

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 増口潔

---

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。AGP は  $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬 ( $\beta$ -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、 $\beta$ -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。一方、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  $\alpha$ -アミラーゼの誘導が  $\beta$ -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ており、4章よりなる。

第1章ではマイクロアレイ解析により、 $\beta$ -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。その結果、 $\beta$ -GlcY が GA 誘導性遺伝子の発現に対して阻害効果を持つだけでなく、防御応答関連遺伝子の発現を変化させることも判明し、 $\beta$ -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  $\alpha$ -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  $\beta$ -GlcY 同様に、GA 情報伝達を阻害することを見出した。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  $\beta$ -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  $\beta$ -GlcY による発現量増加が、 $\beta$ -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章では糊粉層に存在する  $\beta$ -GlcY 反応性の AGP の単離・同定、機能解析を行った。糊粉層組織に富む米糠を用いて AGP の大量精製を行い、糊粉層特異的な AGP の単離に成功した。ゲル濾過 HPLC や酵素分解による  $\beta$ -GlcY 反応性ペプチドの取得により、糊粉層特異的 AGP の本体は Early nodulin 様蛋白質 (ENODL)である *OsENODL1* であることを示した。この AGP は新規なキメラ型 AGP であり、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、*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章では糊粉層特異的な新規 AGP、OsENODL1 の機能解明を目指した。まず *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。形質転換イネを作製し、研究を行ったところ、*OsENODL1*-GFP 融合蛋白質は細胞周辺部に蛍光が観察されたことより、*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。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章では 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。それぞれの ENODL 遺伝子の遺伝子破壊株ホモラインについて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の作製を行った。この結果、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。

以上、本研究は 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を提示しただけでなく、生殖生長における役割も示唆したものであり、学術的にも応用的にも寄与するところが多い。よって審査委員一同は、本研究が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。