

# 論文内容の要旨

申請者氏名 中村 匡良

植物細胞の微小管は細胞周期依存的に特徴的な形態を構築し、間期には細胞膜直下で表層微小管と呼ばれるネットワーク上の構造を形成する。根の伸長領域や黄化胚軸など伸長する細胞の表層微小管は伸長軸に対し垂直に並び細胞伸長の方向性を規定することが知られている。

特徴的な微小管構造の構築には新規微小管形成が寄与すると考えられる。高等植物の間期微小管動態観察の研究から、新しい微小管は既存の表層微小管から約 40° の角度を持って分岐するように微小管を形成することが示され、さらに、形成された微小管は形成部位から切り離されることが報告されている。植物細胞にも動物細胞の微小管形成中心に存在している分子が存在することが知られている。しかしながら、その構造や機能の知見は乏しい。本研究では植物微小管重合核複合体の機能や役割を明らかにするため、微小管重合核構成成分と考えられるシロイヌナズナ AtGCP2 の機能解析を行った。

AtGCP2 タンパク質の一アミノ酸置換が起こった変異株 *spiral3* (*spr3*) 変異株は根の伸長領域における表層微小管がやや左肩上がりに配向しているため、表皮細胞が右方向に伸長し、根が右巻きにねじれるという形質を示した。微小管形成機構を解析するため、*spr3* と野生型に微小管を標識する GFP-TUB6 マーカーを導入し、微小管動態を観察した。野生型では微小管形成は約 40° の角度で形成されるのに対し、*spr3* 変異株では微小管形成角度の分布は広がり、形成角度の制御が緩和しているようであった。*spr3* 変異株の解析から、正常な AtGCP2 を含む植物微小管重合核は微小管形成角度の制御を介して形態形成に重要な微小管束の配向に寄与していることが示唆された。

一方、AtGCP2 の機能欠損株の解析により AtGCP2 が雌雄配偶体の形成や胚発生に重要であり、生存に必須内因子であることを示した。

AtGCP2 と微小管を蛍光標識し、二色同時ライブイメージングにより新規微小管形成と AtGCP2 の関係を観察し評価した。AtGCP2 は微小管の存在しない細胞膜と表層微小管上に局在した。細胞表層局在を示した AtGCP2 は一過的な局在性を示し、より長く局在する微小管上の AtGCP2 は数秒以内に新規微小管を形成した。さらに、カタニン依存的に新規微小管は形成場所より切り離され、AtGCP2 も微小管上から速やかに消失すること、新規微小管のプラス端が形成場所まで完全に脱重合しても AtGCP2 が消失することが観察された。このことから微小管重合核を介した植物間期微小管形成には AtGCP2 が細胞膜や表層微小管に結合することと AtGCP2 が安定化され活性化することの 2 つの制御が存在することが示唆された。また、既存の微小管に平行な微小管形成が新規に確認された。

本研究により、AtGCP2 を含む微小管重合核を介した植物微小管形成機構の新規な知見を得ることができた。また、変異株の解析から、微小管形成角度の厳密な制御により表層微小管の正常なパターンが構築されることが示唆された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 中村 匡良

植物間期表層微小管束はその特徴的な構造を構築することで植物細胞の形を規定すると考えられている。特徴的な表層微小管構造の構築システムを理解するためには、微小管がどのように形成されるかを理解する必要がある。微小管の動態観察から既存の微小管上から角度を持って新規微小管は形成され、その形成場所から切り離されて細胞膜上を移動することが知られているが、微小管形成を担う複合体の機能や形成・切断過程の詳細についてはほとんどわかっていない。分裂酵母では微小管上から新規微小管が形成されることが知られており、動物細胞でも中心体から微小管のマイナス端の切り離しが観察されている。しかし、これら2つの現象が同時に、かつ一般的に起こっているのは植物表層微小管の大きな特徴であり、この過程の解明は植物のみならず他の生物の微小管形成と微小管パターン構築の理解に大きく寄与すると期待できる。

本論文では、モデル植物シロイヌナズナにおいて $\gamma$ チューブリン複合体の構成因子 AtGCP2 の機能解析を行っている。まず、右巻きのねじれ変異株 *spiral3* が AtGCP2 のアミノ酸置換変異であり、AtGCP2 を含む複合体を介した表層微小管の形成角度の厳密な制御が表層微小管パターンの正常な構築に重要であることが示された。AtGCP2 のヌル変異は致死であることから、 $\gamma$ チューブリン複合体の機能異常が細胞や個体レベルでどのような影響を与えるかはこれまでは解析が困難であったが、本変異株の詳細な解析により微小管形成が最終的な微小管パターンの構築に及ぼす影響が明らかとなった。

また、本論文ではシロイヌナズナ細胞内で微小管と微小管重合核の構成因子 AtGCP2 を同時に異なる蛍光を発する蛍光タンパク質で標識し、同時に動態観察することで、微小管形成機構を詳細に調べている。これまで知られていた角度を持った微小管形成に加え、微小管を束化させ安定化させる新規の微小管形成機構が観察された。また、微小管切断活性をもつカタニンの変異株を用いることにより、微小管の形成と切断過程における微小管重合核複合体の振る舞いを始めて可視化することに成功している。こうした一連の動態解析により、細胞質の微小管重合核が細胞表層に一過的に結合し、その中で既存の表層微小管上に結合した重合核がその場に安定して局在すると同時に新規な微小管を形成すること、新規微小管のマイナス端がカタニンにより切り離されたり、プラス端からの脱重合により完全に消失することにより、微小管重合核複合体の構造が変化し、既存の微小管上から乖離するという新規微小管形成モデルを提唱している。このモデルは微小管形成の制御を考える上で非常に示唆に富むものであり、また微小管形成が異常な変異株の解析に有用な指標となると考えられる。

以上のように、本論文は植物の微小管形成機構を分子遺伝学、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。