

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	地球生命物質科学専攻
学生番号 Student No.	51427205
氏名 Name	高谷彰吾

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

Arabidopsis NIMA-related kinase 6 regulates directional growth through cortical microtubule organization

(シロイヌナズナ NIMA 関連キナーゼ 6 は表層微小管を介して伸長極性を制御する)

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

細胞の成長極性の制御は、真核・原核を問わず、生物の成長と形態形成に不可欠であり、細胞構成成分の組織化という普遍的な問題を内包している。特に、植物の発生では細胞が移動しないため、個々の細胞がどの方向にどれくらい成長するかにより、器官全体の形が制御される。植物細胞の伸長方向は、細胞膜内側に局在する表層微小管が一定の方向に並ぶことで決定される。しかし、中心体をもたない植物細胞において、微小管配向を制御する分子機構は不明のままである。

また、細胞同士の成長がどのように調節され、器官全体を形作るのかという問題がある。これについては、器官の成長に伴ってその表面に張力が発生し、張力方向に微小管が配向することで、個々の細胞が協調して成長するというメカニカルフィードバック説が有力である。しかし、メカニカルフィードバックの制御機構や分子機構はほとんどわかっていない。本研究では、シロイヌナズナ NIMA 関連キナーゼ 6 (NEK6) に着目し、(1) 微小管が整列する機構、(2) メカニカルフィードバックの調節、の2点を解析し、成長極性を制御する新たな機構を見出した。

(1) NEK6 は余分な微小管を除去して配向を整え、細胞の伸長方向を制御する

nek6 変異体では、表皮細胞が側方へ異常に伸長して突起を形成する。胚軸細胞の成長解析から、NEK6 が異常な伸長を抑制すると共に、細胞伸長を促進することを示した。また、*nek6* 変異体では野生株と比べて微小管の配向が著しく乱れていた。微小管動態のライブセルイメージングと定量解析により、*nek6* 変異体では表層微小管が細胞膜から剥離し、曲がって変形しやすいこと、変形した微小管が他の微小管と交差・束化して固定化されることが示された。更に、NEK6 の微小管上での動態を解析したところ、NEK6 は脱重合する微小管末端に局在していた。特に、変形した微小管が脱重合する末端に蓄積していた。また、NEK6 を発現誘導すると、微小管の密度が低下して配向が異常になり、細胞伸長が顕著に抑制さ

れた。以上より、NEK6は変形した微小管を除去してその配向を整え、一定方向への細胞伸長を促進することが明らかになった。

NEK6はin vitroで β チューブリンをリン酸化するが、その機能は不明であった。NEK6の分子機能を解明するため、NEK6により β チューブリンをリン酸化し、質量分析により5つのリン酸化されるSer/Thr残基を特定した。これらのSer/Thrをリン酸化されないアラニン、またはリン酸化ミミックとなるアスパラギン酸へ置換し、GFPと融合した形で変異チューブリンを発現させた。その結果、Thr166をアラニンへ置換すると、 β チューブリンの微小管局在が顕著に促進され、Ser314, Thr366をアスパラギン酸に置換すると微小管に局在しなくなった。従って、これらの部位がNEK6によってリン酸化されると、微小管の脱重合が誘導されることが示唆された。まとめると、NEK6は β チューブリンをリン酸化することで変形した微小管を脱重合させ、微小管の配向を整えることが示された。

(2) NEK6は張力に対する微小管の応答を抑制し、細胞と器官の成長を協調させる

*nek6*変異体では、突起形成に先立って表層微小管が突起を取り巻くように同心円状に異常な配向を示すことを見出した。この微小管配向は1時間程度で素早く形成され、方向性の無いランダムな微小管配向が徐々に同心円状へと変化することがわかった。次に、膨圧を増減させて、細胞表面に負荷される張力を制御し、微小管配向への影響を調べた。低張液の水（膨圧と張力が増大）に浸すと同心円状の微小管配向が増加したが、マンニトール等張液（膨圧と張力が減少）に浸すと逆に減少した。次に、細胞の形とそれに伴う張力に沿って微小管が再配向するか調べるため、微小管再重合実験を行った。その結果、微小管を完全に脱重合した後でも、再び細胞の形に沿って同心円状の微小管が形成された。以上より、同心円上の配向は、細胞形態に沿った張力によって誘導されることが示された。*nek6*変異体では局所的な張力に微小管が過剰に応答し、同心円状の表層微小管が形成されて細胞の変形を促進し、これが更に同心円上の微小管配向を強化するという、張力を介した形態と微小管のフィードバックにより突起形成を引き起こすと考えられる。

次に、芽生えのタイムラプス観察を行った。野生型の胚軸はまっすぐ伸びるのに対し、*nek6*変異体の胚軸は屈曲しながら成長した。胚軸に重力刺激を負荷したところ、*nek6*変異体では胚軸が過剰に屈曲した。更に、重力負荷と同時に接触刺激を与えると、この屈曲は促進され、胚軸が1回転して成長した。従って、*nek6*変異体はメカニカルストレスに対して過剰に応答すると考えられた。そこで、胚軸細胞を一部除去し、除去部位を取り囲むように張力を発生させ、微小管の応答を定量した。その結果、*nek6*変異体の微小管は張力に過剰に応答することが明らかになった。また、張力応答が低下したカタニン変異体に*nek6*変異体を掛け合わせて2重変異体を作成したところ、カタニン変異体の表現型が回復した。以上の結果から、NEK6は細胞や器官・組織の形に沿って発生する局所的なメカニカルストレス（張力）に対して、微小管が過剰に応答しないように抑制することで、器官全体での細胞伸長を協調させると考えられる。