

(論文内容の要旨)

高等植物の器官は、異なる機能・形態を持つ細胞群がそれぞれ独自のパターンを形成することにより形成されている。細胞の分化パターンに関する研究は多細胞生物を対象に数多くなされているが、その分子機構の全容は明らかではない。本研究では、「細胞内における小胞輸送系から細胞の分化パターンをみる」という独自の視点を取り入れ、その分子機構をモデル植物シロイヌナズナを用いて遺伝学的手法で解明したものである。具体的には、葉の維管束ネットワークと維管束に沿って分布するミロシン細胞の分布パターンをモデルとし、細胞内輸送系の中でも「液胞輸送系」に着目して研究を行った。

ミロシン細胞はその液胞にミロシナーゼという酵素を多量に蓄積し、植物免疫に働く異型細胞である。はじめに、蛍光タンパク質を用いてミロシン細胞を可視化する系を確立した。この系を用いることによりミロシン細胞の分布・発達過程・形態の変化を細胞レベルで追究することが可能になった。興味深いことに、ミロシン細胞は維管束の前駆細胞である前形成層と同時期に、前形成層近傍に分化してくることがわかった。また、ミロシン細胞と前形成層のマーカー遺伝子を用いた解析により、葉の初期発生段階において、すでにミロシン細胞は前形成層とは異なる分化の運命決定を受けていることを見出した。

次いで、維管束とミロシン細胞の分化パターンにおける液胞輸送系の機能を解明するために、種子貯蔵タンパク質の液胞輸送をモニターする系を用いて、液胞輸送系に働く因子の変異体の単離を目指した。その結果、液胞膜に局在する SNARE タンパク質「VAM3」と「VTI11」が、液胞輸送に働くことが判明した。この結果を受けて、VAM3 の 2 つのアリルと VTI11 の単独変異体と二重変異体を確立した。変異体の表現型観察により、*vam3* 変異体の強いアリルと、*vam3 vti11* 二重変異体で維管束ネットワークは単純化し、反対にミロシン細胞の数は増加していることを明らかにした。さらに、変異体で増加したミロシン細胞は、単純化した維管束ネットワークを補償するかのよう分布しているという観察結果を得た。以上の結果は、ミロシン細胞と維管束細胞の分化に液胞型 SNARE 複合体の機能が必要であることを示している。

VAM3 による維管束とミロシン細胞の分化パターンの制御機構をさらに追究するために、野生型と *vam3* 変異体の葉原基を含む茎頂部分のサンプルを用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、液胞型 SNARE 複合体の変異体では、オーキシン応答性遺伝子の発現が低下していることがわかった。オーキシンは、細胞分化に働く植物ホルモンである。変異体におけるオーキシンの合成・及びオーキシンの分布を葉原基のステージにおいて解析したところ、オーキシンの合成は野生型と同程度であったが、オーキシンの分布には異常が見られた。変異体の葉原基で見られたオーキシンの分布は、野生型に比べ単純化し、それは将来的に観察される変異体の未発達な維管束パターンに類似していた。このことから、オーキシンの分布が異常になることにより維管束の発達不全が起こると考えられた。また、オーキシンの内生量は変化しないことから、オーキシンが低濃度に蓄積する細胞が多数存在することが示唆され、それらがミロシン細胞に分化するというモデルが提唱できた。

最後に変異体におけるオーキシンの分布異常の原因として、オーキシンの分布に機能するオーキシン排出輸送体 PIN1 の細胞内局在を解析した。野生型では基底膜側のみに極性をもって局在する PIN1 に対して、変異体ではその極性を失っていた。以上の結果から液胞選別輸送経路は PIN1 の極性をもった細胞内局在の制御を介して、オーキシンの分布を制御しており、これによって葉の細胞の分化パターンが決定されるという新しい分子機構が明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

高等植物の異型細胞は、形態的に周辺の細胞と異なる特徴的な形態を持つ細胞として多数発見されているが、その形成機構はほとんどわかっていない。植物の葉に分布するミロシン細胞は代表的な異型細胞で、「ミロシナーゼ-グルコシノレートシステム」と呼ばれる生体防御系に機能すると考えられている。即ち、ミロシン細胞はその液胞にミロシナーゼを含むが、病害虫により組織や細胞が傷害を受けて初めてミロシン細胞から遊離したミロシナーゼは基質であるグルコシノレート（カラシ油配糖体）と反応し、最終的に病害虫や細菌に対する忌避物質としてイソチオシアネートとニトリルを産生する。しかし、ミロシン細胞の分化・発達過程は不明である。本研究では、緑葉のミロシン細胞と維管束の分布に着目してミロシン細胞の分化・分布を明らかにすること目的としている。

一方、ミロシン細胞と異なり、維管束のパターンの形成および維管束前駆細胞から管状要素への分化については、多数の変異体や制御因子など非常に多くの知見が得られている。本研究は、維管束パターンとオーキシン、さらにオーキシンを制御するオーキシン排出キャリアーについて注目しつつミロシン細胞の分化を維管束の分化からみるというユニークな発想をベースとしている。このような視点からの研究は皆無であることから評価できる。

本研究の端緒は、ミロシン細胞が維管束に沿って発達・分布するという発見とミロシン細胞の分化パターンが液胞タンパク質の選別輸送の鍵となる液胞型 SNARE によって制御されているという発見にある。液胞型 SNARE (VAM3 および VTI11) の変異体シリーズを複製したところ、液胞型 SNARE の機能不全度に応じて、維管束の発達は抑制され、逆にミロシン細胞の発達が促進するという大変興味深い現象を見出している。2 種類の全く異なる機能をもつ細胞が一つの基本細胞グランドメリシステムから協調しながら分化してくるという成果は全く新しいもので評価できる。

この協調的な分化の分子機構として、白川氏は植物ホルモンの一つオーキシンとその排出キャリアである PIN1 に注目して解析を進めた。その結果、本来なら細胞の原形質膜に極性をもって分布している PIN1 が、その極性を失ってしまうことを見出した。PIN1 が恒常的に液胞へ輸送され分解されていること、即ち quality control を受けていることを示した点も興味深い。液胞型 SNARE の変異体では、この制御により生じたオーキシンの分布異常が、上記のようなミロシン細胞と維管束の分化パターン不全を引き起こしているという全く新しいモデルを提唱することに成功している。高等植物にとって栄養分や水分を供給するためのライフラインと言うべき維管束と外敵から身を守るための防御装置としてのミロシン細胞が協調しながら分化しているという概念は初めてのものである。

本研究は、液胞選別輸送系が、植物ホルモンの排出キャリアの極性を制御することにより、植物の細胞の分化パターンを決定していることを明らかにしたもので、この分野の研究に新しい視点を与えたものとして高く評価された。本論文の内容の一部は国際学術誌 *Plant Cell Physiology* に掲載された。このように、白川氏によって行われた研究の質は高く、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。