氏名	貴嶋　紗久		
学位の種類	博士（　理学　）		
学位記番号	博甲　第　　8559　　号		
学位授与年月日	平成　30年　3月　23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Molecular and Cell Biological Study on the *Arabidopsis thaliana* Actin Isoforms (シロイヌナズナアクチンアイソフォームの分子細胞生物学的研究)		
主査	筑波大学准教授	博士（ 理学 ）	中野賢太郎
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田　治
副査	筑波大学教授（連携大学院）	理学博士	広瀬　恵子
副査	筑波大学教授	博士（ 農学 ）	三浦　謙治

論　文　の　要　旨

植物のアクチン細胞骨格は、根などの組織の先端成長、花粉管の伸長、原形質流動やオルガネラの移動と再配置、病原菌の侵入や細胞外刺激への応答など、様々なプロセスで働く。植物は多様なアクチン遺伝子 (アイソフォーム) をもち、各アイソフォームの発現パターンは組織や成長過程で異なる。これまでに著者は、モデル植物であるシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* のアクチンアイソフォームについて自らが行った先行研究から、いくつかのアイソフォームは重合能やアクチン結合タンパク質（ABP）への親和性が顕著に異なることを見出していた。そこで著者は、アクチンアイソフォームが異なった生化学活性を発揮することが、上述した様々なアクチン細胞骨格の働きを実現する分子基盤の 1 つである可能性を考えた。本論文で著者は、この仮説を検証する目的で、顕微鏡イメージングを駆使したアクチンアイソフォームの細胞内局在様式の違いと、それが生じる原因について研究を展開している。

本論文の第 1 章で著者は、蛍光タンパク質融合アクチンのコンストラクトの開発に取組んでいる。これまでに同様の技術は動物細胞の実験系では利用されていたが、植物では実績がなかった。そこで著者は、まずアクチンに対する蛍光タンパク質の融合位置とリンカーの長さの検討を重ねたことについて述べている。その結果、アクチンの N 末側に 9 アミノ酸残基以上の長さのリンカーを介して蛍光タンパク質を融合したコンストラクトが効果的であることを見出した。著者はこれをシロイヌナズナの葉から作製したプロトプラストに発現し、蛍光タンパク質融合アクチンがフィラメントを形成するのを観察できたと報告している。続いて著者は、主要なアクチンアイソフォームである AtACT2 と AtACT7 に異なる蛍光タンパク質を融合したコンストラクトを、タバコ *Nicotiana benthamiana* の葉に一過的に共発現した。そして、海綿状組織の細胞と表皮細胞で各アイソフォームの局在を調べた。その結果、著者は、

海綿状組織の細胞においては、AtACT2 と AtACT7 はまだらに共重合した繊維状構造を形成するのを発見した。一方、表皮細胞においては、AtACT2 は AtACT7 に比べて細い繊維状構造に取り込まれ、AtACT7 は太い束化した繊維状構造に取り込まれたことを見出した。

表皮細胞における AtACT2 と AtACT7 の局在様式が異なっていたことから、著者は第２章において、アクチンフィラメントのプローブとして汎用されている mTalin1 と Lifeact の局在を交えて、各アクチンアイソフォームの局在性を比較した。その結果、著者は、Lifeact はほとんど全ての AtACT7 を含む繊維状構造をラベルしたが、AtACT2 を含む繊維状構造の大部分を認識しないことを発見した。一方、精製した AtACT2 及び AtACT7 から形成した繊維状構造に Lifeact が作用するか、*in vitro* で調べたところ、両アクチンアイソフォームにほぼ同様に Lifeact が結合したと著者は述べている。そのため、表皮細胞で AtACT2 の繊維状構造が Lifeact で認識されなかったのは、表皮細胞内では AtACT2 に特異的に結合する ABP が Lifeact の結合と競合する可能性について著者は言及している。

第３章で著者は、より様々な組織でのアクチンアイソフォームの観察を目指し、GFP-AtACT7を発現するシロイヌナズナ株の樹立に取り組んだ。ところが、GFP-AtACT7を発現した植物体は矮性の表現型を示したため、今後、コンストラクトの発現量の制御等の工夫が必要だろうと指摘している。

審　査　の　要　旨

著者による本研究成果は、動物細胞などの実験系でも一部を除き曖昧であったアクチンアイソフォームの細胞内分布を実験的に明確にした点で、極めて独創的で学術的価値が高い。さらに、著者が本研究で確立した植物細胞内のアクチンアイソフォームを直接的にイメージングする技法は、今後、植物の分子細胞生物学的研究分野で普及する可能性が高く、当該分野の研究の推進に重要な意義をもつ。また本技法を応用することで、生化学的解析だけでは十分に理解が進まなかった変異型アクチンについて、その細胞内挙動を野生型アクチンと比較解析するなど、新たな研究への道筋が開かれたことも注目に値する。

平成30年 1月30日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。