

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14540

研究課題名(和文)「植物のダイニン」探索

研究課題名(英文) Searching for the "plant dynein"

研究代表者

五島 剛太 (Goshima, Gohta)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：20447840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ダイニンは動物細胞で微小管上をマイナス端方向へと長距離歩行できる唯一のモータータンパク質であり、微小管上のカーゴ(積み荷)の逆行輸送(マイナス端方向への輸送)をはじめ、微小管が関与するほぼ全ての細胞内運動に必須の役割を果たす。ところが、植物は逆行輸送を遂行するにも関わらず、進化の過程でダイニン遺伝子を失った。では植物はどうやってこれらのプロセスを遂行しているのだろうか？本研究では、ヒメツリガネゴケを材料として、植物の逆行輸送モーターの同定に挑戦した。そして、陸上植物で高度に保存された3つのキネシン14(KCBP、KCH、ATK)が、核や葉緑体、そして微小管自体の逆行輸送を担うことを発見した。

研究成果の概要(英文)：In animal cells, the retrograde transport of intracellular cargo along microtubules is executed by the cytoplasmic dynein motor (retrograde transport is transport towards the minus end of the microtubule). Interestingly, however, land plants have lost the cytoplasmic dynein gene, despite that they execute retrograde transport. In this research, we aim to identify the motor(s) responsible for retrograde transport in plants. Using the moss *Physcomitrella patens*, we identified three kinesin-14 motor proteins (KCBP, KCH, ATK) that were required for retrograde transport of the nucleus, chloroplast, and microtubule itself in the moss cytoplasm.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞内輸送 微小管 ヒメツリガネゴケ キネシン

1. 研究開始当初の背景

動物細胞において、微小管上の物質輸送を担うモーターはキネシンと細胞質ダイニン (以下、単に「ダイニン」と記す) である。キネシンは微小管のマイナス端からプラス端方向へ、ダイニンはその逆方向に長い距離「歩く」ことにより、結合するカーゴ (積み荷) の運搬を担う。動物にはダイニン遺伝子は1つしか存在せず、マイナス端方向への輸送 (逆行輸送) のすべてを担っている。ところが興味深いことに、全ゲノムが解読された結果、陸上植物にはダイニンが全く存在しないことが判明した。植物はダイニンを使わずにどのように細胞質内でカーゴを運搬するのだろうか?

有力な仮説は、植物ではこれらのプロセスは専らアクチンとミオシンが担うというものであった (例: 原形質流動)。ところが我々は最近、ヒメツリガネゴケの原糸体において、細胞内の構造体が微小管上を逆行輸送される様子を観察した。植物には、ダイニンと同等の役割を果たす未同定の微小管歩行モーターが存在することが強く示唆された。

2. 研究の目的

ダイニンは動物細胞で微小管上をマイナス端方向へと長距離歩行できる唯一のモータータンパク質であり、微小管上のカーゴ (積み荷) の逆行輸送 (マイナス端方向への輸送) をはじめ、微小管が関与するほぼ全ての細胞内運動に必須の役割を果たす。ところが、植物は同様の微小管依存的プロセスを有するにも関わらず、進化の過程でダイニン遺伝子を失った。では植物はどうやってこれらのプロセスを遂行しているのだろうか? 本研究では、ヒメツリガネゴケを材料として、植物の逆行輸送モーターの同定に挑戦する。これまで知られていない新しいタイプのモーターの発見に成功すれば、植物における微小管依存的プロセスの分子機構研究の突破口となるのみならず、分子モーターの生物物理学や細胞工学的応用研究にも新たな一分野を提供しうる。

3. 研究の方法

本研究では、2つのアプローチを並行して進めた。いずれかの方法で植物の逆行輸送モーターの同定に辿り着くことを目指した。

(1) ヒメツリガネゴケに6種類存在するキネシン14サブファミリーに絞った活性解析 (生化学アプローチ)
精製したGFP融合キネシン14タンパク質の微小管上での長距離歩行の有無を試験管内1分子歩行アッセイで検証した。

(2) キネシンファミリー全体の網羅的機能解析 (細胞生物学アプローチ)
キネシンに対する誘導型RNAi株や遺伝子破壊株において、微小管依存的に輸送され

るオルガネラの経時動態観察を行い、異常が出るものを探索した。また、GFP融合キネシン発現株ライブラリーを逐一観察することで、細胞内の微小管上を長距離歩行するキネシンを探索した。

4. 研究成果

(1) ヒメツリガネゴケに6種類存在する14型キネシンについて、試験管内運動アッセイを通じて分子活性を網羅的に決定した。またその中のKCBPタンパク質については細胞内での動態を斜光照明蛍光顕微鏡法により追跡した。その結果、KCBPタンパク質がクラスター化することで微小管上をマイナス端方向へと長距離歩行することを見出した。この動きは動物や菌類のダイニンモーターで認められるものと同様であり、ダイニンを失った植物における代替モータータンパク質の候補を提唱できたことになる。この成果はNature Plants誌に発表し (Jonsson et al. 2015)、複数の学術誌でハイライトとして取り上げられた。

(2) (1)の結果から、KCBPがダイニン様の機能を担うモーターではないかと予想した。この仮説を検証するため、パラログが4つ存在するKCBPの完全遺伝子破壊株を樹立し機能解析を行った。KCBPは生育必須遺伝子ではなかったものの、四重遺伝子破壊株では原糸体細胞の成長遅延が認められ、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、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。さらに、配置異常が認められた葉緑体は微小管のプラス端側が配向する細胞先端に集積しており、マイナス端方向への輸送がなくなったため、プラス端側にカーゴが集積するというモデルに一致していた。KCBPにはFERMドメインと呼ばれる膜結合ドメインが存在しており、二つの異なるオルガネラがカーゴとして示唆されたことから、膜とKCBPが直接結合する可能性が考えられた。そこで、リン脂質からなるリポソームを作製し、KCBPとの結合を調べた結果、酸性脂質特異的にKCBPがリポソームに結合することが示された。これらの結果は、KCBPが植物細胞で複数のカーゴに直接結合し輸送を行う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。

一方、微小管から新たに生成された短い微小管は一定の頻度で微小管上をマイナス端方向へ輸送されることが当研究室の先行研究によって明らかにされていた。この輸送を担うモーターとして、I型キネシン-14であるATKを見出した。これらの成果は、「植物のダイニン」が複数のキネシン14タンパク質であることを示唆しており、これらの議論を含めた論文をJ Cell Biol誌に発表した (Yamada et al. 2017) (図1)。

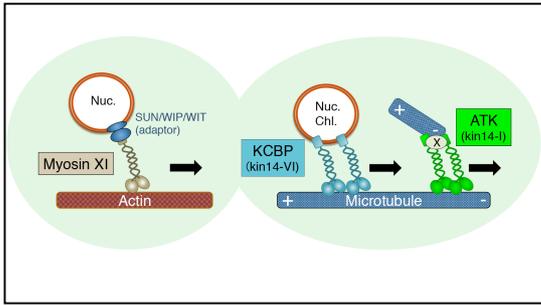


図 1 ヒメツリガネゴケ細胞で見出された、複数のキネシン 14 によるカーゴ運搬 (右)。左はシロイヌナズナで知られたミオシン・アクチンによる核輸送 (Yamada et al. J Cell Biol. 2017 より)。

(3) キネシン 14 の一つである KCBP タンパク質が細胞内の一部のオルガネラの逆行輸送を担うことが明らかとなったが、キネシン 14 サブファミリーの中にはまだ機能が明らかにされていない遺伝子もいくつか存在し、それらもまた逆行輸送を担っている可能性も考えられたため、他のキネシン-14 についても詳細な解析を行った。

KCH タンパク質はアミノ末端側にカルポニンホモロジー (CH) ドメインを持つことで特徴付けられる II 型キネシン-14 である。被子植物の KCH は微小管とアクチンの両方に結合する活性を持つことが報告されているが、高い遺伝子重複が問題となり遺伝学的解析は部分的であり、その機能の全貌は不明であった。そこで、ヒメツリガネゴケで 4 つ存在する KCH の局在解析、表現型解析を行った。すなわち、KCH 遺伝子産物をそれぞれ GFP で可視化して細胞内動態を調べるとともに、相同組換えを用いて 4 つすべてを遺伝子破壊したトランスジェニック株を作成して細胞内の動態を観察した。以下の新しい知見を得た。

- 1) KCH は原糸体頂端細胞の先端に局在すること
- 2) 細胞先端で細胞骨格の集合体の安定的な維持に必要であること
- 3) 細胞周期の大部分で、核の逆行輸送に寄与していること

細胞伸長には微小管とアクチンの両方が必要とされること、KCH が微小管とアクチンの両方に結合する活性を持つことから、KCH は核の輸送を担うとともに微小管とアクチンを架橋することで細胞伸長に寄与するキネシンである可能性がある。一方、興味深いことに、アクチン結合能を有する CH ドメインを欠いた KCH も野生型と同様の機能を保持していることもわかった。これらの成果は現在、論文を投稿中である (Yamada and Goshima. Submitted)。

(4) 研究全体を通じて、「植物のダイニン」についての重要な知見が得られた。すなわち、動物や菌類が担うカーゴ輸送について、ダイ

ニンを失った植物では少なくとも 3 つの種類のキネシン 14 が担っているというものである。興味深いことに、うち 2 種は植物で特異的に進化したものであり、植物ではキネシン 14 を重複、進化させることでダイニンの欠失を補ったのかもしれない。

(5) これらの研究成果も踏まえて、我々は、動植物で微小管機能や細胞分裂機能を担う因子にどれくらいの保存性があるのかを調べ、総説として発表した (Yamada and Goshima. Biology. 2017)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Yamada M, Tanaka-Takiguchi Y, Hayashi M, Nishina M, Goshima G. (2017) Multiple kinesin-14 family members drive microtubule minus-end-directed transport in plant cells. 査読有
J. Cell Biol. 216(6):1705-1714
DOI:10.1083/jcb.201610065

②Yamada M, Goshima G. (2017) Mitotic Spindle Assembly in Land Plants: Molecules and Mechanisms. 査読有
Biology (Basel). 6(1)
DOI:10.3390/biology6010006

③Yamada M, Miki T, Goshima G. (2016) Imaging mitosis in the moss *Physcomitrella patens*. 査読有
Methods Mol Biol. 1413:263-282
DOI:10.3390/biology6010006

④Jonsson E, Yamada M, Vale RD, Goshima G. (2015) Clustering of a kinesin-14 motor enables processive retrograde microtubule-based transport in plants. 査読有
Nat Plants. 1:15087
DOI:10.1038/nplants.2015.87

[学会発表] (計 13 件)

①山田萌恵 (2107) Multiple kinesin-14 family members drive microtubule minus-end-directed transport in plant cells.
第 69 回日本細胞生物学会大会

②五島剛太 (2016) Multiple kinesin-14 family members provide the retrograde transport mechanism in plants.
Gordon Research Conference: Plant & Microbial Cytoskeleton

③五島剛太 (2016)

Evidence for kinesin-14-dependent retrograde transport in plants that naturally lack cytoplasmic dynein genes. EMBO|EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems

④五島剛太 (2015)

「植物ダイニン」の探索
植物細胞骨格研究会

⑤五島剛太 (2015)

Functions of microtubules and motors in plant cells: A live-cell microscopy approach using the moss *Physcomitrella patens*.
10th International Botanical Microscopy Meeting

[その他]

ホームページ等

五島研究室ホームページ

<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~tenure2/goshima.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五島 剛太 (GOSHIMA, Gohta)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20447840