

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 植物小胞体膜アクアポリンの分子生理学的機能の解明

氏名 佐藤 良介

## 論文内容の要旨

植物は大きなアクアポリンファミリーを保持している。アクアポリンは次の4つのサブファミリー、細胞膜内在性タンパク質 (PIP)、液胞膜内在性タンパク質 (TIP)、nodulin 26 様膜内在性タンパク質 (NIP)、低分子型塩基性膜内在性タンパク質 (SIP) に分けられる。特定の植物、例えばヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) あるいはナス科植物 (*Solanaceae family*) は、上記4種に加えて新規の膜内在性タンパク質 (XIP) サブファミリーを含む。実験対象としたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は35種のアクアポリン分子種が含まれる (PIP 13種、TIP 10種、NIP 9種、SIP 3種)。これらのアクアポリンは、細胞特異性、基質特異性、環境応答性において、それぞれ特徴をもっている。なかでも PIP および TIP の複数の分子種は、植物の中での水分バランス調節に必須であることが実験的に示されている。特定のアクアポリンは、水以外の中性な低分子、たとえばグリセロール、二酸化炭素、アンモニア、ケイ酸、ホウ酸、過酸化水素、あるいは毒性物質の亜ヒ酸を輸送する。

研究対象とする SIP サブファミリーは、ゲノムが解読されたすべての植物に遺伝子が同定されており、このことは SIP 遺伝子およびタンパク質が植物の進化の過程で必須要素として保存されてきたことを示唆している。しかし、SIP の輸送基質も生理学的な役割も解明されていない。シロイヌナズナの3種の SIP はいずれも ER 膜に局在し、酵母異種発現系を用いた実験により、SIP2;1 を除いて SIP1;1 と SIP1;2 は水透過性をもつことが報告されている。また、ブドウ (*Vitis vinifera* L.) の SIP1 が ER 膜に局在し、水透過機能をもつことが報告された。一方、哺乳動物のアクアポリン-11 (AQP11) が植物の SIP のオルソログに相当すると推定されている。AQP11 は動物細胞の ER 膜に局在し、アクアポリン共通の2箇所の Asn-Pro-Ala (NPA) モチーフの代わりに、前半部分では Asn-Pro-Cys (NPC) モチーフをもち、この点は、シロイヌナズナの SIP でも NPA モチーフとは異なる配列となっている (SIP1;1, NPT、

SIP1;2, NPC、SIP2;1, NPL)。AQP1においては、この NPC モチーフがその分子の機能発現には必須であることが実験的に証明されている。

そこで本研究では、植物体内で多様な機能を持つ小胞体に局在する SIP がどのように小胞体の機能に寄与しているのかを明らかにするため、SIP の発現組織の小胞体膜に焦点をおき、SIP の生理的役割とその機能に着目した研究に着手することとした。第二章では、3 種の SIP ホモログそれぞれの T-DNA 挿入変異株を調製し、栄養成長期における影響を解析した。これまで 3 種の遺伝子全ての変異体は用意していなかったため、本研究により SIP の欠損による変化を体系的に調べることができた。各 *sip* 株での通常生育では目に見える表現型は得られなかった。新鮮重や水分含量に影響がなかったことから、水輸送能を持つ SIP1;1 や SIP1;2 が植物体の水分状態に顕著な影響を与えないことが分かった。次に、実生の胚軸において *sip2;1* の欠損株を観察し、細胞内の小胞体ボディ (ER body) の形状が短くなり、数が増えるなどの異常が見られた。また複数の小胞体ストレス応答遺伝子の発現レベルも上昇した。一方で、植物体の表現型に差異は見られなかった。これは SIP2;1 が ER body の形成に必要なタンパク質であるためか、もしくは副次的な原因で ER body の形成 (伸長) を妨げられたために短くなった可能性もある。前者に関しては、ER body 関連遺伝子変異体との掛け合わせによって明らかにできるのではないかと考えられる。後者に関しては、SIP2;1 が欠損することでストレスが生じ、これが要因となり形態形成が不完全になった可能性がある。つまり小胞体内で目的の物質を細胞質へ排出することで維持していた機構が乱れて、本来問題なく処理できることが不可能になったのではないかと推定した。しかし、ER body にこのような変化が見られたが、植物の生育には致命的な影響がなかった。このことから、栄養成長においては SIP2;1 が欠損しても小胞体の機能は十分に働く、もしくは小胞体の機能の一部として働いている、または SIP2;1 の欠失を補う分子あるいは機構があるものと推定される。

第三章では、生殖成長期に焦点を当て遺伝子変異による影響がないか否かを検証した。栄養成長期では植物体の形態に目立った変化は見られなかったが、*sip2;1* では生殖成長期において莢の形成および種子の生産数に異常が見られた。そのため、受精に着目し研究を進めたところ、花粉に異常が生じていることが判明した。具体的には、変異株由来の花粉の発芽、花粉管伸長の低下などが明らかとなった。これらにより、受粉した花粉の発芽の低下、さらに発芽した花粉管が胚珠まで到達できずに受精が完結せず種子の形成異常につながったと推定した。一方で、*sip1;1*、*sip1;2* 株では異常を示さなかった。*sip2;1* 株の根の細胞内の小胞体の形態変化や花粉の異常から、異常が生じている部位における小胞体関連遺伝子の発現解析を行った。まず根において、小胞体ストレス応答を誘引する薬剤 dithiothreitol (DTT) を処理し、その影響を関連遺伝子の mRNA レベルで解析した。結果、*sip2;1* 株では、小胞体ストレス応答時の転写因子である *bZIP60* や酸化還元酵素である *ERO1* などの発現が野生株に比べ有意に上昇した。さらに、分子シャペロンである *BiP3* の発現レベルが顕著に上昇した。この *BiP3* は小胞体ストレスに応答して特異的に応答するタンパク質であり、*sip2;1* 株

では DTT による小胞体ストレスに対して過剰に応答したことが考えられた。また興味深いことに、ストレス処理なしの生育状態においても、*sip2;1* 株では野生株に比べ *BiP3* の発現レベルが有意に増加した。また花粉についても同様の解析をしたところ、*sip2;1* 株のみ野生株に比べ有意に *BiP3* の発現レベルが増加した。これらの結果から *SIP2;1* が欠損することによって小胞体内でストレスが生じている、もしくは常に生じているストレスに対する適応的な応答機構が機能しなくなり、ストレス応答遺伝子の発現が上昇したと推定した。

今回の研究における大きな発見は、*SIP2;1* 欠失における表現型を得られたことにある。これまでにも *SIP2;1* の欠損株を用いた研究はされていたが明瞭な結果は得られていなかった。しかし、本研究により花粉という特定の組織での *SIP2;1* の機能を解明するところまでたどり着くことができた。花粉における結果は、*SIP2;1* の植物における生理的役割の解明に新たな手掛かりを与えるものと考えられる。*SIP2;1* が小胞体内の環境を正常に保つ役割を担っていることが示唆され、この機能が滞ることで小胞体ストレスが誘導されたと解釈できる。その結果、花粉では花粉の発芽、花粉管の伸長が低下を招いた。花粉管では、タンパク質の分泌や脂質の生合成など、急速に稼働するため、何も処理をしなくてもストレスが生じている。ここにストレスに関わるであろう *SIP2;1* が欠損することで小胞体の機能が低下し、上記のような結果をもたらしたと考える。

そこで問題となってくるのが、*SIP2;1* が小胞体膜で何を輸送することで小胞体ストレスを軽減しているのかという点である。ここで *SIP2;1* が欠損した際に発現上昇した *BiP3* に着目して考察したい。*BiP3* はタンパク質のリフォールディングに関わるタンパク質であり、小胞体ストレスが生じた際のセンサーでもある。つまり小胞体内にはミスフォールドされたタンパク質やフォールディングされていないタンパク質が存在しており、それをリフォールドさせるために多くの分子シャペロンが働くと考えられる。その過程では、酸化還元的にタンパク質の折り畳みを行う *PDI* や *ERO* が注目される。これらの遺伝子も ER ストレス条件で発現が上昇し、翻訳産物が機能する。これらの *PDI* や *ERO* が機能すると、その副産物として過酸化水素が発生する。この過酸化水素が過剰に発生すれば、それは小胞体内で毒性を示すと推測される。動物では小胞体内で生じた過酸化水素は小胞体内のグルタチオンやペルオキシダーゼにより代謝分解されることが報告されている。一方で植物においては、小胞体内におけるタンパク質の折り畳みにより活性する過酸化水素の代謝経路は明らかとなっていない。植物では、*SIP2;1* がタンパク質の折り畳み反応で発生した過酸化水素を小胞体から細胞質に排出しているのではないかと推測する。またこれを支持するように、*SIP2;1* は根の中心柱や胚軸などの細胞が活発に活動する場所で強く発現していることから、許容しきれない過酸化水素を小胞体から輸送するために局在しているのではないかと考える。これらの推測を解明するために、*SIP2;1* の輸送基質を特定することは今後の大きな課題である。