

氏名	阪本康司
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第51号
学位授与の日付	平成5年3月23日
学位授与の要件	生命科学研究科 分子生物機構論専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	シロイヌナズナの根端の刺激応答反応によって誘導されるタンパク質の解析
論文審査委員	主査教授 江口吾朗 助教授 岡田清孝 教授 西村幹夫 教授 長濱嘉孝

論文内容の要旨

植物の根は、重力方向に沿って伸長する。これは、重力屈性として古くから知られている現象である。高等植物の根の重力屈性については、従来主にトウモロコシを材料とし、生理学的あるいは、生化学的な観点からこの現象を解明しようという試みが成されてきた。トウモロコシの根は、根冠で重力を認識し、植物体を傾けたとき、根冠の下方から成長阻害物質が放出され、伸長帯での下方の伸長が阻害されることによって、根は重力方向に屈曲するものと考えられている。また、重力の認識時にタンパク質の合成とリン酸化がみられ、根冠から伸長帯付近にかけてカルシウムイオンの濃度勾配が形成され、下方のカルシウムイオンの濃度が高くなると考えられている。これらの現象を包括する制御のネットワークを明らかにするためには、重力屈性を分子レベルで解析することが必要である。一方、シロイヌナズナは植物における高次な現象の遺伝学的解析に広く用いられているが、重力屈性などの刺激応答反応についての詳細な基礎的研究は行われてこなかった。そこで、本研究では、シロイヌナズナについて、物理的刺激及び化学的刺激によって根端組織で誘導されるタンパク質を探索解析し、高等植物における刺激応答反応の制御ネットワークを解明するための道を開くことを目的とした。

はじめに、トウモロコシについて得られている知見を踏まえ、シロイヌナズナの根の重力屈性の発現過程でカルシウム・イオン及びタンパク質の合成が必要であるか否かをイオン濃度調節実験及びタンパク質合成阻害実験等によって詳細に調べた。その結果、シロイヌナズナの芽生えの根の重力屈性にもカルシウム・イオンとタンパク質合成が必要であることが明らかにされた。次に、タンパク質の合成が特異的であるかどうかを調べるために、シロイヌナズナの芽生えを、その方向を90度変えて一定時間静置した後、根の組織からタンパク質を抽出し O'Farrellの二次元ゲル電気泳動法により解析した。その結果、二つのスポットの一時的な増加がみられた。これらのタンパク質は、根が重力方向の変化を感じし屈曲するより早い段階に必要なものと考えられた。

次に、タンパク質が誘導されるか否かを検討するために、植物体をロッカーテーブル上で振とうし連続的に重力方向を変化させ（ロッキング）重力刺激を増幅させた。この方法で刺激した根から抽出したタンパク質を二次元ゲル電気泳動法により解析したところ、14種類のスポットの経時的な増加がみられた。この14個のスポットには、90度の回転で増加した2種類のスポットが含まれていた。また14種類のスポットのうち9種類がタンパク質合成によるもので5種類が修飾または分解によるものと判明した。以上の結果は、ロッキングで植物体を刺激することによって、一度の重力刺激ではわずかしか合成・修飾・分解などの変化を受けないタンパク質が蓄積するものと考えられた。またロッキングで刺激するとタンパク質のリン酸化がみられることも明らかにされた。

シロイヌナズナの重力屈性の突然変異株は、根が示す接触刺激に対する応答も異常であることが知られている。また根が示すもう一つの屈性である屈光性によって誘導されるタンパク質の変化も興味深い。そこでシロイヌナズナに正面から光を当て、光と接触の刺激を同時に与え（光で誘導した接触刺激）、ロッキングで刺激した場合と共通なタンパク質の変化がある否かを二次元ゲル電気泳動法により調べた。光で誘導した接触刺激により12種類のスポットの増加がみられたが、このうち4種類は、ロッキング刺激によって誘導

されたスポットと同じものであった。この結果は、ロッキングの刺激と光で誘導した接触刺激には共通の応答経路があることを示唆している。

さらに、植物を重力や、光で刺激することは、ある種のストレスを与えることとも考えられる。そこで植物にストレスを与えることで知られる、熱ショックとアブシジン酸でシロイヌナズナを刺激し、ロッキングあるいは光で誘導した接触刺激と共通するタンパク質の変化があるかどうかを二次元ゲル電気泳動法により調べた。その結果これらの刺激でもロッキングあるいは、光で誘導した接触刺激と共通する変化のあることが明らかとなった。

上記のごとく本研究によって、シロイヌナズナの根端で異なった刺激による応答反応の遺伝的制御システムが互いに重なり合っていること、すなわち制御のネットワークが存在することが明らかにされた。また、刺激応答に関与すると想定されるタンパク質の存在が明らかにされたことにより、高等植物における刺激応答反応の制御ネットワークを分子のレベルで探究することが可能となった。

論文の審査結果の要旨

高等植物の根の成長の速度や方向は、様々な物理的・化学的刺激によって調節されている。根は、重力や光の方向、土中の石などの傷害物などに鋭敏に反応するが、詳細な機構についてはまだほとんど解明されていない。本論文は、遺伝解析や分子レベルの解析に優れたシロイヌナズナを用いて、根が、種々の物理的刺激に反応する過程で特異的に合成または修飾される蛋白質を調べ、根の屈曲過程におけるそれらの役割を解析し、高等植物における刺激応答の制御機構を分子レベルで理解することを目的とした研究を内容とするものである。

申請者は、従来トウモロコシについて明らかにされている知見を詳細に検討し、それらを踏えて適切な研究計画と新しい方法とを巧みにとり入れて、研究を展開し、下記の成果を納めた。

1. シロイヌナズナの根の重力屈性反応に蛋白質の合成とカルシウム・イオンが必要であることを確認した。
2. シロイヌナズナの根端部組織に重力方向変化の刺激を一定時間間隔で継続的に与えることのできる実験系を工夫し、十数種の蛋白質が誘導されることを二次元ゲル電気泳動法によって明かにした。そのうちの2種の蛋白質は、根の方向を90度曲げることによって一過的に誘導されることから、根が重力屈性を発現する過程に重要な機能を持つことが示唆された。
3. 重力刺激によって誘導される蛋白質の一部は、傷害物に対する接触刺激によっても誘導されることを明らかにした。
4. 熱ショックやアブシジン酸処理によって誘導される蛋白質についても解析し、異なった刺激に対する応答機構のネットワークを明らかにした。

以上のごとく、申請者は本研究によって、シロイヌナズナの根が屈曲性を発現する過程で、刺激応答反応に関与する蛋白分子種を同定し、高等植物の根の屈曲性を分子及び遺伝子レベルの機能に立脚して解析していくための具体的な方途を拓いた。このような成果を内容とする本論文は学位論文として評価しうるものである。