

|          |   |         |          |
|----------|---|---------|----------|
| 氏名       | なか<br>中                                   | うね<br>畦 | さとの<br>悟 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (理 学)                                 |         |          |
| 学位記番号    | 理 博 第 3172 号                              |         |          |
| 学位授与の日付  | 平 成 19 年 3 月 23 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 学 専 攻                       |         |          |
| 学位論文題目   | シロイヌナズナ内珠皮細胞死を制御する $\delta$ VPE と新規構造体の解析 |         |          |

論文調査委員 (主査) 教授 西村いくこ 教授 長谷あきら 教授 岡田清孝

### 論 文 内 容 の 要 旨

液胞プロセシング酵素 (VPE) は、液胞タンパク質の成熟化に関わる新規のシステインプロテアーゼとして発見された。これまで、シロイヌナズナの3種類の VPE 遺伝子 ( $\alpha$ VPE,  $\beta$ VPE,  $\gamma$ VPE) の解析から、 $\beta$ VPE は種子特異的、 $\alpha$ VPE と  $\gamma$ VPE は栄養器官特異的に発現し、それぞれ特殊化した機能を果たしていることが分かってきた。その後、シロイヌナズナの遺伝子データベースから新たな VPE ホモログが見いだされ、 $\delta$ VPE と名付けた。 $\delta$ VPE のアミノ酸配列を既知の全ての VPE ホモログと比較したところ、 $\delta$ VPE は種子型 VPE、栄養器官型 VPE と異なるタイプであることが示唆された。この新規 VPE の生理学的な機能を解明する目的で、 $\delta$ VPE に対する特異的抗体を作製した。イムノブロット及び蛍光抗体染色によってその局在を調べたところ、 $\delta$ VPE は種子の発生段階の初期に内珠皮の特定の細胞層 (ii2, ii3層) に一過的に発現していることが分かった。 $\delta$ VPE が発現している層では種子形成の過程で細胞死が起きており、 $\delta$ VPE 欠損株では内珠皮の細胞死に遅れがみられた。また、細胞死が起きる時期に電子密度の高い構造体が細胞膜と細胞壁の間に現れ、その新規の構造体に  $\delta$ VPE が局在することを明らかにした。また、動物のプログラム細胞死では、caspase と呼ばれる cysteine protease を実行因子とする細胞死機構がよく知られているが、 $\delta$ VPE が caspase-1 活性を持つことを明らかにした。これらの結果は、 $\delta$ VPE が内珠皮特定層の細胞死に重要な役割を果たしていることを示している。近年、タバコモザイクウイルスのタバコの葉への感染による過敏細胞死と呼ばれる植物の防御応答が VPE のノックダウンによって抑制されることや、シロイヌナズナの葉に対してカビ毒である FB-1 によって誘導される細胞死が VPE のノックアウトによって抑制されることが明らかになっている。本研究は、そうした病原体による誘導型の細胞死だけでなく、発生過程における内珠皮細胞死においても VPE がキープレイヤーとして働くことを示すものとなった。

さらに  $\delta$ VPE の局在する新規構造体に注目して解析を行った。この構造体は電子密度が高く、内珠皮の特定細胞層における細胞死の初期に細胞外に出現する。この構造体は遠心による沈殿画分として粗精製することができる。これを用いて11種類の構成成分を同定した。そのうち、公開されている DNA マイクロアレイのデータベースによって、 $\delta$ VPE と発現パターンが最も良く似ている At4g12960 に注目して解析を行った。At4g12960 は、Human や Mouse においてタンパク質の S-S 結合を切断することが報告されている GILT (Gamma-interferon inducible lysosomal thiol reductase) のホモログであった。シロイヌナズナにはこのホモログが6つ存在する。AGI number の順に番号をつけ、At4g12960 は AtTR5 (Thiol Reductase) と命名した。AtTR5 の抗体を作製し、イムノブロットを行ったところ、発現時期・器官が  $\delta$ VPE と完全に一致した。蛍光抗体染色の結果は、内珠皮の特定の細胞層 (ii2・ii3層) に AtTR5 が一過的に発現することを示した。AtTR5 が構造体に局在することを抗  $\delta$ VPE 抗体と抗 AtTR5 抗体の免疫2重染色を行い電子顕微鏡によって確認した。T-DNA の挿入による AtTR5 欠損変異体を独立に2ライン取得し、電子顕微鏡による観察を行ったところ、AtTR5 欠損変異体では新規構造体の数が減少し、大きさが著しく小さくなった。このことは AtTR5 がこの構造体の主要な構成成分であることを示唆した。

## 論文審査の結果の要旨

中畦君は、高等植物の胚発生過程における珠皮のプログラム細胞死の機構の解明を目的として研究を行った。高等植物の種子では、次世代の胚や胚乳は種皮によって覆われている。種皮は胚を物理的なダメージや病原体の感染や紫外線によるダメージから守るだけでなく、種が発芽に適切な環境が訪れるまで発芽しないようにするという休眠システムの制御、胚珠から胚へのアミノ酸等の栄養源の輸送といった様々な重要な機能を果たしていると考えられている。アブラナ科の珠皮は内珠皮と外珠皮の2つからなり、シロイヌナズナの珠皮は受精期よりもかなり前の段階で胚珠を覆うようにして発生する。受精後、種子発生の早い時期に内珠皮と外珠皮は激的にその外見を変化させて成熟した種皮を形成する。中畦君はこの過程で、内珠皮の限られた細胞層でプログラム細胞死が起こることを示した。次いで、この細胞死を制御する因子として液胞プロセシングの一つである $\delta$ VPEが関与していることを見いだした。近年、高等植物の過敏感細胞死などのプログラム細胞死では、液胞の崩壊が引き金となっていることが示されてきた。この液胞の崩壊を制御している因子として液胞プロセシング酵素が浮上してきた。中畦君は内珠皮の第2・第3細胞層における細胞死に関与する $\delta$ VPEは、液胞ではなく原形質膜の外で複合体として機能することを見いだした。また、この複合体の構成成分としてthiol reductaseを見いだしている。この発見は、これまでのVPEを引き金とした液胞主導型の細胞死の機構とは全くことなるタイプの細胞死の機構の提唱につながる。本研究は、高等植物の新しいタイプのプログラム細胞死の機構の存在を示した点だけでなく、珠皮の特定の細胞層の細胞死の生理学的意義についても新しい知見を与えるものとして高く評価された。本学位論文の内容の一部は、国際誌Plant Cell誌に掲載されている。このように、行われた仕事の質は高く、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、論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。