

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	なかの りょうへい 中野 亮平
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理学研究科 生物科学専攻
(学位論文題目) 高等植物における小胞体形態の維持機構	
論 文 調 査 委 員	(主査) 西村 いくこ 教授 長谷 あきら 教授 鹿内 利治 教授

理 学 研 究 科

京都大学	博士（理学）	氏名	中野 亮平
論文題目	高等植物における小胞体形態の維持機構		
(論文内容の要旨)			
小胞体は独特なネットワーク状の構造をとるオルガネラである．この構造はチューブ状の小胞体とシート状の小胞体が複雑に組み合わさって形成されている．このようなネットワーク状の形態は小胞体に固有であり，真核生物に広く保存された特徴である．しかしながら，小胞体がどのようにその形態を形成・維持しているか，またその形態の細胞機能・高次機能における役割は未だ明らかになっていない． 本研究では，小胞体の形態形成・維持機構に関与する新規因子を同定するため，正遺伝学的解析を行った．共焦点顕微鏡観察及び遺伝学に適した高等植物シロイヌナズナを用いた．小胞体を GFP により可視化する形質転換シロイヌナズナ GFP-h を親株に小胞体の形態に異常を示す変異体（<i>endoplasmic reticulum morphology</i> 変異体，<i>ermo</i> 変異体）を 3 系統単離した．<i>ermo1</i> および <i>ermo2</i> 変異体は球状の異常構造体を形成し，<i>ermo3</i> は顆粒状の異常構造体を発達させていた．また，<i>ermo2</i> および <i>ermo3</i> では小胞体の巨大な凝集体が観察された．どの変異体も異常な構造体に加えて正常なネットワーク状の小胞体を保持していた． <i>ERMO1</i> と <i>ERMO2</i> はそれぞれ GNOM-LIKE1 と SEC24a と呼ばれるタンパク質をコードしていることを明らかにした．これらはどちらも小胞体ーゴルジ体間のタンパク質輸送に関わると考えられている因子であった．GNOM-LIKE1 は ゴルジ体から小胞体への輸送を担う COPI 小胞の出芽に関与し，SEC24a は小胞体からゴルジ体への輸送を担う COPII 小胞の出芽に関与する因子であった．これらのことから，小胞体ーゴルジ体間のタンパク質輸送が小胞体形態の維持に重要な役割を担っていることが明らかになった．さらなる解析の結果，小胞体ーゴルジ体間の全体的なタンパク質輸送ではなく，SEC24a の Arg-693 を介して結合するなんらかの積荷タンパク質が小胞体の形態に重要な役割を担っており，この因子の輸送が小胞体の形態維持に重要であることが示唆された． 一方，<i>ERMO3</i> は GDSL-lipase/esterase ファミリーに属するタンパク質をコードしていることを明らかにした．この遺伝子は全身で発現しているにも関わらず，<i>ermo3</i> 変異体では ER body を発達させる細胞でのみ小胞体の形態に異常がみられた．遺伝学的解析から，転写因子 NAI1 の下流で発現するタンパク質群と協調して機能していることがわかった．生化学的解析により，<i>ERMO3</i> が PYK10 複合体と相互作用することを明らかにした．PYK10 複合体は様々なオルガネラに局在するタンパク質から構成される巨大なタンパク質複合体で，生細胞内では形成されずに細胞が菌などにより破砕された時のみ生じると考えられている．本研究から <i>ERMO3</i> は PYK10 複合体が生細胞内で形成されないように機能していることが示唆された．また，PYK10 はミロシナーゼ活性という生体防御システムに重要な役割を担い得る酵素活性を持つことを初めて明らかにした．これらの結果は，<i>ERMO3</i> は PYK10 複合体の制御を介して地下部における生体防御システムに関与していることを示唆している． 以上の成果により，真核細胞内の小胞体の構造維持に小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送が関与していること，さらには，小胞体を中心とした細胞内膜系の生体防御への関与が明らかとなった．			

(論文審査の結果の要旨)

中野亮平氏が注目した小胞体は、真核細胞に広く存在する内膜系で、タンパク質や脂質の合成など多様な機能を担っている。一方、小胞体は、細胞内で最大の膜面積をもつオルガネラで、チューブ状構造とシート状構造で構成されるネットワークとして細胞内全体に張り巡らされている。植物では、細胞内外から受けるストレスに応じて、小胞体から機能を特化させたオルガネラを派生させることが知られている。所属研究室で見いだされた ER body(endoplasmic reticulum body)はその一つで、植物の生体防御に関与している。本研究では、複雑な小胞体構造の維持に関わる分子機構を解明し、小胞体の形態維持と生体防御等の高次機能を明らかにすることを目的としている。

中野氏は、モデル植物シロイヌナズナの正遺伝学を駆使して、小胞体の形態異常を示すシロイヌナズナ変異体を単離し、*endoplasmic reticulum morphology (ermo)* と命名した。本論文で対象とされた3系統の小胞体形態異常変異体 (*ermo1*, *ermo2*, *ermo3*) は、いずれも動物や酵母を含めてこれまでに知られていない新規の表現型を示したという点で興味深いものである。

単離された *ermo1* と *ermo2* の原因遺伝子は、それぞれ *GNOM-LIKE1* と *SEC24a* であり、真核細胞で広く保存された因子であった。*ERMO1/GNOM-LIKE1* は小胞体からゴルジ体への順行輸送に関わる因子で、*ERMO2/SEC24a* はゴルジ体から小胞体への逆行輸送に関わる因子である。即ち、本研究から、小胞体とゴルジ体間の双方向の小胞輸送が、小胞体の形態維持に関与していることが判明した。この成果は、小胞輸送と小胞体の構造とのリンクを初めて示したという点で高く評価された。

一方、*ermo3* 変異の原因遺伝子は、機能未知のタンパク質をコードしていた。*ermo3* 変異体の葉では、小胞体由来の顆粒状構造体とオルガネラの凝集体をもつ細胞がキメラ状に分布していた。興味深い発見は、これらの異常な表現型が、ER body 形成を制御している転写因子 *NAI1* の発現により抑圧されたというものである。ER body は内部に大量の β -glucosidase (PYK10)を集積しており、虫害や傷害によって細胞が破壊された際に、PYK10 複合体と呼ばれる巨大な構造体を形成することが分かっている。本研究から、*ERMO3* は、*NAI1* 制御下で ER body を発達させた細胞において、PYK10 複合体構成タンパク質群と協調して機能していることが明らかになり、*ERMO3* の分子機構の一端を明らかにすることができた。この結果は、個々の細胞はそれぞれに固有な遺伝子発現プロファイルをもち、オルガネラ形態を維持するための機構もこのプロファイルに応じて分化していることを示唆している。

これまで、PYK10 は O-glucoside 結合を切断する β -glucosidase であると信じられてきたが、中野氏の生化学的な解析から、S-glucoside 結合を切断する活性、即ちミロシナーゼ活性をもつことが明らかになった。ミロシナーゼ・glucosinolate 系は、アブラナ科で古くから知られている病害虫の忌避物質生産系である。本研究から、根の主要タンパク質である PYK10 がミロシナーゼ・glucosinolate 系を担う主要酵素であることが証明された。

本研究は、真核細胞で最大の膜面積をもつ小胞体のネットワーク構造の維持の分子機構と植物特有の新しい生体防御への関与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、植物科学の有力国際学術誌の一つである *The Plant Cell* 誌に掲載された。中野亮平氏が実施した研究の質は高く、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、平成24年2月1日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。