

(様式第 1 3 号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: 田中 優史

題目: Functional analysis of two Arabidopsis COPII components, AtSec24B and AtSec24C, in gametogenesis

(配偶体形成における二種類のシロイヌナズナCOPII構成因子、AtSec24B及びAtSec24Cの機能解析)

真核細胞において小胞体(ER)膜上で合成されたタンパク質は分泌経路を経てそれぞれに定められた細胞内または細胞外区画へ運搬され、細胞活動に重要な役割を果たしている。分泌経路の初発であるERからゴルジ体へのタンパク質輸送はcoat protein complex II (COPII)に覆われた膜小胞が担っている。そのCOPIIは低分子量GTP結合タンパク質であるSar1と2種類のタンパク質複合体(Sec23/24複合体, Sec13/31複合体)から構成される。小胞の形成はこれらのタンパク質の連続的な会合によって起こる。まずSar1がGTPと結合することによって活性化され、ER膜上に結合する。この活性型Sar1を目印としてSec23/24複合体が集合し、同時に小胞内に取り込まれるべきタンパク質(積荷)を選択的に捉え、出芽前複合体を形成する。さらに、この出芽前複合体どうしをSec13/31複合体が架橋することにより、膜の湾曲が進み小胞の出芽が起こる。Sec24は積荷と直接結合することで、COPII小胞に取り込むべき積荷の認識を行っていると考えられている。このようなCOPII小胞を用いたタンパク質輸送は酵母や哺乳類細胞を用いた研究によって明らかにされており、植物においても保存されていることが示されている。

シロイヌナズナのゲノムには3種類のSec24ホモログ(AtSec24A, 24Bと24C)が存在することが知られている。AtSec24Aの機能はよく特徴づけられているが、AtSec24Bと24Cは塩基配列が予想されているのみである。そこで、著者はAtSec24Bと24Cの塩基配列を決定した。その結果、AtSec24Bと24CはSec24ファミリーに特徴的なドメインが保存されていることが示された。また、3種類のSec24ホモログ (AtSec24s) についてレポーターを用いた発現部位解析と細胞内局在解析を行った。その結果、すべてのAtSec24が細胞内でCOPIIに特徴的な分布を示し、ほとんどの組織で発現することが示された。さらに、シロイヌナズナの発達におけるAtSec24Bと24Cの機能を明らかにするために、AtSec24Bノックアウト株(*atsec24b-1*)とAtSec2

4Cノックダウン株(*atsec24c-1*)を単離した。*atsec24c-1*は異常を示さなかったが、*atsec24b-1*では花粉管の発芽率の低下が示された。また、それらの株の交配によって、AtSec24Bと24Cの著しい減少が雄性配偶体である花粉で第一有糸分裂後の発達停止を引き起こし、雌性配偶体である胚嚢においても様々な段階での発達停止を引き起こすことが示唆された。

次に、著者は多重形質転換が可能な新規薬剤耐性マーカーを持ったGatewayバイナリーベクターの開発を行った。現在、植物研究の進展によって様々な遺伝子導入植物が作製されており、既存の遺伝子導入植物にさらに遺伝子導入を行うことが必要となっている。例えば、上記の実験において、*atsec24b-1*と*atsec24c-1*は破壊株選抜マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を有しており、*atsec24b-1*の相補のためにハイグロマイシン耐性遺伝子をもったベクターを用いて形質転換体を作製した。*atsec24b-1*と*atsec24c-1*の交配株を相補させるためにその形質転換体さらにAtSec24Cを導入しようとした場合、カナマイシンやハイグロマイシンとは異なった薬剤に対する選抜マーカーをもったベクターを用いる必要がある。糖タンパク質の糖鎖合成に関与するUDP-*N*-acetylglucosamine: dolichol phosphate *N*-acetylglucosamine-1-P transferase (GPT)は、シロイヌナズナで高発現されることによって、糖鎖合成の阻害剤であるツニカマイシンに対して抵抗性を与えることが知られている。そこで、著者は新たな選抜マーカーとしてGPT遺伝子をもつ植物形質転換用バイナリーベクターの開発を行った。本ベクターシリーズでは既存のpGWBシリーズと同様の2種類のシステム (pGWBとR4pGW B) が取り入れられ、16種類のレポーターまたはエピトープタグも利用可能である。シロイヌナズナを用いた有用性試験の結果から本ベクターによる形質転換体は0.15 mg L<sup>-1</sup>のツニカマイシンを含む培地によって最も効果的に選抜されることが示された。

以上の結果から、AtSec24Bと24CはCOPIIとして機能し、雌雄両方の配偶体形成に重複して関与していることが明らかにされた。また、開発されたツニカマイシン耐性バイナリーベクターはより多彩な多重形質転換体の作製に利用でき、今後の形質転換体を用いた植物研究の発展に貢献すると期待された。