

別紙 4

| | |
|----------|---------|
| 報告番 - | ※ 甲 第 号 |
|----------|---------|

主 論 文 の 要 旨

論文題目 植物における微小管依存的な細胞内輸送機構の
研究

氏 名 吉田 真理

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内輸送は生命のさまざまなプロセスを支える基盤的な現象である。動物細胞において「従来型キネシン」として知られるキネシン-1 や、神経軸索での働きがよく知られているキネシン-3 は、細胞内のさまざまな物質を微小管プラス末端側へ（順行性）輸送する分子モーターとして広範な役割を果たしている。一方、多くの植物はキネシン-1 やキネシン-3 などの動物における主要な順行性輸送モーターを遺伝的に欠失している。そのため、薬理的証拠から複数の組織で微小管依存的なオルガネラ輸送メカニズムが示唆されているにもかかわらず、動物のキネシン-1 と同等な役割を果たす分子モーターは未だ同定されていなかった。そこで、微小管に依存した細胞内現象の研究に有用な基部陸上植物ヒメツリガネゴケ *Physcomitrium patens*（最近までは *Physcomitrella patens* と呼ばれていた）をモデルとし、植物の細胞内輸送におけるキネシンの役割を理解することを目的とした研究を行なった。

まずは巨大なオルガネラである細胞核の順行性輸送を担うモーターを同定するため、ヒメツリガネゴケで核の配置に関与することが知られていた植物特異的キネシン ARK (Armadillo Repeat-containing Kinesin) の解析を行った。ARK の機能を喪失した変異体を作成するため、CRISPR/Cas9 システムを利用し、ヒメツリガネゴケ ARK ファミリーの 4 つのパラログ遺伝子 (*ARKa*, *ARKb*, *ARKc*, *ARKd*) それぞれにフレームシフト変異を導入した。その結果、3 重変異体 (*ARKabc-1* 変異体), 4 重変異体 (*ARKabcd-1* 変異体) を含む、さまざまな組み合わせの多重変異体が生産された。*ARKa* または *ARKb* のいずれか 1 つのみに変異を持つ変異体では顕著な表現型は見られなかった一方、驚いたことに、*ARK3* 重変異体では核、葉緑体、ミトコンドリア、

小胞を含む複数のオルガネラの微小管プラス端側への動きが抑制されることを発見した。歩行活性を失った変異型の **ARK**、または積荷結合領域（テール）領域に存在するタンパク質-タンパク質相互作用モチーフ **ARM**（アルマジロリピート）を失った変異型の **ARK** コンストラクトの発現は、前述の細胞内オルガネラの分布異常をレスキューしなかった。さらに、**ARK** はテール依存的に核周囲へ局在化することができ、かつ、微小管上の長距離歩行活性を持つモーターであることが *in vivo, in vitro* で示された。これらの結果より、**ARK** がテール領域を介して積荷と相互作用し、その歩行活性によってオルガネラ輸送を遂行する主要な順行性輸送モーターである可能性が強く示された。

オルガネラ配置の表現型に加え、**ARK3** 重変異体はシビアな細胞成長の異常を複数の組織で示した。つまり、野生型のヒメツリガネゴケ細胞は円筒状の形態を示すが、**ARK3** 重変異体では先端成長速度が大幅に低下しており、その結果として細胞の長さが顕著に短縮していた。より深刻な表現型を示す **ARK4** 重変異体や **ARK3** 重変異体/**ARKd**RNAi 株においては、細胞の異常な膨張や異所的な成長点の形成が確認された。ヒメツリガネゴケの先端成長を駆動する細胞先端のアクチン構造を観察したところ、**ARK3** 重変異体ではその形成と維持が阻害されていることがわかった。更なる解析により、**ARK3** 重変異体ではフォルミン、Arp2/3 複合体を含むアクチン調節因子や、植物の Rho GTPases (Rop) を活性化する機能を持つグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である RopGEF3、RopGEF6 の細胞先端への局在化が減少していることがわかった。これらの極性因子の減少が表現型の原因であるかどうかを明らかにするため、RopGEF3 と **ARK** モータードメインが融合したコンストラクトを作成し RopGEF3 を強制的に細胞先端へ局在化させた。その結果、**ARK3** 重変異体が示す先端成長異常の表現型が大幅にレスキューされた。つまり、**ARK** の歩行活性が RopGEF の先端局在を促進し、下流の細胞先端アクチン構造の形成と維持に寄与する可能性が示唆された。

ARK ファミリー遺伝子は陸上植物で広く保存されているが、その機能が明らかになっている例は少ない。そこで、分子機能の保存性について検証するため、種子植物シロイヌナズナの **ARK** ホモログである At**ARK2**, At**ARK3** をクローニングし、ヒメツリガネゴケ **ARK3** 重変異体で発現させた。その結果、At**ARK2** はオルガネラ分布と先端成長を、At**ARK3** は先端成長の表現型を部分的にレスキューした。つまり、シロイヌナズナとヒメツリガネゴケの間で **ARK** の輸送モーターとしての役割が保存されていることが示唆された。

以上、本研究の結果より、ヒメツリガネゴケの **ARK** が多様な積荷を運搬し、成長において重要な機能を果たす植物の順行性輸送モーターであることが示され、その機能の一端は他の植物でも保存されていることが示唆された。