論文内容の要旨

申請者氏名 阿部 竜也

間期の植物細胞では、微小管は膜内面に密着して、特徴的な表層微小管を構成している。伸長する細胞においては伸長軸方向に対して直角に表層微小管束と最内層細胞壁のセルロース微繊維が配向していることから、表層微小管がセルロース微繊維の配向を制御して細胞の伸長方向を決定していると考えられている。表層微小管の配向化には個々の微小管の動きが重要である。器官が左巻きにねじれる *lefty* 変異株は、 α チューブリンに変異が起きており、根の表層微小管束の配向パターンを調べると野生型と比べて右巻きに配向する傾向が見られた。このことから、チューブリンの変異が微小管機能に変化を引き起こし、微小管配向パターンに影響を与えることが示唆された。そこで、申請者は改変チューブリンを発現させたアラビドプシス形質転換植物体を用いて、微小管ダイナミクスの変化と配向パターン形成との関連を明らかにした。

α チューブリン6 又は β チューブリン6 の N 末端あるいは C 末端に GFP やヘマグルチニンや *myc* エピトープタグを付加した改変チューブリン発現質転換植物体を作成した。 α チューブリンの N 末を改変した形質転換体においてのみ花卉や葉柄や根が右巻きにねじれる形質がみられた。これらの形質転換体における表層微小管では、改変チューブリンが取り込まれており、更に左巻きの配向が観察された。次に、N 末改変 α チューブリンを取り込んだ表層微小管の動態を測定し、微小管の安定性を評価したところ、コントロールと比べ N 末改変チューブリンを発現させた細胞の微小管は収縮頻度が低下しており、伸長しやすい微小管が形成されていると考えられた。そこで、伸長している微小管のプラス端の構造を特異的に認識し局在する End Binding1 (EB1) タンパク質の局在性を確かめたところ、N 末改変チューブリンを発現させた細胞では、コントロールの植物体に比べ EB1 が共局在している微小管の数が増え、更に EB1 の局在部位が拡大していた。これらの結果から、N 末改変チューブリンが取り込まれた微小管はより伸長しやすい性質を持つと結論した。

微小管に取り込まれた、 β チューブリンに結合している GTP は加水分解を受け、微小管プラス端の GTP キャップが消失すると微小管は収縮する。この GTP 加水分解が起こる際に α チューブリンのある領域が GTP 加水分解促進活性(GAP 活性)を持つことが知られている。この領域が α チューブリンの N 末端近傍に存在していることから、 α チューブリンの N 末端に余分なアミノ酸を付加することで GAP 活性が阻害されると推測した。GAP 活性に重要なアミノ酸残基を変異させた α チューブリンを発現させた植物では、上記の N 末改変 α チューブリン発現植物と同様の微小管動態と配向、更に右巻きねじれ表現型を示した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 阿部 竜也

真核生物で高度に保存された微小管は細胞分裂、極性、細胞内輸送などさまざまな細胞機能に利用されるが、生物種により特徴のある構造や機能も見られる。植物間期細胞に見られる表層微小管束も、その配向をダイナミックに制御することで細胞の伸長方向を決定すると考えられる。近年、細胞の伸長方向に異常が見られるアラビドプシス変異株の解析から、微小管と細胞伸長の密接な関係が改めて示唆され、またチューブリン変異が細胞のねじれ伸長を引き起こすことが示された。この微小管と細胞伸長の関係をさらに深く理解するためには、個々の微小管の動態がどのように特徴ある微小管束構造の形成に反映されるのかを明らかにする必要がある。

申請者は生きた植物細胞における微小管の可視化に用いられる GFP (green fluorescent protein)- α チューブリン発現アラビドプシス植物体が右巻きねじれ表現形をもつことに注目し、研究をスタートさせた。まず、申請者は種々の改変チューブリン発現形質転換体を作製し、どのような改変チューブリンを発現させた場合に植物細胞が右にねじれて伸長するのかを調べた。その結果、 α チューブリンの N 末端に短いペプチド鎖を付加した場合にのみ、表層微小管束は浅い左巻きヘリックスに配向し、細胞は右巻きにねじれて伸長することが明らかにした。さらに、申請者は N 末改変 α チューブリンが取り込まれた微小管は収縮が起りにくくなり、より伸長しやすい性質をもつことを明らかにした。

申請者は以上の実験結果と微小管の三次元構造の知見などを基に、N 末改変 α チューブリンがどのような機構で微小管の動態を変化させたかを推察している。このモデルによれば、 α チューブリンの N 末端に付加された余分なペプチドは近傍に位置している GTP 加水分解促進活性 (GAP 活性) を持つ領域の機能を阻害する。結果としてより長い GTP キャップが形成され、微小管の安定性が増大する。この微小管の安定化が表層微小管束を左巻きヘリックスに配向化する要因であるとしている。

また、本研究により機能を阻害せずに微小管を GFP 標識するには、 β チューブリンの N 末端側に GFP を付加するのが最良であることが判明した。

本研究により、植物細胞微小管の動態解析により微小管機能がより効果的に評価できることを示し、微小管機能と微小管束の配向化の関係をより明確にすることに成功した。更には、最適な微小管可視化方法を提示し、今後の細胞骨格研究に大きく貢献すると期待される。

以上のように、本論文は改変チューブリン発現アラビドプシス植物体におけるねじれ機構を分子生物学的および細胞生物学的に解析したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。