

# 主論文

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

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

三木 智博

# 目次

要旨	3
序論	5
細胞分裂 核の配置 微小管 (microtubule) キネシン (kinesin) ヒメツリガネゴケ ( <i>Physcomitrella patens</i> ; <i>P. patens</i> )	
結果 第1部; カウロネマ細胞の観察	10
ヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞の細胞分裂 細胞分裂後、核は微小管依存的に中央に配置される	
結果 第2部; 局在スクリーニング	12
ヒメツリガネゴケ kinesin の分類 局在スクリーニング (細胞分裂期での内在性 kinesin の局在) アミノ酸配列の相同性と局在の相似性の関係	
結果 第3部; RNAi スクリーニング	17
Kinesin RNAi スクリーニング	
結果 第4部; Kinesin-5 の研究	18
Kinesin-5 はスピンドルとフラグモプラストのミッドゾーンに局在しない Kinesin-5 は細胞分裂後期以降のスピンドル、フラグモプラストの組織化と染色体の分配に必須である	



結果 第 5 部; Kinesin-ARK の研究	20
Kinesin-ARK は核の配置に関わる	
Kinesin-ARK は移動する核の周りにある微小管束に集積している	
Kinesin-ARK はプラス方向へのモーター活性を持つ	
考察	23
他の中心体をもたない細胞との比較とこれからの展開	
分裂期における植物 kinesin の内在性局在解析	
細胞分裂における kinesin-5 の役割	
核の配置における微小管と kinesin-ARK の役割	
材料と方法	29
図	33
表	69
動画の説明文	83
参考論文	87
謝辞	100

# 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、 $\alpha$ -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 actin 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。

# 序論

## 細胞分裂

生物は細胞を増殖、分化させるために細胞分裂を行う。細胞分裂はすべての生物に必須のプロセスである。一般に細胞分裂期 (体細胞分裂期) は以下の 6 つの時期に分けられる (Gadde and Heald 2004; McIntosh et al. 2002; Mitchison and Salmon 2001; Rieder and Khodjakov 2003; Scholey et al. 2003)。

前期	複製の終わった染色体が凝縮する
前中期	核膜の崩壊がおこる
中期	染色体がスピンドルの赤道面に整列する
後期	2 つの姉妹染色分体が分離され両極に向かって移動する
終期	染色体が脱凝縮し娘核が形成される
細胞質分裂	細胞質が 2 つに分かれることにより、2 細胞となる

また、後期は 2 種類からなり、それぞれ

後期 A	動原体微小管が短くなり、染色体が極に向かう
後期 B	2 つの紡錘体極が遠ざかる

と呼ばれる。

動物細胞に比べ、植物細胞の体細胞分裂に関する知見の蓄積は圧倒的に少ない。動物細胞と植物細胞において細胞分裂の様式には明らかな違いが存在する (Inoue and Sato 1967)。両者の重要な違いとして以下の二点が挙げられる (図 1)。体細胞分裂では、動物には微小管を生み出す中心となる中心体があるが植物には存在しない (Marshall 2009; Murata et al. 2007)。細胞質分裂において動物細胞では収縮環によって娘細胞がくびり切れるのに対し、植物では細胞板による区分けがおこる (Lambert and Bajer 1972; Otegui et al. 2005)。この細胞板を形成するために、植物はフラグモプラストと呼ばれる、主に微小管からなる構造体を染色体分離後に形成する (図 1 右上)。

## 核の配置

真核生物の細胞は遺伝物質を包み込み、遺伝子発現の制御を担う核を持つ。多くの細胞種において、細胞の中での核はランダムに配置されない (Gundersen and Worman 2013)。例えば、棒状の細胞である分裂酵母では、核は細胞の中央に配置され、その結果、分裂装置であるスピンドル、収縮環 (コントラクタイルリング) は中央に形成される。これらのメカニズムによって、等分裂を保障している (Tran et al. 2001)。対照的に、上皮細胞や

神経細胞などの多くの分化した動物の細胞では、核は非対称に配置され、そしてそれは、生理学的に重要であるようである (Gundersen and Worman 2013)。植物の細胞においても、核の配置は制御されている。例えば、シロイヌナズナの葉の細胞では青色光依存的に核の配置が行われることが示されている (Iwabuchi et al. 2010; Iwabuchi et al. 2007)。

現在までの報告によると、動物や酵母の多くでは核膜と結びついた微小管が核の細胞内配置に重要な役割を担う。核膜と結びついた微小管は 2 つのメカニズムで核を動かすことができる。1 つめは、微小管のプラス端が細胞表層と結びつき、pushing force もしくは pulling force を生み出すことによって、核を配置するメカニズムである。分裂酵母では、細胞先端の微小管による pushing force によって、核が中央に配置される (Tran et al. 2001)。一方、出芽酵母では、微小管のマイナス端方向に歩くモータータンパク質、細胞質 dynein が集まる細胞表層で生じる微小管の pulling force によって核は bud neck に移動する (Adames and Cooper 2000)。2 つめは、核膜と微小管をつなぐモータータンパク質によって核が微小管上を輸送されるメカニズムである。例えば、動物受精卵の雌性前核の動きは、精子由来の中心体微小管に沿って歩く dynein によって引き起こされる (Reinsch and Gonczy 1998)。プラス端方向に歩くプロセッシブなモータータンパク質、kinesin-1 と kinesin-3 もまた、核の動きに必要であることが示されている。核膜表面にある特異的なタンパク質がこれらのモータータンパク質を集めてくる (Fridolfsson and Starr 2010; Tsai et al. 2010)。一方、植物では多くの細胞種で、actin とモータータンパク質・myosin (例えば、myosin XI-i) が核の位置を制御している (Chytilova et al. 2000; Iwabuchi et al. 2010; Tamura et al. 2013)。それにも関わらず、核膜上で細胞骨格モーターと核をつなぐアダプタータンパク質 (SUN-KASH 複合体) は酵母、動物、植物で保存されている (Gundersen and Worman 2013; Tamura et al. 2013)。陸上植物において、kinesin 依存的な核の配置機構は報告されていない (陸上植物は細胞質 dynein をもたない)。

## 微小管 (microtubule)

微小管は細胞分裂をはじめ、細胞の成長、移動、核の配置などにおいて重要な因子である (Desai and Mitchison 1997)。微小管は  $\alpha/\beta$ -tubulin ヘテロダイマーの最小構成単位からなり、その tubulin ヘテロダイマーが重合した、極性のある繊維状の構造体である (Desai and Mitchison 1997)。新たな tubulin ヘテロダイマーが微小管に断続的に重合している状態をグロース (伸長、growth)、脱重合している状態をシュリンク (短縮、shrinkage)、見かけ上、伸長も短縮もしていない状態をポーズ (休止、pause) と呼ぶ。また、伸長から短縮への転換をカタストロフ (崩壊、catastrophe)、逆に短縮から伸長への転換をレスキュー (救済、rescue) と呼ぶ。各状態への転換は偶発的に起き、この現象はダイナミックインスタビリティ (動的不安定性、dynamic instability) と呼ばれる。微小管のプラス端はマイナス端に比べて動的である (Horio and Hotani 1986; Kinoshita et al. 2001; Mitchison and

Kirschner 1984)。

## キネシン (kinesin)

哺乳類の kinesin は配列の類似性から 14 のサブファミリー (kinesin-1-kinesin-14) に分類されている (Lawrence et al. 2004; Miki et al. 2005)。Kinesin のいくつかは細胞分裂期において非常に重要な役割をもつ。スピンドルの両極性の確立、中期分裂面からの染色体の分離、スピンドルのサイズ決定、細胞質分裂などには kinesin-4、-5、-6、-7、-8、-10、-12、-13、-14 のファミリーの kinesin が協同的に働くことにより確実に行われる。これらの分裂期 kinesin は様々な種での機能解析や局在解析により同定されてきた。例えば、GFP 融合タンパク質を発現する株を作成することで、出芽酵母のもつ 6 個の kinesin のうち 4 個がキネトコアに局在することが明らかになった (Tytell and Sorger 2006)。また、網羅的な RNAi スクリーニングによりショウジョウバエ S2 細胞では、25 個のうち 8 個が細胞分裂に必須の機能を果たしていることが示された (Goshima and Vale 2003)。ヒトでは、数種の細胞株において RNA 干渉 (RNA interference、RNAi) 解析と局在解析がなされ、45 個の kinesin のうち、20 個ほどが分裂期 kinesin として同定された (Maliga et al. 2013; Miki et al. 2005; Zhu et al. 2005)。多くの kinesin は微小管や染色体に力を及ぼす。そのため、細胞分裂装置に局在する kinesin を同定することは、スピンドルの両極性の確立、スピンドルの伸長、染色体の動態など、ダイナミックな動態の分子メカニズムを理解するために必須の知見を提供する (Goshima and Kimura 2010; Scholey et al. 2003; Walczak and Heald 2008)。

興味深いことに、最近の全ゲノム解析により陸上植物は動物よりも多くの kinesin を有することが明らかになった。シロイヌナズナは 61 個の kinesin をもつが、従来の 14 のサブファミリーに属さないものがいくつか存在する (Miki et al. 2005; Reddy and Day 2001; Vale 2003)。なぜ、陸上植物がそれほど多くの kinesin を持つのかは未解決の問題であり、実験なしでは解決できない。しかしながら、シロイヌナズナでは 60 以上存在する kinesin を網羅的に解析することは困難であり、今日まで、植物のもつ個々の kinesin の役割や各ファミリーの役割の理解は限られている。

## ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*; *P. patens*)

ヒメツリガネゴケは様々な分子生物学的なツールが使える比較的新しいモデル陸上植物である (Bezanilla et al. 2003; Bezanilla et al. 2005; Cove 2005; Hiwatashi et al. 2008; Nakaoka et al. 2012; Prigge and Bezanilla 2010; Rensing et al. 2008; Senger et al. 2005; Vidali et

al. 2009a; Vidali et al. 2009b)。27本の染色体をもち、ゲノム配列は2008年に解読されデータベースは整備されている (Rensing et al. 2008)。ヒメツリガネゴケの大きな特徴のひとつとして、相同組換え効率が非常に高いことが挙げられる。この高い相同組換え効率を利用し、GFPなどの蛍光タンパク質をコードする遺伝子を内在性遺伝子に付加することができるため、蛍光タンパク質を融合したタンパク質は本来の染色体上にある本来のプロモーター下で発現される。加えて、ヒメツリガネゴケは生活環の多くを一倍体で過ごすため、融合タンパク質は内在性のタンパク質に完全に置き換わって存在することになる (Nakaoka et al. 2012; Prigge and Bezanilla 2010)。そのため、これらの置き換わった蛍光タンパク質の局在は本来の内在性のタンパク質の局在を正確に表す可能性が高い。また、この高い相同組換え効率を利用し、ノックアウト株の作成も容易に行える。さらに、ヒメツリガネゴケではRNAiが働くことが報告されている (Bezanilla et al. 2003; Bezanilla et al. 2005)。所属研究室では、最近、新たに誘導型のRNAiシステムを構築した (Nakaoka et al. 2012)。この誘導型RNAi系を用いれば、分裂に必須な遺伝子を比較的簡便かつ網羅的にノックダウンすることができるため、植物細胞での網羅的な遺伝子機能解析が可能となった (Kosetsu et al. 2013; Nakaoka et al. 2012)。

もうひとつのヒメツリガネゴケを用いる利点は、カウロネマ細胞と呼ばれる細胞でライブ観察が容易に行える点である。胞子から発芽した糸状の原糸体とよばれる組織にはクロロネマ細胞とカウロネマ細胞の2種類の細胞が存在する (Menand et al. 2007)。クロロネマ細胞は大きな葉緑体をもち、光合成により盛んにエネルギーを産生している。一方、カウロネマ細胞はクロロネマ細胞に比べて、細胞周期が短く (5~6時間ごとに分裂する)、細胞の伸長速度が速い (Menand et al. 2007; Nakaoka et al. 2012; Prigge and Bezanilla 2010)。加えて、カウロネマ細胞は葉緑体が小さいため自家蛍光が少ない。そのため、細胞分裂期において、GFPやRFPなどの蛍光タンパク質をライブ観察するのに適している (Hiwatashi et al. 2008; Kosetsu et al. 2013; Nakaoka et al. 2012)。現在までの研究において、GFP-tubulin (微小管のマーカー)、histoneH2B-mRFP (染色体のマーカー)、MAP65-GFP (反平行微小管の束化マーカー)、EB1-GFP (微小管のプラス端マーカー) を使用することで、カウロネマ細胞でのスピンドル、フラグモプラストの形成過程の動態が一部明らかにされた (Hiwatashi et al. 2008; Kosetsu et al. 2013; Nakaoka et al. 2012)。すなわち、機能阻害と顕微鏡を使ったライブ観察を組み合わせることで、細胞分裂に関わるダイナミックな細胞内プロセスの分子メカニズムや遺伝子の機能など、新たな見識が得られてきた。

カウロネマ細胞は多くの陸上植物の細胞と同様に、中心体等の微小管重合中心をもたない。かわりに、分裂期においては、主としてオーグミンと呼ばれるタンパク質複合体によって微小管の増幅が行われている (Doonan et al. 1985; Nakaoka et al. 2012)。しかし、他の陸上植物の多くの細胞とは異なり、カウロネマ細胞は preprophase band (PPB、分裂準備帯とも呼ばれる。主に微小管からなり、細胞分裂初期に一時的に現れ、将来の分裂面を決定する構造体である。(Bannigan et al. 2008; Lloyd and Chan 2006; Muller et al. 2009)) を形成しない。そのため、カウロネマ細胞を用いれば、スピンドルやフラグモプラストが中心体やPPBに依存せず、自己組織化によって構築されるメカニズムを明らかにできる

と思われる。また、その成果は中心体を持たない一部の動物細胞のスピンドル形成の理解にも重要な示唆を与えると考えられる (Goshima and Scholey 2010; Walczak and Heald 2008)。

本研究では、細胞分裂や核の配置のメカニズムを明らかにするため、ヒメツリガネゴケを用いて細胞生物学的な解析を行った。まず、カウロネマ細胞の細胞分裂、分裂後の核の配置の様子を高解像度で観察し、詳細に記載した。次に、78種類ある kinesin の全蛍光タンパク質融合株の作成を試み、kinesin の分裂期局在スクリーニングを行うことで43個もの kinesin が分裂期において細胞分裂装置に局在することを明らかにした。さらに、450以上の kinesin RNAi 株をライブ観察することで、kinesin-5 と kinesin-ARK ファミリーの細胞内での新しい機能を見出した。これらの結果をふまえて、動物と植物の kinesin の相違点、細胞分裂や核の配置の分子機構について考察する。



# 結果 第1部; カウロネマ細胞の観察

## ヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞の細胞分裂

まず、ヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞の細胞分裂過程を知るため、 $\alpha$ -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を spinning-disc 型共焦点蛍光顕微鏡で観察し、スピンドルの長さ、分裂期の時間 (核膜崩壊から染色体の分離が始まるまでの時間) を測定した (図 2、3、4、5、動画 1)。それぞれ、 $12.1 \pm 1.5 \mu\text{m}$  ( $n = 11$ 、平均  $\pm$  標準偏差)、 $10.6 \pm 1.0$  分 ( $n = 10$ 、平均  $\pm$  標準偏差) であった。

微小管は分裂前期に核膜の周りに集まっており (図 2、-1 min)、スピンドルが形成された後、姉妹染色分体の分離がおこる。染色体の分離が始まると、スピンドルのミッドゾーン付近での微小管のシグナルが減少したが (図 2、11-12 min)、染色体分離の途中からは再び微小管シグナルの増加が見られた (図 2、12-15 min)。興味深いことに、核膜崩壊直前の微小管シグナルは細胞先端側で強く、反対側で弱い、非対称なパターンを示した (図 3A)。三次元で解析してみると、核の細胞先端側で動物細胞の中心体のような微小管形成中心 (Schuh and Ellenberg 2007) は観察できなかったが、核は投網のような形で微小管に覆われていた (図 4、NEBD (nuclear envelope breakdown、核膜崩壊))。

核膜崩壊後 3 分までは微小管はまだ先端側に多く、まず単極性状態のスピンドルが形成された (図 3B、1.8 min)。この過程において、時間経過とともに微小管のシグナル強度が増大した。やがて微小管の分布が非対称な単極性状態のスピンドルから迅速に対称的になり、核膜崩壊後 10 分以内に両極性のスピンドルが完成した (図 3B)。

## 細胞分裂後、核は微小管依存的に中央に配置される

Doonan らの研究によると、ヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞を微小管脱重合剤クレマートで 1 時間以上処理すると、頂端細胞では先端成長が抑制される (Doonan et al. 1988)。この表現型から先端成長において、微小管が重要であることが示されている。本研究では、現在最もよく使われる微小管脱重合剤オリザリン (Finka et al. 2007; Hiwatashi et al. 2014) と、GFP-tubulin と histoneH2B-mRFP を発現する細胞 (Nakaoka et al. 2012) を用いてタイムラプス観察による追試実験を行った。先端成長が抑制されることを確認し (動画 2、Hiwatashi et al. 2014)、想定していたように、分裂期においてスピンドルが形成されないこともわかった。

一方、興味深いことに、分裂直後の核の動きにオリザリンが影響を与えることを見出した。コントロールである DMSO を加えた細胞では、分裂直後、娘核は細胞の中央に向

かって動いた。その後、先端成長に伴い核も移動し、核は娘細胞の中央付近に維持された (図 6)。しかし、分裂終期の細胞にオリザリンを加えると、コントロールのように核は細胞中央に向かって動かず、その場所にとどまった (図 7A、B、D、動画 3)。これは先端成長が抑制されたことによる影響ではない。なぜなら、先端成長を止めることが知られている actin 重合阻害剤のラトランキュリン B、もしくはサイトカラシン B (Finka et al. 2007; Harries et al. 2005; Sato et al. 2001; Vidali et al. 2009a; Wu and Bezanilla 2014) を使用しても、分裂直後の核の動きには明らかな影響が見られなかったからである (図 7A、C、D、動画 3)。これらの結果は、頂端細胞の分裂直後の核の動きは微小管に依存していることを示唆している。

オリザリンを用いた実験により、カウロネマ細胞では微小管は少なくとも 3 つの役割 (細胞分裂、先端成長、核の配置) を担っていることが示唆された。これらの過程にはモータータンパク質により発生する力が関わっている可能性が考えられる。そこで、次に微小管モータータンパク質 *kinesin* に着目し、局在スクリーニング、RNAi スクリーニングから、これらの過程に働く因子の探索を試みた。

## 結果 第2部; 局在スクリーニング

### ヒメツリガネゴケ kinesin の分類

本研究では、kinesin の名称は Shen et al. の命名法に従った (Shen らはヒメツリガネゴケのゲノム配列から kinesin を探索し、それぞれの kinesin を Lawrence et al. に従い分類、命名した (Lawrence et al. 2004; Shen et al. 2012))。私自身の BLAST サーチで得られた結果は基本的に Shen et al. と同じであり、kinesin-1、-3、-6、-10、-11 はヒメツリガネゴケのゲノムには見当たらなかったが、Shen et al. でリストされなかった 2 個の kinesin を見出した (kinesin 12-Ip、12-IIId と名付けた)。合計で、ヒメツリガネゴケの kinesin はゲノム中に 78 個存在することを確認した。69 個を 15 のファミリーに分類し (kinesin-1-14 と kinesin-ARK)、残りの 9 つの kinesin はどのファミリーにも属さないため、'orphan' とした (表 1、2、Shen et al. 2012)。

### 局在スクリーニング (細胞分裂期での内在性 kinesin の局在)

78 個の kinesin のカルボキシ末端側に Citrine (GFP バリエーション (Griesbeck et al. 2001)) 遺伝子を in-frame で挿入することを試みた (図 8A、B)。アミノ末端側でのタグの付加は技術的に困難であるため、kinesin のカルボキシ末端側でのタグ付けを選択した。この方法の注意点として、カルボキシ末端側へのタグの付加によって kinesin の構造が正しく取られず、そのために間違った局在を示す可能性が挙げられる。そのような問題があるが、このアプローチによって、植物 kinesin の局在を網羅的に解析することが可能になり、全貌を明らかにするひとつの手がかりになると考えた。実際、kinesin のカルボキシ末端側へのタグの付加は様々な生物種の kinesin の多くでうまくいっていることが報告されており (Garcia et al. 2002; Goshima and Vale 2005; Maliga et al. 2013; Tytell and Sorger 2006; West et al. 2001)、機能的な蛍光タンパク質融合 kinesin が発現する可能性が高い。PCR により、相同組換えによる適切な置換が起きたことを 69 の kinesin で確認し (図 8C)、2 つの独立した株を使ってカウロネマ細胞で分裂期局在解析を行った。用意したそれぞれの PCR プライマーが働かなかったために、3 つの kinesin (kinesin 4-Id、12-Ij、12-IIb) ではタグの付加が確認できなかった。そのため、これらの遺伝子については、10-13 個の独立した株を未確認のまま観察した。Citrine の発現が顕微鏡下で確かめられたものについて、シグナルが目的の融合タンパク質由来であることを確かめるため、ウエスタンブロッティングを行った (図 8C)。合計 72 種類の Citrine 融合 kinesin 株をタイムラプス観察した。データベースからカルボキシ末端が判別できなかったため、6 個の遺伝子についてはタグを付加するためのコンストラクトを用意することはできなかった。

分裂期でのそれぞれの kinesin の局在を動画で示した (動画 4 では分裂期で局在が見られたものすべてを、動画 5-14 ではそれぞれのファミリーの局在をより高解像度で示している)。結果は、図 9、10、表 3 にまとめた。まとめると、8 つのサブファミリーに属する 40 個と orphan の 3 個が分裂期のいずれかの時期で分裂装置 (スピンドルやフラグモプラストなど) に局在した (図 10、局在分布を記述するため、本論文では便宜的に図 10 左のように、スピンドル、フラグモプラストは midzone/equator (ミッドゾーン/赤道面)、intra-spindle/intra-phragmoplast、polar region に細分化した)。分裂期局在が見られた kinesin の多くは、分裂期前期に細胞質にも拡散している様子が観察された。しかし、葉緑体由来の自家蛍光が強く、その時期での正確な局在を決定することは困難であった。最も頻繁に観察された場所はスピンドル微小管、フラグモプラスト微小管が反平行に集まるミッドゾーンであった。分裂後期や終期ではその場所に約 30 の kinesin が局在した。ミッドゾーン以外の場所にも局在するものも見られ (例えば、kinesin 7-IV)、中には、スピンドル、フラグモプラスト微小管全体に局在するものもあった (例えば、kinesin-13)。一方で、染色体に局在するものは少数であった。4 つの kinesin だけが、染色体やキネトコアに局在した。Kinesin-2 と kinesin-9 はカウロネマ細胞での発現は認められなかった。以下に、それぞれの kinesin サブファミリーごとの現在までの知見と、ヒメツリガネゴケでの観察結果を記す。Kinesin-5 と kinesin-ARK に関しては、詳細な研究を進めたため、このパートでの記載は省き、第 4 部 (kinesin-5)、第 5 部 (kinesin-ARK) で記述している。

#### ***Kinesin-4***

ハエの Klp3A と哺乳類の KIF4 を含む動物の kinesin-4/chromokinesin は分裂期において、後期までは染色体に局在し、染色体の整列に必須の役割を果たす (Mazumdar et al. 2004; Stumpff et al. 2012; Vernos et al. 1995; Wang and Adler 1995; Williams et al. 1995)。染色体分離が開始すると、それらの kinesin はスピンドルのミッドゾーンに局在場所を変え、微小管のプラス端のダイナミクスを制御する (Hu et al. 2011; Mazumdar et al. 2004)。

ヒメツリガネゴケには 8 個の kinesin-4 が存在し、カウロネマ細胞においてそのうちのひとつ (kinesin 4-Ic) が動物の KIF4 と同様の局在を示した。つまり、分裂前中期から中期にかけて凝縮した染色体上に局在し、後期、細胞質分裂ではミッドゾーンに移動した (図 10、動画 5)。この結果は kinesin 4-Ic が動物の chromokinesin のオルソログであることを強く示唆している。Kinesin 4-Ia は細胞質分裂期においてフラグモプラストで観察されるが、前期から後期にかけては局在が見られない (図 10、動画 5)。他の 4 つの kinesin-4 で Citrine シグナルは観察されたが、分裂装置に局在しなかった。これらの non-mitotic な kinesin がヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞で何かしらの機能を果たしていることが示唆される。

#### ***Kinesin-7***

このサブファミリーで一番良く研究されているのは、長いアミノ酸配列をもち、二量体を形成することが知られている哺乳類の CENP-E である。CENP-E は分裂前期から後期

まではキネトコアに局在し、後期以降はミッドゾーンに局在を変える (Yen et al. 1991)。また、分裂前中期での染色体の整列に重要な kinesin である (Schaar et al. 1997; Wood et al. 1997)。植物の NACK も kinesin-7 に分類される。それらはフラグモプラストの赤道面に集積し、MAP kinase カスケードを活性化することにより、細胞質分裂を制御する (Nishihama et al. 2002; Strompen et al. 2002; Tanaka et al. 2004)。

ヒメツリガネゴケには7個の kinesin-7 が存在し、4つのグループに分けられる (Shen et al. 2012)。私はそのうちの3つのグループ (5 遺伝子) が異なった分裂期局在を示すことを見出した (図 10、動画 7)。Kinesin 7-III はキネトコア様の点状のシグナルを示し、これはキネトコアタンパク質の Mis12 と共局在することを確認した (図 11、Goshima et al. 2003)。点状のシグナルは分裂前期から後期にかけて見られた。この局在パターンは哺乳類の CENP-E を想起させる。しかしながら、CENP-E とは異なり、後期以降にミッドゾーンに局在を変える様子は見られなかった。かわりに、3つの NACK 様の kinesin である kinesin 7-IIa、IIb、IIc が分裂中期から細胞質分裂が完了するまでミッドゾーンに局在した (図 10、動画 7)。一方、kinesin 7-IV は特徴的な局在パターンを示した。中期ではスピンドル微小管上全体にあるが、後期では polar region に強く集まっている様子が見られ、かすかにミッドゾーンにも局在した。細胞質分裂期においてもフラグモプラストの polar region により強く局在した (図 10、動画 7)。

### ***Kinesin-8***

Kinesin-8 は動物から酵母まで広く保存されている (出芽酵母の Kip3、分裂酵母の Klp5/6、ショウジョウバエの Klp67A、哺乳類の KIF18、KIF19 がある (Su et al. 2012))。Kip3 と KIF18A は微小管上をプラス端の方向に歩き、微小管を脱重合もしくは安定化させている (Du et al. 2010; Gupta et al. 2006; Mayr et al. 2007; Varga et al. 2006)。Kip3、Klp5/6、Klp67A、KIF18A は分裂期においてキネトコアに局在し、染色体の整列に重要なタンパク質である (Garcia et al. 2002; Goshima and Vale 2005; Stumpff et al. 2008; Su et al. 2012; Wargacki et al. 2010)。一方で、哺乳類の kinesin-8 である KIF19 は繊毛の微小管長を調節する役割をもつことが知られている (Niwa et al. 2012)。

ヒメツリガネゴケは3つの kinesin-8 をもつ。Kinesin 8-Ia と Ib は後期スピンドルとフラグモプラストのミッドゾーンで弱いシグナルを示したが、中期まではスピンドル上の局在は観察されなかった (図 10、動画 8)。Kinesin 8-II は中期から細胞質分裂期にかけてスピンドルとフラグモプラストのミッドゾーンに集積した (図 10、動画 8)。興味深いことに、ヒメツリガネゴケがもつ3つの kinesin-8 はどれもキネトコア局在を示さなかった。

### ***Kinesin-12***

ヒトの kinesin-12 である KIF15/Hklp2 は kinesin-5 と協調的に働き、スピンドルの両極性を確立し、維持する (Tanenbaum et al. 2009; Vanneste et al. 2009)。KIF15/Hklp2 は微小管結合タンパク質 TPX2 依存的にスピンドル微小管に局在する。シロイヌナズナの kinesin-12 は POK (phragmoplast-orienting kinesin) タイプと PAKRP (phragmoplast-associated

kinesin-related protein) タイプの 2 つに分けられる。POK1/2 の二重変異体ではフラグモプラストでの微小管の並びに異常が生じ、結果として、細胞壁の配置に異常をきたす (Muller et al. 2006)。PAKRP1 と PAKRP1L はフラグモプラストの赤道面に局在し、細胞質分裂期においてフラグモプラスト微小管の組織化に重要な役割を果たす (Lee et al. 2007)。

ヒメツリガネゴケにおいて kinesin-12 は最も大きなファミリーを形成し、シロイヌナズナと同様にアミノ酸配列によって 2 つのグループに分けられる。数が多い方のグループはシロイヌナズナの POK に近い。発現レベルの違いはあるが、分裂期局在が見られた kinesin-12 の多くはフラグモプラストの赤道面に局在した (図 10、動画 9、10)。中には kinesin 12-Ie、Ih、Ii のように分裂前中期からミッドゾーンに局在した kinesin もあった。一方、現在まで知られていない特徴的な局在を示す kinesin も少数だが存在した。ヒメツリガネゴケの 3 つの kinesin 12-I (12-Ia、12-Id、12-Ie) はフラグモプラストが拡大する先の細胞の表層に点状の局在を示した (図 9 黄矢尻、図 10、動画 9)。Kinesin 12-Ib は分裂中期から後期において、スピンドルの polar region に局在したが、細胞質分裂期ではミッドゾーンに局在しなかった (図 10、動画 9)。6 つの kinesin-12 は分裂期局在を示さなかったが、細胞質中や細胞膜に沿って分布していた。

### ***Kinesin-13***

Kinesin-13 は微小管脱重合活性をもち、細胞周期を通じて微小管のダイナミクスを制御する (ショウジョウバエの Klp10A、ヒトの MCAK/KIF2C、KIF2A などがある)。分裂期では中心体、スピンドル極、キネトコアに局在する (Ganem and Compton 2004; Goshima and Vale 2005; Manning et al. 2007; Rogers et al. 2004; Wordeman and Mitchison 1995)。スピンドル極では微小管のマイナス端を脱重合し、スピンドル微小管の flux に寄与し、キネトコアでは微小管の結合を制御している (Ganem et al. 2005; Rogers et al. 2004)。

ヒメツリガネゴケのすべての kinesin-13 はカウロネマ細胞で発現していた。Kinesin 13-b と 13-c はスピンドル、フラグモプラスト微小管に局在し、ミッドゾーンではより強くシグナルが観察された。Kinesin 13-a のシグナルは弱いと同様の局在パターンであった (図 10、動画 11)。しかしながら、どの kinesin-13 もキネトコアやスピンドル極に強く局在しなかった。

### ***Kinesin-14***

他の kinesin とは異なり、kinesin-14 はカルボキシ末端側にモータードメインをもち、微小管のマイナス方向へと動く (McDonald et al. 1990; Walker et al. 1990)。動物や酵母は kinesin-14 をひとつ、もしくは少数しかもたない。もっともよく研究されている kinesin はショウジョウバエの Ncd である。この non-processive な (一歩しか歩く活性をもたない) kinesin はスピンドル微小管上に均一に局在し、伸長中の微小管先端にも局在する。また、Ncd はスピンドルの極収束に重要な役割も果たす (Endow et al. 1994; Goshima et al. 2005)。同様の働きは脊椎動物の kinesin-14 においても示唆されている (Manning and Compton 2007; Walczak et al. 1998)。シロイヌナズナは 20 以上の kinesin-14 をもち、そのうちの 3

つ (KatA/ATK1、ATK5、KCBP) は分裂期 kinesin であることが同定されている。KatA/ATK1 と ATK5 はスピンドルとフラグモプラストに局在し、変異体ではスピンドル極が収束しない表現型が観察されている (Ambrose and Cyr 2007; Ambrose et al. 2005; Chen et al. 2002; Liu et al. 1996)。KCBP はスピンドルとフラグモプラストに局在し、機能を阻害すると分裂遅延が見られている (Bowser and Reddy 1997; Vos et al. 2000)。

ヒメツリガネゴケには 15 の kinesin-14 が存在し、アミノ酸配列から 6 つのグループに分けられる。Kinesin 14-I は KatA/ATK1 と ATK5 に近く、また、KCBP は kinesin 14-VI に近い。3 つのグループに属する 6 つの kinesin-14 で分裂期局在が観察された (図 10、動画 12)。核内に集積していた kinesin 14-Ia と Ib は核膜崩壊後、スピンドル微小管、とりわけ、ミッドゾーンにより強く集まり、後期まで続いた。細胞質分裂の間は、フラグモプラストの赤道面には局在せず、中央付近 (intra-phragmoplast) により強く局在する。Kinesin 14-IIIa と IIIb の局在パターンは kinesin 14-Ia、Ib に似ていた。対照的に、kinesin 14-IIa と IIc はスピンドル、フラグモプラスト微小管上に均一に局在した。

### **Orphan kinesins ('kinesin-Orph')**

ヒメツリガネゴケには、15 のサブファミリーのどれにも属さない kinesin が 9 個存在する。この orphan kinesin のうち、3 つが分裂期局在を示した。そのうちの 2 つ、KINID1a と KINID1b は内在性 Citrine 株、ノックアウト株を用いた研究から機能が同定されている (Hiwatashi et al. 2008)。私もこれらがスピンドルとフラグモプラストの赤道面に局在すること確かめた (図 10、動画 14)。Kinesin Orph-IVc もかなり弱くだがフラグモプラストの赤道面に局在した。

## アミノ酸配列の相同性と局在の相似性の関係

網羅的な kinesin の局在解析により、分裂期局在の相似性とタンパク質の相同性の相関を調べることが可能となった。ファミリー内のそれぞれの kinesin ペアについて相関を解析した。全長、モータードメイン、非モータードメインを比較対照に用いた (図 12A、B)。この結果から局在の相似性とタンパク質の相同性が一般的によく相関があることが示された。例えば、4 つの kinesin-5 は分裂期を通して、全く同じ局在を示し、また、お互いの配列は他のファミリーのペアよりも高い相同性を示した。6 個の kinesin-7 における 15 ペアでは、局在パターンは 2 つのグループに分けられた。似たような局在パターンを示すペアと、まったく異なるペアであり、これはアミノ酸配列の相同性に一致した。例外は kinesin-12 であり、アミノ酸配列の相同性と局在の相似性の相関は小さかった (図 12B)。

## 結果 第3部; RNAi スクリーニング

### Kinesin RNAi スクリーニング

(仁科桃子氏と共同で行った)

RNAi スクリーニングをはじめると、全 78 種類それぞれの *kinesin* 遺伝子につき 2 つの RNAi コンストラクトの設計を試みた。cDNA から 700 bp ほどの断片を PCR で増幅し、誘導型 RNAi システムの pGG626 ベクターに組み込んだ。pGG626 からなる RNAi コンストラクトは GFP-tubulin/histoneH2B-mRFP 発現株に形質転換し、RNAi の指標である histone-mRFP の蛍光強度に基づいて、それぞれのコンストラクトから作られた株、5 株ほどを RNAi 候補株として選抜した (mRFP の蛍光強度は標的遺伝子のノックダウンとともに減少することが想定される (Nakaoka et al. 2012))。合計で、61 遺伝子を標的とする 450 以上の RNAi 株を選抜した (残りの 17 遺伝子については株を取得することができなかった。取得できなかったものの多くは PCR による遺伝子増幅ができなかったことによる)。二重鎖 RNA (dsRNA) は  $\beta$ -エストラジオールの添加によりプロモーターをオンにすることで発現される。 $\beta$ -エストラジオールの添加後、5-6 日後に、3 分ごとのタイムラプス観察 (6 時間以上) を行い、その後、動画を解析することで表現型を評価した (図 13)。動画 15 にスクリーニングの一例を示す。3000 を越える動画の解析から、いくつかの遺伝子 (例えば、*kinesin7-II* (Naito and Goshima 2015)) で分裂期などでの異常が確認された。以下に示すように、*kinesin-5* では分裂期の異常、*kinesin-ARK* では核の配置の異常が観察された。その他の *kinesin* の表現型は本論文では示していない。



## 結果 第4部; Kinesin-5 の研究

### Kinesin-5 はスピンドルとフラグモプラストのミッドゾーンに局在しない

局在スクリーニング、RNAi スクリーニングの結果をふまえ、いくつかの kinesin でさらなる解析を試みた。ここでは、特徴的な局在を示した kinesin-5 について、より詳細な解析を行うことにした。Kinesin-5 はホモ 4 量体の構造をとり、動物、菌類、シロイヌナズナでは、スピンドルの両極性に重要な役割をもつことが示されている (Bannigan et al. 2007; Hagan and Yanagida 1990; Sawin et al. 1992)。しかしながら、このタンパク質の局在はそれぞれの生物によって少し異なる。カエルの kinesin-5 である Eg5 は dynein 依存的な輸送によりスピンドル極に多く集積する (Uteng et al. 2008)。一方で、ハエの kinesin-5 である Klp61F は S2 細胞や胚において、スピンドル微小管に一樣に局在する (Cheerambathur et al. 2008; Goshima and Vale 2005)。シロイヌナズナのもつ 4 つの kinesin-5 のうちのひとつ、AtKRP125c (At kinesin 5-c) やタバコの TKRP125 は細胞周期を通じて微小管に強く局在する (Asada et al. 1997; Bannigan et al. 2007)。このように局在パターンが様々であるにもかかわらず、kinesin-5 の機能として一番よく考えられているものは、スピンドルのミッドゾーンで反平行の微小管を互いに滑らせるという機能である (Kapitein et al. 2005; Kashina et al. 1996; Sharp et al. 1999)。このモデルだと kinesin-5 の欠如による表現型である単極性のスピンドル形成を一番良く説明できる。

ヒメツリガネゴケは 4 つの kinesin-5 をもち、それらはお互いに高い相同性をもつ (図 14、15)。原糸体細胞抽出液 (カウロネマ細胞とクロロネマ細胞を含む) を用いたウエスタンブロッティングの結果によると、kinesin 5-d が最も多く発現しており、5-a の発現量は最も少ない (図 16A)。30 秒ごとのライブ観察によると、シグナルの強さは様々だが、5-a から 5-d の局在パターンは同じであった (動画 6、図 10、図 16B)。間期、及び分裂期前期においては、シグナルは核の周りを囲む微小管も含めた細胞質微小管に局在した。核膜崩壊後はスピンドル微小管、フラグモプラスト微小管に局在した。驚くべきことに、シグナル強度は分裂期を通じてスピンドル、フラグモプラストのミッドゾーンで一番弱いことがわかった (図 16C)。この部分は反平行微小管が重なる部分に一致する (Hiwatashi et al. 2008; Kosetsu et al. 2013)。次に、より短い間隔 (3 秒ごと) で分裂終期の細胞を撮影した。Kinesin 5-c のシグナルはミッドゾーンから除かれていることが確認できた。さらに、このシグナルが極に向かって動く様子も観察された (図 16D)。Kinesin-5 が反平行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は局在せず、むしろ、平行微小管の多い領域に多く局在すると結論づけた。

## Kinesin-5 は細胞分裂後期以降のスピンデル、フラグモプラストの組織化と染色体の分配に必須である

ヒメツリガネゴケの分裂期での kinesin-5 の機能を調べるため、RNAi スクリーニングで用いたコンストラクトの他、4 つの kinesin-5 をターゲットする配列をつないだ 4 重の RNAi コンストラクトを用意した (図 17A)。4 つの kinesin-5 の遺伝子はお互いによく似ているため、いずれの RNAi コンストラクトも同時に全 kinesin-5 をノックダウンできると期待された (Kosetsu et al. 2013; Nakaoka et al. 2012; Vidali et al. 2007)。定量 RT-PCR (quantitative real-time RT-PCR) によって、実際にそれぞれのコンストラクトで多重 RNAi ノックダウンがかかっていることを確かめた (図 17B)。

$\beta$ -エストラジオールを加えた培地で、長時間のライブ観察を行ったところ、複数の RNAi 株で多核の細胞が見られたが、コントロールでは一度も見られなかった (図 18: RNAi 株では 3 回から 5 回の実験で計 47 から 140 個の細胞を、コントロールでは計 200 個以上の細胞を観察した)。染色体のライブ観察の結果、多核は分裂後期か細胞質分裂期 (もしくはその両方) でラギング染色体が生み出されたことに起因することが示された (図 19A、動画 16)。この結果は、spinning-disc 型共焦点顕微鏡を用いた観察でも確認された (ライブ撮影は内藤晴子氏と共同で行った)。すなわち、分裂後期から細胞質分裂期にかけてスピンデル、フラグモプラストの形状の異常や染色体分配の異常が現れた (図 19B、動画 17)。さらに、中期スピンデル長は通常よりも長く、時々だが整列していない染色体も存在した。最も多く観察された表現型は、分裂後期でスピンデル微小管が弛み、それに伴ってラギング染色体が出現するものであった (図 19B)。また、他のケースでは、フラグモプラスト微小管が適切に整列せず、細胞質分裂が不完全に終わる表現型が見られた (図 19B)。しかし、いずれの時期においても単極性スピンドルの形成は見られなかった。

# 結果 第 5 部; Kinesin-ARK の研究

## Kinesin-ARK は核の配置に関わる

Kinesin-ARK は植物特異的な kinesin であり、ヒメツリガネゴケには 4 つの遺伝子が存在する (kinesin ARK-a-d) (図 20、21A)。Kinesin-ARK のメンバーは、アミノ末端側にモータードメインを持ち、テール部分には armadillo リpeatモチーフを持つ (図 21B)。シロイヌナズナにおいて、kinesin-ARK (ARK1、ARK2、ARK3 と呼ばれる) の欠損株では、根毛細胞で微小管量が増え、細胞の形態が異常になることが報告されている (Jones et al. 2006; Sakai et al. 2008; Yang et al. 2007)。局在スクリーニングから、kinesin ARK-a と -b はカウロネマ細胞で同じくらい強く発現し、-c、-d は全く発現していないか、わずかにしか発現していないことがわかった (図 10)。また、分裂期において、kinesin ARK-a と -b はスピンドルとフラグモプラストの微小管に局在していることが示された (図 10、動画 13)。Kinesin ARK-a と -b はお互いに DNA レベルにおいて高い相同性をもっている (図 22A)。このことは、冗長的な機能を持っていること、1 つをターゲットする RNAi コンストラクトで同時にノックダウンがかかる可能性があることを示唆している。Kinesin ARK-a と -b において 2 つのオーバーラップしない部分を含む 3 つのコンストラクト (図 22A) からなる独立した 6 つの RNAi 株を取得した。定量 RT-PCR によって、実際にそれぞれのコンストラクトで kinesin ARK-a と -b が同時にノックダウンされていることを確かめた (図 22B)。

取得した kinesin-ARK の 6 つの RNAi 株において、タイムラプス観察から細胞の先端成長や細胞分裂に要する時間などには影響を与えないこと (図 23A、B)、また、茎葉体 (茎と葉が区別できる植物体) の形態にも影響を与えないことがわかった (図 23C)。一方で、カウロネマ細胞において特徴的な表現型が観察された (図 24、動画 18)。Kinesin-ARK RNAi 細胞では、コントロールと同じように細胞分裂は進行した。しかし、先端細胞側の娘核が分裂直後に分裂面にまで戻り、分裂面近くでとどまる様子が高い割合で観察された (図 24)。核が分裂面にまで戻る速度は  $0.34 \pm 0.15 \mu\text{m}/\text{分}$  (平均  $\pm$  標準偏差、図 24B の 54 min から 81 min の間) であり、コントロールでは同じ時期に  $0.31 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{分}$  (平均  $\pm$  標準偏差) の速度で細胞の中央に向かった。

この分裂面にまで戻る動きが微小管、もしくは actin によるものなのかを調べるため、薬剤処理、RNAi 処理、タイムラプス観察を組み合わせる実験を行った。染色体分離後、20-21 分後に actin 阻害剤ラトランキュリン B を加えたところ、kinesin-ARK RNAi 細胞では頂端細胞の核は分裂面にまで戻り、コントロールでは通常通りの動きを見せた (図 25A、B、E、動画 19)。これらは薬剤を加えていない実験と同様の動きである (図 24)。一方で、微小管阻害剤を加えたところ、コントロール細胞と kinesin-ARK RNAi の両方とも核はその場所にとどまる様子が観察された (図 25C、D、E、動画 19)。この結果から核が分裂面に戻る動きは微小管依存的なメカニズムによるものであり、actin は関係しないことが

示された。

Kinesin-ARK RNAi では、核は分裂面の近くで数時間とどまったが、次の分裂前  $92 \pm 34$  分 (平均  $\pm$  標準偏差、 $n = 5$ ) で再び細胞の中央に向かって動きだした ( $0.58 \pm 0.45 \mu\text{m}/\text{分}$  の速度 (動画 15; 白の矢印で示された細胞の 5:45 あたり)。しかしながら、この動きでは核の位置は完全には元の状態には戻らず、kinesin-ARK RNAi 細胞の分裂期スピンドルはコントロールに比べて分裂面側にずれて位置することを見出した (図 26)。これらの結果から、植物特異的な kinesin-ARK と細胞骨格である微小管が、染色体分離後における核の中央への配置に必要であると結論づけた。

## Kinesin-ARK は移動する核の周りにある微小管束に集積している

共焦点顕微鏡による高解像度の観察を行ったところ、コントロールの細胞では中央へ向かって動く核の周りに束化された微小管が見られた (観察した 5 細胞のうち 4 細胞で見られた)。しかしながら、RNAi の細胞ではそのような束化した微小管は観察されなかった (観察した 4 細胞でどの細胞においても見られなかった) (図 27A、動画 20)。このことから、kinesin-ARK タンパク質が微小管と核をつなぐリンカーとして働いていることが示唆された。

次に、核が動く時期における kinesin ARK-a の局在を決定した。mCherry-tubulin と Citrine を融合した kinesin ARK-a を同時に観察することで、染色体分配後に核の周りにある微小管と kinesin ARK-a-Citrine が共局在することを確認した (図 27B、動画 21)。

最近、GFP を融合したシロイヌナズナの ARK1 が伸長中の微小管の先端に局在すること、ARK1 変異体の細胞では微小管の伸長が遅くなり、根毛細胞においては伸長から短縮への転換頻度も減少することが報告された (Eng and Wasteney 2014)。また、シロイヌナズナの現在までの報告では、細胞質での微小管が異常に増加することにより根毛細胞の成長に影響を与えることが示されており (Sakai et al. 2008; Yoo et al. 2008)、ARK の変異体 (ARK1-3) でのその他の表現型もいくつか報告されている (Jones et al. 2006; Sakai et al. 2008; Yang et al. 2007; Yoo and Blancaflor 2013; Yoo et al. 2008)。しかしながら、これらの変異が核の移動に影響を及ぼすかどうかは評価されていない。シロイヌナズナでの結果がヒメツリガネゴケの kinesin-ARK にも当てはまるのかを調べるため、ヒメツリガネゴケの kinesin-ARK-Citrine の局在を斜光照明顕微鏡 (oblique illumination fluorescence microscopy) を用いて間期の細胞で観察した。斜光照明顕微鏡ではバックグラウンドのシグナルを低減させることで、細胞表層の 1 本 1 本の微小管を鮮明に観察することが可能である (Konopka and Bednarek 2008; Nakaoka et al. 2015; Tokunaga et al. 2008)。この方法により、kinesin ARK-b-Citrine が細胞表層付近の細胞質中で伸長中、短縮中のどちらの微小管にも局在し、伸長中の微小管先端の局在に限定されないことを確認した (図 28、動画 22)。また、Citrine シグナルが微小管に沿って動いている様子は観察されなかった。次に、

GFP-tubulin の共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス観察から細胞表層付近の微小管伸長速度を定量した。Kinesin-ARK RNAi 細胞では、シロイヌナズナの変異体で見られたような伸長速度の低下は確認できなかった (図 29A)。また、微小管を免疫染色し、細胞質中の微小管量を測定したが、微小管の量が増加するという結果は得られなかった (図 29B)。これらの結果から、ヒメツリガネゴケの kinesin-ARK はカウロネマ細胞において微小管のダイナミクスにはほとんど影響を与えないことが示唆された。これは、RNAi による不完全なノックダウンや細胞種の違いによるものであるかもしれない。あるいは、シロイヌナズナの ARK が進化の過程で新たな機能を獲得した可能性もある。

## Kinesin-ARK はプラス方向へのモーター活性を持つ

現在までのところ、kinesin-ARK ファミリーにおいてモーター活性は明らかにされていない。ヒメツリガネゴケの kinesin-ARK がモーター活性を持つのか、そして、もしモーター活性を持つのであれば、それは微小管のプラスかマイナスのどちらの向きへ動くのかを調べるため、以下の実験を行った。モータードメインと 2 量体化するためのドメインをもつ kinesin ARK-a の断片に GFP を融合したリコンビナントタンパク質を大腸菌から精製し、*in vitro* 微小管 gliding assay を行った (図 30A、B、kinesin ARK-a の 64-482 aa を使用した。この部分は kinesin ARK-a から-d まで高度に保存されている)。この実験では、抗 GFP 抗体を介することで GFP 融合 kinesin モーターをガラスに張り付け、蛍光ラベルした微小管をその上におき、その微小管の動きを全反射蛍光顕微鏡で観察することでモーター活性の有無を判断する。ATP 存在下では、微小管は動き、その gliding 速度は  $11.7 \pm 7.1 \mu\text{m}/\text{分}$  であったが (図 30C、平均  $\pm$  標準偏差、 $\sim 200 \text{ nm}/\text{秒}$ )、加水分解されない、ATP のアナログである AMP-PNP 存在下では、微小管が gliding する様子は観察されなかった。次にモーターの方向性を評価するため、極性を示す微小管を用いた微小管 gliding assay を行った。その結果、微小管がマイナス方向へと動く様子が観察された (図 30D、E、動画 23、マイナス方向への微小管の動きは、kinesin がプラス方向への動きを持つことを意味する)。これらの実験から、kinesin ARK-a は微小管のプラス方向への動きをもったモータータンパク質であると結論づけた。

# 考察

## 他の中心体をもたない細胞との比較とこれからの展開

細胞分裂の様子を高解像度で観察したことによって、スピンドルの形成において、カウロネマ細胞は他の中心体を持たない生物とは異なっていることが明らかになった。例えば、分裂前中期に両極性への転換のような、動的な微小管が再構築されるにもかかわらず、速く、確実にスピンドルは構築されるという際立った特徴をもつ。核膜崩壊前の微小管の非対称性は、他の中心体をもたない動物のシステムでは微小管がランダムに分布するのと対照的である (Mahoney et al. 2006; Schuh and Ellenberg 2007)。27本の染色体が適切に微小管と結合しなければならないが、核膜崩壊から分裂後期が始まるまでにたった10分しかかからない (図2)。他の中心体のない生物の例を挙げると、タバコ培養細胞 (BY-2細胞) では核膜崩壊から分裂中期までに約45分 (Kurihara et al. 2008)、マウスの卵母細胞では数時間 (Kitajima et al. 2011)、アフリカツメガエルの卵抽出液では30分以上 (Petry et al. 2011)、中心体をなくしたショウジョウバエのS2細胞では約30分と、カウロネマ細胞に比べるとかなり長い。そのため、カウロネマ細胞は他のメカニズム、例えば、まだ同定されていない  $\gamma$ -tubulin 複合体を制御する因子を使って、これらの過程を確実にしているのではないかと考えられる。ヒメツリガネゴケでは、基本的な分子生物学、細胞生物学のツールが使えるので (Bezanilla et al. 2003; Bezanilla et al. 2005; Cove et al. 2006; Prigge and Bezanilla 2010)、微小管生成に関する新たな因子の探索は興味深い実験である。そして、そのような因子が見つかることがあれば、細胞分裂や微小管の生成において、動植物の相違点を比較検討していくことが可能になっていくであろう。

## 分裂期における植物 kinesin の内在性局在解析

本研究では、植物の分裂期において網羅的に kinesin の局在を解析した。ゲノム上の内因性プロモーター下で誘導される遺伝子発現を多細胞の野生株で行ったことは非常に希少であり、価値のあるものと考えられる。

本研究において、分裂装置であるスピンドル、フラグモプラスト等に局在する kinesin を43個同定した。これはカウロネマ細胞で発現している60個の kinesin の72%にあたる (図10)。植物は分裂期において重要な働きをする中心体や、他の微小管モータータンパク質 dynein に頼ることなく染色体分配を正確に行うため、分裂期に働く kinesin を増やしてきたのかもしれない。また、多くのファミリーで高い相同性をもったものが分裂期を通じて同じ局在を示すことから、冗長的な kinesin の存在も考えられる。この仮説を証明するためにはそれぞれの kinesin のノックアウトによる解析が必要である。

シロイヌナズナやタバコなどの他の植物で調べられてきた kinesin はヒメツリガネゴケでも似たような局在を示した (例えば、kinesin 7-II (Nishihama et al. 2002; Strompen et al. 2002)、kinesin 12-II (Lee et al. 2001)、kinesin 14-I (Ambrose and Cyr 2007; Ambrose et al. 2005; Chen et al. 2002))。シロイヌナズナの kinesin (61 個) は構造が簡単なヒメツリガネゴケの kinesin (78 個) よりも少ないが (表 2)、これは、系統樹の比較から、kinesin 12-I をヒメツリガネゴケが多く持っていることに起因する (ヒメツリガネゴケでは 18 個、シロイヌナズナでは 3 個 (Shen et al. 2012; Zhu and Dixit 2011))。本研究において、ヒメツリガネゴケがもつ多くの kinesin 12-I はスピンドル、フラグモプラストの分裂面で働くことが示唆された。種子植物ではスピンドルの両極性を助けるであろう PPB や分裂前期の polar cap がヒメツリガネゴケにはないため (Bannigan et al. 2008; Lloyd and Chan 2006)、スピンドルの両極性を確実にするためには、反平行微小管をクロスリンクするモータータンパク質が必要となったのではないかと推測する。3 つの kinesin 12-I (12-Ia、12-Id、12-Ie) が示した特徴的な局在は (図 9、10)、PPB と細胞表層で分裂面を調節するシロイヌナズナの kinesin 12-I である POK1、POK2 を想起させる (Muller et al. 2006)。

Kinesin 12-I 以外では、ヒメツリガネゴケとシロイヌナズナで kinesin の個数にあまり違いがない。しかし、顕著に違う点があり、それはヒメツリガネゴケ kinesin には同じサブファミリー内でかなり高い相同性をもつホモログが存在する点である。例えば、ヒメツリガネゴケもシロイヌナズナも kinesin-5 を 4 つもつが、At kinesin 5-c と 5-d の相同性 (69%) をのぞくと、他の相同性は 39-45% とヒメツリガネゴケのものよりも相同性が低い (ヒメツリガネゴケでは 72-79%) (図 15B)。これは、シロイヌナズナの kinesin-5 の機能がより多様性をもっていることを示唆している (Bannigan et al. 2008)。実際、シロイヌナズナでは、ひとつの kinesin-5 (AtKRP125) の変異だけで劇的な分裂期スピンドルの形成異常が見られている (Bannigan et al. 2007)。

網羅的な解析により、他にも興味深い知見を得た。Kinesin 4-Ic を除き、残りの 42 個の kinesin のなかには、動物で研究されてきた局在とまったく同じ局在パターンを示すものは存在しなかった。例えば、動物細胞でキネトコアに局在する kinesin のホモログ (kinesin-8 と kinesin-13) はヒメツリガネゴケでキネトコア局在を示さなかった。また、ヒメツリガネゴケの kinesin-5 は、動物と酵母で働く場所として最も重要だと考えられているスピンドルのミッドゾーンには局在しなかった (Bannigan et al. の報告では微小管との共染色のデータはないが、シロイヌナズナの AtKRP125c はヒメツリガネゴケの kinesin-5 と似たような局在パターンかもしれない (Bannigan et al. 2007))。もちろん、ヒメツリガネゴケのキネトコアやスピンドルミッドゾーンが存在しないというわけではなく、kinesin-7-III や kinesin-13、kinesin-14 等の局在がそれらの部位の存在を明白に示している。これらの生物種間の違いは、アミノ酸配列の違いに起因するのかもしれない。他のケースでは、kinesin 12-Ia、12-Ib、7-IV が分裂後期のスピンドルで極付近に多く局在し、9 個の kinesin が分裂中期のスピンドルのミッドゾーンに多く局在しているが、このような局在パターンも動物では報告されていない。これまでは動物での知見が一般化されてきたが、植物と動物の細胞分裂における各 kinesin の機能と局在の保存性については再考する

必要があるだろう。植物の kinesin は新たな細胞内機能を獲得して進化してきた可能性もある。あるいは、動物で保存されている機能は、冗長性などの理由によって、見落とされてきたのかもしれない。多くの kinesin は植物で保存されているので、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。

## 細胞分裂における kinesin-5 の役割

本研究では誘導型 RNAi 系を用いて kinesin-5 の機能を調べた。この系を用いると 3 ヶ月という短期間で複数のパラログを同時にノックダウンすることで表現型の評価が行うことができ、生存に必須な遺伝子にも対応できる (遺伝子ノックアウト法では生存に必須な遺伝子は扱えない。また、複数のパラログを持つ場合、ノックアウト株を取得するまでに長い時間を要する)。Kinesin-5 の RNAi 株では、分裂後期以降での染色体分配の失敗、スピンドル、フラグモプラストの形成異常、細胞質分裂の失敗という表現型が観察された (図 19)。シロイヌナズナの根の細胞を含む (Bannigan et al. 2007)、他の多くの生物種においては、kinesin-5 のノックダウン・変異体では、分裂前中期もしくは分裂中期でスピンドルの崩壊が見られるため、ヒメツリガネゴケでの結果は予想外であった。哺乳類の細胞で kinesin-5 の阻害剤を使用した最近の報告によると、分裂後期特異的な阻害ではスピンドルの伸長に異常が見られるが、スピンドルの形態には影響を与えない (Collins et al. 2013)。そのため、ヒメツリガネゴケの kinesin-5 は新しい機能を獲得した可能性が考えられる。しかしながら、シロイヌナズナの kinesin-5 の変異株では分裂後期以前に表現型が見られるため、分裂後期以降の表現型が見逃されている可能性を考慮すると、種子植物でも同様の分裂後期での機能をもっている可能性は否定できない。一方で、私の系では不完全な RNAi ノックダウンにより、単極性のスピンドルが見られなかった、すなわち、ヒメツリガネゴケの kinesin-5 も分裂前中期におけるスピンドルの両極性に必要だが、今回の RNAi を用いた解析では顕在化しなかったのかもしれない。他の可能性として、このカウロネマ細胞において kinesin-5 はスピンドルの両極性に必須ではないということも考えられる。というのも、哺乳類で kinesin-5 と冗長的な働きをもつと考えられている kinesin-12 のファミリー (Tanenbaum et al. 2009; Vanneste et al. 2009) を含む、16 個の kinesin がカウロネマ細胞においてスピンドルのミッドゾーンに局在しているからである (図 10)。将来、kinesin-5 のノックアウト株を作ることでこの点が明らかになると期待される。

本研究では分裂後期以降の適切なスピンドルとフラグモプラストの形成に kinesin-5 が必要であることが示された。分裂後期以前の染色体整列異常や後期以降のラギング染色体は、kinesin-5 の減少によりキネトコアと微小管が適切に結びつかなかったために生じたものと考えられる。さらに、フラグモプラストが 2 つに裂かれた表現型も現れたこ



とから (図 19)、kinesin-5 は近接した平行な微小管を束ねることでフラグモプラストを形成している可能性が考えられた。考えられるモデルを図 31 に示した。平行な微小管を束ねることはフラグモプラストの拡大に重要なメカニズムであることが最近提案されている (Murata et al. 2013)。

## 核の配置における微小管と kinesin-ARK の役割

本研究では、細胞分裂だけではなく、一般的に植物では actin 依存的なメカニズムによると考えられている核の配置にも焦点を当てた (Chytilova et al. 2000; Iwabuchi et al. 2010; Tamura et al. 2013)。ヒメツリガネゴケの先端成長するカウロネマ細胞において、微小管と微小管モータータンパク質である kinesin-ARK ファミリーが染色体分離後の適切な核の配置に必要であることを示した (図 32)。この結論を強くサポートするデータとして、微小管重合阻害剤や kinesin-ARK の RNAi で分裂直後の核の配置に異常が見られたことが挙げられる。しかし、これらの結果は actin や myosin がこれらの細胞で核の配置に関わっているという可能性は排除していない。実際、細胞周期の他のステージで核の配置のメカニズムはよくわかっていない。たとえば、先端成長する間、核が先端成長する速度と同じ速度で動き、細胞の中央に配置されるメカニズムなどはわかっていない。この過程や他の過程において、actin-myosin 依存的な力の発生が必要となってくる可能性は残されている。

Kinesin-ARK はどのようにして核を配置させているのだろうか？ ひとつの可能性は kinesin-ARK が間接的に働いているということである。シロイヌナズナの ARK は *in vitro* において NIMA-related kinase と結合すること (Sakai et al. 2008)、遺伝学的に class I ADP ribosylation factor GTPase-activating protein (ARF-GAP) の AGD1 と相互作用することが知られている (Yoo and Blancaflor 2013; Yoo et al. 2008)。このことから未知のメカニズムを介して、これらのシグナリング因子が核の配置を制御している可能性がある。あるいは、kinesin-ARK が微小管ダイナミクスを制御し、それによって、細胞板に与える微小管の pushing/pulling の力を変えているとの可能性も考えられる。しかし、今回の実験からヒメツリガネゴケの kinesin-ARK RNAi で細胞分裂や、先端成長、微小管の量やダイナミクスの異常は観察されなかった (図 23, 29)。したがって、これらの可能性は排除できないが、おそらく最もありそうなモデルは次の通りである。動物細胞で kinesin や dynein が、また、シロイヌナズナで myosin XI が行っているように、kinesin-ARK が核を積み荷として輸送しているというモデルである。Kinesin-ARK が微小管のプラス端方向へのモーター活性をもつこと、先端細胞での微小管ネットワークに極性があることはこのモデルを支持する。先端のカウロネマ細胞では、微小管は細胞質中で長軸方向に並ぶ (Doonan et al. 1985)。微小管のプラス端をライブ観察した最近の報告によると、ヒメツリガネゴケの先端細胞の頂端側では、先端に向かって微小管が伸び、一方で先端細胞の基部側 (核より基部側)

では極性は混ざり合っていることが示されている (Hiwatashi et al. 2014)。そのため、核を先端側へ輸送する効率的な方法のひとつとして、一定の方向性をもった微小管上でプラス方向への動きをもつ kinesin を使う方法は考えられるモデルである (図 33)。実際、先端へと向かう核の周りには微小管が存在し、kinesin-ARK はこの微小管上に局在している。このモデルを立証するためには、核膜と kinesin-ARK をつなぐアダプタータンパク質を同定することが必要である。SUN-KASH タンパク質複合体はひとつの候補である (Zhou et al. 2014)。

*In vitro* において、精製した kinesin-ARK モーターは微小管 gliding 活性を有していることを示した (図 30)。一方で、細胞内では kinesin-ARK-Citrine シグナルは微小管には局在するが、プラス端方向への動きは観察されなかった (図 28、動画 22)。細胞表層付近で動きが見えなかった原因として、kinesin-ARK が non-processive なモーターであることが考えられる (kinesin が一歩しか歩くことができない)。あるいは、細胞表層で見られた kinesin-ARK は不活性型の構造をとっており、積み荷が結合しない限り、動く様子は見られないということも考えられる。実際、kinesin ファミリーの中には積み荷との結合で活性型になる kinesin がいくつか存在することが知られている (Verhey and Hammond 2009)。もし、核が kinesin-ARK の積み荷であるのならば、核は細胞表層よりずっと細胞の内側にあるため、細胞表層付近で kinesin-ARK-Citrine の動きが見られなかったのは理にかなっていると考える。なお、シロイヌナズナの ARK1 のカルボキシ末端に GFP を融合したものは機能的であることは示されているが、本研究では Citrine を融合することで kinesin-ARK の機能が失われた可能性は排除できていない。

本研究において、kinesin ARK-a と -b でそれぞれ独自の機能を決定することはできていない。1つの RNAi コンストラクトが同時に両方ともをノックダウンしているからである。これら 2 つのタンパク質がかなり高い相同性を持っていること (アミノ酸レベルで 89.8% (ClustalW2 による))、細胞内局在において違いが見られなかったことを考えると、それら 2 つは冗長的な機能を果たしている可能性が高いであろう。

本研究結果は、頂端細胞において核を動かす 4 つのメカニズムが存在することを示唆している。1 つめは、分裂周期に核が新たな細胞の中央に向かう動きである (図 24B の 3–21 min、図 32 の phase I)。この動きはオリザリンによって阻害されることから微小管依存的な移動であると考えられる。2 つめは、核が分裂面の方向に少し戻る動きである (図 24B の 24–51 min、図 32 の phase II)。これもまた微小管依存的であり、actin には非依存적である (図 25)。頂端細胞での微小管の配向を考慮すると (Hiwatashi et al. 2014)、微小管のマイナス方向への動きをもった kinesin によって核が輸送されているという可能性が考えられる。3 つめは、微小管と kinesin-ARK の働きにより (おそらくは核を積み荷として)、核が細胞中央へと向かう動きである (図 24B の 54–81 min、図 32 の phase III)。もし kinesin-ARK が核を積み荷として運ぶというモデルが正しければ、*in vitro* で見られた kinesin-ARK モーターの微小管 gliding 速度よりも核の移動速度が遅い理由として、kinesin-ARK と反対方向へと動くモーターや微小管結合タンパク質、また、細胞質中の粘弾性などによる影響が考えられる。最後は、kinesin-ARK RNAi 下で分裂面にとどまった

核が次の分裂期に向けて、細胞の中央に向かう動きである (動画 15、図 32 の phase IV)。この移動のため、分裂面は完全ではないが、ある程度は回復する (図 26)。まだ同定されていない微小管のプラス端方向への動きをもった kinesin や全体的な微小管の再構築などのメカニズムがこのタイプの核の動きに関係しているのかもしれない。

本研究では、植物細胞での核の配置についての新たなメカニズムを発見した。つまり、核が微小管、および kinesin 依存的なメカニズムによって移動しているということである。この発見により、微小管、および kinesin 依存的な核の動きは、菌類、動物、植物で広く保存されていることが示唆された。どのメカニズムを優先的に使うかは細胞種により異なるのであろう。実際、actin-myosin の系も動物細胞において、核の動きに重要であるとの報告がある (Gundersen and Worman 2013; Norden et al. 2009)。種子植物で同様の微小管および kinesin 依存的なメカニズムが存在するのかわかっていないが、興味深いことに、マメ科植物の根毛細胞では微小管は actin 依存的な核の動きを防ぐのに必要であることが示されている (Lloyd et al. 1987)。種子植物において、kinesin-ARK が核の配置に関わっていることを調べるのは興味深いことであろう。

# 材料と方法

## ヒメツリガネゴケの培養と形質転換

形質転換は標準的な PEG 法に従った (Nishiyama et al. 2000)。ヒメツリガネゴケの培養には BCDAT 培地を用いた。培養条件は 25 °C、4000 ルクスの明条件で行った。

## プラスミド

本研究で用いたプラスミド、PCR プライマーを表 4、5 に示す。局在スクリーニングで用いた mCherry と  $\alpha$ -tubulin は PCR によって遺伝子増幅し、イネ actin プロモーター、*rbcS* ターミネーター、薬剤耐性マーカー *aph4* カセット、ヒメツリガネゴケのゲノム配列 PIG1 を含んだベクターにクローニングした。カルボキシ末端に Citrine をつないだ kinesin のプラスミドは、*kinesin* 遺伝子のカルボキシ末端約 1 kb と 3'-UTR 約 1 kb を PCR で増幅し、*citrine* 遺伝子、nopaline synthase polyadenylation signal (nos-ter)、薬剤耐性マーカー *nptII* カセットを含んだベクターにクローニングした。*citrine* 遺伝子の開始コドンである ATG は TTG に変えてある。RNAi スクリーニングでは、cDNA から 700 bp ほどの断片を PCR で増やし、誘導型 RNAi システムの pGG626 ベクター (Nakaoka et al. 2012) に Gateway LR system を用いて組み込んだ。

## 顕微鏡観察、薬剤処理、免疫染色

観察用のプレートには 35 mm ガラスボトムディッシュ (MatTek) もしくは、6 穴ガラスボトムプレート (IWAKI) を使用した。このディッシュに BCD 培地を 3 ml 加え、固めた後、中央のガラス部分の寒天を切り取り、約 50  $\mu$ l の BCD 培地を薄く塗り広げた。BCD 培地を薄く塗った部分にヒメツリガネゴケ原系体を置き、25 °C、4000 ルクスの明条件で 4-5 日培養したものを観察に使用した。RNAi 株の観察には BCD 培地に  $\beta$ -estradiol を 1  $\mu$ M になるように加え、5-6 日培養したものを観察した。高解像度の観察には顕微鏡 TE2000 (Nikon)、100 倍レンズ (1.40-NA)、60 倍レンズ (1.40-NA)、40 倍レンズ (1.30-NA)、共焦点スキャナユニット CSU-X1 (Yokogawa)、EMCCD カメラ ImagEM (Hamamatsu) を使用した。画像は 10 秒、30 秒、もしくは 1 分ごとに撮影した。微小管のダイナミクスの観察には 1.5 倍の中間変倍と 100 倍レンズを用いて、3 秒ごとに撮影した。低倍での観察には顕微鏡 Ti (Nikon)、20 倍レンズ (0.75-NA)、10 倍レンズ (0.45-NA か 0.40-NA)、EMCCD カメラ Evolve (Roper)、iXon3 (Andor) を使用した。画像は 1 分、もしくは 3 分ごとに撮影した。細胞内での斜光照明顕微鏡、微小管 gliding assay の全反射蛍光顕微鏡による観察には、顕微鏡 Ti (Nikon)、100 倍レンズ (1.49-NA)、EMCCD カメラ Evolve (Roper) を使用した。細胞内での観察にはさらに 2.5 倍の変倍レンズを用いた。画像は細胞内では 3

秒ごと、微小管 gliding assay では 1 秒ごとに撮影した。これらの顕微鏡は Micro-Manager により制御した (Edelstein et al. 2010)。画像解析には ImageJ を使用した。

RNAi スクリーニングでは 6 穴ガラスボトムプレートを使用し、観察中に培地が乾燥するのを防ぐため、観察の 1 時間以上前に約 1 mL の水を加えた。薬剤処理の実験では、観察の直前に余分な培地を切り取り 1.5 mL の水を加えて観察を始め、分裂後期の始まりから 5-6 分後、もしくは 20-21 分後に 0.5 mL の薬剤を含んだ水を加えた。薬剤のストック濃度は、20 mM オリザリン (AccuStandard) in DMSO、25 mM ラトランキュリン B (AdipoGen) in DMSO、20 mM サイトカラシン B (Wako) in DMSO である。薬剤処理の最終濃度は 10  $\mu$ M オリザリン (0.05% DMSO)、25  $\mu$ M ラトランキュリン B (0.1% DMSO)、200  $\mu$ M サイトカラシン B (1.0% DMSO) であり、コントロールには 0.5%、もしくは 1.0% DMSO を使用した。微小管の免疫染色は基本的に Nakaoka et al. に従った (Nakaoka et al. 2012)。35 mm ガラスボトムディッシュで 6 日間培養したカウロネマの微小管を DM1A 抗体を用いて染色した。

### ウエスタンブロッティング

液体窒素で凍らせた原糸体 (カウロネマ細胞とクロロネマ細胞を含む) を乳鉢、乳棒を用いて凍結破砕し、SDS を含むバッファーを用いて細胞抽出液を作製。SDS-PAGE、トランスファー後、一次抗体として抗 GFP 抗体 (JL8, 1:1000) を、二次抗体として抗マウス HRP 抗体 (1:1000) を使用した。

### PCR によるジェノタイピング

ジェノタイピングに用いたゲノム DNA は以下のように用意した。まず、BCDAT 培地で 1-2 週間培養した原糸体細胞 (カウロネマ細胞とクロロネマ細胞を含む) を液体窒素により凍らせ、10 $\times$  PCR buffer (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris·HCl, 0.1% Tween-20, pH 8.8) を加え、ピペットマンのチップで破砕した。65 °C で 10 分温めた後、遠心によって上清を集めた。PCR による遺伝子の増幅は KOD FX neo (TOYOBO) を使用した。Kinesin-Citrine ラインの取得に関して、PCR によるジェノタイピングはひとつの kinesin 遺伝子に対し 15 株で行った。

### 定量的 RT-PCR

原糸体細胞 (カウロネマ細胞とクロロネマ細胞を含む) から全 RNA を RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて精製し、DNase 処理を行った。この RNA から PrimeScript II first-strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA) を用いて一重鎖 cDNA を合成した。定量的 RT-PCR (Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)) は Power SYBR Green PCR Master Mix と 7500 Real-Time PCR system (model 7500; Applied Biosystems) を用いて行った。TUAI

( $\alpha$ -tubulin) 遺伝子を内在スタンダードとして用いて解析を行った (Nakaoka et al. 2012)。定量的 RT-PCR に用いたプライマーは表 6 に示す。

### アミノ酸配列を用いた解析

MAFFT ver. 7.043 を用いて (Kato et al. 2002; Kato and Standley 2013)、それぞれのアミノ酸配列を並べ、その配列を MacClade ver. 4.08 を用いて、手作業でギャップを削除し並び直した。その後、JTT (Jones-Taylor-Thornton) モデルに従い (Jones et al. 1992)、MEGA5 を用いて、近隣結合法による系統樹 (neighbor-joining tree) を作成した (Tamura et al. 2011)。図 10 では 66 遺伝子の相対的進化距離を求めるため、189 アミノ酸残基を使用した (図 15A では 9 遺伝子で 989 アミノ酸残基を、図 21A では 9 遺伝子で 641 アミノ酸残基を使用した)。分岐のブートストラップ確率は 1000 回の繰り返し計算によって求めた。

### 遺伝子 ID

The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org>) と Phytozome (<http://www.phytozome.net>) のデータベースからヒメツリガネゴケ、シロイヌナズナ、イヌカタヒバの配列を取得した。ゼニゴケの kinesin-5 の配列は河内博士、西浜博士 (ともに京都大学) に頂いた。使用したシロイヌナズナの遺伝子 ID は At ARK-1 (AT3G54870)、At ARK-2 (AT1G01950)、At ARK-3 (AT1G12430)、At kinesin 5-a (AT2G37420, AtKRP125a)、At kinesin 5-b (AT2G36200, AtKRP125b)、At kinesin 5-c (AT2G28620, AtKRP125c)、At kinesin 5-d (AT3G45850) である。シロイヌナズナの kinesin-5 の遺伝子名は Zhu and Dixit に従った (Zhu and Dixit 2011)。ヒメツリガネゴケの遺伝子 ID は表 1、4、5 に示す。

### タンパク質精製

Kinesin ARK-a のモータードメインと 2 量化ドメイン、mGFP は大腸菌発現用コンストラクト (pET23a (Novagen)) にクローニングした。表 7 に示したプライマーを用いて PCR を行った。まず、HindIII/XhoI による切断でコンストラクト pTM475 (mGFP-6×His) を作成し、続いて NdeI/NotI による切断でコンストラクト pGG886 (Kinesin-ARK-a-motor-mGFP-6×His) を作成した。リコンビナントタンパク質は pGG886 を大腸菌 SoluBL21 株 (Genlantis) に形質転換し、0.2 mM IPTG、18°C の条件で誘導を行い発現させた。250 mL の培養から得られた大腸菌ペレットは溶解バッファー (50 mM NaPO<sub>4</sub>、pH 8.0、250 mM NaCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM imidazole、10 mM 2-mercaptoethanol、1 mM ATP、protease inhibitors) 液中でホモジェナイズし (ホモジェナイザーは Branson-Emerson Sonifier 250D-Advanced (BRANSON) を用いた)、遠心後、上清を Ni-NTA ビーズに結合させ、洗浄バッファー (50 mM NaPO<sub>4</sub>、pH 6.0、250 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、60 mM imidazole、10 mM 2-mercaptoethanol、0.1 mM ATP) で洗浄した。その後、

目的タンパク質を溶出バッファー (50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.2, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM imidazole, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM ATP) で溶出した。バッファーは PD MiniTrap G-25 (GE Healthcare) を用いて、10 mM 2-mercaptoethanol と 0.1 mM ATP を含んだ BRB80 (80 mM K-PIPES, pH 6.8, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA) に置換した。さらにリコンビナントタンパク質はタキソールで安定化した微小管と 1 mM AMP-PNP を用いてアフィニティー精製を行い、混合物は 80,000 g、15 分、25℃ の超遠心後、5 mM ATP を加えてリリースした。微小管 gliding assay にはこのように精製した直後のリコンビナントタンパク質を用いた。

### 微小管 gliding assay

従来よく使われている微小管 gliding assay (Woehlke et al. 1997) に少しの改良を加えて実験を行った。フローチャンバーは両面テープを用いてスライドガラスとシラン化したカバーガラスを重ねて作成した。カバーガラスは抗 GFP 抗体 (rabbit polyclonal, アフィニティー精製済) で表面をコートした。フローチャンバーを BRB80 で洗い流した後、精製した GFP 融合タンパク質 (kinesin ARK-a-motor-mGFP-6×His) を流し込んだ。そして、0.5 mg/ml k-casein を含んだ BRB80 で洗い流した後、motility バッファー (BRB80, GMP-CPP で安定化し、蛍光色素 Alexa 568 でラベルした微小管、2 mM ATP もしくは AMP-PNP、0.5 mg/ml k-casein、0.1% methylcellulose、20 μM taxol、oxygen scavenger system (50 mM glucose、400 μg/ml glucose-oxidase、200 μg/ml catalase、4 mM DTT (Li et al. 2012))) をフローチャンバーに流し込み、全反射蛍光顕微鏡によって観察を行った。極性を示す微小管 (polarity-marked microtubules) は、まず、蛍光色素を多く含む明るい微小管を重合し (bright MTs seed (80% ラベルしていない tubulin: 20% Alexa 568 でラベルした tubulin))、続いて蛍光色素を少なくした暗い微小管を重合した (dim MTs (67% ラベルしていない tubulin: 2% Alexa 568 でラベルした tubulin: 31% NEM (N-ethylmaleimide)-tubulin))。Gliding 速度は ImageJ を用いて作成したキモグラフにより解析した。

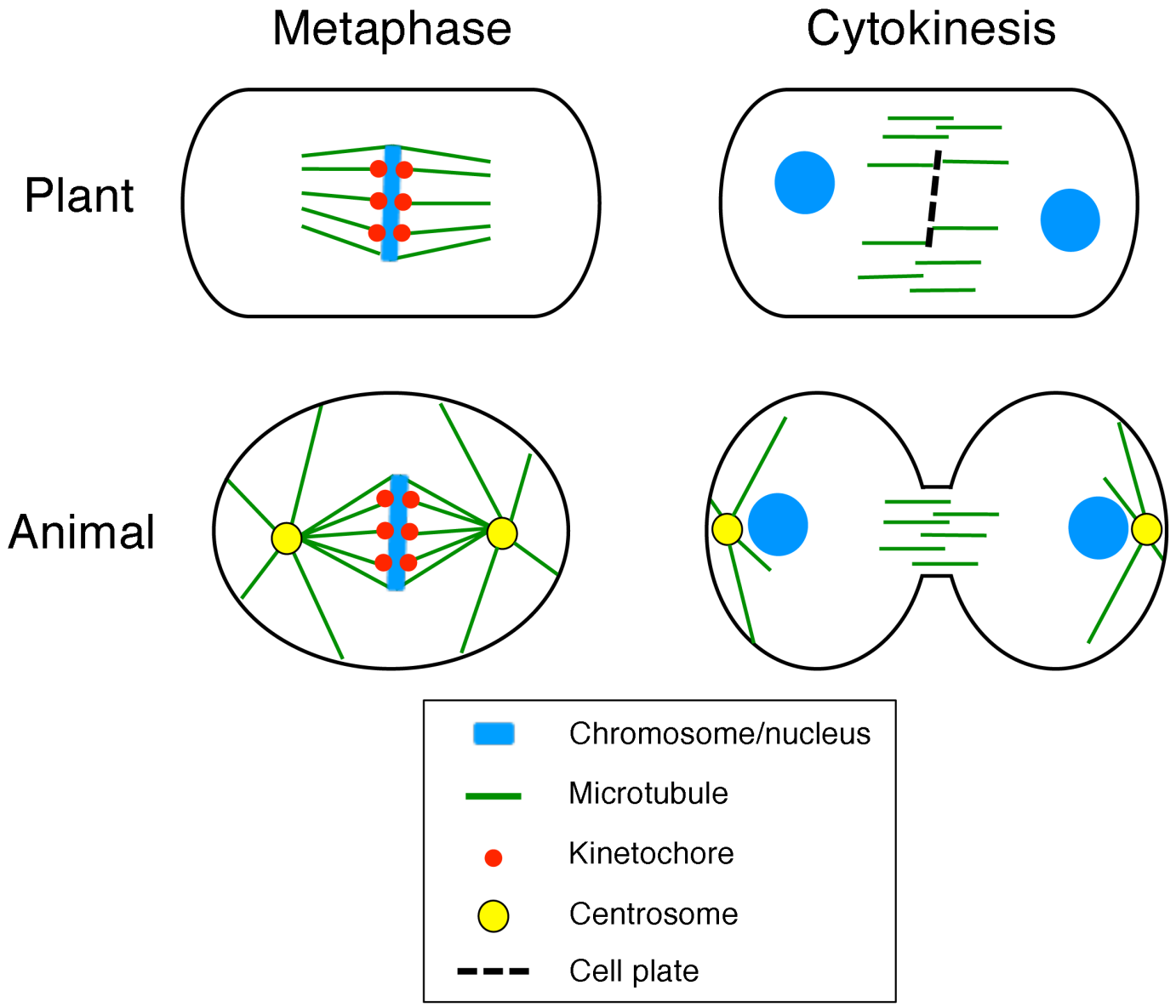
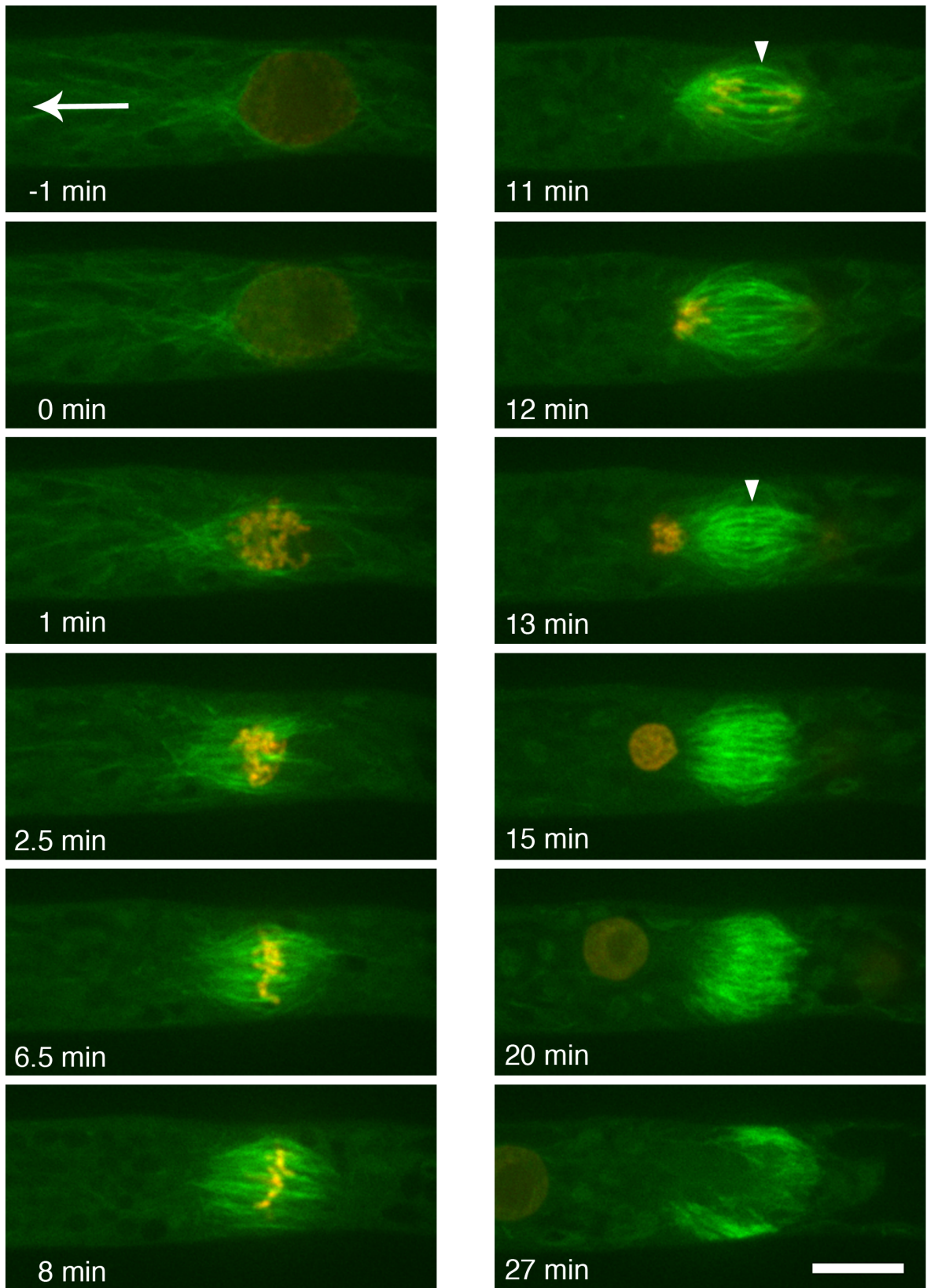


図1 植物と動物の体細胞分裂における相違点

植物の体細胞分裂（上）と動物の体細胞分裂（下）の簡略図。体細胞分裂では、動物には微小管を生み出す中心となる中心体があるが植物には存在しない。細胞質分裂において動物細胞では収縮環によって娘細胞がくびり切れるのに対し、植物ではフラグモプラストによって細胞板が形成され、区分けされる。





## GFP-tubulin / HistoneH2B-mRFP

図2 高解像度観察によるヒメツリガネゴケの細胞分裂

GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の高解像度タイムラプス観察像。写真は spinning-disc 型共焦点顕微鏡で 30 秒ごとに撮影した。矢印は細胞成長方向、矢尻はスピンドルのミッドゾーン (11 min)、フラグモプラストのミッドゾーン (13 min) を示す。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

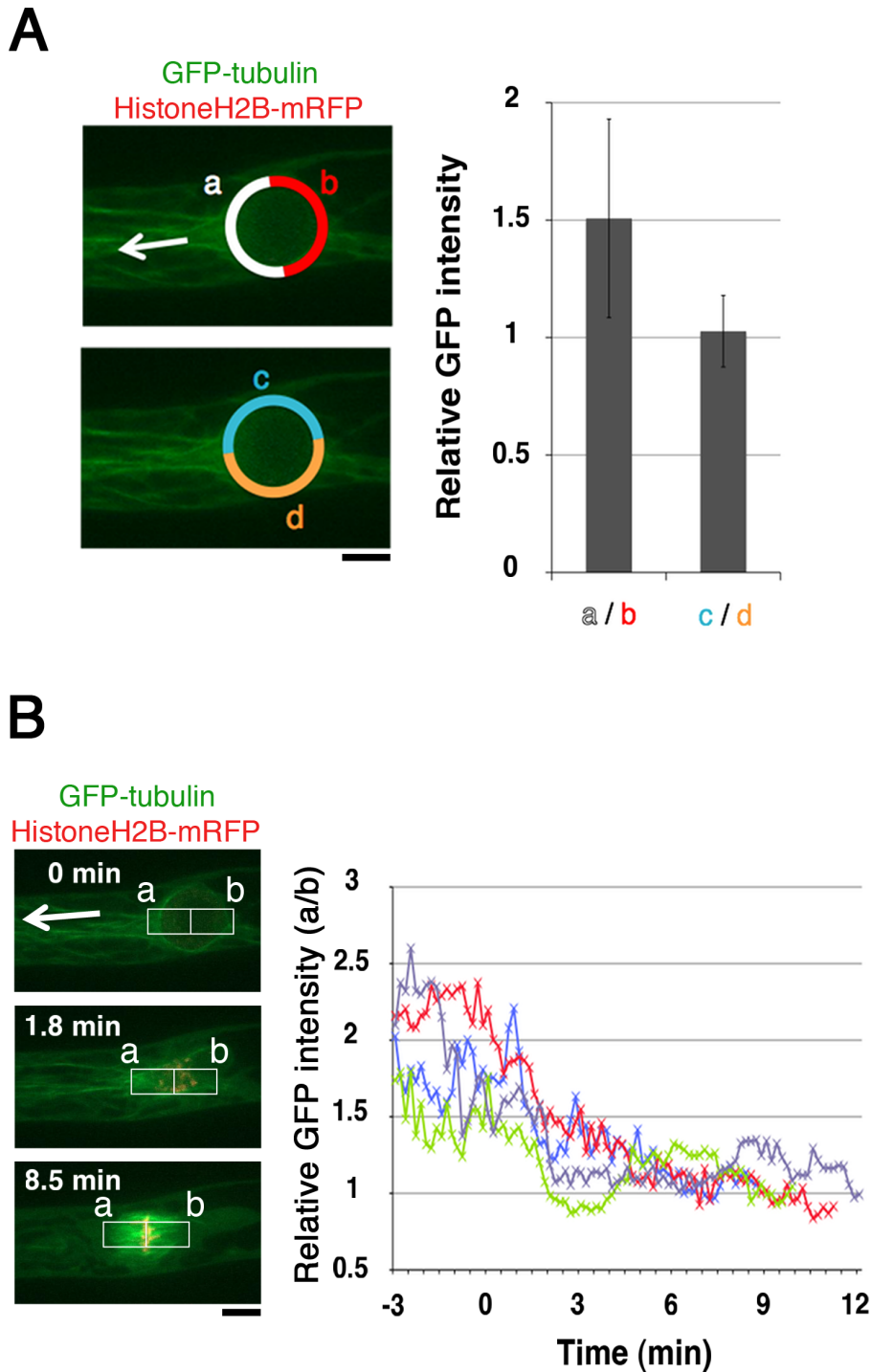


図 3 カウロネマ細胞の細胞分裂では単極性状態のスピンドルが分裂前中期に両極性に転換される

(A) 核膜崩壊直前における核を取り巻く微小管分布の定量。細胞先端側の領域 a とその反対側の領域 b の微小管強度を幅  $0.65 \mu\text{m}$  で測定し、相対値  $a/b$  を求めた ( $\pm$  標準偏差、 $n = 13$ )。コントロールである領域 c と領域 d の相対値  $c/d$  は 約 1 であった。矢印は細胞成長方向を示す。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$ 。

(B) 核膜崩壊から染色体分離が始まるまでの期間の微小管分布の定量化。細胞先端側 a とその反対側 b での相対値  $a/b$  を求めた。10 秒ごとに撮影した 4 細胞のデータをプロットした。矢印は細胞成長方向を示す。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$ 。

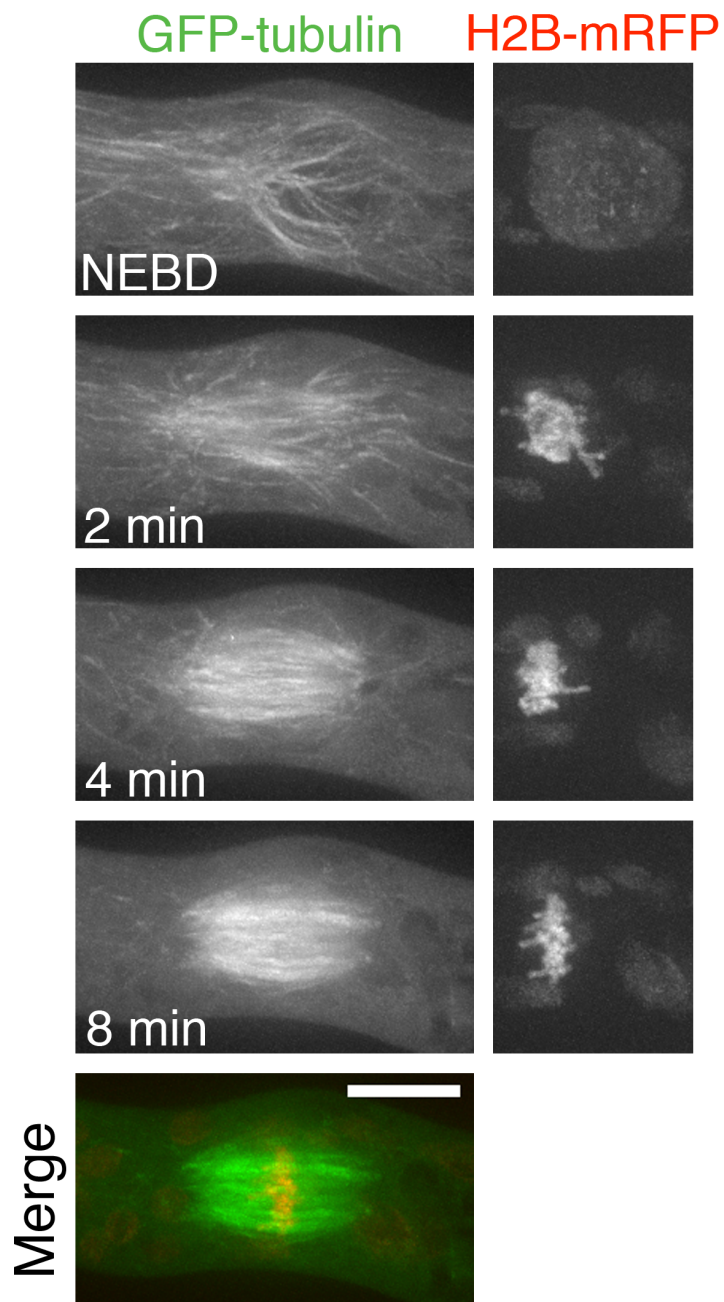


図4 高解像度観察によるヒメツリガネゴケの細胞分裂 (核膜崩壊から染色体整列まで)  
 GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の高解像度  
 タイムラプス観察像。写真は1分ごとに撮影し、13のZ軸スライス (1  $\mu$ m ごと) で撮影したものを  
 maximum projection により表示した。核膜崩壊を0 min とした。スケールバーは10  $\mu$ m。

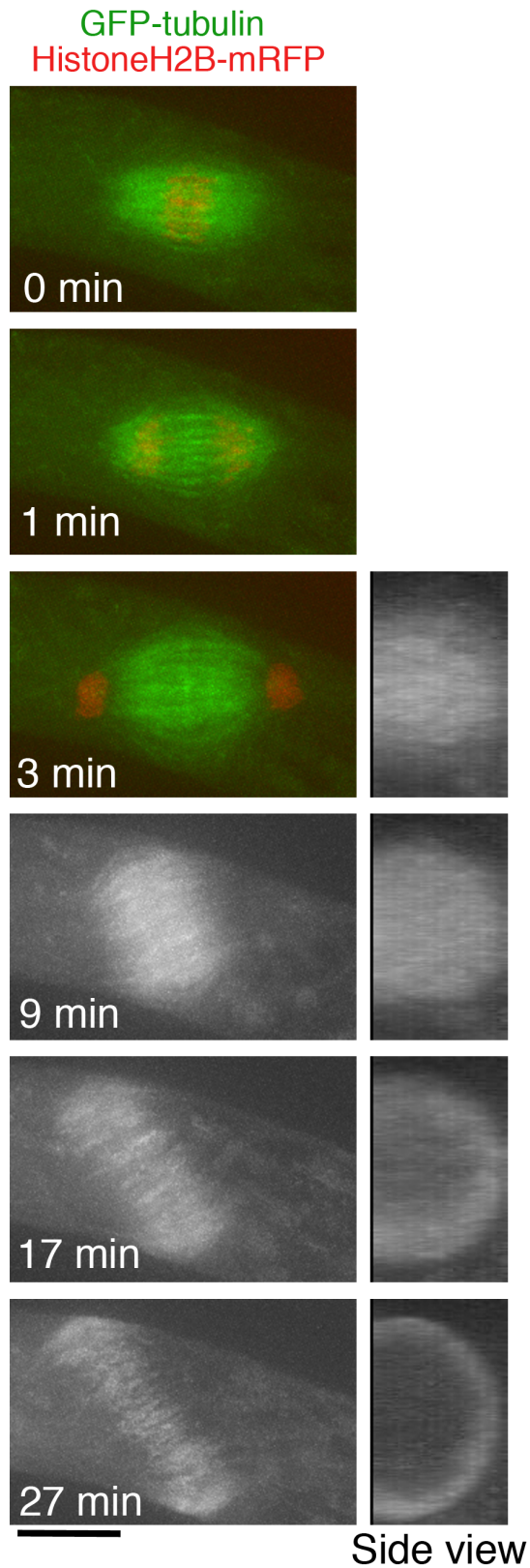
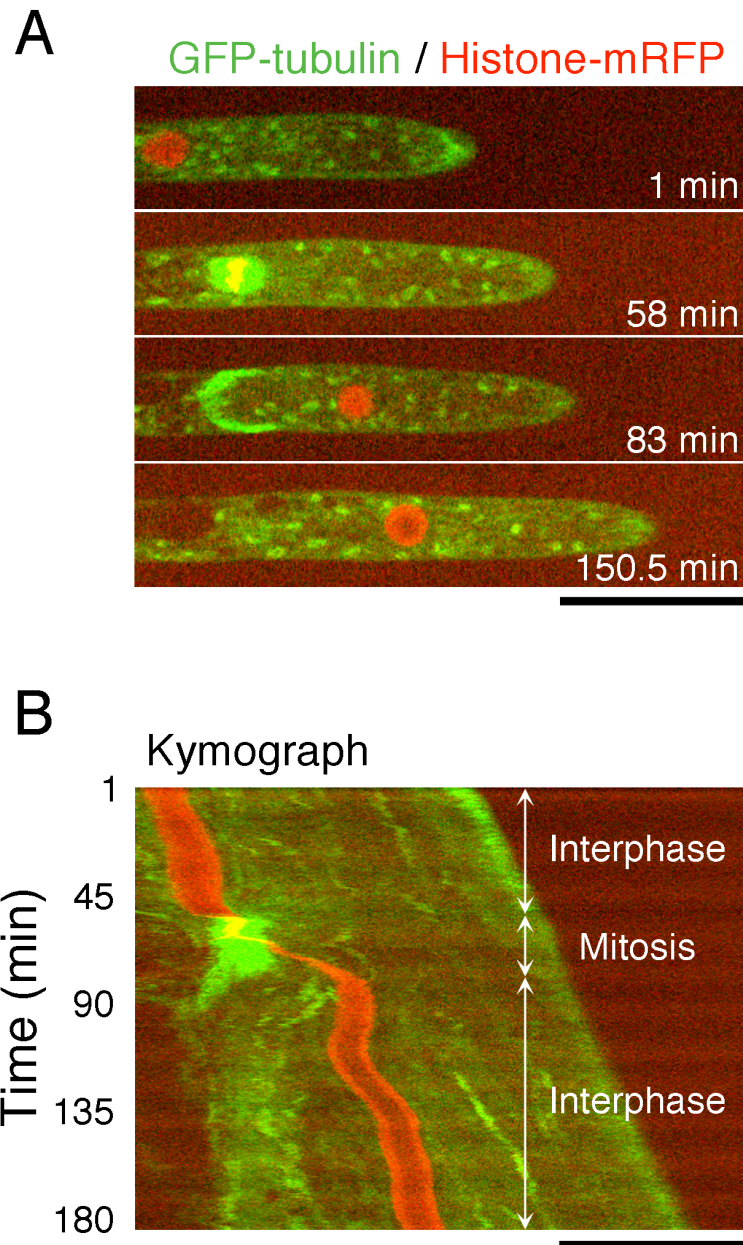


図5 高解像度観察によるヒメツリガネゴケの細胞分裂 (染色体分配から細胞質分裂まで) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤)を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の高解像度タイムラプス観察像。写真は1分ごとに撮影し、13のZ軸スライス ( $1\mu\text{m}$ ごと)で撮影したものを maximum projection により表示した。また、三次元構築した同時期の GFP- $\alpha$ -tubulin 像も並べて表示した (Side view)。染色体分配開始時を 0 min とした。スケールバーは  $10\mu\text{m}$ 。





**図6 カウロネマ細胞の核の位置**

(A) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と Histone-mRFP (赤) を発現している細胞のカウロネマ頂端細胞の細胞周期の像。分裂期のスピンドル (58 min) とフラグモプラスト (83 min) を示す。

(B) 先端成長と比較した核の位置をキモグラフにより示す。間期の多くの間、核は細胞の成長にあわせて先端側に動き、それによって、細胞の中央に保たれる。スケールバーは 50  $\mu$ m。

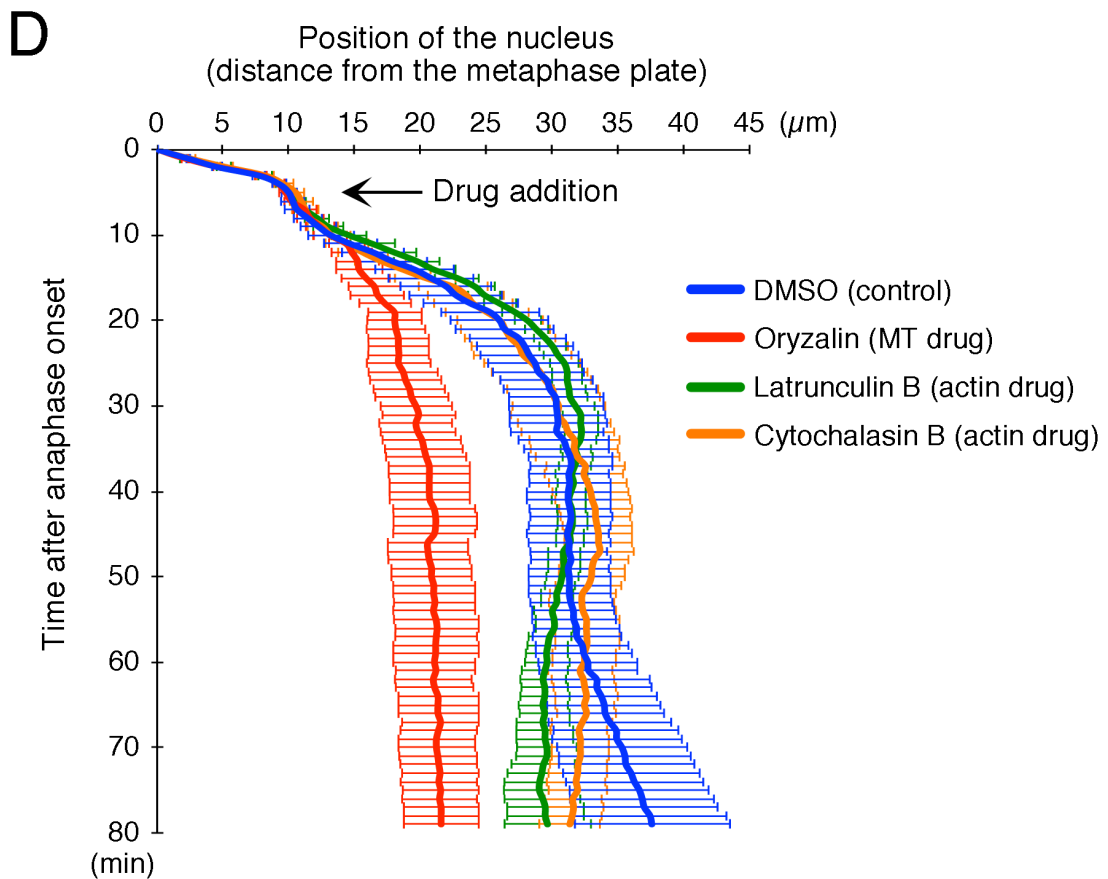
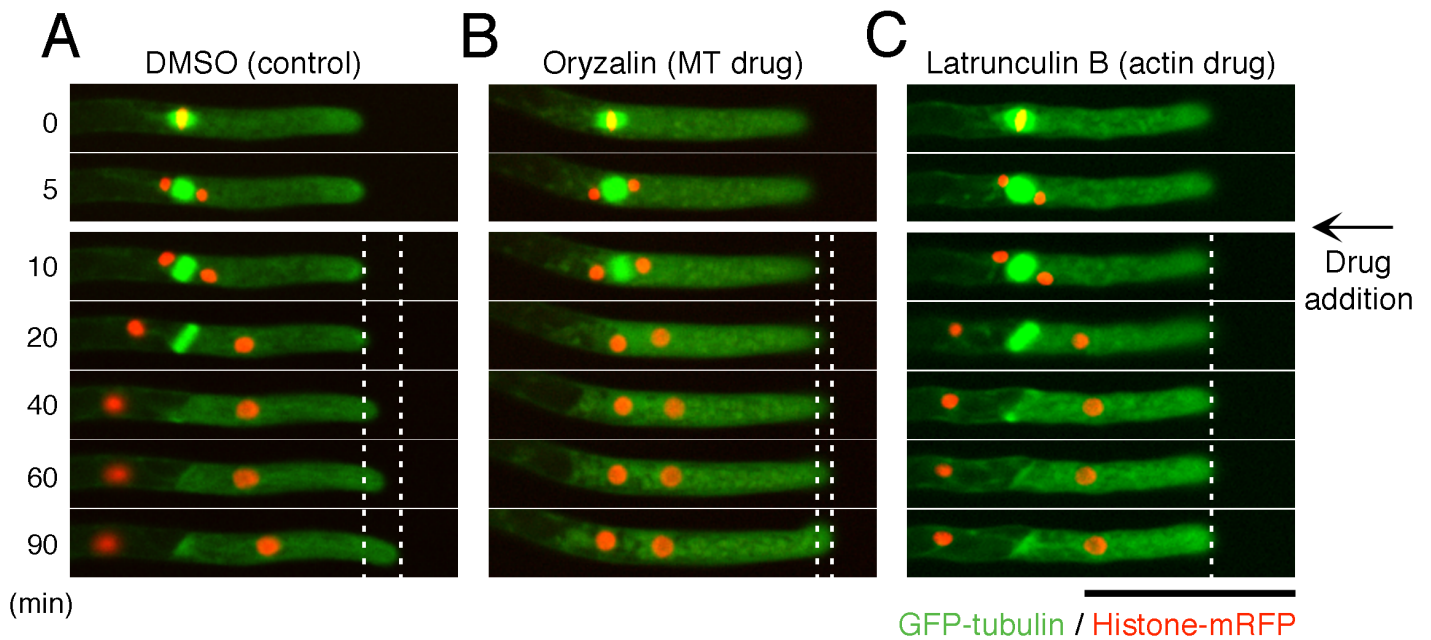
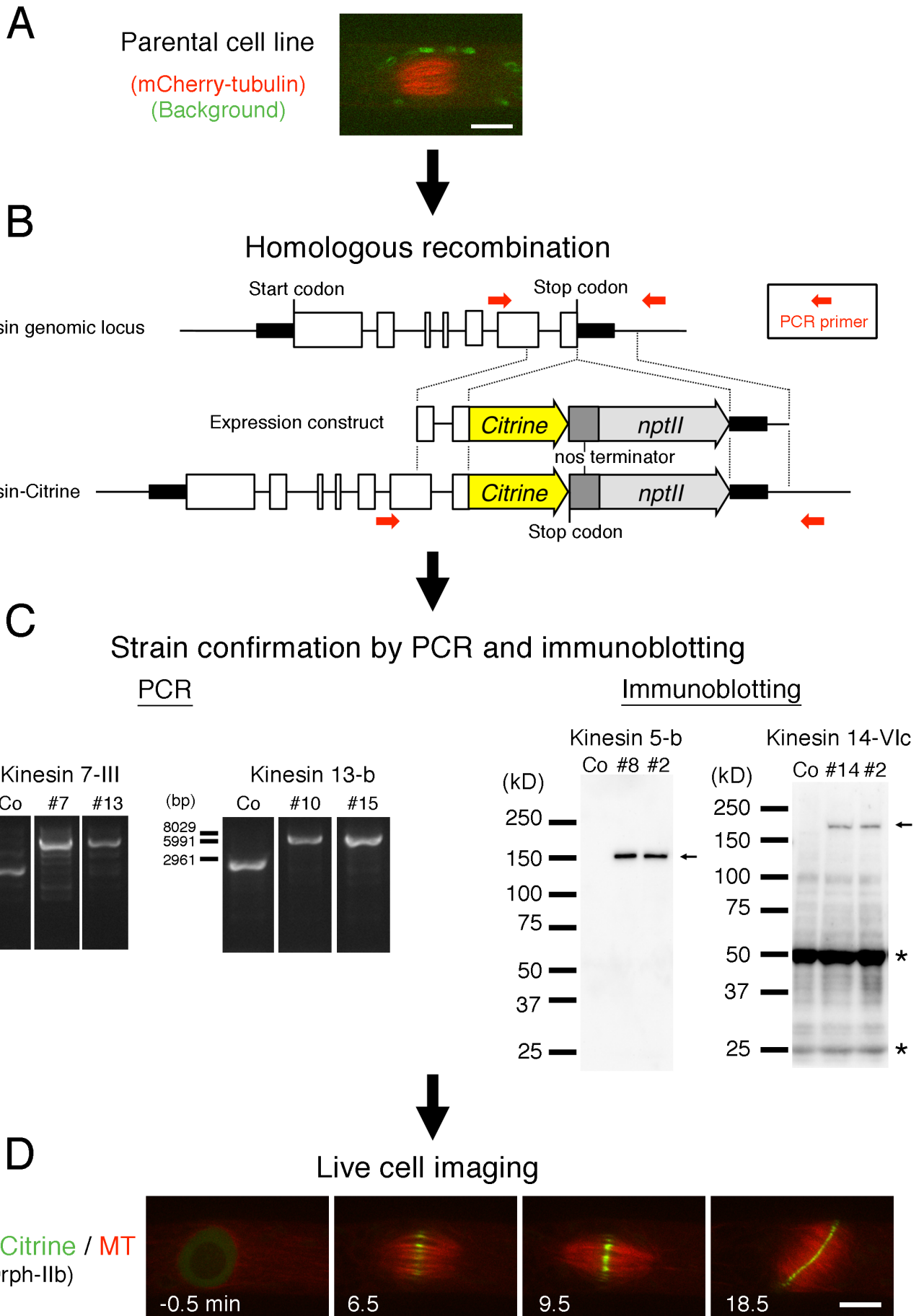


図7 カウロネマ頂端細胞において、細胞分裂直後の核は微小管依存的に細胞の中央に配置される

(A–C) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を発現している細胞の wide-field 型蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察。微小管脱重合剤オリザリン (10  $\mu\text{M}$ )、actin 重合阻害剤ラトランキュリン B (25  $\mu\text{M}$ )、サイトカラシン B (200  $\mu\text{M}$ )、コントロールとして DMSO (0.5%、もしくは 1.0%) を分裂終期の細胞 (図の 5–6 min) に加えた。画像は 1 分ごとに撮影した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。  
(D) 薬剤添加前後の頂端細胞の核の位置を示す。分裂中期板からの距離を平均  $\pm$  標準誤差で示す。DMSO、 $n=7$ ；オリザリン、 $n=7$ ；ラトランキュリン B、 $n=6$ 、サイトカラシン B、 $n=7$ 。染色体分離開始時を 0 min とした。



### 図 8 分裂期 kinesin 探索 (局在スクリーニング) のフローチャート

ヒメツリガネゴケの内在性 kinesin の分裂期局在を包括的に決定するための実験手順。

(A) mCherry- $\alpha$ -tubulin 発現株を親株として用いた。分裂期中期の細胞を示す (赤、mCherry- $\alpha$ -tubulin; 緑、葉緑体の自家蛍光)。

(B) 相同組換えにより内在性の kinesin のカルボキシ末端側に *citrine* 遺伝子を付加した。*citrine* 遺伝子の後ろには *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase のターミネーター (nos terminator) と G418 耐性遺伝子カセット (*nptII*) が組み込まれてある。黒色の長方形は非翻訳部位、白色の長方形はエキソン、黒色の線はイントロン、赤色の矢印は株の選抜に用いたプライマーを示す。

(C) PCR とウエスタンブロッティングによる株の選抜。PCR の電気泳動写真 (左) と抗 GFP 抗体を使ったウエスタンブロッティング (右) の典型的な例を示す。抗 GFP 抗体は Citrine を認識する。矢印は Citrine 融合 kinesin の予想される分子量を、星印は非特異的なバンドを示す。

(D) Spinning-disc 型共焦点顕微鏡を用いたカウロネマ細胞のライブ観察。一例として、KINID1a/kinesin Orph-IIb-Citrine (緑) と mCherry- $\alpha$ -tubulin (赤) を発現する細胞を示す。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。



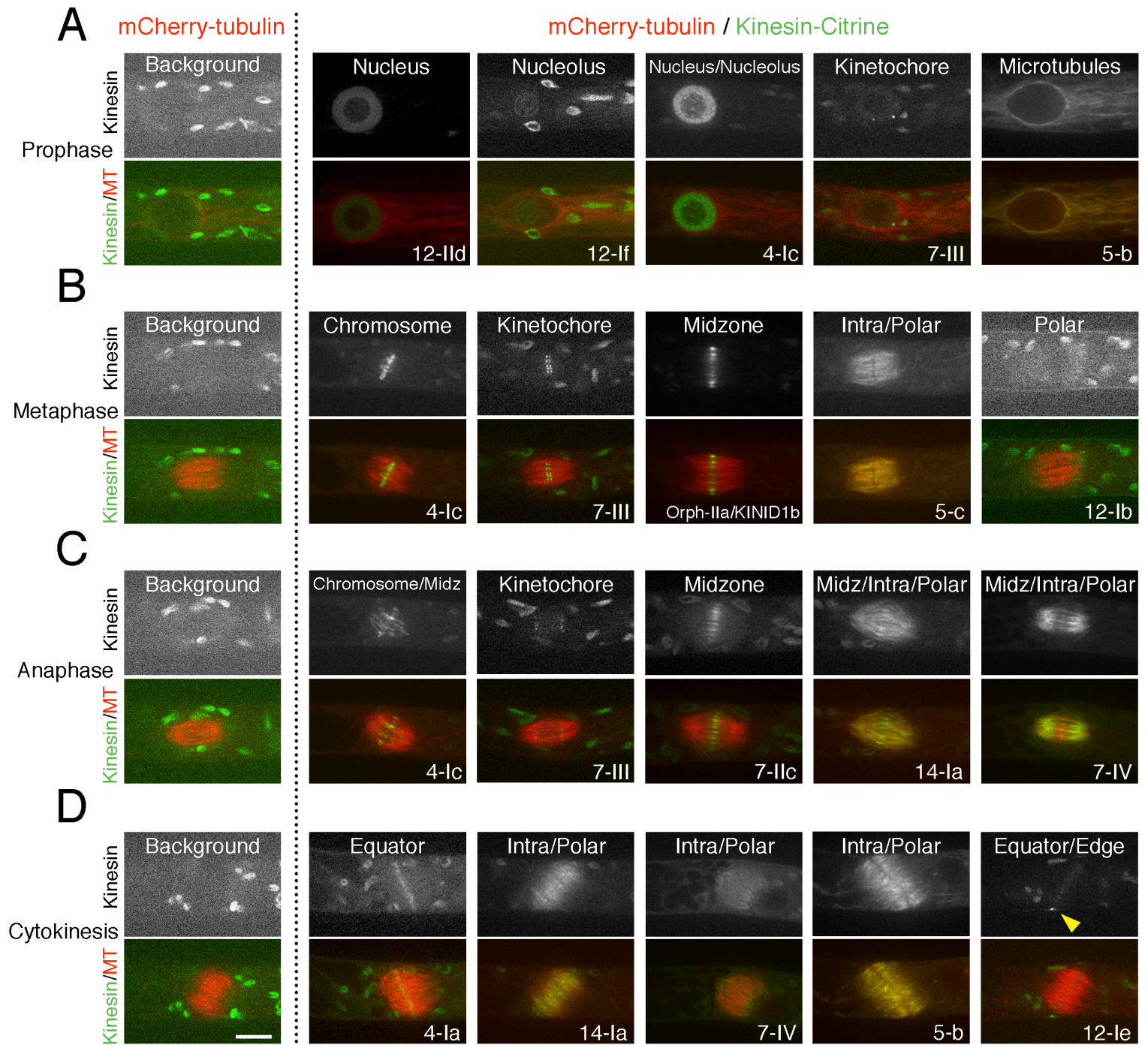
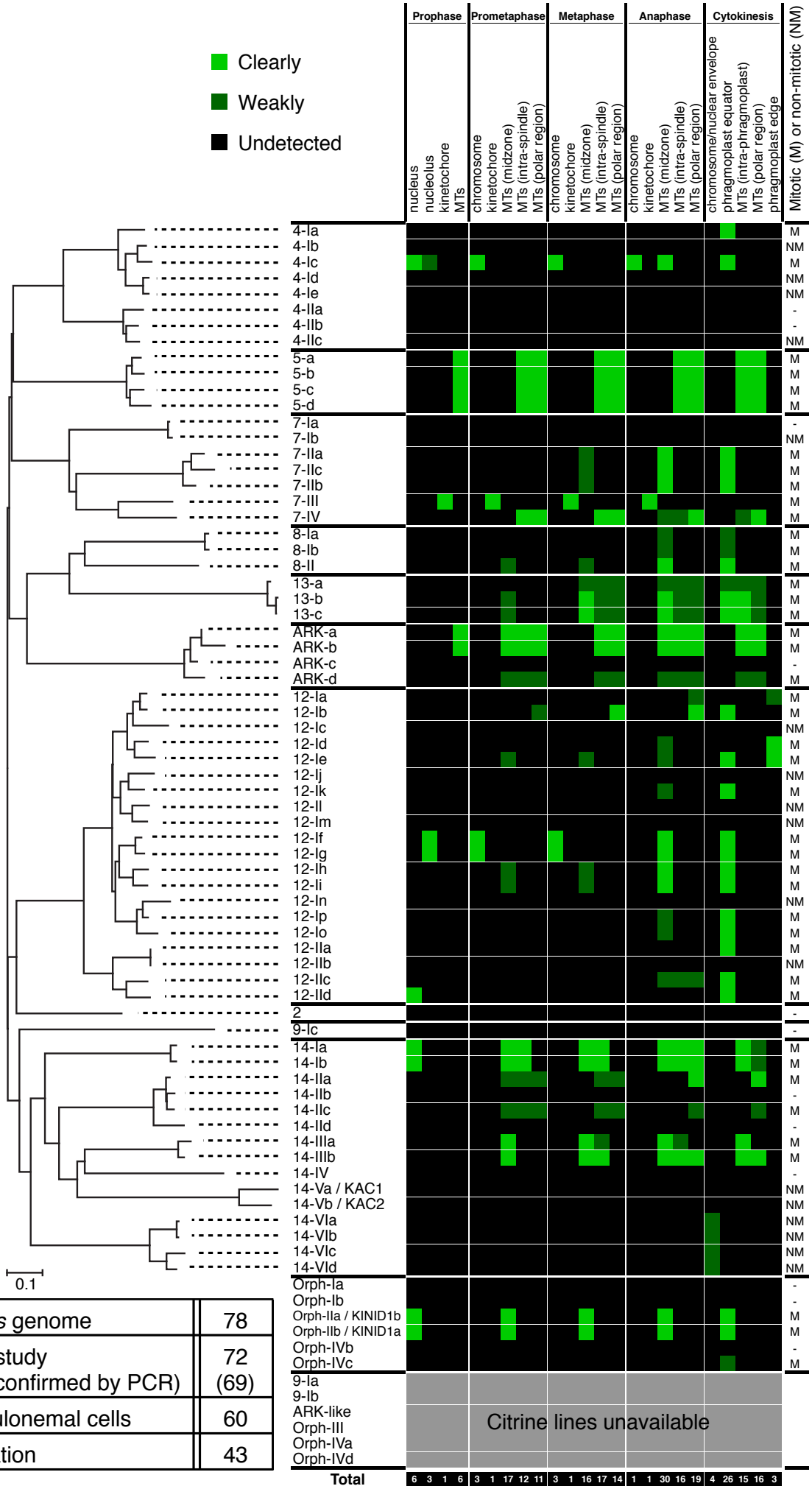
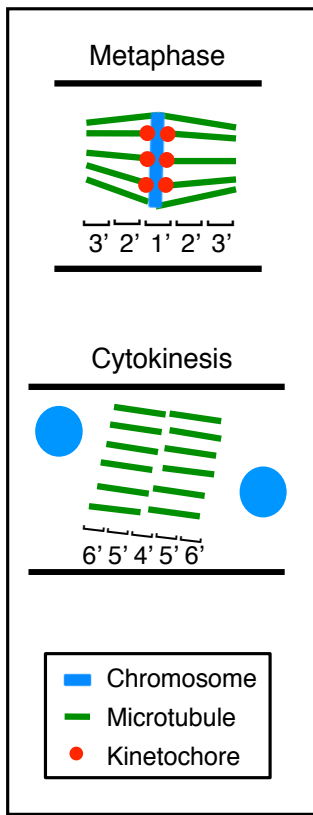


図 9 細胞分裂期における kinesin の局在

(A) 分裂前期、(B) 分裂中期、(C) 分裂後期、(D) 細胞質分裂期、それぞれの時期で代表的な局在の画像を示す。緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す。コントロールとして、左に mCherry- $\alpha$ -tubulin のみを発現している細胞を示す。局在部分は画像の上部分に、kinesin の遺伝子名は画像の下部分に示す。矢尻はフラグモプラストの縁を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

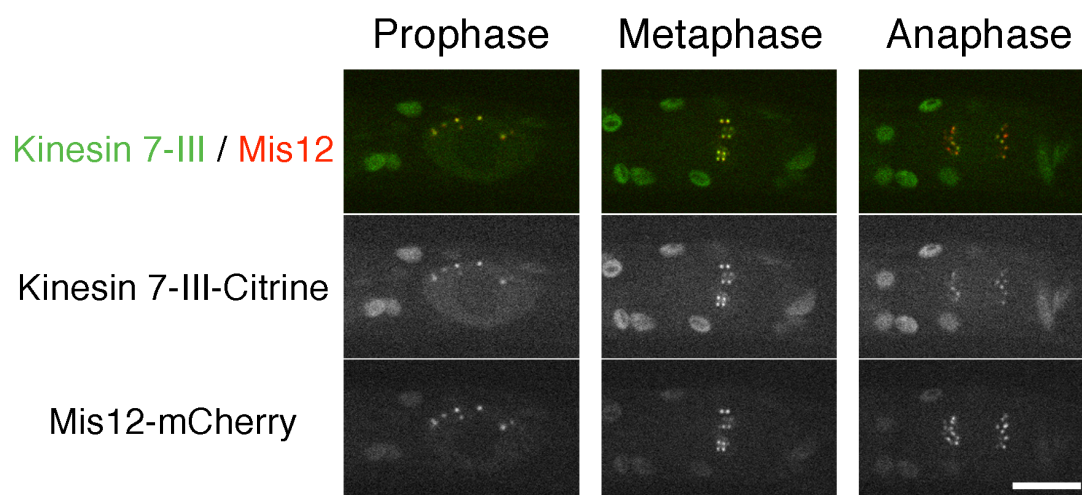
■ Clearly  
■ Weakly  
■ Undetected



Kinesins in <i>P. patens</i> genome	78
Imaging in this study (Homologous recombination confirmed by PCR)	72 (69)
Citrine expression in caulonemal cells	60
Mitotic localisation	43

### 図 10 細胞分裂期での kinesin の局在と発現のまとめ

(左) 3つの領域に分けた分裂中期と細胞質分裂期の模式図。1'と4'は midzone/equator (ミッドゾーン/赤道面)、2'と5'は intra-spindle/intra-phragmoplast、3'と6'は polar region。(右) 細胞分裂期のそれぞれの期間における 78 個の kinesin の局在をまとめたヒートマップ。四角は Citrine シグナルが強い (緑)、弱い (濃緑)、もしくは、検出できない (黒) を表す。citrine 遺伝子を付加できなかった 6 個の kinesin については灰色で示す。一番右の列はその kinesin が mitotic kinesin なのか (M)、nonmitotic kinesin なのか (NM)、もしくは発現していないのか (-) を示す。一番下の行はそれぞれの領域で検出できた kinesin の合計を示してある。Kinesin のファミリーは中央の系統樹にならって分類されている。(中央) ヒメツリガネゴケ kinesin の系統樹。下のバーは座位当たりの置換数を示す。(左下) ヒメツリガネゴケがもつ kinesin の数、本研究で観察を行った kinesin の数、カウロネマ細胞で Citrine の発現が見られた数、分裂期局在を示した数を表にまとめた。



**図 11 Kinesin 7-III のキネトコア局在**

Kinesin 7-III (緑) とキネトコアタンパク質 Mis12-mCherry (赤) の共局在を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

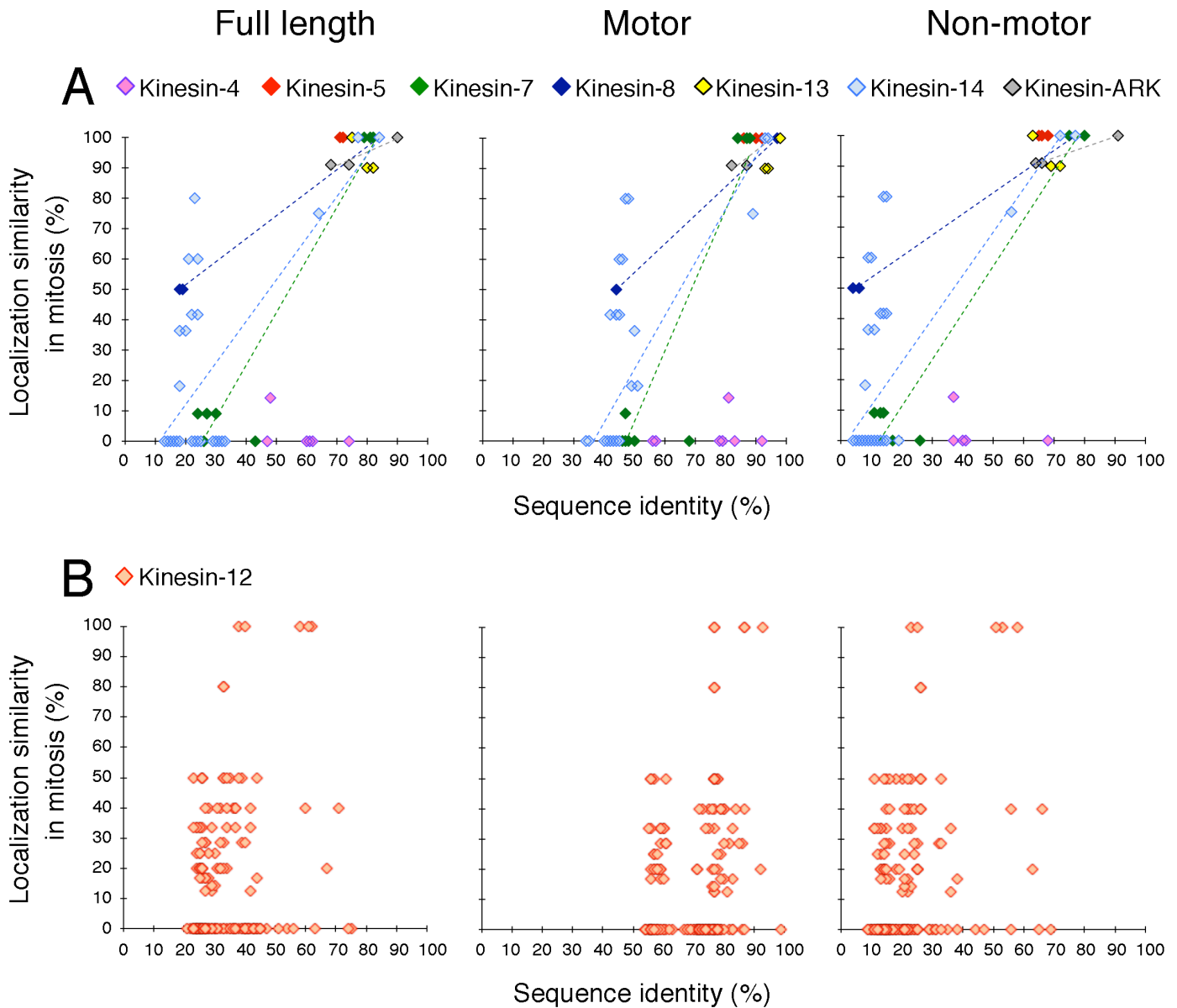


図 12 タンパク質のアミノ酸配列相同性と分裂期局在の相似性の相関

(A、B) 同じ kinesin ファミリー内のそれぞれの kinesin のペアについて、アミノ酸配列の相同性 (%) と分裂期局在の相似性 (%) をプロットした。以下に一例を挙げる。3 つの kinesin-13 はすべてカウロネマ細胞で発現しているため、kinesin13-a と 13-b、13-a と 13-c、13-b と 13-c のそれぞれの組み合わせの結果を表示してある。アミノ酸配列の相同性は ClustalW2 (EMBL) によって決定し、局在の相似性は図 10 のヒートマップに基づいて決定した。局在の相似性において、Kinesin 13-b と 13-c のペアでは、10 個の局在時期・場所で 10 個とも局在が同じであるためスコアは 100 % になる。一方、13-a と 13-b のペアでは 10 個中 9 個の局在が同じになるので、スコアは 90 % になる。Kinesin の全長、モータードメイン、非モータードメインの 3 つに分けて解析を行った。モータードメインはショウジョウバエの kinesin-1 のモータードメイン (9-340 アミノ酸) を使ってホモロジーサーチによって決定し、非モータードメインはモータードメイン以外の残りの部分を使用した。分裂期局在が見られない kinesin と分裂期に局在する kinesin の分裂期局在の相似性は 0 % で表し、両者とも分裂期局在を示さない組み合わせは表示していない。カウロネマ細胞で発現していない kinesin は解析から除いた。いくつかの kinesin ファミリーの中でアミノ酸配列と分裂期局在の相関が見られた ( $R^2$  (全長) = 0.93 (kinesin-7)、1.00 (kinesin-8)、0.46 (kinesin-14)、0.93 (kinesin-ARK);  $R^2$  (モータードメイン) = 0.87 (kinesin-7)、1.00 (kinesin-8)、0.55 (kinesin-14)、0.83 (kinesin-ARK);  $R^2$  (非モータードメイン) = 0.96 (kinesin-7)、1.00 (kinesin-8)、0.50 (kinesin-14)、1.00 (kinesin-ARK))。一方、kinesin-12 ファミリーでは相関が見られなかった ( $R^2 < 0.08$ )。



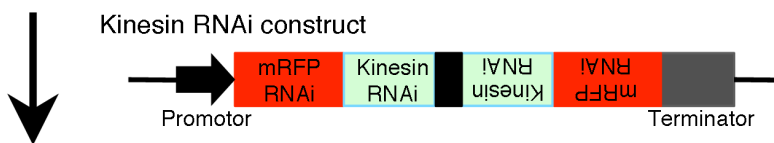
- 78 kinesins in *Physcomitrella patens*



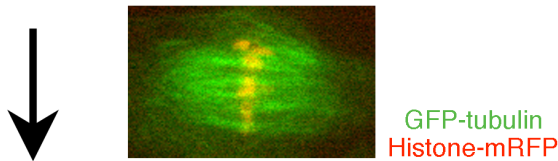
- Designing 2 sets of PCR primers against 78 kinesins
- PCR amplification (~700 bp)



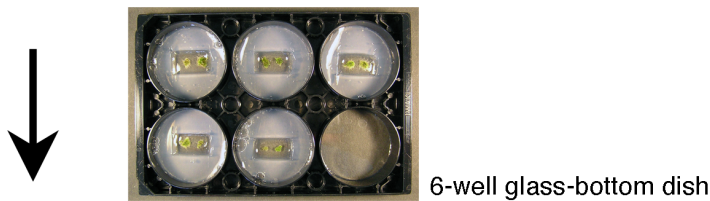
- Insertion to pENTR/D-TOPO vector
- Gateway LR reaction to the pGG626 RNAi vector



- Transformation of RNAi constructs to the GFP-tubulin/Histone-mRFP cell line



- Histone-mRFP intensity screening
- Imaging (long-term, multiple positions)



- Manual inspection of the phenotypes

— Total —  
61 genes  
101 constructs  
> 450 lines observed

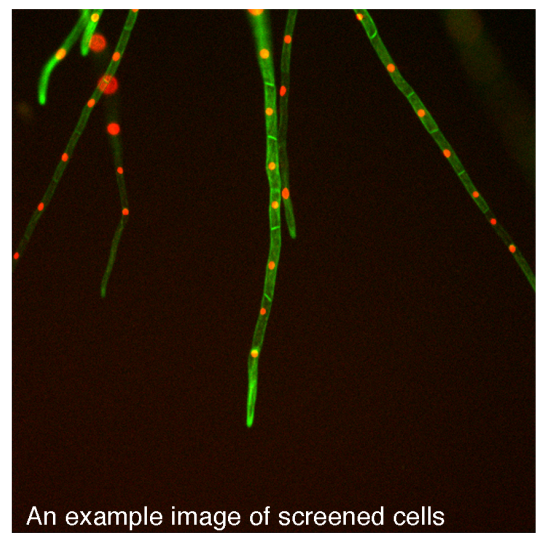


図 13 Kinesin RNAi スクリーニングのフローチャート

合計で 61 遺伝子を標的とする 101 のコンストラクトを用意し、450 以上の RNAi 株を選抜した。タイムラプス観察は wide-field 型蛍光顕微鏡を用いて GFP- $\alpha$ -tubulin、histoneH2B-mRFP、葉緑体の自家蛍光の異なる 3 つのカラーを撮影した。スケールバーは 10  $\mu$ m (分裂中期の細胞)、2 cm (6 穴プレート)、100  $\mu$ m (スクリーニングの細胞)。本実験は仁科桃子氏との共同で行った。

```

PpKinesin5-a 1 -----MAARSEKDRSVAVOVLLRCRPLNEEKRIRKNPQVISCNDTRREVTVLQTIASKQIDRTFFDKVFGP
PpKinesin5-b 1 -----MAARAEKDKGVAVOVLLRCRPFNEEKRKAKTPQVISCNDSRREVTVCONIASKQIDRTFFDKVFGP
PpKinesin5-c 1 -----MAARAEKDKGVAVOVLLRCRPFSEDEKRTKSPQVISCNDTRREVTVFONIASKQIDRTFFDKVFGP
PpKinesin5-d 1 MARDPILFSPRTARTASRFPDVAAGARTDKDKGVAVOVLLRCRPLSDDEKKAQSPQVISCNDRREVTVFQCSAHKQIDRTFFDKVFGP
*****

PpKinesin5-a 68 ASROVDLYDQATAPIVNEALDGFNCTIFAYGQTGTGKTYTMEGLGRKSKNGELPADAGVIPRAIQOIFETLDRDNOEYSVKVTVLELYNE
PpKinesin5-b 68 NSROVDLYDQAVVPIVNEVLDGFNCTIFAYGQTGTGKTYTMEGSRKSKNGDLPADAGVIPRAIQOIFETLDRDNOEYSVKVTVLELYNE
PpKinesin5-c 68 QSRQVDLYDQATVPIVNEVLDGFNCTIFAYGQTGTGKTYTMEGSRKSKNGELPADAGVIPRAIQOIFETLDRDNOEYSVKVTVLELYNE
PpKinesin5-d 91 QCKQVDLYDESIVPIVNEVLDGFNCTIFAYGQTGTGKTYTMEGSRKSKNGELPADAGVIPRAIQOIFETLDRDNOEYSVKVTVLELYNE
*****

PpKinesin5-a 158 ELTDLLAPEEYSKVVIDEKIKKPLALMEDGRCGGVLRVGLLEEIVTSANEIYTLDRGSAKROTAETLLNKQSSRSIFSITIHKEKTFP
PpKinesin5-b 158 ELTDLLAPEEYSKVVIDEKIKKPLALMEDGRCGGVLRVGLLEEIVTSANEIYTLDRGSAKROTAETLLNKQSSRSIFSITIHKEKTFP
PpKinesin5-c 158 ELTDLLAPEEYSKVVIDEKIKKPLALMEDGRCGGVLRVGLLEEIVTSANEIYTLDRGSAKROTAETLLNKQSSRSIFSITIHKEKTFP
PpKinesin5-d 181 ELTDLLAPEEYSKVVIDEKIKKPLALMEDGRCGGVLRVGLLEEIVTSANEIYTLDRGSAKROTAETLLNKQSSRSIFSITIHKEKTFP
*****

PpKinesin5-a 248 EGEELMKCGKLNLDLAGSENISRSQAKDNRRAREAGEINKSLLTLGRVITSLVEHLGHVYPRDSKLTLLRDLSDGGKTKTCIATVSPSV
PpKinesin5-b 248 EGEELMKCGKLNLDLAGSENISRSQAKDNRRAREAGEINKSLLTLGRVITSLVEHLGHVYPRDSKLTLLRDLSDGGKTKTCIATVSPSV
PpKinesin5-c 248 EGEELMKCGKLNLDLAGSENISRSQAKDNRRAREAGEINKSLLTLGRVITSLVEHLGHVYPRDSKLTLLRDLSDGGKTKTCIATVSPSV
PpKinesin5-d 271 EGEELMKCGKLNLDLAGSENISRSQAKDNRRAREAGEINKSLLTLGRVITSLVEHLGHVYPRDSKLTLLRDLSDGGKTKTCIATVSPSV
*****

PpKinesin5-a 338 HCLDETLSTLDYAYRAKNIKKNPEVNQKTKMSALIKDLYGEIERLKAEVYSARERNGIYIPRDRYFEEAEKAMVDKIERMGLVEEAKD
PpKinesin5-b 338 QCLDETLSTLDYAYRAKSIKKNPEVNQKTKMSALIKDLYGEIERLKAEVYSARERNGIYIPRDRYFEEAEKAMVDKIERMGLVEEAKD
PpKinesin5-c 338 HCLDETLSTLDYAYRAKNIKKNPEVNQKTKMSALIKDLYGEIERLKAEVYSARERNGIYIPRDRYFEEAEKAMVDKIERMGLVEEAKD
PpKinesin5-d 361 PCLDETLSTLDYAYRAKNIKKNPEVNQKTKMSALIKDLYGEIERLKAEVYSARERNGIYIPRDRYFEEAEKAMVDKIERMGLVEEAKD
*****

PpKinesin5-a 428 KQIEDLQMLNEARQODCAALLTKLNETQKSLCSQOTLHETTENLKOANCAIRERDVIYVIANQSETEK-----
PpKinesin5-b 428 KQIEDLQMLNDSQOQLWSDLLIKLNETQKSLCSQOTLHETTENLKOANCAIRERDVIYVIANQSETEK-----
PpKinesin5-c 428 KQIEESERATETQOQYSDLLAKLDRQKLEIYTOENLNETLENLKOANCAIRERDVIYVIANQSETEK-----
PpKinesin5-d 451 KQIEDLQKSSSEIQOQYADLLAKLNTQESLDRTRDHLNETTENLKOANCAIRERDVIYVIANQSETEK-----
*****

PpKinesin5-a 495 -----ALVSRAGELRRELEAAVQDVAGLFAKIERKEDLELKNQKLVNAPQSGLTEHMKELRTRLVVGVTQOQQQLRTEEQQLHSF
PpKinesin5-b 495 -----ALVDRAGELRRELEAAVQDVAGLFAKIERKEDLELKNQKLVNAPQSGLTEHMKELRTRLVVGVTQOQQQLRTEEQQLHSF
PpKinesin5-c 518 KLMTTCYISEKSLVNRRAELRKELEAAVQDVAGLFAKIERKEDLELKNQKLVNAPQSGLTEHMKELRTRLVVGVTQOQQQLRTEEQQLHSF
PpKinesin5-d 518 -----ALVSRAGELRRELEAAVQDVAGLFAKIERKEDLELKNQKLVNAPQSGLTEHMKELRTRLVVGVTQOQQQLRTEEQQLHSF
*****

PpKinesin5-a 575 LNFKD-----QAEELKKNKLOGLKDLVLSQIQLVHTAVLHEHDVSSSTLKSLSLDSKVAAPKALEQOLLVSAVADAQSVHHDLOEQLSNQS
PpKinesin5-b 575 LNVKD-----QAEELKKNKLOGLKDLVLSQIQLVHTAVLHEHDVSSSTLKSLSLDSKVAAPKALEQOLLVSAVADAQSVHHDLOEQLSNQS
PpKinesin5-c 608 LNSKDAQVPHQQAEEELIKKLOGLKDLVLSQIQLVHTAVLHEHDVSSSTLKSLSLDSKVAAPKALEQOLLVSAVADAQSVHHDLOEQLSNQS
PpKinesin5-d 598 LNFKE-----KSVLELKRKLOGLKDLVLSQIQLVHTAVLHEHDVSSSTLKSLSLDSKVAAPKALEQOLLVSAVADAQSVHHDLOEQLSNQS
*****

PpKinesin5-a 659 QELAEFAQHQRQVAQKCLQAARDITRTIMASLSIAIEVDTFANFNECIIFSSANHDKGLHALAEAYEEHARKDHTOLLESTITAMLASSLGNR
PpKinesin5-b 659 QEVADFQAKQREVALKSLKAARDITHTLVAISLSTMETDAVNFREHVNFPSANHDEELHNLAEAYEEHARKDHTOLLESTITAMLASSLGNR
PpKinesin5-c 698 HEVALFAQQOREVAQRSLQEMARNIAOTLFTSLSTMETDAASFOEHVNSSSVDHDOGLLELAEAYEEHARNEYTOLLESTITAMLASSLGNR
PpKinesin5-d 682 QEVASFAQQOREVAARRSLEAARDITQVVTSLSTMETDAANFREHVNSSSVDHDELIQLADAYEEHARKDHTOLLESTITAMLASSLGNR
*****

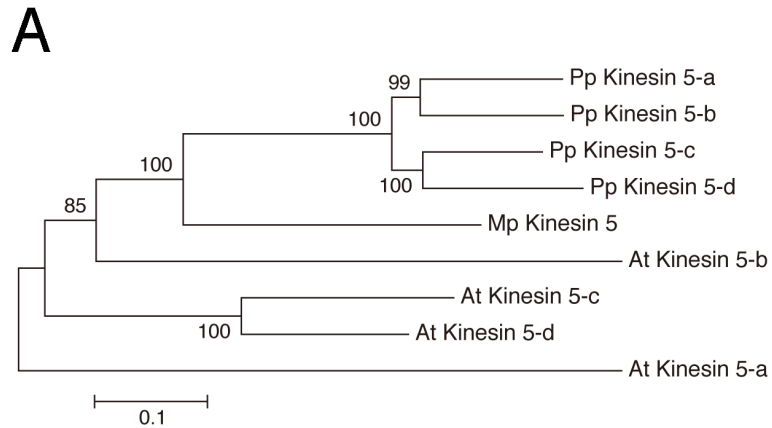
PpKinesin5-a 749 TNLVHTRIKKLREVASOHAHRTKHGLEKIQOEAITANGKLNFTATAGASSLEDATMFATSVSRMDEILQSSSTHTTTSGRKWESI KKEV
PpKinesin5-b 749 TNLVTRVHKLRDNDWSQHAHVAQEAQVGIQREAVANGRLDAFATSDASSAQEAVALATKVS RMEELIETCTKHTATSGNKWVSTYKEV
PpKinesin5-c 788 TQLVQTSVKKLRDNDWSDAHLVVOGQKIQOEAIVTANGQVNAFISTDVSSEVDSALLANRVS RMEELIETCTHTATSGRKWDFTCKEI
PpKinesin5-d 772 TNLVQTSVKKLRDNDWSDAHLVVOGQKIQOEAIVTANGQVNAFISTDVSSEVDSALLANRVS RMEELIETCTHTATSGRKWDFTCKEI
*****

PpKinesin5-a 839 NHIIVTSHTAATSIILREGLEFANANVLVKLOGLQDTRARKLIEAONNNTVAFINGTCTGEHEAACKMOSTMKLOAEAAELERSHESGLSGV
PpKinesin5-b 839 NDVVKSHSVVNNLILGEGKANTDILLHNLOGLEETACLEIEKENRNTVAVVDDICTGDHEAASRMLSVMKSOEGAAATELQSMHDSRLSVV
PpKinesin5-c 878 QAMQNSHTTAVTISILGEGLDANTLILKIQALEADAGRLEIETRNNTLAFVQGTSA GEHEAAEKMSHTMASOVNAATELCSHNSSSVAAV
PpKinesin5-d 862 MELQNSHTAAVNSIIEGGLQANANLLVNIQOEDAALMEIETENNYTVTFVNETCA GEHEAAARMOSTMASOVNAATELCSHNSSSVAAV
*****

PpKinesin5-a 929 QFQTDHHLKKEEYLEDKPTCSTPRKRRTI QVPTPSSINALCTPPLDMLLKEFRARHAVGGPVRLSKVVFQSVESAFRDSRTPLTIN*
PpKinesin5-b 929 QNRTHHYLKDEYIIGDKPTCTTPRKRRAIHVPTLSSINGLCTPLFDLTVNEFRAKNTAGGIDRPSRVFQSVESAFRDSRTPLTIN*
PpKinesin5-c 968 QNHTDHYLREYLVDEPTCSTPRRRPIQVPTPSSINAVCTPPLDMLLDFRKTAAAGGSDRLSKVVFQSVESAFRDSRTPLTIN*
PpKinesin5-d 952 QKHADHYLKEEYLEDKPTCSTPRRRPIQVPTPSSINAVCTPPLDMLLDFRKTAAAGGSDRLSKVVFQSVESAFRDSRTPLTIN*
*****

```

図 14 ヒメツリガネゴケがもつ 4 つの kinesin-5 のアミノ酸配列のアライメント  
Clustal Omega プログラム (EMBL) によって決定した。



**B**

*Physcomitrella patens*

	Pp Kinesin 5-a	Pp Kinesin 5-b	Pp Kinesin 5-c	Pp Kinesin 5-d
Pp Kinesin 5-a	-	-	-	-
Pp Kinesin 5-b	<b>77</b>	-	-	-
Pp Kinesin 5-c	<b>75</b>	<b>75</b>	-	-
Pp Kinesin 5-d	<b>73</b>	<b>72</b>	<b>76</b>	-

*Arabidopsis thaliana*

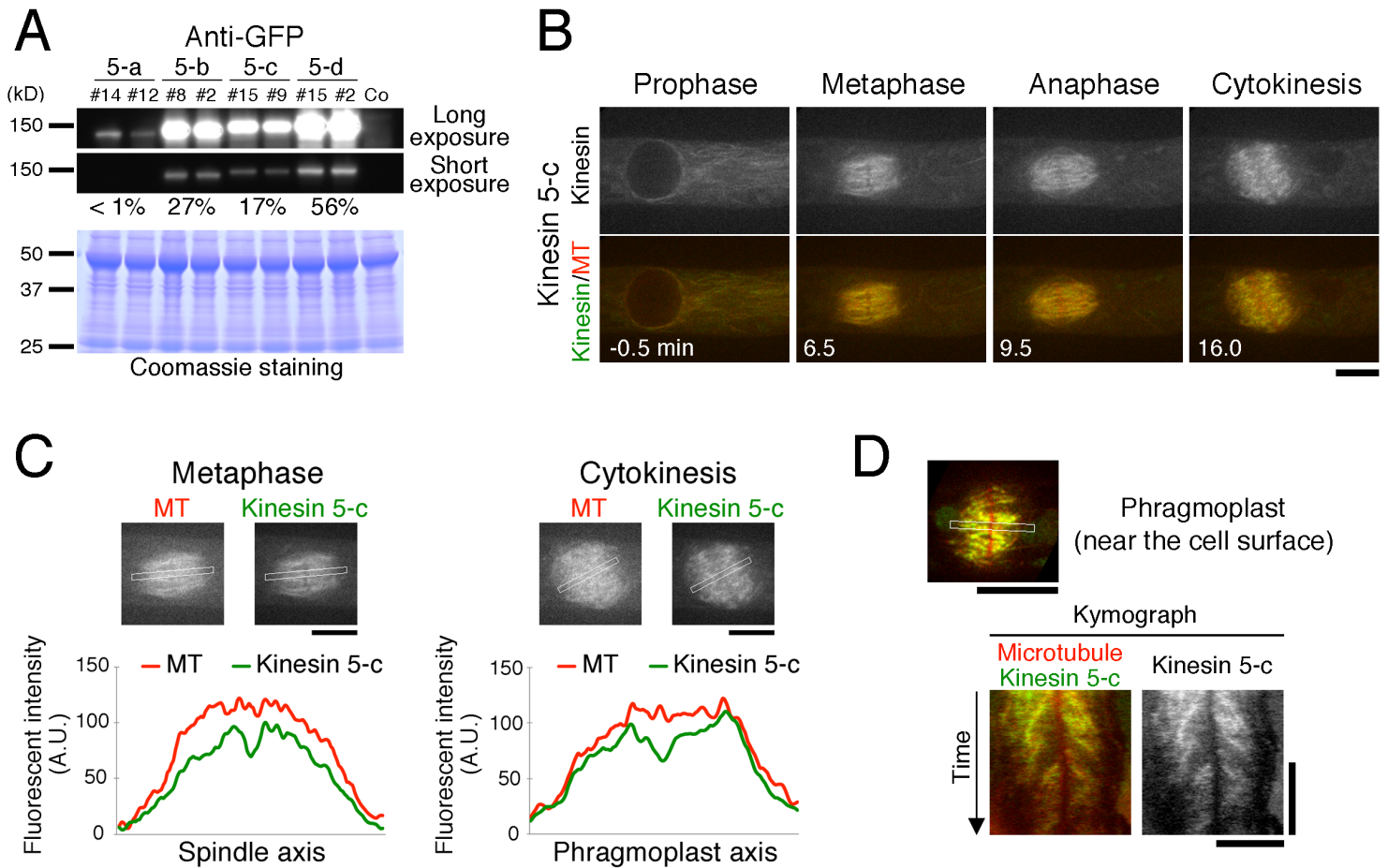
	At Kinesin 5-a	At Kinesin 5-b	At Kinesin 5-c	At Kinesin 5-d
At Kinesin 5-a	-	-	-	-
At Kinesin 5-b	<b>39</b>	-	-	-
At Kinesin 5-c	<b>42</b>	<b>44</b>	-	-
At Kinesin 5-d	<b>45</b>	<b>44</b>	<b>69</b>	-

**図 15 Kinesin-5 の相同性**

(A) ヒメツリガネゴケ (Pp)、シロイヌナズナ (At)、ゼニゴケ (Mp) の kinesin-5 ファミリーの系統樹解析。分岐にある値はローカルブートストラップ確率である。ブートストラップ確率は 1000 回の繰り返し計算により求めた値を示してある。枝の横の長さは推定される進化的距離の相対的な長さである。下のバーは座位当たりの置換数を示す。

(B) ヒメツリガネゴケとシロイヌナズナの kinesin-5 ファミリー内のアミノ酸配列の相同性 (%) を示す (ClustalW2 によって決定した)。





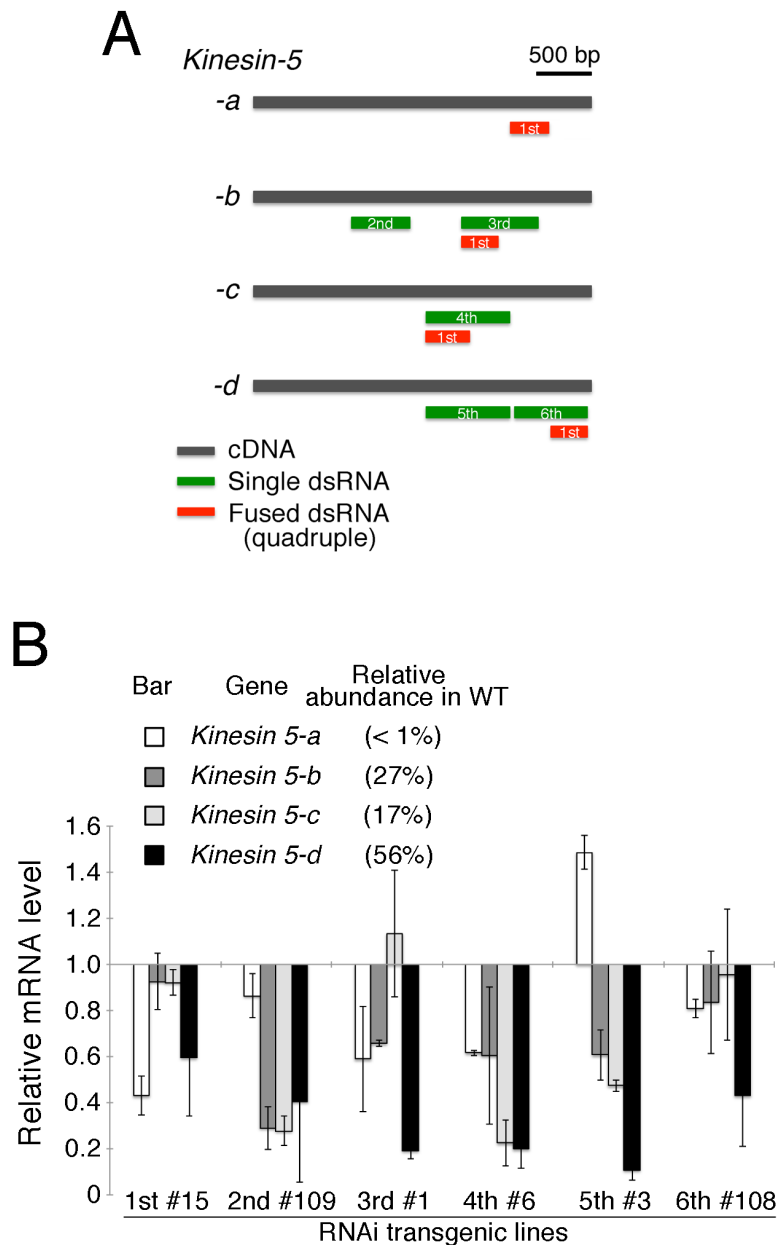
**図 16** スピンドル、フラグモプラストにおける不均一な kinesin-5 の分布

(A) 原糸体細胞抽出液 (カウロネマ細胞とクロロネマ細胞を含む) での Citrine 融合 kinesin 5-a から 5-d のウエスタンブロッティング。kinesin 5-a から 5-d までの相対量はバンドの濃度によって測定した。クマシーブルー染色をローディングコントロールに用いた。抗 GFP 抗体は Citrine を認識する。

(B) 細胞質分裂期での kinesin 5-c の局在。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

(C) スピンドル (左) とフラグモプラスト (右) の蛍光強度の測定。白線で囲まれた領域を解析した。3 つの近接したピクセルの平均値をプロットした。Kinesin 5-c のシグナル (緑) は、微小管 (赤) が存在する赤道面部分で急激に低下する。スケールバーは 10  $\mu$ m。

(D) フラグモプラストでの kinesin 5-c の局在。Kinesin 5-c-Citrine シグナルの極に向かう動きがキモグラフにより検出された。この極へ向かう動きの分子機構はわかってない。横のスケールバーは 10  $\mu$ m; 縦のスケールバーは 3 分。



**図 17 Kinesin-5 RNAi ノックダウンの確認**

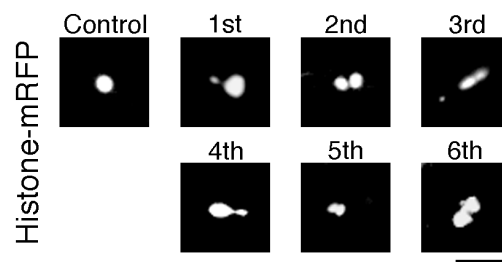
(A) 6 個の RNAi コンストラクトを *kinesin-5* の RNAi ノックダウンに使用した。灰色のバーは cDNA を示し、赤色と緑色のバーは dsRNA を示す。4 重のコンストラクト (1st construct) はそれぞれの *kinesin-5* から 311 - 424 bp の配列をタンデムにつなげて作成した。

(B) 定量 RT-PCR (quantitative real-time RT-PCR) による *kinesin-5* のノックダウンの確認。コントロールを 1.0 とした時の相対値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。2 回の独立の実験による結果を示す。

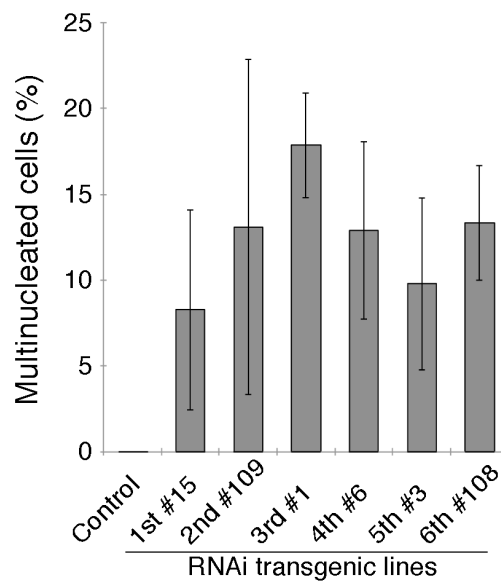
**A**

Construct	Phenotype detected / (# of lines)	Imaging (# of lines)
Kinesin-5 RNAi	1st	2 / 2
	2nd	6 / 8
	3rd	4 / 5
	4th	2 / 5
	5th	3 / 5
	6th	3 / 5
	Total	20 / 30
Control	0 / 41	

**B**



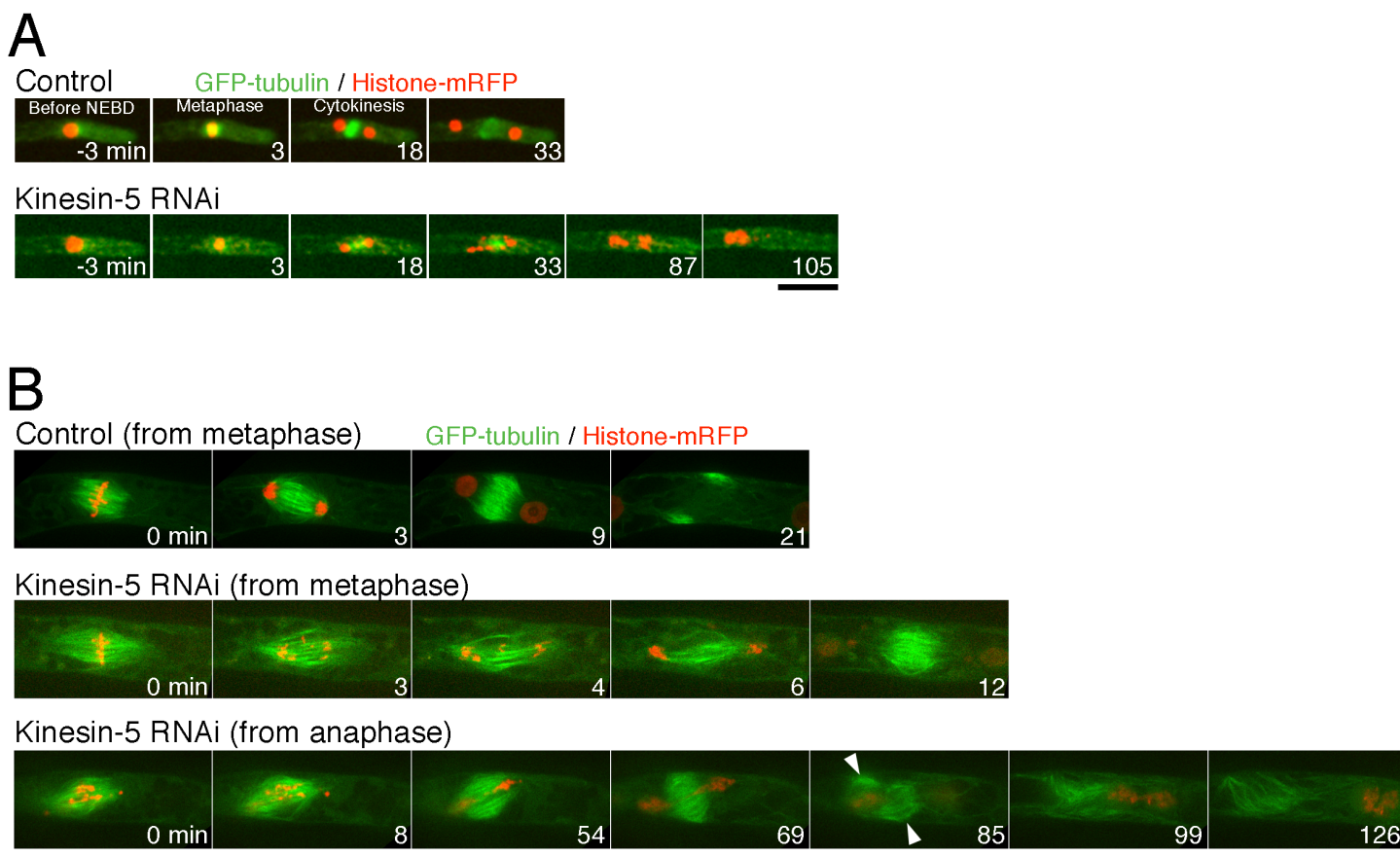
**C**



**図 18 Kinesin-5 RNAi ノックダウンによる多核の表現型**

(A) RNAi 株の選抜のまとめ。RNAi コンストラクトが染色体に組み込まれた 30 の RNAi 候補株のうち、20 株で多核の表現型が見られた (この選抜方法では、RNAi コンストラクトが完全に正しい場所に挿入されたかは評価していない)。この割合は Nakaoka et al. で、3 つの分裂期に必要な遺伝子に対して用意した 7 つの RNAi コンストラクトで得られた割合に近い (Nakaoka et al., 2012)。コントロール株では 41 回の観察で一度も多核の表現型は見られなかった。

(B、C) 多核の表現型が見られた細胞の画像とその割合を示す。エラーバーは 3 回から 5 回の独立の実験の標準偏差を示す。スケールバーは 50  $\mu$ m。



**図 19 分裂後期以降での kinesin-5 の働き**

(A) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の wide-field 型蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察。コントロールと kinesin-5 RNAi (1st construct line #15) のカウロネマ細胞を示す。画像は3分ごとに撮影した。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 50  $\mu$ m。

(B) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の spinning-disc 型共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス観察。コントロールと kinesin-5 RNAi (1st construct line #15) のカウロネマ細胞を示す。上部と中央のパネルでは、姉妹染色分体の分配開始時を 0 min とし、下部のパネルでは任意の時間を 0 min とした (下部のパネルの細胞は内藤晴子氏によって撮影された)。矢尻は2つの分離したフラグモプラスト様構造を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

```

PpKinesinARK-a 1 MAFQAQHK--SRPLSVNMGKNGVGLSPSPPTSPSPQEPESAK----A--THSRTKS---ASPATSSSATSTRROSNNGSARQSHDGGVANRVRVT
PpKinesinARK-b 1 MAFQAQHK--SRPLSVNSGKNVAGSLSPPTSPSPQEPDSSK----G--THMRTKS---ASPVTSSSTSTRROSNNGSTRQSHDGGVANRVRVT
PpKinesinARK-c 1 MAFQAQHKSRPLSVNSLKNQA-----CPSPSPQPISSS---TSTTRPKKASVSSSTSSSTRROSNNGSTRQSHDGGVANRVRVT
PpKinesinARK-d 1 MAFASAHKGGPTTAPARTQVTR-----SLSMSQSASKEVTVASPTSIASPNMRPKS---ASFSPSNVYHRRNRSSTGKGGFDNGVLRNVRVA
*****

PpKinesinARK-a 82 VRLRPRNAEELEADLDFADCVLELOPELKRRLKLRKNWSESETYQDFEILTETASQKRVEVVAKPVVESVLEGYNGTMAYGQTGTGKFTFT
PpKinesinARK-b 82 VRLRPRNAEELEADLDFADCVLELOPELKRRLKLRKNWSESETYQDFEILTETASQKRVEVVAKPVVESVLEGYNGTMAYGQTGTGKFTFT
PpKinesinARK-c 81 VRLRPRNAEELEADLDFADCVLELOPELKRRLKLRKNWDCETQYQDFEILTETASQKRVEVVAKPVVESVLEGYNGTMAYGQTGTGKFTFT
PpKinesinARK-d 88 VRLRPRNAEELEADLDFADCVLELOPELKRRLKLRKNWDCETQYQDFEILTETASQKRVEVVAKPVVESVLEGYNGTMAYGQTGTGKFTFT
*****

PpKinesinARK-a 172 LGKLGDEDTADRGIMVRALEDILSININHADDTVTVSYLQLYMESVODLLAPERDNCHIQEDPKTGDVSVPGATQIQITDHOFSFVNLLDVG
PpKinesinARK-b 172 LGKLGDEDTADRGIMVRALEDILSININHADDTVTVSYLQLYMESVODLLAPERDNCHIQEDPKTGDVSVPGATQIQITDHOFSFVNLLDVG
PpKinesinARK-c 171 LGKLGDEDTADRGIMVRALEDILAVINPVVDVTVSYLQLYMESVODLLSPEKDNIAIQEDPKTGDVSVPGATQIQITDHOFSFVNLLDVG
PpKinesinARK-d 178 LGRLGDEEDCADRGIMVRALEDILANITPGEDTIVTVSYLQLYMESVODLLAPERDNIAIQEDPKTGDVSVPGATQIVLQDQTSFVRLDVG
*****

PpKinesinARK-a 262 ESNRVAANTKLNTESSRSHALLLVQVKKAVRKE---PAEN--G-----KMRAPTIRRSKLLIVDLAGSERVDKSGSEGHTLEEAKSI
PpKinesinARK-b 262 ESNRVAANTKLNTESSRSHALLLVQVKKAVRSKE---PTENGGN-----KMRAPTIRRSKLLIVDLAGSERVDKSGSEGHTLEEAKSI
PpKinesinARK-c 261 EANRFAANTKLNTESSRSHALLLVQVKKAVRNKVVV--VPENGGNGSHSVKGMRAPTIRRSKLLIVDLAGSERVDKSGSEGHTLEEAKSI
PpKinesinARK-d 268 EANRFAANTKLNTESSRSHALLLVQVKKGYKGRSGDTATNENDNGSPOTGTGRAPHIRRSKLLIVDLAGSERVDKSGSEGHTLEEAKSI
*****

PpKinesinARK-a 340 NLSLTALGKGINALAEENSPHVPIRD SKLTRLRLRDSFGGTAARTSLIVTIGPSPRHRGETTSTIMFGQRAMKVENMVKLEEFDYKSLCRRM
PpKinesinARK-b 342 NLSLTALGKGINALAEENSPHVPIRD SKLTRLRLRDSFGGTEILSAY-----HVKCAKRAMKVENMVKLEEFDYKSLCRRM
PpKinesinARK-c 350 NLSLTALGKGINALAEENSPHVPIRD SKLTRLRLRDSFGGTAARTSLIVTIGPSPRHRGETTSTIMFGQRAMKVENMVKLEEFDYKSLCRRM
PpKinesinARK-d 358 NLSLTALGKGINALAEENSPHVPIRD SKLTRLRLRDSFGGTAARTSLIVTIGPSPRHRGETTSTIFGQRAMKVENMVKLEEFDYKSLCRRM
*****

PpKinesinARK-a 430 EAELDRLVAENERQVKARMEENDEELDRVVEESRQLVMEAEENRLOTALQSMMAEKSIYEQEVEELROKCEKRGCEVEELRHLKLEEVIVRVD
PpKinesinARK-b 416 EAELDRLVAENERQVKARQENDEELDRVVEESRQLVMEAEENRLOTALQSMMAEKSTYEQEVEEMRLKCEKRGCEVEELRHLKLEEVIVRVD
PpKinesinARK-c 440 EAELDRLVAENERQVKIRLENDEELDRVVEESRQLVMEAEENRLOTAMDSINERNSIYEREVESELROSCCKGCEVEELRHLKLEEVIVRVD
PpKinesinARK-d 448 ETELDRLVAENERLVKRSREDESECARQLDDARDVVEAESKLAHALBLTAAEKSONRKDVLDMKQLQEAECARREQLKELKLEAL-----
*****

PpKinesinARK-a 520 VLQEEVQVLARERQTEQOEKYTHEENLKLQKEMTKMKEQOHMDIMKQVKKHKNFLAEALERSNTERAHRERLEEFELCSORLQLAOLERVE
PpKinesinARK-b 506 MLOEETQLLARERONEQOEKCTOEELKQKQKEMTKMKEQOKELEAEEETKYKELAELESERKTERAHRERLEDELGCORLQLEERLE
PpKinesinARK-c 530 KLOEETQALASERONDQOEKHTOLEENLKLQKEMTKMKEQOKELEMOQVEKQOELALALENEKRERERLEBEELASQLKTEELERVE
PpKinesinARK-d 533 -----S-SHQSEKAEKSNVDTTKLPEKLEDAAEEMHQREIATELQEHQKELAEVVALYMQERARRERLENELASQRELVLCESLQK
*****

PpKinesinARK-a 610 KELRAATPOIQDSE--SNDQRETEELRKLLEDEERLKNQSDNQSMEIAELRALLEKERQKRKQSDPEQSSSETSELRALLOSEROKIIOF
PpKinesinARK-b 593 KELQATPOIQDSEEOSNDQSKETEBELRTILEIRONSQSDNQSLEIMKLRASLENEQQRNQPDCQDKETAELRALLESEROKLQHS
PpKinesinARK-c 620 ER-RSLSQIQDSEV--SNVQKKEEBELRTLLENERORRE-----E-----FSMALQSS
PpKinesinARK-d 613 QLLNGAQPPEHQRO-----E-----
*****

PpKinesinARK-a 698 EEQITIEVAELRRTLLEGERQKREQLQELRVAKTQMSKRSVNGSLTROQGDPELLTVRHRLEDEELRERERLEEEIRHLKEQVLSVLEEHEE-
PpKinesinARK-b 683 EEQITIEISELRTLLENEROKREQLQELRVAKS QVSKRSVNGSLTROQGDPELLTVRHRLEDEELRERERLEEEIRHLKEQVLSLEEHD-
PpKinesinARK-c 661 VGQSKETIAELSTLLENEROKREQLQELKSTKTQMSKRGVNGSLTKQOQDELLTVRHRLEDEELRERERLEEEIRHLKEQVAVLLEEHEEV
PpKinesinARK-d 634 GEHSSEVMSLRSLLEKQMOKNDQLEQLRALKSSASRKSMSKGNQK--QSDPELLTRORLEDELKERGLESENROLREOAGFLSDDEE-
*****

PpKinesinARK-a 787 HSRRIMANGG--SGRSSLGSESPLISISKPNHMRDTINGORATIAKLFEQVGLHKLILSLESEDVVDVRVHAVKVVANLAAEEANQEKIVE
PpKinesinARK-b 772 HSRRIMNNGG--SGRSSLGSESPLISISKPNHMRDTINGORATIAKLFEQVGLHKLILSLESEDVVDVRVHAVKVVANLAAEEANQEKIVE
PpKinesinARK-c 751 HSRRIMTNGGMSGRSSVGSSESPLISMSKPSHMRDTINGORATIAKLFEQVGLHKLILSLESEDVVDVRVHAVKVVANLAAEEANQEKIVE
PpKinesinARK-d 721 QTRRMVDKGG--SGRSSVGSSESPLVGSANPDHMRDTINGORATIAKLFEQVGLHKLILSLESEDVVDVRVHAVKVVANLAAEESNQEKIVE
*****

PpKinesinARK-a 875 AGGLGSLMLLLOSSEDETIIRVAAGAVANLAMNETNOELIMSQGGIGLLARTADDAEDPQTLRMVAGAIANLGCNDKLQVKLREEGGIRA
PpKinesinARK-b 860 AGGLGSLMLLLOSSEDETIIRVAAGAVANLAMNETNOELIMSQGGIGLLARTADDAEDPQTLRMVAGAIANLGCNDKLQVKLREEGGIRA
PpKinesinARK-c 841 AGGLGSLMLLLOSSEDETIIRVAAGAVANLAMNETNOELIMSQGGIGLLARTADDAEDPQTLRMVAGAIANLGCNDKLQVKLREEGGIRA
PpKinesinARK-d 809 AGGLGSLMLLLOSSEDETIIRVAAGAVANLAMNETNOELIMSQGGIGLLARTADDAEDPQTLRMVAGAIANLGCNDKLQVKLREEGGIRA
*****

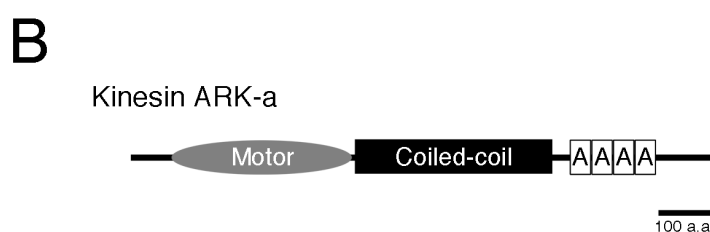
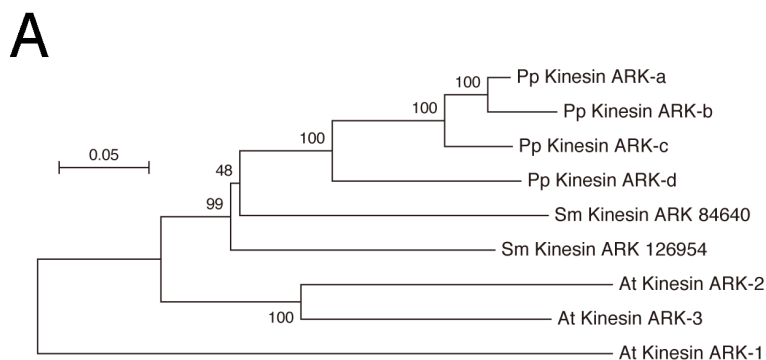
PpKinesinARK-a 965 LLGMVRSRHPDVLAQVARGIANFAKCESRGAAGQYKLGSRLLIDDGALPWIVANANNEASPIRRHIELALCHLAQHEVNAKDLVAGGALW
PpKinesinARK-b 950 LLGMVRSRHPDVLAQVARGIANFAKCESRGAAGQYKMGSRLLIDDGALPWIVANANNEASPIRRHIELALCHLAQHEVNAKDLVAGGALW
PpKinesinARK-c 931 LLGMVRSRHPDVLAQVARGIANFAKCESRGAAGQYKLGSRLLIDDGALPWIVANANNEASPIRRHIELALCHLAQHEVNAKDLVAGGALW
PpKinesinARK-d 899 LLGMVRSRHPDVLAQVARGIANFAKCESRGAAGQYKSGRSLLIDDGALPWIVANANNASPIRRHIELALCHLAQHEVNAKDLVAGGALW
*****

PpKinesinARK-a 1055 ELVRSRECSREDIRNLAQRTLNASGTFQVELRRLHLVY
PpKinesinARK-b 1040 ELVRSRECSREDIRNLAQRTLNASGTFQVELRRLHLVY
PpKinesinARK-c 1021 ELVRSRECSREDIRNLAQRTLNASGTFQVELRRLHLVY
PpKinesinARK-d 989 ELVRSRECSREDIRNLAQRTLNASGTFQSELRRLHLVY
*****

```

図 20 ヒメツリガネゴケがもつ 4 つの kinesin-ARK のアミノ酸配列のアライメント  
Clustal Omega (EMBL) によって決定した。

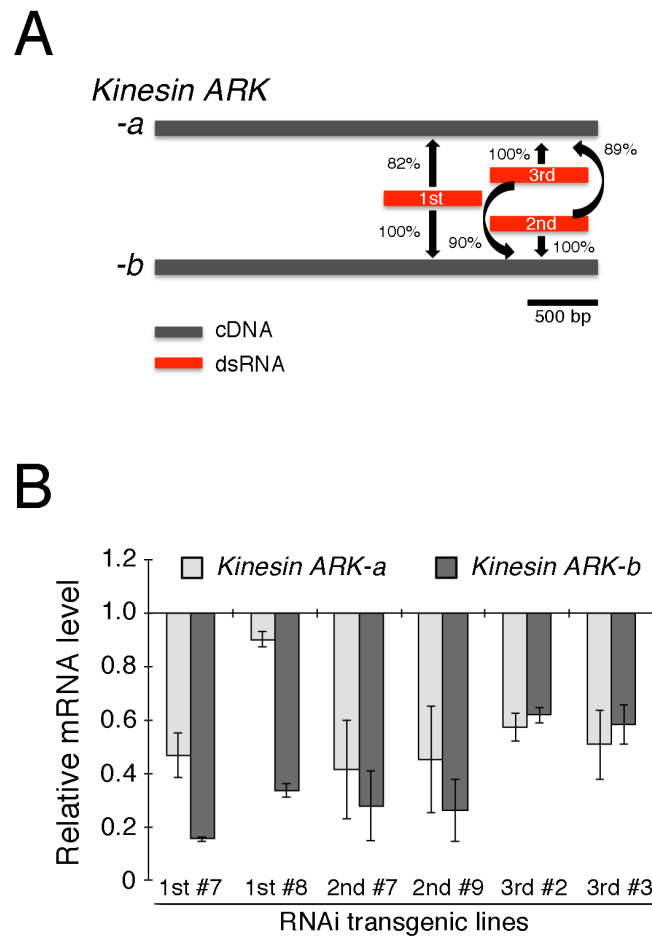




**図 21 Kinesin-ARK (armadillo repeat-containing kinesins) ファミリー**

(A) ヒメツリガネゴケ (Pp)、シロイヌナズナ (At)、イヌカタヒバ (Sm) での kinesin-ARK ファミリーの系統樹解析。分岐にある値はローカルブートストラップ確率である。ブートストラップ確率は 1000 回の繰り返し計算により求めた値を示してある。枝の横の長さは推定される進化的距離の相対的な長さである。イヌカタヒバの kinesin-ARK は Phytozome database の accession 番号に基づく暫定的な名前である。下のバーは座位当たりの置換数を示す。ヒメツリガネゴケにはもうひとつの kinesin-ARK 様の kinesin が存在するが (Shen et al., 2012)、モータードメインしか同定されていないため、この解析では除いた。

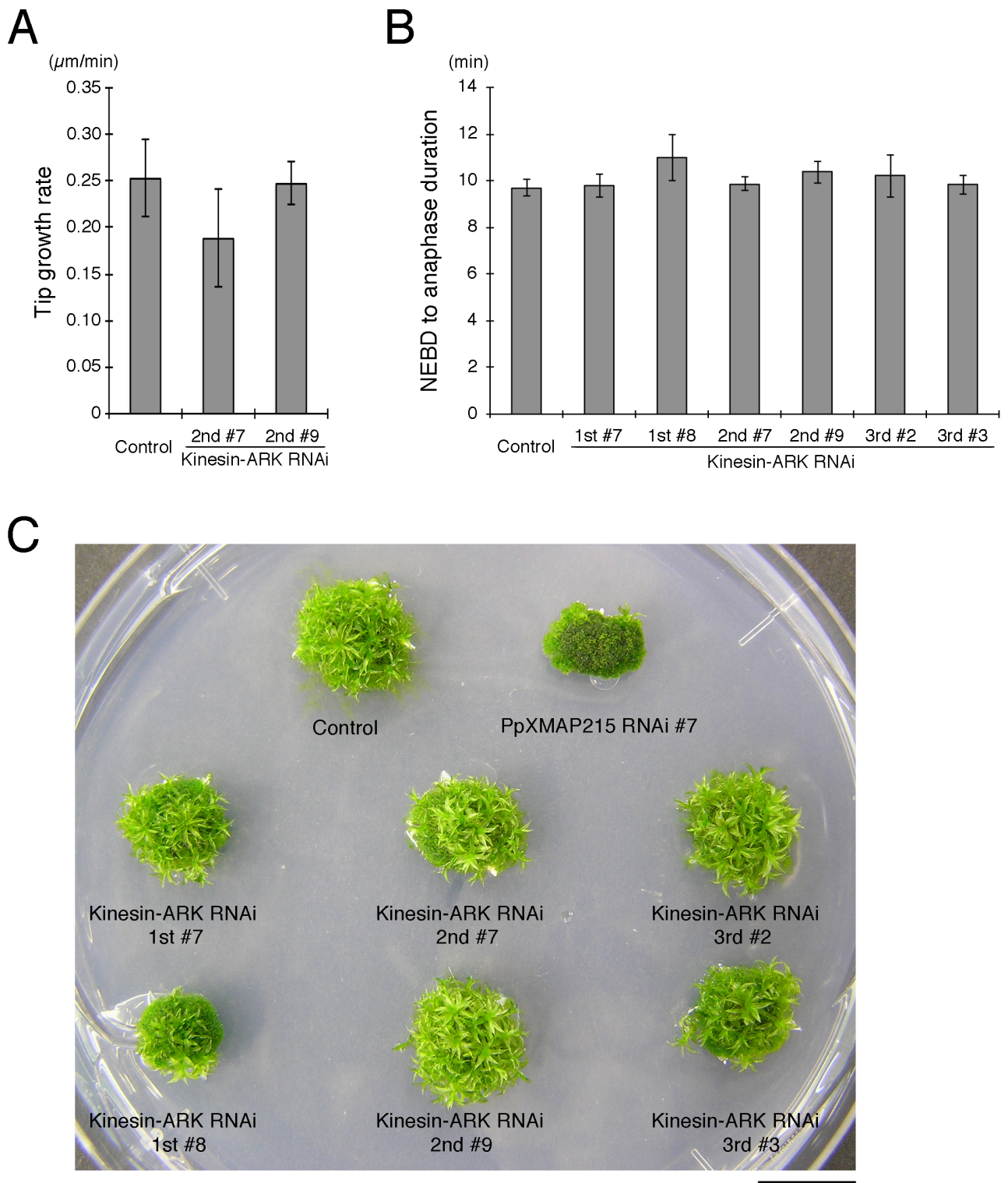
(B) Kinesin-ARK の構造の模式図。モータードメイン、コイルドコイル、アルマジロリピート ('A' と表記) を有する。これらのドメインは SMART ソフトウェア (EMBL) によって決定した。



**図 22 Kinesin-ARK RNAi ノックダウンの確認**

(A) *Kinesin-ARK* の RNAi ノックダウンに 3 つの RNAi コンストラクトを使用した。灰色のバーは cDNA、赤色のバーは dsRNA を示す。値 (%) は配列の相同性を示す。

(B) 定量的 RT-PCR による *kinesin ARK-a* と *-b* のノックダウンの確認。コントロールを 1.0 とした時の相対値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。2 回の独立の実験による結果を示す。



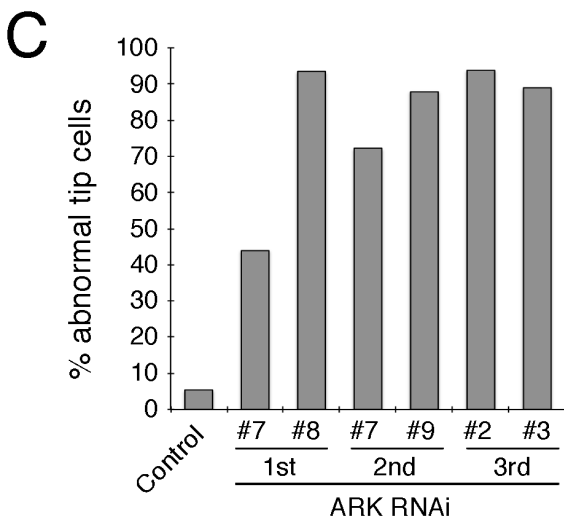
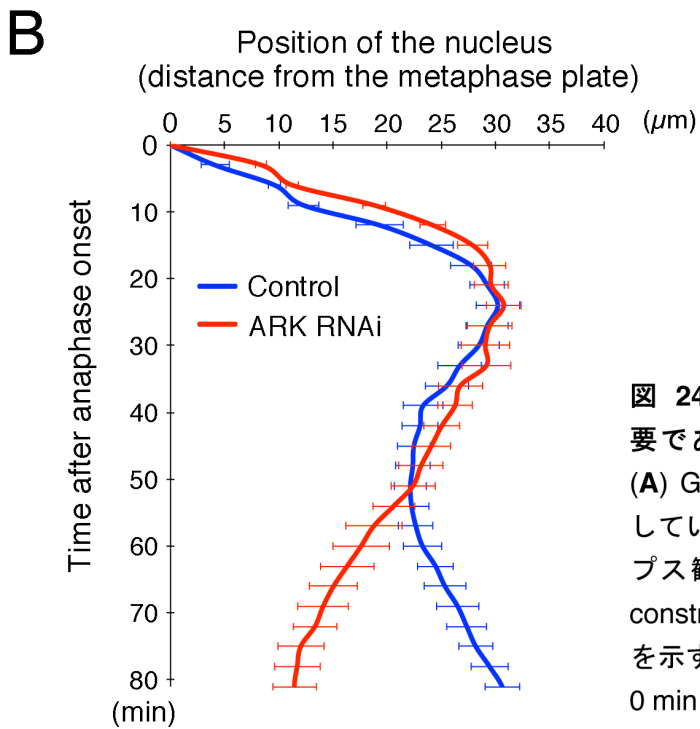
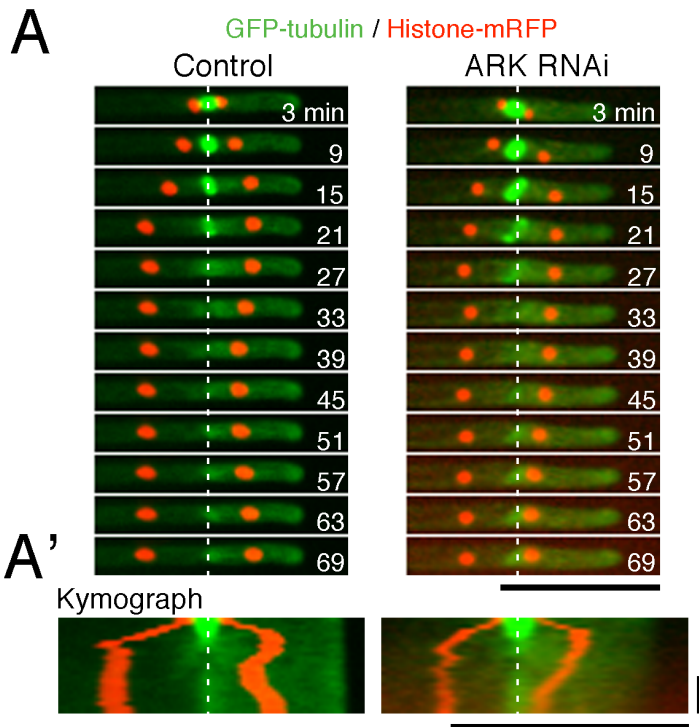
**図 23 Kinesin-ARK RNAi ノックダウンは先端成長、細胞分裂、コロニーの形態に影響を与えない**

(A) タイムラプス観察からカウロネマ細胞の先端成長の速度を測定した。3-7 回の独立の実験からの平均値を標準誤差とともに示す。RNAi 処理細胞での明らかな違いは見られなかった (line #7,  $p = 0.40$ ; line #9,  $p = 0.93$  (t-test))。

(B) 核膜崩壊から分裂後期までの時間に関して明らかな違いは認められなかった (平均値  $\pm$  標準誤差; コントロール,  $n = 52$ ; RNAi 1st construct line #7,  $n = 19$ ,  $p = 0.88$  (t-test); line #8,  $n = 9$ ,  $p = 0.16$ ; 2nd construct line #7,  $n = 31$ ,  $p = 0.72$ ; line #9,  $n = 33$ ,  $p = 0.25$ ; 3rd construct line #2,  $n = 10$ ,  $p = 0.57$ ; line #3,  $n = 18$ ,  $p = 0.83$ )。

(C)  $1 \mu\text{M}$  のエストラジオール入りの BCDAT 培地で 3 週間培養したコロニーを示す。劇的な先端成長の表現型を示す PpXMAP215 RNAi line をポジティブコントロールとして用いた (Nakaoka et al., 2012)。スケールバーは 1 cm。



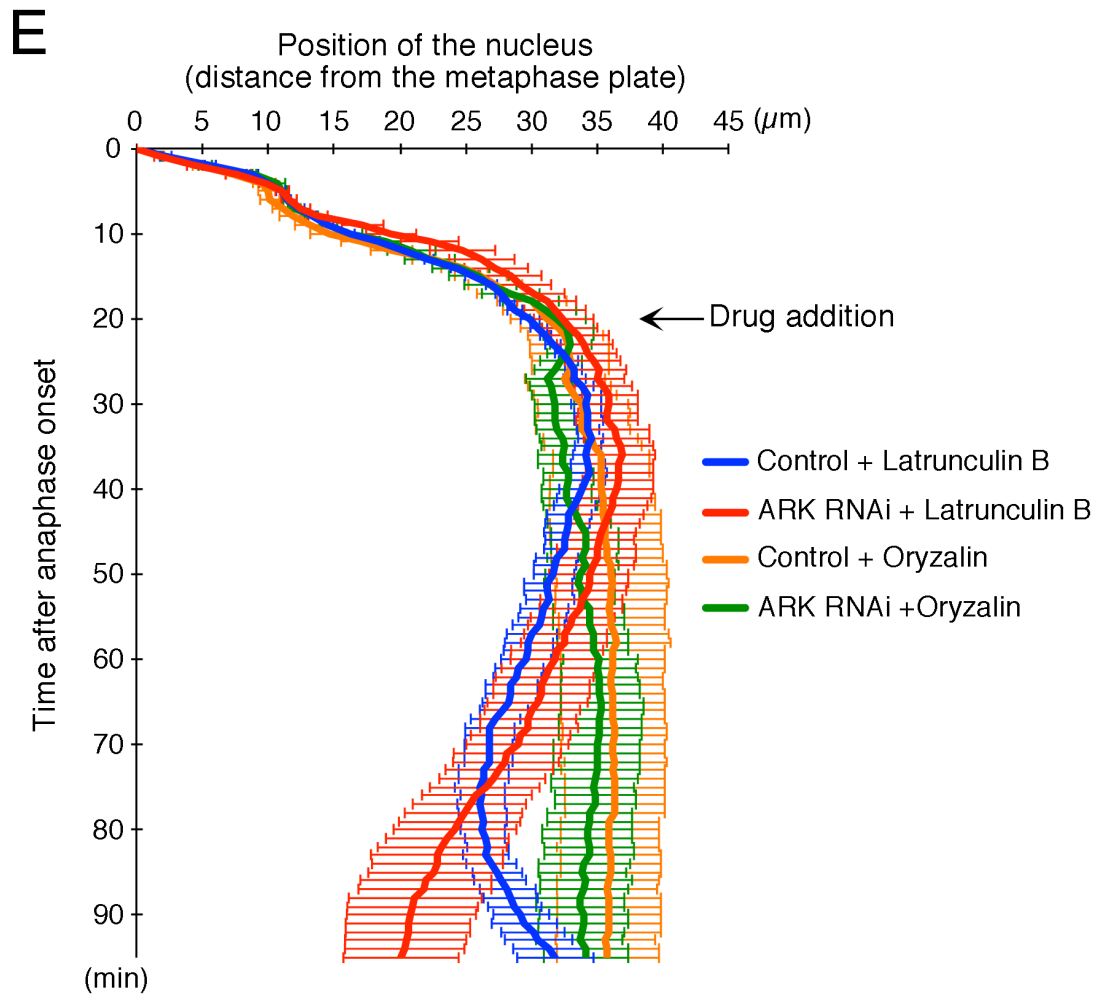
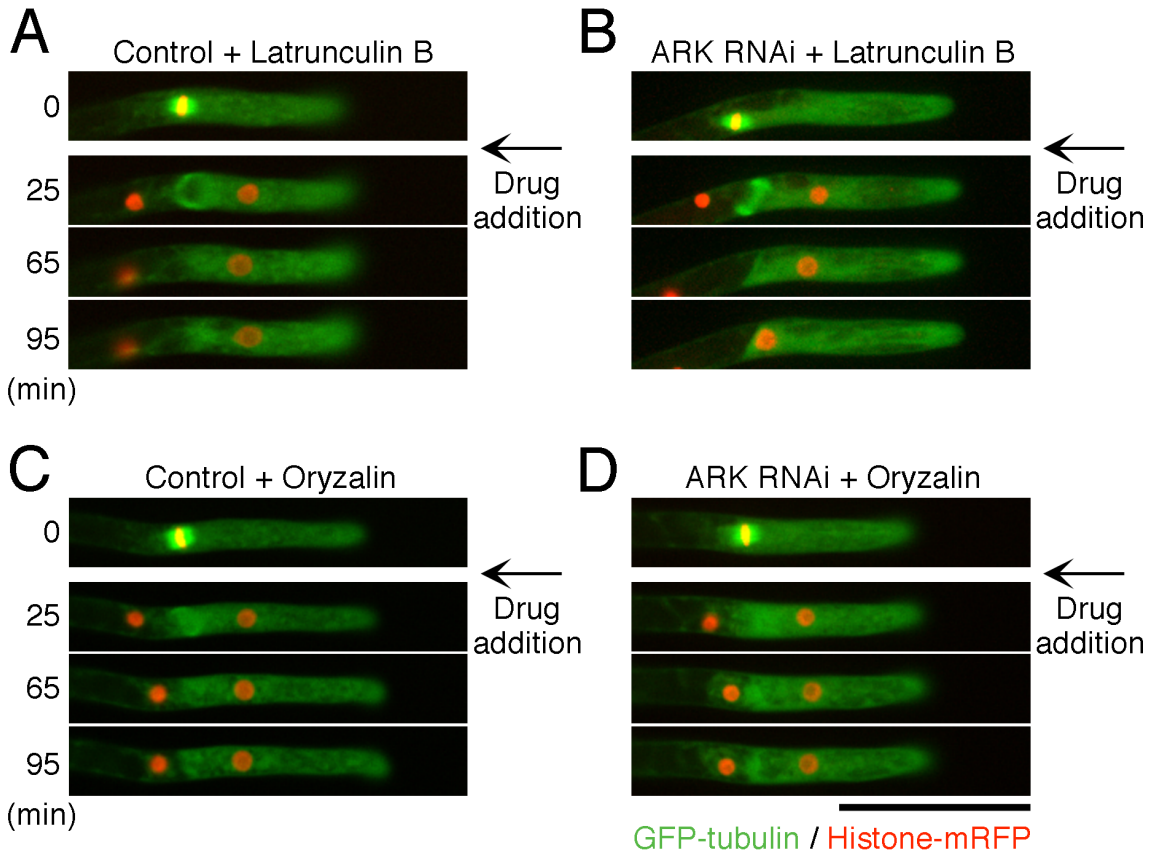


**図 24 Kinesin-ARK は細胞分裂直後の核の配置に必要である**

(A) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を発現している細胞の wide-field 型蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察。コントロールと kinesin-ARK RNAi 株 (1st construct line #7) の代表的な画像とそのキモグラフ (A') を示す。画像は3分ごとに撮影した。染色体分離開始時を 0 min とした。横のスケールバーは 100  $\mu$ m; 縦のスケールバーは 30 分。

(B) コントロールと RNAi 株での頂端細胞での分裂直後の核の動き (それぞれ  $n=5$ 、平均  $\pm$  標準誤差)。20-40 分での核が分裂面に動く動きは図 7 のコントロールの動きと少し異なるが、これは観察条件の違いであると考えられる (材料と方法)。

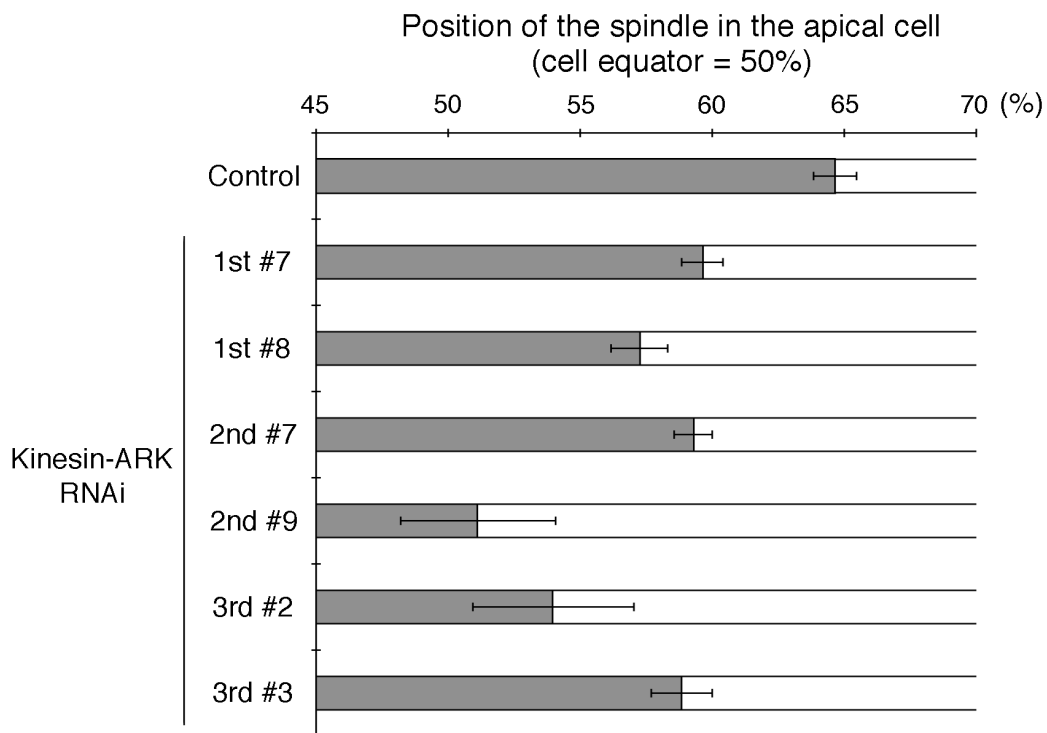
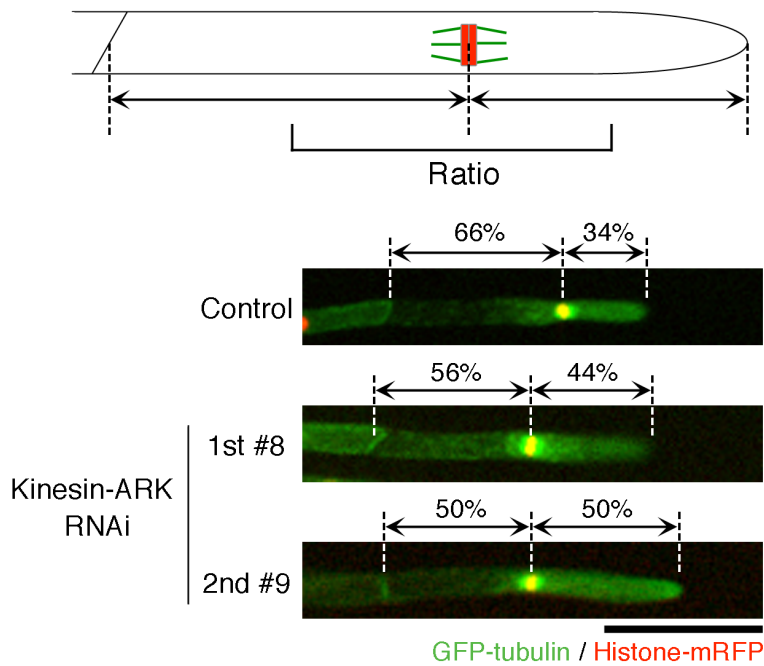
(C) Kinesin-ARK RNAi ノックダウンによる核の配置異常の頻度 (コントロール,  $n=75$ ; RNAi 1st construct line #7,  $n=25$ ; line #8,  $n=15$ ; 2nd construct line #7,  $n=43$ ; line #9,  $n=33$ ; 3rd construct line #2,  $n=16$ ; line #3,  $n=27$ )。分裂した細胞のうち、頂端側の核が分裂面に戻る頻度を測定した。



**図 25 Kinesin-ARK 非存在下での分裂面に戻る核の動きは actin 依存的ではなく、微小管依存的である**

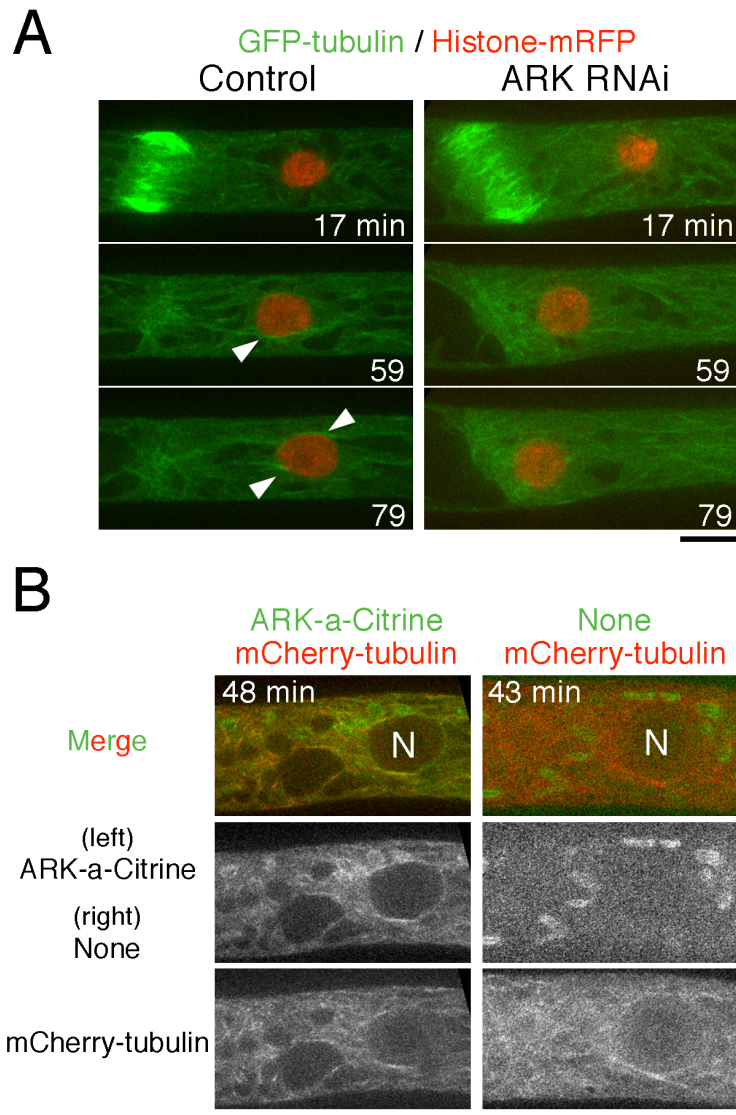
**(A-D)** GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の wide-field 型蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察。Actin 重合阻害剤ラトランキュリン B (25  $\mu$ M)、微小管脱重合薬剤オリザリン (10  $\mu$ M) は染色体分離後 20-21 min で加えた。画像は 1 分ごとに撮影した。スケールバーは 100  $\mu$ m。

**(E)** 薬剤添加前後の頂端細胞の核の位置を示す。分裂中期板からの距離を平均  $\pm$  標準誤差で示す。染色体分離開始時を 0 min とした。すべての RNAi ラインで同様の動きをしたため、RNAi ラインでの結果はひとつにまとめた。コントロール + ラトランキュリン B, n = 5; kinesin-ARK RNAi + ラトランキュリン B, n = 6 (2nd construct line #7, n = 3; line #9, n = 2; 3rd construct line #2, n = 1); コントロール + オリザリン, n = 4; kinesin-ARK RNAi + オリザリン, n = 4 (2nd construct line #7, n = 1; line #9, n = 3)。



**図 26 Kinesin-ARK RNAi によるスピンドル位置の異常**

頂端細胞での分裂中期スピンドルの相対的な位置の測定。コントロールと kinesin-ARK RNAi 株 (1st construct line #8 と 2nd construct line #9) の代表的な画像を示す。定量した結果を平均  $\pm$  標準誤差で示す (コントロール,  $n = 29$ ; kinesin-ARK RNAi 1st construct line #7,  $n = 11$ ; line #8,  $n = 4$ , 2nd construct line #7,  $n = 14$ ; line #9,  $n = 15$ ; 3rd construct line #2,  $n = 5$ ; line #3,  $n = 10$ )。RNAi 処理細胞での明らかな違いが認められた (1st construct line #7,  $p = 0.001$ ; line #8,  $p = 0.003$ , 2nd construct line #7,  $p = 0.0002$ ; line #9,  $p < 0.0001$ , 3rd construct line #2,  $p < 0.0001$ ; line #3,  $p = 0.0007$  (t-test))。スケールバーは  $100 \mu\text{m}$ 。



**図 27 Kinesin-ARK は微小管上と移動中の核の周りに局在する**

(A) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の spinning-disc 型共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス観察。コントロールと kinesin-ARK RNAi 株 (2nd construct line #9) の代表的な画像を示す。矢尻は核の周りの束化した微小管を示す。画像は 1 分ごとに撮影した。スケールバーは 10  $\mu$ m。

(B) 分裂直後には、kinesin ARK-a-Citrine (緑) は微小管 (赤) 上にある。(左) Kinesin ARK-a-Citrine と mCherry- $\alpha$ -tubulin を発現している細胞。(右) mCherry- $\alpha$ -tubulin のみを発現している親株。画像は 1 分ごとに撮影した。染色体分離開始時を 0 min とした。'N' は核を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

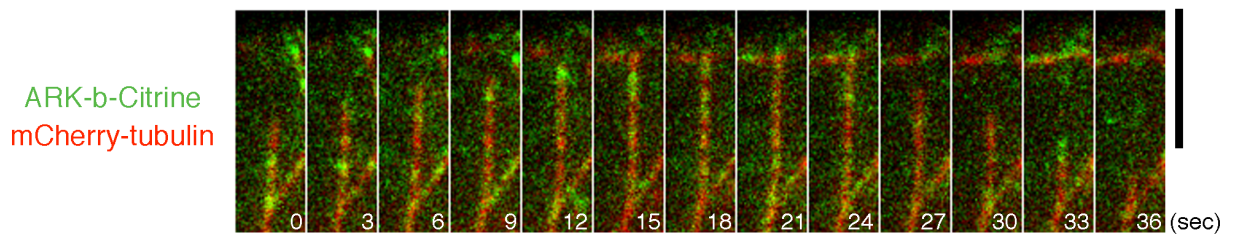
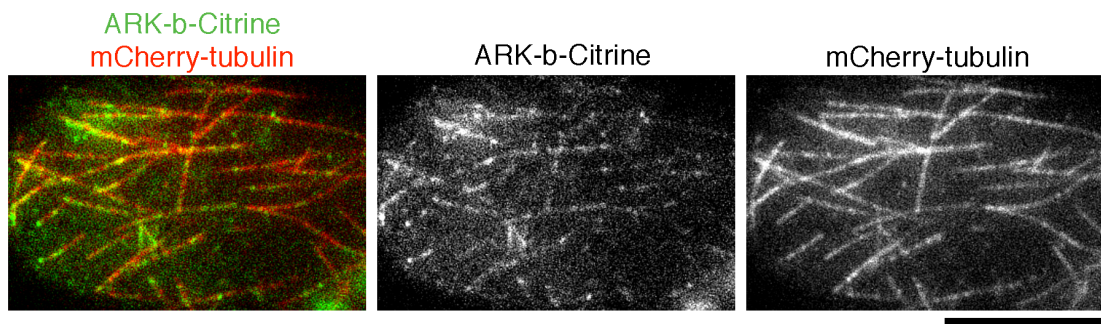
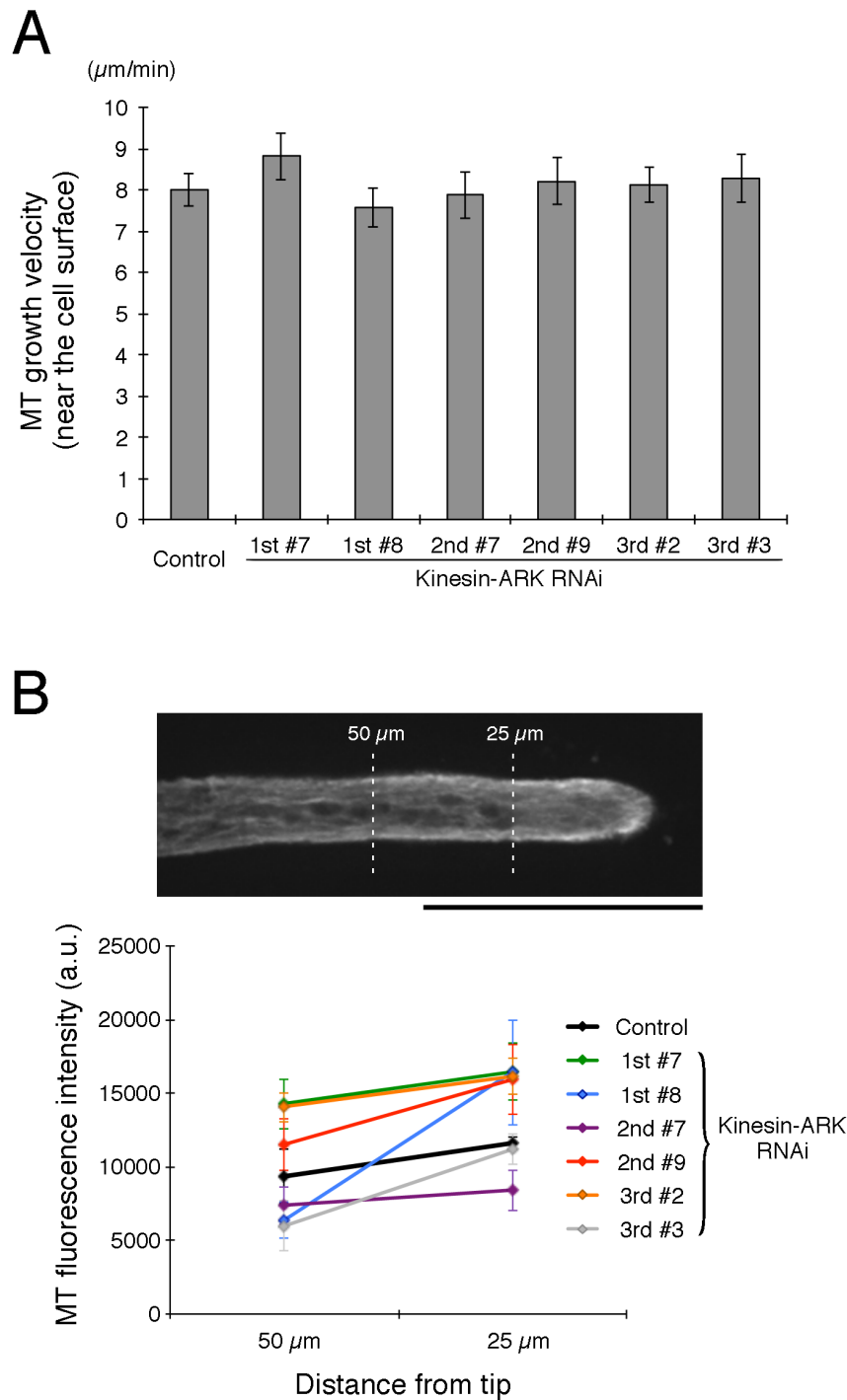


図 28 微小管が伸長、短縮する間の kinesin-ARK-Citrine の局在  
 Kinesin ARK-b-Citrine が微小管上に局在する様子を斜光照明顕微鏡 (oblique illumination fluorescence microscopy) を用いて撮影した。スケールバーは  $10\ \mu\text{m}$  (上) と  $5\ \mu\text{m}$  (下)。

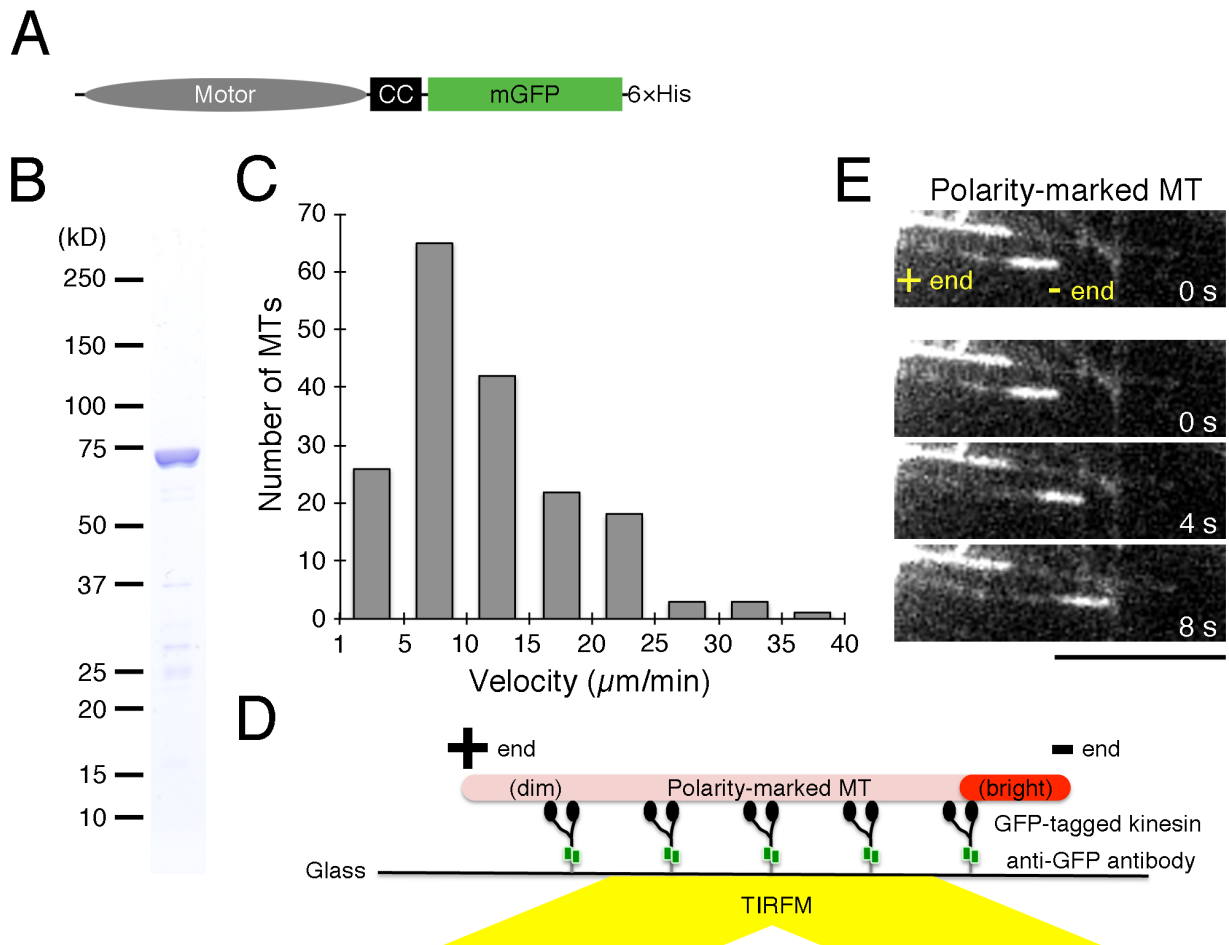




**図 29 Kinesin-ARK RNAi ノックダウンは細胞質中の微小管の量と伸長速度に影響を与えない**

(A) 細胞表層付近の微小管の伸長速度の測定。GFP- $\alpha$ -tubulin を 3 秒ごとに spinning-disc 型共焦点顕微鏡によりタイムラプス観察を行い、キモグラフにより解析した。平均  $\pm$  標準誤差をプロットした (それぞれのラインにおいて 5 細胞からそれぞれ 25 本の微小管を測定した)。伸長速度は kinesin-ARK RNAi によって変化しなかった (1st construct line #7,  $p = 0.24$ ; line #8,  $p = 0.49$ ; 2nd construct line #7,  $p = 0.85$ ; line #9,  $p = 0.76$ ; 3rd construct line #2,  $p = 0.83$ ; line #3,  $p = 0.69$  (t-test))

(B) 細胞質微小管の平均蛍光強度の測定。微小管は抗 tubulin 抗体により染色し、先端から 25  $\mu\text{m}$  と 50  $\mu\text{m}$  の位置を定量した。Spinning-disc 型共焦点顕微鏡により撮影したコントロールの代表的な画像を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。



**図 30 Kinesin-ARK はプラス方向に歩くモータータンパク質である**

(A) In vitro の実験に用いたコンストラクトの模式図。‘CC’ はコイルドコイルを示す。

(B) 精製した kinesin-ARK のクマシー染色図。このタンパク質はさらにタキソールで安定化した微小管を用いてアフィニティー精製を行った後、実験に用いた。

(C) ATP 存在下での MT gliding の速度の定量。静止したままの微小管は解析から除いた。

(D) 極性を示す微小管を使った MT-gliding assay の模式図。微小管の極性は蛍光ラベルの強度の違いにより分けられ、明るい方がマイナス端側である。

(E) 極性を示す微小管を使った MT-gliding assay。微小管はマイナス方向に動いているため、kinesin ARK-a はプラス端方向へ向かうモーターであることがわかる。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$ 。



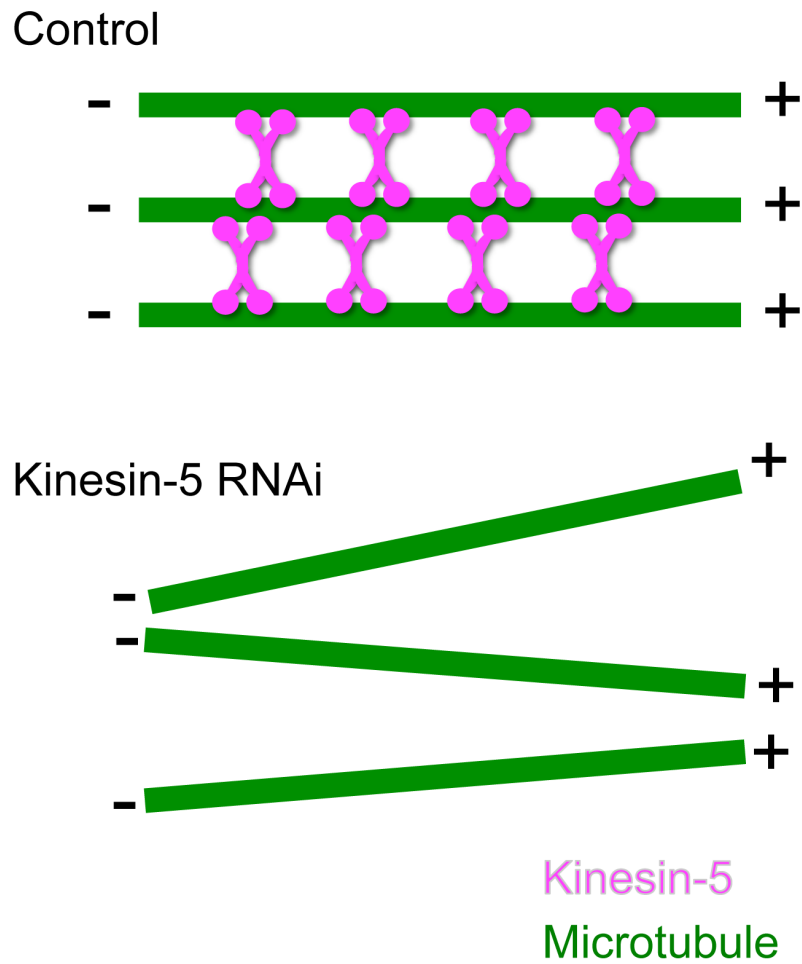


図 31 本研究から推測された kinesin-5 の役割

スピンドル、フラグモプラスト上の kinesin-5 は反平行ではなく、平行な微小管同士を束ねる役割を果たすと推測される。+、-は微小管のプラス端、マイナス端をそれぞれ示す。

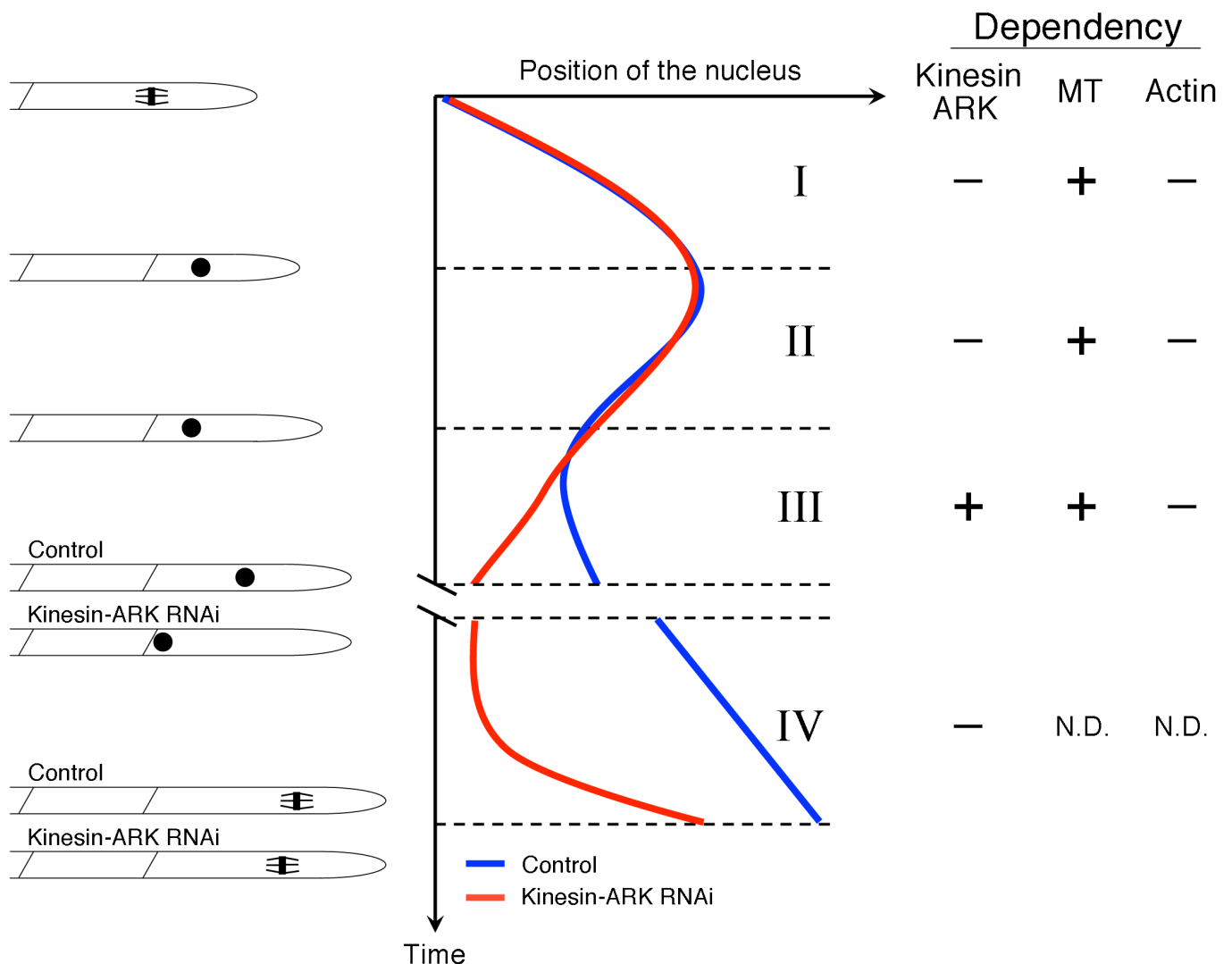
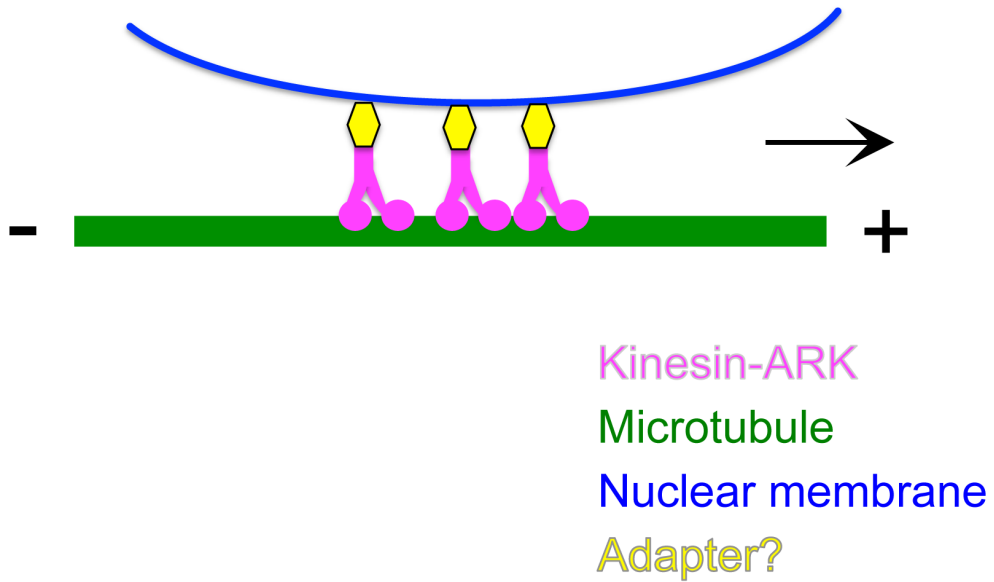


図 32 ヒメツリガネゴケの頂端カウロネマ細胞の核の動き

コントロールと kinesin-ARK RNAi の頂端細胞での核およびスピンドルの配置を示す概略図。細胞分裂後、頂端細胞の娘核はまず微小管依存的に細胞の中央に向かって動く (phase I)。この動きには kinesin-ARK と actin を必要としない。しばらくして、頂端細胞の核は分裂面へと動くが、これは微小管依存的であり、kinesin-ARK も actin も必要としない (phase II)。分裂面に達する前に、頂端細胞の核は再び先端方向へと動く。この動きは微小管および kinesin-ARK 依存的であり、actin 依存的ではない (phase III)。その後、細胞が先端成長する間、頂端細胞の核は細胞の中央付近にとどまる (phase IV)。Kinesin-ARK RNAi では phase III の動きは観察されず、頂端細胞の核は分裂面に達したまま数時間とどまる。次の分裂期が始まる際に核は急速に細胞の中央に向かって動く。しかし、この動きでは核の位置は完全には元の状態には戻らず、kinesin-ARK RNAi 細胞の分裂期スピンドルはコントロールに比べて分裂面側にずれて位置する (phase IV)。「ND」は未決定を表す。



**図 33** 本研究から推測された kinesin-ARK の役割

細胞分裂直後において kinesin-ARK はまだ同定されていないアダプタータンパク質を介して核膜と結びつき、微小管のプラス方向へと核を移動させると推測される。矢印は核の動く方向を示し、+、-は微小管のプラス端、マイナス端をそれぞれ示す。

表 1 ヒメツリガネゴケの kinesin superfamily

Subfamily	<i>Physcomitrella patens</i>		Homologues in other species (selected)
	Gene name (accession number/Phypa_#)		
Kinesin-1	-		HsKIF5, DmKHC
Kinesin-2	2	(425592)	HsKIF17
Kinesin-3	-		HsKIF1A, CeUNC-104
Kinesin-4	4-1a	(437833)	AtFRA1, HsKIF4, DmKlp3A
	4-1b	(438737)	
	4-1c	(432365)	
	4-1d	(453193)	
	4-1e	(441211)	
	4-2a	(447296)	
	4-2b	(433281)	
Kinesin-5	4-2c	(446183)	AtKRP125c, HsEg5, DmKlp61F, AnBimC, ScCin8, SpCut7
	5-a	(457162)	
	5-b	(447260)	
	5-c	(425536)	
Kinesin-6	5-d	(423604)	HsMKLP1
	-		
Kinesin-7	7-1a	(447411)	AtNACK1/AtHIK, HsCENP-E
	7-1b	(437231)	
	7-2a	(458197)	
	7-2b	(432536)	
	7-2c	(454208)	
	7-3	(426030)	
Kinesin-8	7-4	(452429)	HsKIF18, MmKIF19, DmKlp67A, ScKip3, SpKlp5/6
	8-1a	(453903)	
	8-1b	(424121)	
Kinesin-9	8-2	(458481)	HsKIF9
	9-1a	(458410)	
Kinesin-10	9-1b	(425498)	HsKid, DmNod
	9-1c	(428375)	
Kinesin-11	-		HsKIF26A
Kinesin-12	12-1a	(444072)	AtPOK1, AtPAKRP1, HsKIF15/HsXklp2
	12-1b	(440218)	
	12-1c	(442090)	
	12-1d	(437562)	
	12-1e	(434464)	
	12-1f	(432190)	
	12-1g	(432169)	
	12-1h	(454564)	
	12-1i	(432906)	
	12-1j	(445541)	
	12-1k	(422406)	
	12-1l	(431567)	
	12-1m	(453302)	
	12-1n	(426336)	
	12-1o	(437642)	
	12-1p	(455320)	
	12-2a	(422514)	
	12-2b	(422285)	
	12-2c	(440124)	
12-2d	(428714)		
Kinesin-13	13-1a	(427794)	AtKinesin13A, HsMCAK, HsKIF2A, DmKlp10A
	13-1b	(438664)	
	13-1c	(456175)	

	14-1a	(439730)	
	14-1b	(438782)	
	14-2a	(430601)	
	14-2b	(439319)	
	14-2c	(436987)	
	14-2d	(441550)	
Kinesin-14	14-3a	(459874)	AtATK1, AtATK5, AtKAC1/AtKCA1, AtKCBP, HsHSET, DmNcd
	14-3b	(424496)	
	14-4	(435249)	
	14-5a / KAC1	(437825)	
	14-5b / KAC2	(435597)	
	14-6a	(439249)	
	14-6b	(450599)	
	14-6c	(428061)	
	14-6d	(458819)	
	ARK-a	(455498)	
Kinesin-ARK	ARK-b	(453488)	AtARK1
	ARK-c	(425827)	
	ARK-d	(427907)	
	ARK-like	(446331)	
	Orph-1a	(457477)	
	Orph-1b	(453299)	
	Orph-2a / KINID1b	(436446)	
Orphan Kinesin	Orph-2b / KINID1a	(430757)	
	Orph-3	(441202)	
	Orph-4a	(431083)	
	Orph-4b	(451243)	
	Orph-4c	(437822)	
	Orph-4d	(453297)	

用いた略語を次に示す。An (*Aspergillus nidulans*、糸状菌)、At (*Arabidopsis thaliana*、シロイヌナズナ)、Ce (*Caenorhabditis elegans*、線虫)、Dm (*Drosophila melanogaster*、ショウジョウバエ)、Hs (*Homo sapiens*、ヒト)、Mm (*Mus musculus*、マウス)、Sc (*Saccharomyces cerevisiae*、出芽酵母)、Sp (*Schizosaccharomyces pombe*、分裂酵母)。

表 2 ヒメツリガネゴケとシロイヌナズナの kinesin 遺伝子数の比較

Subfamily	<i>P. patens</i>	<i>A. thaliana</i>
Kinesin-1	-	1
Kinesin-2	1	-
Kinesin-3	-	-
Kinesin-4	8	3
Kinesin-5	4	4
Kinesin-6	-	1
Kinesin-7	7	15
Kinesin-8	3	2
Kinesin-9	3	-
Kinesin-10	-	3
Kinesin-11	-	-
Kinesin-12	20	6
Kinesin-13	3	2
Kinesin-14	15	21
Kinesin-ARK	5	3
Orphan Kinesin	9	-
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>61</b>

表 3 細胞分裂期での kinesin の局在のまとめ

Phase	Location	Kinesin	Total
Prophase	Nucleus	4-Ic, 12-IIId, 14-Ia, b, Orph-IIa, b	6
	Nucleolus	4-Ic, 12-If, g	3
	Kinetochores	7-III	1
	MTs	5-a, b, c, d, ARK-a, b	6
Prometaphase	Chromosome	4-Ic, 12-If, g	3
	Kinetochores	7-III	1
	MTs (midzone)	8-II, 12-Ie, h, i, 13-b, c, 14-Ia, b, 14-IIa, c, 14-IIIa, b ARK-a, b, d, Orph-IIa, b	17
	MTs (intra-spindle)	5-a, b, c, d, 7-IV, 14-Ia, b, 14-IIa, c, ARK-a, b, d	12
	MTs (polar region)	5-a, b, c, d, 7-IV 12-Ib, 14-IIa, c, ARK-a, b, d	11
	Chromosome	4-Ic, 12-If, g	3
	Kinetochores	7-III	1
	MTs (midzone)	7-IIa, b, c, 8-II, 12-Ie, h, i 13-a, b, c, 14-Ia, b, 14-IIIa, b, Orph-IIa, b	16
Metaphase	MTs (intra-spindle)	5-a, b, c, d, 7-IV, 13-a, b, c 14-Ia, b, 14-IIa, c, 14-IIIa, b, ARK-a, b, d	17
	MTs (polar region)	5-a, b, c, d, 7-IV, 12-Ib 13-a, b, c, 14-IIa, c, ARK-a, b, d	14
	Chromosome	4-Ic	1
	Kinetochores	7-III	1
Anaphase	MTs (midzone)	4-Ic, 7-IIa, b, c, 7-IV, 8-Ia, b, 8-II, 12-Id, e, f, g, h, i, k, o, p 12-IIc, 13-a, b, c, 14-Ia, b, 14-IIIa, b, ARK-a, b, d, Orph-IIa, b	30
	MTs (intra-spindle)	5-a, b, c, d, 7-IV, 12-IIc, 13-a, b, c 14-Ia, b, 14-IIIa, b, ARK-a, b, d	16



	MTs (polar region)	5-a, b, c, d, 7-IV, 12-Ia, b, 12-IIc, 13-a, b, c 14-Ia, b, 14-IIa, c, 14-IIIb, ARK-a, b, d	19
	Phragmoplast equator	4-Ia, c, 7-IIa, b, c, 8-Ia, b, 8-II, 12-Ib, e, k, f, g, h, i, o, p 12-IIa, c, d, 13-a, b, c, Orph-IIa, b, Orph-IVc	26
Cytokinesis	MTs (intra-phragmoplast)	5-a, b, c, d, 7-IV, 13-a, b, c 14-Ia, b, 14-IIIa, b, ARK-a, b, d	15
	MTs (polar region)	5-a, b, c, d, 7-IV, 13-a, b, c 14-Ia, b, 14-IIa, c, 14-IIIb, ARK-a, b, d	16
	Phragmoplast edge	12-Ia, d, e	3

細胞分裂期それぞれの時期での kinesin の局在を表にまとめた。一番右の段はその時期と場所で検出された kinesin の数を表す。

表4 Kinesin-Citrineコンストラクトに用いたPCR primerの配列

Kinesin name	Accession number (Phyph. #)	Kinesin's C-terminus forward primer (5'→3')	Kinesin's C-terminus reverse primer (5'→3')	Kinesin's 3'-UTR forward primer (5'→3')	Kinesin's 3'-UTR reverse primer (5'→3')	Locus name	Plasmid
2	425592	AAAggtaaccGTTTCTCTGTGATATGATG	AAAtaegatTCGTGCGGTGGCGGGCCGCTGG	AAAggtaaccTAGCCACCCCATTTTTTAACTG	AAAactagaCAGTATGACCAACCACTCC	Pp1s13_115V6	pTM354
4-1a	437833	AAAggtaaccATTCTCTATGTGCGAGATGGCTC	AAAactegagCCCGCCGTAAAGTGGAAAGCAATG	AAAactagfTAAGCTGGATTCGGAATCTGG	AAAaceggggCGCTGCTCCAGACCAATGTGAC	Pp1s74_30V6	pTM374
4-1b	438737	AAAggtaaccCCAATGCTAGCCACTGTTCAAGC	AAAaggcccCAATCTTCGCGAGTTCATTCG	AAAaggcccGATTCGCGAGTTCATTCG	AAAagaccGATTCGCAAAATTCGATATGATG	Pp1s80_21V6	pTM377
4-1c	432365	AAAggtaaccCTGTGCGATCAATCATATGGTG	AAAactegagCAGTCTTCGCGAATTTGTCGG	AAAactegagCAGTCTTCGCGAATTTGTCGG	AAAaceggggGAAATTCCTTAAAAGGTGACG	Pp1s42_71V6	pTM365
4-1d	453193	AAAggtaaccTGTGGTATATGTTTCAAGTG	AAAaggtaccAAACGAAATTAAGGCTCAACAG	AAAaggtaccGATTCGATCAGTCAAGAGAG	AAAactagGGATTCCTTTTGTGCAAGATTC	Pp1s237_18V6	pTM391
4-1e	441211	AAAggtaaccGATGGAGATGGCAAGCGGAAG	AAAactegagCTGAAATTAAGAGAGGTTTG	AAAaggtaccCGCAGTATTTGGAAAGTGG	AAAactagGTACACCCCAAAGACATTCG	Pp1s98_189V6	pTM383
4-2a	447296	AAAggtaaccCTGAGAAAGGAGGCTTTGGTGC	AAAactegagACTGCTATGTTGGTCTCATGTC	AAAaggtaccGGCGCATGACAACTCAITG	AAAactagaGCACTATAATTTTCAATTTGTC	Pp1s158_177V6	pTM387
4-2b	433281	AAAggtaaccCAAAAGACAGAAAGGATGC	AAAactegagATTATCATCTGTCTCATGTC	AAAaggtaccGACGGCATGACAACTAATTAAC	AAAactagaGCACTAATCTATCTCCGGCAAGG	Pp1s47_261V6	pTM367
4-2c	446183	CGTTGctegagACCTGACAAAGCAAG	AAAaggtaccCAAGCCATAAGCCACTTTGTAAGG	AAAaggtaccCGTTTCCCAAGCATATATGG	AAAactagaCAAGGCAAGAGTGGAAACAAG	Pp1s146_76V6	pTM293
5-a	457162	AAactegagCTCAGGTCAGTATTTACTTTCTC	AAggtaccATTGATGATGGTGAAGGGGAGTTCG	AAggtaccTCCGCAATTAGTAGGACCAAGTGG	AAactagaCAACACCTTCAGAGCGTTAGCAGAGA	Pp1s315_14V6	pTM196
5-b	447260	AAggtaccGTGTGCTGTCTATTCAGCACCC	AAactegagATTGATGGTGTGTAAGCGGTGTTCC	AAAacegggTCAAGCAITGGTAGCCACGTTGGGAAAG	AAaceggggGACCATCCCAAGTCTTTTGAC	Pp1s158_7V6	pTM195
5-c	425536	AAggtaccGTTCCGATCACTATCCACACTTCC	AAactegagTGTGATGGTGGTAGGGGAGTGG	AAggtaccGCCTCTTCCAGAGCTCTATTC	AAactagaCAATATAATCCCTGTAAATGTTTCTC	Pp1s13_177V6	pTM194
5-d	423604	AAggtaccGTTTACATGATCCGACCACTTCTC	AAggtaccGTTAATGTTGGTAGGGGCGCTC	AAAacegggGCCACTCTGGCAGACCCTGTG	AAggtaccGGAAGTATTTATATTAATCTACATGTGG	Pp1s6_143V6	pTM193
7-1a	447411	AAAggtaaccGCAAACTCCCTATTTCAAGTCATG	AAAaagctGGTCAACAATTTGGCTGATGATC	AAAaggtaccGAACTATTCAGGCAAGCCCTTGG	AAAaceggggGATGGGTAAAGACTAATCTTGG	Pp1s160_43V6	pTM388
7-1b	437231	AAAggtaaccCAAGCGGAGTGTGTAATAACTC	AAAaagctGTGCTTGTGATGAGGAGGTAC	AAAaggtaccCGTAAATGATCAATCAITGGAAATAAG	AAAactagaCTTGTGTGGAACTCTCTTTACCAAAACC	Pp1s70_159V6	pTM372
7-2a	458197	AAAggtaaccGAAAGCTACTTGTCTGTCAAG	AAAactegagGAAATGAGAGAGCTGATAAAC	AAAaggtaccCACTGGGAAAAAAAMTTCAAGTGG	AAAaceggggGAGGTGCTAGAAAACCCCTCATCC	Pp1s343_28V6	pTM398
7-2b	432536	AAAggtaaccCAAGTACAGAGTGGTTC	AAAaagctAAAAGTTAAGCAGAGCTGACAGAC	AAAactagaCACTGGCGGCAACCTTGGAGCTC	AAAaceggggGTATTAAGGAAATCTGTAAGG	Pp1s43_22V6	pTM366
7-2c	454208	AAAggtaaccGGTGTGATGACCGTCCGGTACTG	AAAactegagCTTGGGTGACACCTGAAACGACTGC	AAAaggtaccTAGCTATGTAAGCTTGGCAGTAGAG	AAAactagaCACTGATAATGGAATCAAGCAGAG	Pp1s255_53V6	pTM394
7-3	426030	AAAggtaaccCATATACAGCCATATAACAATG	AAAaggtaccCAAAATTCCTTCTTCTCAAACTC	AAAaggtaccATCCACTTCTCACATAAACTG	AAAacegggCTTCTCTAAAAGACTAGTAGTC	Pp1s14_442V6	pTM356
7-4	452429	AAAggtaaccGTGAAATGAGCAATGTTTCAATCC	AAAactegagCCAGATAGTGTCTTCACTCTC	AAAaggtaccCTCAGAACTGGCACATGAACC	AAAactagaCTTATCTTCCCAACAAGCACTAC	Pp1s225_109V6	pTM390
8-1a	453903	AAggtaccATCATAGATATCTCTTCCAAAG	AAactegagTTTCCAAATCCACTACAGCTCTCG	AAggtaccCAGGGTATTCGTAICTTGG	AAAaceggggATTATATACCCAGAAAGACTGCTG	Pp1s249_44V6	pTM202
8-1b	424121	AAggtaccCAAAATGAGATGTCATCAGATC	AAaugctCTTCCAAATATAACTGCTCTTGG	AAactagaTAGACCTGTGCTTTTTCAGG	AAAaggtaccCGAAACCTGGCGTGGAGCTT	Pp1s7_82V6	pTM201
8-2	458481	AAAggtaaccGGTCAAGTGGGAGCCAGAG	AAactegagCCCCCGAGATTTGTCAGCC	AAactagfTGTCACTGTCAGTCAACCC	AAaceggggCAAACTTACATACTAAATCAAAACC	Pp1s353_36V6	pTM200
9-1c	428375	AAAggtaaccCTACTTGAACAACAATGGAGCC	AAactegagGTGGAGACTTTCTTGTGAGAAC	AAAaggtaccTTGTGCTTCTTAACCCAGTGGT	AAAaceggggCAAGAACTTAATCTGATGGGTG	Pp1s24_181V6	pTM361
12-1a	444072	GGgtaaccCTGATCATAGCATCGATCGGGTT	ACCGgtaaccTCTGGGTGTCACACTTTGGG	TCCceggggCCTCAATGGCACTACCTCG	ATTTTgeggggGCCAGTTGCAATCTACAAG	Pp1s124_25V6	pKK11
12-1b	440218	GGgtaaccGCACATCTCTACAGCAGCTGA	ACCGgtaaccTCTGGGCGTTAAGCTTTGAA	ATTTTgeggggCCCTCGCACCAATGAGCTCT	TCCceggggATTGGCAACTAACATCTCC	Pp1s90_174V6	pKK10
12-1c	442090	AAAggtaaccGGTGGAGCAATCATACGCTATC	AAAggtaccTTCATGACAGCAATCTCTTCTG	AAAggtaccCAGATCTGCTACTATAAGAGG	AAAactagaCTATCCCTATAATCCGATCCGACC	Pp1s105_205V6	pTM385
12-1d	437562	CATATCTGGAAGTaaagctTGC	TTTaaagctTCCGGGCGCCCAAGTTCAGG	ATTTTgeggggGATGTTTCTGCTGATTCAGT	TCCceggggCCAGCCACTGGGACTCTCCG	Pp1s72_7V6	pTM300
12-1e	434464	GGgtaaccCCCGTAATGCTGATGAGCTG	ACCGgtaaccTCCGGGTGAGGCACTCCA	ATTTTgeggggGATTTTGTGATGCTTTTGTACAG	TCCceggggTTGGAAGTCCCAACTAATAGGTGTC	Pp1s54_20V6	pKK7
12-1f	432190	ACCGgtaaccCTCTGTCGACGCAACACAAA	CCGctegagCCGACGCTGTTAAGGGGCTAT	ATTTTgeggggCACAGTCAAMIMICTTACTTA	TCCceggggGATGTTTGTGTAATCTCAACCAC	Pp1s41_285V6	pKK15
12-1g	432169	ACCGgtaaccCTCGGTCTCAACATATCTC	ACCGgtaaccTATATCAATCCGATGTTTG	ATTTTgeggggCGTACGCTAGCCCTAGTATAG	TCCceggggATGGTGTGATGACATGAGGATC	Pp1s41_148V6	pKK16
12-1h	454564	GGgtaaccCTCTCAGCAACCGGATTCATC	ACCGgtaaccCTTAGGATGGTGCACAAATA	ATTTTgeggggCTAAAGTATGAGTGGCCGATTT	TCCceggggTGAATGATGCTTCTTATGAC	Pp1s26_54V6	pKK8
12-1i	432906	GGgtaaccTGTCTGGCAGAGTTGGATAA	ACCGgtaaccAGAAAGTATGAACTGTAC	ATTTTgeggggCAATTTTAGCATCAAAAT	TCCceggggAAGGTAATGTTGGTGTCAAG	Pp1s45_257V6	pKK13
12-1j	445541	GGgtaaccGTCCCTCTTTGAAAGCTTAA	ACCGgtaaccGTCCCTGTCGCAAGCTGGGAC	ATTTTgeggggCACTGCTGCTTGGCACTGTAATC	TCCceggggGAGGAGTCTGCTGCTGGTAAAT	Pp1s139_70V6	pKK12
12-1k	422406	GGgtaaccGTGTCACAGCAAAATGATG	CCGctegagCCGAGGTGTCAGGGCCCGGGC	ATTTTgeggggGCTGTTCCGGCAACTATCT	TCCceggggACTCAAAAGTATCACTGGGCTC	Pp1s2_320V6	pKK9
12-1l	431567	GGgtaaccAGGCTGGAGGAAAAAAGAGG	ACCGgtaaccATTTCGCTGTGTCACGTTTCA	ATTTTgeggggCTAGATTCAAACAGCCACC	TCCceggggTACTCCGACACTGAAATGTC	Pp1s38_275V6	pKK17
12-1m	453302	GGgtaaccAGTATCCCAATGGGAAAGCA	CCGctegagCTGACTTCGCCCAAAATTCAT	ATTTTgeggggCACTCCGCCAACCTGCAAAAT	TCCceggggTGTTCGCAAAAGTTGAGGCC	Pp1s239_28V6	pKK18
12-1n	426336	AAAggtaaccCTGCGACCTCATATTTGTGATTC	AAAaggcccATAATAAAATGCACTCATCTG	AAAaggtaccCATTAAGAAAGTTAAATCCCTT	AAAactagaGTATAATGAAAAGCTTAAAG	Pp1s15_488V6	pTM358
12-1o	437642	AAAggtaaccCAGTTTCAAGTGGATAACAATCG	AAactegagAGTCTTGGCCACGCTCCCTGTC	AAAaggtaccTAAATCCCTGACTTCCGATGACAG	AAAaceggggCACACAGTCCCCAGGTTGG	Pp1s72_20V6	pTM373
12-1p	455320	AAAggtaaccATCCGACTTAAAGGCTCTCTTC	AAAaagctATAGTACAAAATTAATTTCCATGCC	AAAactagaTATAGTACAAAATTAATTTCCATGCC	AAAaceggggCATGAAGTTGCAAGTCCCACTCC	Pp1s276_79V6	pTM395



表 5 Kinesin RNAi コンストラクトに用いた PCR primer の配列

Kinesin name	Kinesin RNAi forward primer (5'→3')	Kinesin RNAi reverse primer (5'→3')	Accession number (Phypha #)	Locus name	Plasmid	Note
4-1a	CACCgcgccgcGACA ACGATCTGTCCATG GAGG	ATAgcgcgccTGGGT TACAAGATTGAAC GTGG	437833	Pp1s74_30V6  Pp1s74_30V6. 1	pMN374	
4-1a	CACCgcgccgcCAGG GATTGACGCCCTGA GCAC	ATAgcgcgccGTCAC AGATTCCTTCTTTC TGG	437833	Pp1s74_30V6  Pp1s74_30V6. 1	pMN464	
4-1b	CACCgcgccgcTGAT GGAAGTAAAGACTA CAAGC	ATAgcgcgccGGTGC TGTGAGTCAGTGC TAG	438737	Pp1s80_21V6  Pp1s80_21V6. 1	pMN376	
4-1c	CACCgcgccgcCTCA TGTTTGGTGTGCGCA TCC	ATAgcgcgccTCACC GCGATTTGCACAT CG	432365	Pp1s42_71V6  Pp1s42_71V6. 1	pMN356	
4-1d	CACCgcgccgcGAA ATTCACGATCTTCT GG	ATAgcgcgccTGCCC TTGCACATACAAG CTC	453193	Pp1s237_18V 6 Pp1s237_18 V6.1	pMN330	
4-1d	CACCgcgccgcGGTT GCCTGGCTTGAAGC TAGC	ATAgcgcgccGACCT CGTGCTGCACATA CG	453193	Pp1s237_18V 6 Pp1s237_18 V6.1	pMN425	
4-1e	CACCgcgccgcACAA ACATGAATTCTCAC TCC	ATAgcgcgccGTCAA GCCCATCATCAAG TTCC	441211	Pp1s98_189V 6 Pp1s98_189 V6.1	pMN388	
4-1e	CACCgcgccgcAGAC GGATAATATGTTGA AAG	ATAgcgcgccGCTAA ATTTAAAAGAGGT TTG	441211	Pp1s98_189V 6 Pp1s98_189 V6.1	pMN474	
4-2a	CACCgcgccgcGTCG CATCTATCCGAGAC C	ATAgcgcgccATGGG TCTCATGTACTTTT GG	447296	Pp1s158_177 V6 Pp1s158_1 77V6.1	pMN414	
4-2b	CACCgcgccgcGAAA CTTACACGAATGCT AC	ATAgcgcgccGGTTA CCCAGTCAGTCAT AGG	433281	Pp1s47_261V 6 Pp1s47_261 V6.1	pMN359	
4-2c	CACCgcgccgcAGGA AGATGTCTACACCA ACTG	ATAgcgcgccGACTC CCTGTACGGTACA TGC	446183	Pp1s146_76V 6 Pp1s146_76 V6.1	pMN310	
5-a	CACCgcgccgcGGAC TAATCTTGTTCATA CTCG	ATAgcgcgccAGTCT AACAGGTCCACCG ACG	457162	Pp1s315_14V 6 Pp1s315_14 V6.1	pMN437	
5-b	CACCgcgccgcTGCC CTTGTCGAACATCT AGGG	ATAgcgcgccGAGC GATTCTGGGTTTC ATTC	447260	Pp1s158_7V6  Pp1s158_7V6. 1	pMN316	☒ 17A の 2nd construct
5-b	CACCgcgccgcGGTT CACACAGCTGTGC ATGC	ATAgcgcgccGGAGT GGGACTTCACTAC ATCG	447260	Pp1s158_7V6  Pp1s158_7V6. 1	pMN415	☒ 17A の 3rd construct
5-c	CACCgcgccgcTTTG TAATTACAAATCAG AG	ATAgcgcgccGTGCT CTTGGAAGCTAGC AGC	425536	Pp1s13_177V 6 Pp1s13_177 V6.1	pMN305	☒ 17A の 4th construct
5-d	CACCgcgccgcCATT TGAACGAAACAAC AGAG	ATAgcgcgccGGAG CTGGCATGATCT TTCC	423604	Pp1s6_143V6  Pp1s6_143V6. 1	pMN363	☒ 17A の 5th construct

5-d	CACCgcgccgcCAAT CTTATTCAAACGTC TGTC	ATAggcgcgccCATCG GAACCGCCGATAA CAC	423604	Pp1s6_143V6  Pp1s6_143V6. 1	pMN454	☒ 17A の 6th construct
7-1a	CACCgcgccgcGTGG AGATCAACGAGCT ACGTG	ATAggcgcgccTCGAC TAGATACAGTATT CTC	447411	Pp1s160_43V 6 Pp1s160_43 V6.1	pMN317	
7-1a	CACCgcgccgcAAAG TTGAAGAAGGAAA AAG	ATAggcgcgccGGTCA CAATTTGCTGATA GATC	447411	Pp1s160_43V 6 Pp1s160_43 V6.1	pMN416	
7-1b	CACCgcgccgcAGCG GATCAAGTCTGCG GTC	ATAggcgcgccTGGAG CAAATCATTTCG GTC	437231	Pp1s70_159V 6 Pp1s70_159 V6.1	pMN369	
7-1b	CACCgcgccgcAGAG AAAGAGGCATCAC TTC	ATAggcgcgccAGGA GTTACTTTCAAAG GAGG	437231	Pp1s70_159V 6 Pp1s70_159 V6.1	pMN459	
7-2a	CACCgcgccgcATTC GCAACTAGGGCGA AGG	ATAggcgcgccGTGGC GCGAAGGCTGTGC ATTG	458197	Pp1s343_28V 6 Pp1s343_28 V6.1	pMN346	
7-2a	CACCgcgccgcCAAA TCCGACCTTAATTC AAGC	ATAggcgcgccGATCC TCGCTACCACCTCA GC	458197	Pp1s343_28V 6 Pp1s343_28 V6.1	pMN441	
7-2b	CACCgcgccgcGTAA CACCCTTGCAATTC C	ATAggcgcgccGCTGT GGCACGAAGGTTG TGC	432536	Pp1s43_22V6  Pp1s43_22V6. 1	pMN357	
7-2b	CACCgcgccgcGGAC ATCACAAGCAAGT AGCTTC	ATAggcgcgccGCTTG TAGATGAGCTGGA GCC	432536	Pp1s43_22V6  Pp1s43_22V6. 1	pMN449	
7-2c	CACCgcgccgcTAAT CAAAATTTGCGAA GC	ATAggcgcgccACCTC TTCTTCTCCAGC GC	454208	Pp1s255_53V 6 Pp1s255_53 V6.1	pMN336	
7-3	CACCgcgccgcGGCT GAAATTGAGAGTT CTTC	ATAggcgcgccTGCTT CTTGACCATCCTG TTC	426030	Pp1s14_442V 6 Pp1s14_442 V6.1	pMN309	
8-1a	CACCgcgccgcCTTC AAAATCGAGCAGA GC	ATAggcgcgccTTCTT CAAATCTAGACAT ATCG	453903	Pp1s249_44V 6 Pp1s249_44 V6.1	pMN335	
8-1a	CACCgcgccgcTCAA GCCGGGCCCGTGT C	ATAggcgcgccGCTCT CGGCTGCGTTTGT TTG	453903	Pp1s249_44V 6 Pp1s249_44 V6.1	pMN430	
8-1b	CACCgcgccgcTGCT CATTAATGACCTCT GCTG	ATAggcgcgccAGATC TTTGAGAATGACC ACC	424121	Pp1s7_82V6 P p1s7_82V6.1	pMN368	形質転換体 得られず
8-1b	CACCgcgccgcGGAT GGAGATGTAGTGT CCTCG	ATAggcgcgccGTGCT GACCACTGAACCTG TTATC	424121	Pp1s7_82V6 P p1s7_82V6.1	pMN458	
8-2	CACCgcgccgcTTGT CCTCAGAGAGGAT TCC	ATAggcgcgccGTGAC GGTGTGTCATTGC TG	458481	Pp1s353_36V 6 Pp1s353_36 V6.1	pMN348	
12-1c	CACCgcgccgcGTTG ATGGAGAGCGTTT CGAG	ATAggcgcgccACGA GCGATTCAACTTCT TCC	442090	Pp1s105_205 V6 Pp1s105_2 05V6.1	pMN302	
12-1d	CACCgcgccgcGATG AAATCTTGAAGCA CAG	ATAggcgcgccGGACT GCTCCGGCTGAT CTCTTC	437562	Pp1s72_7V6 P p1s72_7V6.1	pMN461	

12-1e	CACCgcgccgcGAAG AGAGCGCACGACA TGTCAGC	ATAggcgcgccGCTGC TCAGTAAGAGCAC TAAG	434464	Pp1s54_20V6  Pp1s54_20V6. 1	pMN361
12-1e	CACCgcgccgcGGAA AAGGATGAAGGAG TAGAG	ATAggcgcgccACCGA AAACGCCCTTCAT AGG	434464	Pp1s54_20V6  Pp1s54_20V6. 1	pMN452
12-1f	CACCgcgccgcCGAC TCTGAGTCTCAATG GAG	ATAggcgcgccATGTG ATCGCAACTGATC TACA	432190	Pp1s41_285V 6 Pp1s41_285 V6.1	pMN355
12-1f	CACCgcgccgcGAGT TGGAAAGCGAAAT GCAC	ATAggcgcgccAATTC TCGGAGTGCTCC ATGG	432190	Pp1s41_285V 6 Pp1s41_285 V6.1	pMN447
12-1g	CACCgcgccgcAGAA CTTCAAGTTGAGCA ATCC	ATAggcgcgccTTTTTC TCCCAGATTTCTTG C	432269	Pp1s41_148V 6 Pp1s41_148 V6.1	pMN446
12-1h	CACCgcgccgcGGTA GCAGTTTCCAAACT TCAGG	ATAggcgcgccGCTCT TGGGCAGAGCGCT CAGCA	454564	Pp1s262_54V 6 Pp1s262_54 V6.1	pMN338
12-1h	CACCgcgccgcGGAG TTACTTGGAGTGAA GTTGG	ATAggcgcgccATCTT AGACTTGAATTTA ACG	454564	Pp1s262_54V 6 Pp1s262_54 V6.1	pMN433
12-1i	CACCgcgccgcGATG CTGGTGAAGCAGC AGTTCCG	ATAggcgcgccGCATC CATCCTCGCAATG TCC	432906	Pp1s45_257V 6 Pp1s45_257 V6.1	pMN358
12-1i	CACCgcgccgcTGAA GAAATTCAGCAC AC	ATAggcgcgccGGAC ATCTACTGCTAGC CTCTG	432906	Pp1s45_257V 6 Pp1s45_257 V6.1	pMN450
12-1k	CACCgcgccgcGCTG AGGAAATGGAAGC GGAGC	ATAggcgcgccGCTGC TCTTTGAAGTAGG TCG	422406	Pp1s2_320V6  Pp1s2_320V6. 1	pMN418
12-1l	CACCgcgccgcCAGT GACAGCTGAGTTGT CAGC	ATAggcgcgccGGACT GCAGCCCACAAC CTGAG	431567	Pp1s38_275V 6 Pp1s38_275 V6.1	pMN352
12-1l	CACCgcgccgcTCGT GACGAATTTGAGA TGG	ATAggcgcgccTTGAA TTGTTGCACCTCAT C	431567	Pp1s38_275V 6 Pp1s38_275 V6.1	pMN444
12-1m	CACCgcgccgcAGTG ATGAAGAAGGCAC CAC	ATAggcgcgccGCTTG TGTTGTTCTCTCTT TCG	453302	Pp1s239_28V 6 Pp1s239_28 V6.1	pMN331
12-1m	CACCgcgccgcAGCT AGAATATGTTTGCA GG	ATAggcgcgccAGGA CTTGATGAAGTAT TCAAG	453302	Pp1s239_28V 6 Pp1s239_28 V6.1	pMN426
12-1n	CACCgcgccgcGAGA TCCATAACGAGCAT ATCAC	ATAggcgcgccGATAC ATTCTGGCATTCA GG	426336	Pp1s15_488V 6 Pp1s15_488 V6.1	pMN313
12-1n	CACCgcgccgcACTT GCAAATCATCGAA GACTTG	ATAggcgcgccGAACT ACATCTGAGATTC TCAGG	426336	Pp1s15_488V 6 Pp1s15_488 V6.2	pMN314
12-1n	CACCgcgccgcTTCC ATTGGAGAATGAT CACC	ATAggcgcgccGCATC CCACTGGTTGGGT CTTG	426336	Pp1s15_488V 6 Pp1s15_488 V6.1	pMN413
12-1o	CACCgcgccgcAGCC ACCCAAACGATGG AAGG	ATAggcgcgccGCTCC AGCTCTCAACCC GTCC	437642	Pp1s72_20V6  Pp1s72_20V6. 1	pMN370

12-1o	CACCgcgccgcGAGG CTGTGCGCCAGAA AGTGC	ATAggcgcgccGCTTG CCACGTCTCCGTCT TG	437642	Pp1s72_20V6  Pp1s72_20V6. 1	pMN460
12-1p	CACCgcgccgcGGAA CAACTCCGAGGATT TC	ATAggcgcgccTCAAA CTCTGACTCCAAA C	455320	Pp1s276_79V 6 Pp1s276_79 V6.1	pMN339
12-1p	CACCgcgccgcGTGC GTCAGAGAGTAGC TGC	ATAggcgcgccGACTT AAGGCTCTCTTCA G	455320	Pp1s276_79V 6 Pp1s276_79 V6.1	pMN434
12-2c	CACCgcgccgcGATG CGTTCAATTGGCA ATGG	ATAggcgcgccGTCAA TGTCTAGATTATCT AGG	440124	Pp1s90_66V6  Pp1s90_66V6. 1	pMN473
12-2d	CACCgcgccgcGGTT GTAAGACTATGTTG CCAG	ATAggcgcgccTCCAT CAGCGTGAGCCAT TCG	428714	Pp1s26_172V 6 Pp1s26_172 V6.1	pMN337
13-a	CACCgcgccgcATCA CTATAAACGATGTG GAGAG	ATAggcgcgccTGAGC GTGTTTCAGTGTGT GTTC	437794	Pp1s21_208V 6 Pp1s21_208 V6.1	pMN326
13-b	CACCgcgccgcAACT CAAAGAGGGATAT TAGC	ATAggcgcgccTCTAT CCTTGACTGAGTG AGAG	438664	Pp1s79_31V6  Pp1s79_31V6. 1	pMN465
13-c	CACCgcgccgcGTCA CAATTAGCGATAC GGAC	ATAggcgcgccTGCAT TTGGGAAATACA TGAG	456175	Pp1s293_5V6  Pp1s293_5V6. 1	pMN341
14-1a	CACCgcgccgcTACT AAGGCCAGCTTAC AGG	ATAggcgcgccGCAA ATATGCAGACCTT ATATCC	439730	Pp1s87_179V 6 Pp1s87_179 V6.1	pMN381
14-1b	CACCgcgccgcCACC GCCAAGGCGACCT TAC	ATAggcgcgccGACCC GGTCTGTCCATAC GC	438782	Pp1s80_62V6  Pp1s80_62V6. 1	pMN377
14-1b	CACCgcgccgcGATG CTGGGAAATCCAG AGATACC	ATAggcgcgccGAGC GGACGCTCAGAGA AGTTTGG	438782	Pp1s80_62V6  Pp1s80_62V6. 1	pMN467
14-2a	CACCgcgccgcACTG ATCTGGAATCAGG AGC	ATAggcgcgccGCAG GAGAGCATGCTGA AGAGG	430601	Pp1s34_101V 6 Pp1s34_101 V6.1	pMN344
14-2a	CACCgcgccgcGAAC AATGTAGACGAGA AGC	ATAggcgcgccGCAAC TGCTCCAAGAGAA GC	430601	Pp1s34_101V 6 Pp1s34_101 V6.1	pMN439
14-2b	CACCgcgccgcCGAG AATGTTCGAACTT TTTGG	ATAggcgcgccTGTTT CCTTTGAGTAAGA AG	439319	Pp1s84_53V6  Pp1s84_53V6. 1	pMN379
14-2b	CACCgcgccgcGGAA TCTGGAGCTATTTT AAGG	ATAggcgcgccGCTCC GTAGGAGAATTCG TTGG	439319	Pp1s84_53V6  Pp1s84_53V6. 1	pMN380
14-2b	CACCgcgccgcACTT GACATGAAAGAGC CTC	ATAggcgcgccGGTCC ATACTGATATCTA CAGG	439319	Pp1s84_53V6  Pp1s84_53V6. 1	pMN469
14-2c	CACCgcgccgcGGAG ATTAAGTACACTTG ACTAC	ATAggcgcgccGAGCT TCCTTCAATCTATC ACC	436987	Pp1s68_75V6  Pp1s68_75V6. 1	pMN367
14-2c	CACCgcgccgcCTAG TCAACCAAAGTCCC CTC	ATAggcgcgccGACA GATAAGAACAACA TACC	436987	Pp1s68_75V6  Pp1s68_75V6. 1	pMN457



14-3a	CACCgcgccgcGGTC ATCTCAGAATTGGA CGTG	ATAggcgcgccGCTTT CGTTCGTAGCTTTC G	459874	Pp1s403_54V 6 Pp1s403_54 V6.1	pMN353	
14-3a	CACCgcgccgcGGTT CAGGTTGCGCATGCA ATAG	ATAggcgcgccGGAA GAGCCTGCGCCTT AACAGG	459874	Pp1s403_54V 6 Pp1s403_54 V6.1	pMN445	
14-3b	CACCgcgccgcTGCA GGCCACTGAGTCTT G	ATAggcgcgccGCTTC CTTGAGACGATCA CCTTG	424496	Pp1s9_137V6  Pp1s9_137V6. 1	pMN382	
14-4	CACCgcgccgcGATG CTGCCCAGAGATA CTTC	ATAggcgcgccGAAC ACGAATCGCTTTG TGG	435249	Pp1s58_144V 6 Pp1s58_144 V6.1	pMN453	
14-5a	CACCgcgccgcGTCG TCATGACACAATTA TC	ATAggcgcgccGATTC TCCAGATTGCGTA TGAAGG	437825	Pp1s74_159V 6 Pp1s74_159 V6.1	pMN373	
14-5a	CACCgcgccgcGATT AAAGATGGATATG ACTATC	ATAggcgcgccTTCCT TCGGGAGCATCCT TGC	437825	Pp1s74_159V 6 Pp1s74_159 V6.1	pMN463	
14-5b	CACCgcgccgcAACG GCTGCGTGAAGAA ACC	ATAggcgcgccGATGA GCAGGCGATCTCT GG	435597	Pp1s60_159V 6 Pp1s60_159 V6.1	pMN364	
14-5b	CACCgcgccgcGAAA GATGATGCTACCTC ACC	ATAggcgcgccGTTTC CTCAAGCTCCTCC ACG	435597	Pp1s60_159V 6 Pp1s60_159 V6.1	pMN455	
14-6a	CACCgcgccgcTACG TTCATTACCGTATG G	ATAggcgcgccAGGC GCTACTCTTCTAGG TG	439249	Pp1s83_25V6  Pp1s83_25V6. 1	pMN378	
14-6a	CACCgcgccgcAAAG CAGTCTAATGGAG C	ATAggcgcgccTTGTG AACAATAGCTTGC AGC	439249	Pp1s83_25V6  Pp1s83_25V6. 1	pMN468	
14-6b	CACCgcgccgcTTGC GGTCATTGCCGTAC G	ATAggcgcgccAGGC GCTACTCTTCTAGG	450599	Pp1s199_47V 6 Pp1s199_47 V6.1	pMN320	
14-6b	CACCgcgccgcGTTT GCTCTGAAGGTTTA CATG	ATAggcgcgccGCAGT TTTGATTCCACGAT CATC	450599	Pp1s199_47V 6 Pp1s199_47 V6.1	pMN417	形質転換体 得られず
14-6c	CACCgcgccgcGAGA GGGCTGGAACATC AG	ATAggcgcgccTAACA TGACACCTGCAA AGAG	428061	Pp1s22_70V6  Pp1s22_70V6. 1	pMN328	
14-6c	CACCgcgccgcAGGA CACTTTATTGACT TGC	ATAggcgcgccGCTGA TTTCGAGGGACGC TCG	428061	Pp1s22_70V6  Pp1s22_70V6. 1	pMN423	
14-6d	CACCgcgccgcCCTA TTGGATTGCTGCCA GG	ATAggcgcgccGATTT TCGAGAGTGC GGA TCTG	458819	Pp1s364_50V 6 Pp1s364_50 V6.1	pMN351	
14-6d	CACCgcgccgcGAAA TTCGTGCGGAGGTA AGG	ATAggcgcgccGGTAA GCCCAGGATTGCT ATTGG	458819	Pp1s364_50V 6 Pp1s364_50 V6.1	pMN443	
ARK-a	CACCgcgccgcATTG CTAGAGTCCGAGG ACG	ATAggcgcgccTCAAT TCTACTTGAAAAG TGC	455498	Pp1s280_66V 6 Pp1s280_66 V6.1	pMN435	☒ 22A の 3rd construct
ARK-b	CACCgcgccgcAGAA TCTCTGGAAGTCG	ATAggcgcgccGCTTA GCAATGGTGCTC TCTGG	453488	Pp1s242_11V 6 Pp1s242_11 V6.1	pMN334	☒ 22A の 1st construct

ARK-b	CACCgcgccgcTGGA ATCTGAGGACGTTG	ATAgcgcgccTCAAT TCTACTTGAAAG TGC	453488	Pp1s242_11V 6 Pp1s242_11 V6.1	pMN429	☒ 22A の 2nd construct
ARK-c	CACCgcgccgcGAAC GGGAAGTGTCGGA ATTG	ATAgcgcgccGGATT TCCTCTCCATTCT TTCC	425827	Pp1s14_211V 6 Pp1s14_211 V6.1	pMN308	
ARK-c	CACCgcgccgcGCAA CCATTGCCAAGCTC TTTG	ATAgcgcgccGGAG GCGCCTTAATTCA ACTTG	425827	Pp1s14_211V 6 Pp1s14_211 V6.1	pMN408	
ARK-d	CACCgcgccgcTGCT AATACGAAGCTCA ATAC	ATAgcgcgccGCACT CGGCCTCTAGTTGT AG	427907	Pp1s22_256V 6 Pp1s22_256 V6.1	pMN327	
ARK-d	CACCgcgccgcGTTG AGTTGGATCTGAA AGTCTC	ATAgcgcgccGAACC AATCCCAAAGGG CACC	427907	Pp1s22_256V 6 Pp1s22_256 V6.1	pMN422	
orph-2a	CACCgcgccgcTTCG AATTCCGCTAGTCT ACTAC	ATAgcgcgccAAATT CAAGAGCACTGGC TC	346446	Pp1s65_79V6  Pp1s65_79V6. 1	pMN366	
orph-2a	CACCgcgccgcTCAT ACGGATCTCAGCAT TTCG	ATAgcgcgccGAGTT GAGTTGACGATAT GTGC	346446	Pp1s65_79V6  Pp1s65_79V6. 1	pMN456	
orph-2b	CACCgcgccgcAGGA AATCTGTGACGCCCT CC	ATAgcgcgccGAACT GTTGAGACCCATA CG	430757	Pp1s34_181V 6 Pp1s34_181 V6.1	pMN345	
orph-2b	CACCgcgccgcGGAA AACCAGCTGGATC AATCC	ATAgcgcgccGAGTA GAGTTGACAATGT GTG	430757	Pp1s34_181V 6 Pp1s34_181 V6.1	pMN440	
orph-4b	CACCgcgccgcAATT CTAGAACAGCTCTT C	ATAgcgcgccAATAA TGTTCTAACCTTA G	451243	Pp1s209_68V 6 Pp1s209_68 V6.1	pMN324	
orph-4b	CACCgcgccgcGAGT CCCTTCAAGCATCT GG	ATAgcgcgccGGTAT ACTCGCTGGAGA ATC	451243	Pp1s209_68V 6 Pp1s209_68 V6.2	pMN325	
orph-4c	CACCgcgccgcTTGT GTTGTGCGTTAAG C	ATAgcgcgccATCCT TTCATACTGTCTCC	437822	Pp1s74_146V 6 Pp1s74_146 V6.1	pMN372	
orph-4c	CACCgcgccgcGTTG AGTACAAAAGTGGA AATCG	ATAgcgcgccGGCA GTGATGGAACCTT GGAGG	437822	Pp1s74_146V 6 Pp1s74_146 V6.1	pMN462	
Quadruple (5-a)	CACCtctagaGAGAAA AGATCACACTCAA CTAT	AAgctagcGGCAGTG TGGGACGTCACTA GATGGTTTAC	457162	Pp1s315_14V 6 Pp1s315_14 V6.1	pTM175	☒ 17A の 1st construct
Quadruple (5-b)	CACCtctagaCACAGC TGTGCATGCTCACG AGGC	AAgctagcCTCTTCAT CATGGTTGGCACT GCAG	447260	Pp1s158_7V6  Pp1s158_7V6. 1	pTM175	☒ 17A の 1st construct
Quadruple (5-c)	CACCtctagaTGATCG TACAAAAAACA CTTGAG	AAgctagcGACACCA ACTCCTGAAACCA CG	425536	Pp1s13_177V 6 Pp1s13_177 V6.1	pTM175	☒ 17A の 1st construct
Quadruple (5-d)	CACCtctagaCCTGGA GGGCTTACAAGCG AACG	AAgctagcCGTTGCA CTTCAATAGGTCTT CTCCTG	423604	Pp1s6_143V6  Pp1s6_143V6. 1	pTM175	☒ 17A の 1st construct

表 6 定量的 RT-PCR に用いた primer の配列

Name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Note
5-a	TGATGGCTGCTCGATCAGAA	TGCAACGAAGCAGGACTTGT	
5-b	CCGGTTTCTTTTACTGTTGATC	AGCCTCAGACGTCAAGTGCAA	
5-c	CACCTCCAATTCTCATTAAAATCC	CGCGCCAGCTTTAGACAAG	
5-d	CGCGCGCGGAAA	GTTATCACACGTCCAAGCGTAAGT	
ARK-a	CGGATGGAGAACGACGAAGA	TCCATCACAAGCTGACGACTTT	
ARK-b	TCGTCCTCCACCACATCCA	GCCGTCATGTGATTGCTGGTA	
TUA1	CGTAGGAGGGACCAGTTTGG	TGCATTTCATCCCGAGTCA	Nakaoka et al., 2012

表 7 Kinesin ARK-a motor-mGFP-6xHis コンストラクトに用いた PCR primer の配列

Name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Plasmid
mGFP	TTTaagettGCGGCCGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	AAAactegagCTTGTACAGCTCGTCCATGC	pTM475
ARK-a	CACCcatatgGGATCTGCCCGCAATC	TTTgcggcgcACCCTCCGCCATCATAGATTGAAGC	pGG886

小文字はクローニングに用いた制限酵素サイトを示す。

# 動画の説明文

## 動画 1 高解像度観察によるヒメツリガネゴケの細胞分裂

GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の高解像度タイムラプス観察像。動画は spinning-disc 型共焦点顕微鏡で 30 秒ごとに撮影した。0 sec は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

## 動画 2 微小管脱重合剤オリザリンのカウロネマ細胞への影響

GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞のタイムラプス観察像。動画は wide-field 型蛍光顕微鏡で 3 分ごとに撮影した。00:00 (時間:分) はオリザリン (10  $\mu$ M) 添加時を示す。分裂期に進行した細胞はスピンドルを形成できないため、染色体は細胞質中に散り散りになっている。スケールバーは 100  $\mu$ m。本実験は私自身も行ったが、この動画は中岡由貴氏が独立に撮影したものを使わせていただいた。

## 動画 3 カウロネマ頂端細胞において、細胞分裂直後の核は微小管依存的に細胞の中央に配置される

GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を発現しているカウロネマ細胞の wide-field 型蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察。微小管脱重合剤オリザリン、actin 重合阻害剤ラトランキュリン B、コントロールとして DMSO を分裂終期の細胞 (5-6 min) に加えた。画像は 1 分ごとに撮影した。スケールバーは 100  $\mu$ m。

## 動画 4 細胞分裂期における kinesin の局在

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す。kinesin の遺伝子名はそれぞれの画像の左上に示す。左上の画像は mCherry- $\alpha$ -tubulin のみを発現している細胞を示す (親株)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

## 動画 5 Kinesin-4 サブファミリーの分裂期局在

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。kinesin の遺伝子名はそれぞれの画像の左上に示す。上の画像は mCherry- $\alpha$ -tubulin のみを発現している細胞を示す (親株)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

## 動画 6 Kinesin-5 サブファミリーの分裂期局在

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩

壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### **動画 7 Kinesin-7 サブファミリーの分裂期局在**

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### **動画 8 Kinesin-8 サブファミリーの分裂期局在**

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### **動画 9 Kinesin 12-I サブファミリーの分裂期局在**

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### **動画 10 Kinesin 12-I、12-II サブファミリーの分裂期局在**

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### **動画 11 Kinesin-13 サブファミリーの分裂期局在**

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### **動画 12 Kinesin-14 サブファミリーの分裂期局在**

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### **動画 13 Kinesin-ARK サブファミリーの分裂期局在**

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### **動画 14 Orphan kinesin の分裂期局在**

緑は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、赤は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す (中央は kinesin-Citrine と葉緑体による自家蛍光、右は mCherry- $\alpha$ -tubulin を表す)。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

#### 動画 15 タイムラプス観察による kinesin RNAi スクリーニング

GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞のタイムラプス観察によるスクリーニングの一例。動画は wide-field 型蛍光顕微鏡で 3 分ごとに撮影した。ここに挙げた例では (kinesin-ARK RNAi)、核の移動に異常が見られた (青矢印)。しかしながら、次の分裂期の直前には核は細胞の中央に向かって動く様子が見られた (白矢印、5:33 から 6:03 のところ (時間:分))。コントロール細胞の通常の核の動きも示してある (黄矢印)。スケールバーは 100  $\mu$ m。

#### 動画 16 Kinesin-5 RNAi ノックダウンによる分裂後期以降の異常 (低解像度)

GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞のタイムラプス観察。動画は wide-field 型蛍光顕微鏡で 3 分ごとに撮影した。0 min は核膜崩壊時を示す。スケールバーは 100  $\mu$ m。

#### 動画 17 Kinesin-5 RNAi ノックダウンによる分裂後期以降の異常 (高解像度)

GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞のタイムラプス観察。動画は spinning-disc 型共焦点顕微鏡で 30 秒ごとに撮影した。上と中央の像では染色体分配開始時を 0 min とし、下の像では任意の時期を 0 min とした。スケールバーは 10  $\mu$ m。

#### 動画 18 Kinesin-ARK は細胞分裂直後の核の配置に必要である (低解像度)

(A) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を発現している細胞の wide-field 型蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察。動画は 3 分ごとに撮影した。染色体分配開始時を 0 min とした。横のスケールバーは 100  $\mu$ m。

#### 動画 19 Kinesin-ARK 非存在下での分裂面に戻る核の動きは actin 依存的ではなく、微小管依存的である

GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を恒常的に発現しているカウロネマ細胞の wide-field 型蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察。Actin 重合阻害剤ラトランキュリン B、微小管脱重合剤オリザリンは染色体分離後 20-21 min で加えた。動画は 1 分ごとに撮影した。スケールバーは 100  $\mu$ m。

#### 動画 20 Kinesin-ARK は細胞分裂直後の核の配置に必要である (高解像度)

(A) GFP- $\alpha$ -tubulin (緑) と histoneH2B-mRFP (赤) を発現している細胞の spinning-disc 型共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス観察。動画は 1 分ごとに撮影した。染色体分配開始時

を 0 min とした。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

**動画 21 細胞分裂直後には、kinesin ARK-a-Citrine は微小管上にある**

Kinesin ARK-a-Citrine (緑)と mCherry- $\alpha$ -tubulin (赤)を発現している細胞(上)と mCherry- $\alpha$ -tubulin のみを発現している細胞(下)の spinning-disc 型共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス観察。画像は 1 分ごとに撮影した。染色体分離開始時を 0 min とした。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

**動画 22 微小管が伸長、短縮する間の kinesin-ARK-Citrine の局在**

Kinesin ARK-b-Citrine が微小管上に局在する様子を斜光照明顕微鏡 (oblique illumination fluorescence microscopy) を用いて撮影した (3 秒ごと)。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

**動画 23 *In vitro* における kinesin-ARK の活性**

ATP、AMP-PNP 存在下でのリコンビナントタンパク質 kinesin ARK-a モーターの *in vitro* 微小管 gliding assay。動画は 3 回繰り返している。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。



## 參考論文

Adames, N.R. and Cooper, J.A. (2000) Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 149: 863-874.

Ambrose, J.C. and Cyr, R. (2007) The kinesin ATK5 functions in early spindle assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 226-236.

Ambrose, J.C., Li, W., Marcus, A., Ma, H. and Cyr, R. (2005) A minus-end-directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Mol Biol Cell* 16: 1584-1592.

Asada, T., Kuriyama, R. and Shibaoka, H. (1997) TKRP125, a kinesin-related protein involved in the centrosome-independent organization of the cytokinetic apparatus in tobacco BY-2 cells. *J Cell Sci* 110 ( Pt 2): 179-189.

Bannigan, A., Lizotte-Waniewski, M., Riley, M. and Baskin, T.I. (2008) Emerging molecular mechanisms that power and regulate the anastral mitotic spindle of flowering plants. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 1-11.

Bannigan, A., Scheible, W.R., Lukowitz, W., Fagerstrom, C., Wadsworth, P., Somerville, C. and Baskin, T.I. (2007) A conserved role for kinesin-5 in plant mitosis. *J Cell Sci* 120: 2819-2827.

Bezanilla, M., Pan, A. and Quatrano, R.S. (2003) RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* 133: 470-474.

Bezanilla, M., Perroud, P.F., Pan, A., Klueh, P. and Quatrano, R.S. (2005) An RNAi system in *Physcomitrella patens* with an internal marker for silencing allows for rapid identification of loss of function phenotypes. *Plant Biol (Stuttg)* 7: 251-257.

Bowser, J. and Reddy, A.S. (1997) Localization of a kinesin-like calmodulin-binding protein in dividing cells of *Arabidopsis* and tobacco. *Plant J* 12: 1429-1437.

Cheerambathur, D.K., Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G. and Scholey, J.M. (2008) Dynamic partitioning of mitotic kinesin-5 cross-linkers between microtubule-bound and freely diffusing states. *J Cell Biol* 182: 429-436.

Chen, C., Marcus, A., Li, W., Hu, Y., Calzada, J.P., Grossniklaus, U., Cyr, R.J. and Ma,

- H. (2002) The Arabidopsis ATK1 gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis. *Development* 129: 2401-2409.
- Chytilova, E., Macas, J., Sliwinska, E., Rafelski, S.M., Lambert, G.M. and Galbraith, D.W. (2000) Nuclear dynamics in Arabidopsis thaliana. *Mol Biol Cell* 11: 2733-2741.
- Collins, E., Mann, B.J. and Wadsworth, P. (2013) Eg5 restricts anaphase B spindle elongation in mammalian cells. *Cytoskeleton (Hoboken)* 71: 136-144.
- Cove, D. (2005) The moss Physcomitrella patens. *Annu Rev Genet* 39: 339-358.
- Cove, D., Bezanilla, M., Harries, P. and Quatrano, R. (2006) Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu Rev Plant Biol* 57: 497-520.
- Desai, A. and Mitchison, T.J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 83-117.
- Doonan, J.H., Cove, D.J. and Lloyd, C.W. (1985) Immunofluorescence microscopy of microtubules in intact cell lineages of the moss, Physcomitrella patens. I. Normal and CIPC-treated tip cells. *J Cell Sci* 75: 131-147.
- Doonan, J.H., Cove, D.J. and Lloyd, C.W. (1988) Microtubules and microfilaments in tip growth: evidence that microtubules impose polarity on protonemal growth in Physcomitrella patens. *J Cell Sci* 89: 533-540.
- Du, Y., English, C.A. and Ohi, R. (2010) The kinesin-8 Kif18A dampens microtubule plus-end dynamics. *Curr Biol* 20: 374-380.
- Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R. and Stuurman, N. (2010) Computer control of microscopes using µManager. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 14: Unit14 20.
- Endow, S.A., Chandra, R., Komma, D.J., Yamamoto, A.H. and Salmon, E.D. (1994) Mutants of the Drosophila ncd microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis. *J Cell Sci* 107 ( Pt 4): 859-867.
- Eng, R.C. and Wasteneys, G.O. (2014) The Microtubule Plus-End Tracking Protein ARMADILLO-REPEAT KINESIN1 Promotes Microtubule Catastrophe in Arabidopsis. *Plant Cell* 26: 3372-3386.
- Finka, A., Schaefer, D.G., Saidi, Y., Goloubinoff, P. and Zryd, J.P. (2007) In vivo

visualization of F-actin structures during the development of the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytol* 174: 63-76.

Fridolfsson, H.N. and Starr, D.A. (2010) Kinesin-1 and dynein at the nuclear envelope mediate the bidirectional migrations of nuclei. *J Cell Biol* 191: 115-128.

Gadde, S. and Heald, R. (2004) Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol* 14: R797-805.

Ganem, N.J. and Compton, D.A. (2004) The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J Cell Biol* 166: 473-478.

Ganem, N.J., Upton, K. and Compton, D.A. (2005) Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux. *Curr Biol* 15: 1827-1832.

Garcia, M.A., Koonruga, N. and Toda, T. (2002) Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. *Curr Biol* 12: 610-621.

Goshima, G. and Kimura, A. (2010) New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle. *Curr Opin Cell Biol* 22: 44-49.

Goshima, G., Kiyomitsu, T., Yoda, K. and Yanagida, M. (2003) Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol* 160: 25-39.

Goshima, G., Nedelec, F. and Vale, R.D. (2005) Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J Cell Biol* 171: 229-240.

Goshima, G. and Scholey, J.M. (2010) Control of mitotic spindle length. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 21-57.

Goshima, G. and Vale, R.D. (2003) The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line. *J Cell Biol* 162: 1003-1016.

Goshima, G. and Vale, R.D. (2005) Cell cycle-dependent dynamics and regulation of mitotic kinesins in *Drosophila* S2 cells. *Mol Biol Cell* 16: 3896-3907.

Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A. and Tsien, R.Y. (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 276: 29188-29194.

Gundersen, G.G. and Worman, H.J. (2013) Nuclear positioning. *Cell* 152: 1376-1389.

Gupta, M.L., Jr., Carvalho, P., Roof, D.M. and Pellman, D. (2006) Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat Cell Biol* 8: 913-923.

Hagan, I. and Yanagida, M. (1990) Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7+* gene. *Nature* 347: 563-566.

Harries, P.A., Pan, A. and Quatrano, R.S. (2005) Actin-related protein2/3 complex component ARPC1 is required for proper cell morphogenesis and polarized cell growth in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 17: 2327-2339.

Hiwatashi, Y., Obara, M., Sato, Y., Fujita, T., Murata, T. and Hasebe, M. (2008) Kinesins are indispensable for interdigitation of phragmoplast microtubules in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 20: 3094-3106.

Hiwatashi, Y., Sato, Y. and Doonan, J.H. (2014) Kinesins have a dual function in organizing microtubules during both tip growth and cytokinesis in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 26: 1256-1266.

Horio, T. and Hotani, H. (1986) Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321: 605-607.

Hu, C.K., Coughlin, M., Field, C.M. and Mitchison, T.J. (2011) KIF4 regulates midzone length during cytokinesis. *Curr Biol* 21: 815-824.

Inoue, S. and Sato, H. (1967) Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *J Gen Physiol* 50: Suppl:259-292.

Iwabuchi, K., Minamino, R. and Takagi, S. (2010) Actin reorganization underlies phototropin-dependent positioning of nuclei in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiol* 152: 1309-1319.

Iwabuchi, K., Sakai, T. and Takagi, S. (2007) Blue light-dependent nuclear positioning in

Arabidopsis thaliana leaf cells. *Plant Cell Physiol* 48: 1291-1298.

Jones, D.T., Taylor, W.R. and Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8: 275-282.

Jones, M.A., Raymond, M.J. and Smirnov, N. (2006) Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in Arabidopsis. *Plant J* 45: 83-100.

Kapitein, L.C., Peterman, E.J., Kwok, B.H., Kim, J.H., Kapoor, T.M. and Schmidt, C.F. (2005) The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* 435: 114-118.

Kashina, A.S., Baskin, R.J., Cole, D.G., Wedaman, K.P., Saxton, W.M. and Scholey, J.M. (1996) A bipolar kinesin. *Nature* 379: 270-272.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30: 3059-3066.

Katoh, K. and Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30: 772-780.

Kinoshita, K., Arnal, I., Desai, A., Drechsel, D.N. and Hyman, A.A. (2001) Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* 294: 1340-1343.

Kitajima, T.S., Ohsugi, M. and Ellenberg, J. (2011) Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell* 146: 568-581.

Konopka, C.A. and Bednarek, S.Y. (2008) Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *Plant J* 53: 186-196.

Kosetsu, K., de Keijzer, J., Janson, M.E. and Goshima, G. (2013) MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN65 is essential for maintenance of phragmoplast bipolarity and formation of the cell plate in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 25: 4479-4492.

Kurihara, D., Matsunaga, S., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2008) Live cell imaging

reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol* 49: 1256-1261.

Lambert, A.M. and Bajer, A.S. (1972) Dynamics of spindle fibers and microtubules during anaphase and phragmoplast formation. *Chromosoma (Berl.)* 39: 101-144.

Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., et al. (2004) A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 167: 19-22.

Lee, Y.R., Giang, H.M. and Liu, B. (2001) A novel plant kinesin-related protein specifically associates with the phragmoplast organelles. *Plant Cell* 13: 2427-2439.

Lee, Y.R., Li, Y. and Liu, B. (2007) Two Arabidopsis phragmoplast-associated kinesins play a critical role in cytokinesis during male gametogenesis. *Plant Cell* 19: 2595-2605.

Li, W., Moriwaki, T., Tani, T., Watanabe, T., Kaibuchi, K. and Goshima, G. (2012) Reconstitution of dynamic microtubules with Drosophila XMAP215, EB1, and Sentin. *J Cell Biol* 199: 849-862.

Liu, B., Cyr, R.J. and Palevitz, B.A. (1996) A kinesin-like protein, KatAp, in the cells of arabidopsis and other plants. *Plant Cell* 8: 119-132.

Lloyd, C. and Chan, J. (2006) Not so divided: the common basis of plant and animal cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 147-152.

Lloyd, C.W., Pearce, K.J., Rawlins, D.J., Ridge, R.W. and Shaw, P.J. (1987) Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 8: 27-36.

Mahoney, N.M., Goshima, G., Douglass, A.D. and Vale, R.D. (2006) Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr Biol* 16: 564-569.

Maliga, Z., Junqueira, M., Toyoda, Y., Ettinger, A., Mora-Bermudez, F., et al. (2013) A genomic toolkit to investigate kinesin and myosin motor function in cells. *Nat Cell Biol* 15: 325-334.

Manning, A.L. and Compton, D.A. (2007) Mechanisms of spindle-pole organization are influenced by kinetochore activity in mammalian cells. *Curr Biol* 17: 260-265.

- Manning, A.L., Ganem, N.J., Bakhoun, S.F., Wagenbach, M., Wordeman, L. and Compton, D.A. (2007) The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol Biol Cell* 18: 2970-2979.
- Marshall, W.F. (2009) Centriole evolution. *Curr Opin Cell Biol* 21: 14-19.
- Mayr, M.I., Hummer, S., Bormann, J., Gruner, T., Adio, S., Woehlke, G. and Mayer, T.U. (2007) The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr Biol* 17: 488-498.
- Mazumdar, M., Sundareshan, S. and Misteli, T. (2004) Human chromokinesin KIF4A functions in chromosome condensation and segregation. *J Cell Biol* 166: 613-620.
- McDonald, H.B., Stewart, R.J. and Goldstein, L.S. (1990) The kinesin-like *ncd* protein of *Drosophila* is a minus end-directed microtubule motor. *Cell* 63: 1159-1165.
- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L. and West, R.R. (2002) Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 193-219.
- Menand, B., Calder, G. and Dolan, L. (2007) Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *J Exp Bot* 58: 1843-1849.
- Miki, H., Okada, Y. and Hirokawa, N. (2005) Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 15: 467-476.
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242.
- Mitchison, T.J. and Salmon, E.D. (2001) Mitosis: a history of division. *Nat Cell Biol* 3: E17-21.
- Muller, S., Han, S. and Smith, L.G. (2006) Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 16: 888-894.
- Muller, S., Wright, A.J. and Smith, L.G. (2009) Division plane control in plants: new players in the band. *Trends Cell Biol* 19: 180-188.
- Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasezawa, S., Machida, Y. and Hasebe, M. (2013) Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature communications* 4: 1967.



Murata, T., Tanahashi, T., Nishiyama, T., Yamaguchi, K. and Hasebe, M. (2007) How do plants organize microtubules without a centrosome? *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 1154-1163.

Naito, H. and Goshima, G. (2015) NACK kinesin is required for metaphase chromosome alignment and cytokinesis in the moss *Physcomitrella patens*. *Cell Struct Funct* In press.

Nakaoka, Y., Kimura, A., Tani, T. and Goshima, G. (2015) Cytoplasmic nucleation and atypical branching nucleation generate endoplasmic microtubules. *Plant Cell* In press.

Nakaoka, Y., Miki, T., Fujioka, R., Uehara, R., Tomioka, A., Obuse, C., Kubo, M., Hiwatashi, Y. and Goshima, G. (2012) An inducible RNA interference system in *Physcomitrella patens* reveals a dominant role of augmin in phragmoplast microtubule generation. *Plant Cell* 24: 1478-1493.

Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., et al. (2002) Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* 109: 87-99.

Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Sakakibara, I., Kato, M. and Hasebe, M. (2000) Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis. *DNA Res* 7: 9-17.

Niwa, S., Nakajima, K., Miki, H., Minato, Y., Wang, D. and Hirokawa, N. (2012) KIF19A is a microtubule-depolymerizing kinesin for ciliary length control. *Dev Cell* 23: 1167-1175.

Norden, C., Young, S., Link, B.A. and Harris, W.A. (2009) Actomyosin is the main driver of interkinetic nuclear migration in the retina. *Cell* 138: 1195-1208.

Otegui, M.S., Verbrugghe, K.J. and Skop, A.R. (2005) Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis. *Trends Cell Biol* 15: 404-413.

Petry, S., Pugieux, C., Nedelec, F.J. and Vale, R.D. (2011) Augmin promotes meiotic spindle formation and bipolarity in *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14473-14478.

Prigge, M.J. and Bezanilla, M. (2010) Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* 137: 3535-3543.

- Reddy, A.S. and Day, I.S. (2001) Kinesins in the Arabidopsis genome: a comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics* 2: 2.
- Reinsch, S. and Gonczy, P. (1998) Mechanisms of nuclear positioning. *J Cell Sci* 111 ( Pt 16): 2283-2295.
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., et al. (2008) The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Rieder, C.L. and Khodjakov, A. (2003) Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells. *Science* 300: 91-96.
- Rogers, G.C., Rogers, S.L., Schwimmer, T.A., Ems-McClung, S.C., Walczak, C.E., Vale, R.D., Scholey, J.M. and Sharp, D.J. (2004) Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* 427: 364-370.
- Sakai, T., Honing, H., Nishioka, M., Uehara, Y., Takahashi, M., et al. (2008) Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in Arabidopsis. *Plant J* 53: 157-171.
- Sato, Y., Wada, M. and Kadota, A. (2001) Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor. *J Cell Sci* 114: 269-279.
- Sawin, K.E., LeGuellec, K., Philippe, M. and Mitchison, T.J. (1992) Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* 359: 540-543.
- Schaar, B.T., Chan, G.K., Maddox, P., Salmon, E.D. and Yen, T.J. (1997) CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *J Cell Biol* 139: 1373-1382.
- Scholey, J.M., Brust-Mascher, I. and Mogilner, A. (2003) Cell division. *Nature* 422: 746-752.
- Schuh, M. and Ellenberg, J. (2007) Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell* 130: 484-498.
- Senger, T., Wichard, T., Kunze, S., Gobel, C., Lerchl, J., Pohnert, G. and Feussner, I. (2005) A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity

from the moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem* 280: 7588-7596.

Sharp, D.J., McDonald, K.L., Brown, H.M., Matthies, H.J., Walczak, C., Vale, R.D., Mitchison, T.J. and Scholey, J.M. (1999) The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles. *J Cell Biol* 144: 125-138.

Shen, Z., Collatos, A.R., Bibeau, J.P., Furt, F. and Vidali, L. (2012) Phylogenetic analysis of the Kinesin superfamily from *Physcomitrella*. *Front Plant Sci* 3: 230.

Strompen, G., El Kasmi, F., Richter, S., Lukowitz, W., Assaad, F.F., Jurgens, G. and Mayer, U. (2002) The *Arabidopsis* HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr Biol* 12: 153-158.

Stumpff, J., von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C. and Wordeman, L. (2008) The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev Cell* 14: 252-262.

Stumpff, J., Wagenbach, M., Franck, A., Asbury, C.L. and Wordeman, L. (2012) Kif18A and chromokinesins confine centromere movements via microtubule growth suppression and spatial control of kinetochore tension. *Dev Cell* 22: 1017-1029.

Su, X., Ohi, R. and Pellman, D. (2012) Move in for the kill: motile microtubule regulators. *Trends Cell Biol* 22: 567-575.

Tamura, K., Iwabuchi, K., Fukao, Y., Kondo, M., Okamoto, K., Ueda, H., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2013) Myosin XI-i links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 23: 1776-1781.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.

Tanaka, H., Ishikawa, M., Kitamura, S., Takahashi, Y., Soyano, T., Machida, C. and Machida, Y. (2004) The *AtNACK1/HINKEL* and *STUD/TETRASPORE/AtNACK2* genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Genes Cells* 9: 1199-1211.

Tanenbaum, M.E., Macurek, L., Janssen, A., Geers, E.F., Alvarez-Fernandez, M. and Medema, R.H. (2009) Kif15 cooperates with eg5 to promote bipolar spindle assembly. *Curr Biol* 19: 1703-1711.

Tokunaga, M., Imamoto, N. and Sakata-Sogawa, K. (2008) Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat Methods* 5: 159-161.

Tran, P.T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. and Chang, F. (2001) A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol* 153: 397-411.

Tsai, J.W., Lian, W.N., Kemal, S., Kriegstein, A.R. and Vallee, R.B. (2010) Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. *Nature neuroscience* 13: 1463-1471.

Tytell, J.D. and Sorger, P.K. (2006) Analysis of kinesin motor function at budding yeast kinetochores. *J Cell Biol* 172: 861-874.

Uteng, M., Hentrich, C., Miura, K., Bieling, P. and Surrey, T. (2008) Poleward transport of Eg5 by dynein-dynactin in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J Cell Biol* 182: 715-726.

Vale, R.D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467-480.

Vanneste, D., Takagi, M., Imamoto, N. and Vernos, I. (2009) The role of Hklp2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr Biol* 19: 1712-1717.

Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A.A., Tanaka, T.U. and Howard, J. (2006) Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat Cell Biol* 8: 957-962.

Verhey, K.J. and Hammond, J.W. (2009) Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 765-777.

Vernos, I., Raats, J., Hirano, T., Heasman, J., Karsenti, E. and Wylie, C. (1995) Xklp1, a chromosomal *Xenopus* kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning. *Cell* 81: 117-127.

Vidali, L., Augustine, R.C., Kleinman, K.P. and Bezanilla, M. (2007) Profilin is essential for tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 19: 3705-3722.

- Vidali, L., Rounds, C.M., Hepler, P.K. and Bezanilla, M. (2009a) Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells. *PLoS One* 4: e5744.
- Vidali, L., van Gisbergen, P.A., Guerin, C., Franco, P., Li, M., Burkart, G.M., Augustine, R.C., Blanchoin, L. and Bezanilla, M. (2009b) Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13341-13346.
- Vos, J.W., Safadi, F., Reddy, A.S. and Hepler, P.K. (2000) The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *Plant Cell* 12: 979-990.
- Walczak, C.E. and Heald, R. (2008) Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int Rev Cytol* 265: 111-158.
- Walczak, C.E., Vernos, I., Mitchison, T.J., Karsenti, E. and Heald, R. (1998) A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr Biol* 8: 903-913.
- Walker, R.A., Salmon, E.D. and Endow, S.A. (1990) The Drosophila claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule. *Nature* 347: 780-782.
- Wang, S.Z. and Adler, R. (1995) Chromokinesin: a DNA-binding, kinesin-like nuclear protein. *J Cell Biol* 128: 761-768.
- Wargacki, M.M., Tay, J.C., Muller, E.G., Asbury, C.L. and Davis, T.N. (2010) Kip3, the yeast kinesin-8, is required for clustering of kinetochores at metaphase. *Cell Cycle* 9: 2581-2588.
- West, R.R., Malmstrom, T., Troxell, C.L. and McIntosh, J.R. (2001) Two related kinesins, klp5+ and klp6+, foster microtubule disassembly and are required for meiosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 12: 3919-3932.
- Williams, B.C., Riedy, M.F., Williams, E.V., Gatti, M. and Goldberg, M.L. (1995) The Drosophila kinesin-like protein KLP3A is a midbody component required for central spindle assembly and initiation of cytokinesis. *J Cell Biol* 129: 709-723.
- Woehlke, G., Ruby, A.K., Hart, C.L., Ly, B., Hom-Booher, N. and Vale, R.D. (1997) Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell* 90: 207-216.
- Wood, K.W., Sakowicz, R., Goldstein, L.S. and Cleveland, D.W. (1997) CENP-E is a

plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell* 91: 357-366.

Wordeman, L. and Mitchison, T.J. (1995) Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol* 128: 95-104.

Wu, S.Z. and Bezanilla, M. (2014) Myosin VIII associates with microtubule ends and together with actin plays a role in guiding plant cell division. *Elife* 3.

Yang, G., Gao, P., Zhang, H., Huang, S. and Zheng, Z.L. (2007) A mutation in MRH2 kinesin enhances the root hair tip growth defect caused by constitutively activated ROP2 small GTPase in Arabidopsis. *PLoS One* 2: e1074.

Yen, T.J., Compton, D.A., Wise, D., Zinkowski, R.P., Brinkley, B.R., Earnshaw, W.C. and Cleveland, D.W. (1991) CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO J* 10: 1245-1254.

Yoo, C.M. and Blancaflor, E.B. (2013) Overlapping and divergent signaling pathways for ARK1 and AGD1 in the control of root hair polarity in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* 4: 528.

Yoo, C.M., Wen, J., Motes, C.M., Sparks, J.A. and Blancaflor, E.B. (2008) A class I ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein is critical for maintaining directional root hair growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* 147: 1659-1674.

Zhou, X., Graumann, K., Wirthmueller, L., Jones, J.D. and Meier, I. (2014) Identification of unique SUN-interacting nuclear envelope proteins with diverse functions in plants. *J Cell Biol* 205: 677-692.

Zhu, C. and Dixit, R. (2011) Functions of the Arabidopsis kinesin superfamily of microtubule-based motor proteins. *Protoplasma* 249: 887-899.

Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J.D., Bossy-Wetzler, E., Fan, J.B., Abraham, R.T. and Jiang, W. (2005) Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell* 16: 3187-3199.

# 謝辞

日々指導していただいた五島剛太教授に感謝します。直接指導していただく機会に恵まれ、数多くのお言葉をいただきました。実験の進め方からものの考え方まで幅広く指導していただき、貴重な日々を過ごせました。また、研究につまずいた時には的確なアドバイスをいただき、研究の指針を与えていただきました。心より感謝します。

清光智美博士には、日々の議論から最新の技術に至るまで多くのアドバイスや知識をいただきました。また、本論文の改訂に関して指導していただきました。心より感謝します。上原亮太博士には、実験の進め方から議論、雑談に至るまで幅広く指導していただきました。上原博士に聞けば多くのことは解決するという安心感は、研究を進める上で必要不可欠でした。心より感謝します。釜崎とも子博士には、違った角度からのアドバイスや知識をいただきました。また、日々の議論も大変有益なものとなりました。心より感謝します。幸節健博士には、植物の基礎的な話から、日々の議論に至るまでお世話になりました。心より感謝します。渡邊定則博士には、日々の議論や実験の進め方など、多くのアドバイスや知識をいただきました。心より感謝します。李文静博士には、研究室に配属されたときから実験の進め方を指導していただきました。また、研究に対する熱意に刺激を受けました。本当にありがとうございました。仁科桃子さんには、RNAiスクリーニングに関して多大な協力をしていただきました。また、バッファの作製や形質転換の準備など実験がスムーズに行くように環境を整えていただきました。本当にありがとうございました。

中岡由貴さんには、共同研究を行っただけでなく、日々の議論に対してもお世話になりました。また、本論文の改訂に関してアドバイスしていただきました。本当にありがとうございました。研究室に配属されてからの6年間はほぼ毎日顔をあわせることになり、良き友、良きライバルとして充実した時間を過ごせたと思います。藤岡竜太さんには、RNAi株の候補を得るためのアルゴリズムを利用させていただきました。ありがとうございました。伊藤亜実さん、森脇崇史さん、江塚智哉さん、内藤晴子さん、林久登さん、山田萌恵さんには、研究に対する姿勢に刺激を受け、後輩たちには負けられないという思いにさせていただきました。また、日々の雑談にも快く応じてくれました。ありがとうございました。

稲葉理絵さんには、実験器具の洗浄や事務手続きなど、あらゆる面でサポートしていただきました。本当にありがとうございました。富岡亜希子さんには、ヒメツリガネゴケの形質転換の方法などを教えてもらっただけでなく、株の作製、維持を手伝っていただきました。本当にありがとうございました。渡邊彩子さんには、株の胞子作りを手伝っていただきました。本当にありがとうございました。西山朋子博士には、実験のコツから日々の議論までお世話になりました。本当にありがとうございました。

最後に、常にあたたく見守り支えてくださった家族、友人に心より感謝いたします。

2015年2月 三木 智博