

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田村 倫子

---

アスパラギン酸プロテアーゼ(AP)は活性中心に 2 つのアスパラギン酸残基を持つタンパク質分解酵素である。植物においては、種子貯蔵タンパク質を分解し発芽や登熟に寄与することが報告されている。これらはすべて可溶性の AP であるが、生体内には膜貫通型の AP も存在する。2002 年に 9 回膜貫通型の AP、シグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) が同定され、ヒトにおいては小胞体膜に局在し、切り出したペプチド断片が免疫に関与するという重要な機能が解明された。さらに魚類や昆虫類において SPP は胚発生に必須であることも報告され、膜内に活性部位を有し限定分解した基質に機能を持たせるという膜貫通型プロテアーゼの機能が注目を集めている。しかし植物においては生理機能の解析はもちろん、SPP の存在も全く知られていない。

申請者の博士論文は、全ゲノム配列が解読されたシロイヌナズナを用いて植物における SPP の生理機能を追究したものである。動物の胚発生とは異なり、生涯を通して発生・分化を繰り返す植物において SPP の機能は非常に興味を持たれた。本論文は以下の 3 章から構成され、シロイヌナズナ SPP の部位特異的発現を明らかにしたものである。

### 1. シロイヌナズナ SPP とそのホモログの同定

ヒト SPP のアミノ酸配列をもとに、シロイヌナズナのデータベースから相同性の高い 6 つの配列を得た。その中でヒト SPP に最も類似の配列を AtSPP と命名し、以下相同性の高い順に AtSPPL1~AtSPPL5 と命名した。いずれの分子も触媒に関わる膜内の 2 箇所活性部位が保存されていた。

### 2. 組織における発現解析

乾燥種子・根・葉・茎・花序・サヤにおける AtSPP とそのホモログの mRNA の発現を RT-PCR により検証したところ、AtSPP は検討したすべての組織に発現していた。一方 AtSPP のホモログは組織により発現部位や発現量に差が見られた。そこで、AtSPP とそのホモログがいつ、どの細胞に強く発現するか *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した。

発芽時の発現を追跡するため、吸水後 8 時間ごとの発現を解析したところ、発芽直前の吸水 40 時間からシグナルが観察された。発現部位は、AtSPP もそのホモログも幼根の表皮細胞の一部で細胞伸長が盛んな部位、およびシュートメリステムと呼ばれ一生を通して未分化能を保持し、植物体のすべての地上部組織を形成する部位であった。以上、AtSPP とそのホモログが細胞の分裂・分化あるいは細胞伸長の盛んな部位で機能することを明らかにした。

メリステムにおける発現は花序を持つまで継続されていたが、その発現部位は AtSPP が茎頂全体であったのに対し、AtSPPL2 および L3 は茎頂ではなく、茎を形成する部位であった。このことから AtSPP は未分化能の維持あるいは細胞の分化分裂に関与するのに対し、AtSPPL2 および L3 は茎に形成するように分化した細胞で機能することが示唆された。よって異なる組織に発現している分子を基質とすると考えられた。

### 3. 細胞オルガネラにおける局在の解析

機能および基質の検討のため細胞内局在を解析した。GFP と目的分子の融合タンパク質をシロイヌナズナの培養細胞に一過的に発現させた。AtSPP と GFP の融合タンパク質の蛍光は、網目状に観察された。これは GFP に小胞体輸送シグナル(HDEL)を付加した場合の形状と同様であることから、AtSPP が小胞体に局在することが明らかになった。これを確認するために、培養細胞の粗膜画分(内在の AtSPP を含む)のショ糖密度勾配遠心を行った。細胞の粗膜画分を EDTA 存在下または非存在下で分画すると、EDTA 存在下における AtSPP のバンドは、非存在下のそれより 5-6 フラクション、ショ糖密度の軽い方にシフトした。この現象は EDTA のキレート効果によりリボソームが小胞体から遊離し、小胞体画分がショ糖密度の軽い方に分画されたためであり、AtSPP の小胞体局在を証明するものであった。

一方、AtSPP のホモログと GFP との融合タンパク質は蛍光がドット状に観察され、それが FM4-64 の蛍光と重なったためエンドソームに局在することが分かった。植物エンドソームの膜における生理機能は未知の要素も多く、従って AtSPPL2 や L3 の生理作用を追究することはエンドソーム膜の細胞機能の解明にもつながると考えられた。

以上、本研究はシロイヌナズナにおける膜貫通型酵素 SPP を単離し部位特異的発現を解明した植物 SPP の初めての知見である。植物 SPP の作用機序をより深く理解することは、SPP を持つ高等生物に普遍的な SPP の機能の解明に寄与するだけでなく、膜で機能する酵素という新しい局面の柱となると考えられ、学術的に高く評価できる。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。