

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 ヒメツリガネゴケの細胞分裂期におけるキネシンスーパーファミリーの網羅的局在・機能解析

氏 名 三木 智博

論 文 内 容 の 要 旨

生命体が自身を構築し、恒常性を保つためには、細胞分裂が正確に行われる必要がある。この過程において、微小管は分裂期スピンドル（紡錘体）を構成し、染色体を正確に娘細胞に分配するために必須の役割を果たす。また、適切な核の配置は様々な細胞種の機能において非常に重要である。植物細胞では、actin と myosin が核の配置に重要であることが示されてきた。一方、動物や酵母においては、一般的に微小管依存的なメカニズムが用いられている。細胞分裂制御機構や核の配置機構における普遍的な原理を知るためには、動植物の相違点を比較検討していく必要がある。しかし、動物細胞に比べ、植物細胞の分裂の分子的基盤に関する知見の蓄積は少なく、比較検討の下地はいまだ十分に用意されていない。私は不明な点が多い植物の細胞分裂機構、核の配置機構を解明するため、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*, *P. patens*) を用いた細胞生物学的研究を行った。

具体的には、細胞分裂機構や核の配置機構を分子レベルで解明することを目標に、まず、細胞分裂、核の配置の様子を高解像度でライブ観察し、定量的な解析を行った。次に、微小管結合モーターである kinesin に着目し、2 種類のスクリーニング（局在スクリーニング、RNAi スクリーニング）を通して分裂期に関わる因子の局在、機能を調べた。

まず、 α -tubulin を GFP、histoneH2B を mRFP で標識したヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞の細胞分裂を高解像度でタイムラプス観察した。その結果、核膜崩壊前に核膜の周りにある微小管が先端側に多く配置され、核膜崩壊後、単極性状態のスピンドルが分裂前中期に両極性に転換されることを見出した。三次元解析により、核膜崩壊前は微小管が投網のような形で核を覆っており、核膜崩壊後 1-3 分の間で微小管の増幅が起こっている様子が観察された。同様に、微小管の増幅は染色体の分離後、フラグモプラストが形成される際にも観察された。また、阻害剤を用いた実験から分裂直後の核の動きはアクチン依存的ではなく、微小管依存的なメカニズムによって引き起こされることが示唆された。

Kinesin はすべての真核生物に存在する微小管に力を及ぼすモータータンパク質である。興味深いことに陸上植物は 60 以上の kinesin をもち、これは酵母や動物で知られているよりもずっと多い。しかし、植物のもつ多くの kinesin は、性状が明らかにされておらず、細胞内での働きもよくわかっていない。本研究では、内在性の kinesin 遺伝子に蛍光タンパク質を融合することにより、

ヒメツリガネゴケの kinesin の分裂期での局在を包括的に決定し（局在スクリーニング）、43 の kinesin が細胞分裂装置（キネトコア、スピンドル、フラグモプラストなど）に局在することを見出した。驚くべきことに、43 のうち 1 つだけが動物のホモログと同一の局在パターンを示し、残りの多くは想定外のところに局在した。RNAi スクリーニングでは、いくつかの遺伝子で分裂異常や核の配置異常などの表現型が認められた。本研究では、2 つのファミリー (kinesin-5、kinesin-ARK) について詳細な解析を進めた。

動物や酵母では、kinesin-5 はスピンドル中央で反平行な微小管をスライドさせる機能を持ち、その欠損によって中期スピンドルの単極化が起こることが知られている。しかし、ヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞で kinesin-5 を RNAi ノックダウンしてもスピンドルの単極化は見られず、かわりに分裂期後期に姉妹染色分体の分配異常やフラグモプラスト微小管の配向異常が見出された。反平行な微小管の多いスピンドル・フラグモプラストのミッドゾーンに kinesin-5 の局在がほとんど認められず、平行な微小管が多い領域に強く局在した。これらの結果から、ヒメツリガネゴケにおいては kinesin-5 は反平行ではなく、平行な微小管を架橋することにより正確な細胞分裂を保障している可能性が考えられた。

また、armadillo repeat-containing kinesin (kinesin-ARK) という植物特異的なモータータンパク質が核の配置に必要であることを見出した。先端成長するカウロネマ細胞において、細胞分裂の後、核は微小管依存的に細胞の中央に配置される。Kinesin-ARK の RNAi ノックダウンでは、中央へ向かう初期の核移動は通常通り起こるが、中央に達する前に元の分裂面の位置に戻ってしまう。コントロールの細胞では、動いている核の周りに kinesin-ARK と共局在する微小管の束化が頻繁に観察されるが、kinesin-ARK のノックダウンした細胞では見られない。In vitro の微小管 gliding assay では、kinesin-ARK が微小管のプラス端方向へ向かうモータータンパク質であることを示した。これらの結果は動物や菌類と同様に、コケのカウロネマ細胞においても微小管と微小管依存的なモータータンパク質が核の移動を引き起こしていることを示唆している。

本研究によって、ヒメツリガネゴケの細胞分裂装置に関する微小管モータータンパク質の一覧を提供することになった。多くの kinesin は植物で保存されているため、モデル植物としてよく用いられるシロイヌナズナといった種でさらなる研究がなされることが期待されるとともに、酵母や動物で行われてきた研究に基づいた分裂期 kinesin の一般化に一石を投じることなることが期待される。