

# 論文審査の結果の要旨

氏名 竹元 廣大

本論文はシロイヌナズナにおける液胞輸送経路の繫留因子の研究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、植物の液胞の機能の多様性や、植物が独自に獲得した液胞輸送経路、シロイヌナズナにおける膜融合に関わる因子、エンドソーム-液胞間の輸送経路ではたらく繫留因子に関するこれまでの知見などについて概説されている。

第2章はエンドソーム-液胞間の輸送経路ではたらく繫留因子である CORVET と HOPS のシロイヌナズナにおける機能について述べられている。第1章で述べられている植物に特有の多様化したポストゴルジ輸送経路の特徴と、液胞輸送経路で機能する繫留因子である CORVET、HOPS 両複合体の機能がどのように関連しているのかは、これまでにほとんど明らかにされていなかった。本論文ではこれら2つの複合体について、コアサブユニットである VPS18 と CORVET、HOPS それぞれに特異的なサブユニットである VPS3、VPS39 をあわせて解析することにより、シロイヌナズナにおけるエンドソーム-液胞間の輸送経路の制御機構をより詳細に明らかにすることを試みた。まず、Yeast Two-Hybrid 法及び免疫沈降-質量分析解析を用いて、CORVET と HOPS のサブユニットが、シロイヌナズナにおいて複合体を形成することを明らかにした。次に VPS18、VPS3、VPS39 のシロイヌナズナ生体内での細胞内局在を観察した。その結果、VPS3 は細胞質中のドット様構造に、VPS39 は液胞膜上のサブドメインと少数の細胞質中のドット様構造に局在している様子が観察された。VPS18 は細胞質中のドット状構造と液胞膜上のサブドメイン両方に局在しており、VPS3、VPS39 ともそれぞれドット様構造上、液胞膜上のサブドメイン上で共局在していた。また、RAB との共免疫沈降法や細胞内局在の比較の結果から、VPS3 と VPS39 がそれぞれ保存型の RAB5 や RAB7 と相互作用し、VPS3 は RAB5 と細胞質中のドット様構造上で、VPS39 は液胞膜上のサブドメインと一部の細胞質中のドット様構造上で RAB7 と共局在することが明らかとなり、これらのことから、CORVET はエンドソーム上で RAB5 と、HOPS は RAB7 と液胞前区画及び液胞膜上で協調的に機能していることが分かった。続いて、VPS18、VPS3、VPS39 の T-DNA 挿入変異体について、表現型の解析を行った。その結果、いずれも胚致死性の変異体であり、CORVET と HOPS はシロイヌナズナの胚発生において必須の因子であることが明らかとなった。さらに、植物でしかみられない、RAB5 依存かつ RAB7 非依存的な液胞輸送経路の積荷タンパクである SYP22 の細胞内局在を、*vps18*、*vps3*、*vps39* 背景で

観察した。*vps18*、*vps3* 背景では SYP22 が細胞膜に誤輸送され、*vps39* 背景では細胞質中のドット様構造に局在している様子が観察され、SYP22 が輸送される経路に CORVET が関わるということが明らかになった。また、液胞への膜融合に関わる R-SNARE である VAMP713 と VAMP727 との VPS3、VPS39 の局在及び相互作用を比較したところ、VPS3 は VAMP727 と、VPS39 は VAMP713 との相互作用と共局在がそれぞれみられ、逆はみられないことが明らかになった。これにより、CORVET は RAB5 および VAMP727 と協調的に機能して、エンドソームと液胞膜の融合の繫留因子として機能するのに対し、HOPS は RAB7、VAMP713 と協調的に機能して、液胞同士の融合の繫留因子としてはたらくことが分かった。VAMP727 は植物特異的な配列を持つ VAMP7 ホモログであり、一連の結果から、植物が新規に獲得した R-SNARE と進化的に保存された RAB5-CORVET が協調的にはたらくことが、植物独自の輸送経路の獲得に関連することが示された。本章の成果は植物における多様化した液胞の機能、輸送経路がどのように制御され、進化的に獲得されてきたのか、ということを明らかにするための非常に重要な一歩である。

第3章は総合討論であり、本編の総括とともに今後の展望が述べられている。

なお、第2章は海老根一生博士、Jana Christin Askani 氏、Falco Krüger 博士、Zaida Andrés Gonzalez 博士、伊藤瑛海博士、郷達明博士、Karin Schumacher 教授、中野明彦教授、上田貴志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研究を行ったもので、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。