

## 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 入学  
氏 名 朴 美 姫  
指導教官名 山口五十磨

論文題目 植物の細胞伸長におけるアラビノガラクトタン蛋白質の機能解析

### 1. 序論

アラビノガラクトタン蛋白質 (AGP) はプロテオグリカンの一種であり、主に細胞壁間隙に存在し、植物の様々な生長、発達へ関与することが示唆されているが、その直接的な証拠はほとんど得られていない。これまでに AGP と特異的に相互作用する試薬 ( $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬) を用い、根の伸長成長への AGP の関与が示されていたが、本研究では主に基部伸長と AGP との関連性を様々な角度から追求した。キュウリ胚軸におけるジベレリン応答性遺伝子の検索から得られた *CsAGP1* の機能解析を行なうとともに、 $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬を用いた生物検定により、AGP と基部伸長との関連性を追究した。また、細胞伸長における AGP の生理的なメカニズムを追求するために  $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬を用い、微小管の配向への関与を検討した。さらに、シロイヌナズナの AGP 遺伝子破壊株のスクリーニングや、アンチセンス RNA 発現体の作成を行い、それらの研究を通して AGP と伸長生長、あるいは他の形態形成との関連性を追究することを目的とした。

### 2. AGP と基部伸長との関連性の追求

基部伸長には植物ホルモンの一種であるジベレリンが深く関わっている。ジベレリンにより転写レベルが調節される遺伝子の単離、解析は基部伸長を制御するジベレリンの作用過程に関する情報を与えると考え、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法によりキュウリ胚軸における GA 応答性遺伝子のスクリーニングを行なった。その遺伝子の一つ、*CsAGP1* (ABO29092) が AGP をコードしていると推定された。

*CsAGPI* の ORF (243 アミノ酸) には classical AGP に特徴的な 3 つのドメインの存在が認められた。N 末端のシグナルペプチドに続いて、中央部分に hydroxyproline に富む領域 (Pro 33.5%, Ala 19.8%, Ser 16.8%) が存在する。さらに C 末端には  $\omega/\omega+2$  則に適合する切断位置 ( $^{218}\text{Ser}$ ) に短いスペーサーと塩基性アミノ酸 ( $^{225}\text{Lys}$ )、さらに疎水性膜貫通ドメインが続く典型的な GPI アンカー付加シグナルが認められた。

この *CsAGPI* の全長 cDNA を CaMV 35S プロモーター制御下でタバコに導入し、得られた形質転換体から AGP を抽出、精製し、野生型タバコに含まれる AGP との比較を行った。予備精製後の AGP 画分をゲル濾過 HPLC により分画し、 $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬を用いた単純放射ゲル拡散法により検出したところ、野生型に含まれる AGP とは異なる溶出時間に  $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬と反応性のあるタンパク質が検出された。また、AGP を広く認識する 2 種類の抗体、LM2、JIM13 を用いてイムノブロットングを行った結果、 $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬と反応性のある同じ画分が抗体に認識され、*CsAGPI* の産物が AGP としての特徴を備えていることが判明した。

*CsAGPI* はノーザン解析の結果  $\text{GA}_4$  及び IAA いずれの処理によっても転写量の増加が認められた。また、芽、子葉、胚軸、根のいずれにおいても発現していたが、胚軸においてのみ  $\text{GA}_4$  により発現量が増加した。また、キュウリ実生の胚軸から抽出した AGP を HPLC で分画し、単純放射ゲル拡散法により定量したところ、 $\text{GA}_4$  処理によってキュウリの実生の胚軸伸長が促進される時、それに対応して AGP 量が約 1.5 倍増加した。これらの結果から、*CsAGPI* は  $\text{GA}$  や IAA からの情報伝達の上流で機能するのではなく、より下流において、いずれのホルモンによる細胞伸長制御にも共通して機能するものと考えられた。

*CsAGPI* が AGP の特徴をもっていることから、キュウリの実生における  $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬の影響を調べたところ、 $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬は根と胚軸いずれの伸長も抑制した。その抑制効果はホルモン処理によって伸長が促進された胚軸で、より顕著に現れた。これらの抑制効果は、AGP と結合能のない  $\alpha$ -galactosyl Yariv 試薬による抑制効果よりは有意に大きく、 $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬による AGP 機能の障害を通して伸長の抑制が生じたものと考えられた。以上の結果から、AGP は茎部伸長に必要な成分であることが強く示唆された。

次に、*CsAGPI* を過剰発現させた形質転換タバコの解析により、*CsAGPI* の茎部伸長への関与を追求した。T0 世代の AGP 含量を測定したところ、一見して野生型より背丈が高い二つのライン 10 と 11 が野生型より高いレベルの AGP を含んでいることが判明した。そこで、これらのホモのライン、10.1 と 11.4 を選抜し、茎部伸長を含む形質を詳細に観察したところ、10.1 と 11.4 のいずれも野生型に比べて茎部伸長の促進が認められた。特に、生育後期にこの形質が明瞭であった (図1)。また、形質転換体は野生型より平均 7 日 (ライン 10.1) と 9 日 (ライン 11.4) 開花時期が早かった。全ての花芽が開花し、背丈の生長が止まった播種後 80 日目の形質転換体と野生型を比較したところ、形質転換体は野生型より背丈が高

いのに対し、節間の数には有意な差がなかった。このことは、背丈の伸長促進は節間伸長の促進に起因することを示している。また、単純放射ゲル拡散法により AGP 量を測定したところ、形質転換体(10.1, 11.4)の茎部 AGP 量が野生型の約 3 倍であった。以上より、形質転換体における茎部伸長促進は、AGP 量の増加によってもたらされた形質であると考えられた。

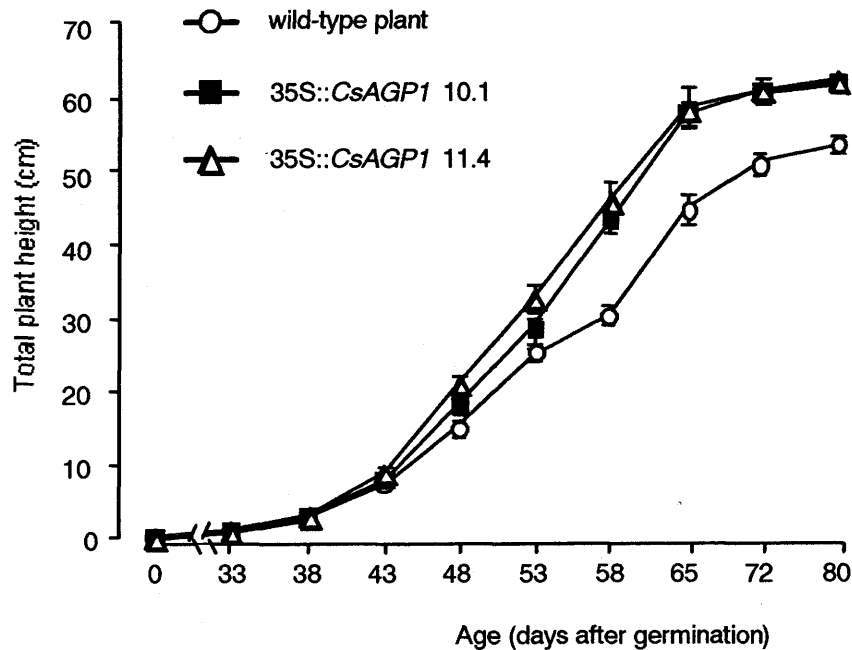


図1. *CsAGP1* 形質転換体の形質

### 3. AGP と微小管配向との関連性の検討

GA やオーキシンは微小管の配向制御を通して細胞伸長を制御していることが知られている。*CsAGP1* の発現制御様式や過剰発現体の形質の現れ方等から、AGP は GA やオーキシンからの情報伝達系の上流よりむしろ下流で細胞伸長に関わっていると想定されたが、このことを検討すべく、 $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬の微小管配向への影響を調査した。検定には、微小管の研究によく用いられているアズキ胚軸切片を用いた。この材料においても、無傷のキュウリ実生と同様、 $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬は  $\alpha$ -galactosyl Yariv 試薬と比較して、有意に GA やオーキシンにより誘導される胚軸伸長を抑制した。微小管の配向を観察したところ、IAA 単独あるいは GA との併用により横向きに配向した微小管が増えるが、これに対して、 $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬、 $\alpha$ -galactosyl Yariv 試薬とも、有意な影響を与えなかった。このことより AGP は微小管配向よりさらに下流、すなわち細胞壁を緩ませる過程や、細胞壁成分の新規な合成やアセンブリーに関わっているものと考えられた。

#### 4. AGP 変異体の解析

特定の遺伝子の機能を知る上で、その機能が失われた変異体の解析は非常に有効である。現在、シロイヌナズナの classical AGP と考えられる遺伝子は 17 クローン見出されているが、研究開始当初知られていた *AtAGP1* から *AtAGP5* の 5 つの遺伝子について、破壊株のスクリーニングを行った。その結果、いずれのクローンについても、ORF 中に T-DNA が挿入されたラインは得られなかったが、*AtAGP1*, 4, 5 についてはごく近傍に T-DNA が挿入されているものが得られた。そのうち *AtAGP4* のタグラインでは T-DNA 内にトランスポゾン *Ds* エlementを有していたため、*Ac/Ds* Two element system を用いて *Ds* の再転移を促し、破壊株のスクリーニングを行った。その結果、ORF 内に *Ds* が再挿入された 5 つの破壊株ラインの調製に成功した。一方、Syngenta より *AtAGP1*, *AtAGP2*, *AtAGP5* の破壊株を入手し、ホモの株を選抜した。これらの破壊株の形質を観察したところ、通常の栽培条件では形質の変化は認められなかった。現在 *atagp1/atgp5* や *atagp2/atagp5* の二重破壊株を作製し、形質を観察中である。また、*AtAGP1* 及び *AtAGP5* のアンチセンスラインを作製し、形質を観察したところ、抽台の時期に変化が無いにもかかわらず、野生型よりロゼット葉の数が少ないという形質が観察された。その現象は *AtAGP5* の破壊株では認められなかったため、*AtAGP5* のアンチセンス発現により *AtAGP5* と相同性が高い他の AGP 遺伝子の発現も抑えられたのではないかと考えられ、現在検討中である。

#### 5. 総括

以上、植物の様々な成長に関与していることが示唆されている AGP について、GA 応答性遺伝子の解析、AGP 作用の特異的阻害剤を用いた検定を通して、AGP が茎部伸長において機能している可能性を強く指摘した。また、シロイヌナズナの各種変異体を調製し、新たな形質に関与している可能性を示唆した。

#### 参考文献

Me Hea Park, Yoshihito Suzuki, Makiko Chono, J. Paul Knox, and Isomaro Yamaguchi.

*CsAGP1*, a gibberellin responsive gene from cucumber hypocotyls (*Cucumis sativus*), encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation. Plant Physiology. in press.