

# 論文内容の要旨

申請者氏名 藤田 智史

微小管は植物において、細胞の形の決定・増殖など生存に必須の役割を果たす重要な細胞内構造物の一つである。その役割のために、微小管は細胞周期や植物ホルモンなど内的刺激および環境ストレスなどの外的刺激に応答してネットワークの再編成を行う。このことは、様々な刺激と微小管を結びつける多岐にわたる制御機構が存在することを示唆しているが、特に外的刺激と微小管制御の分子実態に関する知見は極めて乏しい。

本研究においては植物の微小管制御系を明らかにするために、微小管重合阻害剤に高感受性を示す *propryzamide hypersensitive 1-1d* (*phs1-1d*) 変異体に着目した。*PHS1* は phosphatase domain を持つタンパク質をコードすることからリン酸化経路を通じて微小管の安定性制御に寄与することが示唆されていたが、どのように微小管制御に関わるかは不明のままであった。ここでは、*PHS1* の生化学的・細胞生物学的機能および *PHS1* 経路の活性化を解析することにより植物細胞における微小管制御機構の一側面を明らかにすることを目的とした。

最初に *PHS1* のどの領域が微小管の安定性に関わるかを評価したところ 85-700a.a. に微小管を強く脱重合させる活性があることが分かった。この領域中には粘菌の atypical kinase の一種である Actin-fragmin kinase と弱い相同性を示す領域が存在する。このことから *PHS1* のこの領域も kinase domain ではないかと考え実験を行い、この領域が kinase であることを示した。この domain は、*in vitro* および *in vivo* で  $\alpha$ -tubulin Thr 349 をリン酸化し、このリン酸化は tubulin を微小管に取り込みづらくさせることを明らかにした。

ところで、*PHS1* は atypical kinase domain だけではなく phosphatase domain も持つタンパク質である。そこで *PHS1* の phosphatase domain の役割を検討したところ、phosphatase 活性が *PHS1* の kinase domain がもつ微小管脱重合活性を *in vivo* で抑えることが分かった。

最後に *PHS1* の細胞・個体レベルでの機能を理解するために、*PHS1* による  $\alpha$ -tubulin のリン酸化および微小管脱重合がどのような条件下で引き起こされるかを検討した。先行研究により、イネにおいて高浸透圧条件下で  $\alpha$ -tubulin Thr349 のリン酸化が引き起こされることが報告されていた。そこで *PHS1* を介してこれらの現象が引き起こされているのではないかと考え研究を進めたところ、*PHS1* 依存的に高浸透圧ストレス条件下での  $\alpha$ -tubulin のリン酸化および微小管の脱重合が引き起こされることが明らかとなった。

本研究では、*PHS1* に phosphatase domain に加え新奇 atypical kinase domain である tubulin kinase domain を同定し、高浸透圧条件下において kinase domain が  $\alpha$ -tubulin をリン酸化することで微小管の脱重合を促進することが分かった。また、この経路は通常条件下では phosphatase 活性によって抑えられていることが示唆された。この研究によって、外界環境と微小管の状態を結びつける分子機構の一端が明らかになった。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 藤田 智史

微小管は真核生物に高度に保存された細胞骨格であり、その高次構造、動態、他の細胞構造物との相互作用を変化させることにより、細胞分裂、細胞極性形成、オルガネラ移動など多様な細胞機能に重要な役割を果たしている。植物における微小管研究は、細胞分裂時における分裂面の決定機構並びに間期微小管が細胞伸長方向を決定する分子機構が主流を占めていた。一方、乾燥、高低温、重金属などの劣悪環境要因が微小管をすばやく脱重合する現象がいくつかの植物種において報告されており、外来刺激に対して植物が細胞骨格の安定性をどのように制御し、環境適応しているのか興味もたれていた。しかしながら、外部シグナルに微小管が応答する分子機構は全く解明されておらず、今後の研究の発展が期待される植物科学分野のひとつである。

本論文では、モデル植物シロイヌナズナの微小管が不安定になっている優勢変異株として本研究室で単離され、その原因遺伝子が解明されていた *propyzamide hypersensitive 1d* (*phs1-d*)について詳細な機能解析が行われた。PHS1は mitogen-activated protein kinase を脱リン酸化する phosphatase (MKP)に分類され、*phs1-d*ではそのキナーゼ相互作用予想モチーフが変異していた。シロイヌナズナ葉細胞への一過的遺伝子発現系を用いて、PHS1のどの領域に微小管不安定化能があるのかが調べられたところ、phosphatase 触媒領域とは別の保存された機能未知の領域が植物細胞で微小管を脱重合することが判明した。藤田君は、さらにこの領域が $\alpha$ チューブリンのトレオニン 349 を特異的にリン酸化する新奇キナーゼであることを *in vitro* と *in vivo* の実験で証明した。

本論文では、さらに PHS1によりリン酸化されたチューブリンは微小管ポリマーに重合しないこと、植物細胞では PHS1の脱リン酸化活性がこのチューブリンリン酸化活性を抑制していることを明らかにしている。最後に、本論文では高浸透圧や高塩濃度などの外界ストレスが PHS1を介して表層微小管の迅速な脱重合を引き起こしていることを発見し、外界ストレスが PHS1の脱リン酸化による抑制を解除することによりすばやく外来刺激応答を可能にしていると議論している。

以上のように、本論文は植物の微小管安定性が環境要因によりすばやく制御される分子機構を生化学、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。