

論文審査の結果の要旨

氏名 棚橋 沙由理

本論文はゴルジ体形態異常を示すシロイヌナズナ変異体の単離とその原因遺伝子の同定についてまとめられたものであり、3章からなる。

第1章は序論であり、真核細胞の膜交通におけるゴルジ体の役割、およびゴルジ体の形態的特徴である層板構造の重要性について概説されている。

第2章はゴルジ体形態異常変異体の単離と遺伝子同定について述べられている。ゴルジ体のシス槽マーカーである ERD2-GFP を発現させたシロイヌナズナ (Col-0 背景) を共焦点顕微鏡で観察すると、ゴルジ体はほぼ均一なサイズのディスク状の構造として細胞質中に分散していた。これに EMS による変異原処理を行ったラインの M2 世代植物について、ゴルジ体形態に着目し顕微鏡下でのスクリーニングを行った。その結果、約 10,000 ラインから 30 個体のゴルジ体形態異常変異体候補を選抜した。さらに、変異体候補の中でサイズの不均一なゴルジ体が混在し、とくに小型化したものが多いというゴルジ体形態異常を示す変異体#46-3 について、解析を進めた。変異体#46-3 にトランス槽マーカー ST-mRFP を導入して共焦点顕微鏡下で局在比較を行ったところ、親株ではシス槽とトランス槽が隣り合って重なるように位置するのに対し、変異体#46-3 では両者が離れて存在するものがあった。加えて、小型化した ERD2-GFP のシグナルに ST-mRFP のシグナルを伴わないものが存在した。これより、変異体#46-3 では層板構造内のシス槽とトランス槽の位置関係に異常が生じたことが示唆された。次に、透過型電子顕微鏡による観察を行った。親株ではゴルジ体の槽の数がおよそ 4-7 枚であるのに対して、変異体#46-3 では 2-3 枚程度に減少したゴルジ体が観察された。一方で、槽の数が 9 枚まで増加した多層化したゴルジ体や、巨大化したトランス槽を有するゴルジ体も観察されるなど、多様なゴルジ体形態異常が確認された。続いて、変異体#46-3 の表現型の原因遺伝子を同定するために、変異の生じた染色体の領域の絞り込みを行った。まず、変異体#46-3 と異なる背景のシロイヌナズナの野生株 *Landsberg erecta* との F2 世代植物を作出し、共焦点顕微鏡下で#46-3 のゴルジ体形態と同様の異常を示すものを選抜した。これらの株において、分子マーカーを用いたラフマッピング、および次世代シーケンサーによる連鎖解析を行った結果、変異は第4染色体上腕部に生じた可能性が高いことが明らかになった。この領域内でアミノ酸置換をもたらす変異が存在した 3 ローカス (At4g02410、At4g02750、At4g04910) について、野生型 DNA のクローニングを行い、ア

グロバクテリウムを介して#46-3 に遺伝子導入した。その結果、NSF (*N*-ethylmaleimide sensitive factor) をコードする At4g04910 遺伝子を導入した株においてのみ、ゴルジ体形態異常の相補が確認された。また、同ローカスに T-DNA が挿入された 3 ラインを入手し解析を行った結果、T-DNA が ORF のすぐ上流に挿入された SAIL_1155_C06 と第 3 エキソンに挿入されたライン SAIL_620_E12 は、ホモ接合のとき植物体が致死となった。SAIL_1155_C06 と変異体#46-3 を掛け合わせた結果、両者をヘテロにもつ F1 世代植物のゴルジ体形態は、変異体#46-3 で観察されたものと同様であった。以上により、#46-3 の原因変異が *NSF* 遺伝子にあると結論した。*NSF* タンパク質は、真核生物の膜交通において普遍的に保存された膜融合に必須な鍵因子であり、AAA+タンパク質ファミリーの一つである。小胞膜と標的膜が融合する際に Q-SNARE と R-SNARE によって強固な SNARE 複合体が形成されるが、膜融合の後、NSF は SNAP とともに SNARE 複合体を解離させる役割を果たす。この反応は、膜交通に必要不可欠である。植物の膜交通において SNARE 分子は多様化しているが、*NSF* 遺伝子は単一コピーで存在する。*NSF* タンパク質は 3 個のドメインから成るが、変異はこのうちの SNAP-SNARE 複合体の解離を実行する ATPase 触媒ドメイン (D1) 上に存在する 374 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換されるミスセンス変異であった。

第 3 章は総合討論であり、膜融合因子 *NSF* のゴルジ体形態維持への寄与の仕組み、および今後の展望について議論されている。

なお、本論文第 2 章は、庄田恵子氏、齊藤知恵子博士、坂本智昭博士、倉田哲也博士、植村知博助教、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及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、本審査委員会は博士（理学）の学位を授与できると認める。