

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山田 晃嗣

植物は浸透圧ストレス条件下で多くの糖やアミノ酸などの代謝産物を蓄積することが知られている。しかし、それらの溶質が蓄積する組織やオルガネラはいまだ特定されていない。そこで本論文では、代謝産物の輸送に関わるトランスポーターの解析を行うことで、浸透圧ストレス下で蓄積する代謝産物の植物体内における流れやその生理的役割を解明することを目的とした。浸透圧ストレス下で顕著に蓄積する糖として、単糖、二糖、糖アルコール、ラフィノース属オリゴ糖などが報告されているが、特に単糖トランスポーターに着目し解析を行った。

第1章では、シロイヌナズナの単糖トランスポーター遺伝子の発現解析を行った。はじめに公開データベースやノーザンブロット解析などで確認したところ、複数の遺伝子に浸透圧ストレス誘導性が確認された。そのなかでも、ERD6 様ファミリーには浸透圧ストレス誘導性を示す遺伝子が複数確認された。しかし、これまでに ERD6 様ファミリーの機能解析の報告はなく、浸透圧ストレス条件下でどのように機能するかは不明であった。そこで本研究では、単糖トランスポーターのなかでも ERD6 様ファミリーに着目し解析を進めた。ERD6 様ファミリーにおいて最も強い浸透圧ストレス誘導性を持つ遺伝子は、乾燥初期に発現が誘導される遺伝子として単離されている *ERD6* と分子系統的に最も近縁であったため、*ESL1* (*ERD six-like 1*) と名付け、以後 *ESL1* と *ERD6* の解析を行った。

第2章では、*ESL1* および *ERD6* の組織特性性と細胞内局在の観察を行った。*GUS* や *GFP* などのリポーター遺伝子を用いて *ESL1* および *ERD6* の組織特異性と細胞内局在を調べた結果、*ERD6* と *ESL1* は発現する組織と細胞内局在が異なることが示された。よって、*ESL1* と *ERD6* の植物体における生理的機能は重複していないことが推測された。

ERD6 様ファミリーはリソソームに局在するヒトのグルコーストランスポーター *GLUT8* と相同性が高い。*GLUT8* は N 末端に存在する酸性ジロイシンモチーフを破壊することでその細胞内局在が細胞膜へと変化する。液胞膜に局在する *ESL1* は N 末端にロイシン残基が並んだ配列を有しており、それらのロイシン残基の *ESL1* の細胞内局在への関与が考えられた。ロイシン残基をアラニン残基へ置換した *ESL1* (*LLL/AAA*) を作製し、細胞内局在を調べたところ、*ESL1* (*LLL/AAA*)-*GFP* 融合タンパク質は細胞膜へ局在することが観察された。さらに、アラニンスキャニング解析において *ESL1* の液胞膜局在には *LXXLL* 配列が必要であることが明らかとなった。

第3章では、タバコ懸濁培養細胞BY-2を用いてESL1およびERD6過剰発現細胞を作製し、単糖輸送活性を測定した。液胞膜に局在するESL1を過剰発現した細胞はベクターコントロール細胞と比べてグルコース輸送活性に差は見られなかったが、細胞膜に局在するESL1 (LLL/AAA)の過剰発現細胞を作製しグルコース輸送活性を測定したところ、ベクターコントロール細胞に比べて有意にグルコースを吸収することが示された。また、ESL1 (LLL/AAA)のグルコース輸送の K_m 値は102mMであった。次にERD6過剰発現細胞を作製し、同様にグルコース輸送の K_m 値を測定したところ309mMとなり、ESL1とERD6は低親和性のトランスポーターであることが示された。ESL1 (LLL/AAA)およびERD6過剰発現細胞ではプロトノフォアであるCCCPを添加してもグルコース輸送活性に変化が見られなかったことより、それらの輸送機構はプロトン勾配を利用した二次的能動輸送ではなく促進拡散であると考えられた。本研究によって植物の促進拡散型の単糖トランスポーターが初めて同定された。

第4章では、ESL1は液胞膜局在であるため、液胞内で単糖を産生する酵素である液胞型インベルターゼ活性の測定を行った。液胞内の単糖生成経路の1つとして液胞型インベルターゼによるスクロースの分解が挙げられる。そこで液胞型インベルターゼの活性を測定したところ、浸透圧ストレス下においてその活性の上昇が確認された。シロイヌナズナには液胞型インベルターゼ遺伝子の組織特異性を定量的RT-PCR法やプロモーターと*GUS*遺伝子をつないで導入した形質転換体を用いて解析したところ、発現する組織がESL1との重なりが見られたため、それらの細胞ではESL1との協調的な働きが推測された。

以上、本論文は高等植物における乾燥等の浸透圧ストレス耐性の獲得に機能すると考えられている液胞中の単糖の輸送に関する制御機構を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。