

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者 加星（岸）光子

植物細胞は細胞壁によってお互いが隔てられているが、細胞質と変形した小胞体が細胞壁を貫通した、原形質連絡とよばれている構造によって連絡しあっている。原形質連絡を介した細胞間情報伝達は、選択的・能動的な分子の輸送も可能であり、各器官の発達・植物体の維持に重要な役割を担うと考えられている。原形質連絡の存在は 100 年以上前から知られていたが、微細な構造や性質についてはこの 20 年ほどの間に徐々に明らかになってきたところである。原形質連絡の構造・性質は細胞の種類や発達段階によって変化する。葉は発達するにつれ、栄養を他器官から受け取るシンク器官から、栄養を作り出して他器官へ与えるソース器官に変化する。この変化に伴い複雑な構造を持つ分枝型原形質連絡が観られるようになり、透過する分子の選択性が上昇する。多くの植物ウイルスは原形質連絡を介して感染を広げるが、タバコモザイクウイルスの移行タンパク質 (MP) は分枝型原形質連絡にのみ局在する。分枝型原形質連絡はソース葉の細胞間情報伝達やウイルスの細胞間移行に重要な役割を果たすと考えられるが、構成する分子に関する知見はほとんどなかった。加星 (岸) 氏は、分枝型原形質連絡に着目し、その構成要素の抽出を行い、抽出されるタンパク質について分子生物学的・細胞生物学的解析を行なった。

第一章では、MP を選択的に抽出する方法を探索し、その効果の検討を行なった。8M LiCl により原形質連絡を含む細胞壁面分から MP が選択的に抽出されることを見出した。また、MP が抽出されない 7M LiCl 処理後と、8M LiCl 処理後の細胞壁面分を透過型電子顕微鏡観察により比較し、分枝型原形質連絡の構成要素が抽出されていることを示した。分枝型原形質連絡は葉の生長とともに増加する。葉の生長段階をおって抽出液のタンパク質組成を比較し、MP と同様に増加するタンパク質を選択した。この中に分枝型原形質連絡と関連のあるタンパク質があると考えられた。

第二章では、MP と共に抽出されるタンパク質の解析を行なった。抽出液に含まれるタンパク質のアミノ酸配列分析とその配列に基づく相同性検索を行い、9 個のタンパク質が推定された。MP と共抽出されるタンパク質のうち最も量が多く、他のタンパク質に粘着性を示す 24K タンパク質についてさらに解析を加えた。24K タンパク質は、葉の生長とともに MP 抽出液中の存在量が増加する。24K タンパク質は germin like protein (GLP) ファミリーに属する 24KGLP と推定された。GLP ファミリーのタンパク質は植物に普遍的に存在し、多くが糖鎖を持ち細胞壁

に分布することが知られていたが、共通の機能は不明であった。24KGLP mRNA の発現解析から、葉の生長の活発な部位で発現することが明らかになった。GLP に対する抗体を用いた顕微鏡解析から、GLP は葉で安定して存在していること、葉肉細胞の細胞間隙に面した細胞壁分岐部を中心に分布することが明らかになった。また、免疫電顕法による解析から、GLP は細胞壁分岐部の電子密度の高い領域を中心とした細胞間隙に面した細胞壁に分布すること、一部の分枝型原形質連絡に分布することが明らかになった。細胞壁分岐部の分解による細胞壁接着部の減少と、分枝型原形質連絡の形成は同時期に起こるといふ観察がなされていたが、両者に GLP が関与することが示唆された。

第三章では、MP と共抽出される 42K タンパク質の解析を行なった。42K タンパク質は Aromatic amino acid rich glycoprotein (AroGP) である 42KAroGP と推定された。AroGP はトマト果実においてペクチン分解酵素 polygalacturonase の活性を調節する  $\beta$ -subunit として発見されたタンパク質である。その遺伝子は、シロイヌナズナ、トマトに 3 個ずつ存在する。AroGP は前駆体タンパク質がプロセッシングされた成熟タンパク質として機能する。42KAroGP mRNA の発現解析から、葉の生長時に発現し生長が終わると発現が減少することが確認された。AroGP を認識する抗体を用い、蓄積・局在を解析した。老化中の葉からは前駆体タンパク質は検出されず、成熟タンパク質のみが粗細胞壁画分に検出された。免疫電顕法により、AroGP は若い葉では細胞間隙周辺に分布し、細胞壁近傍と細胞壁分岐部に近い細胞壁内に局在した。また、成長中の葉では細胞間隙に面した細胞壁、細胞壁内、細胞壁接着部の内部などに点在した。単純型原形質連絡近傍にも局在が観られた。*Nicotiana benthamiana* において、ウイルス誘導性ジーンサイレンシングによる 42KAroGP mRNA の発現抑制が行なわれた。42KAroGP の cDNA 配列の一部を導入したウイルスを接種した植物では接種葉を中心に壊死が生じることから、42KAroGP はトマト AroGP と同様に polygalacturonase  $\beta$ -subunit として機能すると推測された。また、発達の初期から 42KAroGP mRNA の発現が抑制された葉では、細胞壁接着部の分離が進まず細胞間隙の減少が観られた。局在と遺伝子抑制の解析結果から、42KAroGP が細胞間隙形成時に細胞壁接着の分解を調節することが示唆された。

以上、本論文は、これまでほとんど解析されていなかったソース葉における原形質連絡構成要素の抽出方法を確立し、その解析に道筋をつけた。また、関連するタンパク質の解析を行い、ソース葉への発達に不可欠な細胞間隙形成に関与する因子の発見にも至った。これは、葉のシンク-ソース器官への発達時に見られる細胞壁を中心とした形態変化を解明する上で重要な貢献をなすと考えられる。

従って、本審査委員会は博士（学術）の学位にふさわしいものと認定する。