

## 別紙 4

報 告 番 ー	※      甲      第      号
------------	------------------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 **Kinesin-14** の機能解析を通した植物細胞内輸送機構の  
解明

氏 名 山田 萌恵

## 論 文 内 容 の 要 旨

微小管依存的な細胞内輸送は生物にとって重要な活動であり，動物細胞内では 2 種類の分子モーター，kinesin と細胞質ダイニンによって駆動される．Kinesin は微小管プラス端方向への輸送を，細胞質ダイニンはマイナス端方向への輸送を担い，2 つのモーターが協調して機能することで微小管上の両極性輸送が行われる．しかしながら，陸上植物は細胞質ダイニン遺伝子群を進化の過程で失ったため，微小管依存的なマイナス端方向性輸送がどのようにして行われているのかは不明であった．さらに，植物ではアクチンとミオシンによる原形質流動が細胞内輸送の主要な駆動力だと考えられており，微小管依存的な輸送機構が植物には存在しない可能性も考えられた．しかし近年，ヒメツリガネゴケ原系体細胞では核や微小管断片が微小管依存的に輸送されることが報告され，植物細胞内にも微小管依存的な細胞内輸送機構が存在することが示唆された．

そこで，陸上植物には細胞質ダイニンの代わりにマイナス端方向性輸送を担うモータータンパク質が存在するのではないかという仮説を立て，陸上植物で重度に重複した *kinesin-14* 遺伝子に着目した．Kinesin-14 はマイナス端方向に一歩だけ歩行できることで知られる特殊な kinesin である．本研究はヒメツリガネゴケに存在する 6 種の *kinesin-14* を網羅的に解析することで，仮説を検証した．

まず，生化学的解析と生細胞観察から class VI kinesin-14 である KCBP が試験管内と細胞内の両方で，クラスター化することでマイナス端方向への長距離歩行活性を獲得することを見出した．次に，*KCBP* 遺伝子破壊株を樹立し機能解析を行ったところ，*KCBP* は生育必須遺伝子ではなかったものの，細胞分裂直後の微小管依存的な核輸送や葉緑体配置に異常をきたした．また，KCBP は細胞質全体に分布することに加え，分裂直後には核周縁部に集積した．さらに，この時期の微小管極性は KCBP の

核輸送方向と一致していた。これらの結果は、KCBP が植物細胞内で複数のカーゴを輸送する微小管依存的なマイナス端方向性モーターとして機能していることを示唆している。

次に、Class I kinesin-14 である ATK が原糸体細胞内で微小管断片を輸送することを見出した。ATK は動植物で広く保存された kinesin-14 であり、Citrine-ATKa の動態観察を行ったところ、フラグモプラスト微小管上でマイナス端方向に長距離歩行する様子が認められた。また、細胞質微小管の観察から分岐型生成微小管輸送の際に、ATK が輸送起点に高頻度で局在することを見出した。ATK 完全遺伝子破壊株は取得できなかったため誘導型 RNAi 株を樹立し、分岐型生成微小管輸送を解析したところ、RNAi 株では輸送頻度の低下が認められた。これらの結果は、ATK が細胞質及びフラグモプラスト内で微小管断片を輸送するモーターであることを示唆している。

さらに、表現型解析とタンパク質の動態解析から、Class II kinesin-14 である KCH がプラス端方向性モーターである ARK と拮抗的に働く核輸送モーターであることを見出した。KCH はアミノ末端側に CH ドメインと呼ばれるアクチン結合領域を持つ kinesin-14 である。KCH 遺伝子破壊株の原糸体細胞では中心に位置するはずの核が細胞先端に異所的に局在する様子が認められ、原糸体細胞の先端成長も顕著に抑制された。KCH は微小管のプラス端とアクチンが集積する細胞先端で微小管と共局在し、KCH 遺伝子破壊株では微小管の集積が安定的に維持されなかった。さらに、KCH のトランケーションタンパク質を発現させた KCH 遺伝子破壊株では、核の配置異常は回復したが、先端成長抑制は回復しなかった。これらの結果は、KCH が核を輸送するマイナス端方向性モーターであると同時に、細胞骨格の架橋によって先端成長に寄与する多機能な kinesin であることを示唆している。

本研究によって、ヒメツリガネゴケに 6 種類存在する kinesin-14 のうち、3 種類がマイナス端方向性輸送モーターとして機能することが明らかとなった。陸上植物は、kinesin-14 の機能を進化の過程で多様化されることで、細胞質ダイニンの消失を可能にさせたのかもしれない。本研究の結果が、独自に進化した植物の細胞内輸送機構の重要な知見となることが期待される。

