

(論文内容の要旨)

ER body は、小胞体に由来する機能未知の細胞小器官である。シロイヌナズナをはじめとするアブラナ科植物に存在する。また、ER body は主に幼植物体の子葉、胚軸、根で見られ、成長した植物体では根のみに見られる。ER body を欠く突然変異体 *nail-1* の解析から、ER body の主な構成成分は PYK10 と呼ばれる β -グルコシダーゼであることがわかっている。生体防御に関与する例が多く知られている β -グルコシダーゼを内部に蓄積することに加え、傷害、食害によって誘導されることから、ER body は植物の生体防御に関与する可能性が高い。本研究では、ER body の機能、形態形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。そのため、『病害虫に対する忌避物質の不活性な配糖体が PYK10 の基質であり、ER body は PYK10 と基質を細胞内で分画する機構ではないか』という作業仮説のもとに研究を行った。つまり、食害、病害によって細胞内構造が壊れたときに PYK10 とその基質が出合って忌避物質が作られ、生体防御を達成すると考えた。

シロイヌナズナにおける ER body の生理学的機能を明らかにするために、1. 主要構成成分である PYK10 タンパク質の細胞内膜構造破壊後における生化学的性質の解析、2. 活性型 PYK10 複合体の精製と MS 解析による PYK10 タンパク質と相互作用する因子の同定、3. PYK10 タンパク質と相互作用するジャカリン様レクチン (JAL) の解析、4. 比較メタボローム解析による PYK10 の天然基質の探索を行った。まず 1. 2. 3. の解析から、ER body の主要な内容物である PYK10、BGLU21 などの β -グルコシダーゼが、細胞内膜構造崩壊後に活性化し巨大な複合体を形成すること、複数の JAL が拮抗的に働くことで複合体の大きさを調整していることを明らかにした。さらに 4. のメタボローム解析から PYK10 の天然基質として hastatoside が有力な候補であるということを明らかにした。以上の結果は、ER body の機能に関する作業仮説を間接的に支持するものであった。

これまで知られている ER body 以外の小胞体由来オルガネラはすべて球形をしている。力学的には球形が安定と考えられるにもかかわらず、ER body は葉巻状の形態をしていることから、ER body の形態を制御する何らかの分子機構が存在する可能性がある。そこで、1. ER body を欠く変異体 *nai2* の解析、2. ER body の定量解析系を用いた ER body 形態異常変異体の解析から、ER body の形態形成の分子機構を明らかにすべく研究を進めた。まず、1. の解析から、*nai2* 変異体の原因遺伝子としてアブラナ科特異的なタンパク質をコードする遺伝子 *NAI2* を同定し、NAI2 タンパク質は小胞体内で PYK10 を凝縮させ ER body を形成するのに必須であることを明らかにした。また、2. の解析から、PYK10 の立体構造の変化や、 β -グルコシダーゼの量の減少が ER body の数や形態に影響を及ぼすこと、ER body 上に存在する膜タンパク質 IMP1 が ER body を細長い葉巻状にするのに重要であることを明らかにした。

シロイヌナズナにおいて ER body に関連する遺伝子の転写制御の全貌を明らかにするために、1. DNA マイクロアレイを用いた *nail-1* 変異体のトランスクリプトーム解析、2. ATTED-II を用いた共発現解析、3. PYK10 プロモーター活性レポーター植物 (pPYK10::tdTomGFP-h) を用いた変異体スクリーニングを行った。また、その過程で根における内性ジャスモン酸量と *NAI1* の関わりが示唆されたので、4. 内性ジャスモン酸量の測定を行った。1. 2. 4. の解析から、 β -グルコシダーゼ、JAL、NAI2、IMP1 など ER body の機能、形態形成に重要な遺伝子群が NAI1 転写因子によって協調的に制御されていること、NAI1 転写因子とジャスモン酸生合成の間に正のフィードバックループが存在し、ジャスモン酸の根における内生量維持に重要であることを明らかにした。また、3 の解析により 40,000 系統の M2 植物からなる変異体プールを作出し、予備的なスクリーニングによって、PYK10 の発現に異常のある変異系統を単離した。これらの変異体は、今後、本研究で確立した AtMap1 タイリングアレイによる高速正遺伝学に用いることができる。

本研究によって ER body 関連因子を包括的に同定し、また、キーファクターとなるタンパク質群の機能の一端を明らかにすることができた。

(論文審査の結果の要旨)

小胞体は、動物・植物を通して最大の表面積をもつオルガネラで、細胞内に広くネットワーク構造を張り巡らしている。永野惇君は、この小胞体 (endoplasmic reticulum) から派生することから ER ボディと命名された巨大なオルガネラを研究対象とした。ER ボディは幼植物体の全身の表皮細胞に存在するが、成長した植物体では根にのみ存在が認められる。ロゼット葉には存在しないが、傷害によって誘導されることから、永野君は、「ER ボディは植物の生体防御機構として働く」という仮説のもと研究を展開した。学位論文の前半では、ER ボディの機能解明を目的として、ER ボディが形成されない nail 変異体を用いた比較プロテオームや比較トランスクリプトーム解析から ER ボディ関連遺伝子群を同定し、それぞれの機能解析を行った。その結果、ER ボディ内に大量に集積されている β -glucosidase である PYK10 が病害や虫害による細胞破壊の結果、巨大な複合体となって活性化されることを示した。この PYK10 の複合体化に関与する因子として複数のジャカリン様レクチン (JAL) を同定した。興味深いことは、複数の JAL が拮抗的に働くことで複合体の大きさを調整しているという発見である。細胞内での局在性を異にする PYK10 と JAL が特異的に結合して活性化するという結果は、傷害によって破壊された後に PYK10 が酵素反応を起こして、植食者を忌避させる物質を生産しているという可能性を示唆している。これら成果は、国際誌「Plant Cell Physiology」に2編の論文として発表されている。次いで、nail 変異体を用いた比較メタボローム解析を駆使して、PYK10 の天然基質として hastatoside が有力な候補であることを突き止めている。論文の後半では、ER ボディの葉巻型の構造がどのようにして形成されるかという問題に分子遺伝学的解析から取り組み、この構造体を形成するには PYK10 と NAI2 という2つの因子で十分であることを示した。NAI2 の研究成果は国際誌「The Plant Cell」に発表され、昨年10月には朝日新聞など数紙で報道されている。また ER ボディの大きさや数が異常になる変異体の解析から、新奇の膜タンパク質の同定にも成功している。永野君は、正遺伝学的解析の高速化に向けてシロイヌナズナのタイリングアレイの設計を行い (国際誌「The Plant Journal」に発表)、欠失遺伝子の単離を容易にすることにも貢献した。これらの多面的な研究の成果から、ER ボディ関連因子を包括的に同定すると共に、キーファクターとなるタンパク質群の機能を明らかにし、アブラナ科植物の新しい生体防御機構としての位置づけを示すことができた。以上のように、本研究の仕事の質は高く、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。