

論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤 瑛海

本研究は、植物固有型 RAB5, ARA6 のエフェクターを介した機能発現機構について研究されたものであり、序論、第1章、第2章、第3章、総括から構成されている。

序論では、この研究の背景や目的が示されている。RAB5 は、小胞輸送機構において膜融合を制御する低分子量 GTPase の一つである。RAB5 は、真核生物に広く保存されているが、陸上植物は、保存型 RAB5 に加え、ユニークな一次構造を有する RAB5 ホモログをもつ。本研究では、シロイヌナズナに存在する植物固有型 RAB5 である ARA6 の機能発現機構を解明することを目的とし、そのエフェクターの同定と機能解明を行った。この章では、論文提出者が、修士課程で行ったスクリーニングにより単離された ARA6 エフェクター候補 (Plant-unique RAB5 effectors (PUFs)) や、本研究において PUF2, PUF3, PUF7/ クラスリン重鎖が注目された経緯についても述べられている。

第1章では、PUF2 の解析結果について述べられている。まず、PUF2 が ARA6 の機能発現に関わる分子であるかどうかを調べるため、*puf2* 変異体入手し、活性型 ARA6 過剰発現時における生育を調べたところ、この形質転換体は活性型 ARA6 が賦与する塩ストレス耐性を示さなかった。このことから、PUF2 が ARA6 の機能発現に関わる分子であることが確認された。その一方で、PUF2 は、保存型 RAB5 の局在するエンドソーム集団に局在し、保存型 RAB5 が制御する液胞輸送経路を制御した。また、PUF2 は、ARA6 と保存型 RAB5 の両方を活性化する RAB5 グアニンヌクレオチド交換因子である VPS9a と相互作用し、VPS9a のエンドソーム局在を制御した。以上の結果から、本研究では、PUF2 が、VPS9a の働きを制御することにより、2種類の RAB5 が制御する輸送経路を統御するモデルを提示した。

続いて、第2章では、PUF3 の機能解析を行い、PUF3 が核と ARA6 エンドソ-

ムに局在することを明らかにした。また、活性型 **ARA6** の過剰発現時には、**PUF3** はエンドソームに、不活性型 **ARA6** 過剰発現時には核により多く局在した。このことから、**PUF3** が **ARA6** の活性状況に応じて核とエンドソームをシャトルするシグナル分子である可能性が提示された。

第3章では、**PUF7**/クラスリン重鎖と **ARA6** の細胞内動態を明らかにするとともに、クラスリンの細胞内分布を調べるため、ライブイメージングによるクラスリンの動態解析を行った。クラスリン重鎖と複合体を形成することが知られているクラスリン軽鎖を **GFP** で可視化し、オルガネラマーカールとの局在を比べた。メタモルフ上で、クラスリンとオルガネラマーカールの重心間距離を半自動的に測定するマクロを作成し、クラスリンの細胞内局在を定量的に評価した結果、クラスリンはトランスゴルジに最もよく局在し、**ARA6** の局在するエンドソームの近傍に局在することが明らかになった。また、動態解析では、**ARA6** エンドソームの一部にクラスリンが局在し、一緒に動く様子が観察された。このことから、クラスリンと **ARA6** エンドソームの細胞内動態には密接な関連があり、クラスリンが **ARA6** の機能発現に関わる可能性が示された。

総括では、第1章から3章までに得られた結果が総合的に考察されており、**ARA6** のエフェクターを介した機能発現モデルが提唱されている。

本研究では、これまで全く明らかにならなかった **ARA6** のエフェクターを同定し、**ARA6** の機能を支える分子機構について新しいモデルを提唱した。これは、植物固有型 **RAB5** の機能を理解する上できわめて重要な位置づけにあるのみならず、この分野の進展に重要な示唆を与えるものである。また、本論文は、提出者が自立して研究活動を行うのに十分な研究能力と学識を有することを示すものである。

なお、本論文第3章は藤本優博士、海老根一生博士、植村知博助教、上田貴志准教授、中野明彦教授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検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。