

論文内容の要旨

論文題目 Analysis of cell wall proteins co-extracted with tobacco mosaic virus movement protein

(タバコモザイクウイルス移行タンパク質と共抽出される
細胞壁タンパク質の解析)

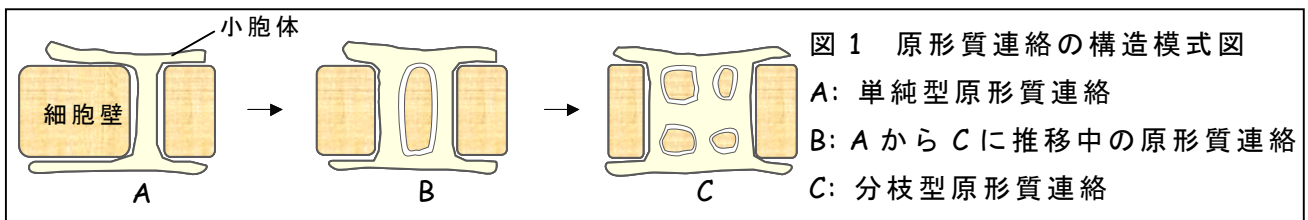
加星 (岸) 光子

植物では、原形質連絡によって多くの細胞の細胞質と小胞体がつながれ、相互の情報伝達や栄養物質の輸送が可能になっている。原形質連絡は隣接する細胞の細胞質がつながり、小胞体から派生するデスモチューブルが細胞壁を貫通する直径 50 nm ほどの構造である。原形質連絡はタンパク質などの高分子を通過させ、細胞間の情報伝達の一端を担っている。原形質連絡を構成する分子の解析は、細胞が小さく多くの原形質連絡が分布する幼植物や、均一な材料の調製が容易な培養細胞が主に用いられてきた。また、原形質連絡を通過する分子の研究は、実験操作の容易であるタバコの葉が中心に用いられてきた。一方で、近年、細胞間を移行して機能する転写因子が発見されてきている。このような転写因子の mRNA が発現する細胞と転写因子が細胞間移行して分布する細胞の範囲は、厳密に制御されていることが明らかになっている。そのため、原形質連絡を介した高分子の移行は発生段階、組織、細胞の種類によって異なっていると考えられ、原形質連絡を構成する分子も異なると予想される。

原形質連絡は植物ウイルスが隣接する細胞へ移動し、感染を広げる通り道としても利用される。植物ウイルスは葉の細胞へ侵入して増殖し、隣接細胞への移行を繰り返して維管束へ到達し、植物体全体へ感染を広げる。ウイルスのコードするタンパク質はごく少数であるが、感染過程において植物が元来もつ多くの機構を利用している。タバコモザイクウイルスの移行タンパク質 (MP) は原形質連絡に局在し、ウイルスゲノム RNA の隣接細胞への移行を助ける。MP の原形質連絡への蓄積は、葉の成長に伴って増加する。

MP の原形質連絡への蓄積と葉の成長との関連についての解析から、タバコにおいては、葉の成長に伴い分布する原形質連絡の構造が変化することが明らかになっている。栄養を他の組織から受け取るシンク葉では一つの胞体由来のデスモチューブルが貫通する、単純型原形質連絡が多数見られる (図 1)。しかし、成長しソース葉になるにつれて単純型原

形質連絡は減少し、分枝型原形質連絡が出現してくる。また、シンク葉からソース葉への成長に伴い、原形質連絡を自由に通過できる分子の大きさが減少するが、選択的に通過するタンパク質の存在も知られている。単純型原形質連絡から分枝型原形質連絡への変化は、葉のシンク-ソース器官への発達や細胞間情報伝達の様式の変化と関連すると考えられる。分枝型原形質連絡は、単純型原形質連絡が複数融合する、あるいは単純型原形質連絡が単独で発達して形成されると考えられている。しかし、どのような分子が関与して分枝型原形質連絡が形成されてくるかは解析されていなかった。

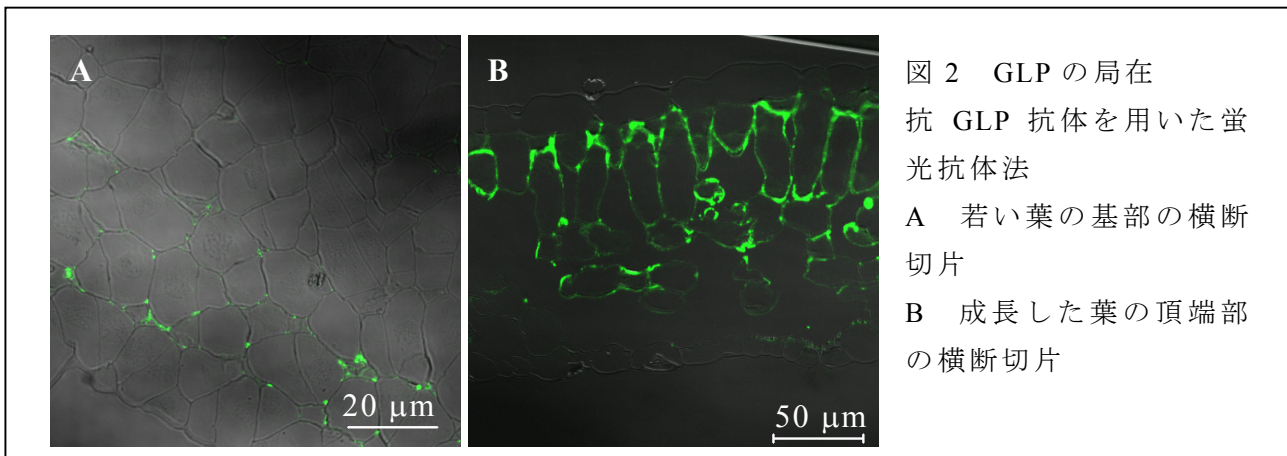


私は、分枝型原形質連絡の構成・形成に関わる因子の解明を目的に研究を始めた。MP は分枝型原形質連絡にのみ蓄積する。そこで MP を分枝型原形質連絡の指標として用いることにした。MP は細胞壁から、8M LiCl 処理により選択的に抽出されることを見出した。さらに、8M LiCl 処理により分枝型原形質連絡内部の構成要素が抽出されることを明らかにした。

8M LiCl 処理で抽出される成分には分枝型原形質連絡の構成要素が含まれると予想された。8M LiCl 抽出液に含まれるタンパク質を精製し、いくつかの植物由来のタンパク質を検出した。成長段階の異なる葉の間でこれらのタンパク質の蓄積を比較し、分枝型原形質連絡との関与が期待されるタンパク質を選択した。これらのタンパク質の部分アミノ酸配列をもとに、相当するタンパク質を推定した。このうち、植物に普遍的に存在する germin like protein (GLP) ファミリーに高い相同性を持つ 24K タンパク質と芳香族アミノ酸に富む aromatic amino acid rich glycoprotein (AroGP) に相同性をもつ 42K タンパク質について解析を行なった。

24K タンパク質は MP とともに抽出されるタンパク質のうち最も量が多いタンパク質であった。また、SDS-PAGE、ブロット後にも他のタンパク質のバンドに含まれることから、粘着性を持つと考えられた。24K タンパク質の N 末端アミノ酸配列を元に cDNA をクローニングした。得られた配列は GLP ファミリーのタンパク質で保存性の高い配列を持ち、全長に渡り他の GLP タンパク質と相同性が観られ、GLP であると考えられた。このタンパク質、24KGLP の mRNA は茎での発現も僅かに確認されたが、葉で高い発現がみられた。特に、葉の成長の活発な部位で発現し、成長が終わると発現は大幅に低下した。24KGLP に対する抗体を作成し、蓄積・局在を解析した。GLP は 1 つの植物種の中でもファミリーを形成するため、得られた抗体は他の GLP も認識すると考えられる。蛍光標識抗体を用いた解析から、GLP は若い葉では隣接する葉肉細胞によって形成される細胞間隙に局在し、成長した葉では細胞壁接着が分離していく領域を中心に局在することが明らかになった (図

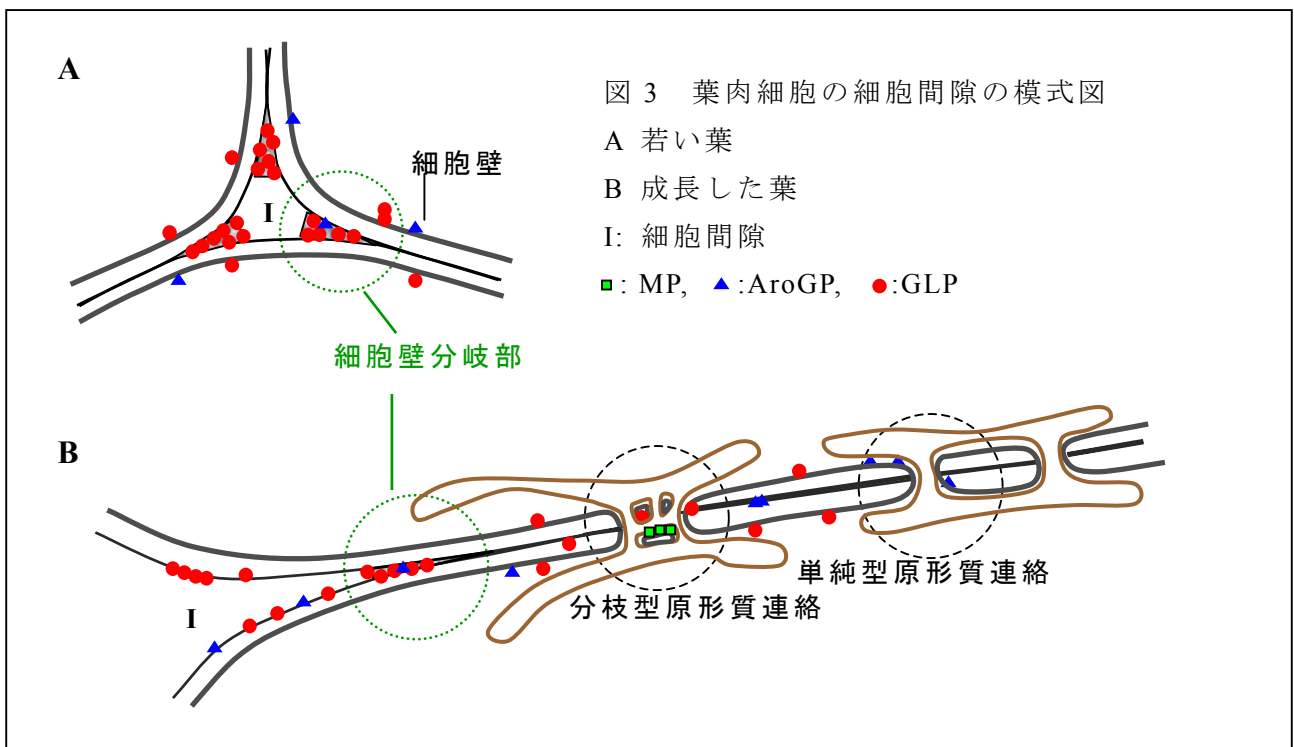
2)。また、免疫電顕法により、GLP は細胞壁分岐部の電子密度の高い領域を中心に分布することが明らかになった。この領域は特定のペクチンに富むと考えられている。成長した葉ではさらに細胞壁接着部の細胞間隙側にも分布した。細胞壁接着部は細胞間隙に面した領域よりも GLP の分布は少ない。しかし、その中の分枝型原形質連絡の一部ではあるが局在が観られた。細胞壁分岐部の分離と分枝型原形質連絡の形成にはどちらも局所的な細胞壁接着の分解が想定される。両過程への 24KGLP の関与が示唆された。



42K タンパク質の N 末端アミノ酸配列を元に cDNA をクローニングした。得られた配列はトマト AroGP1 と全長に渡り高い相同性を持ち、N 末端アミノ酸配列はトマト AroGP1 の成熟タンパク質の開始位置と一致したことから、このタンパク質は AroGP であると考えられた。AroGP はトマトにおいて、ペクチン分解酵素 polygalacturonase の調節を行なう β -subunit (PG β S) であると考えられている。この 42K タンパク質、42KAroGP の mRNA は根・茎・葉のいずれの組織でも発現が確認された。しかし、成長を終え老化を始めた葉での発現は低下していた。42KAroGP に対する抗体を作成し、蓄積局在を解析した。成長中の葉では前駆体と考えられる高分子量のタンパク質と約 42K のタンパク質が検出された。一方、老化し始めた葉では高分子量のタンパク質は検出されず、約 42K のタンパク質のみが検出された。また、細胞壁を多く含む画分には約 42K のタンパク質のみが検出された。これらのことから、AroGP はプロセッシングを受けた安定なタンパク質として細胞壁に分布すると考えられた。免疫電顕法により、若い葉と成長中の葉で AroGP の分布を観察した。若い葉では細胞間隙周辺に分布し、細胞壁の細胞質側近傍と細胞壁分岐部に分布した。成長中の葉では細胞質側の細胞壁だけでなく細胞壁内や外側への局在も観られた。また、一部の単純型原形質連絡の近傍にも局在が観られた。また、機能を推測するため、42KAroGP の mRNA 発現をウイルス誘導性ジーンサイレンシングにより *Nicotiana benthamiana* において抑制した。42KAroGP の遺伝子配列の一部をコードするウイルス LgJ42K を感染させると、接種葉で壊死が生じた。これはトマト AroGP である PG β S のアンチセンス遺伝子を形質転換した植物で見られる現象と類似しており、42KAroGP は機能の面においても PG β S と相同であることが示唆された。さらに、発達の初期から 42KAroGP mRNA の発現が抑制された葉では、細胞壁接着の分離が進まず細胞間隙が減少していた。このことから、42KAroGP が PG β S として polygalacturonase の活性を調節し、細胞間隙形成時の細胞壁接着の分離に

関与すると示唆された。

本研究において、まず 8M LiCl 処理によって分枝型原形質連絡の構成要素が抽出されることを明らかにした。このとき抽出されるタンパク質から見出された GLP は、葉の生長時に主に細胞壁分岐部に局在し、分枝型原形質連絡にも分布が観られた。24KGLP の生化学的な機能はアミノ酸配列の情報のみからでは不明だが、粘着性を持つことから糖質やタンパク質のつなぎとめや保護を行なう可能性が考えられる。42KAroGP は局在と遺伝子発現抑制から、細胞間隙形成時に polygalacturonase の活性を調節することで、細胞壁接着の分離に関与することが示唆された。



葉では細胞間隙の形成により効率的なガス交換が可能になり、光合成能の上昇につながる。細胞間隙の発達にはシンク-ソース器官への発達に不可欠であると考えられる。また、原形質連絡の分枝化はシンク-ソース器官への発達に伴う細胞間の物質輸送の変化と関連付けられていた。原形質連絡の分枝化も細胞間隙形成も局所的な細胞壁接着の分解を伴い、同時期に生じる現象であるだけに、本研究は両過程に同じ機構が関与する可能性を強く示唆した。現在までの葉の細胞間隙の形成に関わる分子の知見は限られており、本研究で見出された 2 つのタンパク質は有力な手掛かりになると考えられる。