

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 福田 あかり

高等植物の篩管は、糖やアミノ酸などの代謝産物、りん酸・イオウ化合物、微量栄養素、さらには情報伝達物質などの長距離輸送経路であり、成長・生産を制御している。篩管は輸送経路として特殊化した細胞であり、それ自身はタンパク質合成能力を持たない。しかし篩管の機能発現には多くのタンパク質が必要であるため、篩部に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考えられる。本論文は、篩管液に多く含まれたタンパク質3つを新しく同定し、また、これらを含むタンパク質が伴細胞において合成され篩管に移行されることを明らかにしたものである。

第1章で、これまで報告された数少ない篩管液タンパク質について、それらの採取法、同定、生理活性など、本研究の背景と目的を述べている。第2章では、イネ篩管液に含まれた23 kDa、31 kDa、および36 kDaの3種の部分アミノ酸配列を解析し、イネ遺伝子データベースから、これらの遺伝子の決定をおこなった。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。

第3章では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) 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。RPP31のアミノ酸配列は、GST typeI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 typeIのものとは一致した。大腸菌で合成したRPP31は、GST基質1-chloro-2,4-dinitrobenzen に対し活性があった。また、イネ篩管液中からもGST活性が検出された。次に、抗RPP31抗体を用い、イネ植物体内におけるRPP31の存在量を調べた結果、葉の抽出液と篩管液(総可溶性タンパク質の1%以上の濃度)で検出したが、根抽出液からは検出されなかった。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。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た。

第4章では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。この実験により、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。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、外来タンパク質の β -glucuronidase (GUS, 分子量 68 kDa)、あるいは green fluorescent protein (GFP, 分子量 27 kDa) 遺伝子を PTRXh 下流に繋ぎ、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。GUS と GFP タンパク質は伴細胞と篩管液中から検出された。しかし 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。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た。第5章では本研究での新しい知見について総合考察をおこなっている。

以上本論文は、イネ篩管液から新たに3種のタンパク質を同定し、glutathione S-transferase については生理活性と植物組織局在性などの解析を行なった。さらに伴細胞で生成されたタンパク質の原形質連絡を介しての篩管への移行の制御について新しい知見とコンセプトを得ている。これらの研究成果は、植物篩管におけるタンパク質の機能と移行について、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。