

氏名	てら さか かず よし 寺 坂 和 祥
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 47 号
学位授与の日付	平成 17 年 7 月 25 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	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	植物の ABC タンパク質 PGP サブファミリーの発現および機能解析

論文調査委員 (主査)  
教授 佐藤文彦 教授 河内孝之 教授 永尾雅哉

### 論 文 内 容 の 要 旨

ABC (ATP-binding cassette) タンパク質は分子内に高度に保存された ATP 結合領域を有するタンパク質の総称である。ABC タンパク質は植物界にも広く存在しており、シロイヌナズナでは120種以上の ABC タンパク質の遺伝子が見出され、植物の生理機能に重要な役割を果たしていることが推察されている。本研究では、植物における ABC タンパク質の内でも、特にその機能解明が遅れている PGP サブファミリーのメンバーに関し、二次代謝産物や植物ホルモンなど、低分子の生理活性有機化合物の輸送を中心に解析した。

まず、二次代謝産物のアルカロイド輸送のモデル系としてアキカラマツ培養細胞を用いて、その生産するアルカロイド、ベルベリンの輸送(排出)に対する PGP 様 ABC タンパク質の関与を解析した。その結果、ベルベリンの輸送能はベルベリンの生産性とは独立に機能しており、また、アキカラマツ培養細胞は ABC タンパク質の基質となると考えられる neutral red や蛍光プローブ calcein AM といった化合物を細胞外に排出することを明らかにした。また、これらの輸送活性は ABC タンパク質の典型的な阻害剤で阻害され、この輸送が ABC タンパク質、特に PGP サブファミリーに属するメンバーによるものであることを示した。次いで、vanadate trap 法により、アキカラマツ培養細胞における ABC タンパク質の検出を試み、植物細胞由来の粗膜画分を用いた場合にも同手法が有効であることを初めて明らかとした。

PGP タイプの ABC タンパク質のより普遍的な機能を明らかにするため、モデル植物のシロイヌナズナを用いて、アキカラマツ培養細胞の PGP 遺伝子のホモログである AtPGP4 および AtPGP21 の発現部位、ならびに誘導因子について解析を行った。その結果、様々な化合物の添加に対して両遺伝子が異なる発現制御を受けており、また、発現の細胞・組織特異性も異なっていることを明らかとした。

根において強い発現の認められる AtPGP4 に関して詳細に解析した結果、同遺伝子は根の表皮細胞で発現していること、また、表皮細胞の細胞膜の apical 側に局在していることを明らかとした。さらに、AtPGP4 の遺伝子破壊株では、根の生長が低下することを明らかとした。

一方、AtPGP4 を昆虫細胞系で発現させ、AtPGP4 の輸送活性、特に基質について、vanadate trap 法により解析を行った結果、インドール環をもつ化合物が輸送基質となることが示唆された。さらに、<sup>3</sup>H-IAA を遺伝子破壊株、高発現植物体に投与し、IAA 輸送活性を測定した結果、AtPGP4 が IAA を輸送していることが植物体ならびに細胞レベルで示された。また、AtPGP4 は AtPIN2 と協調的に根の表皮細胞において根端から根の上部への basipetal auxin transport に関与していることが示された。さらに、HeLa 細胞を用いた異種発現系で詳細な解析を行った結果、AtPGP4 の IAA 輸送は AtPIN2 と協調的に制御されていること、その輸送方向が内向きであることなど、PGP サブファミリータンパク質の機能について新たな知見を得た。

## 論文審査の結果の要旨

生物界に広く存在する ABC タンパク質は様々な物質輸送において重要な役割を果たしている。ABC タンパク質は植物界にも広く存在しており、植物の生理機能に重要な役割を果たしていることが推察されている。本研究では、植物における ABC タンパク質の内でも、特にその機能解明が進んでいない PGP サブファミリーに関し、二次代謝産物や植物ホルモンなど、低分子の生理活性有機化合物の輸送を中心に解析した結果をまとめたものであり、その評価できる点は以下の通りである。

1) 二次代謝産物のアルカロイド輸送のモデル系としてアキカラマツ培養細胞を用いて、その生産するアルカロイド、ベルベリンの輸送を解析し、ベルベリンの輸送能はベルベリンの生産性とは独立に機能していること、また、同細胞は ABC タンパク質の基質となると考えられる neutral red や蛍光プローブ calcein AM を細胞外に排出すること、また、これらの輸送活性は ABC タンパク質の典型的な阻害剤で阻害され、この輸送が、PGP サブファミリーに属する ABC タンパク質によるものであることを示唆している。

2) vanadate trap 法により、アキカラマツ培養細胞における ABC タンパク質の検出を試み、植物細胞由来の粗膜画分を用いた場合にも同手法が有効であることを初めて明らかとしている。

3) モデル植物シロイヌナズナを用いて、アキカラマツ培養細胞から単離した PGP 遺伝子のホモログである AtPGP4 および AtPGP21 の発現解析を行ない、両遺伝子が異なる発現制御を受けていることを明らかとしている。

4) 根において強い発現の認められる AtPGP4 に関して詳細な解析を進め、同遺伝子は根の表皮細胞で発現していること、また、表皮細胞の細胞膜の apical 側に局在していることを明らかとしている。さらに、AtPGP4 の遺伝子破壊株では、根の生長が低下することを明らかとしている。

5) AtPGP4 の輸送活性について、組換え AtPGP4 を用いて解析を行なうとともに、さらに、AtPGP4 の遺伝子破壊株、高発現植物体を用いて輸送活性を測定し、AtPGP4 が AtPIN2 と協調的に、根の表皮細胞において根端から根の根元への basipetal auxin transport に関与していることを示している。

6) さらに、HeLa 細胞を用いた異種発現系で詳細な解析を行ない、AtPGP4 の IAA 輸送は AtPIN と協調的に制御されていること、その輸送方向が内向きであることなどの新規な知見を得ている。

以上の結果は、植物細胞における低分子化合物の輸送に関わる ABC タンパク質 PGP サブファミリーの機能解明に重要な知見を与えるものであり、植物分子細胞生物学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成17年5月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（生命科学）の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。