

論文審査の結果の要旨

氏名 榎本 悟史

本論文は、維管束の連続的形成に関して、分子遺伝学的、細胞生物学的に解析したものであり、6章からなる。第1章では、Prefaceとして、この研究の背景と研究を始めるにあたっての動機を述べている。第2章では本研究で使われた材料と方法について記述されている。第3、4、5章は研究の結果とその考察であり、第3章では、維管束の連続性に関与する遺伝子 *VAN3* のクローニングとその遺伝子産物の機能および細胞内局在の解析について、第4章では、*VAN3* と類似の遺伝子の同定とその組織内、細胞内局在解析について、第5章では、維管束連続性に関与する *VAN4* の遺伝子産物の機能解析と細胞内局在について述べられている。第6章では得られた結果を受けて、総合的に維管束の連続性を決定する機構と細胞内小胞輸送の関係について考察している。

維管束は適切な場所に連続的な形で配置されてはじめて細胞、組織間におけるネットワークを形成する。論文提出者は、維管束の連続性決定機構の解明を目指し、野生型と同様の形状の葉脈を形成するにも関わらず、葉脈が不連続となる *van3*、*van4* 変異体を用いて、連続性に関与する因子の単離とその機能解析を行った。

これまで *van3* 変異体では *At5g13300* に一塩基置換が見いだされていた。そこで、論文提出者は、*At5g13300* の 8.6 kbp のゲノム断片を用いて相補性検定を行い、*VAN3* は *At5g13300* であると結論づけることに成功した。*VAN3* は膜のカーブを認識する BAR ドメイン、脂質と結合する PH ドメイン、ARF-GTPase を活性化させる ARF-GAP ドメイン、タンパク質間相互作用をする ankyrin repeat からなる ACAP-type の ARF-GAP であることが明らかとなった。この成果は、小胞輸送の鍵を握る ARF-GAP が維管束の連続性に関与するという世界で初めての結果であり、高く評価された。続いて、論文提出者は *VAN3* の細胞内局在を知るために、一過的発現シロイヌナズナ培養細胞を用いた解析と *van3* 変異体に *pVAN3::VAN3-3xmyc*、*pVAN3::VAN3-VENUS* を導入し、*van3* 変異を相補した植物体を用いた解析を行った。その結果、*VAN3-VENUS* は ER マーカーの HDEL-GFP、ゴルジ体マーカーの GFP-SYP31、エンドソームマーカーの ARA6-GFP とは共局在せず、トランスゴルジネットワーク (TGN) マーカーの GFP-SYP41 と共局在することが明らかとなり、*VAN3* タンパク質

は TGN に局在することが明らかとなった。しかし、TGN すべてに局在するわけではなく、一部の集団にのみ局在した。この結果は、積み荷の選別が TGN 以前の過程で行われる可能性があることをはじめて示したもので、高く評価された。これに加え、VAN3 は根の表皮、皮層、及び維管束で細胞膜の頂端部及び基部に極性をもって局在していた。生化学的解析から VAN3 は細胞質及びミクロソーム画分に存在するタンパク質であり、ミクロソーム膜で TritonX-100 耐性な raft 様構造に存在することが示唆された。また、TGN 内において他の TGN マーカーと分離して存在することも明らかとなった。これらの局在解析の結果を総合して、VAN3 は raft 様構造を介して、維管束形成に関する積み荷の極性をもったエキソサイトーシスあるいはエンドサイトーシスを制御することが考えられた。これらの知見は新規かつ先端的なもので、非常に高い評価を得た。この積み荷がオーキシン取り込み担体の AUX1 あるいはオーキシン排出担体の PIN1 である可能性について検討したが、PIN1、AUX1 の局在に VAN3 は直接的には関与しないことが明らかとなった。

次に、論文提出者は、VAN3 と同じ ACAP ARF-GAP ファミリーに属する ARF の機能分担を明らかにする第一歩として、シロイヌナズナ ACAP ARF-GAP (VAL1、VAL2、VAL3) すべての発現及び細胞内局在を解析した。まず、各遺伝子上流 2 kbp を GUS につないだ遺伝子を導入した植物体を用いて発現解析を行った。その結果、VAN3 は植物全体で広く発現をするのに対して、VAL1 は托葉、静止中心近傍に限定的な発現が観察された。また VAL2 は植物全体で前形成層に、VAL3 は地上部ではほぼ全域、地下部では根端及び維管束に発現が観察された。このように VAL1、VAL2、VAL3 遺伝子は多少のオーバーラップを持ちながら、異なった組織に発現することが分かった。また、細胞内局在の解析から、VAL1、VAL2 はエンドソームに、VAL3 は細胞質に存在することが明らかとなった。このことは ACAP-type の ARF-GAP が植物体において組織レベルだけでなく、細胞レベルで機能分担していることをはじめて示したものとして、高く評価された。

続いて、論文提出者は *van4* 変異体の原因遺伝子の同定を行った。その結果、*van4* の原因遺伝子の同定に成功したが、VAN4 は機能未知の遺伝子であった。これまで単離同定されてきた維管束の連続性に関わる *van3*、*van7* 変異体がいずれも細胞内小胞輸送に関連する遺伝子の変異であったことから、VAN4 タンパク質が小胞輸送に関連する可能性を考え、細胞内局在と小胞輸送に関連する機能解析を行った。まず、*van4* 変異体に *pVAN4::VAN4-3xmyc* を導入し、相補された植物体を用いて細胞内局在を解析した。VAN4-3xmyc はエンドソームマーカーの ARA6-GFP との共局在が観察された。また ARF-GEF の阻害剤である BFA の処

理を行うと VAN4-3xmyc は細胞内に集合体を形成し、その周囲を ST-GFP に標識されるゴルジ体が囲むことが明らかとなった。このことより VAN4 のエンドソームにおける局在が支持された。また エンドソーム局在が知られている GN-GFP (VAN7) と VAN4-3xmyc は通常は顕著な共局在を示さず、BFA 処理した時のみ部分的に共局在した。このことは VAN4 と VAN7 は主に異なるエンドソームで機能することを示唆している。また、生化学的な解析から、VAN4 は膜表在性タンパク質であると考えられた。以上の結果から、VAN4 は VAN7 と異なるエンドソームに局在し、維管束の連続性に関与する新たなタンパク質であることが分かり、新規の発見として高く評価された。

なお、本論文第 1 章は澤進一郎、小泉好司、杉山宗隆、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。

以上、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、榎本悟史提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。