

論文審査の結果の要旨

氏名 中名生 幾子

本論文は2章からなり、第1章では、管状要素分化過程で一過的かつ局所的に発生するスーパーオキシドの発見とその管状要素分化における働きについて、第2章では、管状要素分化過程でのスーパーオキシド発生の分子機構について述べられている。

ヒヤクニチソウの *in vitro* 分化系は単離葉肉細胞が単細胞のまま管状要素へと分化するもので、高等植物の優れた細胞分化のモデル系として広く使われてきている。この細胞分化過程では、葉肉細胞が未分化な細胞へ、未分化な細胞が維管束前駆細胞へ、維管束前駆細胞が管状要素へと運命づけられていくことが明らかになってきたが、それらの過程を制御する細胞内シグナルについては現在のところほとんど分かっていない。論文提出者は、近年細胞内シグナルとして注目されつつある活性酸素に着目し、管状要素分化過程での活性酸素の発生と分化への関与について解析した。その結果、管状要素前駆細胞での局所的に発生するスーパーオキシドの存在を見だし、スーパーオキシドの管状要素分化シグナルとしての可能性を提唱した。また、このスーパーオキシド発生に関連して、NADPH oxidase 複合体のサブユニット gp91^{phox} homologue 遺伝子に加え、2つの rac small GTPase 遺伝子を単離し、その発現と機能を解析した。

まず、第1章では、管状要素分化過程において、スーパーオキシドが細胞先端に一過的かつ局所的に発生することを NBT 染色法により見出した。このスーパーオキシドの発生は、細胞膜に存在する NADPH oxidase 様酵素の働きによるものであり、WGA で認識される二次壁形成の開始部位と一致した。それに対して、細胞表層の過酸化水素は管状要素分化に伴ってそのレベルは増加するものの、その発生は細胞全体で起こった。これらの結果から、管状要素では形態形成に先立って細胞極性が成立し、その細胞極性とスーパーオキシドが関連していることが明らかになった。また、スーパーオキシドの発生を阻害すると、管状要素分化の二次壁形成と細胞死の過程がともに阻害されることを見いだした。これらの結果は、NADPH oxidase 様酵素による局所的なスーパーオキシドの発生が二次壁形成、細胞死を含む管状要素形態形成のイニシエーションに関

与する可能性を示している。本内容は、管状要素分化におけるスーパーオキシドの局所シグナルとしての可能性を強く示唆したもので、新規の知見として高く評価される。

第2章では、第1章で見いだされた局所的なスーパーオキシドの発生を担うと考えられる NADPH oxidase 複合体の活性サブユニットである gp91^{phox} homologue 遺伝子 *Zerboh2* と、調節サブユニットである rac small GTPase 遺伝子 *ZeRAC1*, *ZeRAC2* の全長 cDNA の単離に成功した。これらはいずれも、管状要素を含む維管束に特異的に発現し、*in vitro* においては管状要素のスーパーオキシド発生時期に一過的に発現することを見いだした。続いて、*ZeRAC1*, *ZeRAC2* タンパク質の細胞内局在を GFP との融合タンパク質を用いて解析し、*ZeRAC1* はその活性状態に応じ、不活性型では細胞質、活性型では細胞膜に存在し、*ZeRAC2* は定常的に細胞膜に局在することを示した。さらに、ドミナントネガティブ型 *ZeRAC1* を細胞に導入し、内在性 *ZeRAC1* の働きを抑えると、局所的なスーパーオキシドの発生が阻害されるが、*ZeRAC2* ではその効果がないことを見いだした。このことから、*ZeRAC1* は管状要素で起こる局所的なスーパーオキシド発生のポジティブエフェクターであることを明らかにした。これらの結果は、*ZeRAC1* と *Zerboh2* が管状要素における局所的なスーパーオキシド発生を担うと考えられる NADPH oxidase 複合体の構成員であることを強く示唆した。本内容は、NADPH oxidase 複合体の構成要素が維管束形成過程で転写レベルの制御を受けていること、さらに局所的スーパーオキシド発生には維管束細胞特異的な *ZeRAC1* の活性化が必要であることを、を初めて見いだしたもので、高く評価される。

なお、本論文第2章は、Benedikt Kost、Nam-Hai Chua、福田裕穂氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって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。

ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、中名生幾子提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。