

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 17 年度博士課程進学
氏 名 増口 潔
指導教員名 浅見 忠男

論文題目

穀類種子糊粉層における アラビノガラクトタン蛋白質の生理機能に関する研究

アラビノガラクトタン蛋白質 (AGP)は Hydroxyproline-rich glycoprotein ファミリーに属し、植物の様々な成長過程に関与することが示唆されている植物特有の細胞壁蛋白質である。分子量の 90%以上がタイプ II 型アラビノガラクトタン糖鎖により構成されている。AGP は β -glucosyl Yariv 試薬 (β -GlcY)と呼ばれる人工的なフェニルアゾ化合物と特異的な結合を示すことから、 β -GlcY は AGP の精製、定量・検出、機能解析に利用することが出来る。また、多くの AGP が glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型の蛋白質であることが示され、その生理機能の発現メカニズムが注目されている。

ジベレリン (GA)は植物の発芽に重要な植物ホルモンである。穀類種子発芽過程において、胚で生合成された GA は、胚乳に存在する貯蔵物質の分解を行うために、糊粉層での加水分解酵素等の合成を誘導するが、この系は GA 研究における重要なモデル実験系となっている。

本博士論文は、大麦種子糊粉層プロトプラストにおける GA による α -アミラーゼの誘導が β -GlcY により抑制されるという既知の知見に基づき、AGP の生理機能と GA 情報伝達系の関連性を追求することを目的とした。第 1 章ではマイクロアレイ解析により、 β -GlcY が糊粉層細胞に与える遺伝子発現への効果を調べ、GA 情報伝達系との接点を追求した。第 2、第 3 章では糊粉層に存在する β -GlcY 反応性の AGP の単離・同定、機能解析を行った。また、イネ糊粉層より同定した糊粉層特異的な AGP は特徴的なドメイン構造を有していたことから、第 4 章では植物における同 AGP ファミ

リーの生理機能の網羅的解明を目指し、シロイヌナズナ遺伝子破壊株を用いた機能解析を行った。

第1章 糊粉層プロトプラストのヤリブ試薬に対する遺伝子発現応答の解析¹⁾

β -GlcY が大麦糊粉層における GA 情報伝達系をどの程度特異的且つ普遍的に阻害するかを追求するとともに、 β -GlcY の抑制作用のメカニズムの糸口を見いだすことを目的に、22K Barley1 GeneChip を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、 β -GlcY が GA 誘導性遺伝子の 80 % の遺伝子の発現に対して阻害効果を持つことを明らかにした。一方、 β -GlcY が防御応答関連遺伝子の発現を変化させることも判明し、 β -GlcY が防御応答情報伝達系を介して GA 情報伝達系を阻害している可能性が伺われた。そこで、ジャスモン酸 (JA)、OPDA、エリシター、サリチル酸、過酸化水素といった防御応答誘因物質が GA 誘導性の α -アミラーゼ活性やプログラム細胞死に与える影響を調べた結果、これらの因子が β -GlcY 同様に、GA 情報伝達を阻害することを見出した。

一方、 β -GlcY と JA には誘導する遺伝子について共通性が見られたが、 β -GlcY 添加後の JA 内生量の増加、JA 生合成遺伝子の発現上昇は認められず、 β -GlcY による JA 内生量の増加によって生じる防御応答反応の関与は否定された。また、GA 情報伝達の既知の制御因子の発現を調べた結果、正の因子 Ca^{2+} -ATPase の GA による発現誘導の β -GlcY による阻害、負の因子 NAK 型キナーゼ (*HvEsi47*) や WRKY 転写因子 (*HvWRKY38*, *HvWRKY51*) の β -GlcY による発現量増加が、 β -GlcY の糊粉層細胞における GA 情報伝達阻害の一因になっている可能性が示された。

第2章 糊粉層に存在する AGP の単離・同定²⁾

糊粉層組織に富む米糠を用いて、糊粉層 AGP の大量精製を行った。逆相 HPLC 上で2つの主要な AGP 画分 (Fr. A、Fr. B) と少量の別の AGP 画分 (Fr. C) が検出された。各部位から精製した AGP を比較した結果、Fr. B は糊粉層特異的な AGP であることが示された。これらの溶出パターンは大麦糊粉層の AGP と非常に良い一致を示した。

次に糊粉層プロトプラストで機能する AGP は、膜結合型の GPI アンカー型 AGP である可能性が高いため、膜画分特異的な AGP が存在する可能性を検討した。全 AGP の大部分が可溶性画分に観察され、約 1 % の AGP が膜画分より得られた。PI-PLC 処理により膜画分 AGP から GPI アンカーが切断された AGP の溶出パターンが可溶性画分と類似したことから、膜画分の AGP は Fr. A から Fr. C の AGP の GPI アンカー結合型として一時的に細胞膜上に局在しているものであり、その後、細胞膜から細胞外へ放出されるものと考えられた。

HF による脱糖鎖処理後、逆相 HPLC で分画したサンプルの N 末端シーケンス等

により、Fr. A から古典的な AGP (*OsAGP1*)とペプチド性 AGP である AG ペプチド (*OsAGPEP1~3*) の配列を得た。

上記の精製法に加え、ゲル濾過 HPLC や酵素分解による β -GlcY 反応性ペプチドの取得により、糊粉層特異的 Fr. B の本体は Early nodulin 様蛋白質 (ENODL)である *OsENODL1*、Fr. C の本体は脂質輸送蛋白質様蛋白質 (*OsLTPL1*)であることを示した。この2つの AGP は新規なキメラ型 AGP であり、同定した全 AGP は GPI アンカー付加配列を持っていた。同定した AGP をコードする遺伝子の部位別発現を調査した結果、*OsAGP1*、*OsAGPEP1~3*、*OsLTPL1* は全身で発現が観察されたのに対し、*OsENODL1* は種子成熟過程後期及び吸水後の糊粉層でのみ発現が認められた。

第3章 *OsENODL1* の機能解析

糊粉層特異的な新規 AGP、*OsENODL1* の機能解明を目指した。種子を用いた発現解析より *OsENODL1* がアブシジン酸 (ABA)応答性遺伝子であることが判明し、ABA が機能する種子成熟過程後期に *OsENODL1* が機能を持つことが示唆された。また、イネゲノム中には多くの ENODL 遺伝子が存在していたが、*OsENODL1* と最も相同性の高い遺伝子、*OsENODL2* の発現を調べたところ、同時期の糊粉層において発現が見られたことから、*OsENODL2* が *OsENODL1* の機能を相補する可能性が考えられた。

次に各種形質転換イネを作製し、研究を行った。*OsENODL1*-GFP 融合蛋白質は細胞周辺部に蛍光が観察され、第2章の結果と同様に、*OsENODL1* が細胞膜、細胞外において機能していることが示唆された。

OsENODL1 の過剰発現、RNAi 発現抑制イネにおいては、通常生育条件下における植物体の様子、種子の形状や発芽等の形質に変化は認められなかった。また、*OsENODL1* が防御応答に関与する可能性を検討すべく、イネ防御応答関連遺伝子の発現を *OsENODL1* 過剰発現イネにおいて調査したが、発現の変化は認められなかった。一方、RNAi により *OsENODL1*、*OsENODL2* を共に発現抑制させた形質転換イネでは、多くの個体が不稔となった。また、種子が形成された個体では *OsENODL1*、*OsENODL2* の発現は抑制されておらず、種子形成までのいずれかの過程において、両遺伝子が重複した重要な機能を持つ可能性が考えられた。

さらに *OsENODL1* が持つ plastocyanin-like ドメインに注目し、研究を進めた。*OsENODL1* が有する plastocyanin-like ドメインには銅結合に必要なアミノ酸残基が保存されておらず、銅結合能はないと思われた。大麦糊粉層 cDNA ライブラリーを作製し、酵母 two-hybrid 法による相互作用蛋白質の検討を行った結果、防御応答に機能を有する xylanase inhibitor との特異的な相互作用が観察された。

第4章 シロイヌナズナ ENODL ファミリーの機能解析

ENODL の植物体内における機能解明の一端を担うことを期待し、シロイヌナズナを用いての ENODL ファミリーの機能解析を行った。データベース検索により、シロイヌナズナには 21 個の ENODL (AtENODL1~AtENODL21) が存在することを明らかにした。これらの持つ plastocyanin-like ドメインには、OsENODL1 同様、銅結合に必要なアミノ酸残基が保存されておらず、銅結合能を有する plastocyanin-like ドメインを持つ他の細胞外蛋白質ファミリーとは異なる進化をしていることが系統樹解析により明らかとなった。

それぞれの ENODL 遺伝子の遺伝子破壊株を入手し、各々のホモラインを選抜した。その後、通常生育条件下における生育や形態の変化を調査したが、*atenodl11* が野生型に比べ背丈が低くなるという点以外に、ENODL 遺伝子破壊株と野生型との間に差は認められなかった。

さらに ENODL 間での遺伝子機能の重複の可能性を考慮し、相同性の高い ENODL の遺伝子破壊株の掛け合わせによる二重遺伝子破壊株 (dKO) の作製を行った。現在までに、*AtENODL1/2*、*AtENODL3/4*、*AtENODL11/12*、*AtENODL14/15* の dKO 株の通常生育条件下における野生型との生育の差や形態の変化は見出せていない。一方、*atenodl5* と *atenodl6* を掛け合わせた場合に dKO 株の作成が出来ず、*AtENODL5 / atenodl5*、*atenodl6 / atenodl6* の後代種子から得られた植物体の遺伝子型を調査した結果、*AtENODL5 / AtENODL5* と *AtENODL5 / atenodl5* となる植物個体の比は約 1 : 1 となり、dKO 株 (*atenodl5 / atenodl5*) となるものは約 1 % であった。このことから、*AtENODL5* と *AtENODL6* が生殖時に重要な機能を有する ENODL であることが明らかとなった。

総括

本博士論文では、穀類糊粉層の GA 情報伝達が、これまで知られていた ABA 情報伝達以外にも、防御応答情報伝達により阻害されるということを示した。また、AGP の新しい機能として、植物の防御応答に関与する可能性が示唆された。AGP が細胞外と細胞内を繋ぐリンカー蛋白質であるという報告例や、AGP が防御応答初期に発生する活性酸素により架橋されるという報告例があり、AGP が防御応答時に何らかのセンサーとしての役割を担っている可能性が考えられる。

一方、穀類糊粉層特異的に存在する AGP として OsENODL1 を同定したが、形質転換イネを用いた解析による機能解明には至らなかった。今後、xylanase inhibitor との相互作用の追求、形質転換イネの防御応答誘因物質等に対する感受性を検討することにより、AGP が防御応答に関与する可能性が明らかになると考えられる。

また、*OsENODL1/OsENODL2* の共発現抑制株やシロイヌナズナの *AtENODL5/AtENODL6* の dKO 株の詳細な解析を通して、植物の生殖過程や種子形成過程における ENODL の関与が明らかにされることにより、この機能未知の新規 AGP ファミリーの機能の一端が解明されるものと期待される。

参考文献

- 1) Mashiguchi K, Urakami E, Hasegawa M, Sanmiya K, Matsumoto I, Yamaguchi I, Asami T, Suzuki Y. *Plant Cell Physiol.* (in press)
- 2) Mashiguchi K, Yamaguchi I, Suzuki Y. (2004). *Plant Cell Physiol.* 45: 1817-1829