

## 論文内容の要旨

申請者氏名 直井 国子

間期の植物細胞で特徴的に見られる表層微小管は細胞質表層の細胞膜内側に存在している。表層微小管は細胞の伸長方向に対して直角に配向することが知られており、表層微小管束の配向を薬剤や遺伝的変異で乱すと細胞はまっすぐに伸長できなくなることから、表層微小管束の配向が細胞壁のセルロース微繊維の配向を規定し、ひいては細胞の伸長方向を決定すると考えられている。一般的に、微小管には微小管付随タンパク質と呼ばれるタンパク質が結合しており、微小管の重合・脱重合や安定性、さらには高次の微小管構造の形成などに関わっている。これまで報告されているチューブリンや微小管付随タンパク質の変異株は細胞伸長が異常になったものが多いことから、申請者は微小管機能に関わる因子の変異株を得るために微小管重合阻害剤であるプロピザミドを低濃度添加した寒天培地上で根細胞が肥大する高感受性変異株をスクリーニングを行った。

シロイヌナズナ半優性変異株 *propyzamide hypersensitive1-1 (phs1-1)* は薬剤無添加の寒天培地上で育てると根が左巻きにねじれ、3  $\mu\text{M}$  の微小管重合阻害剤プロピザミドを添加した培地では根の表皮細胞は肥大し高感受性を示した。根の表皮細胞の表層微小管は、*phs1-1* 変異株では野生株に比べやや短く、右肩上がりの配向に変わっていた。*phs1-1* 変異株の根はプロピザミド以外の微小管重合阻害剤にも感受性を示した。この *phs1-1* 変異株の原因遺伝子を同定したところ、PHS1 タンパク質は C 末端に mitogen-activated protein (MAP) キナーゼを不活性化させる MAP キナーゼ・フォスファターゼの酵素活性部位と相溶性が高い領域を持っていた。*phs1-1* 変異株では N 末領域に 64 番目のアルギニンがシステインに変わるアミノ酸置換変異があった。動物の MAP キナーゼ・フォスファターゼの MAP キナーゼが結合する部位のアミノ酸配列は特徴的であり、*phs1-1* 変異株の変異が入っている領域にもこのアミノ酸配列の一部と類似したアミノ酸配列が存在していた。この配列はイネや他の高等植物の PHS1 アミノ酸配列にも存在していた。PHS1 タンパク質のフォスファターゼ活性を *in vitro* で測定したところ、野生型 PHS1 は人工基質を脱リン酸化する活性を示し、変異型 PHS1 も野生型の半分の活性を保持していた。PHS1 遺伝子内に T-DNA が挿入したヌル変異株 *phs1-2* は劣性の胚性致死を示した。野生株に *phs1-1* 変異株の PHS1 遺伝子領域を入れた形質転換体は *phs1-1* 変異株と同じ表現型を示し、*phs1-1* 変異株に野生型の PHS1 遺伝子領域を形質転換した植物体は表現型が野生型に戻った。従って、*phs1-1* 変異はドミナント・ネガティブに働く変異であると結論した。

以上のことから PHS1 は数種類の MAP キナーゼを不活性化する MAP キナーゼ・フォスファターゼで、その標的分子の 1 つが微小管の安定性に関係する MAP キナーゼではないかと推論した。この MAP キナーゼの不活性化がおこらないことにより、恐らく微小管付随タンパク質の活性制御異常を通して、表層微小管の安定性が低下したのではないかと考えた。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 直井 国子

真核生物で高度に保存されたタンパク質チューブリンはよく保存された微小管細胞骨格ポリマー構造を形成するが、このポリマーが種々の細胞内または細胞外刺激に応じて細胞内のどの場所に形成され、どのような高次の微小管構造をとるのかは、酵母、動物、植物で大きく異なっている。植物では微小管は細胞周期に応じて表層微小管束、前期前微小管、紡錘糸微小管、フラグモプラスト微小管など、多くは植物細胞に特異的な微小管構造物を形成する。間期植物細胞に見られる表層微小管束も細胞の伸長状態に伴い、その配向をダイナミックに変化させる。このような微小管の高次構造や動態は微小管に働く種々の制御タンパク質により調節されると考えられ、これらの制御タンパク質自身は細胞内外の刺激により主にリン酸化情報伝達系を通じて活性制御されることが酵母や動物での知見により明らかにされている。植物細胞においても、リン酸化酵素の阻害剤の投与実験により、酵母や動物細胞と同様の微小管の制御機構があるのではないかと想像されているが、その分子の実体はこれまで不明であった。

申請者は微小管薬剤に高感受性のシロイヌナズナ変異株を多数スクリーニングし、そのうちの1系統が新規フォスファターゼ遺伝子の変異であることを明らかにした。*phs1-1*と命名されたこの半優性変異株の根では表層微小管が野生株に比べて不安定になっており、低濃度の微小管重合阻害剤により微小管が脱重合してしまう。変異株ではMAPキナーゼを脱リン酸化するMAPキナーゼ・フォスファターゼ(MKP)に分類される新規タンパク質の1アミノ酸が置換されていた。興味深いことに、この変異アミノ酸は動物MKPで基質MAPキナーゼとの結合に重要であると報告されているアミノ酸残基であった。申請者はさらにPHS1フォスファターゼのヌル変異株は劣性の胚性致死であることを明らかにした。

申請者は以上の実験結果を基に、また動物MKPの知見などを参考にして、PHS1フォスファターゼの機能モデルを提唱している。このモデルによれば、PHS1は微小管の安定化に関わるMAPキナーゼと胚発生に関与するMAPキナーゼの両方に機能し、*phs1-1*変異株ではこのうち微小管機能関連MAPキナーゼの不活性化のみが低下している。

本研究により微小管阻害剤に対する感受性スクリーニングが微小管機能に関わるシグナル因子の変異株を得るのに効果的であることが示されたばかりでなく、これまで植物細胞骨格への関与が報告されていなかったMAPキナーゼ・カスケードの新たな標的を明らかにすることに成功した。

以上のように、本論文は植物の微小管機能に関わる新規のフォスファターゼを分子遺伝学的に解析したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。