

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 12 年度博士課程 進学

氏 名 守 智子

指導教官名 米山 忠克

論文題目 原形質連絡を通じた高分子物質の移行に関する研究

高等植物には隣接する細胞を連結する原形質連絡 (plasmodesmata, PD) と呼ばれる構造がある。PD により植物体を構成するほぼすべての細胞の細胞質がつながり、symplast を構成している。植物は PD を通じ、水や代謝産物のやり取りを細胞間で行っている。PD を通過することのできる物質の大きさには上限がある (size exclusion limit, SEL)。通常、高等植物の SEL は 1 kDa 程度であり、水や代謝産物などの低分子しか通過することができないと考えられてきた (Mezitt and Lucas, 1996)。

その一方で、植物ウイルスは PD を通り、細胞間を移行して植物体内を拡がっていくと考えられている。植物ウイルスは分子量が数百万を越える巨大な分子であり、ウイルス分子の PD の通過には、ウイルス自身がコードする移行タンパク質 (MP) が必要であると考えられている (Meshi et al., 1987; Holt and Beachy, 1991)。

また近年、植物由来のタンパク質も細胞間を移行することが報告されるようになった。イネ篩管液から単離、同定されたイネチオレドキシシン h (rice TRXh, 約 13 kDa) もその一つであり、タバコ成熟葉葉肉細胞において蛍光ラベルした rice TRXh が細胞間を移行すること、約 10 kDa の蛍光物質の細胞間移行を可能にすることが報告されている (Ishiwatari et al., 1998)。

ウイルスや植物のタンパク質などの高分子物質がどのような機構で細胞間を移行しているのかは今のところ不明である。

本研究では rice TRXh を用いて PD の SEL の変化と植物の成長やウイルスの移行の関係を明らかにす

ることを目的とした。

1. rice TRXh を過剰発現する形質転換タバコの SEL と成長について

これまでの研究で大腸菌で発現させた rice TRXh が細胞間移行することは示されているが、植物体内で発現させて PD の SEL を増大させたという報告はまだない。そこで rice TRXh を過剰発現する形質転換タバコを作成し（当研究室、藤原徹作成）、独立なホモライン 6-4、13-3、28-2 を確立した。ウェスタン解析により、この 3 ラインの葉における rice TRXh の発現を確認した。

マイクロインジェクション実験により、rice TRXh を発現する形質転換体の葉肉細胞の SEL に変化がみられるかどうかを調べた結果、rice TRXh を発現する形質転換体では 12 kDa の蛍光物質 F-dextran が野生型タバコに比べ有意に高い頻度で細胞間を移行した。つまり、rice TRXh を植物体内で過剰発現することにより、PD の SEL を増大することが確認できた。いくつかのウィルスの MP を過剰発現する形質転換体でも SEL の増大が観察されているが、植物のタンパク質を植物体内で発現させ、SEL の増大が観察されたのは今回が初めてである。

SEL の増大によって symplastic な細胞間の輸送が変化していると考えられ、植物の成長にも影響をもたらす可能性がある。そこで、バーミキュライトおよび MS 固形培地上で栽培した rice TRXh を発現するタバコと野生型タバコの乾燥重を比較したが、有意な違いはみられなかった。また、葉の面積や根の長さの比較も行ったが、有意な違いはみられなかった。以上のことから、SEL の増大は植物の成長に影響を与えないと考えられた。

2. rice TRXh を過剰発現する形質転換体における変異型トバモウィルスの細胞間移行について

研究の進んでいるタバコモザイクウィルス (TMV) の細胞間移行に必要な MP の機能と比較することで、rice TRXh が SEL を増大させる機能に対する知見が得られるのではないかと考えた。TMV の MP を発現する形質転換体の SEL は 10 kDa 程度であり (Wolf et al., 1989)、この形質転換体においては MP を持たない TMV (Δ MP-TMV) の移行が相補されることが知られている。Rice TRXh を発現する形質転換体の SEL も同程度であることが本研究で明らかになったので、 Δ MP-TMV の移行を相補できるのではないかと考えた。MP を持つ TMV (+MP-TMV) と Δ MP-TMV の感染実験 (感染を追跡するために外皮タンパク質 (CP) 遺伝子の代わりに GFP 遺伝子を導入した TMV を用いた) の結果、+MP-TMV は野生型タバコと rice TRXh を発現するタバコにおいて GFP で観察できる感染斑を形成したが、 Δ MP-TMV は両者において GFP の感染斑はみられなかった。すなわち rice TRXh は TMV の MP の機能を相補して野生型ウィルスと同程度の移行を引き起こすことはできなかった。これは MP が多

くの機能を持っているのに対し、rice TRXhはその一部の機能であるPDの透過性を変化させる機能しか持っておらず、 Δ MP-TMVの移行を相補できなかったものと考えられた。

そこで、この機能だけに欠陥のあるMPを持つウイルスなら移行を相補できるのではないかと考えた。MPに変異を持つトマトモザイクトバモウイルス (ToMV) LQ37E (MPの37番目のセリンがグルタミン酸に変異、37E-MP)、LQ37T (同じくスレオニンに変異、37T-MP)を用いた (Kawakami et al., 1999)。12 kDa F-dextran と大腸菌で作成した各MPを混合し、野生型タバコにマイクロインジェクションした結果、野生型MPでは100%の頻度で12 kDa F-dextranの細胞間移行が観察されたのに対し、両変異型MPの場合には移行頻度は20%以下であった。このことから両変異型MPはPDの透過性を変化させる機能に少なくとも何らかの欠陥があると考えられた。また各MPを19.6 kDa F-dextranとともにマイクロインジェクションした結果、37E-MPはrice TRXhを発現する形質転換タバコで野生型タバコに比べ有意に移行頻度が高かったのに対し、37T-MPでは違いがみられなかった。また、各変異型MPを持つウイルスの感染実験の結果、LQ37Eはrice TRXhを発現するタバコでは2細胞以上にGFPの蛍光が拡がった頻度が野生型タバコに比べ有意に高かったのに対し、LQ37Tでは違いはみられなかった。以上の結果から、rice TRXhは37E-MPの移行能力を相補し、LQ37Eの移行を少なくとも一部相補することが示された。これは植物由来のPDの移行性を変化させるタンパク質を用いて植物ウイルスの移行を制御した世界で初めての例である。

3. rice TRXhを発現する形質転換体における変異型RCNMVの細胞間移行について

さらにrice TRXhの機能について知見を得るために、変異型のMPを持つRCNMV (red clover necrotic mosaic virus)を用いた。RCNMVは2本のRNAをgenomeとし、RNA1には複製酵素とCPが、RNA2にはMPがコードされている。またRNA2の3'末約300塩基がRNA1の転写に必要であることが報告されている (Sit et al., 1998)。RNA1はCP遺伝子部分に変異型MP-GFP融合タンパク質の配列を導入したもの、RNA2は野生型MPができないようにしたRCNMV (128+BAM、161+BAM)を用いて実験を行った。これらの変異型MPは細胞間移行しないこと、PDに局在しないことが、上記と同様のRNA1とMPの開始コドンATGを削ったRNA2を用いて調べられている (Tremblay et al., *Plasmodesma* 2001 abstracts)。RCNMVの宿主となる*Nicotiana benthamiana*を用いてrice TRXhを過剰発現する形質転換体を作成し、変異型RCNMVの感染実験を行った結果、rice TRXhを発現する独立な*N. benthamiana*形質転換体2ライン (Nb41、Nb44)において、形質転換植物における移行頻度を理論値と考えた場合のみ野生型植物に比べ有意に細胞間を移行していた。つまり、これらの変異型MPを持つRCNMVの細胞間移行はrice TRXhにより完全には相補されないことが示唆された。一方、PDに局在していると考えられるGFPの蛍光が観察されたので、1細胞に

おける PD に局在すると考えられる蛍光の数を数えた結果、128+BAM の場合には Nb41 において、161+BAM の場合には Nb41、Nb44 において野生型植物と比べ有意に多くの蛍光の数が観察された。以上の結果から rice TRXh は変異型 MP と何らかの相互作用をし、変異型 MP を PD に運ぶ可能性が示唆された。

本研究で細胞間移行能力を持つ rice TRXh を植物体内で発現しても PD の SEL が増大することが示された。また PD の SEL が高まることは植物の成長に影響を与えないことが示唆された。ウイルスを使った実験からは、rice TRXh の細胞間移行とウイルスの移行との間には共通する機構があることが推測された。これまでウイルスの MP が進化的に植物タンパク質由来である可能性が指摘されてきたが、本研究によって初めて実験的に植物のタンパク質と MP の両者がウイルスの移行に影響を持つことが示された。今後、37E-MP と 37T-MP の機能の違いを解析することにより、rice TRXh が細胞間移行する機能はより明らかになると考えられる。また rice TRXh が細胞間移行する機能が解明されることにより、植物体内でおきている他の高分子物質の細胞間移行の機能に対して知見を与えることができると考える。