

氏 名	まつ しま りょう 松 島 良
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2674 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 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	シロイヌナズナに存在する小胞体由来の新規構造体の解析

論文調査委員 (主 査)
教授 西村いくこ 教授 岡田清孝 教授 高林純示

論 文 内 容 の 要 旨

小胞体は真核細胞に広く観察されるオルガネラであり、分泌タンパク質および膜タンパク質の合成、膜脂質の生合成、カルシウムイオンの蓄積と恒常性の維持などの機能を担っている。これらの機能に加えて、植物細胞の小胞体は、独自の機能を持つ構造体を発達させる能力を持っている。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に見出される ER body は長さ~10 μ m, 幅~1 μ m の細長い形態を示す小胞体由来の構造体である。ER body の主構成成分は現在まで未同定であり、その生理機能は不明であった。ER body の生理機能および形成の分子機構を明らかにするために、多面的なアプローチを用いて ER body を解析した。

小胞体局在化シグナルを持つ GFP (GFP-HDEL) を発現するシロイヌナズナ (*GFP-h*) では、ER body を可視化できる。これを利用して、ER body が幼植物体の子葉・胚軸・根に発達しているが、成長した植物体の葉 (ロゼット葉) には存在しないことが明らかになった。興味深いことに、本来 ER body を持たないロゼット葉に人為的な傷害や昆虫 (アザミウマ) による食害を与えると、ER body が誘導されることを見いだした。傷害および食害による ER body の誘導は植物ホルモンの 1 つであるジャスモン酸メチルを介して行われていることがら、ER body の機能が植物の傷害および食害に対する抵抗性に関与していることが示唆された。

ER body の生理的機能を解明する目的で、ER body の形成・形態に異常を示す突然変異体のスクリーニングを行い、幼植物体において ER body がほとんど検出されない *nai1* 変異体を単離することに成功した。*nai1* 変異体では basic-helix-loop-helix (bHLH) ドメインを持つタンパク質をコードする At2g22770 遺伝子の第 1 イントロン 3' 切断部位に塩基置換が起こっていた。bHLH ドメインを有するタンパク質の多くは転写制御因子であり、NAI1 タンパク質も ER body の形成に関わる遺伝子の転写制御を行っている可能性が浮上した。

ER body を持たないこの変異体と野生型の幼植物体から、ER body-rich 画分を調製し、そのタンパク質成分を比較することにより、ER body の構成成分の同定を試みた。その結果、C 末端に小胞体局在化シグナル Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) 配列を有する β -グルコシダーゼ PYK10 が ER body の主要構成成分であることが明らかになった。小胞体では、様々なタンパク質が合成され、それぞれの機能部位に輸送されることが知られている。PYK10 と GFP-HDEL の挙動を解析することにより、PYK10 の ER body への集積が積極的に行われていることが明らかになった。トランスポゾンの挿入により PYK10 が欠失している *pyk10* 変異体では、下胚軸の細胞において ER body が欠失していた。PYK10 の機能は、植物種特異的に発達している ER body の機能と密接に関係しており、植食性昆虫もしくは病害細菌に対する植物の防御機構に関与すると考えられる。以上の結果は、ER body が外敵や環境変化に対処するために植物体が備えている耐性機構の一つとみなすことができることを示している。

論文審査の結果の要旨

松島君は、高等植物シロイヌナズナの幼植物体の表皮細胞に発達している ER body (小胞体 Endoplasmic Reticulum 由来のコンパートメント) と命名した新規の細胞内コンパートメントの形成と生理学的な機能の解明を目指して、細胞生物学的・遺伝学的・生化学的などの多面的なアプローチを積極的に取り入れて解析を進めた。小胞体残留シグナルである HDEL (His-Asp-Glu-Leu) を C 末端に付加した GFP (緑色蛍光タンパク質) をシロイヌナズナに発現させると、ER body は、幼植物体の根、胚軸、子葉の表皮細胞内に紡錘形の構造体 (約 $0.5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$) として多数見られる。この構造体は、機能が不明であることから、“Mystery Organelle” と呼ばれてきたもので、教科書「Essential Cell Biology」では現在もプロプラスチドと紹介されているが、松島君の解析を通して、ER body はプロプラスチドではなく、小胞体に由来する生体防御に関わるコンパートメントであることが明らかになった。一般に、GFP は生きた細胞で細胞内のコンパートメントを可視化する目的で近年良く利用されているが、松島君は GFP を単に細胞内のオルガネラを可視化する目的だけでなく、オルガネラの単離の際の指標タンパク質として用いたり、ER body 形成不全変異体の選抜に利用したり、また ER body へのタンパク質の集積機構の解析の指標とするなど GFP を最大限に駆使した解析を展開した。本来 ER body が存在しないロゼット葉に、傷害や虫害や傷害ホルモンであるジャスモン酸を与えることにより ER body が誘導するという発見は、植物のもつ新しい生体防御系の存在を示すものとして大変興味深いものである。表皮細胞は常に外界の環境変化に曝されている。幼植物体の場合、環境ストレスや虫害などによる傷害は個体の生死に関わる。そのため、表皮細胞は傷害時に備えて、予め ER body を準備している。一方、成長した植物体は、多少の傷害は個体の生死に関わらないため、傷害を受けてから ER body を誘導すると考えられる。このように小胞体から機能の特殊化したコンパートメントを誘導することにより、環境ストレスに対応するという植物細胞の戦略が初めて見えてきた点でも松島君の研究は高く評価される。選抜した ER body の形成不全変異体を利用して ER body の主要な構成成分が小胞体残留シグナルを有する β -グルコシダーゼであることを示すことにも成功している。この変異体などの解析を通して、あるいはまた、ER body の主要構成成分として見いだされた β -グルコシダーゼの細胞内の基質の同定に成功すれば、外敵や環境変化に対処するために植物体が備えている耐性機構としての ER body の誘導とその生理学的な意義が深まるものと期待される。本研究は、植物生理学上新たな知見を与えるものと考えられる。本学位論文の内容は、国際誌 Plant Physiology 誌および Plant Journal 誌に掲載されている。

以上より、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試問の結果合格と認めた。