

論文審査の結果の要旨

氏名 井藤 純

本論文は2章からなり、第1章では、*in vitro* ヒヤクニチソウ管状要素分化系を用いて、管状要素分化過程で自己分解の時期に発現が上昇する、S1型ヌクレアーゼ遺伝子 *ZEN1*、リボヌクレアーゼ遺伝子 *ZRNaseI*、システインプロテアーゼ遺伝子 *ZCP4* の各遺伝子産物の免疫局在解析について、第2章では、管状要素自己分解過程で起こる核DNA分解の分子機構の解析について述べられている。

道管・仮道管を構成する管状要素は、成熟すると、特徴的な二次壁を持つ中空の死細胞となる。管状要素の分化過程では、二次壁形成とほぼ同時にプログラム細胞死が誘導される。管状要素細胞のプログラム細胞死の過程に関しては、形態学的な解析により、液胞の崩壊を引き金として自己分解過程が進行すること等が明らかとなっているが、その分子機構については不明である。核分解は、すべてのプログラム細胞死に共通して重要な事象であると考えられる。そこで、管状要素自己分解プログラムにおける実行過程を解明するために、核DNA分解を触媒するDNaseに着目し、核分解機構の解明を試みた。論文提出者は、修士課程において、管状要素分化過程で自己分解の時期に発現が上昇するS1型ヌクレアーゼ遺伝子 *ZEN1* をBY-2へ導入し、その遺伝子産物の活性と細胞内局在を解析し、少なくともBY-2において、活性型 *ZEN1* が液胞に蓄積することを見出した。そこで、博士課程では、管状要素細胞における *ZEN1* の蓄積機構の解析、さらに、管状要素自己分解過程で活性化されるDNaseを *ZEN1* を含め再検索した上で、管状要素自己分解過程で起こる核DNA分解に関わるDNaseの同定及びその作用機構の解析を行った。

まず、第1章では、抗 *ZEN1* 抗体を用いて、*ZEN1* タンパク質の局在を解析し、*ZEN1* が未成熟な管状要素細胞のみに発現し、その液胞に蓄積していること、また、*ZEN1* はゴルジ体及びゴルジ体由来の小胞にも局在し、*ZEN1* の液胞への輸送はゴルジ体由来の小胞による小胞輸送経路で行われることを明らかにした。さらに、また、オートファジーの経路を阻害することが知られるシステインプロテアーゼの阻害剤、E-64dで処理した細胞の免疫電顕の結果、*ZEN1* の液胞への輸送はオートファジーの経路を介さないことも示された。そして、*ZEN1* と同じような発現パターンを示す *ZRNase I* と *ZCP4* の遺伝子産物に対する特異抗体を作製し、それらの局在を調べたところ、

いずれも管状要素細胞の液胞に蓄積していることを見出した。また、2種類の抗体を用いて二重染色を行った結果、ZEN1とZRNase I、ZEN1とZCP4は同じ小胞に局在していない可能性が示唆された。これらの結果は、管状要素自己分解関連酵素が同様な経路で液胞に積極的に蓄積されることを示し、これまで推測されていた管状要素自己分解関連酵素は液胞に蓄積されており、液胞崩壊後、機能するという仮説を裏付ける有力な証拠となった。

第2章では、はじめに、管状要素分解過程で活性化されるDNaseの特定を目的として、様々な条件でin gel DNase assayを行った。その結果、管状要素分化過程では、少なくとも異なる5種類のDNaseの活性が検出され、この内、自己分解の時期のみ活性化されているDNaseとして、ZEN1に加え、新たに24 kDa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 要求性ヌクレアーゼの同定に成功した。ZEN1は中性、酸性どちらでも活性をもち得るが、酸性条件下の方がより強い活性を示す。一方、24 kDaヌクレアーゼは中性条件下でのみ活性を持つ。以上の結果から、ZEN1と24 kDaヌクレアーゼは別々の細胞内コンパートメントで活性化され、管状要素自己分解過程で起こる核DNAの分解に関与している可能性が示唆された。これらのDNaseのin vitroでの核DNA分解能を調べ、ZEN1の活性化条件下でのみ核DNAの分解が検出されること、またこの活性は抗ZEN1抗体で阻害されることを明らかにし、ZEN1が管状要素の核DNA分解の鍵酵素であることを示した。続いて、in vivoでの管状要素の核DNA分解に対するZEN1の機能を探るため、パーティクルガン法によるアンチセンスZEN1遺伝子導入実験を行い、ZEN1アンチセンス遺伝子が液胞崩壊後に起こる核DNAの分解を特異的に抑制することを見出した。これらの結果は、ZEN1が管状要素自己分解過程で起こる核DNAの分解を触媒する主要なヌクレアーゼであること示したものであり、S1型ヌクレアーゼが植物プログラム細胞死で起こる核DNA分解で機能していることを初めて示したものであると同時に、植物プログラム細胞死過程で活性化されるDNaseの機能を明らかにした最初の報告でもある。

なお、第1章は中島仁、福田裕穂氏と、第2章は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、井藤純提出の論文は博士(理学)の学位論文として合格と認める。