

論文内容の要旨

申請者氏名 石田 喬志

微小管は高等生物に高度に保存された細胞骨格の一つである。微小管には細胞内で伸縮を繰り返す動的不安定性と呼ばれる性質があり、微小管が機能する上で非常に重要であると考えられている。植物の根の伸長領域や黄化胚軸など急激に伸長する細胞では、微小管が細胞の伸長軸に対して直交するように並び、細胞壁の主成分であるセルロース微繊維の配向を規定することで円筒状の細長い細胞を作ると考えられている。これまでに細胞の伸長軸が傾き器官がねじれる形質を持つ変異株が多数単離、解析され、これら変異株では表層微小管が傾いて配向していることが示された。ねじれ変異株の多くは微小管関連因子に変異を生じており、微小管機能が細胞の伸長極性の形成に重要であることが示唆される。表層微小管の配向を形成するためにどのような機構が働いているのかは不明な点が多いため、本研究ではこの機構の解明を目標として変異株の単離、解析を行った。

微小管重合阻害剤を指標にスクリーニングを行いチューブリンに変異を生じていた変異株 40 系統（右巻きねじれ変異株 27 系統、左巻きねじれ変異株 13 系統）を得た。これらの変異株は薬剤非存在下においてねじれた器官や表皮細胞、傾いたヘリックス状の表層微小管を形成した。免疫染色法により表層微小管の配向を観察した結果、全ての右巻きねじれ変異株では表層微小管は左巻きヘリックスの配向をとり、左巻きねじれ変異株では右巻きヘリックスの配向をとっていた。根の伸長方向は表皮細胞列の傾きと一致しており、このことから表層微小管の配向が個々の細胞の伸長方向を規定しているという可能性が示された。

微小管を蛍光標識して微小管動態のライブセル観察を行った結果、GTPase 活性化機能に異常を持つと思われる右巻きねじれ変異株 *tua5^{D251N}* では微小管が非常に静的になっている様子が観察された。対照的にチューブリン同士の相互作用領域に変異を抱える左巻きねじれ変異株 *tua4^{S178Δ}* では動的に変化していた。このことは、個々の微小管動態の変化が最終的な表層微小管の配向に影響する可能性を示唆している。また、野生株では微小管のプラス端のみに蓄積する微小管プラス端マーカーGFP-EB1 が、*tua5^{D251N}* では微小管全長に蓄積していた。この結果から、微小管プラス端に構成される GTP cap 構造が *tua5^{D251N}* 変異株では微小管全体で形成され、微小管が過剰に安定化していると考えられる。

以上の結果より、微小管動態の適切な制御が最終的な表層微小管の配向を作り上げる上で重要であると結論付けた。最終的な配向が形成される際には微小管同士の相互作用が重要とされるが、個々の微小管動態の変化は高次の微小管同士の相互作用にも影響を与え、最終的な配向を左右しうることから厳密な制御を要すると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 石田 喬志

植物の根、茎、胚軸、葉柄などの軸器官がまっすぐに伸びるのは、組織を構成している細胞が軸方向にまっすぐに伸長するからである。植物細胞の伸長方向は細胞壁のセルロース微繊維の並び方により規定されていると考えられており、セルロース微繊維の配向には細胞膜内側に張り付いている表層微小管が重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、どのような微小管の状態がどのような表層微小管の配向パターンを作り出すのか、ほとんどわかっていない。

本論文ではモデル植物アラビドプシスのねじれ変異株のうち微小管構成タンパク質であるチューブリンに変異をもつ多数の変異株を解析することにより、この問題に迫っている。アラビドプシスはつる性ではなく、根や葉柄などの軸器官はまっすぐに伸びる。しかし、突然変異によりこれらの器官が右巻き、または左巻きにねじれて伸長する変異株が見つかった。本論文では、大規模なねじれ変異株のスクリーニングを行い、さらに得られた変異株からチューブリンの変異株のみを選び出すことにより、40系統のねじれ変異株を解析に用いている。これらの変異の多くは隣接するチューブリン分子が相互作用すると考えられる位置に見出された。また、GTP加水分解を促進すると考えられるアミノ酸残基にも変異が見つかった。機能的なチューブリン領域を網羅的に解析したのは、高等生物で本論文が最初である。

また、本論文では2種類の微小管標識システムを利用して、個々の表層微小管の動きを詳細に調べている。野生株、右巻き変異株、左巻き変異株のそれぞれの微小管動態を解析することにより、変異株において特徴的な微小管状態が明らかとなった。このような動態解析を多くのねじれ変異株で行うことにより、微小管配向の左右性を生み出す機構が解明されてゆくものと期待される。

さらに、本論文では表層微小管が何本の原繊維で構成されるかをタンニン酸固定法と透過型電子顕微鏡を用いて調べている。困難な観察方法のため、調べられた微小管数はそれほど多くはないが、野生株とねじれ変異株において表層微小管は基本的に13本の原繊維で構成されることが観察された。この知見は左右性の起源を考察する上で有用であり、変異株で微小管自体がねじれた構造をとっている可能性は低いと考察された。

以上のように、本論文は植物細胞の伸長方向制御の観点から微小管の構造と動態を分子遺伝学、分子生物学、細胞生物学を用いて研究したもので、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。