

# 論文内容の要旨

申請者氏名 矢尾 真樹

植物細胞において、細胞表層にある微小管(表層微小管)はその配向を厳密に規定することで、細胞の伸長方向の決定や形態の維持に働いている。この微小管の配向は、様々な微小管付随タンパク質(MAPs)によって直接制御されている。シロイヌナズナの SPIRAL2(SPR2)は植物特有の MAP であり、SPR2 の欠損変異株(*spr2*)は、表層微小管の配向が傾いたために様々な器官で細胞の伸長方向が傾き、ねじれるという形質を示した。本論文では、植物特有の MAPs による表層微小管の制御機構を解明するため、SPR2 について解析した。

SPR2 にはシロイヌナズナゲノム内に非常に相同性の高いホモログ、SPR2-LIKE(SP2L)が存在する。SP2L の T-DNA 挿入変異株(*sp2l*)の表現型は野生型と変わらないが、*spr2sp2l* 二重変異株は *spr2* 変異形質を強調し、SP2L を過剰発現させると *spr2* の変異形質を相補した。以上のことから SPR2 と SP2L は機能重複性があると考えられた。SPR2 及び SP2L の局在性を調べるために、SPR2 及び SP2L の C 末端に GFP を融合し自身のプロモーター制御下で発現させた SPR2-GFP 及び SP2L-GFP 形質転換システムを作成した。SPR2-GFP は植物体全体で、また SP2L-GFP は根毛などの限られた組織でのみシグナルが検出された。さらに SPR2-GFP システムを用いて SPR2 の細胞内での局在と動態を調べたところ、SPR2-GFP は表層微小管上にドット状に局在し、移動しているものと停止しているものが同時に存在していた。特に孔辺細胞において、微小管プラス端集積タンパク質である END-BINDING PROTEIN1(EB1)と似た動態を示したことから、SPR2 の少なくとも一部は微小管プラス端に集積すると判断した。

次に、SPR2 の微小管動態への影響を調べるために、*spr2* 変異株と SPR2 の過剰発現システムに微小管を蛍光標識する GFP-TUB6 マーカーを導入し、微小管動態への影響を調べた。その結果、*spr2* 変異株では過剰発現システムに比べ、微小管プラス端において伸長や収縮が止まる「静止」という現象の起きる時間が増加していた。さらに *spr2* 変異株に微小管プラス端を標識する GFP-EB1 マーカーを導入し、プラス端における EB1 動態への影響を調べたところ、EB1 の蛍光が一時的に止まるという現象が観察され、SPR2 はプラス端の伸長方向を制御する機能があることが考えられた。

以上の結果より、SPR2 ファミリーの MAPs は微小管プラス端の正常な動態を保つことにより、表層微小管構築を助けていると結論付けた。最終的な微小管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、植物特有の制御因子の働きにより、配向形成プロセスが厳密に制御されていると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 矢尾 真樹

間期植物細胞の微小管は細胞膜内側に張り付いて表層微小管を形成し、セルロース微繊維の並び方を制御することにより、細胞の伸長方向を規定していると考えられている。表層微小管は細胞タイプや内外の環境刺激により配向を変化させるが、その再構築には微小管付随タンパク質 (MAP) が重要な働きを果たすことが想像される。近年、植物細胞で働く MAP が次々に同定されてきている。これらの MAP には動物や酵母で知られている MAP と同じ種類のものもあれば、植物特異的な MAP も存在する。特に、植物特異的な MAP については、それらがどのように微小管機能を制御し、どのように微小管パターン形成に影響を与えているかはほとんどわかっていない。

本論文では遺伝学的手法により同定された植物特異的な MAP である SPIRAL2 (SPR2) とそのホモログ SP2L について、遺伝学的、細胞生物学的、生化学的な解析を行い、また微小管標識マーカを用いた動態解析により、これらの MAP が微小管プラス端の静止状態を抑制することにより、スムーズな微小管動態を保障し、正常な表層微小管パターンを形成するのに貢献していることを明らかにしている。植物の MAP の機能が *in vivo* と *in vitro* の両方において詳細に解析され、その主要機能が明らかとなったのは本論文が最初である。また、微小管プラス端の機能制御は最近注目されており、本論文で明らかとなった知見は他の微小管プラス端集積因子の研究に大きな影響を与えられようと考えられる。

本論文では、まず両遺伝子の発現レベルと発現パターンを解析し、*spr2* 変異株、*sp2l* 変異株、その 2 重変異株の表現形を観察し、SP2L を *spr2* で強制発現させる実験により、SPR2 と SP2L が同様の分子機能を持っており、その発現レベルの違いにより、変異株の表現形の強弱が異なることを示している。次に、SPR2 の細胞内局在性を詳細な動態観察により解析し、SPR2 分子の一部が微小管プラス端に局在することを見出した。さらに、変異株における微小管動態の解析から、SPR2 は通常は動的な表層微小管が一過的に静止するポーズ状態を抑制することにより、微小管が曲がった軌跡をとることを防いでいることを明らかにした。最後に、*in vitro* において SPR2 と SP2L 単独分子が微小管動態に与える影響を解析し、*in vivo* で見られたポーズ抑制現象が SPR2 と SP2L による直接の効果であることを強く示唆する実験結果を得ている。

以上のように、本論文は植物に特異的な微小管制御タンパク質の機能を *in vivo* と *in vitro* 両方における詳細な実験・観察により研究したもので、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。