

論文審査の結果の要旨

氏名 栗原（大窪） 恵美子

本論文は3章からなり、第1章はタバコ BY-2 ミニプロトプラスト培養系の確立、第2章は細胞生長における液胞膜型アクアポリン(NtTIP1;1)の同定・機能解析、第3章は細胞生長における液胞膜型ショ糖トランスポーター(NtSUT4)の同定・機能解析について述べられている。

生物にとって生長は基本的かつ重要な生理現象であるが、植物細胞では細胞分裂した後の細胞が細胞体積を著しく増加させるのが特徴的で、細胞体積の増加が個体の生長量の大部分を占める。そこで主要な役割を果たしているのが植物細胞の体積の大半を占めているオルガネラの液胞である。液胞は多機能なオルガネラであり、細胞の生長段階、細胞の内外環境に応答して、さまざまな機能や形態でその役割を果たしている。この液胞の機能と形態の両面におけるダイナミズムを遺伝子・分子レベルから理解するために、液胞を構成する要素である液胞膜タンパク質の機能解析に着目した。

液胞の物質輸送には液胞膜に局在する数多くのトランスポーターが関わっていると考えられる。これまでの過剰発現植物や RNAi によるノックダウン植物を用いた液胞膜を構成する膜輸送タンパク質の機能解析では、表現型が認められないケースや、致死性を示すケースがしばしばみられ、液胞膜タンパク質の多くは機能解析が不十分であった。また、個体中の細胞を追跡し、細胞生長と液胞の発達過程を追跡することも困難であるという問題点を解決する必要があった。本論文では個体では困難であった細胞生長における液胞膜タンパク質の機能解析を行った。この解析により、植物の細胞生長過程における液胞の機能を明らかにすることを目指した。

第1章ではこれまで植物個体では困難であった液胞膜タンパク質の機能解析を行うために、まず、液胞の発達を同調的に誘導させ、経時的な追跡が可能な培養系を確立した。均一で大量に培養が可能な BY-2 細胞を用い、細胞から液胞を除去しミニプロトプラストを調整した。このミニプロトプラストを伸長条件となるような培地中で培養すると、細胞の伸長および液胞の発達が誘導されることが分かった。このミニプロトプラストを用いて阻害剤を用いた液胞の構造解析や液胞発達段階における遺伝子の発現解析が可能となったことを示した。この実験系では細胞を同調的かつ大量に培養することが可能であり、*in planta* では困難であった細胞生長にともなう液胞構造変化の顕微鏡下での追跡(顕微鏡画像解析)のみならず、液胞の発達段階に応じた目的遺伝子の発現解析(遺伝子発現解析)やタンパク質の機能解析も容易にした。

第2、3章では、第1章で確立したミニプロトプラストの培養系、およびプロトプラスト培養系を用いて液胞膜型輸送タンパク質の機能解析を行った。まず第2章では液胞が主に吸水によりその体積を増大させることから、水の輸送を担う実体と考えられる液胞型アクアポリンに着目し、その機能解析を行った。まずタバコにおいて発現している液胞膜型アクアポリン(NtTIP1;1)を同定した。次に、ミニプロトプラスト培養系を用いて、NtTIP1;1 の過剰発現が液胞の発達に及ぼす影響を解析した。その結果、NtTIP1;1 過剰発現細胞(BY-TIPG 細胞)では野生株と比較して液胞の発達が促進されていた。また、BY-TIPG 細胞では細胞体積の増加速度も亢進されていることを見出した。以上の結果から、NtTIP1;1 の細胞の肥大生長への関与が示唆された。さらに、プロトプラストの伸長を

高頻度に誘導する条件で培養したところ、BY-TIPG 細胞では細胞伸長率の促進のみならず、細胞分裂の促進もみられた。このとき過剰発現体では V-PPase 遺伝子の発現が約 3 倍高くなっておりオーキシン輸送の変化が予想された。以上の結果から NtTIP1;1 が細胞分裂に関与している可能性も見出した。

第 3 章では植物において最も多量に輸送が行われている物質の 1 つであるショ糖に着目し、その輸送を担うトランスポーターの機能解析を試みた。本論文ではまず、タバコの液胞膜型ショ糖トランスポーター(*NtSUT4*)を同定し、NtSUT4-GFP を恒常発現するタバコ培養細胞(BY-SUTG)を作出した。次に細胞生長に関する NtSUT4 の機能を解析するため、液胞を除去したミニプロトプラストの培養系を用いて細胞形態の変化について評価を行った。その結果、培養 2 日目の細胞断面積についてはコントロールと BY-SUTG の両者の間に差異がみられなかった。一方、BY-SUTG の細胞伸長率(細胞長軸/細胞短軸)はコントロールと比較して減少していたことから、BY-SUTG では細胞の長軸方向への伸長が抑制されることが示唆された。そこで同様にミニプロトプラストにおいてカルコフローによりセルロースを染色し、その蛍光輝度を定量的に測定した。その結果、BY-SUTG の方が蛍光輝度が高く、セルロースの蓄積量が増加していることがわかった。以上の結果から NtSUT4 がショ糖の輸送を介して細胞壁の形成に影響を与え、細胞形態に関与した可能性が示された。

植物細胞において体積の大半を占める液胞は、植物細胞の体積や液胞中に蓄える物質の種類と量を変化させることにより、細胞の生長と機能分化を支えている。液胞のこうした機能は、液胞膜に局在する個々の輸送タンパク質を解析することによって理解できると考えられるが、有効な実験系に欠けていた。そこで本論文では、液胞と細胞の生長を同調かつ詳細に追跡できる実験系としてミニプロトプラスト培養系を開発した。この培養系を用いた NtTIP1;1 の解析から、液胞膜型アクアポリンの恒常発現により、液胞の発達およびそれに伴う細胞伸長が促進されることを明らかにした。また、低濃度オーキシン条件下では細胞伸長だけでなく、細胞分裂も促進されることを示した。これは液胞膜型アクアポリンの細胞生物学的な知見に貢献し、また、細胞分裂については新奇機能であり、動物のアクアポリンとも類似した現象が明らかとなり興味深い。さらに、タバコの液胞膜型アクアポリンとして初めて NtSUT4 を同定し、機能の解析からは NtSUT4 が細胞形態に関与していることを見出した。本研究により液胞膜を構成する輸送タンパク質は、液胞の発達と細胞生長のみならず、細胞の分裂や細胞の形態そのものにも関与していることが示唆された。

なお、本論文第 2 章は佐野俊夫、桧垣匠、朽名夏麿、馳澤盛一郎との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。