

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K23723

研究課題名（和文）植物の細胞内輸送機構を支える分子基盤の解明

研究課題名（英文）Analysis of the intracellular transport in plants

研究代表者

山田 萌恵（Yamada, Moe）

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：80848391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では顕微鏡観察に適した細胞を持つ基部陸上植物ヒメツリガネゴケをモデルとして用い、細胞内輸送機構の研究を行った。細胞内で物質を適切な場所に配置させるシステムである細胞内輸送は、細胞骨格と付随するモータータンパク質によって駆動される。植物細胞における細胞内輸送に関する知見は乏しく、今までに同定された輸送を駆動するタンパク質やアダプタータンパク質は限られている。そこで、植物細胞内輸送を支える分子機構の解明を目指し、モータータンパク質の網羅的解析を遂行した。その結果、細胞伸長や分裂期に機能するキネシンを発見するとともに、細胞内輸送異常を想起させる表現型を示す変異体も取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内で物質を適切な時期に適切な場所に配置させる細胞内輸送は細胞にとって必須機能の一つである。植物は進化の過程で独自の細胞内輸送システムを構築しており、動物細胞内で機能している輸送分子は植物ではあまり保存されていない。本研究における分子モーターの解析は、植物の独自の輸送システムを紐解く手がかりとなるものであり、さらなる責任分子の同定によって植物特異的な輸送システムの根幹に迫ることが可能になると考える。

研究成果の概要（英文）：Intracellular transport, the system that positions cellular materials in their proper locations in the cell, is driven by the cytoskeleton and motor proteins. However, the molecular mechanisms underlying intracellular transport in the plant cell remain obscure. In this study, we used the basal land plant, *Physcomitrium patens*, as a model system. Through comprehensive analysis of motor proteins, we identified kinesins that function during cell growth and mitotic cell division, and obtained mutants that exhibit phenotypes reminiscent of abnormal intracellular transport.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヒメツリガネゴケ 細胞内輸送 先端成長 微小管

1. 研究開始当初の背景

アクチンや微小管といった細胞骨格とそれに付随するモータータンパク質によって駆動される細胞内輸送は、細胞機能の維持に必須な物質輸送機構である。小胞やオルガネラ、タンパク質、RNA 等がカーゴ（積荷）として輸送されることが知られており、輸送モーターがカーゴに付属した特異的なアダプタータンパク質を認識して結合することで、精密に制御された物質輸送が可能となる。ところが、その生理的な重要性に関わらず、植物の微小管依存的な細胞内輸送の分子機構には未解明な部分が多い。興味深いことに、アクチンによる原形質流動が主要な輸送駆動力であると考えられてきた植物にも、微小管依存的な細胞内輸送システムが存在することが示された。そこで、遺伝学的ツールの利用が可能であり、顕微鏡観察に適した細胞を持つ基部陸上植物ヒメツリガネゴケを用いてイメージング解析を主とした研究を行うことで、植物細胞内輸送を支える分子基盤や制御機構の全容が見えてくると考えた。

2. 研究の目的

細胞内輸送は細胞に必須の生理的機能であるが、アクチンによる原形質流動が主要な輸送駆動力であると考えられてきた植物では、微小管依存的な細胞内輸送に関する知見は乏しく、責任分子の同定もあまり行われていない。本研究では、細胞内輸送の駆動力となるモータータンパク質と付随するアダプタータンパク質に着目し、CRISPR によるゲノム編集技術を駆使して網羅的に機能未知の候補タンパク質の解析を行い、細胞内輸送に関わる因子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では機能未知のキネシンとそのアダプタータンパク質に着目し、網羅的に機能解析を行った。ゲノム編集技術とヒメツリガネゴケの相同組換えを用いて機能欠損型変異体を樹立し、表現型解析を行った。興味深い表現型を示したキネシンについては、生化学的手法によって微小管に対する活性解析を行った。また、アダプターとして機能し得る候補因子の絞り込みを行うため、蛍光タンパク質を内在性タンパク質に付加して生細胞観察し、局在解析を行った。

4. 研究成果

(1) 微小管は重合と脱重合を繰り返す繊維状のタンパク質複合体であり、その動態は「動的不安定性」と呼ばれる。微小管の動態は様々な微小管付随タンパク質 (MAPs) によって制御されており、MAPs の機能欠損は微小管の動態変化を引き起こし、重篤な疾患につながることが知られている。キネシン 13 とキネシン 8 は動物でよく研究された MAPs であり、微小管の脱重合を引き起こす微小管脱重合因子として報告されている。ところが本研究の網羅的表現型解析により、植物のキネシン 13 とキネシン 8 は動物ホモログとは異なる表現型を示すことを見出し、以下の知見を得た。

- ① キネシン 13 とキネシン 8 の遺伝子破壊株では先端細胞の成長方向を司る微小管 foci (図 1 : 矢尻) が不安定になり、結果、細胞が湾曲する。
- ② キネシン 13 は細胞内で微小管のプラス端に局在し、微小管の動態パラメータを変

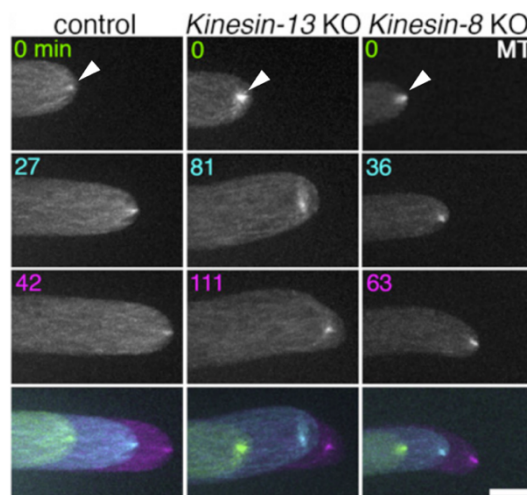


図 1: 先端細胞の微小管 foci

細胞内の微小管を GFP-tubulin で可視化した。矢尻は微小管の集積点である微小管 foci を示す。最下段は各タイムポイント画像の重ね合わせ像。スケールバーは 10 μ m を示す。

- 化させる(図 2 A)。
- ③ キネシン 13, 8 のどちらの遺伝子破壊株でも顕著な細胞分裂異常は認められないが、キネシン 13 の遺伝子破壊株では紡錘体長が短くなる(図 2 B)。
- ④ キネシン 13 の遺伝子破壊株では細胞分裂直前に核が細胞基底側側に移動する。

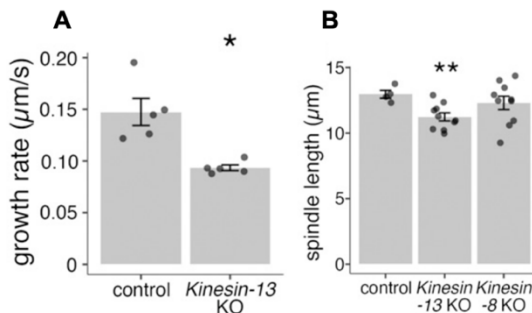


図 2: 微小管伸長速度と紡錘体長の定量結果

(A) EB1 タンパク質の挙動から微小管プラス端の細胞内伸長速度を定量した。N = 5 cells. P-value < 0.05 (Welch's two-sample t test)
 (B) 紡錘体長は分裂期中期で定量した。N = 10. P-value < 0.01 (Welch's two-sample t test)

キネシン 13 とキネシン 8 の遺伝子破壊株では分裂期の顕著な異常こそ認められなかったものの、キネシン 13 とキネシン 8 は微小管の動態制御を通じて細胞成長に寄与することがわかった。

キネシン 13 とキネシン 8 の遺伝子破壊株が細胞分裂異常を示さなかったため、これらキネシンが動物ホモログに見られるような強力な微小管脱重合活性を有するのかを検証した。大腸菌からそれぞれのモータードメインを精製し、微小管と混ぜて反応させたところ、どちらも微小管脱重合活性を示さなかった(図 3)。チューブリンを添加し、微小管が重合・脱重合を繰り返す条件下で実験したところ、キネシン 13 は弱い微小管脱重合誘導活性を示した。一方で、キネシン 8 はモーター活性を示した。キネシン 13 とキネシン 8 の活性は進化の過程で変化し、その機能や細胞分裂への寄与度も多様化した可能性がある。

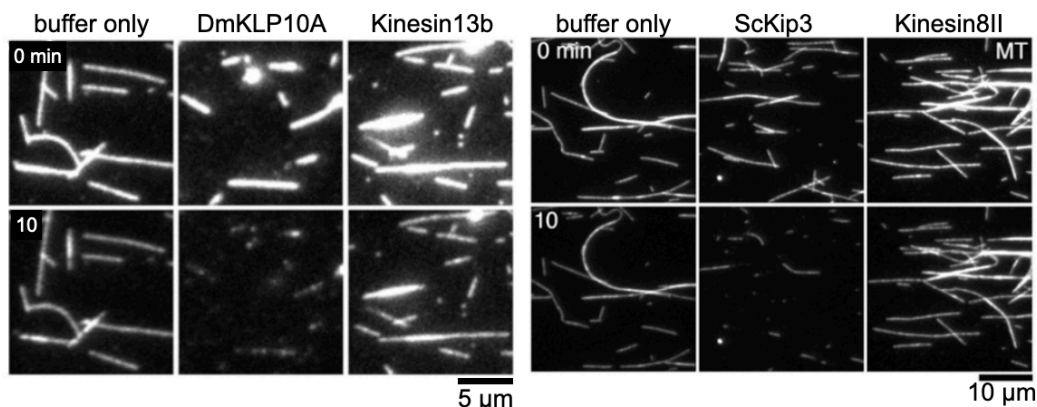


図 3: 試験管内微小管脱重合実験

GMPCPP 安定化微小管を用いた脱重合実験。ポジティブコントロールとしてショウジョウバエのキネシン 13 (KLP10A) と出芽酵母のキネシン 8 (Kip3) を用いた。

以上の結果より、キネシン 13 は強い微小管脱重合活性はもたないものの弱い脱重合誘導活性を持つこと、キネシン 13 の欠損によって微小管のダイナミクスが変化し結果として微小管長が変化することで紡錘体長の短縮や微小管 foci の不安定化が引き起こされることが示唆された。キネシン 8 も強い微小管脱重合活性は示さなかったが、キネシン 8 遺伝子破壊株では微小管のダイナミクスに変化が認められなかったことは、試験管内実験の結果と一致する。ただし、キネシン 8 遺伝子破壊株では先端細胞の微小管 foci が不安定になっていたため、今回は見出せなかった何らかの活性を介して微小管制御に貢献している可能性は否定できない。

報告したキネシン 8 とキネシン 13 は本研究で当初目的としていた細胞内輸送に関わる因子ではなかったものの、予想外の機能を明らかにすることができた(Leong, et al., 2020. Plant Cell)。動物のホモログで報告されていた活性を基づいて植物キネシン 8 や 13 の機能が議論されていた中で、植物細胞の表現型及び分子活性を検証し、植物ホモログ独自の機能を見出した意義は大きい。特に植物キネシン 8 の機能解析は報告されている限りでは初めてであり、今後、植物細胞の微小管制御機構を明らかにする上で重要な貢献になった。

- (2) 先行研究によって植物キネシン 14 である KCBP がヒメツリガネゴケ細胞内で葉緑体と染色体という異なる複数のオルガネラを輸送する輸送モーターであることが示された

(Yamada et al., 2017 Journal of Cell Biology)。KCBPには特徴的なドメインである MyTH4 と FERM があるが、これらドメインがどのように寄与することで細胞周期依存的な異なるオルガネラの輸送が遂行されているのかは不明であった。そこで各ドメインを欠損したトランケーションタンパク質を用いて表現型の相補実験を行うことでドメイン解析を実施した。その結果、FERM ドメインを構成する FERM-C が染色体と葉緑体の輸送に重要であることを見出した。FERM-C は脂質とタンパク質の相互作用面を形成する部位として報告されていることから、FERM-C がカーゴとモータータンパク質との相互作用に重要な領域である可能性が高い。また、解析の過程で KCBP 遺伝子破壊株では細胞分裂期後期における染色体の紡錘体極方向への移動が遅延することも見出した。染色体の移動方向が KCBP と同じマイナス端方向であることと、KCBP の過剰発現で染色体の移動速度が増加することから、KCBP は分裂後期に染色体を輸送するモータータンパク質であるというモデルを発表した (Yoshida et al., 2019. Cell Structure Function.)。

(3) 細胞内輸送を想起させる表現型を示すキネシン変異体の単離

キネシンの網羅的遺伝子破壊スクリーニングによって複数の多重遺伝子欠損株を樹立したが、樹立した変異体の中には細胞内輸送異常の表現型として予想された核や葉緑体の配置異常を示す個体は認められなかった。解析したキネシンはこれらの細胞内輸送には関わっておらず、別の因子が輸送に寄与している可能性が高い。ところが、樹立したいくつかの多重遺伝子欠損株の中には別の輸送異常を想起させる興味深い表現型を示す個体が確認された。これがどう細胞内輸送に寄与しているのかに関する分子メカニズムを明らかにするため、各種マーカータンパク質やトランケーションタンパク質を変異体に発現させ、イメージング解析を行った。今後は、相互作用因子の同定や生化学的活性解析によって詳細な制御機構の解明を目指したい。

(4) KLC の局在観察

キネシンとカーゴのアダプタータンパク質の候補である KLC (Kinesin Light Chain) は TPR モチーフを持つことで特徴づけられる。KLC について網羅的に解析するにあたり BLAST サーチにより TPR モチーフを持つ KLC 様タンパク質を 12 種類同定した。これら全てに対して内在タンパク質の局在解析を行ったところ、いくつかの KLC 様タンパク質がミトコンドリア局在や微小管局在といった興味深い局在パターンを示した。今後は、表現型解析や局在化機構の解析によって細胞内輸送との関与を検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 山田 萌恵	4. 巻 11
2. 論文標題 植物の微小管依存的な細胞内輸送機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 植物科学の最前線	6. 最初と最後の頁 143 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.11b4.00186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Mari W., Yamada Moe, Goshima Gohta	4. 巻 44
2. 論文標題 Moss Kinesin-14 KCBP Accelerates Chromatid Motility in Anaphase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 95 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Leong Shu Yao, Edzuka Tomoya, Goshima Gohta, Yamada Moe	4. 巻 32
2. 論文標題 Kinesin-13 and Kinesin-8 Function during Cell Growth and Division in the Moss Physcomitrella patens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 683 ~ 702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.19.00521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Moe Yamada, Shu Yao Leong, Tomoya Edzuka, Gohta Goshima
2. 発表標題 Kinesin-13 and kinesin-8 function during cell growth and division in the moss physcomitrium patens
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田萌恵
2. 発表標題 植物キネシンが制御する細胞内輸送機構の解明
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------