

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 11 年度博士課程 進学

氏 名 福田 あかり

指導教官名 米山 忠克

論文題目 イネ篩管 glutathione S-transferase の同定およびタンパク質の篩管への移行

高等植物の篩管は、糖やアミノ酸などの代謝産物や、情報伝達物質の長距離輸送経路である。篩管は篩部要素と呼ばれる細長い細胞の連なりによって構成される。篩部要素は、輸送経路として特殊化した細胞であり、その分化過程で核、液胞、ゴルジ体、リボソームなどの多くの細胞内小器官を失う。そのため、篩部要素自身はタンパク質合成能力を持たないと考えられる。しかし、篩部要素の機能発現には多くのタンパク質が必要であるため、篩部要素は隣接する伴細胞内で合成されたタンパク質を原形質連絡を介して受け取るというモデルが考えられる。このモデルは、篩部要素-伴細胞間に密な原形質連絡が観察されること、篩管液に多種のタンパク質が検出され、これらが新規に合成されること、篩管液タンパク質が細胞間移行能力を持つこと、篩管液タンパク質をコードする遺伝子の発現部位が伴細胞であること、によって支持されている。本論文は、より多くの篩管液タンパク質を同定し、また、これらを含む篩管液タンパク質組成に伴細胞におけるタンパク質合成が重要であることを明らかにしたものである。

イネは、インセクトレーザー法により純粋な篩管液を採取することが可能であり、篩管内タンパク質の同定を行うことができる。イネ篩管液中には、100 種を超えるタンパク質の存在が、2 次元電気泳動解析から知られているが、その遺伝子配列の決定や、生理活性の検定が報告されたものは、thioredoxin h (TRXh)のみであった。本研究では、このイネ篩管液中のタンパク質のうち、存在量の多い3種のタンパク質について、これをコードする遺伝子の特定を行った。さらに、そのうちのひとつ、glutathione S-transferase について、*in vitro* での活性検定や、植物

体内におけるタンパク質の局在場所の確認を行った。

また、篩管タンパク質の合成部位は、伴細胞であるとされているが、伴細胞での遺伝子発現と篩管液タンパク質濃度の関連を調べた研究はまだない。本研究では、形質転換により伴細胞内での遺伝子発現を制御し、篩管液中タンパク質の濃度を調節することができるか検証した。また、伴細胞から篩部要素へのタンパク質の移行は、外来のタンパク質でも篩管タンパク質と同じように起こるのか、あるいは移動量に差が生じるのかについても、今まで知られていなかった。外来タンパク質を発現する形質転換イネから篩管液を採取すれば、篩管中のタンパク質の有無や、タンパク質濃度の解析が可能である。本研究では、この方法を用いて、篩管タンパク質と外来タンパク質の篩部要素への移行能力の差について解析を行った。

1. イネ篩管液タンパク質の同定

1-1. 篩管液タンパク質をコードする遺伝子の決定

イネ篩管液中タンパク質を 2 次元電気泳法により分離し、タンパク質の部分アミノ酸配列の解析をプロテインシーケンサーにより行った。その結果、23 kDa、31 kDa、および 36 kDa の 3 種のタンパク質の部分配列が明らかとなり、これをコードする cDNA がイネ遺伝子データベース上に見出された。既存のタンパク質との相同性検索の結果、これら 3 種のタンパク質は、それぞれ、植物 heat shock protein、植物 glutathione S-transferase (GST)、イネ塩ストレス誘導性タンパク質との相同性を示した。

1-2. イネ篩管液 glutathione S-transferase (GST) の解析

同定を行ったイネ篩管液タンパク質のうち、GST と相同性を持つ 31 kDa タンパク質 (RPP31; rice phloem protein of 31 kDa) に注目し、その活性検定や、植物体内における存在部位の解析を進めた。GST は、種々の疎水性求電子化合物と、トリペプチドのグルタチオン(γ -Glu-Cys-Gly; GSH)との抱合を触媒する酵素である。植物 GST は、そのアミノ酸配列とイントロン/エキソンの構造から、type I、type II、type III の 3 種に分類される。RPP31 のアミノ酸配列は、type I GST と最も高い相同性を示し、また、予想されるイントロン/エキソンの構造も type I のものと一致した。このことから、RPP31 は、type I の GST に属するものと考えられた。

大腸菌内で RPP31 を合成し、その GST 活性測定を、一般的な GST 基質である 1-chloro-2,4-dinitrobenzen を用いて行った結果、RPP31 が GST 活性を持つことが示された。また、イネ篩管液中からも GST 活性が検出され、RPP31 が篩管内部で活性を持つ GST であることが示唆された。

次に、抗 RPP31 抗体を用い、RPP31 のイネ植物体内における存在量を調べた結果、葉の抽出液と篩管液中から RPP31 タンパク質が検出され、特に篩管液中には、総可溶性タンパク質の 1%以上の濃度で RPP31 が存在することがわかった。一方、根抽出液からは RPP31 タンパク質

は検出されなかった。このことは、RPP31 が地上部に特異的な GST であることを示している。さらに、イネの葉鞘切片を用いて、細胞レベルでの RPP31 の存在部位を、免疫染色法を用いて調べた。その結果、RPP31 は、成熟葉大維管束と小維管束の篩部（篩部要素—伴細胞複合体）、さらに未熟葉の原生篩部で検出され、葉の成長段階にかかわらず、RPP31 が篩部に局在していることが示された。

トウモロコシなどの植物において GST は、除草剤処理により発現が誘導され、その解毒を行うことが知られている。しかし今回見つかった RPP31 は、イネ除草剤のプレチラクロールや、その葉害軽減剤のフェンクロリン処理に対してはタンパク質濃度が変化しなかった。従って RPP31 は外来の薬剤に対し発現誘導が起こらないタイプの GST であることが推察された。

こうした恒常的に発現する GST の機能として、酸化障害からの細胞の防御が考えられる。GST は、脂質の酸化で生じたアルケンなどの毒性化合物を、GSH との抱合により解毒する。細胞内小器官をほとんど持たない篩部要素においては、GST が酸化ダメージの回復に貢献している可能性がある。また、動物 GST の一部は、ステロイド等の疎水性化合物のキャリアーとなり、その細胞内輸送を助けることから、植物の篩管内においても、GST が膜成分や植物ホルモンなどの疎水性化合物を可溶化し、輸送しやすい形としていることが考えられる。今後こうした篩部で恒常的に発現する RPP31 の解析が、植物の内在 GST の機能の理解に役立つと考えられる。

2. 形質転換によるイネ篩管液タンパク質の濃度変化および外来タンパク質の篩管への導入

2-1 イネ篩管液タンパク質の濃度調節

伴細胞における遺伝子発現が、篩部要素内のタンパク質存在量に影響を及ぼすか明らかにするため、イネ成熟葉伴細胞で発現を誘導する TRXh プロモーター(PTRXh)下流に篩管液タンパク質 oryzacystatin I (OC-I) あるいは TRXh の cDNA を繋ぎ、このキメラ遺伝子を導入した形質転換体イネを作成した。その結果、PTRXh-sense OC-I 形質転換イネで篩管液中 OC-I 濃度の増加が、また PTRXh-antisense OC-I 形質転換イネで篩管液中 OC-I 濃度の減少が確認された。さらに、PTRXh-antisense TRXh 形質転換イネで、篩管液中 TRXh 濃度の減少が確認された。以上の実験により、伴細胞内の遺伝子発現を変化させることで、篩管液中の特定のタンパク質濃度を変動させることが可能であることが示された。これらの結果は、伴細胞内で合成されたタンパク質が、篩部要素内へ移行するというモデルをより強固にするものである。

2-2. 篩部要素へのタンパク質の移行能力の解析

次に、本来篩管内には存在しない外来のタンパク質についても、伴細胞から篩部要素へ移動が可能であるか調べるため、PTRXh 下流に外来タンパク質の β -glucuronidase (GUS, 分子量 68kDa)、あるいは green fluorescent protein (GFP, 分子量 27kDa) 遺伝子を繋ぎ、これらのキメラ遺伝子を導入した形質転換イネを作成した。PTRXh-GUS 形質転換イネの葉身切片で GUS タン

パク質の存在場所を確認したところ、伴細胞に強い GUS 活性が観察された。また、篩部要素内にも、GUS 活性が確認された。さらに、この形質転換イネ篩管液中からも GUS タンパク質が検出された。また、PTRXh-GFP 形質転換イネについても、蛍光顕微鏡で葉身切片の観察を行った結果、伴細胞に強い GFP の蛍光が観察され、さらに、篩管液中から GFP が検出された。この結果は、本来篩管内にはない外来タンパク質である GUS や GFP も、伴細胞から篩部要素へ原形質連絡を通過して移動することが可能であることを示している。

さらに外来タンパク質の GFP と、篩管液タンパク質である TRXh や RPP31 とでは、伴細胞から篩部要素内への移動程度に差があるか、篩管液のタンパク質濃度と、葉鞘全体の抽出液中のタンパク質濃度を測定することで比較を試みた。その結果、PTRXh-GFP 形質転換イネでは、葉鞘全体における GFP 濃度に対して、篩管液中の GFP 濃度が、TRXh や RPP31 に比べて有意に低いことがわかった。葉の切片において、GFP は伴細胞に多く存在することが確認されることから、これは、GFP が篩部要素内へ輸送されにくく、伴細胞内に多く蓄積していることを示している。

この結果は、伴細胞内で合成されたタンパク質が、みな同様に篩部要素内へ輸送されるのではなく、篩部要素内で必要とされるタンパク質が、優先的に取り込まれている可能性を示している。GFP (27 kDa)と RPP31 (31 kDa)は、分子量では大きな差はないもの、RPP31 のほうが、篩管内部での存在比が多いことは、篩部要素内への移動しやすさが分子量以外の要因によることを示している。今後より多くの篩管内タンパク質の構造解析がこうした細胞間移行に必要な要因の解明につながると考えられる。