

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 寺内 かえで

アスパラギン酸プロテイナーゼ(AP)(EC3.4.23)は動物、微生物、ウイルス、植物において広く存在する酵素である。植物のAPは2つのアスパラギン酸残基を活性部位とし、至適 pH を酸性域にもち、ペプスタチンにより活性阻害されるなど、すべての AP に共通な性質を有しているが、一次構造的には約 100 アミノ酸残基からなる植物特異的挿入配列(PSI)を有する特徴がある。

本論文は食糧として重要なタンパク資源である大豆を対象とし、大豆 AP を同定し、少なくとも 5 種類あることを明らかにした。ついで、5 種類の AP について組織レベルでの発現解析を行ない、特徴ある 2 つの AP (soyAP1、soyAP2) について細胞レベルおよび細胞内オルガネラレベルでの発現解析を行ない、soyAP1 と soyAP2 の植物生理学的機能を推定したものである。

まず序論では、AP の特徴、植物 AP の構造、発現、生理機能について概説し、本論文の研究意義と目的を示した。

第 1 章では、網羅的な大豆 AP の同定を試み、コメの AP、*oryzasin1* の塩基配列からプライマーを作成し、RT-PCR、3'-RACE および 5'-RACE により 2 種類の大豆 AP のクローン (soyAP1、soyAP2) の全長を単離した。また、EST データベースを検索し、大豆には soyAP1 および soyAP2 を含め、合計 5 種類の AP が存在することを明らかにした。また、大豆完熟種子の粗精製画分に AP 活性が存在することを確認した。

第 2 章では、組織レベル、細胞レベル、細胞内オルガネラレベルでの発現解析を行なった。組織レベルの解析では 5 種類の大豆 AP についてノーザン解析を行ない、互いに異なる組織で発現する AP、同じような発現様式を示す AP の両方が存在することを明らかにした。特に、soyAP1 と soyAP2 は発現組織の比較においても互いに相補的であり、発芽過程における発芽種子での発現量変化においても対照的であることを見出した。細胞レベルでの解析においては、soyAP1 と soyAP2 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。発芽種子 (室温吸水、48 時間) の胚軸においては、soyAP1 は特定の細胞に強く発現しているのに対し、soyAP2 は不特定の様々な細胞に発現していることを示した。次いで、胚軸に発現する分子マーカを用いて、soyAP1 が発現している部位が篩部であることを特定し、さらに、内皮特異的なマーカを用いることにより、soyAP1 発現細胞の発現位置を明確にし、発現細胞の形状を考慮して、soyAP1 は篩管細胞に発現していることを特定した。発芽種子の根の先端部においては、根の先端からの距離と対応させて解析を行ない、soyAP1 が未成熟な篩管細胞と導管で発現していることを明らかにした。また、根の先端からの距離の違いにより soyAP1 の発現様式は大きく変化することを明らかにした。さらに、播種 1 週目の根の先端においても

soyAP1 は未成熟な維管束に発現していることを示し、発芽の初期過程（4℃吸水、48時間）における子葉部分においても soyAP1 は維管束に発達する細胞に発現していることを明らかにした。細胞内オルガネラレベルでの解析では、蛍光タンパク質 GFP をレポーターとして、シロイヌナズナの根由来の培養細胞に一過的に発現させ、soyAP1 および soyAP2 いずれも液胞において GFP 蛍光が観察されることを明らかにし、両者が液胞タンパク質であることを示唆した。

以上の結果から、soyAP1 および soyAP2 の生理機能について推定した。すなわち、soyAP1 は未成熟な篩管細胞および導管に発現することから、これらの細胞の自己分解による成熟化に関与していることを示唆した。オオムギの AP についても同様な報告があることを考慮し、複数存在する AP のうち、篩管細胞および導管の成熟化という共通の機能を有するものが存在することを示唆し、AP は植物におけるプログラムされた細胞死の一形態に関与していることを提案した。また、soyAP2 については、分解型液胞が発達している組織で発現していること、液胞タンパク質であることが示唆されることから、液胞に存在する様々なタンパク質を分解処理しているものと推定した。

本論文は、大豆 AP を同定し、それらの AP の発現解析を行なうことにより、2つの大豆 AP の生理機能について推定し、特に1つについては植物 AP 共通の機能を提案したものであり、学術上、応用上貢献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。