

論文審査の結果の要旨

氏名 ロベルト・アントニオ・バレロ
ROBERTO ANTONIO BARRERO

本論文は、植物では殆ど、その機能の不明な CAP タンパク質をコードする遺伝子 AtCAP1 について解析したものである。AtCAP1 は、436 個のアミノ酸から構成されており、ゲノム上に 1 コピー存在する。論文提出者は、修士課程において、AtCAP1 を酵母で過剰発現すると、その C 末端領域ドメイン (A6, アミノ酸 188 個) が、CAP 欠損細胞を相補する事を明らかにした。この事は、AtCAP1 が、細胞骨格形成に必要である事を示唆したものである。本研究は、植物細胞を用いた AtCAP1 の機能解明を目的として遂行された。

本論文は、3 章よりなり、第 1 章では、AtCAP1 の発現とアクチンへの結合が調べられた。すなわち、CAP 抗体を用い、その発現を調べたところ、培養細胞や根で発現が強く、茎、葉、花卉において低い事が判明した。CAP の C 末端領域 (A6, アミノ酸 158 個) を用いて、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質を作成した。この GST-A6 を用い、アクチンとの結合実験を行ったところ、*in vitro* で両者の結合が確かめられた。

ひきつづいて、植物個体における AtCAP1 の過剰発現が調べられた。そのため、AtCAP1 遺伝子を過剰に発現する、いくつかの形質転換アラビドプシス植物が作成された。独立した 3 系統について詳細に解析した。すべての系統は、本遺伝子を 1 コピー有する。導入した遺伝子の発現による AtCAP1 タンパク質量は、DEX の量に比例して増加した。S4 が最も AtCAP1 タンパク質を蓄積し、S11 は最も少なかった。アラビドプシス植物体における AtCAP1 の過剰発現の効果を調べるために、比較的若い植物が用いられた。AtCAP1 タンパク質を過剰に発現する植物は、小葉とロゼット葉のサイズが減少したが、主根は野生型と同じであった。このような器官サイズの減少は、本タンパク質蓄積量と正の相関を示した。S4 植物では、葉身は 31.9% 横方向に減少した。葉柄の長さは 73.8% 減少した。このことは、くり返し実験でも証明された。

第2章では、タバコにおける AtCAP1 の過剰発現は葉器官サイズの減少を引き起こすことが示された。このような現象が葉細胞の伸長の変化によるのかを調べるための実験を行った。その結果、導入植物細胞のサイズは野生型よりも小さかった。

第3章では、AtCAP1 を過剰に発現するタバコ BY-2 が得られた。そのような細胞株を7日間培養し、DEX を含む培地に移し、24 時間培養した。アクチンのレベルは一定に保たれているのに対し、AtCAP1 は DEX の添加量の増大と共に増加した。さらに本タンパク質の発現は、DEX 処理後2時間目から始まることが示された。次に、タバコ細胞の増殖を調べたところ、AtCAP1 のレベルは増殖の阻害と平行であることが示された。植物細胞内において AtCAP1 タンパク質がアクチンに結合するかどうかを調べるために形質転換 BY-2 細胞が用いられた。材料をホモジナイズ後、タンパク質を AtCAP1 抗体で沈澱させ、電気泳動した。続いて、アクチン抗体で処理したところ、明らかなバンドが認められた。このことは AtCAP1 が細胞中でアクチンと直接あるいは間接的に相互作用する可能性を示唆するものである。以上、論議したように AtCAP1 タンパク質は、細胞分裂および伸長の両者を制御すると考えられる。このことは、細胞骨格形成に重要なアクチンとの相互作用を AtCAP1 が担っている可能性を示唆するものである。

本研究は、植物の分化や増殖の制御機構の解明に向けて重要な知見であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。尚、本論文は、梅田正明博士、山村三郎博士、内宮博文博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。