

論文内容の要旨

申請者氏名 Wong Jeh Haur

Plant microtubule (MT) is a cytoskeleton that plays critical roles in establishing proper cell division patterns and directional cell expansion that ultimately generate organ and plant morphology. This dynamic polymer alternates stochastic phases of polymerization and shrinkage, and in interphase plasma membrane-bound MTs migrate cell cortex and interact each other, which facilitates organization of distinct arrays. MT-associated proteins (MAPs) regulate stability, dynamics, organization, and interactions with other cellular components, and are important for versatile functions of various MT arrays. Although a few dozens of plant MAPs have been discovered by biochemical, genetic, and homology-based approaches, only a fraction of these MAPs have been characterized. In this work, two novel plant-specific MAP families that have been recently discovered from cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana* have been characterized.

The BASIC PROLINE-RICH PROTEIN (BPP) family of plant-specific MAPs contain central highly basic regions, which in BPP1 was shown to be responsible for MT binding, and in *Arabidopsis* consists of seven members (BPP1 to BPP7). All seven BPP proteins fused to GFP were localized to cortical MTs. RT-PCR and promoter-GUS assays showed that, among the members, *BPP1* and *BPP5* are expressed mostly strongly, and *BPP2* is expressed relatively highly in several vegetative and reproductive organs. When several single and multiple mutant combinations were analyzed, the *bpp1 bpp5* double mutant and the *bpp1 bpp2 bpp5* triple mutant showed distinct morphological defects. In wild-type cotyledons and true leaves, pavement cells are highly inter-digitated and display complex jigsaw puzzle-like shapes. However, pavement cells in the double and triple *bpp* mutants do not develop into such complex shapes; in early stages of cell shape determination, local undulations of cell walls (lobe formation) is impaired. In wild-type cotyledon pavement cells, the lobe formation is facilitated by restricting growth at the convex side, with a presumed role of radiating MT bundles in this region. In the *bpp* mutants, these cortical MT bundles are not efficiently established. GFP-BPP1 preferentially localizes to emerging radiating MTs even before morphologically apparent lobe initiation. These studies indicate that BPP-family MAPs, especially BPP1 and BPP5, are required for the formation of transient MT arrays that radiate from the convex side of the developing lobes, and therefore for the formation of the jigsaw puzzle-like shapes of cotyledon pavement cells.

MAP55 (named after its molecular weight of approximately 55 kD) and its *Arabidopsis* homolog MAP55-Like (MAP55L) do not contain any functionally known motifs or domains. *In vitro* MT co-sedimentation assay with recombinant proteins showed that MAP55 and MAP55L bind MT directly. GFP-MAP55 particles tracked the growing plus ends of cortical MTs in *Arabidopsis* cells, independently of known MT plus-end tracking proteins in plants.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Wong Jeh Haur

微小管は真核生物に高度に保存された動的な細胞骨格であり、その高次構造、動態、他の細胞構造物との相互作用を変化させることにより、細胞分裂、細胞極性形成、オルガネラ移動など多様な細胞機能に重要な役割を果たしている。間期植物細胞においては、細胞膜内側に張り付いている表層微小管がセルロース合成酵素複合体の動きを制御することにより、セルロース微繊維の配向を決定し、肥大する細胞の伸長方向制御に主要な役割を担っていると考えられている。表層微小管の配置や安定性は多様な微小管付随タンパク質 (Microtubule-Associated Proteins; MAPs) により制御されるが、その性質が明らかになっている植物 MAPs は少数であり、多くの機能未知の MAPs の解析により、植物細胞の伸長方向とその結果としての植物細胞の形の制御機構が解明されると期待される。本論文では機能未知の2種類の植物特異的 MAP ファミリーを研究している。

本論文の第1章で、モデル植物シロイヌナズナに7遺伝子存在する Basic Proline-rich Protein (BPP)ファミリータンパク質がすべて植物細胞内で微小管に結合する新規 MAPs であることを示した。このうち、*BPP1*, *BPP2*, *BPP5* が植物体において多くの組織で強く発現していたことから、これら3つの遺伝子の機能欠損変異株の表現型を解析した。単独変異では強い表現型が見られなかったものの、*bpp1bpp5* 並びに *bpp1bpp2bpp5* の多重変異株では、軸器官の縦方向の細胞伸長が阻害され、子葉と本葉の表皮細胞に見られるジグソーパズル様の複雑な細胞形態が見られなかった。子葉表皮細胞におけるローブ (凸部分) の形成過程を詳細に観察した結果、*BPP1* と *BPP5* がローブ形成の初期段階で出現する放射状微小管構造体の形成し、最終的に発達したローブ並びにフラットな外面細胞壁を形成するのに必須の制御因子であることを見出した。ジグソーパズル様の複雑な表皮細胞の形を形成するには表層微小管が重要な役割を果たしていることは報告されていたが、この細胞形態の形成に必須の微小管制御因子が発見されたのはこの論文が最初である。ローブ形成には植物特異的な低分子 GTPase である Rho-of-Plants (ROPs) とそのエフェクターである RIC1 が関与することが知られており、これらのシグナル制御系と *BPP1* と *BPP5* の機能制御の関連に興味もたれる。

本論文の第2章では、別の新規 MAP ファミリーである *MAP55* と *MAP55L* の機能解析を報告している。特に、*MAP55* が伸長する微小管のプラス端に集積することを見出しており、興味深い。微小管プラス端集積 MAPs は植物ではほとんど解析が進んでおらず、今後のさらなる機能解析が期待される。

以上のように、本論文は機能未知の2種類の植物特異的 MAP ファミリーを分子生物学と細胞生物学を用いて研究したもので、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。