

Title	植物のフラボノイド蓄積におけるメンブレントラフィックの関与(Abstract_要旨)
Author(s)	市野, 琢爾
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2014-09-24
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k18541
Right	学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要旨は2014/12/24に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	市野 琢爾
論文題目	植物のフラボノイド蓄積におけるメンブレントラフィックの関与		
(論文内容の要旨)			
<p>植物の種子は、内部の胚を紫外線などの環境ストレスから保護するために、種皮に二次代謝産物であるフラボノイドを集積している。シロイヌナズナは種皮の細胞の液胞内にフラボノイドの一種であるプロアントシアニジンを大量に蓄積しているため、野生型の種子は茶褐色を呈している。今日までの遺伝学的解析によって、種皮の色に異常を示す約30系統の <i>transparent testa</i> 変異体が単離され、フラボノイドの生合成経路とその転写制御機構が詳細に解明されてきた。一方、細胞内で、フラボノイドは小胞体で合成された後、液胞に蓄積することが知られているが、その輸送に関する分子機構はほとんど分かっていない。これに対して、液胞タンパク質も小胞体で合成され、液胞まで小胞を介して輸送されるが、その分子機構は動物や酵母、シロイヌナズナを用いてこれまで詳細に解明されてきた。そこで、フラボノイドの蓄積機構に関して、小胞輸送を含めたメンブレントラフィックという細胞生物学的視点から研究を行った。</p> <p>フラボノイド蓄積に関与するメンブレントラフィックの因子を同定するために、所属研究室で作製された液胞タンパク質輸送に異常を示すシロイヌナズナの <i>green fluorescent seed (gfs)</i> 変異体ライブラリーから種皮色に異常を示す変異体の探索を行った。その結果、11系統の <i>gfs</i> 変異体の単離に成功した。この内、同一の遺伝子に変異が生じていた2系統を <i>gfs9</i> 変異体と命名し、以下の解析を行った。 <i>gfs9</i> 変異体では内在性の液胞タンパク質である12Sグロブリンが細胞間隙に蓄積しており、GFS9はタンパク質の液胞輸送に機能していることが判明した。また、 <i>gfs9</i> 変異体では、種子における主要なフラボノイドであるプロアントシアニジンとフラボノールの蓄積量が野生型と比較して顕著に減少していた。さらに顕微鏡観察によって、 <i>gfs9</i> 変異体においては、液胞の断片化、エンドソームの肥大化、およびオートファゴソーム様の構造体の異常な蓄積が生じていることが判明した。</p> <p>GFS9遺伝子は機能未知のタンパク質をコードしていた。GFS9タンパク質の細胞内局在性を調べるためGFS9-GFP及びGFP-GFS9を発現する形質転換植物を作出した。その結果、GFS9がゴルジ体に局在することを見出した。また、細胞分画及びオルガネラ分画によって、GFS9は表在性の膜タンパク質であることがわかった。以上の結果から、GFS9はゴルジ体に局在する表在性の膜タンパク質で、メンブレントラフィックの3つの経路に関与していることが明らかとなった。(1) タンパク質の小胞体から液胞への輸送、(2) 液胞同士の同型融合、及び(3) エンドソームの成熟化。ショウジョウバエのGFS9オーソログではHOPS複合体と相互作用し、エンドソームの成熟化に機能している。HOPS複合体はエンドソームや液胞上でのSNARE依存的な膜融合を司っている。これらの知見を考慮すると、GFS9は可溶性のHOPS複合体を内膜系オルガネラの膜上にリクルートすることによって、HOPS複合体もしくはSNARE依存的な液胞での膜融合に寄与していることが示唆される。フラボノイドの蓄積におけるGFS9の関与に関しては2つの可能性が考えられた。1つ目は、GFS9依存的な液胞の発生がフラボノイドの液胞における適切な蓄積には必須であるという可能性である。2つ目は、フラボノイドを含んだ小胞を小胞体から液胞まで運搬する経路において、GFS9がゴルジ体でその輸送に関与しているという可能性である。</p> <p>本研究により、フラボノイドの蓄積とメンブレントラフィックの両方に関与している因子が初めて同定された。また、両者に関与する他の因子や、フラボノイドの蓄積に関与する新規因子、および新規トランスポーターも単離に成功している。今後、これらの機能解析を進めることにより、フラボノイドの蓄積機構の解明への貢献が期待される。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

市野琢爾氏が注目した二次代謝産物であるフラボノイドは、すべての陸上植物において合成される。フラボノイドは花弁や果実、種子においてその器官の着色に寄与する色素として機能している。植物色素としてのフラボノイドの生合成機構は詳細に解明されてきた一方、その蓄積における分子機構の詳細はほとんど不明であった。そこで、市野氏は、モデル植物シロイヌナズナの分子遺伝学的解析と細胞生物学的解析を駆使して、フラボノイドの蓄積機構の解明を目指した。

まず、これまで未同定であったフラボノイドの蓄積に関与するメンブレントラフィック因子の同定を目的とした。この目的を達成するために市野氏は、所属研究室で作製した液胞タンパク質の輸送変異体ライブラリーに注目し、そのライブラリーから種皮の色に異常を示す変異体を単離するという簡便な手法で大規模スクリーニングを行った。次いで、このスクリーニングで単離した変異体を *green fluorescent seed 9 (gfs9)* と命名し、変異体の表現型解析から次の成果を得た。この *gfs9* 変異体の種皮では、実際にフラボノイドの蓄積量が減少していることがわかった。また、共焦点レーザー顕微鏡観察および透過型遠視野顕微鏡観察の結果、様々なメンブレントラフィックの異常が見出され、GFS9が液胞における膜融合に機能していることが証明された。さらに、フラボノイド蓄積異常を示す既知の変異体の中にはタンパク質の液胞輸送に異常を示すものはなかったこと、また、逆に、メンブレントラフィックに異常を示す変異体の中にはフラボノイド蓄積に異常を示すものはなかった。これらの結果は、GFS9がフラボノイドの蓄積とメンブレントラフィックの両方に関与する初めての因子であることを示している。市野氏は、フラボノイドの蓄積と液胞タンパク質輸送および液胞の形態に関与する第2の因子としてECHIDNAを単離している。

市野氏が見出した2つの因子は、メンブレントラフィックとフラボノイド集積の両者を繋ぐ初めての鍵を提供するものとして高く評価された。本研究は、植物特異的なフラボノイドの蓄積機構と真核生物に普遍的なメンブレントラフィック（小胞輸送及び液胞の発生）の両方に働く分子機構の解明に大きく貢献するものである。市野氏は、これまでに種皮の色に異常を示す新規の *gfs* 変異体を9株単離しており、今後は、これら変異体の原因遺伝子の同定を進めることによって、メンブレントラフィックとフラボノイド集積の関係性がより詳細に解明されることが期待できる。さらに、メンブレントラフィックという細胞生物学的な視点から、二次代謝研究を進めることにより、フラボノイドのみならず植物が生産する多様な二次代謝産物の未知なる関係性の発見という発展性も十分に認められる。

本研究は、植物細胞の謎であったメンブレントラフィック依存的な二次代謝産物の集積装置を同定したもので、この分野の研究に新しい視点を与えたものとして高く評価された。本論文の内容の一部は、植物科学の有力国際学術誌の一つである *The Plant Journal* 誌に掲載された。市野氏が実施した研究の質は高く、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、平成26年8月21日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公表可能日： 2014 年 12 月 24 日以降