

審査の結果の要旨

氏 名 黄 嘉 禾

真核生物はその進化の過程でさまざまなオルガネラを獲得すると同時に、それらを連絡する物質輸送システムも発達させてきた。このうち小胞や細管を介して行われる物質輸送の仕組みを膜交通と呼び、その過程は、供与オルガネラからの小胞形成と標的オルガネラへの輸送、標的オルガネラへの繫留および融合という三つのプロセスに分けることができる。ポストゴルジオルガネラにおいて小胞形成を担う主要な分子の一つに **clathrin** がある。特に、細胞膜やトランスゴルジネットワークからの **clathrin** 依存的な小胞形成の仕組みは、動物や酵母を用いて盛んに研究されてきた。**clathrin** は植物にも存在し、細胞膜などにおける小胞形成への寄与が既に報告されている。しかし、動物や酵母に存在する多くの小胞形成関連因子の明確なオルソログは、一部を除いてほとんど植物では同定されていない。細胞膜上での小胞形成は、植物にとっても適切かつ迅速に外部環境を感知し変化に応答するために重要だと考えられる。そこで、本研究では未解明な点が多い植物における小胞形成機構を解明すべく、陸上植物固有のダイナミン様タンパク質である **DRP2** に関する機能解析と、共免疫沈降と質量解析を利用した植物における新規の小胞形成関連分子の探索を行った。

1. 植物のダイナミン様タンパク質 **DRP2** に関する解析

Dynamamin-related protein 2 (DRP2) は動物の **dynamamin** のオーソログであり、シロイヌナズナゲノム中に **DRP2A** と **DRP2B** の 2 コピーが存在する。この両分子は 92% という非常に高いアミノ酸配列相同性を持ち、共にエンドサイトーシスにおける小胞形成への関与が示唆されている。まず、両分子の機能的差異を明らかにするため、シロイヌナズナの **T-DNA** 挿入系統の表現型の解析を行った。その結果、両遺伝子共に単独の **T-DNA** ホモ挿入系統では植物体の生育に顕著な異常は観察されなかった。野生型と両遺伝子共に **T-DNA** がヘテロに挿入されている系統間で正逆交雑を行ったところ、雌性配偶体、雄性配偶体がともに致死になっていることが明らかになった。両配偶体についてさらに詳細な観察を行った結果、両配偶体共に核分裂やその後の細胞化が途中で停止していた。以上の結果から、**DRP2** が配偶体形成に必須だということが明らかになった。

次に, DRP2 の細胞内局在を解析した. その結果, 両分子が細胞膜上で直径 200-500 nm のドット状, そして細胞板の新規形成部位で共局在することが明らかになった. さらにさまざまなポストゴルジオルガネラマーカーと両 DRP2 分子の局在を比較した結果, DRP2 が細胞膜だけでなく一部のエンドソームやゴルジ体, トランスゴルジネットワーク上にも局在することが明らかになった. 以上の結果から, DRP2 がさまざまなポストゴルジオルガネラでの小胞形成を実行する可能性が示唆された. さらに, 細胞膜上での DRP2 による小胞形成が細胞骨格やイノシトールリン脂質代謝の影響を受けることが示唆された.

2. ポストゴルジ膜交通における新規小胞装置関連分子の探索

動物や酵母細胞における研究の結果, 一連のエンドサイトーシス小胞形成過程では, 多様な分子が関与することが明らかになっている. しかし, clathrin, アダプタータンパク質である AP2 複合体, dynamin 以外の分子のオーソログは, シロイヌナズナゲノム中での相同性検索からは発見できなかった. そこで, シロイヌナズナにおける新規小胞形成関連分子の同定を目指し, 幼植物体から抗 GFP 抗体を用いて抽出・精製した clathrin-GFP, AP2-GFP, DRP1A-GFP, DRP2A-GFP の共免疫沈降産物を質量解析した. その結果, clathrin-GFP からは 197 種, AP2-GFP からは 70 種, DRP1A-GFP からは 78 種, DRP2A-GFP からは 165 種のタンパク質が同定された. 同定されたタンパク質群には他の既知分子が互いに含まれており, 本手法が旧来の手法では発見できなかった未知の小胞形成分子を得る上で有効だということが示唆された. また, 複数の既知分子から共通に得られた分子中には多数の機能未知の分子が存在し, 植物固有の分子が仲介することにより, 小胞が形成されることが示唆された.

以上, 本論文は, 陸上植物特有のダイナミンである DRP2A および DRP2B は 多様なポストゴルジ間を結ぶ膜交通経路において協調的に機能していることが明らかにした. また, 既知のエンドサイトーシス関連因子の共免疫沈降物に対する質量解析から, 植物における小胞形成に機能すると考えられる候補分子を示した. これらの研究成果は, 学術上応用上寄与するところが少なくない. よって, 審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた.

審査の結果の要旨

氏 名 本郷 太郎

(※履歴書の記載と同じにしてください。)

[illegible]

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学または獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。

※「文書ファイル(Word 等で作成したもの)」及び「PDF ファイル」を提出してください。