

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	しまだ たかし 島 田 貴 士
学 位 (専 攻 分 野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 年 月 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) 植物のオイルボディ膜タンパク質の機能解析	
論 文 調 査 委 員	(主 査) 西 村 い く こ 教 授 長 谷 あ き ら 教 授 嶋 田 知 生 講 師

理 学 研 究 科

京都大学	博士（理学）	氏名	島田貴士
論文題目	植物のオイルボディ膜タンパク質の機能解析		
(論文内容の要旨)			
植物細胞は脂質を蓄えるためにオイルボディというオルガネラを持つ。オイルボディは、オレオシン、カレオシン、ステロレオシンと呼ばれる膜タンパク質に囲まれていることが知られているが、その生理機能はよくわかっていない。本研究では、オイルボディ膜タンパク質の機能解析からオイルボディが関わる生命現象の解明を目指した。 まず、種子のオイルボディに注目し、シロイヌナズナ種子に存在する 4 つの主要なオレオシン遺伝子 (<i>OLE1</i>, <i>OLE2</i>, <i>OLE3</i>, <i>OLE4</i>) の欠損単独変異体 (<i>ole1</i>, <i>ole2</i>, <i>ole3</i>, <i>ole4</i>) を確立した上で、3 種類の二重変異体 (<i>ole1 ole2</i>, <i>ole1 ole3</i>, <i>ole2 ole3</i>) を作出した。それぞれの変異体の種子を電子顕微鏡観察したところ、オレオシン含量とオイルボディの大きさには負の相関があることが分かった。この結果は、オレオシンがオイルボディのサイズレギュレータであることを示している。最もオレオシン含量が少ない <i>ole1 ole2</i> 種子では発芽率の低下がみられたことから、オレオシンは種子の発芽に必須であることが明らかになった。興味深いことに、オレオシン単独変異体 <i>ole1</i> の種子は、凍結処理により発芽が顕著に阻害された。<i>ole1</i> 種子細胞では、凍結処理とそれに続く低温湿潤処理の間にオイルボディの融合がさらに促進され、異常に巨大化したオイルボディが形成された。オレオシンの欠損によるオイルボディの異常な巨大化が、核の形態異常を引き起こし、発芽阻害につながったと考えられる。オレオシンは種子の正常の発芽を助けるとともに、種子に凍結耐性を付与するという働きがあることを明らかにした（第 1 章）。 上記の種子のオレオシンの分子細胞生物学的研究を実施する過程で、オレオシンを用いたシロイヌナズナの形質転換技術の開発に成功した。一般に植物の形質転換体の選抜には薬剤が用いられる。しかし選抜薬剤を用いる従来法は、操作が煩雑になることや選抜薬剤による悪影響などの欠点をもっている。本研究で新たに開発した蛍光タンパク質を用いた選抜法 FAST (<u>F</u>luorescence-<u>A</u>ccumulating <u>S</u>eed <u>T</u>echnology) 法は従来法の欠点を克服できる。FAST 法では、<i>OLE1</i> と蛍光タンパク質の融合タンパク質を <i>OLE1</i> プロモーターで誘導するコンストラクトを FAST マーカーとして用いた。FAST マーカーを利用することにより、蛍光実体顕微鏡下で形質転換種子を非破壊的に容易に選抜できる。また、T2 種子集団からホモ接合種子を効率よく選抜できることから形質転換体の取得までに時間が格段に短縮された。FAST マーカーを持つ Gateway デスティネーションベクターを 10 種類作製し、FAST 法を使用する環境を整えた（第 2 章）。 植物は、種子以外の栄養器官にもオイルを集積するが、その生理学的な役割に関する知見は少ない。葉のオイルボディに局在する膜タンパク質として、<i>CLO3</i> と α-ジオキシゲナーゼ 1 (α-DOX1) を見出した。<i>CLO3</i> と α-DOX1 は、炭疽病菌感染時に感染部位の周辺で発現誘導されオイルボディに共局在した。<i>CLO3</i> と α-DOX1 は脂肪酸代謝経路で協調して働き、α-リノレン酸から 2-HOT (2-hydroxy octadecatrienoic acid) を産生することを明らかにした。2-HOT は炭疽病菌に対して抗菌活性を示したことから、オイルボディ上の <i>CLO3</i> と α-DOX1 は菌の拡大を予防するために、菌の周辺で α-リノレン酸から抗菌物質を産生していることが分かった。オイルボディは、菌感染時の新しい防御機構の一つととらえることができた（第 3 章、論文投稿準備中）。 オイルボディや <i>CLO3</i> は様々なストレスにより発現が誘導されるが、オイルボディの形成誘導機構は未解明の部分が多い。オイルボディ形成誘導に関わる因子の同定を目指し、分子遺伝学的解析を行った。手法としては、<i>CLO3</i> と GFP の融合タンパク質を <i>CLO3</i> プロモーター依存的に発現させる形質転換シロイヌナズナに EMS による変異原処理を行い、この変異体プールから、<i>CLO3</i>-GFP の発現パターンが異常になる <i>loa</i> (<u>L</u>eaf of <u>O</u>il-body-protein <u>A</u>ccumulation)変異体を複数取得することができた（第 4 章）。			

(論文審査の結果の要旨)

植物は細胞内に脂質であるトリグリセリドを集積する。植物の脂質は、近年バイオディーゼルとして注目を集めている。脂質の集積の場であるオイルボディを取り囲む膜タンパク質の生理学的な意義は不明であった。島田貴士君は、オイルボディ膜タンパク質に焦点をあてて、正・逆遺伝学的解析と分子細胞生物学的解析から、この課題に取り組んだ。

先ず、植物の器官の中で脂質含量が最も高い種子のオイルボディを対象として研究を行った。具体的には、シロイヌナズナ種子の主要なオイルボディ膜タンパク質であるオレオシンをコードする4つの遺伝子の単独および二重欠損変異体のシリーズを作製し、解析を行った。その結果、オレオシン量とオイルボディのサイズに負の相関があることを見いだした。即ち、オレオシンはオイルボディのサイズを制御する因子であることを明らかにした。また、この変異体シリーズの詳細な発芽能力の解析から、オレオシンが油量種子に凍結耐性を付与していることを発見した。種子は発芽時のエネルギー源として貯蔵脂質を集積するが、種子が凍結状態から低温湿潤状態へ移行する際にオイルボディ同士が融合すると細胞構造が破壊されることが分かってきた。オレオシンはオイルボディの融合を防ぐことにより、越冬する種子に凍結耐性を与えているという新しい概念が生まれた。この成果は、国際誌 *The Plant Journal* と *Biological & Pharmaceutical Bulletin* に掲載された。

島田君は、オレオシンを利用したシロイヌナズナの形質転換体選抜の簡便法を確立した。このマーカーは FAST (Fluorescence-Accumulating Seed Technology) と命名され、国際誌 *The Plant Journal* に掲載された。本マーカーは、形質転換体の確立に要する時間を半減するだけでなく、従来法のように多数の植物を栽培する必要がないこと薬剤や滅菌操作が不要であるなどの利点があることから、論文発表当初から高い関心を集めた。本マーカーは、ベルギー国の非営利団体 *Plant System Biology* に配布を委託しており、植物科学の発展に貢献できたものと考えている。

植物は、栄養器官である葉にも脂質を集積することが知られていたが、その生理学的な意義は不明であった。島田君は、葉のオイルボディの膜タンパク質を2つ同定し、それらが協調的に働くことにより、オイルボディから供給される α -リノレン酸を基質として抗菌物質 2-HOT (2-hydroxy octadecatrienoic acid)を生産することを見いだした。植物は、感染時にこの2つの遺伝子を発現誘導し、菌の拡散を防いでいると考えられる。オイルボディが抗菌物質生産の場であるという発見は植物免疫の分野に新しい概念を投じたものとして評価できる。

最後に、オイルボディ形成誘導機構の解明を目指して、モデル植物シロイヌナズナを用いて、分子遺伝学的解析を行い、葉の細胞における CLO3 の発現パターンが異常になる変異体を複数単離し、*loa* (Leafof Oil-body-protein Accumulation)変異体と名付けた。これらの変異体の表現型や原因遺伝子の解析を進めることにより、葉のオイルボディ形成誘導の分子機構のみならず、菌感染等のストレス応答におけるオイルボディの関わりについての理解が深まるものとして評価することができる。

上記のように、本研究成果の質は高く、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を平成23年2月2日に行った結果、合格と認めた。