

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 佐藤 良介

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

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	前島正義
委員	名古屋大学教授	小俣達男
委員	名古屋大学教授	榊原均
委員	名古屋大学准教授	石黒澄衛
委員	名古屋大学助教	中西洋一
委員	名古屋大学助教	河内美樹
委員	名古屋大学助教	瀬上紹嗣
委員	名古屋大学助教	田中奈月

## 論文審査の結果の要旨

佐藤良介は、シロイヌナズナを対象として、植物小胞体膜に局在するアクアポリンである SIP (small and basic membrane intrinsic protein、塩基性低分子型) に注目し、それらの遺伝子欠失株 (*sip1;1*、*sip1;2*、*sip2;1* 株) が示す表現型を解析することで、小胞体膜アクアポリンの生理学的役割を明らかにすることを目的とした。3種の SIP 分子種の中で、SIP1;1 と SIP1;2 は水チャネル活性をもつが、SIP2;1 は水チャネル活性が無く輸送基質が明らかになっていない。佐藤は、SIP 3分子種の遺伝子欠失株を調製し、生育・形態・ストレス耐性など、表現型の有無をさまざまな角度から検討した。栄養成長期においては、いずれの器官・組織においても特徴的な表現型は検出できなかった。そこで、生殖成長期に視点を移し、花と莢を解析し、とくに *sip2;1* 変異株において明瞭な変化を見出だした。すなわち、*sip2;1* 株では、莢の中で結実している種子数が顕著に少ないことを見出だした。その原因が *sip2;1* 株由来の花粉の発芽率と花粉管伸長の不全にあることを発見した。本研究は、アクアポリンの研究に携わる世界の研究者が長年課題としてきた小胞体膜アクアポリンの生理的役割を明らかにした点に大きな意義がある。以下、研究の開始時点での状況を述べ、佐藤の研究の概要を項目に分けて説明し、論文審査の結果を述べる。

アクアポリンは動植物微生物に広く分布する普遍的タンパク質の一種であり、植物では、大きくは細胞膜型 (PIP)、液胞膜型 (TIP)、NOD26 型 (NIP)、塩基性低分子型 (SIP) の4サブファミリーに分けることができる。このほかに XIP 型などもある。PIP と TIP の局在はその名の通りの局在性を示し、NIP は主として細胞膜に局在する。一方、SIP は小胞体膜に局在する点が特徴である。植物アクアポリンでは、PIP と TIP を中心に研究が進み、これらが植物体内での水の流れと水分バランスを維持するために不可欠な役割を果たしていることが明らかとなった。研究の進展にともない、水を優先して輸送する分子種のほかに、尿素、二酸化炭素、グリセロール、アンモニア、ホウ酸、乳酸等の基質を輸送する分子種が存在し、生理機能の多様性に関する知見も増えている。多数の分子種について、発現細胞、細胞内局在、輸送基質、遺伝子発現特性などが解明されているが、佐藤は、輸送基質も生理的機能も不明な SIP に注目した。アクアポリンは、生物界を超えて共通して NPA モチーフ (水分子を識別する Asn-Pro-Ala 配列) を2つ保持している。SIP 分子種では、このうちの前半にある NPA モチーフが NPT (SIP1;1)、NPC (SIP1;2)、NPL (SIP2;1) に変化している。このことが輸送基質の選択性にも関わると考えられている。

佐藤は、生理機能の解析手段として、3種の SIP について、それぞれ T-DNA 挿入遺伝子破壊株のホモライン (ホモ接合体) を調製した。3種の遺伝子欠失株を対象に、発芽から栄養成長後期までの生育段階毎に、形態、新鮮重や水分含量を分析した。通常生育条件のほかに、高塩濃度下、乾燥条件など特異な条件も含めて解析したが、野生株との顕著な差異は認められなかった。したがって、水輸送能のある SIP1;1 や

SIP1;2 であっても、植物体の水分状態に顕著な影響を及ぼすわけではないと結論した。

次に、3種の遺伝子欠失株を対象に生殖成長期での表現型解析を進めた。そして、*sip2;1*株においては莢が有意に小さく、莢の中の種子の結実数が減少していることを見出だした。とくに莢の基部領域（柱頭からもっとも離れた領域）での結実が不十分であった。そこで、花粉と胚珠のいずれにその原因があるかを検討するため、野生株と変異株を交配し、それぞれの果実を解析した。この表現型が生ずるのは、*sip2;1*の花粉を用いた場合にのみであり、花粉に原因があることを突き止めた。Sip2;1由来の花粉の発芽率を分析すると、有意に低下していた。さらに *in vitro* 条件での実験において、花粉管の伸長度が野生株の花粉よりも著しく短く、雌蕊での花粉管伸長の解析結果においても十分に伸長していないことが明確であった。すなわち、生殖成長期において、柱頭に付着した *sip2;1* 由来の花粉は、発芽率が低く、発芽しても花粉管が雌蕊の底部にある胚珠にまで伸びず、その結果として莢における結実数が減少する、と結論した。

この表現型が SIP2;1 に起因することを裏付けるためには、SIP2;1 タンパク質が花粉および花粉管に発現していることを証明する必要がある。佐藤は、二量体化しない特性をもつ変形緑色蛍光タンパク質 mGFP を連結した SIP2;1 を、*SIP2;1* の自己プロモーター制御下で発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、mGFP-SIP2;1 が花粉および伸長中の花粉管細胞に発現し、かつ小胞体膜上に明瞭な蛍光シグナルとして局在していることを明らかにした。このことは、SIP2;1 の生理機能を花粉および花粉管の小胞体膜において考察すべきことを意味している。

上述の解析結果から、*sip2;1* 株では小胞体に何らかの異常が生じていると推測し、根に注目し、人為的に小胞体ストレスを引き起こす薬剤ジチオスレイトール (DTT) が小胞体ストレス関連遺伝子の発現に影響するか否かを解析した。根は SIP2;1 を発現し、DTT 処理の影響を直接受ける器官として解析結果を理解しやすい。野生株の根に比して、*sip2;1* 株の根では、小胞体ストレス応答に関与する転写因子 bZIP60、同じく小胞体ストレス応答に関与する酸化還元酵素である ER01 等の発現が有意に上昇した。さらに、小胞体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特異的に応答する分子であり、小胞体内でのタンパク質のリフォールディングに関わる。BiP3 の極めて高い発現は、*sip2;1* 由来の花粉においても観察され、*sip2;1* に SIP2;1 を導入した相補株由来の花粉では、野生株由来の花粉と同様のレベルに低下していた。さらに、通常の生育環境においても、野生株由来の花粉における BiP3 の発現レベルが同じ株の根のレベルの数十倍となっていることを見出だした。佐藤は、これらの結果から、とくに花粉は小胞体ストレスに常時さらされており、*sip2;1* 株の花粉では小胞体ストレスがさらに際立って高いと推測し、SIP2;1 分子

はこうした小胞体ストレスを軽減する役割を担っていると結論づけた。つまり、小胞体ストレスの基本レベルが高い花粉および花粉管では、ストレス下で生ずる分子を小胞体から放出する機能をもっている可能性を示唆した。大きな可能性として、タンパク質のリフォールディングの過程で生ずる過酸化水素等の活性酸素種を小胞体から細胞質側に排出する役割を推測した。

本研究における大きな発見は、*SIP2;1* 欠失における表現型を見出だしたことにあ  
る。これまでも *SIP2;1* の欠損株を用いた実験は展開されていたが、明瞭な表現型は確  
認されていなかった。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、植物における  
*SIP2;1* の普遍的役割の解明に新たな手掛かりを与えるものとする。 *SIP2;1* がストレ  
スを受けやすい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、  
*sip2;1* 株ではこの機能が欠落することで小胞体ストレスがより強く現れたと解釈で  
きる。その結果、花粉の発芽および花粉管の伸長が低下した。花粉管では、タンパク  
質の分泌や脂質の生合成など、急速に代謝系が稼働するため、人為的な処理をしなく  
てもストレスが生じている。 *SIP2;1* が欠損することで小胞体の機能が著しく低下し、  
上記に述べた表現型をもたらしたと考える。

以上のように佐藤良介は、世界の研究者が研究課題としてきた小胞体膜局在アクア  
ポリの生理機能を解明する大きな突破口を開いた。花粉および花粉管の機能不全は、  
受精、種子形成に直結し、作物生産上も重要である。特異なアクアポリン **SIP** の全て  
の分子種を解析できたわけではないが、本研究により、**SIP2;1** と小胞体ストレスの関  
係が明確となり、輸送基質が推定された。これらの研究成果により、生化学および植  
物分子生理学における貢献度のきわめて高い、新規な知見を提供した。本審査委員  
会は本論文の内容が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、  
合格と判定した。