

## 博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 佐藤雅彦

副査 小保方潤一

副査 久保康之

副査 椎名隆

### 1 氏 名

市川美恵

### 2 学位の種類 博士（農学）

### 3 学位授与の要件 学位規程第3条第3項該当

### 4 学位論文題目 シロイヌナズナにおける小胞輸送タンパク質 SNARE と その相互作用因子の解析に関する研究

### 5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

#### 【学位論文の要旨】

別紙に記載

#### 【論文目録】

別紙に記載

#### 【審査結果の要旨】

真核細胞において、小胞体上で新規合成されたタンパク質は、輸送小胞と呼ばれる膜小胞によってゴルジ体を経て、細胞膜、細胞外またはエンドソーム経路で液胞、リソソームへと輸送される。多細胞真核生物では、細胞の形態形成時の細胞極性確立に特定の細胞膜上への方向性を持った輸送、いわゆる極性輸送が重要な働きをしている。本学位論文は、シロイヌナズナにおいて、タンパ

ク質極性輸送時における輸送小胞と標的オルガネラの融合の特異性に関わる因子 SNARE の根毛，花粉管の先端成長における役割と SNARE に相互作用する因子の同定および同定した因子の生理現象における役割を解明することを目的とした研究を行ったものである。

第1章 序論では，本研究の背景として植物における小胞輸送の意義，小胞輸送時の輸送小胞と標的膜との融合に関わる SNARE タンパク質と SNARE 相互作用因子について現在までの知見と不明な点について詳細に述べ，本論文の意義と目的を明らかにした。

第2章では，シロイヌナズナの根毛に特異的に発現している2種類の SNARE, SYP123 と SYP132 について，根毛伸長における役割についての解析結果を報告した。発表内容は以下のとおりである。

*syp123* 変異体では野生株と比べて，根毛が有為に短くなっていた。さらに，SYP132 の発現を，RNA 干渉法によって根毛特異的に減少させると，*syp123* 変異体よりもさらに根毛が短くなった。次に，GFP-SYP123, GFP-SYP132 の挙動を共焦点レーザー顕微鏡を用いて，両者を同時に発現する植物体で解析した結果，GFP-SYP123 は，アクチン依存的に根毛先端に局在した。一方，GFP-SYP132 は，根毛細胞の細胞膜全体に均一に存在することが明らかとなった。これらの結果より，申請者は，根毛伸長に関与する二種類の SNARE のうち SYP123 は，アクチン依存的な根毛の先端への輸送小胞の極性輸送に関与し，SYP132 は，新たに合成されたタンパク質をゴルジ体から細胞膜へ輸送する際に機能していると結論した。

第3章では，花粉の成熟および花粉管発芽，伸長時に関与する SNARE 分子の局在解析の報告を行った。

花粉管は，根毛と同様に先端成長する細胞である。申請者は，花粉で特異的に発現する細胞膜局在型の SNARE である SYP124, SYP125, SYP131, SYP132 の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果，発芽した花粉では，SYP124 と SYP125 は花粉管先端に局在していることが明らかとなった。一方，SYP131 は花粉管全体に均一に局在した。このことから，SYP124, SYP125 は花粉管先端への輸送経路専用，一方，SYP131 は細胞全体への輸送に使われていることが示唆された。また，SYP124, SYP125 は発芽前の花粉粒においては，細胞質内に分散した状態で存在するが，花粉管発芽と同時に花粉管の先端に局在するようになることを明らかにした。これらの結果より，SYP124, SYP125 が局在する小胞は，花粉管伸長用の輸送小胞であり，花粉管発芽前にあらかじめ花粉

粒内に蓄えた状態にしており、花粉管伸長の際に花粉管先端に局在することで、迅速な花粉管の伸長に関与していると結論した。さらに、SYP131は、花粉管全体の細胞膜に均一に存在し、SYP132は、花粉粒本体の細胞膜のみに局在していることが報告された。これらの結果より、花粉管伸長時にも複数のSNARE分子が、各々別の細胞膜ドメインへの極性輸送に関与していることが報告された。

第4章では、老化および病原菌感染時におけるVAMPタンパク質相互作用因子PVA31の役割についての解析について報告した。

まず、動物細胞においてSNAREと相互作用することが報告されているタンパク質VAMP Associated Protein (VAP)に着目した。輸送小胞に存在するSNAREであるVAMPと相互作用するPlant VAP (PVA)タンパク質がシロイヌナズナにも13種類存在している。この中から、老化時および病原菌感染時に発現が誘導されるPVA31を解析した。その結果、PVA31と細胞膜への輸送に関与するSNAREタンパク質VAMP722 / 721との相互作用が確認できた。また、細胞内局在を調べたところ、VAMP722とPVA31は細胞膜で共局在した。次に、PVA31過剰発現体を用いて解析を行ったところ、過剰発現体では、老化マーカーであるSAG12の発現が野生型株より上昇しており、さらに葉の老化が有意に促進されていることが明らかとなった。また、過剰発現体においては、抗菌タンパク質PR1の発現が早期に誘導されることが報告された。これらの結果より、PVA31は、老化および病原菌感染時に、SNAREタンパク質に結合することで、細胞膜上への小胞輸送を調節している可能性が示唆された。

第5章では、細胞極性確立時におけるSNARE相互作用タンパク質SH3P1の役割の解析について報告された。

具体的には、GFP-SYP123を用いた共免疫沈降・質量解析法により複数の相互作用タンパク質候補を得た。その中から、アクチンに相互作用し、エンドサイトーシスに関与すると報告されているSH3P1タンパク質に着目し、SH3P1の局在や変異体を用いた機能解析を行った。その結果、SH3P1とSYP123は、根毛において共局在した。阻害剤処理の結果、両者はエンドソームで共局在することが明らかとなり、この結果から、両者は、同じ輸送経路で働いていることが示唆された。さらに、SH3P1変異体株を用いて、重力屈性に異常があるか調べた結果、変異体では根の重力屈性に異常が生じることが明らかとなった。この時のオーキシンの分布を調べたところ、変異体ではオーキシンの分布が変化していた。これらのことから、SH3P1は、重力刺激感知時のオーキシンの極性輸送に関与していることが示唆された。

第6章では、総合考察として、第2章から第5章までの結果をまとめて、シロイヌナズナにおける小胞輸送タンパク質 SNARE とその相互作用因子が、細胞の形態形成時や老化時の極性輸送にどのように働くかについての考察が述べられた。

以上、本論文は、植物において、様々な SNARE タンパク質およびそれらに相互作用する因子が、細胞膜上への極性輸送において機能することにより、形態形成や多様な生理現象を制御していることを明らかにしたものであり、博士学位論文にふさわしいものと判断した。

#### 最終試験の結果の要旨

平成28年2月10日 午前10時より図書館視聴覚室において博士学位論文発表会を公開で行った。約40分間の口頭発表後、質疑応答が行われた。質疑応答では、研究の意義、結果の解釈、今後の課題など多岐にわたる質問がなされたが、申請者は、全ての質問に対し、適切に回答・議論を行った。以上の結果を踏まえ、公聴会終了後、非公開にて審査員全員で審議した結果、最終試験については、審査員全員一致で合格とした。