

氏名	木 下 哲
学位（専攻分野）	博士（理学）
学 位 記 番 号	総研大甲第 2 1 6 号
学位授与の日付	平成 8 年 3 月 2 1 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	シロイヌナズナにおける 3 種の液胞プロセッシング酵素 の発現から見た液胞機能のダイナミズム
論文審査委員	主 査 教 授 堀 内 嵩 教 授 西 村 幹 夫 教 授 村 田 紀 夫 教 授 中 村 研 三（名古屋大学）

論文内容の要旨

液胞は高等植物に特徴的なオルガネラで、細胞の90%以上の大きさを占めるほどに発達する。膨圧の維持、代謝産物の蓄積、タンパク質の貯蔵、細胞内成分の分解、生体防御機能を担うタンパク質の蓄積など、実にさまざまな機能を液胞は果たしている。液胞の機能は高等植物のおかれた環境や組織に応じて多様な変動を見せるが、それに依りてその形態も様々に変動する。こうした液胞の機能変換時に、液胞が新たな機能を獲得するためには、新しく合成された液胞タンパク質の前駆体が、液胞へ運ばれ成熟型に変換することが必要である。

液胞における前駆体タンパク質のプロセシングのメカニズムは、これまで主に貯蔵タンパク質を材料として解析がなされてきた。登熟種子中の液胞は葉や茎の栄養組織の液胞とは異なり、タンパク質貯蔵型の液胞として分化している。多くの貯蔵タンパク質の前駆体は、タンパク質貯蔵型の液胞に小胞輸送された後、液胞プロセシング酵素（VPE）によって成熟型へ変換される。しかしながら、登熟種子は植物の生活環から見ればほんの一時期であり、植物を構成している様々な組織の中の一つである。一方、植物を形成する大部分の組織は栄養組織であり、この栄養組織の液胞タンパク質のプロセシング機構については殆ど明らかになっていない。

栄養組織においては、種子から精製したVPEに対する抗体でVPEを検出できないし、そのcDNAを用いたノーザンブロットイングでも、VPEのmRNAは検出されていない。それにも関わらず、栄養組織からはVPEの活性がわずかながら検出されるし、プロセシング部位が貯蔵タンパク質と同様にアスパラギンである液胞タンパク質が栄養組織にも存在する。このことから、種子のVPEと免疫学的に少し異なるアイソザイムが栄養組織の液胞には存在し、VPEが栄養組織の液胞タンパク質のプロセシングにも関与している可能性が示唆されていた。

本論文の前半部ではシロイヌナズナには3種のVPEホモログが存在することを示した。そしてそのすべての遺伝子（ α -VPE, β -VPE, γ -VPE）を単離した後、各遺伝子の構造と器官特異性を解析した。その結果、 β -VPEはこれまでに知られていた種子に特異的なタイプで、 α -VPEと γ -VPEは葉や茎のような栄養器官に特異的に発現する新しいタイプの液胞プロセシング酵素であることが明らかとなった。この結果は、VPEによるプロセシングの機構が、タンパク質貯蔵型の液胞・栄養組織の液胞を問わず、高等植物一般の液胞において機能していることを示しており、植物は組織特異的にVPEアイソザイムを明確に使い分けしていることを強く示唆している（報文1と2）

後半部では、これらの遺伝子が、1) どのような組織で特異的に発現するか、2) 植物のおかれた環境においてどのように発現するかを明らかにするために、それぞれのVPE遺伝子のプロモーターをGUS遺伝子につないだキメラ遺伝子を構築し、シロイヌナズナおよびタバコに導入して、各VPE遺伝子のプロモーターの解析を行った。その結果、 α -VPEプロモーターおよび γ -VPEプロモーターはともに、葉の排水組織、老化している組織、退化する組織での活性が特に顕著であった。また、 γ -VPEプロモーター活性は虫害により誘導されることと、サリチル酸に強く応答することが明らかになった。さらに α -VPEプロモーターはエチレンとサリチル酸に応答することがわかった。

これらの現象は、二つの液胞の機能を表していると考えられる。一つは細胞内成分の分解であり、もう一つは、生体防御機能である。葉が老化するときには細胞内成分が分解されて、成長しつつある若い葉などに栄養素を転流する。VPE遺伝子の発現は、この細胞成分の分解に液胞が関与していることを示唆している。またエチレンやサリチル酸は病害菌が感染したときのシグナル伝達物質であり、これらの処理でVPEプロモーター活性が誘導されてくることは、液胞に蓄えられる一群の防御タンパク質の多くがVPEによってプロセシングを受けることを示唆している。

β -VPEプロモーターは種子以外にも花粉で強く活性を示すことが初めて明らかになった。花粉の液胞は花粉形成時や花粉の発芽時にダイナミックに形態を変えることが知られているが、その液胞がどういった機能を果たしているのかは殆ど知られていない。しかしながら、種子タイプの β -VPEプロモーターが強い活性を持っていることより、花粉の液胞は、葉などの栄養組織の液胞と考えるよりむしろ種子に見られる貯蔵型の液胞に似た機能を有しており、花粉管の伸長に必要なアミノ源としてタンパク質を蓄えている可能性が考えられる。

以上のように本研究では、シロイヌナズナの3種のVPE遺伝子を単離解析することで、各々の液胞の持つ役割や、液胞が積極的に働いている組織が浮かび上がってきた。また花粉の液胞の様に、今までに知られていなかった液胞の機能を知る手がかりを得ることとなった。

審査結果の要旨

液胞におけるプロセシングのメカニズムは、主に登熟種子中の貯蔵タンパク質を材料として解析がなされてきている。これまでの解析で、様々な貯蔵タンパク質の前駆体は、液胞プロセシング酵素（VPE）により成熟型へと変換されることが明らかとなっている。一方、植物組織の大部分を占める葉や茎といった栄養組織の液胞におけるプロセシングのメカニズムは殆ど明らかになっていない。申請者の木下 哲は、シロイヌナズナから3種類のVPE遺伝子を初めて単離し、これらの遺伝子発現を形質転換植物を用いて解析し以下の知見を得た。

(1) シロイヌナズナの3種類のVPE遺伝子（ α -VPE, β -VPE, γ -VPE）は、器官特異的に発現が制御されていること、すなわち、 β -VPEは種子において発現しており、 α -VPEと γ -VPEは栄養組織において発現していることを明らかにした。この結果は、貯蔵タンパク質をプロセシングしている種子タイプの β -VPE以外に、栄養組織に α -VPEと γ -VPE遺伝子が存在することを初めて明らかにしたもので、栄養組織においても登熟種子で明らかとなったプロセシングの機構が働いていることを示唆するものである。

(2) それぞれの遺伝子のプロモーターを β -glucuronidase (GUS)につなぎ、シロイヌナズナとタバコに導入し、発現する組織及び発現に関する環境要因を詳細に解析した。その結果、i) 老化や退化する組織で α -VPEと γ -VPE遺伝子が強く発現すること、ii) エチレン処理により α -VPE遺伝子が発現誘導されること、iii) サリチル酸処理により α -VPEと γ -VPE遺伝子が発現誘導されることを明らかにした。組織の老化や退化時には、液胞へ様々な加水分解酵素が運ばれること、また病原菌が感染すると、サリチル酸がシグナルとなり液胞へ一群の防御タンパク質が蓄えられることから、VPE遺伝子の発現とこれらの液胞タンパク質の発現する時期や組織が一致していることが示唆された。

(3) VPEの発現の顕著な組織では、液胞に多くのタンパク質が送られており、VPEの発現が顕著な組織では、液胞が重要な役割を果たしているとの観点から、さらに解析を加えた。その結果、i) 種子タイプの β -VPEが発現している花粉の液胞には、貯蔵タンパク質を蓄える機能があること、ii) 葉の排水組織、胚軸と根の境目などの組織ではVPEが強く発現することから、これらの組織では、液胞が積極的な役割を果たしていることが類推された。これらの結果は植物における新たな液胞機能の動態を明らかにしていく上で貴重な成果と考えられる。

以上の様に本論文は、液胞タンパク質のプロセシング機構が、機能及び形態の異なる液胞全般に存在していることを明らかにしたもので、十分に学位論文にふさわしいものと判断された。なお、これらの成果の一部はPlant Mol.Biol.誌、及びPlant Cell Physiol.誌に掲載されている。

また、申請者による研究成果の説明を25分間行った後、博士論文を中心に、その関係する分野に関する知職について、口述形式による試験を行った。その結果申請者はすべての質問に対し満足すべき解答を与えたので、申請者の持つ研究能力及び学力は課程修了及び学位取得の要件を満たすものと判定された。また、英語については、これまで論文2編が国際誌に発表されていることを考えあわせて、博士の学位に足る十分な能力を有していると判定した。