

## 論文内容の要旨

申請者氏名 中村 守貴

植物の重力屈性反応は、地上部は重力方向とは逆向きに（負の）、地下部は重力方向（正の）に生長を制御するという、環境適応のための重要な生存戦略の一つである。重力屈性反応の重力感受においては、感受細胞でのアミロプラストの重力方向への沈降が重要なイベントであると考えられている。本研究では、シロイヌナズナ花茎重力屈性異常変異体 *sgr* (*shoot gravitropism*) 9 変異体を解析することにより、重力感受の分子メカニズムの解明を目指した。

*sgr9* は花茎重力屈性能が低下した劣性変異体である。*sgr9* の花茎は、伸長が正常で、光屈性を示すことから、重力屈性に特異的な反応過程に異常が生じていると考えられた。*SGR9* 遺伝子は RING finger タンパク質をコードする遺伝子 At5g02750 であり、*sgr9* は RING finger ドメイン直前にナンセンス変異を生じた変異体であった。*SGR9* は花茎において主に重力感受組織である内皮で発現することを示すと共に、内皮特異的な *SCR* プロモーターを用いて内皮細胞での *SGR9* の発現が重力屈性に十分であることを示した。多くの RING finger タンパク質はユビキチン E3 リガーゼとして機能することが知られている。*in vitro* の解析により、*SGR9* はユビキチン E3 リガーゼ活性を持つことを示した。次に、*SGR9* の細胞内局在を解析するため、*SGR9*-GFP を *sgr9* に導入したところ、機能的であるにも関わらず、GFP 蛍光は検出できなかった。*SGR9*-GFP が自己ユビキチン化により不安定である可能性を考え、E3 リガーゼ活性を失わせる変異を RING finger ドメイン内に導入したところ、GFP 蛍光はアミロプラスト上に検出された。以上の結果より、*SGR9* は内皮細胞のアミロプラスト上で、E3 リガーゼとして機能することにより重力感受に関与することが示唆された。

そこで、内皮細胞内のアミロプラスト動態の解析を行なった。野生型では、アミロプラストは少数が跳躍的に動き、多数が細胞の下部に沈降するのに対して、*sgr9* では、アミロプラストは多数が跳躍的な動きをし、重力方向への偏りが少なかった。また、野生型では重力刺激後にアミロプラストが新たな重力方向へ移動するが、*sgr9* では重力方向への移動は見られなかった。アミロプラストの跳躍的な動きは F-アクチン依存的事であることが明らかにされている。そこで、*sgr9* のアミロプラスト沈降異常に F-アクチンが関与する可能性を考えた。F-アクチン形成阻害を引き起こす *ACT8* の優性変異 *fit1* を用いた解析および F-アクチンとアミロプラストの同時イメージングにより、*sgr9* ではアミロプラストと F-アクチンとの相互作用に異常が生じ、跳躍的運動が増加し、アミロプラストが沈降しなかったことを示した。本研究から、*SGR9* はアミロプラスト上で E3 リガーゼとして機能し、アミロプラストと F-アクチンとの相互作用を調節するというモデルを提示した。おそらく *SGR9* はアミロプラストを F-アクチンから解離することで、跳躍的運動を減少させ、アミロプラスト沈降を促すと推測している。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 中村 守貴

固着生活を営む植物は、環境の変化を鋭敏に察知し、器官形成や成長の制御に反映させる生存戦略をもつ。「屈性」と呼ばれる成長運動は、光、重力、水分、接触などの環境刺激の方向を認識した上で起こる、方向性を持つ成長反応である。重力屈性は、1) 重力方向変化の認識（重力感受）、2) 生化学的信号への変換、3) 細胞間の刺激伝達、4) 器官の偏差成長、という一連の過程からなる。この中で重力感受は最も初期に起こる重要なイベントである。しかし植物がどのように重力変化を感受するか未だに大部分が不明である。現在、最も有力な植物の重力感受モデルは「デンプン平衡石仮説」と呼ばれるもので、デンプンが蓄積した色素体であるアミロプラストが、重力方向に沈降することで重力変化を感受すると考えられており、これまでに幅広い支持を得ている。平衡石という言葉が与える印象とは対照的に、地上部の重力感受細胞におけるアミロプラストの運動は非常に複雑で、密度差による沈降だけでは説明できない。また、このように複雑なアミロプラストの動態制御を担う分子実体についてはほとんど知られていなかった。

申請者は、シロイヌナズナ花茎重力屈性変異体 *sgr9* の解析を通して、SGR9 がアミロプラスト動態の制御に関わることを明らかにした。まず申請者は、花茎重力屈性異常を示す *sgr9* 変異株の原因遺伝子が、重力感受細胞である内皮細胞で発現し機能する、RING finger ドメインを持つ E3 リガーゼタンパク質をコードすることを見いだした。また *in vitro* 系を用いて、SGR9 の RING finger ドメインは実際に E3 リガーゼ活性を持つことを明らかにした。更に、GFP 融合蛋白質を発現する形質転換植物を用いて、SGR9 はアミロプラスト上に存在する可能性が高いことを示した。次に申請者は、SGR9 がアミロプラスト上でどのような役割を持つのかを、細胞生物学的な解析を進めた。その結果、*sgr9* はアミロプラスト動態に異常を示し、その異常には F-アクチンが関与する可能性が高いことを見いだした。そこで、分子遺伝学的手法で F-アクチン形成を阻害した時の、野生型及び変異体のアミロプラスト動態、屈性反応について詳細に比較を行った。以上の結果により、野生型内皮細胞において観察される複雑なアミロプラスト動態において、ケーブル状の F-アクチンと相互作用して早い運動を行うアミロプラストは、やがて SGR9 の働きによりその相互作用が弱められ、その高い比重に応じて重力方向へ沈降するというモデルを提示した。

以上のように、本論文は植物の重力感受における平衡石動態制御の分子メカニズムの一端を解明した点で、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。