

学位論文審査の結果の要旨

氏名	田中 優史
審査委員	<p>主査 中川 強 (印)</p> <p>副査 川向 誠 (印)</p> <p>副査 松井健二 (印)</p> <p>副査 板井章浩 (印)</p> <p>副査 西村浩二 (印)</p>
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)
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>細胞内小胞輸送は全ての真核生物において必要不可欠な重要な仕組みであり、また近年様々な生命現象に深く関与することが示されてきている。申請者は植物における小胞輸送の機能に興味を持ち、分子遺伝学的解析が可能なシロイヌナズナを材料として、特に小胞輸送のスタート地点である ER 膜からの小胞出芽を促す因子に着目した研究を進めた。これらの研究は植物分野で非常に重要な配偶体形成の研究へと進展し、配偶体形成における小胞輸送の重要性を明らかにすることとなった。</p> <p>酵母や哺乳類における研究により、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) に覆われた小胞によって行われることがわかっている。COPII は低分子量 GTP 結合タンパク質 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。まず Sar1 が GTP と結合して活性化され ER 膜に結合し、これを目印として Sec23/Sec24 複合体が集合する。この時に小胞内に積荷タンパク質も捉えられ、出芽前複合体が形成される。さらに出芽前複合体が Sec13/Sec31 複合体により架橋されることで膜の湾曲が進み小胞が出芽する。Sec24 は積荷タンパク質と直接結合して積荷の認識を行っていると考えられている重要な因子であり、本研究ではシロイヌナズナの Sec24 ホモログに着目した解析が行われた。</p> <p>シロイヌナズナゲノムには Sec24 ホモログが 3 種 (AtSec24A、AtSec24B および AtSec24C) 存在し、AtSec24A の解析は行われていたものの、AtSec24B および 24C は塩基配列情報のみが知られていた。本研究ではまず AtSec24B および 24C の cDNA の同定が行われ、データベースに登録されていた配列に誤りがあることが見出された。その後正しい配列によるアライメント解析が行われ、Sec24 に特徴的なドメイン、シロイヌナズナ Sec24 に特異的なドメインがあきらかにされた。次いで 3 種類の AtSec24 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が行われた。その結果 3 種の AtSec24 が植物の殆どの組織で発現し、また細胞内において COPII に特徴的な分布を示すことがあきらかにされた。さらにシロイヌナズナの発達における AtSec24B と 24C の機能を解明するため、AtSec24B ノックアウト株 (<i>atsec24b-1</i>) と AtSec24C ノックダウン株 (<i>atsec24c-1</i>) が単離され解析された。<i>atsec24c-1</i> では異常は観察されなかったが、<i>atsec24b-1</i> では花粉管発芽率の減少が見出された。また、両者の交配が行われ、AtSec24B 破壊と AtSec24C 減少が重なった場合の表現型解析が行われた。その結果、AtSec24B の欠損と AtSec24C の大幅な減少が重なると、雄性配偶体である花粉において第一有糸分裂後の発達停止が引き起こされ、雌性配偶体である胚嚢においても様々な段階で発達停止が引き起こさ</p>	

れることが示された。

次に申請者は多重形質転換を可能にする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。植物研究の進展により様々な遺伝子導入植物が作製されているが、これら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になってきている。本学位論文研究においても、*atsec24b-1* と *atsec24c-1* はカナマイシン耐性マーカーを有しており、そのため *atsec24b-1* の相補試験にはハイグロマイシン耐性マーカーのベクターが用いられた。この株にさらに遺伝子導入を行うために、新たな選抜マーカーを持ったベクターの開発が行われた。糖タンパク質の糖鎖合成に参与する UDP-N-acetylglucosamine: dolichol phosphate N-acetylglucosamine-1-P transferase (GPT) は、シロイヌナズナにおいて高発現させることで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付与することが知られている。申請者はこの GPT 遺伝子を選抜マーカーとして有する植物形質転換用バイナリーベクターの開発を行い、実際にシロイヌナズナにおいて形質転換体の選択が可能であることを示した。

以上のように申請者は、AtSec24B と 24C はシロイヌナズナにおいて 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を示した。これら成果は植物の高次生命活動における小胞輸送の役割を明らかにした重要なものである。またツニカマイシン耐性バイナリーベクターを開発し、多彩な多重形質転換実験への路を拓いた。このことより、本審査委員会は本論文を学位論文として十分価値があるものと判断した。