

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 朴 美姫

本論文は「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」に関する研究について述べたもので、序論と3章から構成されている。

序論では研究の背景、目的、戦略が述べられている。アラビノガラクトタン蛋白質 (AGP) はプロテオグリカン的一种であり、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 (β -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、本研究では主に茎部伸長と 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、 β -glucosyl Yariv 試薬を用いた生物検定により、AGP と茎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 β -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 と伸長生長との関連性を追究することを目的とした。

第1章ではキュウリのジベレリン応答性遺伝子 *CsAGP1* の解析を行った。蛍光ディフ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 応答性遺伝子の一つとして *CsAGP1* をクローニングした。*CsAGP1* 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}Ser) に短いスパーサーと塩基性アミノ酸 (^{225}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 *CsAGP1* 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、 β -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 β -glucosyl Yariv 試薬と反応性のあるタンパク質が検出された。また、 β -glucosyl Yariv 試薬と反応性のある同じ画分が AGP を広く認識する抗体に認識され、*CsAGP1* の産物が AGP としての特徴を備えていることが判明した。

CsAGP1 はノーザン解析の結果 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 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、 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とき、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、*CsAGP1* は 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。

CsAGP1 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 β -glucosyl Yariv 試薬の影響を調べたところ、 β -glucosyl Yariv 試薬は根と胚軸いずれの伸長も抑制した。これらの抑制効果は、AGP と

結合能のない α -galactosyl Yariv 試薬による抑制効果よりは有意に大きく、 β -glucosyl Yariv 試薬による AGP 機能の阻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 は基部伸長に必要な成分であることが強く示唆された。

次に、*CsAGP1*を過剰発現させた形質転換タバコの解析により、*CsAGP1*の基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 を含んでいた。そこで、これらのホモのライン、10.1 と 11.4 について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基部伸長の促進が認められた。また、形質転換体は野生型より開花時期が早かった。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、形質転換体(10.1, 11.4)の基部 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基部伸長促進は、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。

第 2 章では AGP と微小管配向との関連性について検討した。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。 β -glucosyl Yariv 試薬のアズキ胚軸切片微小管配向への影響を調査したところ、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、 β -glucosyl Yariv 試薬、 α -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。

第 3 章では AGP の遺伝子破壊株やアンチセンスラインの作成から、AGP の機能を解析しようと試みている。これまで、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。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、抽台の時期が早く、野生型よりロゼット葉の数が少ないという早期開花の形質が観察された。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た。

総括では、以上の内容をまとめるとともに、将来へ向けての展望を述べている。

以上、本論文では、AGP が植物基部伸長において重要な働きをしていることを初めて明らかにしたものであり、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。