Arrows indicate the actin band appeared at early cytokinesis. 00, metaphase; 06, just after anaphase onset; 12, fluorescence of FM 4-64 was visible as a plate shape; 24, cell plate expansion. The corresponding movie is shown in Supplementary Movie S5. A three-dimensional view of a cell part between yellow dotted lines observed from a yellow dotted arrow was reconstructed and shown in Supplementary Movie S6. Scale bar 10  $\mu\text{m}$ . (b) Fluorescence intensity profiles of two intersection lines between the cell cortex and a longitudinal focal plane marked by two white lines (L-l and R-r) at 00 min (black line) and 24 min (cyan line). The left graph corresponds to fluorescence intensity profile of the line L-l, and the right one does to

## Figures

the line R–r. Arrows indicate the actin band appeared at early cytokinesis. (c) Time-lapse images of GFP-fimbrin fluorescence in a cell in which the cell plate was inserted obliquely far from the CDZ. Actin organization in the CDZ is clearly observed. Each image shows a *z*-projection of 18 optical sections encompassing 31.5  $\mu\text{m}$  thickness. Numbers in the top right indicate the time after starting observation (min). Brackets indicate the position of the ADZ. Arrows indicate the actin band. Note that the actin band appeared at the former ADZ. 00, metaphase; 08, just after anaphase onset; 59, end of cytokinesis. The corresponding movie is shown in Supplementary Movie S7. Scale bar 10  $\mu\text{m}$

Figures

**Fig. 5**



*GLIM analysis of AF organization in the CDZ during cytokinesis in a cell whose cell plate did not return to the CDZ. (a, b) Time-lapse images of a whole cell (global images) and CDZ (local images) in a*

## Figures

centrifuged BY-GF11 cell obtained with the GLIM. (a) DIC images of mid-longitudinal optical section of a whole cell. (b) GFP-fimbrin fluorescent images of cell cortex corresponding to the region encircled by a magenta rectangle in (a). The phragmoplast did not return to the CDZ in this cell. Numbers in the bottom left in (a) indicate time after cell plate appearance (min:s). The cell was centrifuged 48-min before 00:00. Magenta arrowheads indicate the cell plate. Yellow brackets indicate the position of the ADZ. –18:00, metaphase; –04:30, anaphase onset; 00:00, just after cell plate appearance; 05:00 and 18:00, cell plate expansion; 26:00, just after the end of cytokinesis. The corresponding movie is shown in Supplementary Movie S9. Scale bar 10  $\mu\text{m}$ . (c) Changes in the relative fluorescence intensity of GFP-fimbrin in the CDZ region enclosed by a magenta rectangle in (b). Arrowhead AO and CPA indicate the times of anaphase onset and cell plate attachment to the parental cell wall, respectively. (d, e) Kymographs in the yellow rectangles in (a) and in (b), respectively. Scale bars; vertical bars 10  $\mu\text{m}$ , horizontal bars 5 min. A vertical black line at the left of (e) indicates the position of the CDZ. A magenta arrowhead indicates the cell plate. Note that the cell plate could not attach to the CDZ. Horizontal black lines at the bottom of (e) indicate existing duration of those structures