

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ガンサップ ジラーボン

三量体 G タンパク質 (以下 G タンパク質、G $\alpha$ 、G $\beta$ 、G $\gamma$ のサブユニットから構成される) は真核生物に保存された、細胞内信号伝達に関わるタンパク質である。G タンパク質に関する研究は動物において先行しているが、動植物間でのゲノム情報を比較すると、G タンパク質介在性信号伝達に関わる因子の数や種類には違いが見られる。このことから、よく調べられた動物のものとは異なる、植物独自の G タンパク質介在性信号伝達の機構が存在する可能性が想定される。シロイヌナズナの G $\beta$ サブユニット (AGB1) の欠損変異体は野生型との表現型の違いが顕著であり、AGB1 は重要な生理機能を持つと考えられる。このことから申請者は AGB1 の相互作用因子に着目して解析を行い、植物の G タンパク質介在性信号伝達経路の一端を解明することを目指した。

1 章の緒論では、研究の背景、意義と目的について述べた。

第 2 章では、シロイヌナズナの細胞内小胞輸送因子 AP-3 $\mu$  の AGB1 との相互作用および生理的な機能に関して検討した。

AP-3 $\mu$  と AGB1 との相互作用は、プルダウン解析と二分子蛍光相補法 (BiFC 法) により、*in vitro* 及び植物細胞で確認した。また、AP-3 $\mu$  と AGB1 とは細胞内で細胞質と核に共局在することが分かった。シロイヌナズナの AP-3 $\mu$  欠損変異体 (*ap-3 $\mu$* ) の表現型を解析したところ、*ap-3 $\mu$*  は発芽時および発芽後の初期成育期においてアブシシン酸 (ABA) に非感受性である事がわかった。AGB1 の欠損変異体 (*agb1*) は ABA に過感受性であることが知られている。AP-3 $\mu$  と AGB1 との遺伝的な相互関係を調べるために、二重変異体 (*agb1/ap-3 $\mu$* ) を作出した。発芽時において *agb1/ap-3 $\mu$*  は野生型より ABA に対する感受性が高く、*agb1* よりは感受性が低かった。発芽後の初期成育期において *agb1/ap-3 $\mu$*  は *agb1* と同程度の ABA 感受性を示した。このことから、発芽時において AP-3 $\mu$  は AGB1 とは独立して ABA 応答反応に関与するが、発芽後の初期成育期において AP-3 $\mu$  の ABA 応答反応制御には AGB1 を必要とすることが示唆された。さらに、別の細胞内小胞輸送因子である AP-3 $\delta$  およびクラスリン重鎖 (CHC) の欠損変異体である *ap-3 $\delta$*  と *chc1* も *ap-3 $\mu$*  と同様に初期成育期において ABA 非感受性を示したことから、AP-3 $\delta$  と CHC も AP-3 $\mu$  と同様、ABA 応答反応制御に関わることが示唆された。

第 3 章では、シロイヌナズナの青色光信号伝達因子である NPH3 の AGB1 との相互作用および生理的な機能に関して検討した。

NPH3 と AGB1 との相互作用は、プルダウン解析と二分子蛍光相補法 (BiFC 法) によ

り、*in vitro* 及び植物細胞で確認した。それに加えてコマツナ葉を利用した共免疫沈降法により、*in planta* の相互作用があることも確かめた。また BiFC 法により、NPH3 と AGB1 とは細胞膜で相互作用することが示された。

NPH3 は青色光信号伝達因子として知られているので、NPH3 欠失変異体 (*nph3*) および *agb1* の青色光に対する光屈性を調べたところ、*nph3* は光屈性を示さないことが確かめられ、*agb1* は野生型よりも低程度の光屈性を示すことが分かった。NPH3 と AGB1 との遺伝的な相互関係を調べるために、二重変異体 (*agb1/nph3*) を作出した。*agb1/nph3* は *nph3* と同様、青色光に対する光屈性を示さなかった。これらの結果から、光屈性には AGB1 が必要であること、NPH3 と AGB1 とが光屈性応答反応において同じ経路で機能することが明らかになった。AGB1 遺伝子の発現は *nph3* において減少しているため、NPH3 は AGB1 遺伝子の発現を正に制御する可能性が示された。

第 4 章では、NPH3 の植物ホルモン (ABA およびブラシノステロイド (BR)) 応答に関する機能について解析した。

AGB1 は ABA と BR のシグナル伝達経路に関与することが既に知られている。NPH3 は細胞膜に局在することが明らかになり、*nph3* 変異体は *agb1* と同様に BR に対して非感受性を示し、BR の生合成阻害剤である BRZ に対して過感受性を示した。しかし、BR と BRZ に対して *agb1/nph3* は相加的な表現型を示すことから、NPH3 は AGB1 とは独立して BR 応答反応に関与することが示された。また、NPH3 を過剰に発現する形質転換シロイヌナズナを作成したところ、形質転換体は発芽時に ABA 非感受性を示した。さらに NPH3 の遺伝子発現は ABA に誘導されることも分かった。これらの結果は NPH3 が発芽時の ABA 応答に関与することを示す。BR 信号伝達と ABA 信号伝達における NPH3 の機能について詳細に考察した。

以上のように、本研究ではヘテロ三量体 G タンパク質  $\beta$  サブユニット AGB1 の物理的相互作用因子について詳細な解析を行い、AP-3 $\mu$  と NPH3 の機能について極めて興味深い結果を得た。本研究で得られた成果は、植物の環境応答を理解する上で非常に重要であり、学術上、応用上貢献することが少なくない。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。