分裂準備帯 (preprophase band) と細胞分裂面の確立

峰雪芳宣

兵庫県立大学大学院生命科学研究科ピコバイオロジー専攻 〒671-2280 兵庫県姫路市書写 2167

要旨：多細胞体制の生物の形づくりの研究には、細胞分裂面挿入位置が時間的・空間的にどのように制御されているのかを解明する必要がある。植物の細胞分裂面挿入位置は核分裂前に決定されており、その位置に分裂準備帯 (preprophase band) が出現する。著者は長年様々なイメージング技術を使って分裂準備帯の研究を行って来た。本稿では、その成果を中心に分裂準備帯の形成と機能について解説する。

Preprophase band and division plane establishment

Yoshinobu Mineyuki

Department of Picobiology, Graduate School of Life Science, Univ. of Hyogo, Shosha 2167, Himeji, Hyogo, 980-2280 Japan

Author for correspondence: Y. Mineyuki, mineyuki@sci.u-hyogo.ac.jp

Summary: To elucidate the regulatory mechanism of division plane establishment is necessary for understanding the development of multicellular organism. In plant cells, the division site, the cortical region where cell plate fuses with the parental cell walls, is pre-determined before nuclear division and the preprophase band marks the site in prophase. Here, I review the research on the development and function of preprophase band based on historical background of our research.

Key words: preprophase band, plant division site, cortical division zone, division pattern, tomography

はじめに

植物の細胞は堅い細胞壁で囲まれているため、細胞分裂の際に新しく形成された細胞壁が親の細胞壁とどの位置で接続したかで娘細胞の将来の運命が大きく左右される。そのため、どのようにして細胞分裂の際に細胞分裂面の挿入位置が決定され、細胞板が挿入された後その場所がどのように変化して行くのか、その制御機構を明らかにすることは植物の形態形成を考える上で重要である。図1はオオムラサキツユクサ雄しべの毛の細胞分裂過程を示している。オオムラサキツユクサ雄しべの毛は古くからライブイメージングでの植物細胞分裂研究の材料として知られており、1880年には細胞分裂の全過程を生きたまま追跡したスケッチが記載されている (Strasburger 1880)。もっとも、Harris (1999)によれば、まだ細胞分裂の各過程が認識されていなかった19世紀半ばには、既に現在我々が知っているレベルの正確さのスケッチ (Hofmeister 1849) が存在するようである。前期の細胞 (図1A0)は、核膜の崩壊と仁の消失がほぼ同時に起こり、前中期に入る (図1A13)。前中期に染色体が徐々に赤道面に移動し、中期になる (図1A50)。図1の細胞では細胞の横の幅が狭いため、中期の赤道面は斜めに入っている。後期に入り染色体が両極に移動を開始する (図1A51)と、最初斜めに傾いていた紡錘体が、徐々に染色体の移動に伴って傾きを変更する (図1A51~66)。植物の細胞分裂面は細胞板 (図1A78, cp) が細胞の中央に出現し、遠心的に伸長することで挿入される (図1B上段) ため、植物の細胞分裂面挿入位置 (division site) は、最終的に細胞板が親の細胞壁と接続する場所を指す (Gunning 1982)。この場所がいつ、どのようにして決定されるかという問題に関する最初の重要な発見は、本学会会員の太田敬久博士によつ

てなされた。太田は分裂中のムラサキツユクサ雄しべの毛の細胞の分裂装置を遠心処理により移動させる実験から、植物の分裂面挿入位置は、少なくとも分裂中期以前に決定しており、分裂終期に出現する細胞板は、細胞表層のその位置 (図1A CDZ) に向かって伸張していくと結論づけた (Ôta 1961)。その5年後にPickett-HeapsとNorthcote (1966a, b) が電子顕微鏡観察で、太田が指摘していた細胞表層の位置に核分裂の前に存在する構造として分裂準備帯 (preprophase band; PPB) を発見した。実際には太田のCytologiaの論文は、PPB発見後BusbyとGunning (1980) の論文で紹介されたことで再評価されることになった。

分裂準備帯 (PPB) と分裂面挿入位置 (division site)

PPBは核を取り巻くように細胞表層に並ぶ微小管の帯 (図2) として認識され、発見当時はpreprophase band of microtubulesと表記されていた。しかし、PPBには微小管以外にも小胞やアクチン、その他の分子が存在することが分かり、1980年代後半には微小管帯とその領域に存在する分子および小胞なども含んだ構造としてPPBと呼ばれるようになった。微小管以外の特定の分子を呼ぶ時にはpreprophase band of actinなどと呼ばれている。PPB発見後、PPBの位置と細胞板挿入位置とが一致することが様々なタイプの細胞で確認された。しかし、大部分の細胞分裂ではPPBの存在した面は細胞板だけでなく中期の赤道面とも一致するため、PPBは分裂面を決めるのか赤道面を決めるのか問題が残った。PalevitzとHepler (1974) は、分裂面が赤道面と45°異なる方向に挿入されることが知られていたタマネギ根辺母細胞の観察から、PPBが赤道面ではなく分裂面を予言することを証明した (図3A (e), B (d) - (h))。赤道

面と分裂面の方向が一致しない現象は、孔辺母細胞に特異的なものというわけではなく、図1の様にオオムラサキツユクサ雄しべの毛の細胞分裂でも観察できる。PPBは陸上植物でしか観察されず、陸上植物でもコケの原糸体など細胞分裂によってはPPBが出現しないものもある。また、

被子植物でも減数分裂や一部の生殖に関連した細胞分裂でPPBが存在しないことが知られている (Mineyuki 1999)。PPBは陸上植物の体細胞分裂で発達した細胞分裂面の位置を決める細胞質分裂装置と考えられる。

図1 オオムラサキツユクサ雄しべの毛の細胞分裂のライブイメージング像。(A) 高感度微分干渉顕微鏡によるタイムラプスVTR撮影法 (Mineyuki and Gunning 1988) で撮影した細胞分裂前期から細胞板形成直後までの103分の様子を左上から右下へ経時的に並べている。各細胞の左下の数字は、左上の細胞を0分とした時の相対的な時間を示す。0分は前期、13～24分は前中期、50分は中期、51～66分は後期、73～78分は終期、84～103分は細胞板接着後の像である。50分目の細胞中に斜めに示した矢印は赤道面 (EP) の方向を、灰色横棒は表層分裂面挿入予定域 (CDZ) を示す。この細胞では赤道面と分裂面挿入位置が異なっていることが分かる。後期～終期の細胞に付けた☆印は移動中の分裂装置の極の位置を示す。徐々に方向が変化していることがわかる。ch, 染色体; cp, 細胞板; N, 核; n, 仁。右段下 Bar = 10 μ m。(B) 細胞板形成と細胞板成熟過程。細胞板が細胞中央に出現した地点 ((B) 上段左端50) から1分おきに細胞板の部分と並べたキモグラム。下の数字は時間 (分) を示す。(A) の数字から21引いた値になっている。Mineyuki and Gunning (1990) より許可を得て転載。Mineyuki and Gunning (1988) がImage-I (現在のMetamorph) 用に開発したソフトを使用。論文ではstreak photoとなっているが、Image-Iのコマンドに採用された時にkimographというコマンドになった。下段右端に10 μ m間隔のスケールバーを示している。

図2 タマネギ子葉皮層細胞の分裂準備帯 (PPB)。(A)～(H) は同一細胞の異なる光学切片を示す。間接蛍光抗体法で微小管を染色し、蛍光顕微鏡を使って細胞表層から中央部まで、焦点を手動ですらすらしながらフィルムで撮影。共焦点レーザー顕微鏡ではないので、z-軸方向の間隔は正確でない。図には核の状態を示していないが、この細胞は前期後半の時期で、幅の狭いPPB ((A) の灰色の横棒) と前期の紡錘体 (☆印は紡錘体の極の位置を示す) が共存している。紡錘体の極近傍からPPBに向かって走る微小管 (矢印) が存在する。この時期PPBと紡錘体は垂直に位置するため、PPBの一つの役割として前期の紡錘体の位置を保つ働きが考えられている。Mineyuki et al. (1991a) を改変。Bar = 10 μ m。

図3 気孔分化の細胞分裂パターンとPPB. 細胞の図, 写真はすべてページ下が子葉の基部になるように配置している. 緑, 孔辺母細胞 (guard mother cell) と孔辺細胞 (guard cell); 黄土色, 孔辺母細胞を造る不等分裂を行う細胞 (guard grandmother cell); 水色, 核および染色体; 赤, 微小管.

(A) タマネギ子葉表皮の気孔分化過程の模式図. (a-d) 孔辺母細胞を造る不等分裂. (a) 間期, (b) 前期後半, (c) 中期, (d) 細胞分裂直後. (e-g) 孔辺母細胞の分裂, (e) 前期, (f) 中期, (g) 細胞分裂直後, (h) 気孔.

(B) タマネギ子葉表皮の気孔分化過程で見られるPPB. 蛍光抗体法 (貼り付け法) による微小管染色 (a, c, d, e, f, h) とHoechstによるDNA染色 (b, g). (a-c) 孔辺母細胞を造る不等分裂のPPB. (a, b) 核移動前の前期細胞. (a) と (b) は同じ細胞. 核が移動する前にPPBが先端よりできている. (c) 核移動後のPPB. Nuは核の位置を示す. Mineyuki (1999) より許可を得て掲載. Bar = 10 μ m. (d-h) 孔辺母細胞のPPBと中期の染色体. (d) 3つの前期細胞が並んでいるのが観察できる. 矢印, 紡錘体の極; 鋸, PPB. Bar = 10 μ m. (e, f) 前期のPPB. (d) 中の1個の細胞の拡大とその細胞の異なる光学平面. 鋸, 極 (この紡錘体の極は微小管は1点に収斂せず, 典型的な極帽 (polar cap) になっている). (g, h) 中期の染色体 (g) と紡錘体 (h). Mineyuki et al. (1988a) より許可を得て掲載. Bar = 10 μ m.

孔辺母細胞を造る不等分裂を行う予定の細胞では, 間期にPPB形成が開始し, 前期に幅狭いPPBが細胞の先端近くに形成されると核が移動を開始する (B(a), (b)). 前期の核が先端に到着する (A(b), B(c)) と, 核分裂が開始し横方向へ細胞分裂面が挿入され, 先端に小さな孔辺母細胞が形成される不等分裂が完了する (A(d)). この不等分裂では, 中期の赤道面 (A(c)) も分裂面と同じ場所に位置する. 孔辺母細胞の前期に出現するPPBは縦方向に並ぶが (A(e), B(d), (e)), 中期の赤道面は斜め方向に並ぶ (A(f), B(g), (h)). しかし, 最終的な分裂面は縦方向に挿入される (A(g)).

(C) 様々な分裂タイプにおけるPPB形成時の微小管配列の変化を示す模式図. 水色, 核; 赤, 表層微小管; 赤紫, 細胞質微小管 (核表面および紡錘体の微小管も含む). (a), 根端分裂組織細胞 (Wick and Duniec 1983, 1984, Mineyuki et al. 1988b). (b), タマネギ子葉表皮基部の等分裂 (Mineyuki and Palevitz 1990). (c) タマネギ子葉表皮の不等分裂 (Mineyuki and Palevitz 1990). (d) タマネギ子葉表皮基部の孔辺細胞母細胞の分裂 (Mineyuki et al. 1989). (e) イネ, オオムギ, トウモロコシなどに見られる助細胞を形成のための不等分裂 (Cho and Wick 1989, Cleary and Hardham 1989, Mullinax and Palevitz 1989). (1) 微小管帯が狭くなる素過程; (2) PPBと垂直に2極性の紡錘体を形成する素過程.

PPB形成時期と細胞周期

PPBはJeremy H. Pickett-Heaps (図4A) が大学院生の時に発見したものである。電子顕微鏡の超薄切片では染色体の凝集具合で前期核かどうか判定がしばしば難しい。Pickett-HeapsとNorthcote (1966a) は、PPB微小管を持つ細胞は前期と間期の移行期に分裂準備を開始するための形態変化の現れる時期と考え、その時期を“preprophase”と名付けた。Pickett-Heapsはこの時期を特徴づけるために、染色体の状態、仁の形状、およびPPB微小管の有無を使うことを提唱したが(1969)、前者2つでの定義づけには問題が残った。PPBを持つ細胞の核の状態の判定の問題から、“preprophase”は前期なのか、その前の間期なのか、それとも間期から前期の一部を含むのか議論が続き、PPBをprophase band (PPBは前期のみに存在するとの主張)、preprophase-prophase band, interphase-mitosis transition band等と呼び換える案も提唱されていた(詳細は峰雪(1997)参照)。この問題は、根端分裂組織細胞の微小管を蛍光抗体

法で染色し、核の蛍光染色との比較することで解決した。Wickら(Wick and Duniec 1983, 1984, Mineyuki et al. 1988b)の一連のタマネギ根端分裂組織細胞の観察から、PPBは間期にも存在すること、また、前中期に消失することが判明し、現在では“preprophase”は細胞周期の特定の時期(“前期の前”など)を表すのではなく、細胞質にPPBなど細胞分裂の準備と思われる構造が出現している時期、つまりPPBを持つ細胞では間期のある時期から前期の終わりまでを指すようになっている(Mineyuki 1999)。

PPBが細胞周期のどの時期に出現するのか、この問題に関して初期の電子顕微鏡時代に、G2期頃に徐々に核の周辺に微小管が集まり始めることを示した報告がある。これは細胞周期を同調的に進行させたホウライシダ原系体の表層微小管分布の定量的解析によるものである(図5, Wada et al. 1980)。この研究は著者の最初の研究で、Lyndon (1990)の教科書に引用してもらっている。その後著者はBrian E. S. Gunning (図4B)の研究室に移り、タマネギ根端分裂組織細胞のPPBを持つ核のDNA量の定量的な解析から、PPBはG2期に出現することを明らかにした(Mineyuki et al. 1988b)。根端分裂組織細胞ではDNA合成が終了して間もない時期にPPB微小管の形成を開始する細胞も存在するが(Gunning and Summut 1990)、G2期の細胞の半数以上はPPB微小管の形成を開始していない(Mineyuki et al. 1988b)。また、薬剤でDNA合成を停止させ、その後薬剤を除去して細胞分裂を同調的に誘導すると、PPB微小管の出現頻度が上昇すること(Burgess and Northcote 1969)から、PPBも同調的に誘導できていると思われる。しかし、

図4 初期のPPB研究に貢献した人物とPPB形成とその機能を示すモデル。(A) Jeremy H. Pickett-Heaps博士。(B) Brian E. S. Gunning博士。(C) PPBの成長、CDZ形成とその役割。(a) 間期には表層微小管に沿ってセルロースのマイクロフィブリルの沈着が起こる。(b) G2から前期にPPBが幅広微小管帯として出現し、この微小管帯の配向した方向に将来の分裂面挿入方向が決定する。(c) 前期にかけて微小管帯の幅が徐々に狭くなり、将来細胞板が接着する予定域になるCDZが形成される。(d) 前中期に微小管帯が消失するが、CDZはそのまま残る。(e) 終期に出現する細胞板はCDZに向かって伸張する。(f) 細胞板がCDZのどこか(CDS)で接続後、細胞板の成熟が完了する。Karahara et al. (2012)を改変。

図5 ホウライシダ原系体の細胞周期進行に伴う表層微小管分布の変化。赤色光下で核周期がG1期に停止した状態で先端成長を行っている原系体を暗所に移すことで細胞分裂を同調的に誘導した。下に細胞周期の各時期を示している。細胞周期の進行開始した時点での先端の位置を0として、その後の平均的な原系体の成長を考慮して各時期の原系体を並べている。Nu, 核の位置; 斜線で囲った部分、表層微小管が存在している部分。斜線の密度が濃いほど微小管の数が多領域を示す。G2期から徐々に核の周りに微小管が集まり始める(Wada et al. 1980)。

DNA合成阻害剤存在下ではS期の細胞でPPB微小管を持つ細胞が出現することから、初期のPPBの微小管帯形成進行と核周期進行とは部分的に脱共役可能であると考えられる(Mineyuki et al. 1988b)。一方、前期になるとPPBにcdc2(CDKA)が局在し(Mineyuki 1991b, Colasanti et al. 1993), cdc2の活性が上昇することで核膜崩壊とほぼ同時に微小管帯は消失する(Hush et al. 1996)。

微小管帯形成の2つの素過程：分裂面の方向と位置の決定

根端分裂細胞ではPPBは最初幅の広い微小管帯として出現し、前期の進行に伴って徐々に微小管帯の幅が狭くなり、前期の最後では幅の狭い微小管帯と前期の紡錘体が共存する(図3C(a))。多くの根端分裂組織細胞では、間期の細胞の伸長方向を制御する間期表層微小管とPPB微小管の方向が同じであるが、幅広微小管帯の出現と同時に核膜周辺に微小管が出現すること(Wick and Duniec 1983)、また、シクロヘキシミドでタンパク質合成を阻害すると間期表層微小管は2時間以内に表層から離れるのに対し、PPB微小管はそのまま表層に残ることで区別することができる(Mineyuki et al. 1994)。しかし、将来の分裂面の方向に間期微小管も並んでいるため、いつ分裂面が決まるかの研究には適していなかった。

気孔の分化過程は細胞分裂のパターンが正確にプログラムされて行われ、途中で分裂面の方向も変更するため(図3A)、分裂面の方向の決定とPPB形成の過程の研究に適している。しかし、この研究には細胞の並びを残したまま蛍光抗体染色する必要がある。細胞表層を瞬間接着剤で貼り付け、内側の細胞を除いて表皮の細胞を観察する方法(貼り付け法)がMarcとHackett(1989)により開発され、気孔分化過程でのPPB形成の研究が可能になった。図3Cは様々なタイプの細胞分裂における微小管帯形成過程をまとめたものである。タマネギ子葉表皮、特に基部の部分では、表皮細胞を造る等分裂の場合(図3C(b))でも、孔辺母細胞を造る不等分裂の場合(図3B(a)-(c), C(c))でも、間期表層微小管はあまり横方向に並んでおらず、むしろランダムである。これらの細胞では、表層微小管が横方向(将来の分裂面の方向)に並び始めるのは、幅広PPB出現時である。孔辺母細胞の分裂では、その分裂面は前の不等分裂と90°異なる方向に挿入される(図3A(d), (g))。前の不等分裂終了後の間期細胞では、微小管は細胞質に多く表層には少ない。この細胞の微小管が表層に並び始めるのはやはり幅広PPBが出現する時である(図3C(d))。我々はこれらの観察を元に、PPB形成過程は2つの素過程に分かれ、まず幅広PPB形成過程で将来の分裂面の方向を決定し、微小管帯が狭くなる過程で幅数 μm の細胞分裂面挿入位置が決まるという考えを提唱した(Mineyuki et al. 1989, Mineyuki 1999)。穀類の気孔では助細胞があり、複雑な形のPPBができる(図3C(e))が、この形成過程もこの考えで説明がつく(Mineyuki 1999)。タマネギ子葉表皮の分裂では、アクチン毒のサイトカラシンが細胞周期進行は阻害しないが微小管帯の幅が狭くなる過程を阻害する(Mineyuki and Palevitz 1990)。Nautilocalyxの葉の基部の外植片の細胞分裂では、培養開始して数日で切り口に平行に細胞板が挿入される。PPB形成開始時期より前にこの組織片を傷口と垂直な方向に傷口を入れると、分裂面は新しい傷口と平行な方向に挿入

される。しかし、PPB形成が開始した時期以降に新しい傷口を入れても分裂面の方向は変化しない(Venverloo 1990)。これは、PPB形成初期に将来の分裂面の方向が決定するという考えを強く支持する実験結果である。

PPB形成と表層分裂面挿入予定域(CDZ)

PPB微小管は前中期には消失し、その位置には見かけ上何もないように見える。しかし、細胞板は正しくその位置を認識して伸長していくことから、PPBが存在している間にその場所になんらかの位置メモリーを残す働きがあると考えられる。一方、親の細胞壁に到達して間もない細胞板は湾曲しているが、やがて真っ直ぐな細胞壁に変化する(図1A84-103, B下段)。この細胞壁の成熟は、遠心処理や薬剤処理を使って実験的に細胞板がPPBの存在していた位置に到達できない、あるいは接続できないようにした場合には進行が遅れる(Mineyuki and Gunning 1990)。これらの事実を元にMineyukiとGunning(1990)はPPB形成過程でPPBの存在する場所近傍に細胞板をPPBの存在していた位置に誘導するための位置メモリーとして働く因子と親の細胞壁に接着した細胞板の成熟に関与する因子が蓄えられるという仮説を提唱した(図4C)。

位置メモリー候補として最初に見つかったのはアクチンであった。アクチンはPPBに存在する分子として知られていたが(後の章で述べる)、PPB微小管が消失する少し前の時期から、アクチンはPPBの領域を除く細胞全体に分布し、PPB領域から排除されるようになる。このアクチン排除域は微小管帯消失後も残っているので、ネガティブメモリーとしての働きが考えられる(Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992)。同様の分子としてキネシン様タンパク質KCA1(Vanstraelen et al. 2006)も発見された。一方、ポジティブメモリー候補の分子として動物のAPCタンパク質の微小管結合部位を有するタンパク質TAN(Walker et al. 2007)やRanGTPase活性化タンパク質RanGAP(Xu et al. 2008)などが発見されている。また、細胞板成熟に関係する候補の分子としてAdaptin様タンパク質TPLATE(Van Damme et al. 2006)、微小管付随タンパク質AIR9(Buschmann et al. 2006)などが報告されている。

PPBが標識する細胞表層は数 μm の幅の領域なのに対し、実際の細胞板の幅はその10分の1程度なので、最近の研究では前者を表層分裂面挿入予定域(cortical division zone; CDZ)と呼び、最終的に細胞板が接着した細胞表層の位置(cortical division site)と区別する様になった(Van Damme et al. 2010)。図4Cは現在考えられているPPBの形成と機能を模式図で表したものである。幅広PPBが出現する過程で将来の細胞分裂面の方向が固定され(図4C(b))、やがてPPBの幅が狭くなって、PPBが局在する細胞表層がなんらかの特殊な修飾を受け、CDZが形成される(図4C(c))。微小管は核膜消失と共にCDZから離れるが、CDZ(ポジティブメモリー候補と言われている分子が局在し、ネガティブメモリー候補の分子が排除される性質を持った細胞表層の帯状の領域)はそのまま残り(図4C(d))、終期に細胞板をCDZに誘導する(図4C(e))。細胞板が親の細胞壁に近づくと、別の分子群がその位置に集まりその後の細胞板の成熟に関与していると考えられる(図4C(e))。現在、これらの分子機作の研究が進行している(Duroc et al. 2011,

Rasmussen et al. 2013).

微小管帯の形成には TONNEAU1 (TON1, Azimzadeh et al. 2008), FASS/TON2/DCD1/ADD1 (Trass et al. 1995, McClinton and Sung 1997, Camilleri et al. 2002, Wright et al. 2009), SABRE, CLASP (Pietra et al. 2013) が関与している。また, FASS/TON2 と TON1 はタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A 複合体として働いているようである (Spinner et al. 2013)。PPB 形成が進むと, TAN や 2 種のクラス 12 キネシン POK1, POK2 などが集まって CDZ を形成する (Müller et al. 2006)。POK1/POK2 が終期に細胞板の端を CDZ に導くのに関与する可能性も考えられている (Lipka et al. 2014)。最近, 終期の細胞板の誘導には微小管端に存在するミオシン VIII が関与しているという報告もある (Wu and Bezanilla 2014)。今後の検証が必要であろう。

CDZ での膜ダイナミクス

前章でも述べたように CDZ 形成過程で様々な分子の挙動が明らかになってきている。しかし, 蛍光プローブを使った光学顕微鏡での観察では, 実際の分子間の相互作用に関する情報には限界がある。そのため, 電子顕微鏡レベルでの 3D 観察が必要であった。我々は 10 年以上前から PPB の構造を 3D で解析するために, タマネギ子葉を加圧凍結/凍結置換し (峰雪ら 2001), それを使って電子線トモグラフィ法 (峰雪ら 2004) で PPB を 3D 観察している。この方法により幾つかの新しい事が見つかった。電子線トモグラフィ法とは, 比較的厚く切った切片を -60° から $+60^\circ$ まで傾斜画像を取得し, それをコンピュータトモグラフィ (CT) の方法を使って計算し立体再構成する方法である。図 6 はタマネギ子葉基部細胞の前期後半の時期の PPB (図 3C (b) の右端の細胞に相当する) の電子線トモグラフィ像の 1 例である。連続傾斜画像を元に計算し立体再構成したデータ (これをトモグラムと呼ぶ) から一つの平面を抽出して示したものである。図 6A は細胞膜のすぐ内側の PPB 領域を示している。実際の一つのトモグラムでは, このような平面 (x-y 平面) が z 軸方向に 100 枚以上重なった形になっている。この方法では被覆小胞 (図 6B), 微小管 (図 7B), マイクロフィラメント (図 8B) などが明確に判定できる。また, 一つのトモグラムの中には多数のこれらの小胞や細胞骨格が存在するので, その出現頻度の比較検討も可能である。

我々の研究以前に 1 枚の有名な電子顕微鏡写真があった。それは Packerd と Stack (1976) の論文で, PPB の近傍にゴルジ体が存在し, ゴルジ小胞と似た小胞が細胞膜と融合している写真である。この写真から, PPB に蓄積されるメモリーはエクソサイトーシスで細胞膜の外に蓄積されると考えられてきた。実際, Mineyuki と Gunning のモデル (1990) も, それを踏襲していた。しかし, 我々の電子線トモグラフィの結果 (図 6) は, PPB に存在する小胞はゴルジ由来のエクソサイトーシスを行う小胞ではなく, エンドサイトーシスを行うクラスリン被覆小胞であることが分かった (Karahara et al. 2009)。被覆小胞でない非被覆小胞 (図 6C) も存在するが, その分布が被覆小胞よりもより細胞質側に多く分布することと 2 つの中間的な小胞も存在することから, 非被覆小胞は被覆小胞の被覆が外れたものと考えられる (Karahara et al. 2009, 2012)。また, この小胞の出現頻度

図6 タマネギ子葉表皮 PPB の電子線トモグラフィ像。(A) トモグラムから子葉接線面方向に切り出した細胞表層 1.42 nm 厚の切片像。1 個のトモグラムは, このような切片像が約 110 枚集まってできている。試料は加圧凍結/凍結置換法により作製。250 nm 厚の切片からトモグラムを作製した。ccp, 被覆ピット; ccv, 被覆小胞; mt, 微小管; ncv, 非被覆小胞。Bar = 1 μ m。(B), (C) トモグラムの一部から抽出した被覆小胞 (B) と非被覆小胞 (C) の像。Bar = 50 nm。Karahara et al. 2009 を改変。

を PPB と PPB 外, あるいは間期の細胞表層とで定量的に比較した結果, PPB の最後の時期には PPB 近傍にクラスリン小胞が増大し PPB 領域, つまり CDZ で, エンドサイトーシスが活発なことが分かった (Karahara et al. 2009)。我々はエンドサイトーシスで PPB 領域の細胞膜が細胞質に回収される時に, 細胞表層に存在している特定の因子, 例えば F-アクチン重合因子と一緒に回収されアクチン排除域が形成されるのではないかと考えている (Karahara et al. 2010)。

PPB 形成過程での微小管束化における F-アクチンの役割

PPB 形成過程でどのようにして微小管は CDZ に集まるのであろうか? 蛍光プローブを使ったライブイメージングによる微小管ダイナミクスの解析から, PPB 形成時期の微小管は間期よりもダイナミックな性質を持つ可能性が示されている (Hush et al. 1994, Dhonukshe and Gadella Jr 2003, Vos et al. 2004)。しかし, 微小管帯のパックされた部分での解析は難しいなどの問題があった。峰雪は微小管帯が狭くなる過程で微小管が束化していくと考えている (1999)。図 7A はタマネギ根端分裂組織細胞の PPB 発達過程での隣り合う微小管と微小管の距離の変化を示したものであるが, 幅狭微小管帯になると微小管の数が増すだけでなく, 微小管間の距離も小さくなっていることがわかる (Nogami et al. 1996)。電子線トモグラフィで実際に PPB 成長過程で微小管の束化の様子を追跡すると, 最初は数本の微小管が架橋構造によって束になり, それが幅広く分布しているが, 徐々にこれらの微小管束が集合し大きな微小管束のクラス

ターを形成し、最後は数個の微小管束のクラスターになることが分かった (Takeuchi ら 未発表). また、電子線トモグラフィーでは重合していると思われる微小管端 (図 7B (a)), 脱重合していると思われる微小管端 (図 7B (c)), γ チューブリン複合体でキャップされていると思われるマイナス端 (図 7B (d)) などが明確に区別でき、間期の表層微小管と PPB 微小管でこれらの微小管端の出現頻度を比べると、PPB 微小管が間期よりもよりダイナミックに重合、脱重合していることがわかる.

図7 電子顕微鏡によるタマネギPPB微小管の解析. (A) グルタルアルデヒドとオスミニウム酸による化学固定した根端分裂組織細胞のPPB発達過程における微小管分布の変化. 図右上はPPBの横断面を示し、点は微小管を、横に引いた曲線は細胞膜を表す. 図左下は各ステージでの隣り合う微小管間の距離の頻度を示すヒストグラム. (a) から (c) に移行するに従ってPPBは徐々に成長し、典型的な幅狭PPBを形成する. ヒストグラムに示した矢印は幅狭PPBの最も出現頻度が高かった微小管間の距離を示す. 横軸の微小管間の距離は、微小管の中心から隣の微小管の中心までの距離を示している. PPBが成熟するに従って微小管の数が増え、微小管間の間隔も狭くなっている. (a) 右 Bar = 500 nm. Nogami et al. (1996) を改変. (B) 子葉表皮細胞の電子線トモグラフィーのデータから抽出した代表的な微小管端の構造 (右) とそのモデル (左). (a) シート状に開いた微小管端. 伸張端と思われる構造. (b) 平坦な微小管端. (c) 反り返った微小管端. チューブリンが脱重合していると考えられる. 矢印は微小管が短縮していく方向. (d) キャップ端. γ チューブリン複合体でキャップされたマイナス端. 峰雪ら (2004) を改変.

図8 微小管帯形成におけるF-アクチンの役割. (A) 蛍光抗体法のデータ (Eleftheriou and Palevitz 1992, Liu and Palevitz 1992, Takeuchi and Mineyuki 2014) から考えられるアクチンと微小管の関係. 赤, 微小管 (MT); 緑, アクチン. CD, サイトカラシン D. タマネギ根端分裂組織細胞のPPB (上写真左) とアクチン排除域 (上写真右). サイトカラシン処理した細胞の幅の広がったPPB (下写真左), それに付随するアクチン (下写真中央) とその拡大図 (下写真右). (B) タマネギ子葉表皮PPBのトモグラムから抽出した微小管に沿って走るF-アクチン (緑矢印). 黒矢印はF-アクチンと微小管の架橋構造を示す. Bar = 50 nm. (C) トモグラム解析データから作成した微小管束化におけるF-アクチンの役割のモデル. 緑の細い線, F-アクチン; 紫の太い線, 微小管; 赤と緑の斜め細い線, F-アクチンと微小管との架橋; 黒の短い線, 長い微小管間架橋; 水色の短い線, 短い微小管間架橋; (Takeuchi ら 未発表).

アクチン毒のサイトカラシンで微小管幅が狭くなる過程が阻害されることから、アクチンが微小管帯を狭くする過程に働いていると考えられている (Mineyuki and Palevitz 1990). 1987年に3つのグループが別々にPPBにアクチンが存在することを報告 (Trass et al. 1987, Palevitz 1987, Kakimoto and Shibaoka 1987) して以降、蛍光プローブを使ったPPBのアクチンの研究が多くなされてきた。図8Aに分裂組織の細胞におけるアクチンの挙動をまとめた。G2期に出現した幅広微小管帯は、前期の進行と共に狭くなる。最初は微小管帯近傍にアクチンが集まっているが、前期の最後になるとアクチンは逆に微小管の存在する場所からPPB以外の細胞表層に移動し、CDZにアクチン排除域 (actin depleted zone) が形成される (Liu and Palevitz 1992, Cleary et al. 1992). サイトカラシンはF-アクチンに結合して重合阻害を起こすことでF-アクチンの脱重合を誘導するが、植物F-アクチンはサイトカラシン処理で完全には脱重合せず、切断され短いF-アクチンになる。PPBへのサイトカラシン処理では、微小管帯が狭くなる過程を阻害するだけでなく、すでに幅の狭くなっていた微小管帯も幅が広がる。この時、アクチンはPPBから排除されなくなり、むしろ微小管帯と共局在するようになる (Takeuchi and Mineyuki 2014).

我々は加圧凍結後適当な方法で凍結置換することで、安定的にF-アクチン (正確にはマイクロフィラメント) を電子顕微鏡で観察できる様になった (Murata et al. 2002). この試料を使い、電子顕微鏡レベルのCTである電子線トモグラフィー法で観察すると、F-アクチンと思われるマイクロフィラメントと、マイクロフィラメントと微小管を連結する構造がはっきりと検出できた (図8B). このデータの詳細な解析から、蛍光プローブでアクチンが存在すると言われている時期には、PPB内にはF-アクチン様構造として、比較的短いマイクロフィラメントが存在していることが分かった。微小管に沿って1本のF-アクチンが走っている像がよく観察されるが、その中に片方の端が微小管から離れ近くの微小管まで伸びている像 (図8C (a), (b)) が観察できた。また、平行して走る2本の微小管の間に1本のF-アクチンが平行に走り、このF-アクチンが両方の微小管に架橋構造で連結している構造も観察できた (図8C (c), (d)). 前者は少し離れた微小管同士を近づけるのに、後者は長い架橋構造で結ばれている2本の微小管をより近付けてPPBの最後の時期に現れる短い架橋構造に移行するのに働いていると考えれば説明がつく。これらのことから、比較的短いF-アクチンがPPB形成過程での微小管同士の束化に働いている可能性が考えられる (Takeuchi ら 未発表).

まとめと今後の展望

我々の研究を中心にPPBの発見から現状までを解説した。MineyukiとGunningが1990年に提案したモデルから25年で、PPBの形成とその後のメモリー蓄積過程に関与する因子の実体もかなり明らかになり、PPBが形成される過程でCDZが確立し、細胞分裂の最後で細胞板の正しい挿入が行われ、そこで細胞板の成熟が起こるという一連の過程が分子レベルで大分繋がってきた。PPBは最初微小管の帯 (preprophase band of microtubule) として発見されたが、現在ではPPBはCDZを形成するための細胞質分裂装置として扱うのが妥当のように思われる。英語ではかなり古く

からPPBとは微小管の帯とその周りの構造や分子を含んだ細胞分裂を準備する構造として扱われているのに対し、我が国の文部省学術用語集では“preprophase band”ではなく“preprophase microtubule band”という用語が採用され、和訳として“前期前微小管束”という言葉が使われている。1997年に本誌にこの日本語はPPBの研究の歴史を踏まえると不適切な訳語であり“分裂準備帯”と呼ぼうという記事を書いた。幸いにして、私のグループ以外の専門家が最近では科研費や学会のHPに“分裂準備帯”を使ってくれるようになったが、未だに日本を代表する辞典は改まっていない。本総説を読んで“preprophase”とは前期の前の時期ではないこと、また、PPBは微小管が束 (bundle) になることが大事ではなく、帯状 (band) に並ぶことが大事な事を理解してもらえれば幸いである。そのうち辞典や教科書にも分裂準備帯という言葉が使われることを祈って筆を置く。

謝辞

本研究は学生時代から現在まで、東大古谷研究室、オーストラリア国立大Gunning研究室、ジョージア大学Palevitz研究室、広島大学および兵庫県立大学の私の研究室で行ってきた研究をまとめたものである。私がこれらの研究室に所属していた時に指導・共同研究をしていただいた学生を含む多くの研究者の方々に謝意を表します。研究室でできない研究を共同研究の形で研究させていただいた国内外の共同研究者に感謝いたします。後半の電子顕微鏡の研究では、L. Andrew Staehelin, Thomas Giddings (コロラド大学)、村田隆 (基生研)、唐原一郎 (富山大) 博士とその研究室の皆さんにお世話になりました。また、竹内美由紀博士 (東大) は電子線トモグラフィーの未発表のデータの提供を、藪内隆俊氏 (兵庫県立大) は図4Cのモデル作製に協力をいただきました。この2名には最後の原稿にも目を通していただき感謝しています。

引用文献

- Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amieur, N., Parcy, F., Pastuglia, M., and Bouchez, D. (2008) Arabidopsis TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* 20: 2146-2159.
- Burgess, J., and Northcote, D. H. (1969) Action of colchicine and heavy water on the polymerization of microtubules in wheat root meristem. *J Cell Sci* 5: 433-451.
- Busby, C. H., and Gunning, B. E. S. (1980) Observations on pre-prophase bands of microtubules in uniseriate hairs, stomatal complexes of sugar cane, and *Cyperus* root meristems. *Eur J Cell Biol* 21: 214-223.
- Buschmann, H., Chan, J., Sanchez-Pulido, L., Andrade-Navarro, M. A., Doonan, J. H., and Lloyd, C. W. (2006) Microtubule-associated AIR9 recognizes the cortical division site at preprophase and cell-plate insertion. *Curr Biol* 16: 1938-1943.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D. (2002) The Arabidopsis TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* 14: 833-845.
- Cho, S.-O., and Wick, S. M. (1989) Microtubule orientation during stomatal differentiation in grasses. *J Cell Sci* 92: 581-594.
- Cleary, A. L., and Hardham, A. R. (1989) Microtubule organization during development of stomatal complexes in *Lolium rigidum*. *Protoplasma* 149: 67-81.
- Cleary, A., Gunning, B. E., 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.
- Colasanti, J., Cho, S.-O., Wick, S., and Sundaresan, V. (1993) Localization of the functional p34^{cdc2} homolog of maize in root tip and stomatal complex cells: Association with predicted division sites. *Plant Cell* 5: 1101-1111.
- Dhonukshe, P., and Gadella, T. W. J. (2003) Alteration of microtubule dynamic instability during preprophase band formation revealed by yellow fluorescent protein-CLIP170 microtubule plus-end labeling. *Plant Cell* 15: 597-611.
- Duroc, Y., Bouchez, D., and Pastuglia, M. (2011) The preprophase band and division site determination in land plants. In: *The Plant Cytoskeleton*, Springer, pp 145-185.
- Eleftheriou, E. P., and Palevitz, B. A. (1992) The effect of cytochalasin D on preprophase band organization in root tip cells of *Allium*. *J Cell Sci* 103: 989-998.
- 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 Sammut, M. (1990) Rearrangements of microtubules involved in establishing cell division planes start immediately after DNA synthesis and are completed just before mitosis. *Plant Cell* 2: 1273-1282.
- Harris, H. (1999) *The birth of the cell*. Yale University Press, New Haven, London.
- Hofmeister, W. I. (1849) *Die Entstehung des Embryo der Phanerogamen: eine reihe mikroskopischer Untersuchungen*, Hofmeister.
- Hush, J. M., Wadsworth, P., Callahan, D. A., and Hepler, P. K. (1994) Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after photobleaching. *J Cell Sci* 107: 775-784.
- Hush, J. M., Wu, L., John, P. C. L., Hepler, L. H., and Hepler, P. K. (1996) Plant mitosis promoting factor disassembles the microtubule preprophase band and accelerates prophase progression in *Tradescantia*. *Cell Biol Int* 20: 275-287.
- Kanamoto, T., and Shibaoka, H. (1987) Actin filaments and microtubules in the preprophase band and phragmoplast of tobacco cells. *Protoplasma* 140: 151-156.
- Karahara, I., Suda, J., Tahara, H., Yokota, E., Shimmen, T., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelin, L. A., and Mineyuki, Y. (2009) The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. *Plant J* 57: 819-831.
- Karahara, I., Staehelin, L. A., and Mineyuki, Y. (2010) A role of endocytosis in plant cytokinesis. *Comm Int Biol* 3: 36-38.
- 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 Open Access Publisher, pp 41-60.
- 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.
- Lyndon, R. F. (1990) *Plant Development: The cellular basis*, Unwin Hyman, London.
- Marc, J., and Hackett, W. P. (1989) A new method for immunofluorescent localization of microtubules in surface cell layers. Application to the shoot apical meristem of *Hedera*. *Protoplasma* 148: 70-79.
- McClinton, R. S., and Sung, Z. R. (1997) Organization of cortical microtubules at the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Planta* 201: 252-260.
- Mineyuki, Y., and Gunning, B. E. S. (1988) Streak time-lapse video microscopy - analysis of protoplasmic motility and cell division in *Tradescantia* stamen hair cells. *J Microsc* 150: 41-55.
- Mineyuki, Y., Marc, J., and Palevitz, B. A. (1988a) Formation of the oblique spindle in dividing guard mother cells of *Allium*. *Protoplasma* 147: 200-203.
- Mineyuki, Y., Wick, S. M., and Gunning, B. E. S. (1988b) Preprophase bands of microtubules and the cell cycle: Kinetics and experimental uncoupling of their formation from the nuclear cycle in onion root-tip cells. *Planta* 174: 518-526.
- Mineyuki, Y., Marc, J., and Palevitz, B. A. (1989) Development of the preprophase band from random cytoplasmic microtubules in guard mother cells of *Allium cepa* L. *Planta* 178: 291-296.
- 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., and Palevitz, B. A. (1990) Relationship between preprophase band organization, F-actin and the division site in *Allium*. Fluorescence and morphometric studies on cytochalasin-treated cells. *J Cell Sci* 97: 283-295.
- Mineyuki, Y., Marc, J., and Palevitz, B. A. (1991a) Relationship between the preprophase band, nucleus and spindle in dividing *Allium* cotyledon cells. *J Plant Physiol* 138: 640-649.
- Mineyuki, Y., Yamashita, M., and Nagahama, Y. (1991b) p 34^{cdc2} kinase homologue in the preprophase band. *Protoplasma* 162: 182-186.
- Mineyuki, Y., Iida, H., and Anraku, Y. (1994) Loss of microtubules in the interphase cells of onion (*Allium cepa* L.) root tips from the cell cortex and their appearance in the cytoplasm after treatment with cycloheximide. *Plant Physiol* 104: 281-284.
- Mineyuki, Y. (1999) The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int Rev Cytology* 187: 1-49.
- 峰雪芳宣 (1997) Preprophase band の訳語について. *Plant Morphol* 9: 65-67.
- 峰雪芳宣, 唐原一郎, 村田隆, Otegui, M., Giddings, H. T., Staehelin, L. A. (2001) 植物組織の高圧 (加圧) 凍結. *電子顕微鏡* 36: 105-107.
- 峰雪芳宣, 須田基将, 唐原一郎 (2004) 電子線トモグラフィ. *Plant Morphol* 16: 21-30.
- Müller, S., Han, S., and Smith, L. G. (2006) Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 16: 888-894.
- Mullinax, J. B., and Palevitz, B. A. (1989) Microtubule reorganization accompanying preprophase band formation in guard mother cells of *Avena sativa* L. *Protoplasma* 149: 89-94.
- Murata, T., Karahara, I., Kozuka, T., Giddings, T. H., Staehelin, L. A., and Mineyuki, Y. (2002) Improved method for visualizing coated pits, microfilaments, and microtubules in cryofixed and freeze-substituted plant cells. *J Electron Microsc* 51: 133-136.
- Nogami, A., Suzuki, T., Shigenaka, Y., Nagahama, Y., and Mineyuki, Y. (1996) Effects of cycloheximide on preprophase bands and prophase spindles in onion (*Allium cepa* L.) root tip cells. *Protoplasma* 192: 109-121.
- Ôta, T. (1961) The role of cytoplasm in cytokinesis of plant cells. *Cytologia* 26: 428-447.
- Packard, M. J., and Stack, S. M. (1976) The preprophase band: possible involvement in the formation of the cell wall. *J Cell Sci* 22: 403-411.
- Palevitz, B. A., and Hepler, P. K. (1974) The control of the plane of division during stomatal differentiation in *Allium*. I. Spindle reorientation. *Chromosoma* 46: 297-326.
- Palevitz, B. A. (1987) Actin in the preprophase band of *Allium cepa*. *J Cell Biol* 104: 1515-1519.
- Pickett-Heaps, J. D., and Northcote, D. H. (1966a) Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. *J Cell Sci* 1: 109-120.
- Pickett-Heaps, J. D., and Northcote, D. H. (1966b) Cell division in the formation of the stomatal complex of the young leaves of wheat. *J Cell Sci* 1: 121-128.
- Pickett-Heaps, J. D. (1969) Preprophase microtubule bands in some abnormal mitotic cells of wheat. *J Cell Sci* 4: 397-420.

- Pietra, S., Gustavsson, A., Kiefer, C., Kalmbach, L., Hörstedt, P., Ikeda, Y., Stepanova, A. N., Alonso, J. M., and Grebe, M. (2013) Arabidopsis SABRE and CLASP interact to stabilize cell division plane orientation and planar polarity. *Nat Commun* 4: 2779.
- Rasmussen, C. G., Wright, A. J., and Müller, S. (2013) The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *Plant J* 75: 258-269.
- Spinner, L., Gadeyne, A., Belcram, K., Goussot, M., Moison, M., Duroc, Y., Eeckhout, D., De Winne, N., Schaefer, E., and Van De Slijke, E. (2013) A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nat Commun* 4: 1863.
- Strasburger, E. (1880) Zellbildung und Zelltheilung, 3rd ed, Fischer, Jena
- Takeuchi, M., and Mineyuki, Y. (2014) Actin-microtubule interaction during preprophase band formation in onion root tips visualized by immunofluorescence microscopy. In: Atlas of Plant Cell Structure, Tetsuko, N., Kawano, S., Tsukaya, H., Matsunaga, S., Sakai, A., karahara, I., Hayashi, Y. (eds), Springer Japan, Tokyo, pp 132-133.
- Traas, J. A., Doonan, J. H., Rawlins, D. J., Shaw, P. J., Watts, J., and Lloyd, C. W. (1987) An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. *J Cell Biol* 105: 387-395.
- Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D., and Caboche, M. (1995) Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* 135: 676-677.
- Van Damme, D., Coutuer, S., De Rycke, R., Bouget, F.-Y., Inzé, D., and Geelen, D. (2006) Somatic cytokinesis and pollen maturation in *Arabidopsis* depend on TPLATE, which has domains similar to coat proteins. *Plant Cell* 18: 3502-3518.
- Van Damme, D., Gadeyne, A., Vanstraelen, M., Inzé, D., Van Montagu, M. C., De Jaeger, G., Russinova, E., and Geelen, D. (2010) 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., De Rycke, R., 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.
- Venverloo, C. J. (1990) Regulation of the plane of cell division in vacuolated cells. II. Wound-induced changes. *Protoplasma* 155: 85-94.
- Vos, J. W., Dogterom, M., and Emons, A. M. C. (2004) Microtubules become more dynamic but not shorter during preprophase band formation: A possible “search-and-capture” mechanism for microtubule translocation. *Cell Motil Cytoskel* 57: 246-258.
- Wada, M., Mineyuki, Y., Kadota, A., and Furuya, M. (1980) The changes of nuclear position and distribution of circumferentially aligned cortical microtubules during the progression of cell cycle in *Adiantum protonemata*. *Bot Mag (Tokyo)* 93: 237-245.
- Walker, K. L., Müller, S., Moss, D., Ehrhardt, D. W., and Smith, L. G. (2007) *Arabidopsis* TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Curr Biol* 17: 1827-1836.
- Wick, S. M., and Duniec, J. (1983) Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. I. Pre-prophase band development and concomitant appearance of nuclear envelope-associated tubulin. *J Cell Biol* 97: 235-243.
- Wick, S. M., and Duniec, J. (1984) Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. II. Transition between the pre-prophase band and the mitotic spindle. *Protoplasma* 122: 45-55.
- Wright, A. J., Gallagher, K., and Smith, L. G. (2009) discordial and alternative discordial function redundantly at the cortical division site to promote preprophase band formation and orient division planes in maize. *Plant Cell* 21: 234-247.
- 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 DOI:10.7554.
- 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.

Received: 18 February 2015 / Accepted: 11 March 2015