

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	平野 朋子
論文題目	シロイヌナズナ Phosphatidylinositol 3 phosphate 5-kinase, FAB1 の機能解析に関する研究		
真核生物に普遍的に存在する Fab1/PIKfyve はフォスファチジルイノシトール 3 リン酸のイノシトール環の 5 位の水酸基をリン酸化し、フォスファチジルイノシトール 3, 5 ビスリン酸を合成する酵素フォスファチジルイノシトール 3-リン酸 5-キナーゼであり、真核細胞内のエンドソームに局在し、液胞やリソソームの恒常性維持、エンドサイトーシスなどの調節に機能している。Fab1/PIKfyve の細胞における機能は、酵母、動物の培養細胞を用いて解析が行われているが、Fab1/PIKfyve の機能が、多細胞真核生物の形態形成や生理反応など個体全体に与える影響については、現在まで全く不明である。 本博士論文では、シロイヌナズナをモデル生物として、個体の発達および形態形成に Fab1/PIKfyve が果たす役割に関しての詳細な検討を行った。 分裂酵母の <i>fab1</i> 欠損株にシロイヌナズナ FAB1A または FAB1B を発現させると、<i>fab1</i> 欠損株液胞の形態異常を完全に相補した。さらに GFP 融合型の FAB1A/B の細胞内局在を酵母細胞およびシロイヌナズナの根の表皮細胞で調べた結果、FAB1A/B はエンドソームに局在することがわかった。FAB1 ノックダウン植物では、液胞の酸性化やエンドサイトーシスに欠損を生じ、また、根や根毛の成長阻害、オーキシシンに対する感受性の減少、根の重力屈性の乱れなど、多面的な異常が観察された。FAB1 のノックダウン植物で観察されるこれらの表現型は、FAB1 の過剰発現植物でも同様に観察された。さらに、FAB1 恒常的過剰発現の植物は、FAB1 の発現量依存的に矮小化すると同時に花粉の発達異常を生じ、また花や葉の形態形成異常を起こした。これらの表現型の多くは、オーキシシンシグナリングに異常がある変異体に共通するものであることから FAB1 機能の欠損が何らかの形でオーキシシンシグナリングに影響を及ぼす可能性が示唆された。 FAB1 の機能がオーキシシンシグナリングのどの段階に影響しているかを調べるために、細胞浸透性のオーキシシンであるナフタレン酢酸(NAA)と AUX1 や PIN タンパク質などのオーキシシンキャリアーによって細胞内外に輸送される細胞非浸透性のオーキシシン 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を用いて、外部から添加したオーキシシンによる実験を行った。その結果、FAB1A/B の発現を低下させると 2,4-D に対しては不感受性になるのに対し、NAA に対しては、正常に応答することが明らかとなった。 以上の結果より、シロイヌナズナにおいては FAB1 の発現異常によって、エンドサイトーシスや液胞酸性化などの細胞内膜系の異常を生じるとともに、オーキシシンキャリアータンパク質の細胞膜上への輸送および細胞内外へのリサイクリングに欠損を生じ、その結果、キャリアータンパク質依存的なオーキシシンの細胞内外への輸送が阻害されている可能性が示唆された。 本研究により、シロイヌナズナにおいて、FAB1 の発現異常が、エンドソームや液胞を含むオルガネラ膜系の恒常性やエンドサイトーシス過程の異常を引き起こし、その結果、植物体全体に多面的な形態異常を引き起こすことが明らかとなった。さらに、これらの形態異常の多くは、オーキシシンキャリアー依存的なオーキシシンの細胞内への輸送と密接な関連性があることが示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、シロイヌナズナフォスファチジルイノシトール3-リン酸 5-キナーゼ、*FAB1*の発現量に異常をきたすと、エンドサイトーシスの過程や液胞酸性化など細胞内膜系の恒常性に異常を生じ、その結果、植物体全体の成長や形態形成に多面的な異常を生じることを示したものである。

酵母および動物細胞を用いた先行研究により、*fab1*欠損株には、巨大化した液胞が観察され、細胞分裂期でも液胞が分裂できないという表現型が報告されていた。また、*FAB1*が、プレ液胞中間体を経て液胞へ輸送される経路や、液胞からトランスゴルジ網への逆輸送、エンドサイトーシス、オートファジー経路等に関与していることも報告されていた。このように単一細胞における*FAB1*の機能については、現在までに多くの報告があるものの、多細胞真核生物の形態形成や個体の発達に及ぼす*FAB1*の影響についての報告はほとんどない状態であった。これは、*FAB1*の欠損が、真核生物の細胞機能に重篤な障害をもたらすために、*FAB1*ノックアウト生物が致死になるなどの原因によるものであると考えられる。実際、シロイヌナズナにおいて*FAB1A*, *FAB1B*を同時に遺伝子破壊すると、花粉が発達途中で死滅し、雄性不稔の表現型を示すために*fab1a/fab1b*二重変異体植物が取得できないことが報告されていた。

本論文では、エストロゲンを培地に添加することで、RNA干渉を条件的に誘導し、シロイヌナズナ*FAB1A*, *FAB1B*の発現を抑制できる系とエストロゲン添加で*FAB1A*または*FAB1B*を過剰に発現できる形質転換植物体を新たに作出し、植物個体の発達段階および生理反応における*FAB1*の役割についての詳細な解析を行った。

その結果、まず、*FAB1A/B*の誘導的ノックダウン植物と*FAB1*過剰発現植物は、根や根毛の伸長が阻害され、更に恒常的*FAB1*過剰発現植物では、*FAB1*の発現量依存的に植物体が矮小化することが明らかとなり、*FAB1*の適切な発現量が植物の正常な成長に必要であることがわかった。さらに、恒常的*FAB1*過剰発現植物では、花粉の生存率が低下し、花粉の形成異常が起こり、*FAB1*の適切な発現量が、花粉の形成にも必要であることがわかった。

一方、*FAB1A/B*のノックダウン植物と過剰発現植物は、液胞の酸性化が極端に低下し、更に*FAB1A/B*ノックダウン植物ではエンドサイトーシスの大幅な遅延が見られた。また、シロイヌナズナ*FAB1A/B*は、分裂酵母*fab1*変異株の表現型を相補するという結果からシロイヌナズナ*FAB1*は、酵母と同様に、植物細胞内でフォスファチジルイノシトール3-リン酸 5-キナーゼとして働き、細胞内膜系の恒常性の維持のために必須であることがわかった。さらに、膜透過性オーキシシンと膜不透過性オーキシシンに対する側根形成誘導の感受性の違いから、*FAB1*が細胞内へのオーキシシンの流入過程に関与している可能性が示され、オーキシシンキャリアーのリサイクリングに重要な役割を果たしていることが示唆された。

本論文は、技術的な障害から、これまで未知であった生物個体の形態形成時や発達時における *FAB1* の寄与を、条件的に RNA 干渉を誘導するという新たな手法を用いて多細胞真核生物で初めて明らかにしたものであり、学術的意義は非常に高く、博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成23年1月31日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日