

論文審査の結果の要旨

氏名 砂田麻里子

本論文は、植物における異なる RAB5 メンバーの活性化機構の研究についてまとめられたものであり、序論、2 章からなる主編、総合討論からなる。

序論では、真核生物の細胞内膜交通における RAB GTPase とその活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の概略と、植物細胞における RAB5 GTPase やポストゴルジ輸送網に関するこれまでの知見が述べられている。

第 1 章では、シロイヌナズナ RAB5 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)、VPS9a についての機能解析について述べられている。シロイヌナズナは保存型 RAB5 である RHA1、ARA7 と、植物特異的な RAB5 である ARA6 をもつ。これらは、細胞内で一部共局在しながらも異なるエンドソーム群に局在し、保存型 RAB5 はエンドソームから液胞方向の輸送を制御するのに対し、植物特異的な ARA6 はエンドソームから細胞膜方向の輸送を制御すること、また遺伝学的解析から、VPS9a はシロイヌナズナにおける RAB5 GEF として異なる RAB5 メンバーを共通に活性化することが先行研究により報告されていた。しかし、どのように異なる RAB5 メンバーを制御しているのかについては未解明であった。本章では、既知のドメイン構造やモチーフが予測されない C 末端領域 (CTR) を削った S304* という変異型 VPS9a を用いて、生化学的・遺伝学的な解析を行った。相互作用および GEF 活性の測定から、S304* は ARA6 特異的な制御に関与することが示唆された。さらに、VPS9a は CTR を介して多量体を形成することも明らかになった。この多量体形成には、植物 RAB5 GEF 間で保存されている 36 アミノ酸からなる配列、PSR (plant-specific high similarity region) が関与することも示唆された。細胞内局在を観察した結果、S304*-mRFP は全長 VPS9a-GFP と一部重なりながらも異なる局在を示し、wortmannin や Brefeldin A などの薬剤処理における応答も異なることが示された。これは、CTR が正しい VPS9a の局在に寄与することを示唆している。本章の一連の研究成果は、VPS9a の CTR が 2 つの異なる RAB5 メンバーの制御において重要な役割を果たしていることを明らかにした点で、インパクトの大きな発見である。

第 2 章は基部陸上植物であるゼニゴケの RAB5 GEF の機能解析について述べられている。ゼニゴケにも保存型 RAB5 と植物特異的な ARA6 が 1 つずつ保存されてい

る。どちらも多胞体に局在するが、薬剤処理による挙動や、活性固定型の局在は異なることが明らかになっていた。ゼニゴケの **RAB5 GEF** については、これまで全く解析がなされていなかった。ゼニゴケには **RAB5** の活性化に必須とされる **Vps9** ドメインをもつものが1つ存在する。これをクローニングし、ゼニゴケ **VPS9** (以下、**MpVPS9** と呼ぶ) と名付けた。**MpVPS9** や他の植物で **Vps9** ドメインをもつものをアライメント解析したところ、**Vps9** ドメイン以外には既知のドメイン構造やモチーフが予測されないこと、C末端領域に **PSR** が保存されていることが明らかになった。酵母ツーハイブリッド法を用いて、相互作用を調べたところ、**MpVPS9** は **MpRAB5** および **MpARA6** と相互作用を示した。また、**MpVPS9** も全長および **CTR** を用いて多量体を形成することが、酵母ツーハイブリッド法およびプルダウン法で示された。精製タンパクを用い、トリプトファンの自家蛍光の変化を利用して **GEF** 活性の測定を行ったところ、**MpVPS9** は **MpRAB5** と **MpARA6** の両方を活性化することが明らかになった。興味深いことに、**MpARA6** に対しては高い感受性を示唆する結果も得られた。本章の一連の研究成果は、ゼニゴケにおいても **Vps9** ドメインをもつものが **RAB5 GEF** としてはたらくことを示しただけでなく、**ARA6** に対する感受性の違いや、**CTR** の機能が植物の **RAB5 GEF** で保存されていることを初めて示した点で、斬新である。

続く総合討論では、細胞内膜交通研究における本研究の総括、および今後の展望が述べられている。

なお、本論文第1章は郷達明博士・上田貴志准教授・中野明彦教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。