

## 論文内容の要旨

申請者氏名 橋口 泰子

高等植物ゲノムの解読以降に行われた逆遺伝学的解析により、植物細胞の液胞へ至る小胞輸送経路には、酵母の順遺伝学的解析によって既に同定されていた因子のオルソログが、酵母と同様の輸送経路で関与していることが示された。しかしながら、植物のゲノムにおいて、これらの因子の多くは重複し、酵母や動物より多数のパラログを持つ。このことから、植物の液胞は酵母/動物の液胞/リソソームより多様化した液胞生成および液胞機能のための分子基盤を持つ可能性が示されたが、パラログ間の機能重複のため、従来の順遺伝学的手法ではパラログの個々の機能を解析することは難しいという課題が生じた。一方、バルブやシートといった液胞膜の動的構造の形成、維持に関与する因子については極めて報告が少なく、さらにこれらの構造の生理機能も正確にはわかっていない。そこで植物液胞の特異性を支える分子基盤やその高次機能における役割を明らかにすることを目的に、シロイヌナズナの花茎の重力屈性を指標として単離された因子の分子遺伝学的解析を行った。

シロイヌナズナの形態と花茎の重力屈性に異常を示す *zigzag* (*zig*) は、液胞へ至る小胞輸送経路において機能する Qb-SNARE VTI11 の欠損変異体である。*zig* の表現型を抑圧する *zig suppressor3* (*zip3*) の原因遺伝子は、出芽酵母において逆行輸送に機能するレトロマー複合体の構成因子 *Vps35* のオルソログ *VPS35A* であることを示した。レトロマーの別の構成因子と予想される *VPS29*, *VPS26A* の機能欠損が *zig* 変異を抑圧したことから、3 つのタンパク質がおそらく同じ経路でレトロマーとして機能する可能性を示した。シロイヌナズナのゲノムには *VPS35* のパラログ (*VPS35B*, *C*) が存在する。*zig* 変異抑圧を指標として、各 *VPS35* パラログの機能を比較した結果、*VPS35A* と *B* あるいは *C* とでは、遺伝学的機能が異なることを示すと共に蛋白質の機能も異なる可能性を示した。

弱い重力屈性を示す変異体 *shoot gravitropism6* (*sgr6*) の重力感受細胞において液胞形態に異常が見られたことを契機に、*SGR6* と液胞機能の関連を探った。*sgr6* の原因遺伝子を同定し、発現解析を行った。花茎において *SGR6* は表皮、内皮、維管束、維管束間繊維細胞に発現するが、重力屈性において機能するのは内皮であることを示した。変異体の内皮細胞でのアミロプラストおよび液胞膜動態を詳細に解析した結果、*SGR6* は液胞膜動態の制御を介してアミロプラストの重力方向への移動に大きな影響を与えており、これにより重力屈性に関与すると結論した。*SGR6* は複数の HEAT repeat 以外に機能を類推させるドメインを持たない。また類似した遺伝子は高等真核生物に保存されているが、機能に関する報告はなかった。*SGR6* は主に膜画分に存在し、*SGR6*-GFP を用いた解析では、液胞膜局在性を示す。以上の結果から、*SGR6* はシロイヌナズナの内皮細胞において、液胞膜の動的構造の形成/維持に関与する新規因子である可能性を示した。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 橋口 泰子

植物の様々な組織、器官において、成熟した細胞の液胞は、細胞体積の 80~90% を占め、植物細胞の特徴的なオルガネラの一つである。高等植物細胞の液胞は、細胞内空間の充填、分子の貯蔵等の細胞レベルの機能のみならず、胚発生や成長、老化、防御応答といった高次の生理機能においても重要な役割を果たす。

申請者はまず、このような液胞の多様な機能がどのような分子基盤により裏打ちされているのか興味を持ち、シロイヌナズナの形態と花茎の重力屈性に異常を示す *zigzag-1* (*zig-1*) の表現型を部分的に抑圧する *zig suppressor3* (*zip3*) の解析を行った。最初に、*zip3* は *VPS35A* の loss-of-function 変異であることを明らかにした。*VPS35A* は、酵母において PVC から TGN への逆行輸送に関わるレトロマー複合体の大サブユニットの構成因子である *VPS35p* のオルソログである。シロイヌナズナにも、大サブユニット構成因子は保存されており (*VPS26A, 26B, 29, 35A, 35B, 35C*)、*VPS29* 以外の遺伝子はゲノム中に複数コピー存在している。*vps29* 変異、*vps26a* 変異が *zig-1* の変異を抑圧することを示し、*VPS35A, 29, 26A* は、その欠損変異が *zig* を抑圧するという共通の機能を持ち、おそらくレトロマー複合体として共に機能している可能性を示唆した。PVC-TGN の逆行輸送機能の低下が、VTI11 の機能欠損を抑圧する分子メカニズムに関しては、PVC-TGN 間を循環していると考えられる VTI12 が、*zip3* 変異による逆行輸送能の低下の影響でその局在を変え、VTI11 の機能を代替する可能性を示した。更に、*vps35b, vps35c, vps26b* 変異については、*zig-1* の変異を抑圧しないことを示し、*VPS35* 及び *VPS26* のホモログ間で遺伝学的な機能が異なることを明らかにした。また、*VPS35* パラログについてさらに詳しい解析を行ない、*zig-1* 変異抑圧に関して遺伝学的には若干の機能重複があるが、分子機能としては同一ではないことを示した。植物における細胞生物学ではしばしば確たる根拠なく機能的に同一視されるパラログ間の機能分化の可能性を、分子遺伝学を用いて示した点において独創性が高く、高等植物における逆行輸送経路の複雑性を示唆した本研究は、2010 年 *Plant Cell* 誌に掲載された。

申請者は上記の研究の過程で、植物の液胞が示すダイナミックな構造変化と高次の生理機能の関連に興味を持ち、液胞膜動態に関わる因子 *SGR6* の解析に着手した。変異体の原因遺伝子の同定を行い、重力感受細胞での機能が重力屈性に必要であること、膜結合性蛋白質であり液胞膜近傍に局在すること、等を明らかにした。野生型と変異体の重力感受細胞における液胞膜動態の詳細な解析から、*SGR6* は液胞膜の動的構造の形成と維持に関わる可能性の高い新奇因子であることを示した。

以上のように、本論文は植物細胞の液胞機能に関わる小胞輸送の多様性および液胞膜動態制御の分子基盤の一端を解明したもので、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。