

植物小胞体膜アクアポリンの分子生理学的機能の解明

名古屋大学大学院生命農学研究科

生物機構・機能科学専攻

バイオダイナミクス講座

細胞ダイナミクス研究分野

佐藤 良介

2019年4月

目 次

略語表	・・・4
情報検索サイト	・・・5
第一章 序論	
第1節 はじめに	・・・6
第2節 植物アクアポリン	・・・7
第3節 Small and basic intrinsic protein(SIP)分子種	・・・11
第4節 本論文の構成	・・・15
第二章 SIP 遺伝子欠損株は栄養成長期において顕著な表現型を示さない	
第1節 緒言	・・・17
第2節 材料及び方法	・・・17
第3節 結果	・・・21
第4節 考察	・・・23
第三章 小胞体膜局在のシロイヌナズナ SIP2;1 は花粉の発芽、花粉管伸長に關与する	
第1節 緒言	・・・24
第2節 材料及び方法	・・・25
第3節 結果	・・・29
第4節 考察	・・・32
第四章 小胞体における SIP 分子種の役割の探索	
第1節 緒言	・・・33
第2節 材料及び方法	・・・34
第3節 結果	・・・34
第4節 考察	・・・37
第五章 総合考察	・・・40
引用文献	・・・45

実験結果の図表	・・・55
謝辞	・・・96
報文目録	・・・97

略語表

APMSF	(<i>p</i> -amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride hydrochloride
AQP	aquaporin
cDNA	complimentary DNA
Col-0	Colombia-0
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycol bis(2-aminoethylether) tetraacetic acid
ER	endoplasmic reticulum
MES	2-(<i>N</i> -morpholino) ethanesulfonic acid
MIP	major intrinsic protein
mGFP	monomer green fluorescent protein
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige and Skoog
NIP	Nodulin26-like intrinsic protein
NOD26	nodule peribacteroid membrane aquaporin
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PIP	plasma membrane intrinsic protein
PPM	plant preservative mixture
PVDF	polyvinylidene difluoride
PVP	polyvinylpyrrolidone
ROS	reactive oxygen species
SIP	small and basic intrinsic protein
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris buffered saline
T-DNA	transfer-DNA
TIP	tonoplast intrinsic protein
TM	transmembrane domein
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
XIP	unexpected(X) intrinsic protein

情報検索サイト

シロイヌナズナゲノム配列情報

The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>)

シロイヌナズナマイクロアレイデータベース

Arabidopsis eFP Browser (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

系統樹及びアライメント作製ツール

ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)

タンパク質の立体構造情報

RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>)

タンパク質の推定構造モデリング

LOMETS (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS/>)

Salk T-DNA 挿入株情報

SIGnAL (<http://signal.salk.edu/>)

第一章 序論

第1節 はじめに

植物の大部分は独立栄養生物であり、生存する上では光や水そして無機栄養塩などを必要とする。しかし、植物は固着性であるため、周囲の土壌からこれらを効率的に吸収しなければならない。この機能は主に根系によって果たされる。根は利用可能な栄養を土壌から吸収する。さらに植物は土壌や大気中の環境変化による厳しい状況に適応する短期的な回避戦略を獲得してきた。これらのストレスには、水の不足または過剰（干ばつ、洪水による冠水）などの非生物学的ストレス、あるいは土壌中のさまざまな有毒な無機・有機化合物が含まれる。極端に高いあるいは低い温度、強い光あるいは長期間の暗黒、また光照射量の変化も植物にとって厳しいストレスとなり、とくに地上部では影響が出やすい。さらに、植物は草食動物やウイルス、バクテリア、昆虫または真菌を含む病原体によって絶え間なく危険にさらされている。このように、植物は絶えず変化する非生物学的および生物的環境に適応するために遺伝子発現、代謝機能の調節、防御物質の生産、生育調整などを行っている (Maurel *et al.* 2015)。

植物にとって水は重要な役割をもつ。葉では光合成反応のために大気中の二酸化炭素を吸収し、化学反応により水分子から酸素・水素イオン・電子を生成して光合成初発反応を進める。またこの時に水の蒸散も行っている。光合成における二酸化炭素、酸素の交換および水の蒸散は、植物の地上部の表皮にある気孔で行われ、厳密に制御されている。蒸散は、根から吸収した水分が通道組織を經由し気孔へ送られる過程を経る。蒸散は水を体外に排出するためだけでなく根から地上部の組織に水や栄養成分を輸送・供給することに関わっている。これには、細胞内、細胞間における水の高速度輸送が必要となる。これらの流れの速度や方向を制御することは、植物全体の水の状態・バランスを維持するためにとくに重要である。細胞レベルで考えると、植物は細胞壁の存在により急激な水の流入による膨圧などにも耐え形態を維持する機構になっている。加えて、植物の成長および発達、分裂組織における細胞分裂、それに続く細胞の肥大成長によって成り立っており、細胞内膨圧は細胞肥大の原動力となる。したがって、植物の代謝活性や成長および発達は、植物体内の水分状態と密接に関わっている。

水と植物の成長の関係を解明するために多様な研究がされており、1990年代初頭に

植物における水チャネルタンパク質が同定された (Maurel *et al.* 1993、Maurel 1997)。発見当初には水輸送活性が確認されていなかったが、後に水チャネルであることが判明した種子内のタンパク質顆粒の膜タンパク質や (Johnson *et al.* 1990)、液胞膜内在性タンパク質 VM23 (Maeshima 1992) も並行して研究が進展していた。Agre らの赤血球膜のアクアポリンの発見 (Preston *et al.* 1992) に引き続いて発表された、植物でのアクアポリンの発見は衝撃的であり、植物の水輸送に関する研究展開に明確な勢いを与えた。これらのアクアポリンの初期研究は、植物における膜輸送システムの分子特性の解明に寄与するとともに、植物組織あるいは細胞の水利用に関わる分子基盤の研究に取り組むための新しい枠組みをもたらした。アクアポリンの発見から 20 年後、植物アクアポリンは、水を輸送するだけでなく、二酸化炭素などのガス、栄養成分 [ホウ素 (B)、ケイ素 (Si)]、また活性酸素種 (ROS) などを輸送する多機能タンパク質として認識されるようになった (Hanba *et al.* 2004、Heckwolf *et al.* 2011、Takano *et al.* 2006、Ma *et al.* 2006、Dynowski *et al.* 2008)。アクアポリン研究は、膜分子生物物理学から細胞生物学およびシグナル伝達まで、植物学の多様な分野に広がっている。多面的な理解が進んだ結果、アクアポリンの機能は、植物成長および非生物学的ストレスに対して広く関わりと考えられるようになった。

本章では植物における多様なアクアポリンについて、個々の機能から植物組織におけるそれらの重要性と機能的特徴について述べる。

第 2 節 植物アクアポリン

アクアポリンの発見と研究の展開

細胞膜を介した水分子の移動は生物において必要不可欠の事象である。過去の長い期間、水は生体膜リン脂質二重層を拡散により自由に行き来することが可能であり、水の量的調節はこれで十分であるとされていたが、一方で、腎臓や赤血球膜、また植物液胞膜での水透過性が極めて高いことから、この水の透過には水分子を特異的に輸送する分子が存在すると推測されていた (Verkman 1989)。その分子実体が解明されたのは 1992 年である。Preston らは、哺乳類の腎近位尿細管膜や赤血球膜に高発現している 28 kDa のタンパク質 (CHIP28) が水透過能を持つことを発見し、この分子をアクアポリンと命名した (Preston *et al.* 1992)。その後、アクアポリンは哺乳類から植物 (Maurel *et al.* 1993)、微生物 (Calamita *et al.* 1995)、昆虫 (Le Caherec *et al.* 1996) 等と次々に同定され、アクアポリンが生物にとって必須の分子であると認識された。また、アク

アポリンはエネルギーを利用して水を能動輸送するのではなく、浸透圧差などによる受動的な水輸送を担うことも基本的な特性として理解された。アクアポリン 1 分子は浸透圧差によって最大毎秒 10 億分子以上の水分子を膜内外の両方向に輸送可能である (Zeidel *et al.* 1992)。

アクアポリン分子の構造的特徴

アクアポリンの分子構造からこの水の高速輸送を述べる。アクアポリン分子構造は主に動物または微生物のホモログで研究されているが、植物アクアポリンから重要な構造的特徴が見い出された。すなわち、低温電子顕微鏡を用いた研究から、アクアポリンが四量体として構成されていることが確認された (Daniels *et al.* 1999、Kukulski *et al.* 2005)。アクアポリンは、MIP (major membrane intrinsic protein) ファミリーに含まれる。MIP は生体膜における水および栄養塩の透過を促進し、細菌から植物、動物まで幅広く分布している (Maeshima 2001、Verma *et al.* 2015、Maurel *et al.* 2015)。MIP ホモログは、全体的な配列保存性 (~25%) は高くはないが、中でも 6 つの膜貫通ドメイン (TM1-TM6) と 2 つのハーフヘリックスに存在するアスパラギン (Asn) - プロリン (Pro) -アラニン (Ala) モチーフ (NPA モチーフ) は極めて高い保存性がある (Fig. 1)。アクアポリンには 6 つの膜貫通ドメインをつなぐ 5 つのループ (A-E) が存在するが、そのうちループ B (LB) とループ E (LE) はそれぞれハーフヘリックスを形成し、この 2 つのハーフヘリックスのそれぞれの内側で NPA モチーフは向かい合う形で配置され、直径 3 Å の孔を形成する。この孔は直径 2.8 Å (短径) の水分子を透過することが可能である。水分子の透過には、NPA モチーフの Asn 残基と水分子の水素結合が重要であり、水分子同士の水素結合を切断する。これは、プロトン (H⁺) を輸送せず、水分子のみを輸送する基質選択性としても大きな意味をもつ。この NPA モチーフ部位を通過した後、再び水分子同士が水素結合を形成することで、水分子は連続した紐のようにして孔を移動し、最終的に膜の反対側に出る。また NPA モチーフの細胞外側 8 Å 程度のあたりに基質選択領域と呼ばれる ar/R 領域 (aromatic/arginine 領域) が存在し、この領域は 4 つのアミノ酸で構成される。例えば、ヒトのアクアポリン AQP1 では Phe58 (TM2 中のアミノ酸残基)、His182 (TM5)、Cys191 (LE)、Arg197 (LE) で構成され、Phe58 と His182 が隣接することで 2.8 Å の孔を形成する。His182、Cys191、Arg197 の 3 残基が水分子との水素結合をすることで透過が円滑に行われるとされている (Sui *et al.* 2001)。塩基性の His182 は H⁺ を静電的に排斥する機能も果たしている。このような NPA モチーフの特徴的なアミノ酸構成と、ar/R 領域により、適切な基質の

選択性と水の高速輸送が可能となっている。

植物アクアポリンの多様な分子種

全ゲノム配列が決定された植物種の数が増え、現在、アクアポリン遺伝子は草本植物（シロイヌナズナ、トウモロコシ、イネ、ダイズ、トマトおよびワタなど）から木本植物（ポプラなど）においても広く報告されている（Chaumont *et al.* 2001、Johanson *et al.* 2001、Quigley *et al.* 2001、Sakurai *et al.* 2005、Gupta and Sankaramakrishnan 2009、Park *et al.* 2010、Reuscher *et al.* 2013、Zhang *et al.* 2013）。小麦（Forrest *et al.* 2008）やブドウ（Shelden *et al.* 2009）においてもアクアポリン遺伝子およびそれらの生理機能の研究が進展している。

これらの研究により、高等植物におけるアクアポリン分子種の多様性が明らかになった。高等植物においては、アクアポリンは5つのサブファミリーに分類される。これらのうちの3種、PIP（Plasma membrane intrinsic protein）、TIP（Tonoplast intrinsic protein）、NIP（Nodulin 26-like intrinsic protein）は、タンパク質の局在および機能についてよく研究されている。さらに2つのサブファミリー、SIP（Small and basic intrinsic protein）（Johanson and Gustavsson 2002、Ishikawa *et al.* 2005、Maeshima and Ishikawa 2008）およびXIP（uncategorized (X) intrinsic protein）（Danielson and Johanson 2008）についても明らかとなりつつある。またゲノム研究から、藻類または初期陸生植物種におけるアクアポリンファミリーの知見が報告されている（Anderberg *et al.* 2011、Anderberg *et al.* 2012、Danielson *et al.* 2008）。種子植物においては、ヒメツリガネゴケはさらに2つのサブファミリー、HIP（Hibrid intrinsic protein）およびGIP（Glpf-like intrinsic prtotein）を有し、イヌカタヒバはPIP、TIP、NIP、SIPおよびXIPに加えてHIPを有する（Anderberg *et al.* 2012、Danielson *et al.* 2008）。このように植物アクアポリンの分子種は多様性に富む。GIPを除くすべての植物のMIPサブファミリーはアクアポリンに属する（Abascal *et al.* 2014）。一方、動物と細菌のMIPはアクアポリンとアクアグリセロポリンに分類される。アクアポリンの総分子種の数を見ると、シロイヌナズナには35種類、トウモロコシでは31種類、イネでは33種類、ポプラでは55種類のアクアポリンが同定されている（Chaumont *et al.* 2001、Johanson *et al.* 2001、Sakurai *et al.* 2005、Maurel *et al.* 2015）。また、本研究で対象とするシロイヌナズナのアクアポリンはPIP（13種）、TIP（10種）、NIP（9種）、SIP（3種）の4つのサブファミリーに分類される（Fig. 2）。

植物アクアポリンの進化は系統発生解析から解かれており、GIPは祖先の細菌遺伝子

からの遺伝子の水平伝播によって生じた可能性があり (Gustavsson *et al.* 2005)、PIP と共に藻類から陸生植物へと伝播されてきた。一方で XIP と SIP は藻類などの植物由来であるが、他のサブファミリー (HIP、TIP) はおそらく PIP の祖先から陸上植物の進化の間に派生したと考えられる。ただし、XIP、HIP、および GIP は、機能的冗長性を示すため、特定の植物種において、その進化の過程で失われた可能性がある (Maurel *et al.* 2015)。

植物アクアポリンの分子進化および遺伝子発現は、外的環境などと関連が深いと想定される。特に、イネ栽培品種間またはシロイヌナズナにおけるアクアポリン遺伝子発現の変化は、通常または水ストレス条件下で存在することが明らかとなった (Alexandersson *et al.* 2010、Lian *et al.* 2006、Sutka *et al.* 2011)。イネ栽培品種では、アクアポリン遺伝子の発現調節の違いが水分欠乏に対する異なる適応メカニズムの根底にあると考えられている (Lian *et al.* 2006)。植物アクアポリンの発現および機能の環境による変動は、個々の分子種の機能を探索するための有用な手段である。例えば、ゲノムワイドな研究では、イネの粒幅に対して OsTIP3; 1 の寄与が示唆され (Huang *et al.* 2012)、または特定の生息地における野生のシロイヌナズナの適応に AtTIP2; 1 の役割が必要であることが示された (Fournier-Level *et al.* 2011)。

植物アクアポリンの分子機能解析

次に植物アクアポリンの分子機能について述べる。植物アクアポリンの基質を同定するには、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験手法が最初の方法であった (Kammerloher *et al.* 1994、Maurel *et al.* 1993)。この卵母細胞は巨大で相補的 RNA の細胞内マイクロインジェクションを行いやすく、細胞体積、細胞内 pH、または放射性標識分子の含有量の測定に基づく簡単な輸送解析を可能にした。これまでに卵母細胞系を用いた実験により、水およびグリセロール、尿素、ホウ素やケイ素、さらには二酸化炭素、アンモニアなどの多くの基質がアクアポリンによって輸送されることが明らかになった。卵母細胞系は現在も頻繁に使用されているが、いくつかの欠点がある。液胞膜アクアポリン TIP などのいくつかの細胞内オルガネラに局在するアクアポリンは一部が細胞膜に局在し機能測定が可能であるが、他のいくつかの植物アクアポリン (PIP1、SIP) は機能的発現には至っていない。

卵母細胞とは別に酵母細胞を用いた発現解析系もあり、この系も植物アクアポリンの機能解析によく使用されている。酵母に導入したアクアポリンを用いた生育試験を行うことで、アクアポリン基質を判定することが可能である。酵母による機能解析により、

二酸化炭素 (Otto *et al.* 2010)、過酸化水素のような活性酸素種 (Bienert *et al.* 2007)、アンモニア (Bertl and Kaldenhoff 2007)、そして亜セレン酸塩 (Zhao *et al.* 2010) がアクアポリンの基質として明らかとなった。

これまでに明らかとなったシロイヌナズナアクアポリンの機能及び基質を表にまとめた (Table 1)。アクアポリンは全体として、さまざまな基質輸送能を持つ多機能チャネルであることわかる。PIP の場合は水、二酸化炭素、過酸化水素、TIP の場合は水、過酸化水素、アンモニアなどの基質を輸送する。また NIP は、より多機能で水、ヒ素、過酸化水素、硝酸、ホウ素、尿素、グリセロールを輸送し、植物において必要な栄養を輸送している。またシロイヌナズナでは保存されていない XIP は、水、ホウ素やケイ素および活性酸素種を透過する多機能チャネルである (Bienert *et al.* 2011、Lopez *et al.* 2012)。一方で、SIP に関してはこれまでに水輸送活性や局在しか明らかにされていない (Ishikawa *et al.* 2005)。

植物にとってアクアポリンの生理的役割や分子機能について様々なことが明らかになっているにも関わらず、研究が進んでいないアクアポリンがある。そこで私はシロイヌナズナアクアポリンの中でも機能および植物内での役割についての情報が少ない SIP に着目した。

第3節 Small and basic intrinsic protein (SIP) 分子種

シロイヌナズナには 35 種類のアクアポリンが同定され、PIP (13 種)、TIP (10 種)、NIP (9 種)、SIP (3 種) の 4 つのサブファミリーに分類される (Fig. 2)。上述のように、SIP 以外のアクアポリン (PIP、TIP、NIP) の研究は進んでおり、その輸送基質、細胞内局在、生理的役割および植物における生理的必要性などが明らかにされている。一方で、SIP についてはわずかな情報、すわち、SIP は特定の組織に発現し、小胞体膜に局在し (Ishikawa *et al.* 2005)、さらに、SIP は小胞体膜局在および一次構造などから哺乳類の AQP11 と AQP12 に類似していることが報告された (Ishibashi 2006)。シロイヌナズナアクアポリンの分子系統樹において、他の植物種に保存されている SIP のアミノ酸配列を加えて系統樹を作成すると、他の植物種における SIP も、シロイヌナズナと同様に SIP として独立したグループに分類された (Fig. 3-1、3-2、3-3)。このことから植物界において SIP サブファミリーが広く保存していることが示唆される。これらの知見から、SIP は植物において機能的に必要な分子であると考えられる。そこで、本節ではこれまでに明らかとなった小胞体膜局在 SIP の構造的特徴および生理学的機

能について述べる。

SIP 分子種の特徴

シロイヌナズナは AtSIP1;1 (At3g04090)、AtSIP1;2 (At5g18290)、AtSIP2;1 (At3g56950、以後、シロイヌナズナの SIP については At を省いて記述する) の 3 種の SIP ホモログをもつ (Johanson *et al.* 2001)。トウモロコシでは 3 種 (ZmSIP1;1、ZmSIP1;2、ZmSIP2;1) (Chaumont *et al.* 2001)、イネでは 2 種 (OsSIP1;1、OsSIP2;1) (Sakurai *et al.* 2005) の SIP ホモログが保存されている。シロイヌナズナでは、SIP の平均分子サイズは 25.9 kDa と 4 つのサブファミリーの中で最も小さい (PIP: 30.6 kDa、TIP: 26.2 kDa、および NIP: 30.7 kDa)。3 種の SIP のアミノ酸配列を比較すると、SIP1;1 と SIP1;2 は 70% と高い配列相同性を示す。一方で、SIP2;1 と SIP1;1 または SIP1;2 との間には 26% の配列相同性しかない (Fig. 4)。

また SIP には、次のような構造上の特徴がある (Alexandersson *et al.* 2005、Maeshima and Ishikawa 2008)。(i) アクアポリンで高度に保存されている NPA モチーフのうち、第一 NPA モチーフが、SIP1;1、SIP1;2、および SIP2;1 でそれぞれ NPT、NPC、および NPL に置き変わっており、NPA としては保存されていない (Fig. 4)。なお、ヒトアクアポリン AQP11 と AQP12 は、第一 NPA モチーフがそれぞれ NPC と NPT になっている (Ishibashi 2006)。第 2 節で述べたように NPA モチーフのペアは、水分子とアスパラギン残基の間の水素結合を介した基質の識別・選択に関与しており、NPA モチーフの変化は基質特異性や水輸送の速度に直接影響し得る。(ii) アミノ酸配列から N 末端側が他のアクアポリンと比較して短い、C 末端側は PIP や TIP と同様の長さである。異なる N 末端長が細胞内局在に関与している可能性がある (Bienert *et al.* 2007)。(iii) SIP はリジンのような塩基性残基が豊富であり、SIP の等電点は他のサブファミリーよりも高くなっている (Johanson and Gustavsson 2002)。(iv) さらに、膜貫通ドメインの TM3 と TM4 間に位置するループ C の長さ (14~19 残基) が、PIP および TIP (22~26 残基) よりも短い。ループ C が短いことで SIP の三次構造に影響を及ぼし、SIP が特異な高次構造を示す可能性がある。ヒト AQP1 および大腸菌 GlpF を用いた配列の比較および高次構造の推定から、3 種の SIP の間で保存されている TM1 中のアスパラギン酸残基 (SIP1;1 の Asp11) は、ループ中の残基と水素結合を形成することによってループ B を正しい位置に固定するのに重要であると考えられる (Johanson and Gustavsson 2002)。

SIP 分子種の細胞内局在

生理機能を考える上で細胞内局在の情報は不可欠である。植物細胞に GFP 融合 SIP タンパク質を発現させて画像解析した結果、すべての SIP メンバーが小胞体膜に局在すると報告された (Ishikawa *et al.* 2005)。蛍光タンパクの融合が SIP の局在に与える影響を排除するため、別の手法による研究として、植物組織からタンパク質を抽出し、シヨ糖密度勾配遠心法による細胞内オルガネラ膜の分画も検討された。遠心分画後の試料について抗 SIP 抗体を用いて細胞内局在を解析した場合においても、SIP が小胞体膜に局在することが明らかになった (Ishikawa *et al.* 2005)。SIP と同様に、マウス AQP11 および AQP12 でも GFP と結合した AQP の異種発現解析から小胞体膜に局在することが実証された (Ito *et al.* 2005、Morishita *et al.* 2005)。

哺乳類における植物 SIP の最も近いホモログは AQP11 および AQP12 であるとされた (Ishibashi 2006)。その根拠は、この 2 種においても第一 NPA モチーフが保存されておらず、また ER 膜局在である点 (Ito *et al.* 2005、Morishita *et al.* 2005) は SIP 分子と共通している。さらに生理機能についても報告があり、*AQP11* 欠損マウスは近位尿細管を空胞化する現象が起き、最終的に腎不全を引き起こして致死となるが、この空胞化は、細胞内の小胞体内腔の膨張によるものであり、小胞体内の水輸送における AQP11 の関与を示唆している (Morishita *et al.* 2005)。このように小胞体局在アクアポリンの欠損が小胞体の形態に異常を見せたことから、小胞体でのアクアポリンの機能は重要であると考えられる。

SIP 分子種の組織特異性

SIP 抗体を用いた組織局在特異性の解析では、SIP1 タンパク質が若い根および花芽で、SIP2; 1 タンパク質は実生の根および開花した花において検出された。またプロモーター-GUS 発現解析の結果から *SIP* メンバーの特徴的な発現パターンが明らかとなった。*SIP1;1* は、根、ロゼット葉、および花、雄蕊、花粉、トライコームで発現した。*SIP1;2* は根、子葉、排水組織で発現した。*SIP2;1* は根および葉脈、花粉において発現した。すなわち、根ではすべての *SIP* が重複して発現しており、それ以外では発現組織が異なる。それゆえ、それぞれの SIP は特定の細胞で、個別の役割を果たしていると考えられる。また GUS 解析結果から、花粉において *SIP1;1* と *SIP2;1* の発現が高いことが明らかになっている (Ishikawa *et al.* 2005)。したがって、花粉における SIP の機能にも注目すべき点がある。

SIP 分子種の水輸送活性

上述のようにアクアポリンは水以外の基質を輸送する分子種がある。SIP が水を輸送するか否かについても検討された。SIP 遺伝子を酵母に導入して発現させ、その酵母から調製された膜小胞を用いて、膜小胞の膨張をストップド・フロー分光光度計により解析した結果、SIP1;1 および SIP1;2 は水チャンネル活性を有することが明らかとなった (Ishikawa *et al.* 2005)。対照的に、SIP2;1 は同じ方法、同じ条件で測定したところ水輸送活性を示さなかった。SIP のホモログであるマウス AQP11 は組換え AQP11 を精製してリポソームに組み込み、ストップド・フロー法により分析したところ水チャンネル活性を有することが示された (Yakata *et al.* 2007)。これらの結果から、SIP1;1 および SIP1;2 は、哺乳類 AQP11 と類似した機能および高次構造を有することが示唆された。なお、SIP2;1 の輸送基質は未だに明らかとなっていない。さらに、SIP1;1 および SIP1;2 が水だけでなく他の基質を輸送する可能性を検証する必要もある。SIP2;1 をリポソームの系で評価できれば、SIP2;1 の輸送基質についても探索が可能であると考えられる。

小胞体膜の機能と SIP 分子種

小胞体膜は細胞内で最も広い表面積をもつオルガネラであり、形態や機能面において多様性が大きい。ほとんどの場合、小胞体膜は管状／網状／シート状などの複雑な網目構造を形成する。ショ糖密度勾配遠心法による生化学的分画により 3 種の SIP タンパク質が粗面小胞体に位置することが明らかになった (Ishikawa *et al.* 2005)。粗面小胞体は、膜タンパク質および分泌タンパク質の合成および初期タンパク質の糖鎖修飾、タンパク質の品質管理、およびミスフォールドタンパク質のリフォールディングの場所である。一方、滑面小胞体は、脂肪酸の伸長およびリン脂質、トリアシルグリセロールの合成場所である。また小胞体には脂溶性の有害物質を解毒する酵素も含まれている。さらに小胞体膜にはエチレン受容体 ETR1 (Wilkinson *et al.* 1995) も局在し、小胞体は植物ホルモンであるエチレンの伝達部位としても機能しているといえる。この機能に対して SIP が関連しているかどうかは不明である。

これまでに当研究室にて *SIP1;1*、*SIP2;1* の遺伝子欠損変異体を用いて、成長、形態、生理学および物理的ストレスに対する表現型を解析してきたが、明確な表現系は見出されなかった。例えば、野生株と SIP 遺伝子欠損株について電子顕微鏡を用いて根の細胞の形態観察したところ軽微な差異が見出されたが、これらを特徴的な表現型と決定するまでには至らなかった。また、生理学ストレスとして熱処理や小胞体ストレス誘

導薬剤処理、銀処理などを検討したが、野生型との差異は必ずしも大きくはなかった(宮本恭輔 2009、榊原里恵 2010)。

第4節 本論文の構成

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 が発現する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 挿入変異株を準備し、栄養成長期における影響を解析した。これまで3種の遺伝子全ての単独変異体は用いられていなかったため、本研究によりはじめて SIP の欠損による変化を体系的に分析することができた。栄養成長期の *sip2;1* 欠損株を観察すると、実生の胚軸において細胞内の小胞体ボディ (ER body) の形状が変化し、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。これらの実験結果を詳述し、考察する。

第三章では、生殖成長期に焦点を当て、遺伝子欠失による影響がないか否かを検証した。栄養成長期の *sip2;1* 株では植物体の形態に目立った変化は見られなかったが、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。*In vitro* での実験では、*sip2;1* 株の花粉の発芽率と花粉管の長さは、それぞれ 60%、約 82%であった。柱頭に乗せた *sip2;1* 株の花粉は、花柱 (雌蕊) の中央領域まで伸び、そこで伸長が止まっていた。その結果、莢の底部 (柱頭から離れた部分) では成熟種子が見られなかった。そして、*sip2;1* 株の莢は小さく、そこに含まれる種子の数は正常な莢の 56%であった。こうした表現型は、*sip2;1* 株に SIP2;1 遺伝子を再挿入することで回復した。SIP2;1 のタンパク質および mRNA は花粉に検出され、また、SIP2;1-GFP を発現させた植物の花粉を観察したところ、ER に局在することが明瞭に示された。一方で、*sip1;1*、*sip1;2* 株では異常を示さなかった。この章では、これらの実験結果を詳述し考察する。

第四章では *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。*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。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。これらの実験結果を詳述し考察する。

第二章

SIP 遺伝子欠損株は栄養成長期において顕著な表現型を示さない

第1節 緒言

植物にとって土壌や大気、光などの環境因子が成長や形態に大きく関わる。例えば、光の照射量が足りない場合、植物は光を求めて茎や葉柄の伸長を促進し、葉の展開を抑制する（避陰反応）。また、土壌中の水分が極めて少ない場合、植物は乾燥状態を感じ、伸長成長の抑制や気孔の閉鎖などの応答により水分の減少を抑える。アクアポリンは水や栄養塩などの物質を輸送し、浸透圧の調節や成長に必要な場所に栄養を供給する役割を持つ。乾燥ストレスや熱ストレスが生じた際には植物内のアクアポリンの発現抑制がかかることも明らかとなっている。そのため、環境応答とアクアポリンの関係は植物の成長にとって重要な因子となる。

本章では、小胞体膜に局在するアクアポリン SIP が植物の生育にどのように関わっているのかを明らかにするための解析結果を述べる。

第2節 材料及び方法

植物材料と生育条件

植物材料にはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生株 Colombia-0 (以後 Col-0 と表記; RIKEN Bioresource Center) および *AtSIP1;1*、*AtSIP1;2*、*AtSIP2;1* の T-DNA 挿入株をそれぞれ用いた。各 SIP の T-DNA 挿入株は、*AtSIP1;1* T-DNA 挿入株: Salk_069427 (以後 *sip1;1* と表記)、*AtSIP1;2* T-DNA 挿入株: GABI_134E12 (*sip1;2* と表記)、*AtSIP2;1* T-DNA 挿入株: SAIL_688_A01 (*sip2;1* と表記) を三度の戻し交雑を行い、そこからホモラインを選抜し実験に用いた。また種子は the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から取り寄せ、それぞれの情報は the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory website、GABI-Kat (Bielefeld University, Bielefeld, Germany; <http://www.GABI-Kat.de>)、the Syngenta Arabidopsis Insertion Librar (SAIL、<https://www.arabidopsis.org/abrc/sail.jsp>) から得た。種子滅菌液 (2% (v/v) PPM (Nalgene)、0.01% (w/v) Triton-X100、50 µg/mL

MgSO₄) 1mlに16時間浸種した後、滅菌液を除去し水で一度洗浄し0.1% (w/v) Ina agar BA-10 (Funakoshi) 溶液で懸濁した。これを Murashige-Skoog (MS) 寒天培地 (0.5x MS 培地用混合塩類 (Wako)、2.3 mM MES-KOH, pH 5.7, 2% (w/v) sucrose、0.6% gellan gum (Wako)) の上に無菌的に播種した。播種後、4°Cで3日間春化处理をし、グロースチャンバーで生育させた。生育条件は22°Cで16時間明期(白色蛍光灯: 80–110 μmol m⁻² s⁻¹) 8時間暗期で設定した。また3週間寒天培地で生育させた後、バーミキュライトと培養土を2:1の割合で混合した土壌に植え替え、生育後期の植物の観察及び実験に用いた。

RNA 抽出および定量 PCR

植物を乳鉢に入れ液体窒素を用いて乳棒で磨砕し、そこから約100 mgの粉末試料を使い、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出し、総RNA(以後total RNAと表記)を得た。抽出したtotal RNAは260 nmの吸光度から濃度を算出し、20 μLの反応系に1 μgのtotal RNAを入れReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo)を用いて逆転写を行い、cDNAを得た。

qPCR法によるmRNAの定量には、Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo)とThermal Cycler Dice real-time system (Takara Bio)を用いて、25倍希釈したcDNAを鋳型にPCRを行った。反復実験は少なくとも三回行った。使用したプライマーはTable2に示した。実験に供する前に、プライマーの効率をテストし、*SIP1;1* (95.1%)、*SIP1;2* (95.6%)、*SIP2;1* (95.5%)であることを確認した。

PCRの反応系は初期変性(95°C、1分)、2ステップ(変性:95°C、15秒、アニーリング:60°C、45秒)を40サイクル行った。また、それぞれのPCR産物を定量的に解析するため、検量線用標準溶液を作製した。目的のPCR産物をPCRによって得た後、Min Elute PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて増幅遺伝子断片の精製を行った。得られた精製DNA断片を260 nmの吸光度(A₂₆₀)で測定した。このA₂₆₀からコピー数を換算し、1.0 x 10¹³~1.0 x 10³ (copies/mL)のコピー数になるように1/100 Tris-EDTA buffer (TE buffer)で希釈した。コピー数換算は以下の式に則った。定量時の内部標準として*PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A; AT1G13320)*のmRNA量で標準化した。

$$\text{copies/ml} = \frac{6.023 \times 10^{23} \times 5 \times 10^{-5} \times (\text{A}_{260}) \times (\text{希釈倍率})}{(\text{増幅断片長}) \times 6.58 \times 10^2}$$

粗膜画分の調製とイムノブロット解析

三週齢の植物を乳鉢に入れ乳棒で磨砕し、試料の 10 倍量の磨砕液 (50 mM Tris-acetate, pH 7.5、0.25 M sorbitol、1 mM EGTA、20 μ M (*p*-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride hydrochloride (APMSF; Sigma-Aldrich)、1% (w/v) polyvinylpyrrolidone-40 (Sigma-Aldrich)、2 mM dithiothreitol (DTT)) を加え、氷上で磨砕した。以後の操作は 4°C で行った。試料液を 6,400 $\times g$ で 10 分遠心し、その上清を 138,000 $\times g$ で 13 分超遠心を行った。得られた沈殿に懸濁液 (20 mM Tris-acetate, pH 7.5, 0.25 M sorbitol, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT) を加え懸濁し、これを粗膜画分とした。

タンパク質量は Bradford 法 (Bradford 1976) を基にした Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて定量した。検量線は γ -globulin (Bio-Rad) を標準タンパク質として用いて作成した。Laemmli 法 (Laemmli 1970) に則って SDS-PAGE を行った。タンパク変性は試料の 5 分の 1 量の SDS sample buffer (10% β -mercaptoethanol, 10% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30% glycerol, 0.02% bromophenol blue) を加え、30°C で 30 分インキュベートした。この試料を 15% アクリルアミド分離ゲルで泳動した。

SDS-PAGE 後のゲルを Immobilon-P membrane (PVDF; Millipore) にセミドライ式ブロット装置 (Transblot SD, Bio-Rad) で 15V、40 分転写した。転写後の PVDF 膜を 5% スキムミルク (0.05% (w/v) Triton-X-100/TBS) で溶解) に浸し、室温で 1 時間振盪した後、PVDF 膜を 0.5% スキムミルクで 1000 倍希釈した一次抗体に浸し室温で一時間振盪した。なお、TBS は、0.02 M Tris、0.14 M NaCl を含み HCl で pH7.5 に調整した。抗 SIP1s 抗体は SIP1;1 と SIP1;2 の両タンパク質を認識し、アミノ酸配列の中間で設計されたもの。一方で抗 SIP2;1 抗体は C 末端領域に設計されたものを用いた (Ishikawa *et al.* 2005)。その後 PVDF 膜を洗浄液 (0.05% (w/v) Triton-X-100/TBS) で 6 分間の洗浄を三回繰り返した。次に、0.5% スキムミルクで 5000 倍希釈した二次抗体に浸し室温で一時間振盪し、PVDF 膜を TBS-T で 6 分間の洗浄を三回繰り返した。二次抗体には anti-rabbit IgG-HRP (Bio-Rad) を用いた。検出には ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて行った。化学発光は Light-Capture II imaging device with a cooled CCD camera (Atto) を用いた。

地上部新鮮重及び相対水分含量の測定

3 週齢の植物体の地上部を切り取りその重さを測定し新鮮重 (fresh weight : FW) とした。切り取った地上部を浸水させ 4°C で一晩静置し膨潤状態にさせた重さ (turgid

weight : TG) を測定し、それを 75°C で 3 日間乾燥させ乾燥重量 (dry weight : DW) を測定した。これらの重さから相対水分含量 (relative water content : RWC) を下記の式から計算した。

$$\text{RWC} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{TW} - \text{DW}} \times 100 (\%)$$

葉の形態観察および経時的な主根伸長の測定

MS 寒天培地で育てた 3 週齢の植物体の葉を切り取り、第一葉から順番に並べ、それぞれ縦幅と横幅を測定した。この値から横幅を縦幅で割りその比率から葉の形状を評価した。主根長伸長は、MS 寒天培地で育てた 1 週齢の植物から同程度の生育を示す植物体を選び、7 日目に測定を開始し、1 日毎に主根の長さを一週間測定した。また長さの表記は測定開始からの伸長量の累積としてグラフに示した。

第3節 結果

SIP は植物組織別にそれぞれ発現する

シロイヌナズナの SIP には SIP1;1、SIP1;2、SIP2;1 の 3 種のホモログが存在し、3 週齢の植物体を用いてこれら SIP の野生型における mRNA 量の定量を行った。結果として SIP 発現量は *SIP1;1*、*SIP2;1*、*SIP1;2* の順に高く (Fig. 5, 8A)、さらに植物体の各生育ステージにおいても *SIP1;1* の発現量が最も高く、*SIP1;2* においては *SIP1;1* の 10% に満たないレベルであった。また *SIP2;1* は全ての生育ステージにおいて mRNA の発現が確認できたが、特に花粉で高発現であった (Fig. 5)。また *SIP2;1* について植物組織別のタンパク質の蓄積量を解析した。*SIP2;1* タンパク質は mRNA の部位別発現パターンと類似しており、花粉で高発現であった。さらに根においてもタンパクの発現レベルが高いことも明らかとなった (Fig. 6)。

SIP 遺伝子欠損株は栄養成長期において顕著な表現型を示さない

SIP 機能欠損株を用いて SIP の生理的役割を探索した。まず野生株 Col-0 を背景にもつそれぞれ *SIP* 遺伝子 T-DNA 挿入株を用意した (Fig. 7)。これら T-DNA 挿入株における *SIP* 遺伝子の転写レベルは顕著に減少しており (Fig. 8B)、実生の *sip1;1*、*sip1;2* 株では、抗 SIP1s 抗体を用いたところ、SIP1;1 と SIP1;2 の共通部分を抗原配列としているため、それぞれの単一遺伝子欠損株では発現が確認された。mRNA の発現レベルと相関するように *SIP1;2* の T-DNA 挿入株では、抗 SIP1s 抗体での検出によるタンパク質発現が高く、*SIP1;1* の T-DNA 挿入株ではタンパク質量は低かった。そこで *sip1;1* と *sip1;2* の二重欠損株を作製し抗 SIP1s 抗体での検出を行ったところ、SIP タンパク質は検出されなかった (Fig. 8C-a)。実生の *sip2;1* 株では抗体によるタンパク質の検出が見られなかったため欠損していると考えられる (Fig. 8C-b)。以上の結果から、これら 3 種の T-DNA 挿入株がそれぞれの遺伝子欠損株であるとして実験に用いた。

まず、栄養成長期における表現型の観察を行った。3 週齢の植物体における SIP 欠損の影響を解析した。結果として、新鮮重、相対水分含量 Col-0 との差異は観察されなかった (Fig. 8D, E)。一方で、ロゼット葉の形態を観察すると *sip2;1* 株では葉が丸まっているように見えた (Fig. 8F)。そこで地上部の葉を切り取り、形状を葉の縦幅と横幅の比として測定し、円形に近いのか細長いのかを Col-0 と比較したところ、どの *sip* 変異株においても野生株との差はなかった (Fig. 9)。また 3 種すべての SIP 遺伝子が根

で発現していることから、主根長の伸長への影響を検討した。主根長において、どの *sip* 変異株でも Col-0 との有意な差はなかった (Fig. 10)。

第4節 考察

SIP欠損による栄養成長期の植物体への影響はない

シロイヌナズナの SIP には *SIP1;1*、*SIP1;2*、*SIP2;1* の 3 種それぞれが、根以外の組織で別々に発現していること (Ishikawa *et al.* 2005) から、それぞれに固有の役割があると推定される (Fig. 5)。一方で、タンパク質一次構造で解析すると、*SIP1;1* と *SIP1;2* は相同性が 70% 近く、また分子系統樹でも同じクレードに属していることから、これらは共通の役割を有している可能性もある。

なお、*SIP1;2* については、mRNA の発現レベルが低く (Fig. 8A)、組織内で生理的な機能を担っているかどうか定かではない。もちろん、正常な状態では発現が抑制されているだけで、何らかの刺激によって発現が誘導され、刺激に応答する役割を果たしているのかもしれない。それを踏まえて当研究室で検証した実験 (小胞体ストレス処理や塩処理等) では、そのような応答 (発現誘導) は見られていない。また、*SIP1;1* は 3 つのホモログの中で最も発現レベルが高く、植物組織においても満遍なく発現し、水輸送活性をもつことから、水輸送を通じて小胞体の機能に関わっていることが示唆された。*SIP2;1* は花粉や根で特に発現が強いことから (Fig. 6)、これらの部位で機能していることが考えられる。

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、水輸送能をもつ *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。

第三章

小胞体膜局在のシロイヌナズナ SIP2;1 は花粉の発芽、花粉管伸長に 関与する

第1節 緒言

被子植物では、水と栄養状態の調節は花粉の発達、発芽、そして花粉管の伸長に影響する (Samuel *et al.* 2009、Pacini *et al.* 2011、Firon *et al.* 2012)。花粉粒はその発達過程と機能の間に、周囲の環境で水分と栄養分の変化が生じる (Firon *et al.* 2012)。花粉は葯内部で発達し、花粉の形状は水和と花粉内の液胞化によって肥大する。成熟に向かうにつれて脱水を行い、花粉の含水量は減少し、成熟時に最小に達する。その後葯の開裂とともに花粉が柱頭に受粉し、花粉粒は急速に水和、そして発芽して花粉管を生成する (Preuss *et al.* 1993)。また花粉の水和は時間的にも空間的にも調節されている。葯内での不適切な水和や (Johnson and McCormick 2001)、柱頭の接着面においても不適切な場所における水和 (Lolle *et al.* 1998) もまた受精の阻害を引き起こす。花粉管の伸長中には、細胞膜からサイトゾルへの水の取り込みはサイトゾル内の膨圧やイオン濃度 (カルシウムやカリウムなどの) の調節や、花粉管の成長に関連する他の栄養素の流入にも必要である (Sommer *et al.* 2008)。花粉水和と花粉の発芽、花粉管成長の変化は水やサイトゾルの溶質を制御する分子機構を必要とする。

アクアポリンは膜内在性タンパク質であり、高度に多様化したチャネルタンパク質である。第一章に述べたように、植物は大きなアクアポリンファミリーを保持している。シロイヌナズナの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 (Maurel *et al.* 2008、Sakurai *et al.* 2005、Chaumont and Tyerman 2014、Maurel *et al.* 2015)。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 (Ampah-Korsah *et al.* 2017、Danielson and Johanson 2008、Bienert *et al.* 2012)。

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 (Maurel *et al.* 2008; Chaumont and Tyerman 2014)。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 (Maurel *et al.* 2015)。シロイヌナズナにおいて、植物の組織で複数の種類のアクアポリンが局在しているにも関わらず、花粉では NIP4;1、NIP4;2、TIP1;3、TIP5;1、SIP1;1、SIP2;1 と特定のものだけである (Bock *et al.* 2006, Maeshima and Ishikawa 2008, Soto *et al.* 2008, Loraine *et al.* 2013, Perez *et al.* 2016a)。TIP1;3 は花粉細胞の液胞で発現しており、TIP5;1 は精細胞にて発現している (Wudick *et al.* 2014)。それぞれ *tip1;3* および *tip5;1* 変異体植物は明確な表現型を示さず、遺伝的な結果にも有意なゆがみを示さなかった。しかし、*tip1;3* と *tip5;1* の二重変異株では、特に水欠乏または栄養欠乏条件下で、花粉管伸長低下を起し稔性の低下を示した。TIP1;3 と TIP5;1 は水と尿素透過能を持ち、これが花粉管の伸長に関わる (Soto *et al.* 2008)。また花粉で特異的に発現する NIP4;1、NIP4;2 についてみると、これらは花粉の細胞膜に局在し、これらが欠損すると花粉の発達や花粉管の伸長の低下が見られた。これは NIP4;1 と NIP4;2 が水とホウ素をサイトゾル内に輸送することで花粉の発達や花粉管の伸長に関わる (Perez *et al.* 2016)。このように花粉に局在するアクアポリンが、花粉の発達、発芽、および花粉管の成長中に、水やホウ素、尿素を輸送することで関わっていることが明らかとなっている (Bock *et al.* 2006, Soto *et al.* 2008, Wudick *et al.* 2014)。そこで花粉で高発現する SIP が花粉の生理にどのように影響するかを調べた。

第 2 節 材料及び方法

植物材料と栽培方法

第二章に記述した方法で実施した。

RNA 画分の調製と定量 PCR

第二章に記述した方法で実施した。

ヘテロ *sip2;1* 変異株の交雑分離比検定

Col-0 株の雌蕊にヘテロ *sip2;1* 変異株の花粉を受粉させ、受精させた。そこからとれた莢から全粒を (MS) 寒天培地 (0.5x MS 培地用混合塩類 (Wako)、2.3 mM MES-KOH, pH 5.7, 2% (w/v) sucrose、0.6% gellan gum (Wako)) の上に無菌的に播種した。播種後、4°C で 3 日間春化处理をし、グロースチャンバーで生育させた。2 週齢の植物体の葉から DNA を抽出し、PCR 法により遺伝型の確認を行った。用いたプライマーセットは Table 2 で示す。

花粉の生存率解析

開花した花を 20 個程度採取し、花粉発芽培地 (1.6 mM H_3BO_3 、3 mM $Ca(NO_3)_2$ 、0.8 mM $MgSO_4$ 、1 mM KNO_3 、0.3 M sucrose、50 mM MES-Tris、pH 7.5 (Boavida *et al.* 2007)) 1 mL に入れ攪拌し、花を除去し 22°C、3,000×*g* で 1 分間遠心した。上清の 100 μ L を残し沈殿を懸濁し、4 mg/mL fluorescein diacetate (FDA) を 2.5 μ L 添加し、次に 1 mg/mL propidium Iodide (PI) を 20 μ L 添加した。花粉の観察には落射蛍光顕微鏡 (upright type BX51、Olympus) を用い、FDA の緑色蛍光は U-MNIBA2 フィルターを用い、PI の赤色蛍光 U-MWIG2 フィルターを用いて観察した。撮影は DP72 (Olympus) カメラを用いた。

花粉の発芽及び花粉管伸長測定

花粉は蕾の発生ステージ 14 番目の花から花粉を上記と同様の方法で回収し、花粉発芽寒天培地に撒き 22°C で 6 時間培養し、花粉の発芽を測定した。観察には落射蛍光顕微鏡 (upright BX51、Olympus) を用い、撮影は DP72 (Olympus) カメラを用いた。*in vitro* における花粉管伸長は花粉の発芽測定に用いた試料から撮影した結果を基に測定した。長さの測定には ImageJ software (imagej.nih.gov/ij/index.html) を用いた。*in vivo* における花粉管伸長は、前日に蕾の発生ステージ 12 番目の花から葯を取り除き、次の日に人為的に花粉を柱頭に受粉させた。24 時間後、雌蕊を固定液 (エタノール : 酢酸 = 9 : 1) に浸け、一晚室温で固定した。次の日、固定液を取り除き、90%エタノールを入れ、20 分室温で静置、90%エタノールを取り除き、70%エタノールを入れ 20 分室温で静置し、次に 70%エタノールを取り除き、50%エタノールを入れ 20 分静置した。エタノールを取り除き、1N NaOH を入れ室温で一晩放置した。NaOH を取り除き、ア

ニリンブルー染色液 (0.1% (w/v) aniline blue in 0.1M K₃PO₄) をいれ、暗所で 1 時間以上静置した。これを落射蛍光顕微鏡を用い観察し、撮影は DP72 (Olympus) カメラを用いた。また蛍光図は U-MWU2 フィルターを利用した。

花粉の水和解析

前日に蕾の発生ステージ 12 番目の花から葯を取り除き、次の日に柱頭を花粉発芽寒天培地に刺し、そこへ花粉を付着させ、そこから 20 分間経時的に観察した。観察には落射蛍光顕微鏡を用い、撮影は DP72 (Olympus) カメラを用いた。また走査型電子顕微鏡を用いて同様の水吸収による膨潤の解析を行った。前日に蕾の発生ステージ 12 番目の花から葯を取り除き、次の日に撮影の 30 分前に葯に花粉を付着させ走査型顕微鏡 (S-2600N、Hitachi) で観察した (Ishiguro *et al.* 2010)。

SIP2;1 相補株及び GFP 融合 *SIP2;1* 株のコンストラクト作製

SIP2;1 の相補株のコンストラクトは Gateway System (Invitrogen) により作製した。The Arabidopsis Information Resource (TAIR) で公開されているシロイヌナズナのゲノム情報から、*AtSIP2;1* の推定プロモーター領域 - 2,301 bp (以後 *SIP2;1p* と表記) と開始コドン及び終始コドン、3' UTR を含む 1,375 bp (以後 *SIP2;1* と表記) を *A. thaliana* (Col-0) のゲノム DNA を鋳型とし、合成酵素に KOD FX plus neoenzymes (Toyobo) を用いて目的遺伝子の PCR を行った。

PCR 産物は MonoFas DNA 精製キット I (GL Science) で精製し、pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen) を用いてマニュアルに基づきエントリーベクターへ挿入した。作製したコンストラクトを大腸菌 DH5 α に形質転換し、50 mg/L カナマイシン (Wako) を含む LB 寒天培地に撒き、37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーを用いてコロニー PCR を行い、目的遺伝子の導入の確認できた大腸菌を 50 mg/L カナマイシン (Wako) を含む LB 液体培地で 16 時間振盪培養し、培養液から FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics) を用いてプラスミドを抽出した。得られたエントリークローンは DNA シーケンサーを用いて塩基配列の確認を行った。シーケンス解析には、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem) 及び Big Dye Terminator v3.1® cycle sequencing kit (Applied Biosystem) を用いた。

上記の方法で作製した *SIP2;1p::SIP2;1/pENTR* を用いて *SIP2;1p::mGFP-SIP2;1/pENTR* のコンストラクトを作製した。*SIP2;1p::SIP2;1/pENTR* を制限酵素の *Hind*III (Takara Bio) と *Nco*I (Takara Bio) で切断し、Slice 法 (Motohashi 2015) を用い

て GFP を N 末端側に挿入し、*SIP2;1p::mGFP-SIP2;1* /pENTR を作製した。GFP 遺伝子と *SIP2;1* の間にはリンカーとして[Gly4Ser] \times 3 を組み込んだ。また GFP はモノマータイプを用いた (Segami *et al.* 2014)。プライマーの詳細は Table 2 に示す。

植物形質転換用バイナリーベクターには pGWB401 を用いた (島根大学総合科学研究支援センター遺伝子機能解析分野の中川強教授より譲渡)。*SIP2;1p::SIP2;1*/pENTR または *SIP2;1p::mGFP-SIP2;1* /pENTR と pGWB401 をそれぞれ Gateway LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen)を用いて反応させ、大腸菌 DH5 α へ形質転換を行い、100 mg/L スペクチノマイシン (Wako) を含む LB 寒天培地で選抜し、コロニーPCR にて目的遺伝子の導入を確認した。

作製した *SIP2;1p::SIP2;1*/pGWB401 及び *SIP2;1p::mGFP-SIP2;1*/pGWB401 はエレクトロポレーション法を用いて *Agrobacterium tumefaciens* GV3101pMP90 へ形質転換し、30°Cで二時間培養し回復させた後、50 mg/L リファンピシン (Wako)、50 mg/L ゲンタマイシン (Wako) 100 mg/L スペクチノマイシン (Wako) を含む LB 培地に撒き 30°Cで二日間培養した。

フローラルディップ法 (Clough and Bent 1998) により *sip2;1* 欠損株へ形質転換した。形質転換植物から得られた T1 種子は 200 mg/L クラフォラン (Sanofi)、50 mg/L カナマイシン (Wako) を含む MS 寒天培地に播種し、選抜を行った。この選抜を繰り返し三次選抜にて T3 種子のホモラインを得た。

GFP 融合 *SIP2;1* の細胞内局在解析

上記で作成した *sip2;1* 株に *SIP2;1p::mGFP-SIP2;1* /pGWB401 を形質転換した植物から花粉を回収し、花粉発芽寒天培地に撒き 22°Cで 6 時間培養し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-D、Olympus) を用いて花粉管の GFP 蛍光から細胞内局在の観察を行った。GFP の検出は 473 nm の励起光を照射し、485 から 510 nm の蛍光を検出した。また観察には UPLSAPO 60XW (Olympus) 水浸レンズと UPLSAPO 100XO (Olympus) 油浸レンズを用い、蛍光画像は Olympus FluoView software で解析した。

第3節 結果

***sip2;1*変異株では雄親由来の組織の変異に起因して種子数が減少する**

生殖成長期の変異株を対象に観察・評価を行ったところ、*sip1;1* 株、*sip1;2* 株では Col-0 と比較して莢の形質に差は見られなかった (Fig. 11A–C、E–G)。一方で、*sip2;1* 株では Col-0 に比べ莢が短くなっており (Fig. 11D、H)、短い莢では至るところで種子の形成が滞っていた (Fig. 11H)。また *sip1;1* 株、*sip1;2* 株の総種子数は Col-0 と差異はなかったが、*sip2;1* 株では Col-0 (およそ 1 万粒) の 64% に満たなかった (Fig. 11I)。

そこで *SIP2;1* の欠損と種子の形成不良および種子収量との関連性を検証するため、Col-0 と *sip2;1* 欠損株の交雑を行い形成された種子および莢を観察した。莢の表現型における直接的な原因が花粉にあった場合、*SIP2;1* は雄性側の組織で重要な役割を担っていると考えられ、その逆もまた同様に考えられる。Col-0 と *sip2;1* の交雑でえられた莢及び種子を観察したところ (Fig. 11J)、*sip2;1* の花粉を Col-0 の柱頭に受粉させた場合では莢の長さが短く種子の生産数が有意に少なかった (Fig. 12)。組み合わせを逆にした場合では、正常な莢が形成された。また各植物から全ての莢を採取し、莢の長さを測定し、長さ別に分類したところ、Col-0 株に比べ *sip2;1* 株では短い莢が多くなる傾向になった (Fig. 13)。このことから、*sip2;1* の種子数減少は雄性側、すなわち花粉が要因であり、受精に至らなかった胚珠が増えたため莢自身も短くなったと解釈した。これらの結果は、*SIP2;1* が花粉や花粉管で発現し正常な莢の形成に必須であることを示唆している。

***sip2;1* 変異株での花粉発芽と花粉管伸長の不全**

sip2;1 株では種子数が減少していたことから、花粉と雌蕊に注目し、Col-0 と各欠損株の花から花粉を採取し、その花粉の発芽試験を試みた。*sip2;1* 株から得た花粉の発芽率は 22°C で Col-0 株花粉の 60% であった (Fig. 14A、B)。このことから *sip2;1* 株では花粉の発芽率が低下していると考えられる。この *sip2;1* 株の花粉発芽率の低下は、*sip2;1* 株に *SIP2;1* 遺伝子を自己プロモーター制御下で相補することで回復した (Fig. 14C)。またこの実験から、花粉管の長さも測定した。結果として *sip2;1* 株では Col-0 株に比べ有意に花粉管が短かった (Fig. 15)。

次に、花粉発芽率の低下が、*sip2;1* 株の花粉の生存率に起因しているのではないかと考え、花粉の生存率を調べた。Col-0、*sip2;1* 株からそれぞれ花粉を採取し、生細胞を

染色する fluorescein diacetate (FDA) と死細胞を染色する propidium iodide (PI) を用いて観察した。生細胞は FDA を取り込み加水分解することにより緑色蛍光を示し、死細胞には PI がそのまま侵入して赤色蛍光を示す (Fig. 16)。Col-0、*sip2;1* 株のいずれの花粉も同程度の高い生存率を示したことから、*sip2;1* の低い発芽率は花粉の生存率に起因しないことが示された。花粉は柱頭の乳頭細胞に接着し水和して膨潤してから発芽する。この過程で水の吸収が正常に行われず発芽に影響しているのではと考え、花粉の水和時の花粉の膨張速度を Col-0 と比較した。その結果、Col-0 と *sip2;1* 欠損株の花粉の膨潤速度に差異はなかった (Fig. 17)。雌蕊に付着した花粉を走査型電子顕微鏡 (scattering electron microscope、SEM) を用いて観察したところ、*sip2;1* 株の花粉は雌蕊の乳頭に正常に接着し、かつ 30 分程度で発芽した (Fig. 18)。

花粉管の伸長度合いを解析したところ、*sip2;1* 株由来の花粉は花粉管伸長に異常がみられた (Fig. 14A)。*in vitro* 実験での花粉管の長さを測定したところ、24 時間後、Col-0 株では平均の長さが 0.59 mm であり、*sip2;1* 株では平均 0.49 mm であった (Fig. 15)。雌蕊を用いた *in vivo* 実験では、まず花から葯を取り除き、それぞれの柱頭に人為的にそれぞれの花粉を受粉させ、アニリンブルー染色により花粉管の伸長を観察した (Fig. 19)。Col-0 と *sip2;1* 欠損株との 4 つの交雑組合せを見てみると (Fig. 19A, B)、*sip2;1* 株由来の花粉を用いた場合、柱頭から一番遠い雌蕊内の底部までは花粉管が到達していなかった。これは Col-0 と *sip2;1* 株のどちらの雌蕊を用いても同じ結果であった。対照的に Col-0 の花粉ではこのような現象は起きなかった。さらに *SIP2;1* 相補株では花粉管の伸長及び胚珠への到達は Col-0 と同程度まで回復した (Fig. 19E, F)。またこの時、子房の柱頭側から花粉管の先端までの伸長量を測定すると、*in vitro* 実験結果と同様に *sip2;1* 株の花粉では Col-0 株に比べ有意に短かった (Fig. 19G)。これらの結果は、花粉側の異常は花粉管伸長の低下が原因であり、雌蕊側には原因がないことを示している。さらに、ヘテロ株である *sip2;1* (+/-) の花粉を Col-0 株の柱頭に受粉させ、そこから得られた種子の遺伝型を調べた。その結果、野生型の遺伝子の割合が多くなり、分離比がメンデル則からずれた (Table 3)。これは *sip2;1* の遺伝型を有する花粉の発芽や花粉管の伸長が不十分で受精がうまくいかず、遺伝型が野生型に偏ったことが考えられる。したがって、花粉における *SIP2;1* の欠損が花粉の発芽や花粉管の伸長に明確に影響を及ぼすことを強く示唆している。

sip2;1 欠損株では種子生産が低下する

上記の実験結果から、莢の中での種子の結実の不全は、*sip2;1* 株の花粉の発芽率、花

花粉管伸長の不全が原因であると考えられる。そこで、*sip2;1* 株の莢の長さ、莢内の種子数を測定した。*sip1;1* 株、*sip1;2* 株では Col-0 との差はなく、対照的に *sip2;1* 株では莢が有意に短く、莢内の一部に種子の欠落が見られた (Fig. 20A) 定量的にまとめると、*sip2;1* 株の莢では一部の胚珠が受精しておらず、莢の長さが Col-0 のおよそ 77% であり、莢あたりの種子数が 56% であり、顕著な差異がみられた (Fig. 20B、C)。また、この結果は莢の長さの分布を示したヒストグラムの結果とも整合性がある (Fig. 13)。

さらに、*sip2;1* 株の莢の基部では多くの未授精の胚珠がみられた (Fig. 20A)。そのため莢を先端 (Tip)、中間 (Middle)、基部 (Bottom) に 3 分割し、それぞれの莢の部位における種子の充足率を計測した (Fig. 21)。莢の基部は雌蕊の下の部分であり、柱頭から離れた部位である。種子の形状はどの部位でも差異は見られなかったが、*sip2;1* 株の莢の各部位における種子数は、Col-0 に対してそれぞれ 81% (Tip)、78% (Middle)、28% (Bottom) と有意に低かった。とくに基部で種子充足率が著しく低下していた。また莢の長さや莢及び植物体における種子数の減少は *SIP2;1* 遺伝子を相補することで回復した (Fig. 22)。種子の欠落は *SIP2;1* の欠損による花粉管の伸長不全が主な原因であると推測した (Fig. 19)。

SIP2;1 は花粉管の小胞体膜に局在し均一に分散している

伸長しつつある花粉管内での *SIP2;1* タンパク質の存在を確認するために、単量体型 GFP (mGFP) (Segami *et al.* 2014) を結合した *SIP2;1* を導入した株を用意した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、花粉及び花粉管内における *SIP2;1* の細胞内局在を観察した。まず、*SIP2;1* が小胞体に局在するかどうかを確認するために ER マーカーを発現する *35Spro-RFP-HDEL* 形質転換株と *mGFP-SIP2;1* 形質転換株の掛け合わせをした二重形質転換植物を作出し、この植物の胚軸を対象として *SIP2;1* の局在を確認した。蛍光写真が示すように、*SIP2;1* が小胞体に局在していることを確認した (Fig. 23)。

花粉細胞での *SIP2;1* の局在解析については、mGFP 融合 *SIP2;1* 形質転換植物 (T₁) から花粉を採取し、寒天培地上で発芽させて観察した。mGFP-*SIP2;1* は花粉管内で先端付近から花粉管の付け根まで、花粉管全体で検出された (Fig. 24)。これらの結果から mGFP-*SIP2;1* は小胞体膜に局在し、花粉管でも発現していることが実証された。なお、タバコ (de Graaf *et al.* 2005) やシロイヌナズナ (Lu *et al.* 2011) での GFP-HDEL の観察では、網目状構造の小胞体が観察されているが、mGFP-*SIP2;1* の花粉管でも、花粉管の中央部分、先端部分で網目状構造の小胞体が観察された (Fig. 24D、E、F)。

もう一点の特徴として、mGFP-SIP2;1 が花粉管の特定部位のみでなく全域に分布すること、そして網目状小胞体の全体に均一に分布していることも確認できた (Fig. 24A-C)。このことは、SIP2;1 が小胞体で共通の普遍的な役割を花粉管伸長時に担っていることを示唆している。

第4節 考察

SIP2;1 の欠損は花粉の発芽率を低下させ花粉管伸長を抑制する

各 *sip* 変異株の表現型を解析することで SIP の生理的役割について探究した。さまざまな器官・組織を異なる生育段階で観察したが、当初はどの組織においても明確な表現型を見出すことができなかった。しかし、花粉に目を向け花粉管伸長の段階まで含めて解析を進めることにより、*sip2;1* 株の花粉および花粉管に異常を見出すことができた (Figs. 14、15)。すなわち、*sip2;1* 株の花粉の低い発芽率、その花粉管の伸長抑制という表現型である。この表現型は、SIP2;1 の転写量の最も高い発現部位が花粉であることとも密接な関連性があると推測される。一方、SIP1;1 の転写レベルは花粉で特に高い発現ではなく、そして SIP1;2 の mRNA は花粉では検出限界レベルであった (Fig. 5)。転写レベルのみでなく SIP2;1 タンパク質は Col-0 の花粉の粗膜画分において高いレベルで蓄積していることも明確に示された (Fig. 6)。*sip2;1* 株の花粉では正常な花粉に近い生存率、柱頭への接着が確認されたが (Figs. 16, 17, 18)、発芽率には顕著な表現型が現れており、*in vitro* 実験では Col-0 の 60%程度にまで低下していた (Fig. 14)。さらに重要な表現型として、*sip2;1* 株の花粉管は受粉後 24 時間後でさえ、花粉管の伸長が不十分なため花柱の付け根領域にある胚珠まで到達していなかった (Fig. 19A-D, G)。その結果として、花柱の基部では受精が行われず、*sip2;1* 株の莢では種子の充足率が基部で著しく低下した (Figs. 20、21)。このことは、莢当たりの種子数、さらには植物当たりの種子数の減少に帰結している (Figs. 11I、20)。花粉の発芽率の減少は、SIP2;1 遺伝子を *sip2;1* 株に導入することで回復した (Fig. 14C)。さらに、相補株の花粉を用いた他家受粉実験では、花粉管伸長における表現型は解消していた (Fig. 19E、F)。したがって、花粉の発芽、花粉管伸長に異常を与える遺伝子は SIP2;1 と結論づけられる (Fig. 25)。

第四章

小胞体における SIP 分子種の役割の探索

第 1 節 緒言

小胞体膜は細胞内で最も広い表面積をもつオルガネラであり、形態や機能面において多様性が大きい。ほとんどの場合、小胞体膜は管状／網状／シート状などの複雑な網目構造を形成する。一般に、ER は脂質合成、有害な脂質と可溶性化合物の解毒、タンパク質合成、タンパク質修飾、タンパク質の適切な輸送、細胞膜および他の膜に供給するための膜生合成など、細胞機能を維持するための重要な役割を發揮している (Schwarz and Blower 2016)。植物細胞の ER は、上述の成分を合成し、核膜、ミトコンドリア外膜、液胞膜、細胞膜や細胞壁に届けるための輸送小胞も生産している。これらの膜小胞は、目的の成分を ER からゴルジ装置を経て細胞膜などに供給する役割を担っている (Samaj *et al.* 2006)。小胞体は粗面小胞体と滑面小胞体に分けられる。粗面小胞体は、膜タンパク質および分泌タンパク質の合成および初期タンパク質の糖鎖修飾、タンパク質の品質管理、およびミスフォールドタンパク質のリフォールディングの場所である。一方、滑面小胞体は、脂肪酸の伸長およびリン脂質、トリアシルグリセロールの合成場所である。また小胞体には脂溶性の有害物質を解毒する酵素も含まれている。さらに、小胞体膜にはエチレン受容体 ETR1 (Wilkinson *et al.* 1995) も局在し、小胞体は植物ホルモンであるエチレンの情報伝達部位としても機能しているといえる。

本研究が対象とする SIP の細胞内局在については、GFP との融合タンパク質の培養細胞での発現観察、そしてシロイヌナズナから得た組織磨砕液のシヨ糖密度勾配遠心法による生化学的細胞分画画により 3 種の SIP タンパク質がいずれも粗面小胞体に位置することが明らかになった (Ishikawa *et al.* 2005)。しかし、小胞体の機能に対して SIP がどのように関連しているかは不明であった。

本章では、小胞体と SIP の関わりを調べるため、小胞体ストレス応答に着目し、小胞体に焦点を絞ったストレス処理をすることでその応答と SIP の欠損における影響を評価した。3 種の SIP がすべて発現している根に対してストレス (DTT) 処理を行い、ストレス応答遺伝子の挙動を解析した。

第2節 材料及び方法

RNA 画分の調製と定量 PCR

第二章に記述した方法で実施した。解析に用いたプライマーについては Table 2 に示した。

小胞体の形態観察

sip1;1、*sip1;2*、および *sip2;1* における小胞体の形態を可視化するために、これらの変異体を、Yamada ら (2008) が作製した小胞体可視化系統、*GFP-h* と交配した。この系統株は西村いくこ教授 (元京都大学、現甲南大学) から分与していただいた。形質転換植物 *GFP-h* は、SP-GFP-HDEL 発現カセットが導入されている。プロモーターにはトウモロコシのユビキチンプロモーター (pUbi1) を用いており、タバコモザイクウイルスの Pr1a タンパク質シグナルペプチド (SP) に GFP を融合しその下流に小胞体残留シグナルである HDEL を結合している。組織内の細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-D ; Olympus) を用いて GFP 蛍光を観察した。SP-GFP-HDEL の GFP 蛍光は 473 nm の励起光を照射し、485 から 510 nm の蛍光を検出した。また、レーザー顕微鏡観察には UPLSAPO 60XW (Olympus) 水浸レンズを用い、蛍光画像は Olympus FluoView software で解析した。

第3節 結果

sip2;1 株の根では小胞体ストレスによりストレスに対して敏感である

根に DTT 処理を行うことで ER ストレスを誘引させた。DTT は細胞内で小胞体ストレスを誘導する薬剤であり、RNA は根から抽出したものをを用いた。根を用いたのは培地内の DTT と直接接触するため、直接的影響を観察し易いと判断したためである。ER ストレス応答遺伝子として、*binding protein (BiP1, BiP2, BiP3)*、*basic leucine zipper domain 60 (bZIP60)*、*ER-localized J domain-containing protein 3A (ERdj3A)*、*protein disulfide isomerase-like (PDIL1-2) protein*、*secretion-associated RAS 1 (SAR1)*、*endoplasmic reticulum oxidoreductin1 (ERO1)* について転写量を測定した。3種類の BiP は、いずれも小胞体内腔に局在する分子シャペロンである Hsp70 であり、

分泌タンパク質の折り畳みに関与し、翻訳機構に必須のタンパク質として働いている (Wakasa *et al.* 2011、Srivastava *et al.* 2013)。bZIP60 はロイシンジッパー型転写因子であり、小胞体ストレス応答時にタンパク質分解を活性化させる (Iwata *et al.* 2008)。ERdj3A は分子シャペロンである Hsp40 であり、Hsp70 と相互作用することで小胞体内腔のタンパク質の折り畳みの制御を担っている (Fragkostefanakis *et al.* 2016)。ERO1 は小胞体膜内腔の内側に結合するフラビン酵素であり、小胞体内の酸化還元状態の制御に必須の役割をもつ (Sevier and Kaiser 2008)。PDIL1-2 はタンパク質ジスルフィドイソメラーゼであり小胞体内腔の酸化タンパク質の折り畳みに関与し、小胞体ストレスにより誘導される (Oslowski and Urano 2011)。SAR1 は COPII 小胞に含まれる GTPase で小胞輸送に関わる (Bi *et al.* 2002)。

これらの遺伝子において、通常の生育状況下において *sip2;1* 株では *ERdj3A* の発現レベルが有意に増加したが、*sip1;1* 株、*sip1;2* 株では転写量に顕著な変化はなかった (Fig. 26A)。DTT 処理下では、*sip2;1* 株において *bZIP60* と *ERO1* はストレス処理によりわずかに発現が促進され、*SAR1* と *ERdj3A* は、Col-0 よりも有意に高発現した (Fig. 26A)。 *BiP3* は通常条件、DTT 処理条件のどちらの条件でも *sip2;1* 株で発現が顕著に促進された (Fig. 26B)。これらの結果から、*sip2;1* 株では通常の生育環境においても常時小胞体ストレス状態にあり、*SIP2;1* は、根において、こうしたストレスを軽減する機能を果たしていると推測した。

***sip2;1* 株の花粉でも小胞体ストレス応答遺伝子 *BiP3* が高発現する**

第三章で示したように、花粉および花粉管内で *SIP2;1* が小胞体膜に局在していることを確認した (Fig. 24)。しかも、*SIP2;1* は花粉で明瞭に発現する。これらを考慮し、*SIP2;1* と小胞体ストレスとの関連性について検討した。他の研究グループにより、成熟花粉が発芽し、花粉管が伸長する過程で小胞体ストレス応答遺伝子の発現上昇が報告されている (Fragkostefanakis *et al.* 2016)。本実験で、小胞体ストレス応答遺伝子の花粉での発現状況を解析すると、*sip2;1* 株では、小胞体ストレス応答遺伝子とされる *BiP3* の発現レベルが Col-0 に比べ顕著に増加した。さらに Col-0 の花粉では、*BiP3* の mRNA 量がきわめて高かった (Fig. 27)。野生株においても花粉は、根に比べて *BiP3* の発現量が高いことから花粉は常に強い小胞体ストレスにさらされている状況が示された。そして、*sip2;1* 株では、野生株に比してさらに *BiP3* の発現レベルが上昇しており、*sip2;1* の根では Col-0 の根に対して 115 倍、*sip2;1* の花粉では Col-0 の花粉に対して 4 倍であった。一方、*sip1;1* 株、*sip1;2* 株では、根および花粉いずれにおいても Col-0 との有意

な差はなかった (Fig. 27)。

SIP 遺伝子欠損株は ER body の形成異常を引き起こす

次に、各 SIP が小胞体 (ER) に局在すること (Ishikawa *et al.* 2005) に着目し、小胞体の可視化を行った。方法としては、GFP 融合 ER マーカーを遺伝子導入した株 (*GFP_h*) と各 *sip* 変異株とを掛け合わせ、得られた二重変異株から SIP の欠損による小胞体の形態への影響の有無を、6 日齢の植物体を対象にして共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。植物は外敵や環境変化により防御機構として ER body と呼ばれる小胞を形成する (Hayashi *et al.* 2001)。この中には β -グリコシダーゼ等の加水分解酵素が含まれており、昆虫による食害を受けた際など、これらの酵素を放出することで外環境から身を守っていると推定されている。また環境応答とは別に幼植物体では、通常条件でも子葉、胚軸、根において ER body が形成されることが報告されている (Hayashi *et al.* 2001、Matsushima *et al.* 2002、Yamada *et al.* 2008)。本実験では、*sip1;1*、*sip1;2* 株における小胞体の形態変化はなかった。一方で、*sip2;1* 株では野生型に比べ ER body の面積が小さく、長さが短くなった (Fig. 28B、C)。またこの現象と SIP2;1 が関係しているかどうかを確認するため、まず、SIP2;1 が ER body に局在しているかどうかを *mGFP-SIP2;1* 株を用いて細胞内の ER body に注目しつつ観察した。蛍光像から、*mGFP-SIP2;1* の分布が小胞体の形態を示しており、さらにチューブ状の小胞体から楕円形の小胞が生じていることから SIP2;1 が ER body にも局在していると判断した (Fig. 29)。

この ER body の形態変化において、ER body 構成タンパク質の mRNA レベルでの発現レベルを解析した。ER body の形成に関わる転写因子 *NAI1*、ER body の膜成分である *NAI2*、ER body に主に蓄積される β -glycosidase をコードする遺伝子 *BGLU23* (PYK10) の 3 遺伝子の発現レベルは Col-0 株と比べ有意な差は見られなかった。一方でストレス応答時に発現し蓄積される *BGLU21*、*BGLU22* の発現レベルが野生型に比べ有意に増加した (Fig. 30)。

また *sip2;1* 株における ER body の形態異常 (Fig. 28) と小胞体ストレスとの関連性を検討するため 6 日齢の植物体に対し、小胞体ストレス応答遺伝子 *BiP3* などの発現とサイトゾル内の *catalase* (*CAT1*、*CAT2*、*CAT3*) の発現も解析した。その結果、*sip2;1* 株でのみ小胞体ストレス応答遺伝子の *BiP3* と *CAT3* の発現レベルが有意に増加していた (Fig. 31)。このことから、*sip2;1* 株での小胞体ストレスが、その組織における ER body 形成にも影響をもつことを示唆した。

第4節 考察

*sip2;1*株では小胞体ストレス関連遺伝子 *BiP3*の発現が顕著に増加する

小胞体膜局在の *SIP2;1* は、その欠失により小胞体ストレス関連遺伝子の発現に影響を及ぼした。今回分析した8種の遺伝子の中で、*BiP3*は根や花粉で顕著な転写レベルの変動を示した (Figs. 26、27、31)。一般的に、*BiP3*は非生物学的ストレスや小胞体ストレス誘導剤により顕著に発現上昇する (Noh *et al.* 2003、Iwata and Koizumi 2005、Liu *et al.* 2007b、Liu and Howell 2010、Maruyama *et al.* 2014、Tajima *et al.* 2008)。*BiP3*はER内腔に局在し、新たに合成されたタンパクに結合してフォールディングを助ける分子シャペロンとしての役割を担っている。この機能は *BiP1* や *BiP2* と同様であり、*BiP3* も含めてタンパクの折り畳みや再折り畳み過程でのタンパクの凝集を防ぐために必須である (Srivastava *et al.* 2013)。*BiP* 遺伝子の発現は、小胞体ストレスを感知し伝達する転写因子として知られる *bZIP17* および *bZIP28* によって増強される (Ohta *et al.* 2013)。さらに、*BiP* 遺伝子が成熟花粉や花粉管で発現し、配偶子形成や花粉管伸長に必要であることも報告され (Maruyama *et al.* 2014)、花粉および花粉管での小胞体ストレス回避の機構が備わっていることが強く推定される。

*BiP3*の転写量は、通常の生育下で栽培した Col-0 の花から回収した花粉でも顕著に高かった (Fig. 27)。このことから、生理的条件においても花粉が連続的な小胞体ストレスに晒されていることが示唆される。花粉は高温などのタンパク質の恒常性を妨げるような異常環境環境に対して敏感であると報告されている (Fragkostefanakis *et al.* 2016)。さらに、小胞体ストレスは活性酸素シグナリングを引き起こす (Ozgur *et al.* 2014)。Maruyama ら (2014) が報告するように、そうした状況を回避するため小胞体内腔に局在する *BiP3* が正常な花粉でも構成的に発現している。花粉に加えて、*sip2;1* 株の根における小胞体ストレス応答遺伝子の発現は小胞体ストレス誘導剤 DTT 処理により *BiP3*、*SAR1*、*ERdj3A* の3つの遺伝子が Col-0 と比べて有意に上昇した (Fig. 25)。*sip2;1* 株では、花粉のみでなく根においても小胞体ストレスに敏感になっていると言える。

sip2;1 株の花粉では、通常条件の栽培環境であっても *BiP3* の mRNA 量が顕著に増大し、*sip2;1* 株の花粉での *BiP3* 転写量は Col-0 の花粉の4倍の高い値であった。これ

は *sip2;1* 株の花粉は常に厳しい小胞体ストレスに晒されていることを示唆している。したがって、*SIP2;1* は花粉の小胞体膜上で、小胞体ストレスを軽減させる役割を担っているといえる。

sip2;1 株は ER body の形態に変化をもたらす

sip2;1 株では、葉の形状に野生株との違いはなかったものの、葉がカールする表現型を示していた (Fig. 9)。これは、葉でストレスが生じていた、もしくはストレスに対して敏感になっているからではないかと考えられる。それを支持するように、実生の *sip2;1* 株では小胞体ストレス応答遺伝子の *BiP3* の発現レベルが Col-0 株に比べ有意に高い (Fig. 31)。

さらに幼植物体や傷害を受けた組織で形成される ER body が、Col-0 株に比べ形が小さく、短かった。その代わり ER body の数が多い傾向が見られた。しかし ER body の構成成分の遺伝子発現レベルに顕著な変化が見られなかった。これらの結果から、ER body の数は多くなったが短くなったため絶対量は変わらず、発現レベルに差が出なかった、すなわち β -glycosidase の絶対的な量の増加は必要なかったと考えられる。次の問題点は、ER body の形態が短いことにある。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サイトゾル側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ていたことが、*SIP2;1* 欠失株では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、栄養成長期においては *SIP2;1* が欠損しても小胞体の機能は十分に働く、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。

第五章 総合考察

植物は栄養を得るために根系を発達させている。この根系から生存に必要な水や栄養などを吸収し、植物体全体に輸送している。この機能に大きく寄与しているのがアクアポリンであり、植物のアクアポリンは機能および局在に多様性が見られ、他の生物に比べ分子種も多種類存在する。シロイヌナズナには 35 種類のアクアポリンが存在し、それらはアミノ酸配列などから大きく 4 つのサブファミリー (PIP、TIP、NIP、SIP) に分類される。中でも PIP や TIP、NIP では様々な知見が得られており、研究が進んでいる。一方、SIP においてはこれまでに小胞体に局在し、SIP1;1、SIP1;2 は水輸送活性をもち SIP2;1 は水輸送活性をもたないということが明らかとなっている。当研究室では、これまで遺伝子欠損株を用いて生物的または非生物的ストレス、それ以外にも多方面からアプローチをしてきたが、顕著な差異を示すデータは得られていなかった。これはシロイヌナズナに限ったことではなく、ほかの植物種であっても SIP の生理機能に関する新しい知見は少なかった。そこで、この SIP に着目し、植物における生理的役割を解明することが新たなアクアポリン研究の一步になると考え研究を開始した。

第二章では 3 つの SIP ホモログ、SIP1;1、SIP1;2、SIP2;1 の T-DNA 挿入変異株における栄養成長期での影響を解析した。それぞれの発現レベルは mRNA レベルにおいて SIP1;1 が最も高く、次いで SIP2;1、SIP1;2 という結果であった。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。次に、これらの主根成長やロゼット葉、新鮮重や相対水分含量を解析したところ、遺伝子欠損株での大きな影響は検出されなかった。新鮮重や水分含量に影響がなかったことから、水輸送能をもつ 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このことから SIP2;1 では水以外の基質を輸送するのではないかという推測をした。

第三章では、SIP1;1 と SIP2;1 が花粉で発現していることから、生殖成長期における表現型について分析した。*sip2;1* 株では生殖成長期において、莢の形成および種子の生産に異常が見られた。そのため、受精に着目すると、花粉に異常が起きていることが判明した。*in vitro* での実験では、*sip2;1* 株の花粉の発芽率と花粉管の長さは、それぞれ野生型の 60%、約 82%であった。柱頭に乗せた *sip2;1* 株の花粉は、花柱 (雌蕊) の中央領域まで伸びるが、そこで伸長が止まっていた。その結果、莢の底部 (柱頭から離れた部分) では成熟種子が見られなかった。そして、*sip2;1* 株の莢は小さく、そこに含まれる種子の数は正常な莢の 56%であった。こうした表現型は、*sip2;1* 株に SIP2;1 遺伝

子を再挿入した相補株では十分に回復した。**SIP2;1** のタンパク質および mRNA は花粉に検出され、また、**SIP2;1-GFP** を発現させた植物の花粉を観察したところ、**ER** に局在することが明瞭に示された。これらの結果を総合して、**SIP2;1** が花粉の小胞体に局在し、花粉の発芽と花粉管の伸長に関与することを解明した。

第四章では小胞体膜に局在する **SIP** の小胞体での役割を解明するため、小胞体で機能している遺伝子の発現レベルの解析と小胞体の形態観察を行った。小胞体において小胞体ストレスに注目しそれらに関わる遺伝子の発現について小胞体ストレス誘導剤 (**DTT**) をすべての **SIP** が発現している根に処理し、根での小胞体ストレス応答遺伝子の発現を解析した。結果ストレス処理により *ERdj3A* や *ERO1* などのタンパク質の折り畳みに関わる遺伝子の発現が *sip2;1* で Col-0 に比べ有意に増加した。また分子シャペロンである *BiP3* の発現レベルはストレス処理により顕著に上昇した。また処理なしの状態においても *BiP3* の発現レベルは *sip2;1* で Col-0 に比べ有意に増加した。次に小胞体の形態を観察したところ、実生の胚軸において *sip2;1* の欠損株では **ER body** の形状が短く、数が増えるなどの変化が見られた。またこの **ER body** の形態変化が見られた 6 日齢の植物体および花粉での遺伝子発現を分析したところ、*sip2;1* 株で *BiP3* の mRNA 量が有意に上昇した。**SIP2;1** は小胞体ストレスにおいて生じる副産物を処理し小胞体を正常に機能させることに関与していることが示唆された。

なお、本研究では、**SIP1;1** と **SIP1;2** については新たな知見を得ることができなかった。しかし、**SIP1** は植物種で広く保存されており、いくつかの植物種では小胞体に局在し水の輸送能をもつことが明らかになっており、**SIP1;1** および **SIP1;2** は植物にとって必要であると考えられる。この 2 つのタンパク質の機能解明も、組換えタンパク質を用いることで基質の特定につながると推測される。また、小胞体に局在することの意義としては、マウス **AQP11** 欠損体では小胞体の空胞化がすでに知見としてあり、小胞体の形態維持に関わる可能性が推定される。したがって、今後、小胞体の形態維持に関わるような遺伝子変異株と掛合せをして、複合変異株での表現型がどのように変化するかを観察することで、小胞体内における役割を解明する糸口が得られると考える。

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する。 **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。次により詳細に記述する。

免疫ブロット法 (Fig. 6) および mGFP-SIP2;1 発現 (Fig. 24) 解析の結果から、SIP2;1 タンパク質が花粉および花粉管に局在していることが確認できた。とりわけ、小胞体は花粉管伸長とともに発達しており、SIP2;1 は花粉管内における小胞体に均等に分布していたことも強調したい。ここで、小胞体の生理的役割や小胞体ストレス下での花粉の機能障害について考察する。小胞体は花粉管の先端付近でより密度高く存在し、迅速な花粉管伸長を支持している (Maruyama *et al.* 2014)。一般的に小胞体は、(i) タンパク質の合成や分泌、(ii) 膜脂質の合成及び供給、(iii) 小胞体内でのタンパク質の折り畳み・高次構造形成などの品質制御、(iv) カルシウムホメオスタシスなどの役割を果たす。これらの役割を考慮し、小胞体機能と花粉管伸長の関連性について議論したい。第一に、迅速な花粉管伸長において、小胞体は細胞壁合成に必要なタンパク質の分泌に関わる (Sámaj *et al.* 2006)。実際に、分泌機構に関わる遺伝子の変異は花粉の発芽と花粉管伸長を阻害する (Cole *et al.* 2005、Szumlanski and Nielsen 2009、Peng *et al.* 2011)。第二に、小胞体で合成されるリン脂質や膜タンパク質を含む膜脂質はゴルジ体を経由して細胞膜へ供給される。第三に、小胞体はタンパク質の折り畳み、再折り畳みなどタンパク質の品質管理に関わる 3 種の BiP タンパク質を含んでいる (Maruyama *et al.* 2014)。第四に、小胞体は液胞やアポプラストなどと共に、主要なカルシウムの蓄積部位としての役割を担っている (Stael *et al.* 2012、Himschoot *et al.* 2017)。花粉管伸長はサイトゾル内でのカルシウム濃度の変化に依存しており (Cárdenas *et al.* 2008)、花粉管先端の細胞膜からサイトゾルへのカルシウムの流入は花粉管伸長の必須である。サイトゾル内のカルシウムの濃度を制御することは、液胞や小胞体内腔へのカルシウム蓄積に強く依存する。SIP2;1 の欠損により小胞体ストレスを生じており、この結果 Ca^{2+} 濃度調節に関わる細胞膜のタンパク質の輸送が滞ってしまい、花粉管伸長への影響につながると考えられる。

最後に、*sip2;1* 株において *BiP3* の mRNA 量が顕著に上昇したことをふまえ、SIP2;1 の欠損が小胞体ストレスの増大につながるのかを考察する (Fig. 25、26、30)。上述の結果から、SIP2;1 は、恒常的に小胞体ストレス状態におかれている花粉において、小胞体内腔に生じる毒性を示す物質を小胞体から透過し濃度を低下させているのではないかと推測する。そのような役割を担うアクアポリンがあるのだろうか？ 植物 SIP アクアポリンは一次構造的に、小胞体に局在するヒトアクアポリン AQP11 に類似している (Morishita *et al.* 2005)。AQP11 の機能欠損はマウスの門脈周囲の肝細胞におけ

る粗面小胞体の液胞化が報告されている。これは小胞体の構造維持に AQP11 の役割が必要であることを示唆している (Rojek *et al.* 2013)。AQP11 は、近位尿細管でのグルコース誘導性酸化ストレスの防御や過酸化水素の輸送体としての役割をもつと推測されている (Atochina-Vasserman *et al.* 2013)。さらに、AQP11 が過酸化水素を透過し、細胞内シグナル分子として働くと推測されている。植物アクアポリンの中でも他の分子種では、幾つかの分子種が過酸化水素を基質として輸送すると報告されている (Bienert and Chaumont 2014, Katsuhara *et al.* 2014)。具体的には、シロイヌナズナにおいて PIP では PIP1;4、PIP2;1、PIP2;2、PIP2;4、PIP2;5、PIP2;7、TIP では TIP1;1、TIP1;2、TIP2;3、NIP では NIP1;2、NIP2;1、NIP4;1 である。

これらのアクアポリンは過酸化水素を細胞内シグナル分子として膜透過させる、または排除・無毒化のために膜透過していると考えられる。これらのことから再度小胞体に焦点を当てる。SIP2;1 が欠損した際に *BiP3* の発現が急激に上昇した。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 (Francisco *et al.* 2012)。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 (Aller *et al.* 2013)。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サイトゾルに排出しているのではないかと推測する (Fig. 32)。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。

こうした点を考慮すると、SIP2;1 が花粉内で小胞体ストレス軽減のために小胞体から活性酸素種 (ROS) を除去するために寄与している可能性があり、その点を実証するためには、SIP2;1 の輸送基質を生化学的な実験で確認することが必要である。

まとめると、SIP2;1 が正常な花粉の発芽や花粉管伸長、そして胚珠での受精に重要な役割を持つことを明らかにした (Fig. 25)。植物の SIP および動物のアクアポリン

AQP11 は一次構造に特異的な領域をもち小胞体に局在する。今回明らかとなった小胞体局在アクアポリン SIP2;1 の解析結果は、小胞体ストレスに曝されやすい花粉および花粉管において、SIP2;1 が特に小胞体ストレスの抑制・回避に寄与することを明確に示した。

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。

そこで小胞体ストレスと SIP2;1 の関係性を明らかにするため、昆虫培養細胞 (s2 細胞) を用いてそれぞれ SIP タンパク質を発現させ輸送基質の特定を試みた。結果として、時間の関係でそれぞれの組み換え SIP タンパク質の発現までできたが、基質の評価まではたどり着けなかった。今後、発現させたタンパク質を用いて輸送基質の評価ができれば、小胞体膜に局在する SIP の機能と小胞体の関係が明らかになり、最終的に植物における SIP の生理的役割を解明することができると考えている。

引用文献

- Abascal F, Irisarri I, and Zardoya R (2014) Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1468-1481.
- Alexandersson E, Danielson JA, Råde J, Moparthi VK, Fontes M, Kjellbom P, and Johanson U (2010) Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J* 61: 650-660.
- Aller I and Meyer AJ (2013) The oxidative protein folding machinery in plant cells. *Protoplasma* 250: 799–816
- Anderberg HI, Danielson JA, and Johanson U (2011) Algal MIPs, high diversity and conserved motifs. *BMC Evol Biol* 11: 110.
- Anderberg HI, Kjellbom P and Johanson U (2012) Annotation of *Selaginella moellendorffii* Major Intrinsic Proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Front Plant Sci* 3: 33.
- Ampah-Korsah H, Sonntag Y, Engfors A, Kirscht A, Kjellbom P, Johanson U (2017) Single amino acid substitutions in the selectivity filter render *NbXIP1;1* aquaporin water permeability. *BMC Plant Biol* 17:61.
- Atochina-Vasserman EN, Biktasova A, Abramova E, Cheng DS, Polosukhin VV, Tanjore H, Takahashi S, Sonoda H, Foye L, Venkov C, Ryzhov SV, Novitskiy S, Shlonimskaya N, Ikeda M, Blackwell TS, Lawson W, Gow AJ, Harris RC, Dikov MM, Tchekneva E (2013) Aquaporin 11 insufficiency modulates kidney susceptibility to oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F1295–F1307.
- Bertl A and Kaldenhoff R (2007) Function of a separate NH₃-pore in aquaporin TIP2;2 from wheat. *FEBS Lett* 581: 5413-5417.
- Bi X, Corpina RA, Goldberg J (2002) Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* 419:271–277.
- Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, Chaumont F (2011) Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *Plant J* 66:306-317.
- Bienert GP, Chaumont F (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1840:1596–1604.
- Bienert GP, Moller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Moller IM, Schjoerring JK and Jahn TP (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide

- across membranes. *J Biol Chem* 282: 1183-1192.
- Boavida LC, MacCormick S (2007) Temperature as a determinant factor of increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 52:570–582.
- Bock KW, Honys D, Ward JM, Padmanaban S, Nawrocki EP, Hirschi K.D, Twell D and Sze H (2006) Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. *Plant Physiol.* 140: 1151–1168.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254
- Calamita G, Bishai W R, Preston G M, Guggino W B, Agre P (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from Escherichia Coli. *J Biol Chem.* 270, 29063-29066
- Cárdenas L, Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Hepler PK (2008) Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. *Plant Physiol* 146:1611–1621.
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, and Jung R (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* 125: 1206-1215.
- Chaumont F, Tyerman SD (2014) Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol* 14:1600–1618.
- Che P, Gingerich DJ, Lall S, Howell SH (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in Arabidopsis. *Plant Cell* 14:2771–2785.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16: 735–743
- Cole RA, Synek L, Zarsky V, Fowler JE (2005) SEC8, a subunit of the putative *Arabidopsis* exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiol* 138:2005–2018.
- Daniels MJ, Chrispeels MJ and Yeager M (1999) Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *J Mol Biol* 294: 1337-1349.
- Danielson JAH, Johanson U (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene

- family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 8:45.
- de Graaf BHJ, Cheung AY, Andreyeva T, Lévassieur K, Kieliszewski M, Wu H (2005) Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco. *Plant Cell* 17:2564–2579.
- Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O, and Ludewig U (2008) Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochem J* 414: 53-61.
- Firon N, Nepi M and Pacini E (2012) Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Ann. Bot. (Lond.)* 109: 1201–1214.
- Forrest KL and Bhave M (2008) The PIP and TIP aquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features. *Funct Integr Genomics* 8: 115- 133, 2008.
- Fournier-Level A, Korte A, Cooper MD, Nordborg M, Schmitt J and Wilczek AM (2011) A map of local adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 334: 86-89.
- Fragkostefanakis S, Mesihovic A, Hu Y, Schleiff E (2016) Unfolded protein response in pollen development and heat stress tolerance. *Plant Reprod* 29:81–91.
- Gupta AB, and Sankararamakrishnan R (2009) Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol* 9: 134.
- Gustavsson S, Lebrun A, Norden K, Chaumont F and Johanson U (2005) A novel plant major intrinsic protein in *Physcomitrella patens* most similar to bacterial glycerol channels. *Plant Physiol* 139: 287-295.
- Hanba YT, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, Terashima I and Katsuhara M (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* 45: 521-529.
- Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa N, Nishimura M, and Hara-Nishimura I (2001) A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 42: 894–899.
- Heckwolf M, Pater D, Hanson DT and Kaldenhoff R (2011) The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator. *Plant J* 67: 795-804.
- Himschoot E, Pleskot R, Damme DV, Vannester S (2017) The ins and outs of Ca²⁺ in plant endomembrane trafficking. *Curr Opin Plant Biol* 40:131–137.

- Howell SH (2013) Endoplasmic reticulum stress responses in plants. *Annu Rev Plant Biol* 64:477-499.
- Huang X, Zhao Y, Wei X, Li C, Wang A, Zhao Q, Li W, Guo Y, Deng L, Zhu C, Fan D, Lu Y, Weng Q, Liu K, Zhou T, Jing Y, Si L, Dong G, Huang T, Lu T, Feng Q, Qian Q, Li J, and Han B (2012) Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. *Nat Genet* 44: 32-39.
- Ikeda M, Andoo A, Shimono M, Takamatsu N, Taki A, Muta K, Matsushita W, Uechi T, Matsuzaki T, Kenmochi N, Takata K, Sasaki S, Ito K, Ishibashi K (2011) The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. *J Biol Chem* 286:3342–3350.
- Ishiguro S, Nishimori Y, Yamada M, Saito H, Suzuki T, Nakagawa T, Miyake H, Okada K, Nakamura K (2010) The *Arabidopsis* *FLAKY POLLEN1* gene encodes a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase required for development of tapetum-specific organelles and fertility of pollen grains. *Plant Cell Physiol* 51:896–911.
- Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M (2005) Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 579:5814–5820.
- Iwata Y, Fedoroff NV, Koizumi N (2008) *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell* 20:3107–3121.
- Johnson KD, Höfte H, Chrispeels MJ (1990) An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpR). *Plant Cell* 2:525–32
- Johnson SA and McCormick S (2001) Pollen germinates precociously in the anthers of raring-to-go, an *Arabidopsis* gametophytic mutant. *Plant Physiol.* 126: 685–695.
- Johanson U and Gustavsson S (2002) A new subfamily of Major Intrinsic Proteins in plants. *Mol Biol Evol* 19: 456-461.
- Johanson U, Karlsson M, Gustavsson S, Sjovall S, Fraysse L, Weig AR and Kjellbom P (2001) The complete set of genes encoding Major Intrinsic Proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for Major Intrinsic Proteins in plants. *Plant Physiol* 126: 1358-1369.
- Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP and Schäffner AR (1994) Water

- channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J* 6: 187-199.
- Katsuhara M, Sasano S, Horie T, Matumoto T, Rhee J, Shibasaki M (2014) Functional and molecular characteristics of rice and barley NIP aquaporins transporting water, hydrogen peroxide and arsenite. *Plant Biotech* 31:213–219.
- Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Senzaki E, Hamamura Y, Higashiyama T, Takayama S, Abe M, Kuchitsu K (2014) Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RhohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell* 26: 1069-1080.
- Kukulski W, Schenk AD, Johanson U, Braun T, de Groot BL, Fotiadis D, Kjellbom P and Engel A (2005) The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *J Mol. Biol.* 350: 611-616.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Laurindo FRM, Pescatore LA, Fernandes DC (2012) Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free. Radic. Biol. Med* 2012; 52: 1954–1969.
- Lian HL, Yu X, Lane D, Sun WN, Tang ZC and Su W (2006) Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. *Cell Res* 16: 651-660.
- Le Caherec F, Deschamps, Delamarche C, Pellerin I, Bonnec G, Guillam MT, Thomas D, Gouranton J, Hubert JF (1996) Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin functional comparison with aquaporin 1. *Eur J Biochem.* 241, 707-715
- Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH (2007) An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell* 19:4111–4119.
- Lopez D, Bronner G, Brunel N, Auguin D, Bourgerie S, Brignolas F, Carpin S, Tournaire-Roux C, Maurel C, Fumanal B, Martin F, Sakr S, Label P, Julien JL, Gousset-Dupont A and Venisse JS (2012) Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *J Exp Bot* 63: 2217-2230.
- Lorraine AE, McCormick S, Estrada A, Patel K and Qin P (2013) RNA-Seq of *Arabidopsis* pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant*

- Physiol* 162: 1092–1109.
- Lu Y, Chanroj S, Zulkifli L, Johnson MA, Uozumi N, Cheung A, Sze H (2011) Pollen tubes lacking a pair of K⁺ transporters fail to target ovules in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:81–93.
- Maeshima M (1992) Characterization of the major integral protein of vacuolarmembrane. *Plant Physiol* 98:1248–54.
- Maeshima M, Ishikawa F (2008) ER membrane aquaporins in plants. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 456:706–716.
- Matsushima R, Hayashi Y, Shimada T, Nishimura M and Hara-Nishimura I (2002) An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130:1807–1814.
- Maurel C (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 399-429.
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI and Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 12: 2241-2247.
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59:595–624.
- Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L (2015) Aquaporins in plants. *Physiol Rev* 95:1321–1358.
- Maruyama D, Sugiyama T, Endo T, Nishikawa S (2014) Multiple BiP Genes of *Arabidopsis thaliana* are required for male gametogenesis and pollen competitiveness. *Plant Cell Physiol* 55:801–810.
- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y and Yano M (2006) A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688-691.
- Mizutani M, Watanabe S, Nakagawa T, Maeshima M (2006) Aquaporin NIP2;1 is localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47:1420–1426.
- Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman, A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K (2005) Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol* 25:7770–7779.
- Motohashi K (2015) A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP

- site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol* 15:47.
- Nieto C, López-Salmerón V, Davière JM, Prat S (2015) ELF3-PIF4 interaction regulates plant growth independently of the evening complex. *Curr. Biol.* 25:187–193.
- Noh SJ, Kwon CS, Oh DH, Moon JS, Chung WI (2003) Expression of an evolutionarily distinct novel BiP gene during the unfolded protein response in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 311:81–91.
- Noronha H, Agasse A, Martins AP, Berny MC, Gomes D, Zarrouk O, Thiebaud P, Delrot S, Soveral G, Chaumont F, Gerós H (2014) The grape aquaporin VvSIP1 transports water across the ER membrane. *J Exp Bot* 65:981–993.
- Ohta M, Wakasa Y, Takahashi H, Hayashi S, Kudo K, Takaiwa F (2013) Analysis of rice ER-resident J-proteins reveals diversity and functional differentiation of the ER-resident Hsp70 system in plants. *J Exp Bot* 64:5429–5441.
- Osowski CM, Urano F (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol* 490:71–92.
- Otto B, Uehlein N, Sdorra S, Fischer M, Ayaz M, Belastegui-Macadam X, Heckwolf M, Lachnit M, Pede N, Priem N, Reinhard A, Siegfart S, Urban M and Kaldenhoff R (2010) Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *J Biol Chem* 285: 31253-31260.
- Ozgun R, Tukan I, Uzilday B, Sekmen AH (2014) Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signaling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defense of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 65:1377–1390.
- Pacini E, Jacquard C and Clément C (2011) Pollen vacuoles and their significance. *Planta* 234: 217–227.
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ and Campbell BT (2010) Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol* 10: 142.
- Pérez Di Giorgio JA, Bienert GP, Ayub N, Yaneff A, Barberini ML, Mecchia MA, Amodeo G, Soto GC, Muschietti JP (2016a) Pollen-specific aquaporins NIP4;1 and NIP4;2 are required for pollen development and pollination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28:1053–1077.
- Pérez Di Giorgio JA, Soto GC, Muschietti JP, Amodeo G (2016b) Pollen aquaporins: the solute factor. *Front Plant Sci* 7:1659.
- Peng J, Ilarslan H, Wurtele ES, Bassham DC (2011) AtRabD2b and AtRabD2c have overlapping functions in pollen development and pollen tube growth. *BMC Plant*

Biol 11:25.

- Preston GM, Carrol TP, Guggino WB, Agre P (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385-387.
- Preuss D, Lemieux B, Yen G and Davis RW (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev* 7: 974–985.
- Qiang X, Zechmann B, Reitz MU, Kogel K-H, Schäfer P (2012) The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. *Plant Cell* 24:794–809.
- Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y and Bohnert HJ (2001) From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol* 3: 1-17.
- Reuscher S, Akiyama M, Mori C, Aoki K, Shibata D and Shiratake K (2013) Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PLoS One* 8: e79052.
- Rojek A, Füchtbauer EM, Füchtbauer A, Jelen S, Malmendal A, Fenton RA, Nielsen S (2013) Liver-specific *Aquaporin 11* knockout mice show rapid vacuolization of the rough endoplasmic reticulum in periportal hepatocytes after amino acid feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304: G501–G515.
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* 46:1568–1577.
- Sámaj J, Müller J, Beck M, Böhm N, Menzel D (2006) Vesicular trafficking, cytoskeleton and signaling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci* 11:594–600.
- Samuel MA, Chong YT, Haasen KE, Aldea-Brydges MG, Stone SL and Goring DR (2009) Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in Brassica and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell* 21: 2655–2671.
- Schwarz DS, Blower MD (2016) The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 73:79–94.
- Segami S, Makino S, Miyake A, Asaoka M, Maeshima M (2014) Dynamics of vacuoles and H⁺-pyrophosphatase visualized by monomeric green fluorescent protein in *Arabidopsis*: artifactual bulbs and native intravacuolar spherical

- structures. *Plant Cell* 26:3416–3434.
- Sevier CS, Kaiser CA (2008) Ero 1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1783:549–556.
- Shelden MC, Howitt SM, Brent NK and Tyerman SD (2009) Identification and functional characterisation of aquaporins in the grapevine, *Vitis vinifera*. *Funct Plant Biol* 36: 1065-1078.
- Shivaraj SM, Deshmukh RK, Rai R, Bélanger R, Agrawal PK, Dash PK (2017) Genome-wide identification, characterization, and expression profile of aquaporin gene family in flax (*Linum usitatissimum*). *Sci Reports* 7:46137.
- Sommer A, Geist B, Da Ines O, Gehwolf R, Schöffner AR and Obermeyer G (2008) Ectopic expression of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane intrinsic protein 2 aquaporins in lily pollen increases the plasma membrane water permeability of grain but not of tube protoplasts. *New Phytol.* 180: 787–797.
- Soto G, Alleva K, Mazzella MA, Amodeo G and Muschietti JP (2008) AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Lett.* 582: 4077–4082.
- Srivastava R, Deng Y, Shah S, Rao AG, Howell SH (2013) BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:1416–1429.
- Stael S, Wurzinger B, Mair A, Mehlmer N, Vothknecht UC, Teige M (2012) Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *J Exp Bot* 63:1525–1542.
- Sutka M, Li G, Boudet J, Boursiac Y, Doumas P and Maurel C (2011) Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* grown in normal and salt stress conditions. *Plant Physiol* 155: 1264-1276.
- Szumanski AL, Nielsen E (2009) The Rab GTPase RabA4d regulates pollen tube tip growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:526–544.
- Tajima H, Iwata Y, Iwano M, Takayama S, Koizumi N (2008) Identification of an *Arabidopsis* transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochem Biophys Res Commun* 374:242–247.
- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wiren N and Fujiwara T (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18: 1498-1509.
- Verkman AS (1989) Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. *Am J Physiol.* 257, 837-850.

- Verma RK, Gupta AB & Sankararamakrishnan R (2015) Major intrinsic protein suprefamily: Channels with unique structural features and diverse selectivity filters. *Methods Enzymol.* 557, 485–520.
- Wakasa Y, Yasuda H, Oono Y, Kawakatsu T, Hirose S, Takahashi H, Hyashi S, Yang L, Takaiwa F (2014) Expression of ER quality control-related genes in response to changes in BiP1 levels in developing rice endosperm. *Plant J* 65:675–689.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. *Science* 270: 1807–1809.
- Wudick MM, Luu DT, Tournaire-Roux C, Sakamoto W, Maurel C (2014) Vegetative and sperm cell-specific aquaporins of *Arabidopsis thaliana* highlight the vacuolar equipment of pollen and contribute to plant reproduction. *Plant Physiol.* 164:1697–1706.
- Zhang DY, Ali Z, Wang CB, Xu L, Yi JX, Xu ZL, Liu XQ, He XL, Huang YH, Khan IA, Trethowan RM and Ma HX (2013) Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). *PLoS One* 8: e56312.
- Zhao XQ, Mitani N, Yamaji N, Shen RF and Ma JF (2010) Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiol* 153: 1871-1877.
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I and Mishimura M (2008) NAI2 Is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 2529-2540.
- Zeidel ML, Ambudkar SV, Smith BL, Agre P (1992) Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 31, 7436e7440.

榊原里恵 (2010) 修士論文

宮本恭輔 (2009) 修士論文

実験結果の図表

Subfamily	Member	AGI Gene	Water channel activity	Glycerol	H ₂ O ₂	CO ₂	NH ₃	B(OH) ₃	As(OH) ₃	Other	Intracellular location *
PIP	1;1	at3g61430	No								PM
	1;2	at2g45960	No			CO ₂					PM
	1;3	at1g01620	No								PM
	1;4	at4g00430	No		H ₂ O ₂	CO ₂					PM
	1;5	at4g23400	No								PM
	2;1	at3g53420	Yes		H ₂ O ₂						PM
	2;2	at2g37170	Yes		H ₂ O ₂						PM
	2;3	at2g37180	Yes								PM
	2;4	at5g06660	No		H ₂ O ₂						PM
	2;5	at3g54820	Yes		H ₂ O ₂						PM
	2;6	at2g39010	Yes								PM
	2;7	at4g35100	No		H ₂ O ₂						PM
	2;8	at2g16850	No								PM
	1;1	at2g36830	Yes		H ₂ O ₂						VM
	1;2	at3g26520	nd		H ₂ O ₂						VM
	1;3	at4g01470	Yes								VM
2;1	at3g16240	Yes				NH ₃				VM	
2;2	at4g17340	nd								VM	
2;3	at5g47450	nd		H ₂ O ₂		NH ₃				VM	
3;1	at1g73190	Yes								VM, PSV	
3;2	at1g17810	nd								VM	
4;1	at2g25810	nd				NH ₃				VM	
5;1	at3g47440	Yes								VM	
NIP	1;1	at4g19030	Yes	glycerol					As(OH) ₃		ER
	1;2	at4g18910	nd	glycerol	H ₂ O ₂				As(OH) ₃	Al-malate	ER
	2;1	at2g34390	Yes	glycerol	H ₂ O ₂					nitrate	ER
	3;1	at1g31880	nd						As(OH) ₃		
	4;1	at5g37810	Yes	glycerol	H ₂ O ₂		NH ₃	B(OH) ₃		urea	PM, IV
	4;2	at5g37820	Yes	glycerol							PM, IV
	5;1	at4g10380	No	glycerol				B(OH) ₃	As(OH) ₃		PM
	6;1	at1g80760	No	glycerol				B(OH) ₃	As(OH) ₃	urea	PM
	7;1	at3g16100	No	glycerol				B(OH) ₃	As(OH) ₃		PM
	1;1	at3g04090	Yes								ER
SIP	1;2	at5g18290	Yes								ER
	2;1	at3g56950	No								ER

*PM: plasma membrane; VM: vacuolar membrane; ER: endoplasmic reticulum; PSV: protein storage protein; IV: intracellular vesicles

Table2. 本研究での T-DNA 挿入確認および qPCR 実験に用いたプライマーセット

T-DNA insertion check

Gene	AGI	Forward	Reverse
SIP1;1	At3g04090	TATCTGTTATTCCAGGCAATTGGTG CTGCAG	AGTTGGTGAGTCCTGGTCCAACATG TTTGG
SIP1;2	At5g18290	GGAACCATGGTCATTTGAGG	CACACATGGACCACACACAA
SIP2;1	At3g56950	AATGGGACGAATCGGTTTAGTAGTG	GAACCAAAGTCAAGCAACGTAG
SALK-LB		GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	
GABI-LB		TCCATATTGACCATCATACTCATTG	
SAIL-LB		GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGC CTTGCTTCC	

qPCR

Gene	AGI	Forward	Reverse
SIP1;1	At3g04090	CTCCTTGCGGATTAGATTACCTGC	CAGCAATAGCTCCAGTGTGCACATC
SIP1;2	At5g18290	CAATCTTCTTAAACCCAAACGTTTC	GGTTATCACCATATCACCTAACGC
SIP2;1	At3g56950	GTTTCATCTTCTCCGTCTTCGTTTC	CTGTAAAGCACCGTGGTGAATTGC
BiP1&BiP2	At5g28540 At5g42020	CAGGCTACTCGGGAAATTCGA	AATACCGTTGGCGTCCACTTC
PP2A ^a	At1g13320	TAACGTGGCCAAAATGATGC	GTTCTCCACAACCGCTTGGT
UBQ5 ^b	At3g62250	CTTGAAGACGGCCGTACCCTC	CGCTGAACCTTTCCAGATCCATCG
bZIP60 ^c	At1g42990	CGATGATGCTGTGGCTAAAA	TCTCAAGCATTCTCTTTGAGAT
BiP3 ^c	At1g09080	CGAAACGTCTGATTGGAAGAA	GGCTTCCCATTCTTTGTTTAC
AtERO1 ^c	At1g72280	TGGCGATGGCCTTTAGCGACT	GGCCAGAATGGGCAGTCACACC
ERdJ3A ^d	At3g08970	CAAGGTATCCCAGAAATCACTC	GAATGTAGCAAACCTTACCTCGT
PDIL1-2 ^d	At1g77510	GCCACTAAGGCGATGATGTT	GCTCTCTGCATCACCAACAA
SAR1 ^d	At1g09180	AGAGATTAGTTCAGCACCAG	GTTGCCAAGAATAAGACAGG

Ref. a: Nieto, et al. 2014; b: Che et al. 2002; c: Ozgur et al. 2014; d: Qiang et al. 2012

Complementation

Gene	AGI	Forward	Reverse
cSIP2;1	At3g56950	CACCGTTCACCATATTCATCTTC	TAGCTGCAATGTCAAGTCTTGAG

Table 3. ヘテロ *sip2;1* 変異株の分離比テスト

Cross	No.	Seeds segregation genotype	Expected ratio	Observed ratio	Observed ratio	χ^2 P value
Wt x <i>sip2;1</i> (+/-) Female × Male	1	+/+ : +/-	1 : 1	14.0 : 1	42 : 3	P < 0.005
	2	+/+ : +/-	1 : 1	15.5 : 1	31 : 2	P < 0.005
	3	+/+ : +/-	1 : 1	2.3 : 1	21 : 9	P < 0.01
	4	+/+ : +/-	1 : 1	3.6 : 1	25 : 7	P < 0.01
	5	+/+ : +/-	1 : 1	3.1 : 1	18 : 6	P < 0.05
<i>sip2;1</i> (+/-) x Wt Female × Male	1	+/+ : +/-	1 : 1	1.1 : 1	23 : 21	P = 0.76
	2	+/+ : +/-	1 : 1	1.1 : 1	21 : 20	P = 0.76
	3	+/+ : +/-	1 : 1	0.7 : 1	23 : 26	P = 0.67
	4	+/+ : +/-	1 : 1	0.9 : 1	17 : 18	P = 0.87
	5	+/+ : +/-	1 : 1	0.8 : 1	17 : 21	P = 0.52

変異株 *sip2;1(+/-)* から単離した花粉を野生株 Col-0 の雌しべの柱頭に置き、得られる種子の遺伝子型を分析した。またその逆の操作により得られた種子の遺伝型の結果を下に示す。

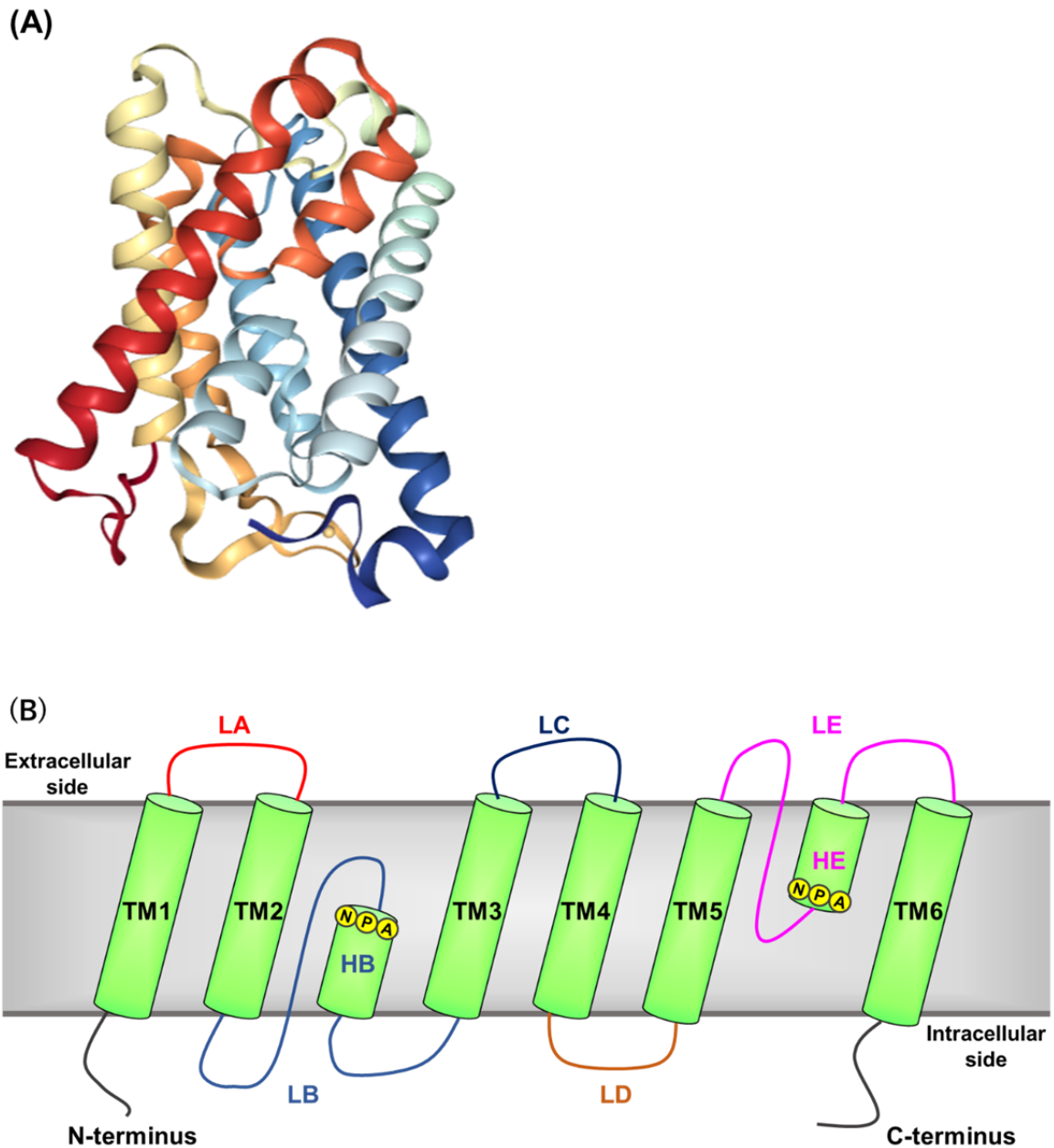


Figure 1. アクアポリンの分子構造

Spinacia oleracea の細胞膜型アクアポリン SoPIP2;1 の三次元結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) ID: 1Z98] (A) および模式図 (B)。アクアポリンは 6 本の膜貫通ヘリックス (Transmembrane domain (TM)) と TM をつなぐ 5 つのループ (Loop A-E (LA-LE)) が存在し、そのうち LB と LE にそれぞれハーフヘリックスを形成し、それぞれの内側で NPA モチーフは向かい合う形で配置され、直径 3 Å の孔を形成する。この NPA モチーフが水分子を認識し、高速輸送する。

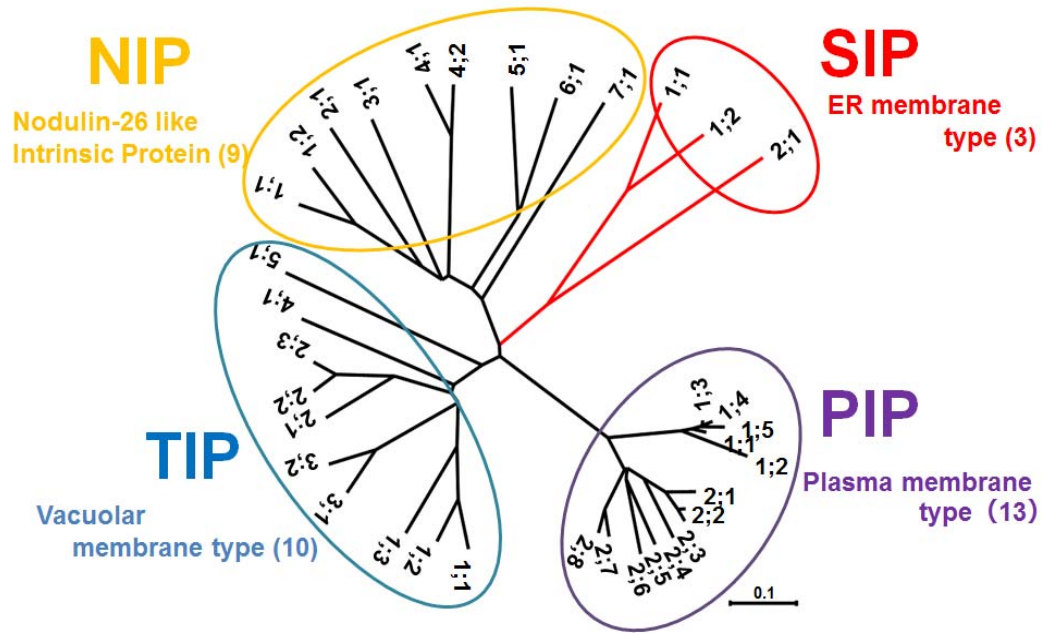


Figure 2. シロイヌナズナアクアポリンの分子系統樹

シロイヌナズナに含まれる 35 種のアクアポリンのアミノ酸配列を基に作成した分子系統樹。PIP (13 種)、TIP (10 種)、NIP (9 種)、SIP (3 種) のサブファミリーを円でマークした。

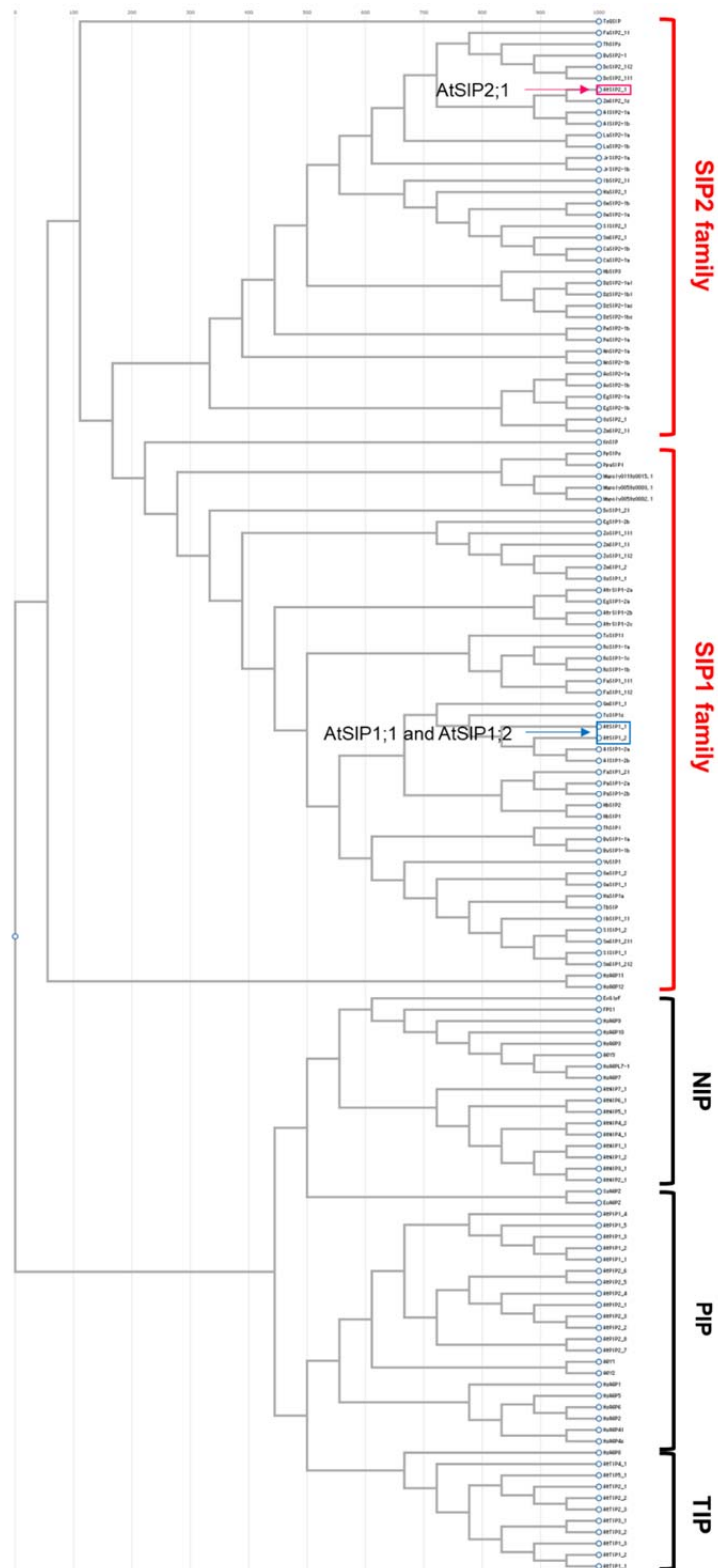


Figure 3-1. アクアポリンの分子系統樹

シロイヌナズナの SIP 以外に、トウモロコシ、イネ、ダイズ、トマト、ポプラ、ヒメツ

リガネゴケ、ブドウ、ゼニゴケなど 35 種類の植物の推定 SIP 分子種のアミノ酸配列を基に作成した分子系統樹。

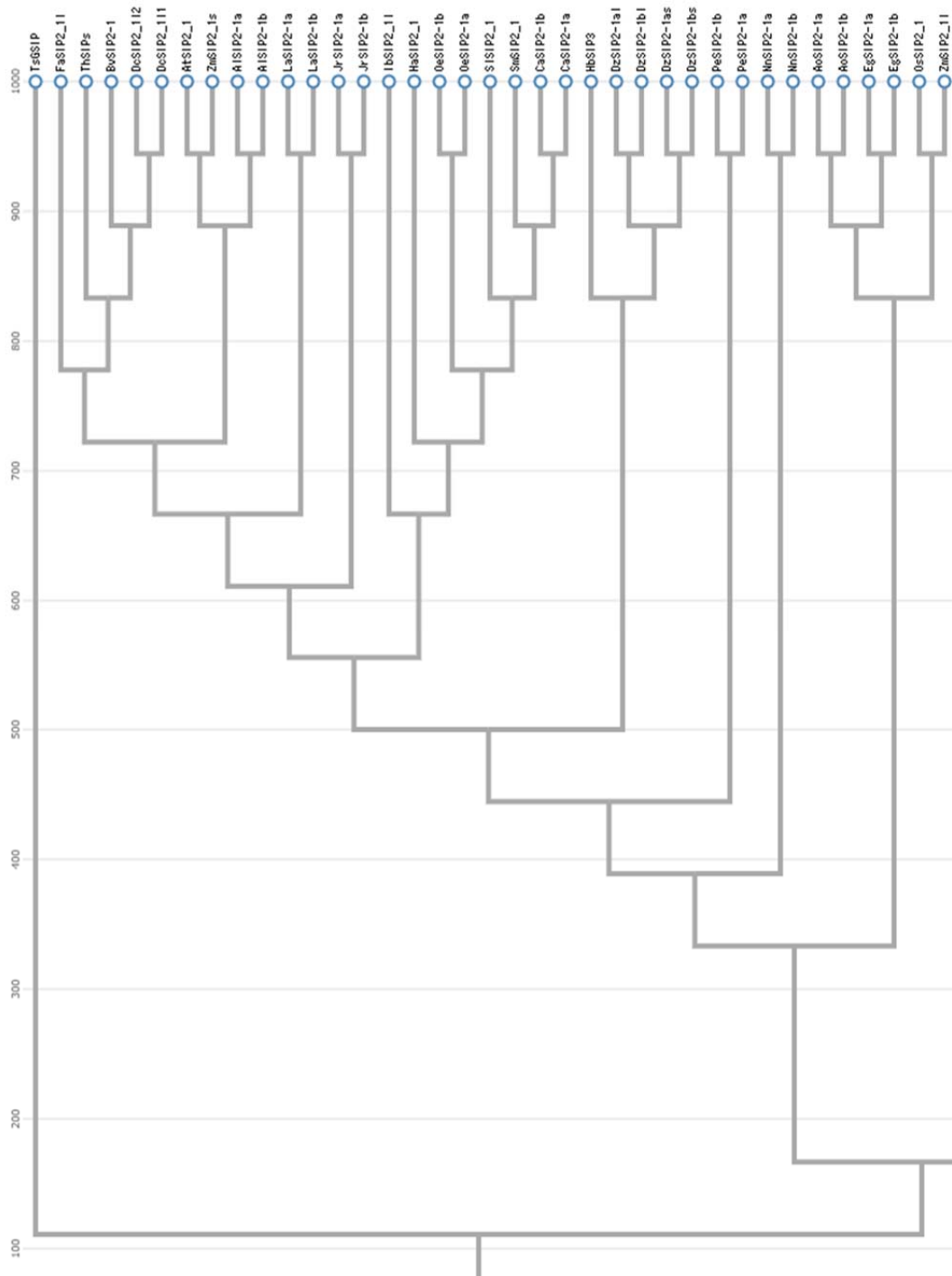


Figure 3-2. SIP2 分子系統樹

シロイヌナズナの SIP 以外に、トウモロコシ、イネ、ダイズ、トマト、ポプラ、ヒメツリガネゴケ、ブドウなど 35 種類の植物の推定 SIP2 分子種のアミノ酸配列を基に作成した分子系統樹。

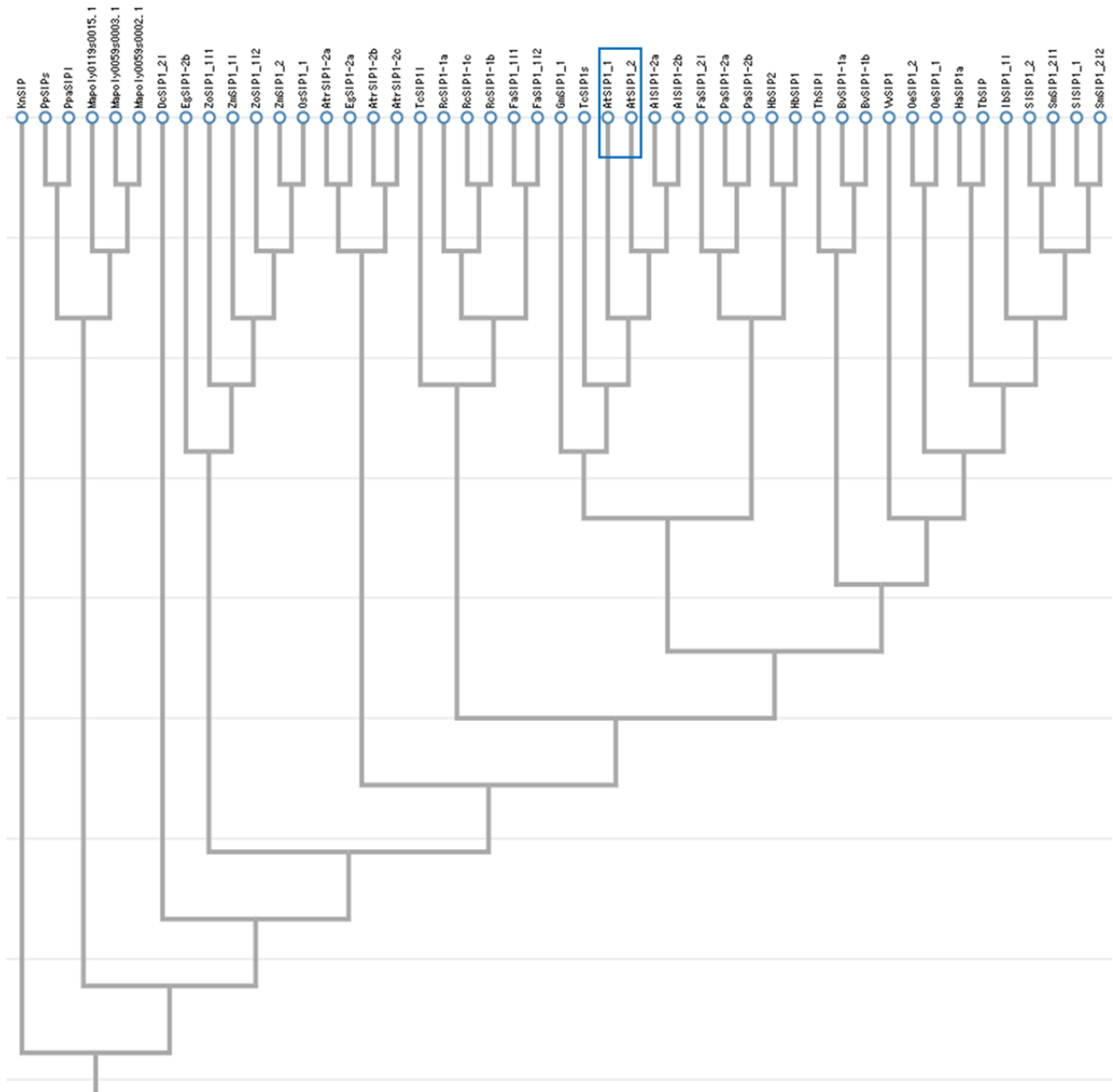


Figure 3-3. SIP1 分子系統樹

シロイヌナズナの SIP 以外に、トウモロコシ、イネ、ダイズ、トマト、ポプラ、ヒメツ

リガネゴケ、ブドウ、ゼニゴケなど 35 種類の植物の推定 SIP1 分子種のアミノ酸配列を基に作成した分子系統樹。

AtSIP1_1	MMGVLKSAIGDMLMTFSWVVLSATFGIQTAAIISAGDFQAITWAPLVIILTSLIFVYVSIF	60
AtSIP1_2	-MSAVKSALGDMVITFLWVILSATFGIQTAAIVSAVGFHGITWAPLVIISTLVVVFVSI SIF	59
AtSIP2_1	-MGRIGLVVTDLVLSFMWIWAGVLVNIILVHGVLG---FSRTDPSGEIVRYLFSIISMFI F	56
AtSIP1_1	TVI---FGSASFNPTGSAAFYVAGVPGDTLFLSLAIRLPAQAIGAAGGALAIMEFIPEKYK	117
AtSIP1_2	TVIGNVLGGASFNPCGNAAFYTAGVSSDSLFLSLAIRSPAQAIGAAGGAIITIMEM IPEKYK	119
AtSIP2_1	AYLQQATKGGLYNPLTALAAGVSGGFSFIFSVFVRIPVEVIGSILAVKHI IHVFPE---	113
	NPX	
AtSIP1_1	HMIGG-PSLQVDVHTGAI AETILSFGITFAVLLIILRGPRLLAKTFL LALATISFV VAG	176
AtSIP1_2	TRIGGKPSLQFGAHNGAISEVVL SFSVTFLVLLIILRGPRKLLAKTFL LALATVSVFVVG	179
AtSIP2_1	--IGKGPKLNVAIHHGALTEGIL TFFIVLLSMGLTRKIPGSFFMKTWIGSLAKLTLHILG	171
AtSIP1_1	SKYTGPAMNPAIAFGWAYMYSSHNTWDHIYVYWISSFVGALSAALLFRSIFPPP RPQKKK	236
AtSIP1_2	SKFTRPFMNPAIAFGWAYIYKSHNTWDHFYVYWISSYTGAILSAMLFRIIFPAP PLVQKK	239
AtSIP2_1	SDLTGGMNPAAVMGWAYARGEHITKEHLLVYWLGPVKATLLAVWFFKVVFKPLTEE QEK	231
	NPA	
AtSIP1_1	QKKA-- 240	
AtSIP1_2	QKKA-- 243	
AtSIP2_1	PKAKSE 237	

Figure 4. シロイヌナズナ SIP のアミノ酸配列

シロイヌナズナの SIP アミノ酸配列を示す。また NPA モチーフ部分を赤枠で示した。第一 NPA モチーフが、SIP1;1 では NPT、SIP1;2 では NPC、SIP2;1 では NPL となっており、SIP では NPA モチーフがそのままの配列では保存されていない。

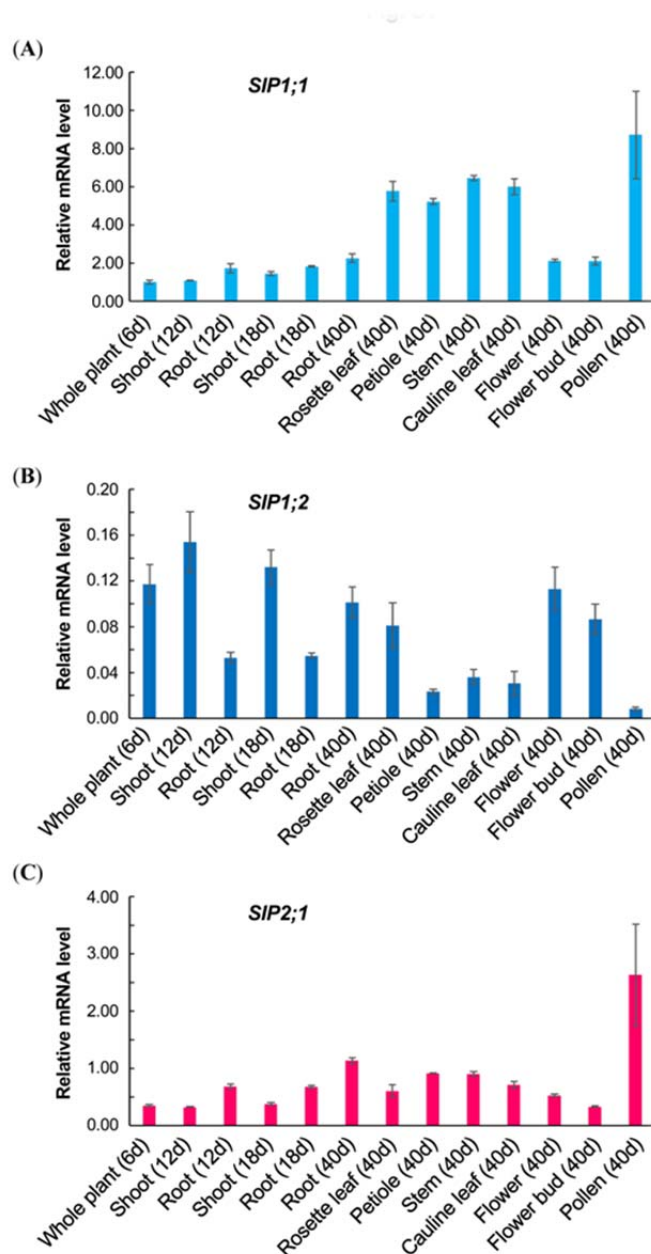


Figure 5. 生育段階の異なる植物体、また各組織における Col-0 での *SIP1;1* 遺伝子、*SIP1;2* 遺伝子、*SIP2;1* 遺伝子の転写量の解析

発芽後 6 日目の植物体全体、12 日目と 18 日目のシュートと根、そして 40 日目の根、ロゼット葉、葉柄、茎、本葉、花、花芽、花粉から総 RNA 画分を調製した。それらを試料として *SIP1;1* (A)、*SIP1;2* (B)、*SIP2;1* (C) の発現量を解析した。6 日目の植物体全体における *SIP1;1* 転写量の値を基準として、各組織における各 mRNA 量の相対値をグラフに示した。データは平均および SE (n = 3) を示している。6 日目の植物体全体では、*SIP1;1* の転写量が最も多く、次いで *SIP2;1*、*SIP1;2* の順であった。

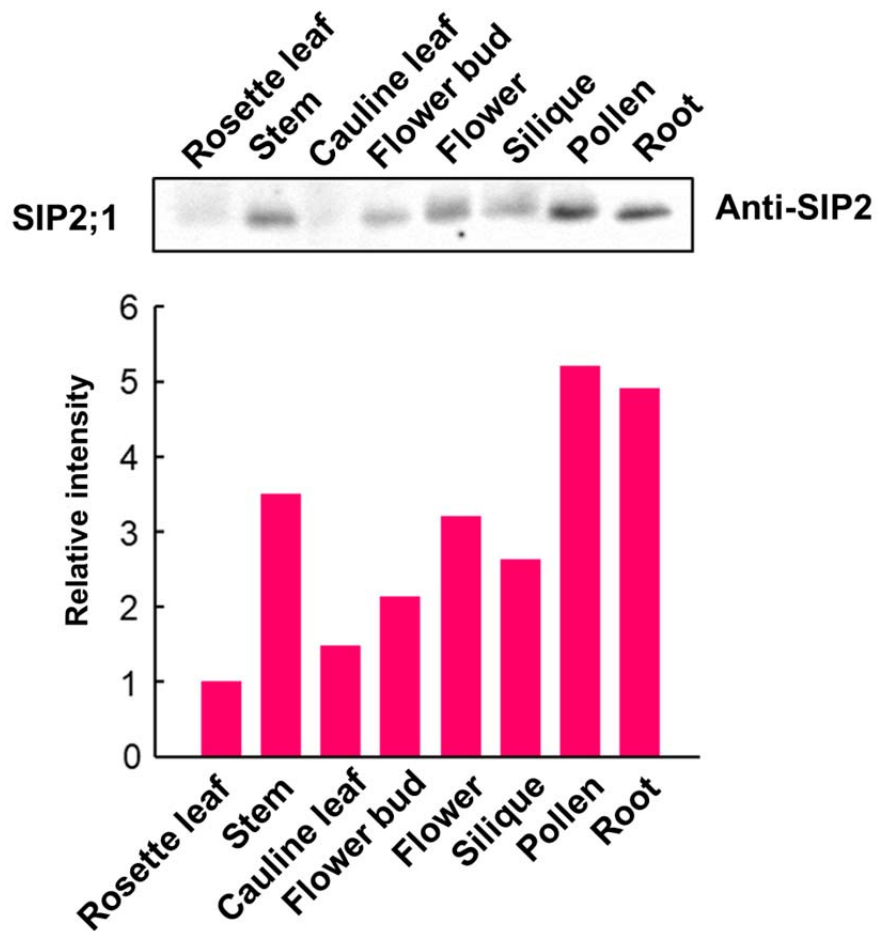


Figure 6. 花粉における SIP2;1 タンパク質の免疫化学的検出

ロゼット葉、茎、本葉、花芽、莢、花粉および根から粗膜画分を調製し、抗 SIP2;1 抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。SIP2;1 タンパク質は約 26 kD の位置に検出された（上部写真）。免疫染色の度合いを測定し、ロゼット葉の値を基準にして相対値を示した（グラフ）。

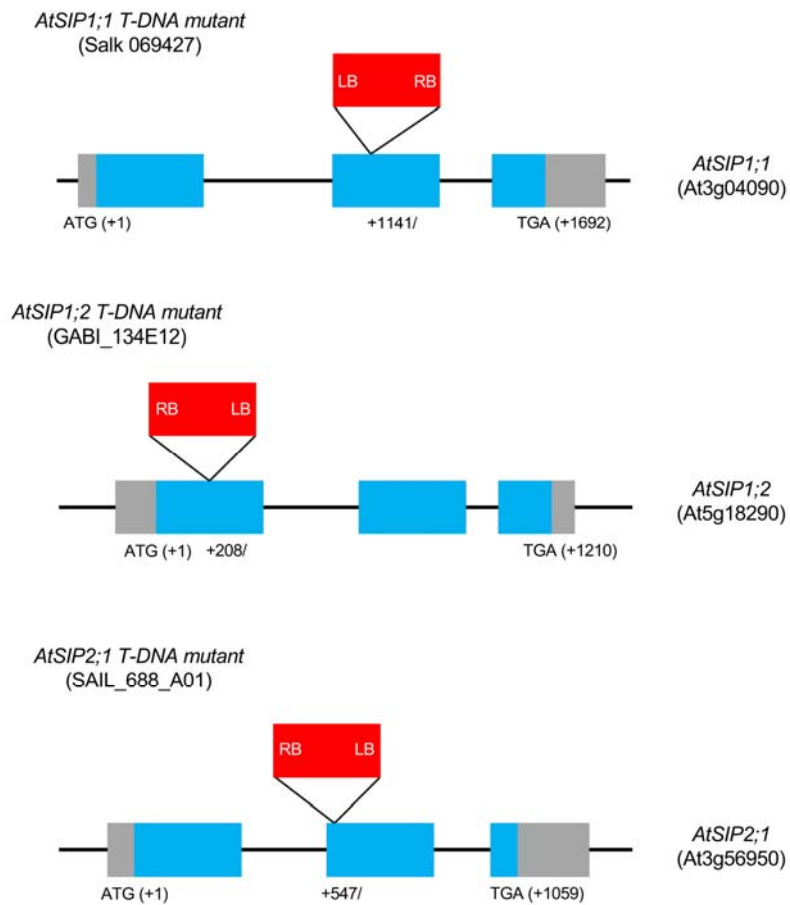


Figure 7. SIP1;1、SIP1;2、SIP2;1 の T-DNA の挿入変異株

Salk_069427 (*sip1;1*)、GABI_134E12 (*sip1;2*)、SAIL_688_A01 (*sip2;1*)。T-DNA (赤色) の挿入位置を図示しており、個々のエクソンは青色ボックス、非翻訳領域は灰色ボックスで表示した。

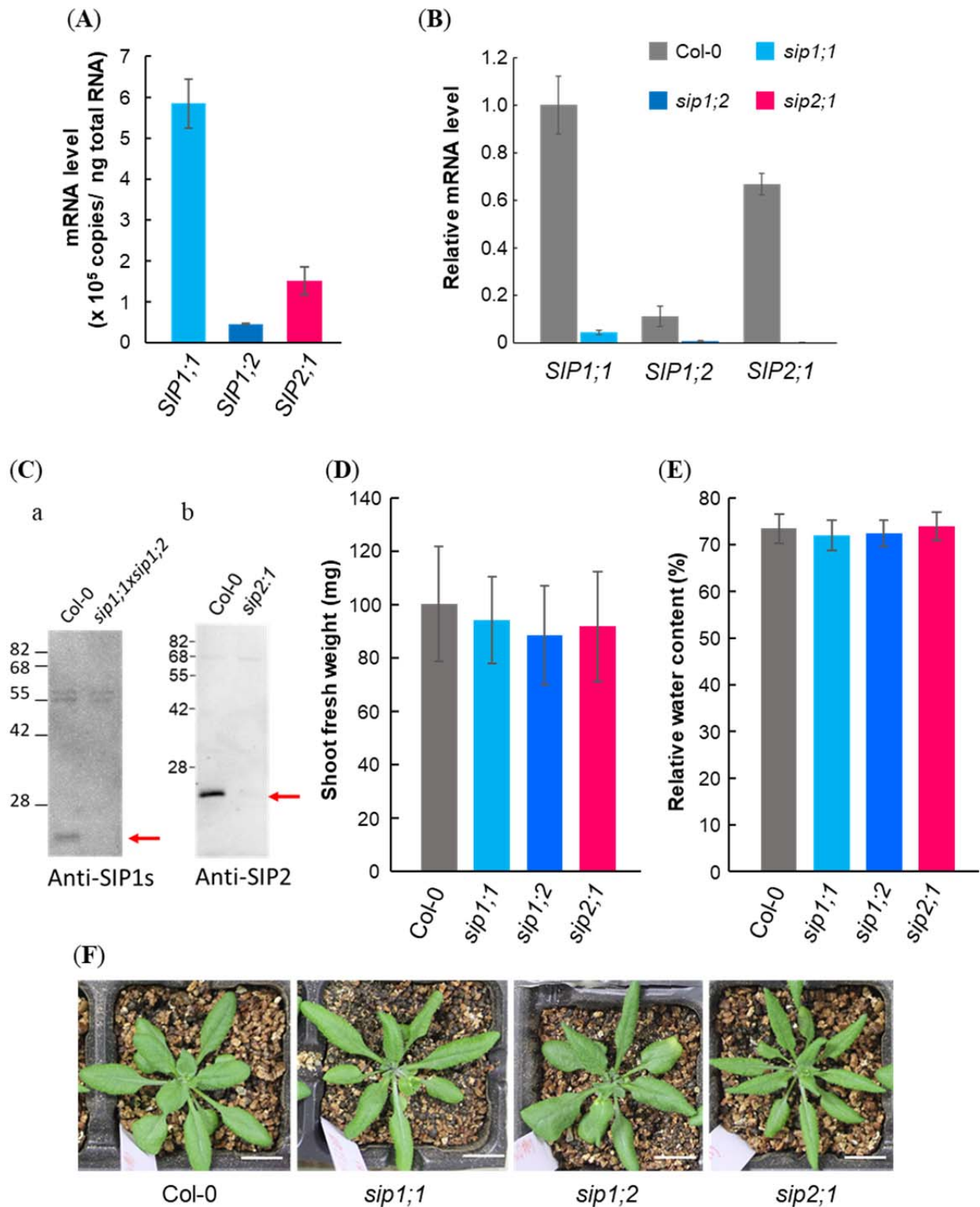
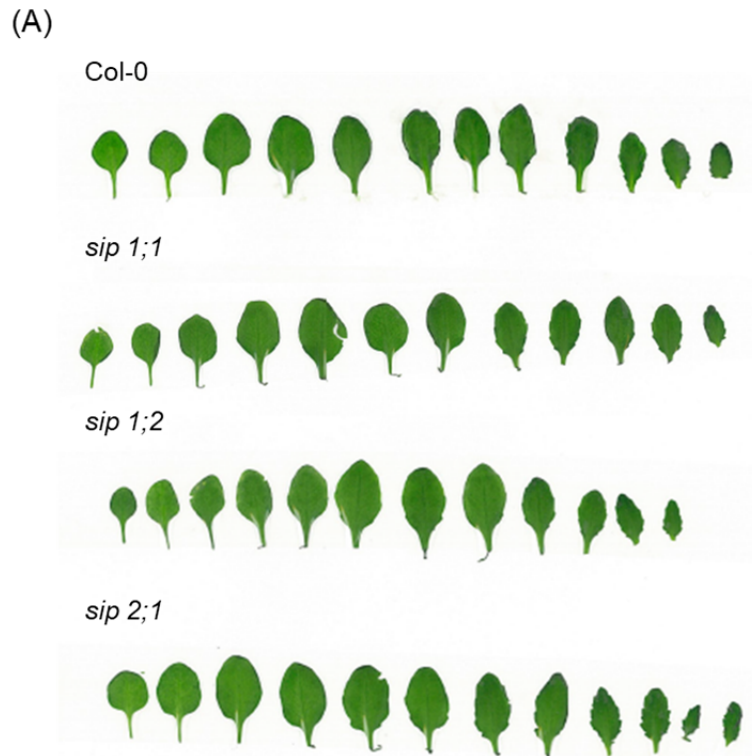


Figure 8. 栄養成長期において通常生育下での SIP 機能欠損株に野生型との明確な表現型の違いは見られない

Col-0、*sip1;1* 株、*sip1;2* 株、*sip2;1* 株の植物を 0.5× MS 寒天培地で三週間育て、それ

ぞれの mRNA 量を測定 (A, B)、Col-0 と *sip2;1* 株のタンパク質発現解析 (C)、新鮮重 (D)、相対水分含量の測定 (E) を示している。(F) 4 週齢の Col-0 及び変異株の地上部の形態観察。(A) Col-0 から総 RNA を準備し、qPCR により各 *SIP* 遺伝子の mRNA 量の定量を行い、絶対 mRNA 量を表記した。データは平均値と SE で示した (n = 3)。(B) Col-0 及び各 *sip* 変異株の相対 mRNA 量を解析し、Col-0 と比較した。データは平均値と SE で示した (n = 3)。(C -a) 実生の Col-0 と *sip1;1* 株と *sip1;2* 株の掛け合わせた二重欠損株から粗膜画分を抽出し免疫ブロット法により抗 SIP1s 抗体を用いて検出した。(C -b) 実生の Col-0 と *sip2;1* 株から粗膜画分を抽出し免疫ブロット法により抗 SIP2;1 抗体を用いて検出した。(D, E) 3 週齢の Col-0 及び各 *sip* 変異株の地上部新鮮重 (FW) と相対水分含量 (RWC)。相対水分含量の計算方法は材料及び方法に記載。データは平均値と SE で示した (D, E: n ≥ 20)。(F) 4 週齢の Col-0 及び変異株植物体。スケールバー = 10 mm。



(B)



W/L Ratio

W : Leaf blade width,
L : Leaf blade length

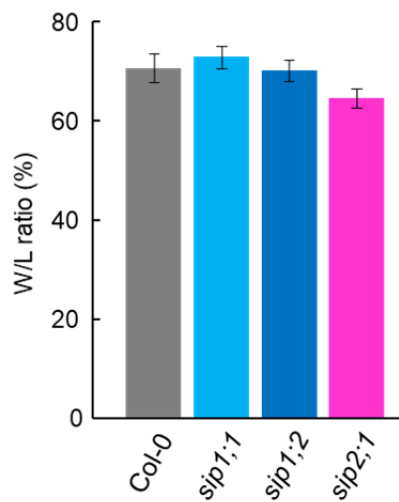


Figure 9. *sip1;1*, *sip1;2*, *sip2;1*株の葉の形状に Col-0 との違いはない

Col-0、*sip1;1*株、*sip1;2*株、*sip2;1*株の植物を 0.5×MS 寒天培地で 3 週間育て、それぞれ第一葉から順に並べ (A)、葉の縦横比を計測し、葉の形状を比較した (B)。

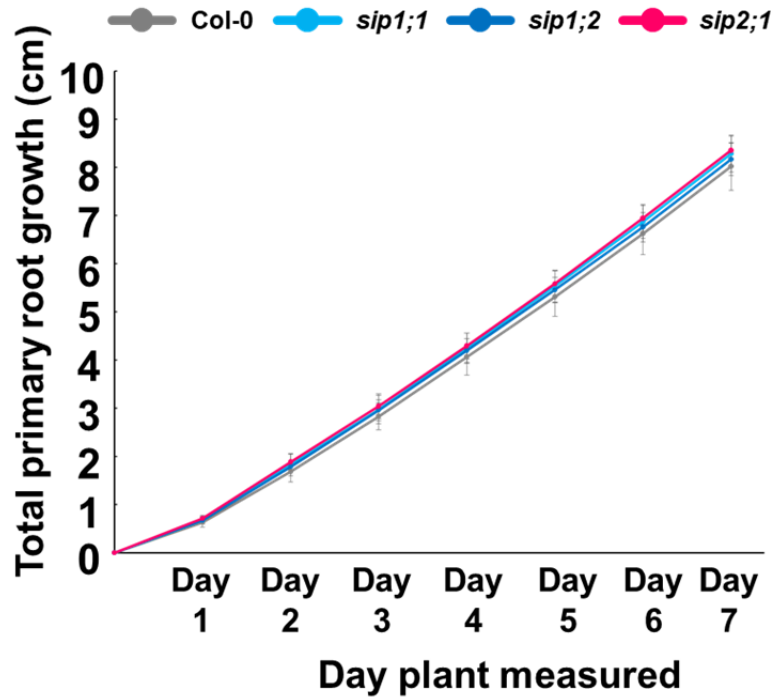


Figure 10. *sip1;1*, *sip1;2*, *sip2;1*株の主根の伸長は Col-0 のパターンと同じである Col-0、*sip1;1*株、*sip1;2*株、*sip2;1*株の植物を 0.5×MS 寒天培地で 1 週間育て、それぞれ一日ごとの伸長量を測定し、累積した結果を示した。データは平均値と SE で示した (n = 10)。

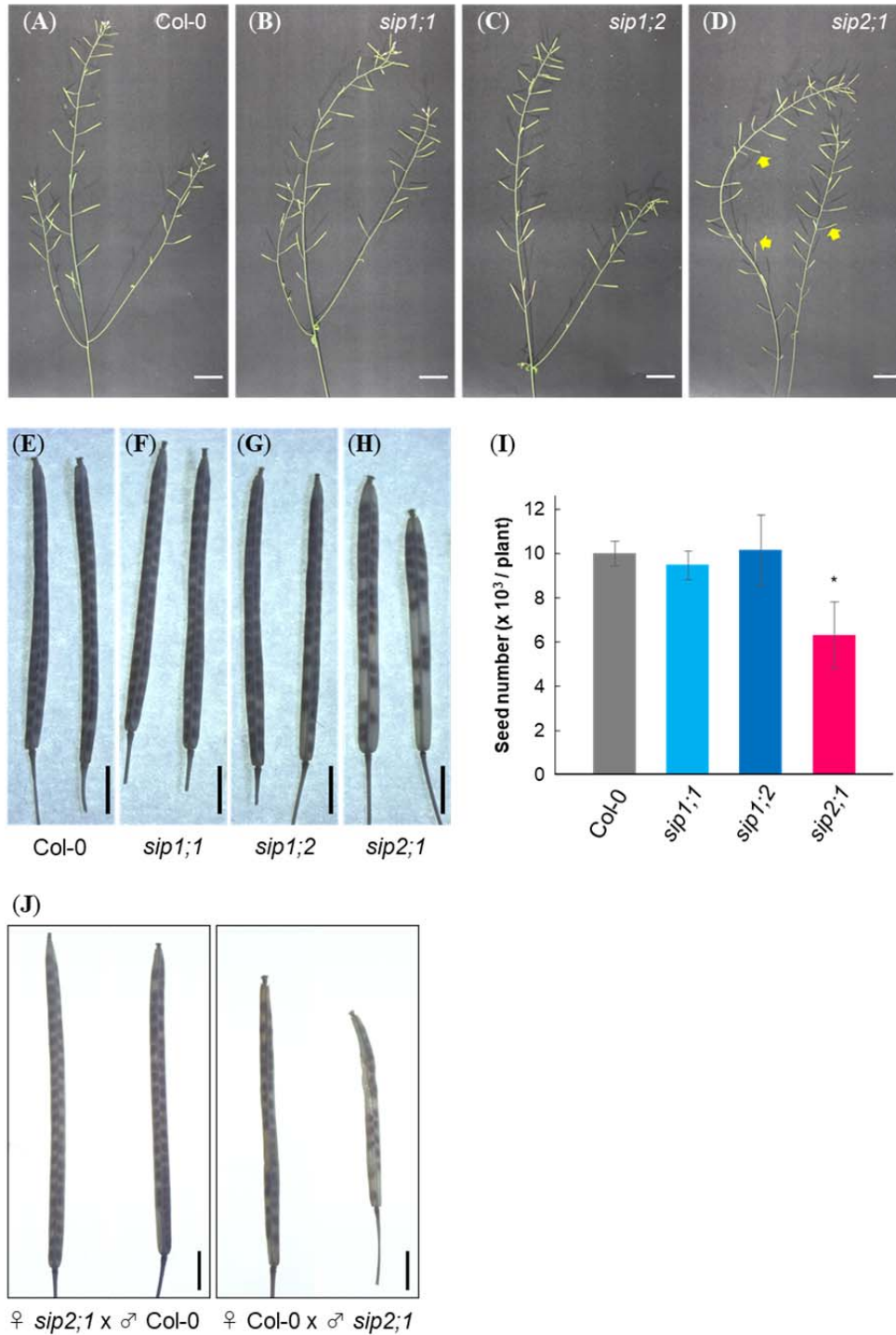


Figure 11. *sip2;1* 株での莢の長さ、種子数の減少

(A–D) 成長した Col-0、*sip1;1* 株、*sip1;2* 株、*sip2;1* 株の地上部の観察写真。*sip2;1* 株における黄色い矢印は未成熟の莢を示す。スケールバー = 2 cm. (E–H) Col-0 及び各 *sip* 株の成熟莢の表現型。莢の写真は下から光を当て撮影した。スケールバー = 2 mm. (I) Col-0

及び各 *sip* 株の植物体当たりの種子数。データは平均値と SE で示した (n = 4)。

*は有意差を示し、*P < 0.05 (Student's *t*-test). (J) 掛け合わせ。左: female (*sip2;1*) × male (Col-0)。右: female (Col-0) × male (*sip2;1*)。スケールバー = 2 mm。

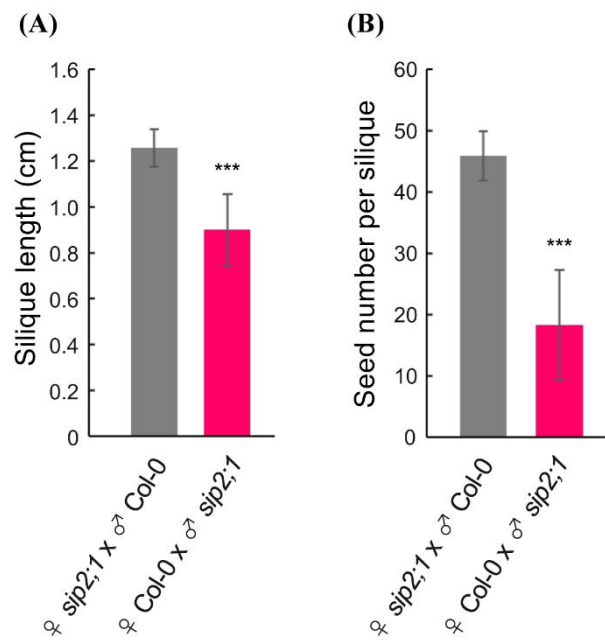


Figure 12. *sip2;1* 株の花粉では莢の長さおよび種子数の減少

sip2;1 変異株の花粉を野生株 Col-0 の雌しべの柱頭に受粉させ、またその逆に Col-0 の花粉を *sip2;1* 変異株の柱頭に受粉させ得られた莢の長さ (A) と莢当たりの種子数 (B) を示す。データは平均値および SE で示した (n = 10)。

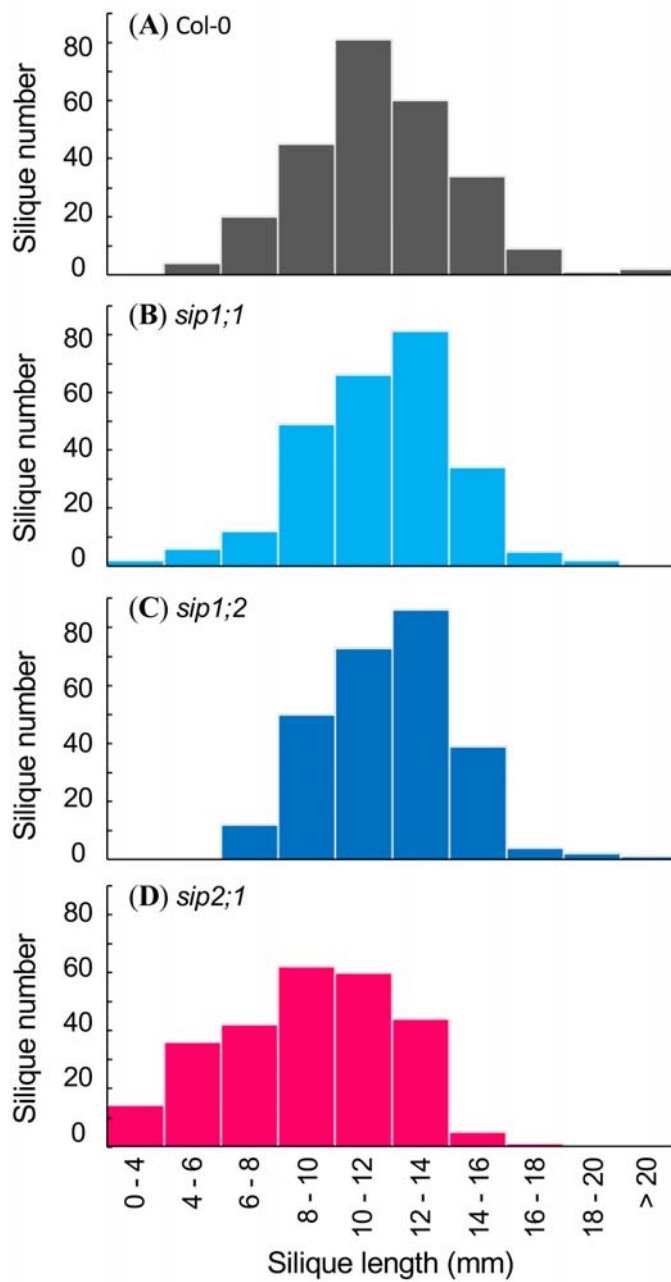
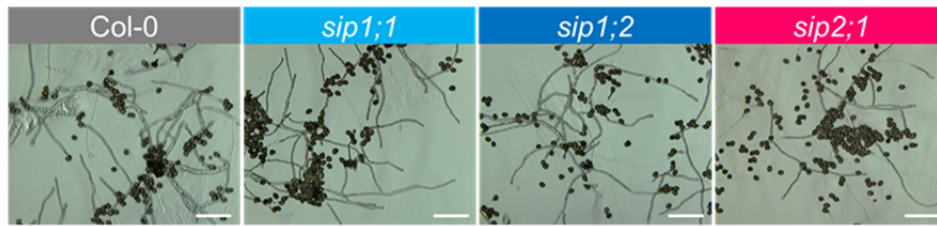


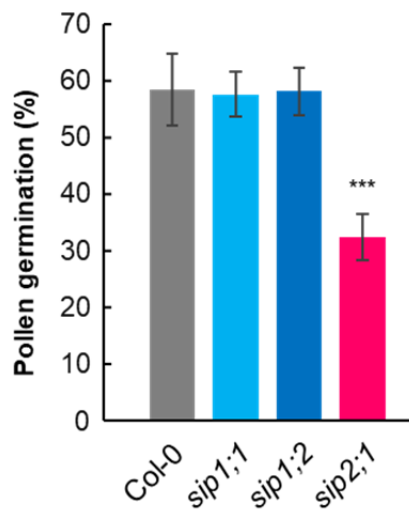
Figure 13. 莢の長さ別ヒストグラム

莢の長さのヒストグラム。Col-0 (A)、*sip1;1* (B)、*sip1;2* (C)、*sip2;1* (D) から全ての莢を採取し、それぞれの長さを計測し、グラフに示した。またそれぞれの莢の長さの平均値およびSDは次の通りであった。Col-0 (11.6 ± 2.7 mm)、*sip1;1* (11.5 ± 2.6 mm)、*sip1;2* (11.9 ± 2.3 mm)、*sip2;1* (9.0 ± 3.0 mm)。

(A)



(B)



(C)

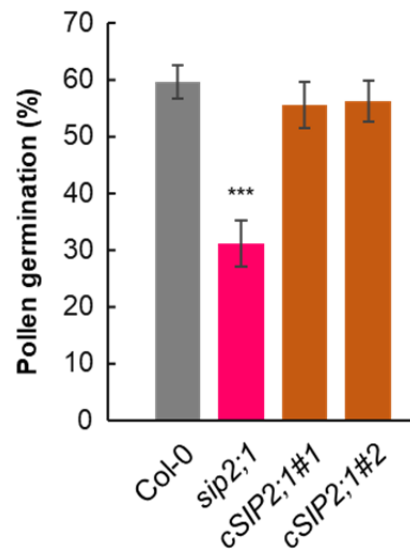


Figure 14. *sip2;1* 株での花粉発芽率の低下

(A) Col-0 および各 *sip* 変異体から採取した花粉を 22°C で花粉発芽寒天培地を用いて発芽させた。スケールバー = 200 μ m。 (B) 22°C における Col-0 及び各 *sip* 株由来の花粉の発芽率を示す。 (C) Col-0 及び *sip2;1* 株、2 つの相補株(#1 and #2) の花粉発芽率。 (B, C) データは平均値および SE で示した。*は有意差を示し、*** $P < 0.005$ (Student's *t* test, $n \geq 150$)。

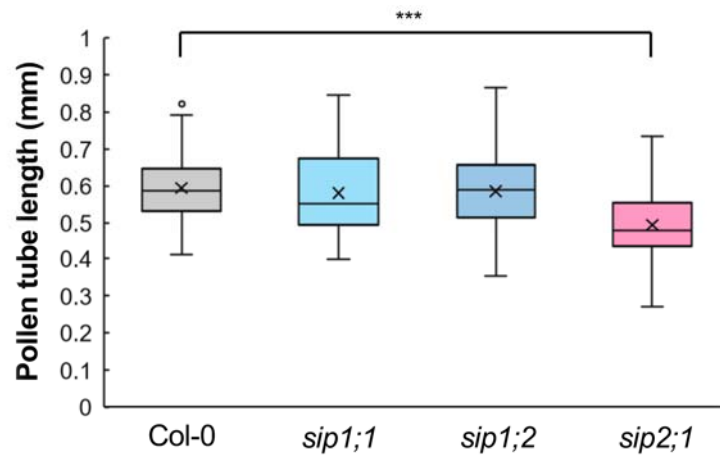


Figure 15. *sip2;1* 株由来の花における *in vitro* 条件での花粉管伸長の低下
 Col-0、*sip1;1*、*sip1;2*、*sip2;1* 由来の花粉を 22°C で 6 時間、発芽培地上に静置した。写真撮影の後、発芽した花粉管の長さを計測し箱ひげ図で示した。*は有意差を示し、*** $P < 0.005$ (Student's *t*-test; $n = 3$ 、各実験 80 個の花粉を分析)。

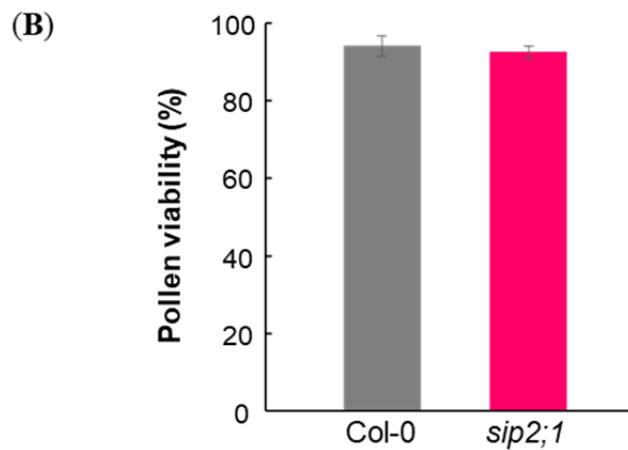
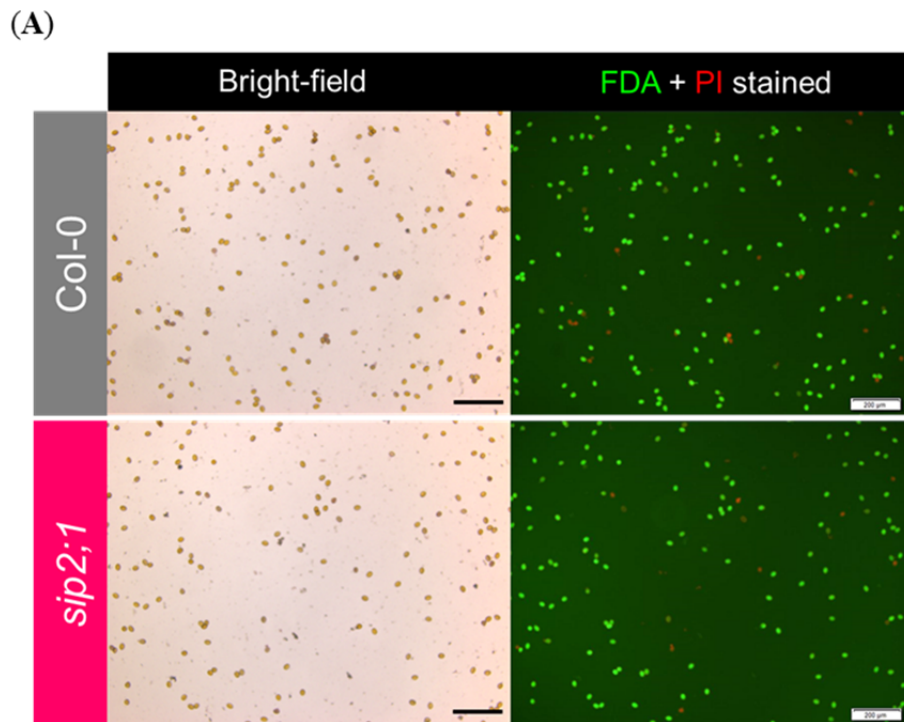


Figure 16. *sip2;1* 株由来の花粉の正常な生存率

(A) Col-0 及び *sip2;1* 株の花から花粉を採取し、花粉発芽溶液に浸し、生細胞を識別する fluorescein diacetate (FDA、生細胞は緑色) と、死細胞を染色する propidium iodide (PI、死細胞は赤色) を用いて染色した。スケールバー = 0.2 mm。(B) Col-0 と *sip2;1* 株の花粉生存率。データは、平均値および SD (各花粉 100 粒以上を分析)。*sip2;1* 株由来の花粉の生存率は Col-0 株の花粉と同程度であった。

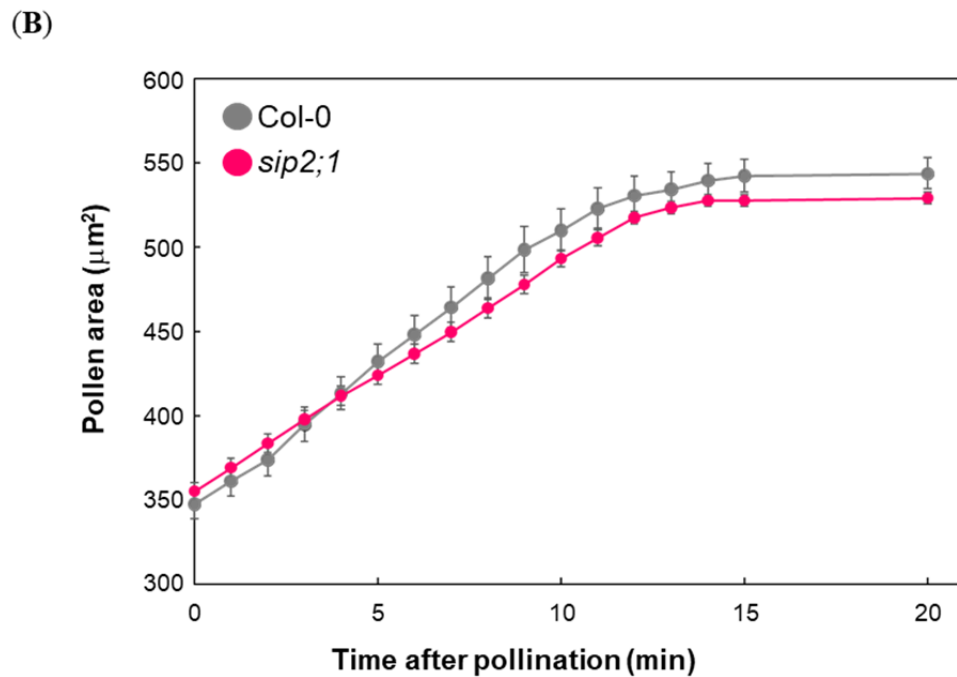
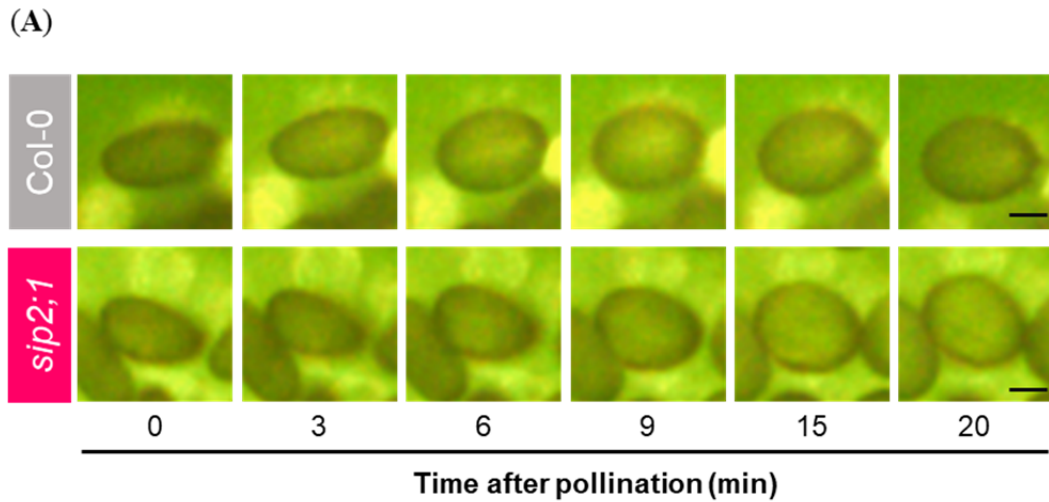


Figure 17. 受粉後の *sip2;1* 株の花粉の正常な膨潤

(A) Col-0 及び *sip2;1* 株の花粉をそれぞれの柱頭に接着させた。個々の花粉の膨潤はそれぞれ受粉後 0~20 分間観測した。(B) 花粉の面積は写真から測定した。データは平均値および SE で示した ($n \geq 17$)。受粉後の *sip2;1* 株の花粉の膨潤は Col-0 と有意差はなく正常であった。

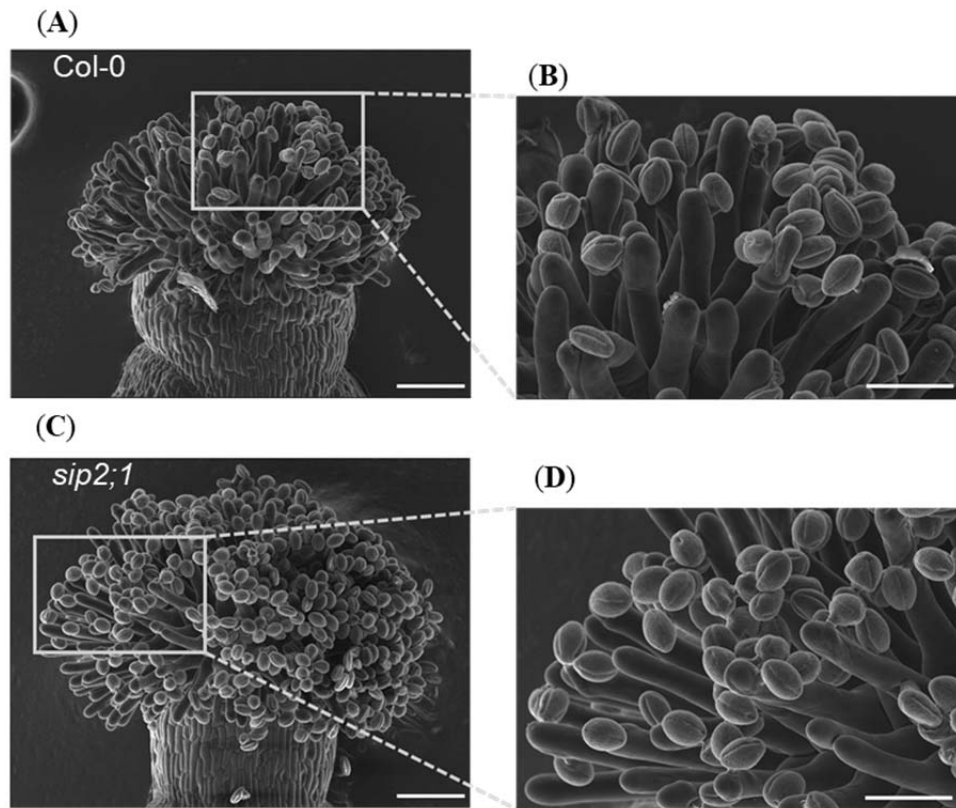


Figure 18. *sip2;1* 株における花粉の柱頭への正常な接着及び水和
Col-0 の花粉 (A、B)、*sip2;1* 株の花粉 (C、D) をそれぞれの柱頭に付着させ、30 分後の
受粉の状態を確認した。スケールバー = 100 μm (A、C) あるいは 50 μm (B、D)。*sip2;1*
株における花粉の柱頭への接着及び水和は Col-0 との差異は見られなかった。

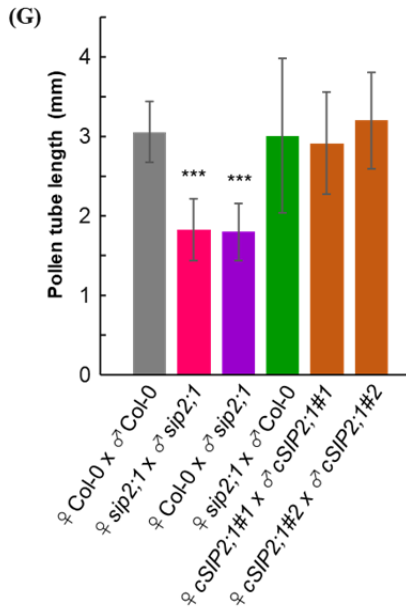
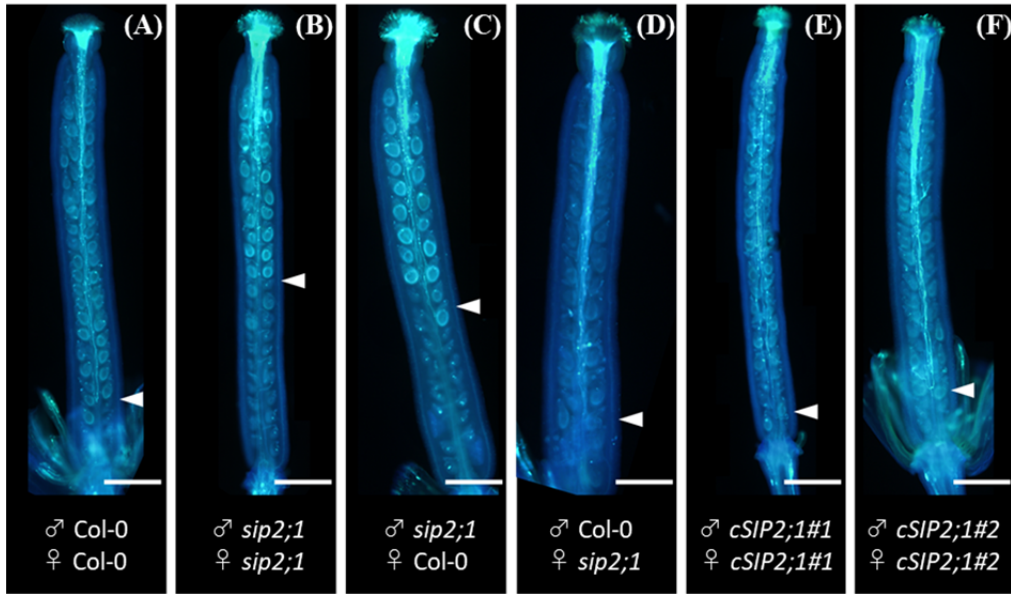


Figure 19. *sip2;1* 株の雌蕊における花粉管伸長の低下とその原因組織

花粉は Col-0 及び各 *sip* 株の花から採取し、柱頭の表面に付着させ、22°C で 24 時間反応させた。受粉後の雌蕊はアニリンブルーで染色した。掛け合わせの組合せは表記の通りに実施した。(A-F) 顕微鏡による蛍光観察。矢頭は花粉管の先端を示す。スケールバー = 0.5 mm。(G) 子房の柱頭側からの花粉管伸長測定。*sip2;1* 株由来の花粉では雌蕊において花粉管が十分には伸長せず、花柱の基部に至らなかった。(H) 花粉管の長さを示すグラフ。データは平均値および SD で示した。*は有意差を示し ***P < 0.005 (Student's *t*-test、n = 3) である。

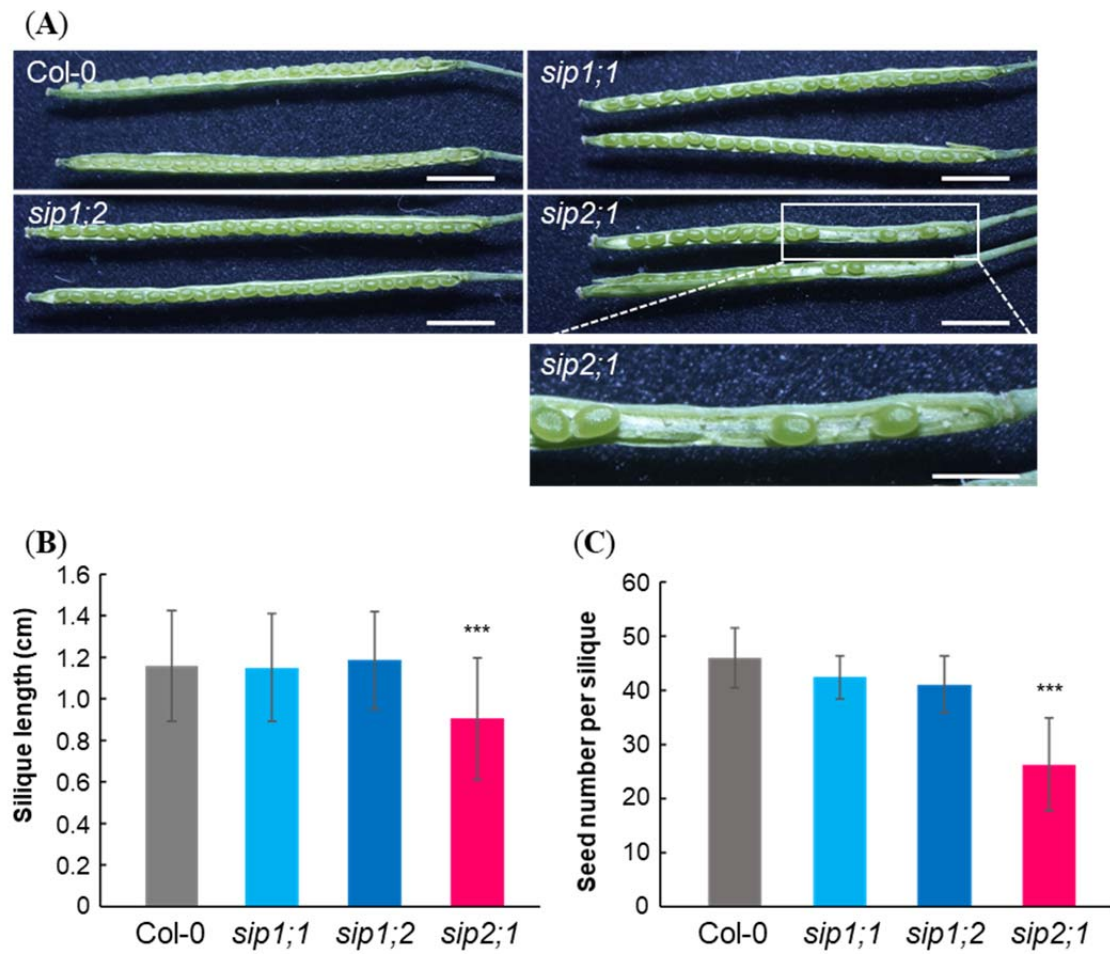


Figure 20. *sip2;1* 株の莢での種子数の減少

(A) Col-0 及び各 *sip* 株の成熟莢。Bars = 2 mm。 *sip2;1* 株の莢の拡大写真を下に示す。スケールバー = 0.5 mm。(B) Col-0 及び各 *sip* 株の莢の長さ。Error bars = SD。*は有意差を示し、*** $P < 0.005$ (Student's *t*test、 $n > 250$) である。(C) Col-0 及び各 *sip* 株の莢当たりの種子数。データは平均値および SD で示した。*は有意差を示し *** $P < 0.005$ (Student's *t*test、 $n > 20$) である。

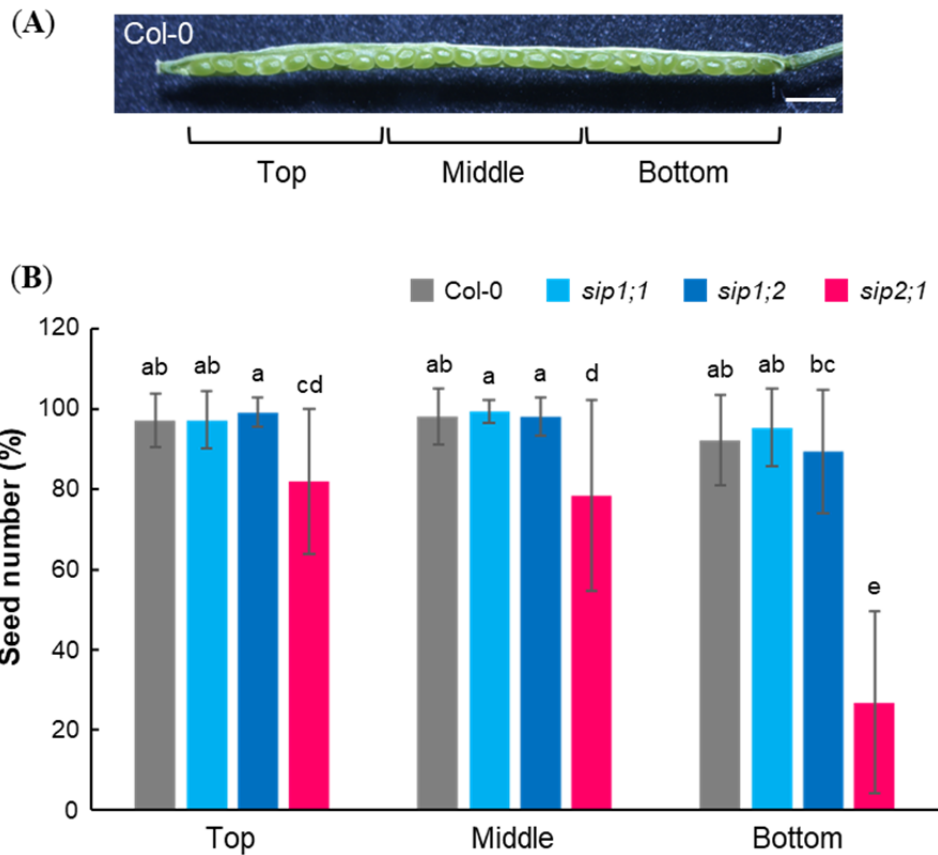


Figure 21. *sip2;1* 株の莢内における欠損した成熟種子の分布

(A) Col-0 の成熟莢の写真。莢は 3 つの領域、top、middle、bottom 領域に区分けした。bottom は雌蕊の柱頭側から離れた部位であり、茎との付け根部分を示す。矢印は種子の欠落した部分を示す。スケールバー = 1 mm。(B) Col-0 及び 各 *sip* 株の top、middle、bottom 領域において正常に受精した種子の割合を%で示す。データは平均値および SD で示した。また有意差は多重比較法を用いて検定した (Tukey's honestly significant difference test、n = 30)。

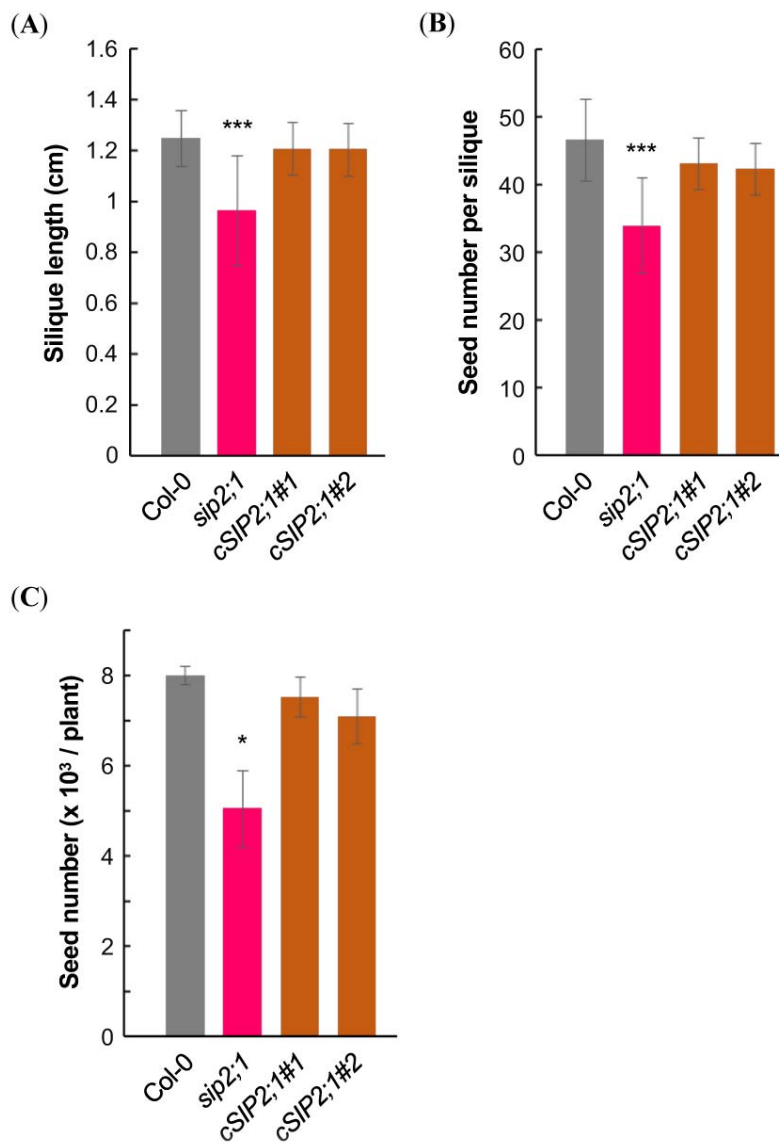


Figure 22. *SIP2;1* 遺伝子相補による *sip2;1* 株の莢の長さおよび種子収量の回復

(A) Col-0 及び *sip2;1* 株、*SIP2;1* 相補株 (*cSIP2;1#1*、*cSIP2;1#2*) の莢の長さ。データは平均値および SD で示した (n = 40)。(B) Col-0 及び *sip2;1* 株、*SIP2;1* 相補株 (*cSIP2;1#1*、*cSIP2;1#2*) の莢当たりの種子数。データは平均値および SD で示した (n = 40)。(C) Col-0 及び *sip2;1* 株、*SIP2;1* 相補株 (*cSIP2;1#1*、*cSIP2;1#2*) の植物当たりの種子数。データは平均値および SD で示した (n = 4)。*は有意差を示し、*P < 0.05、***P < 0.005 (Student's *t*-test) である。

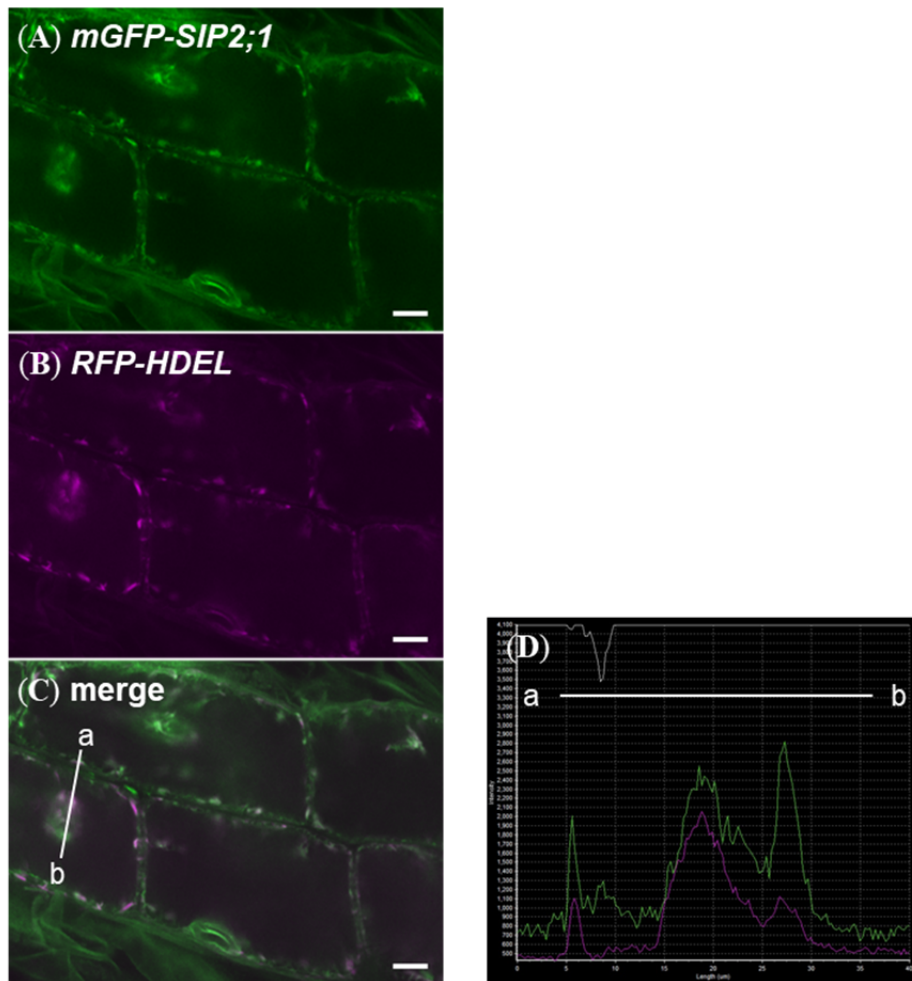


Figure 23. SIP2;1 タンパク質の細胞内での可視化

mGFP-SIP2;1 株および RFP-HDEL 株を掛け合わせて、両遺伝子を発現する株を作成し、胚軸における mGFP-SIP2;1 および RFP-HDEL を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。(A) mGFP-SIP2;1 の観察画像。(B) RFP-HDEL の観察画像。(C) mGFP-SIP2;1 画像と RFP-HDEL 画像の重ね合わせた画像。(D) パネル C の a-b の直線領域での両蛍光の強度を示すグラフ。スケールバー = 10 μ m。

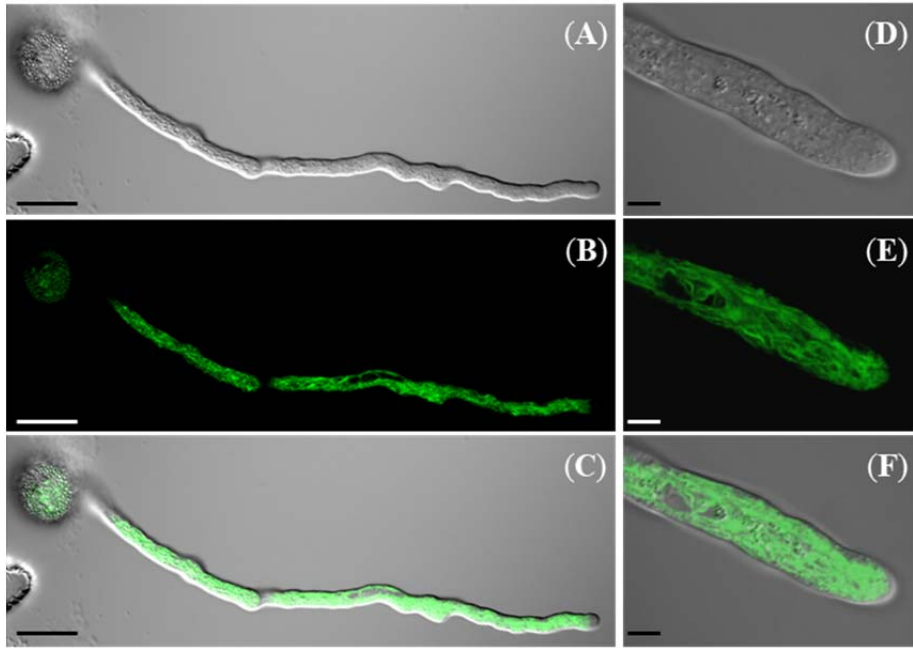


Figure 24. 花粉管伸長時の mGFP-SIP2;1 の顕微鏡解析

mGFP-SIP2;1 コンストラクトは *SIP2;1* 自己プロモーターを組み込み、*sip2;1* 株に形質転換し観察した。コンストラクトの作製は材料と方法に示す。(A、B、C) 花粉管全体。スケールバー = 20 μm 。(D、E、F) 花粉管先端領域。(B、E) 共焦点レーザー顕微鏡による画像。(A、D) DIC。(C、F) 両者の重ね合わせ画像。

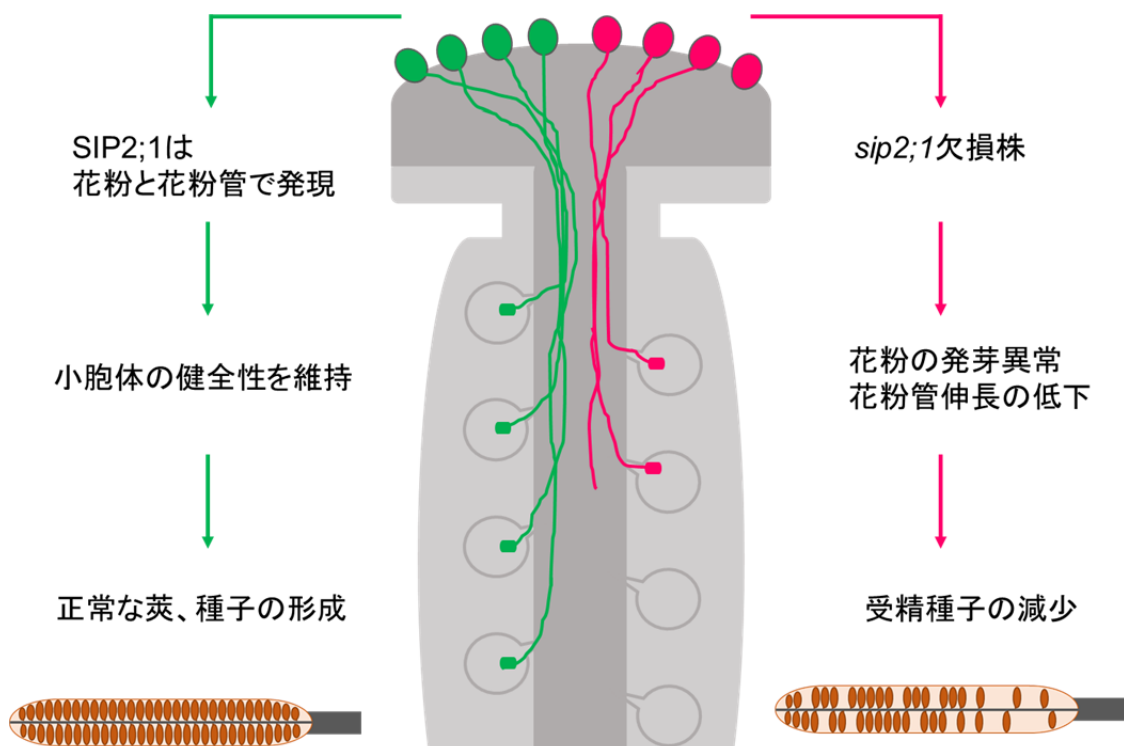


Figure 25. SIP2;1 欠損による受精への影響のまとめ

SIP2;1 が欠損すると、花粉の発芽や伸長に異常が生じ結果として種子の生産に影響がでることを模式図として示した。

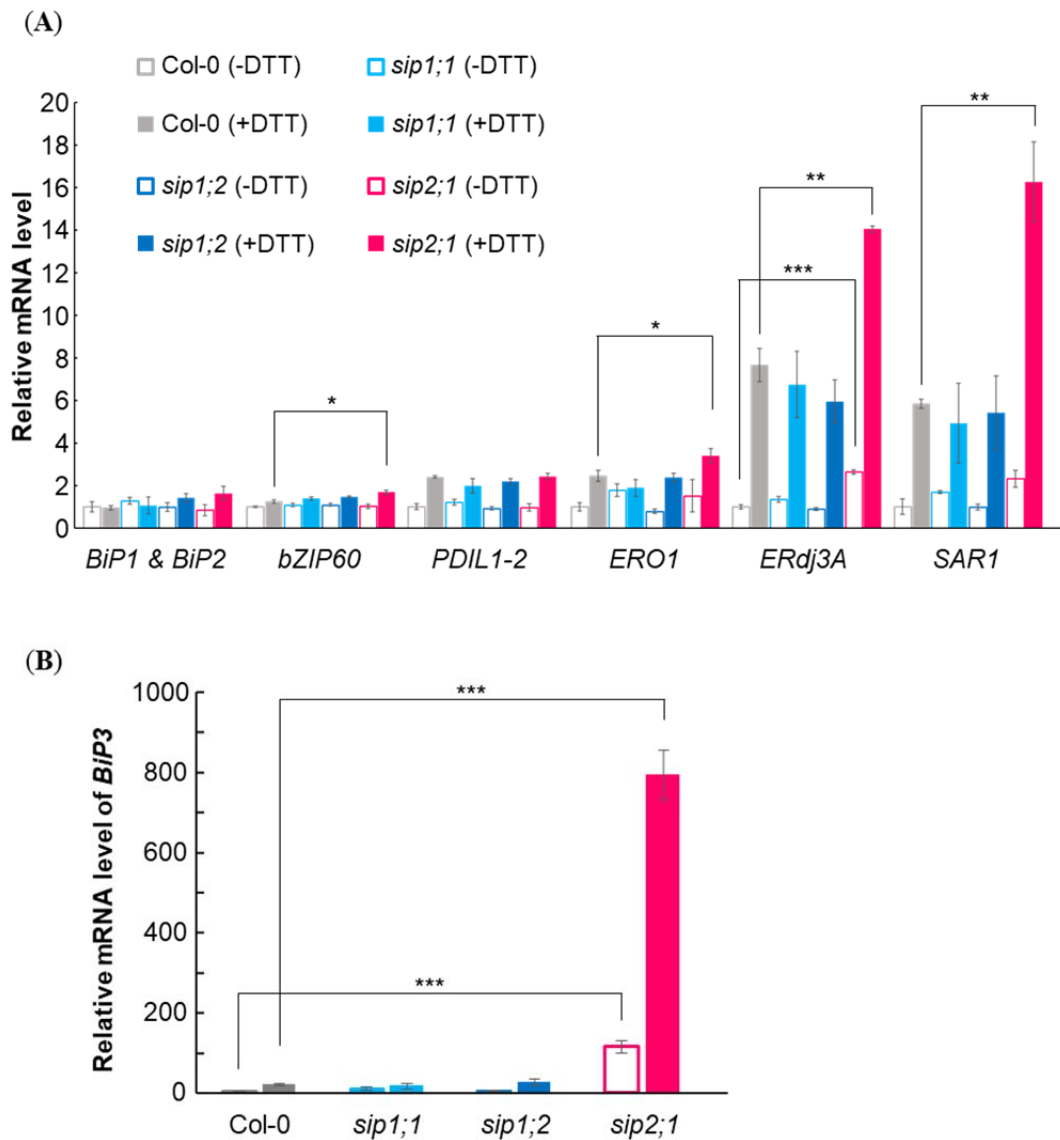


Figure 26. *sip2;1*株での小胞体ストレス関連遺伝子の上昇

Col-0、*sip1;1*株、*sip1;2*株、*sip2;1*株は0.5×MS寒天培地で2週間生育させ、2 mM DTTを含む培地及び含まない培地に移し替えて栽培した。その1週間後、Col-0及び各*sip*株から総RNAを抽出した。(A) *BiP1*と*BiP2*、*bZIP60*、*PDIL1-2*、*ERO1*、*ERdj3A*、*SAR1*の転写量を、qPCR法により測定し、それぞれDTT有り(■)と無し(□)の2通りで示す。相対値の標準値としてそれぞれCol-0のDTT処理なしで割った値で示す。(B) *BiP3*の発現量はDTT無し条件(□)、DTT有り条件(■)を分けて示す。データは平均値およびSEで示した。*は有意差を示し、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.005$ (Student's *t*-test、 $n = 3$)である。

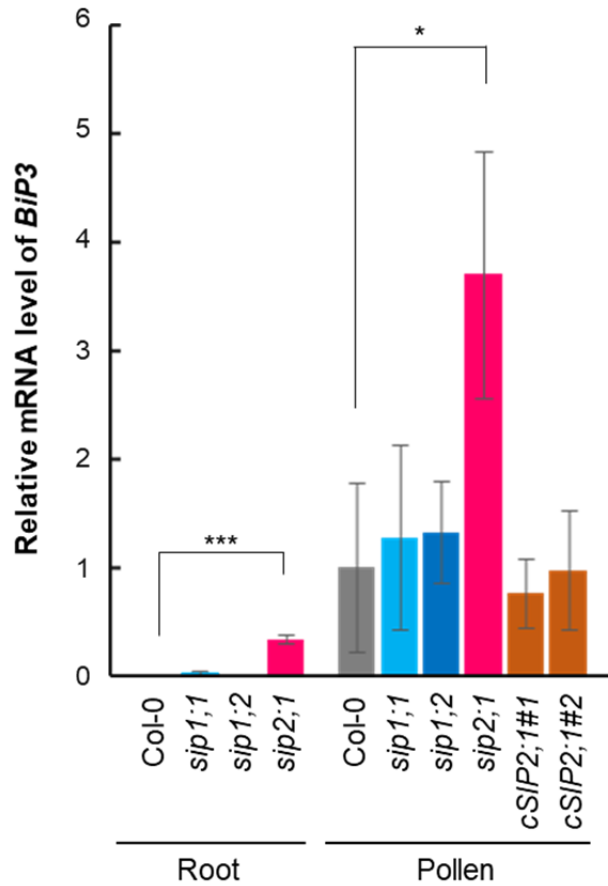


Figure 27. *sip2;1*株での *BiP3* 遺伝子の転写量の顕著な増加

Col-0 及び各 *sip* 株は 0.5× MS 寒天培地で 3 週間生育し、その後バーミキュライトと培養土を 2:1 で混合したポットに植え替えて栽培した。総 RNA 画分は根 (root) および花粉 (pollen) からそれぞれ抽出し、qPCR 法を用いて *BiP3* の mRNA 量を解析した。転写量は Col-0 の根を基準として相対値として示した。データは平均値および SE で示した。*は有意差を示し、*P < 0.05、***P < 0.005 (Student's *t*-test, n = 3) である。

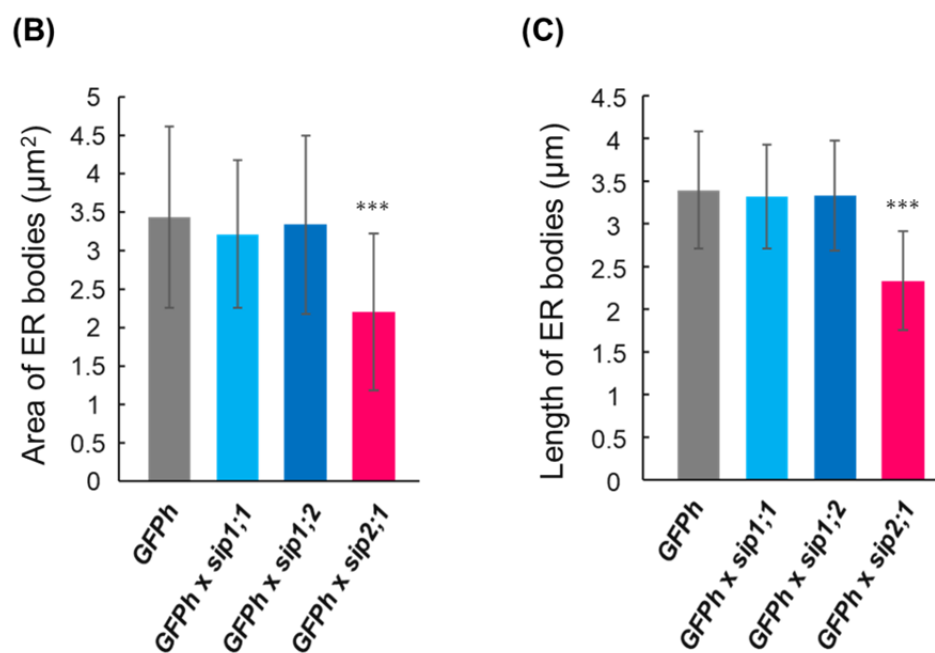
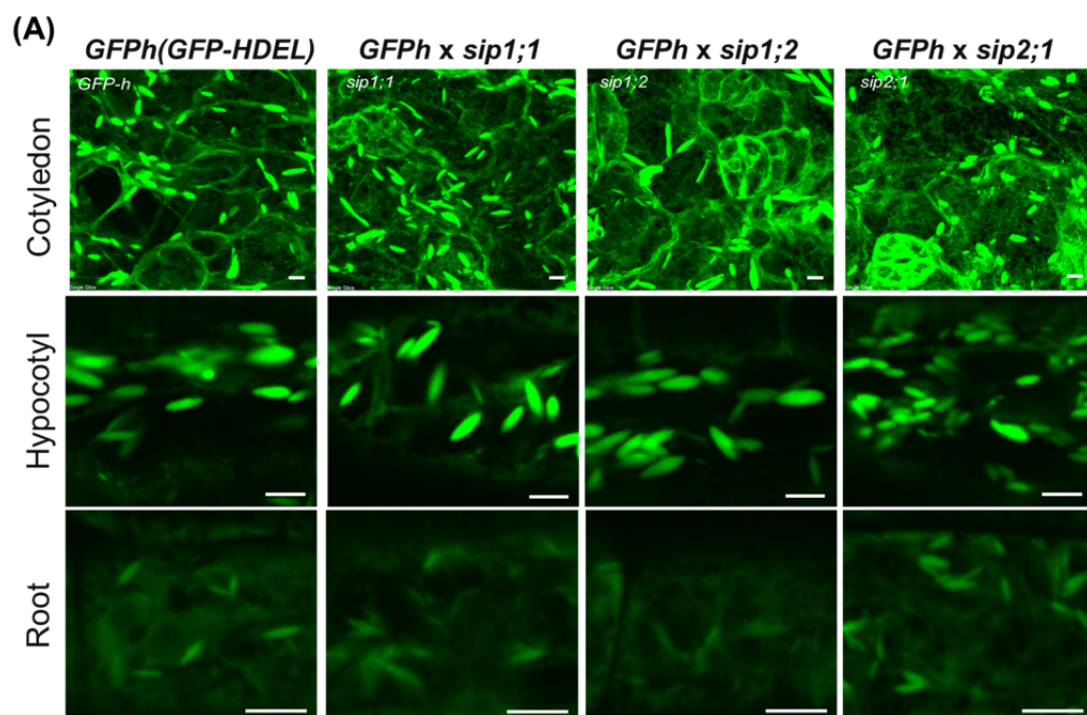


Figure 28. *GFP_h x sip2;1*株の胚軸ではER bodyの面積が小さく、長さが短い
 (A) *sip1;1*株、*sip1;2*株、*sip2;1*株それぞれとGFP融合ERマーカーの導入株(*GFP_h*)とを掛け合わせ、6日齢の植物体の子葉、胚軸、根での小胞体およびER body(緑色蛍光を示す楕円形の構造)の観察を行った。スケールバー = 5 µm。(B、C) ER bodyの面積と長さの測定。データは平均値およびSDで示した。*は有意差を示し、***P < 0.005 (Student's *t*-test、n > 100)である。

mGFP-SIP2;1

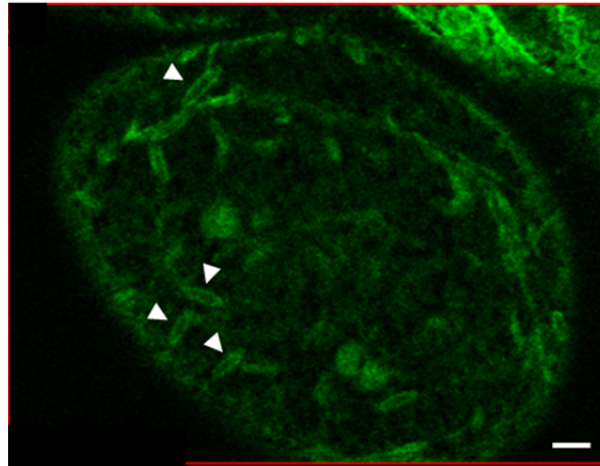


Figure 29. *mGFP-SIP2;1* 株は ER body にも局在する

SIP2;1 の欠損で ER body の形態に変化があったことから、*SIP2;1* が ER body に局在するかどうかを確認した。*mGFP* の DNA を融合した *SIP2;1* を導入した株の胚軸（表皮組織）を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。矢頭は ER body を示す。スケールバー = 5 μm 。

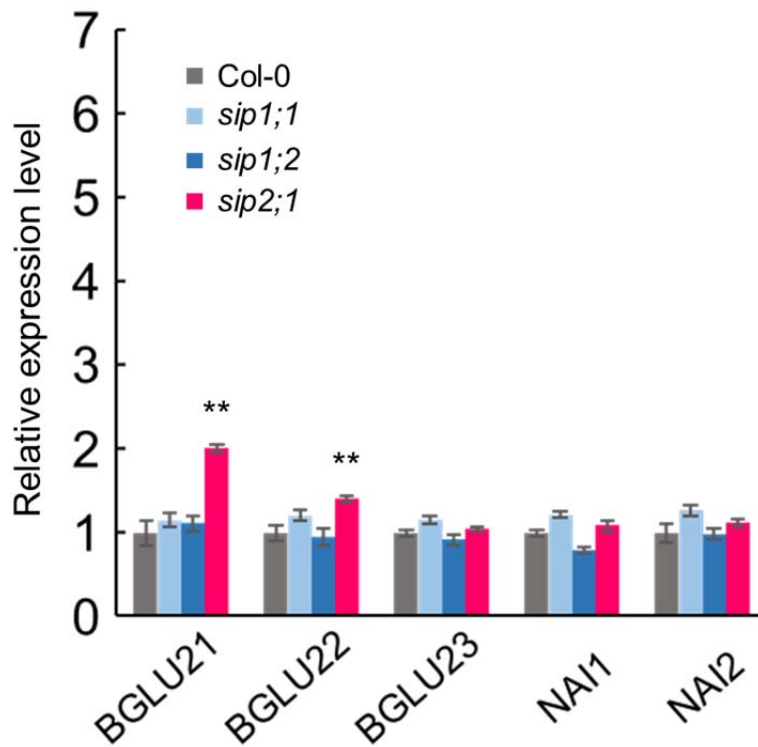


Figure 30. ER body 構成遺伝子の発現解析

6日齢の植物体の Col-0 および各 *sip* 株から RNA を抽出し、qPCR にて β -GLUCOSIDASE 21 (*BGLU21*)、*BGLU22*、*BGLU23*、*NAI1*、*NAI2* の mRNA レベルを測定した。結果は Col-0 株での各遺伝子の mRNA レベルを基準とした相対量として示した。データは平均値および SE で示した。*は有意差を示し、** $P < 0.01$ (Student's *t*-test、 $n = 3$) である。

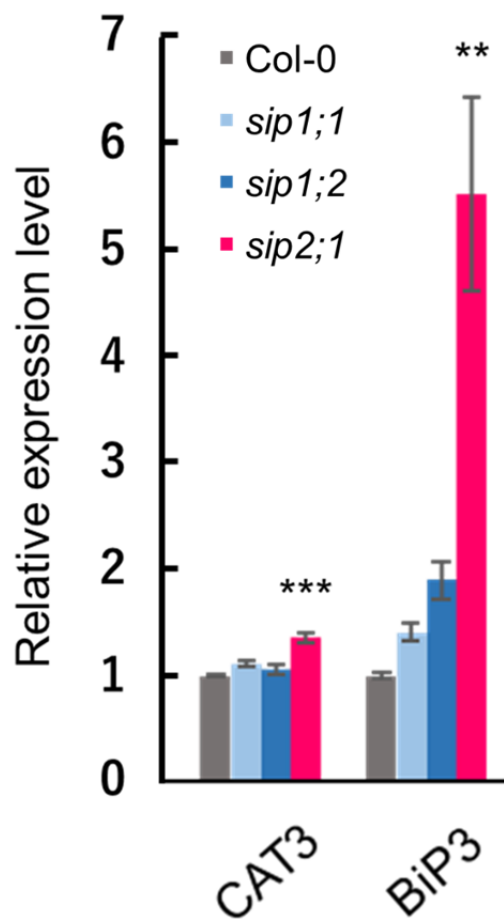


Figure 31. ストレス応答遺伝子の発現解析

6日齢の植物体の Col-0 および各 *sip* 株から RNA を抽出し、qPCR にて *CATALASE 3* (*CAT3*)、および *BiP3* の mRNA レベルを測定した。結果は Col-0 株での各遺伝子の mRNA レベルを基準とした相対量として示した。データは平均値および SE で示した。

*は有意差を示し、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.005$ (Student's *t*-test、 $n = 3$) である。

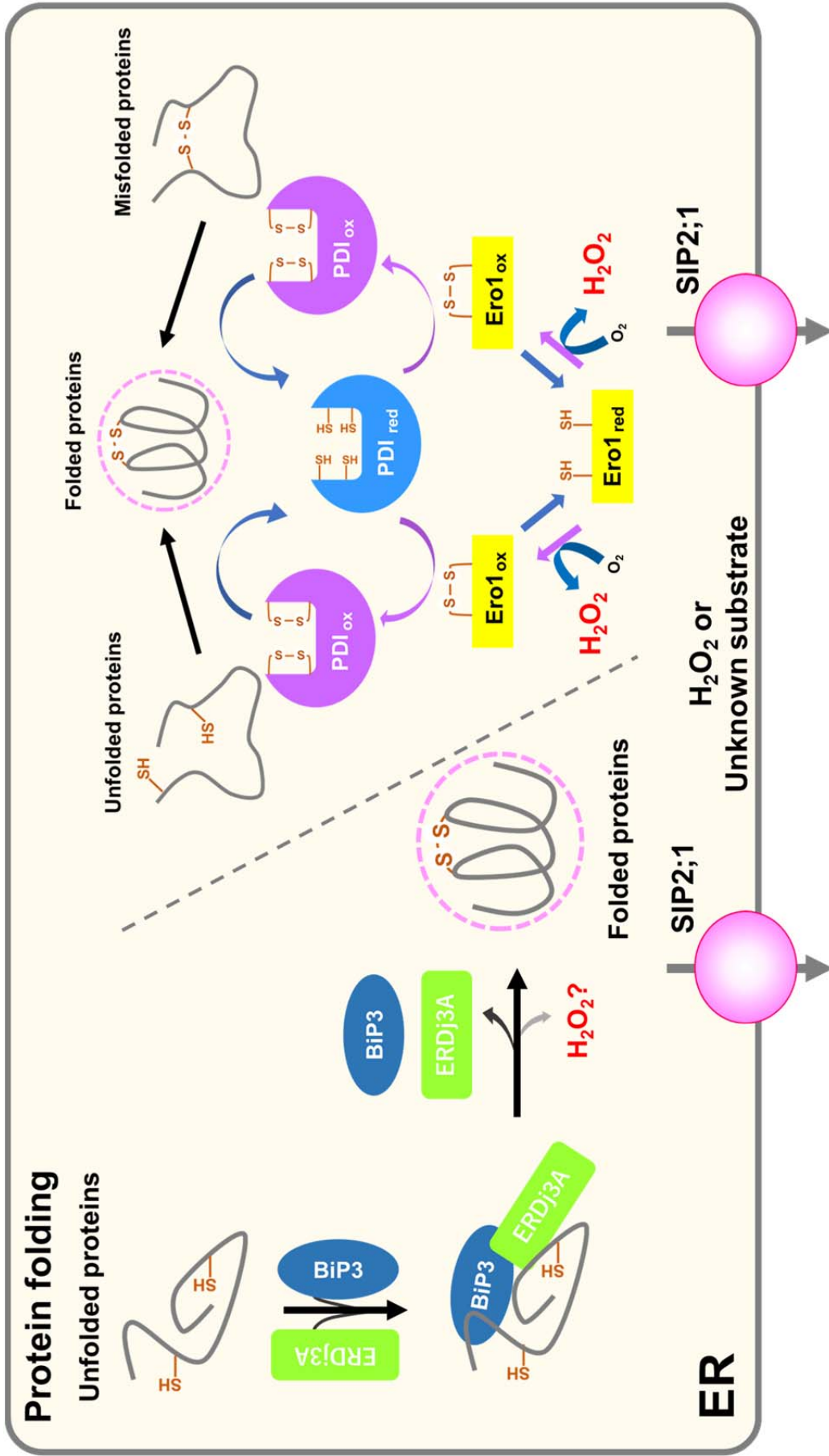


Figure 32. SIP2;1 の機能予測

SIP2;1 が欠損すると、小胞体ストレスが発生した。その際に分子シャペロンである *BiP3* の発現レベルが通常の生育で増加した。このことから SIP2;1 の欠損によって本来の小胞体の機能が低下したことが考えられる。またストレス処理時に、*ERDj3* や *AERO1* の発現レベルの有意な上昇から、これらが動く際に生じる物質を SIP2;1 が輸送していると推測した。
ox: oxidized form (活性型)、red: reduced form (不活性型)。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、温かいお心遣いのご指導、ご鞭撻を賜りました名古屋大学大学院 生命農学研究科 前島正義教授には心より感謝申し上げます。前島先生には6年間ご心配ばかりかけてしまい大変申し訳ありませんでした。どんな時も気にかけてくださりくじけるたびに温かい言葉とともに励まして頂きました。研究においても何にでもチャレンジする機会を与えてくださり、素晴らしい環境で様々なことを学ぶことができました。また中西洋一先生、河内美樹先生、瀬上紹嗣先生、田中奈月先生には研究において非常に有益な指導をいただき厚く御礼申し上げます。

本論文の審査委員をお引き受けくださった名古屋大学大学院 生命農学研究科 小俣達男教授、同 榊原 均教授に深く感謝申し上げます。

花粉に関わる実験手法や得られた結果に対するご助言、また本論文の審査委員もお引き受けいただいた名古屋大学大学院 生命農学研究科 石黒 澄衛准教授に深謝申し上げます。ER body の表現型解析では種子の分与から研究の遂行にあたり助言を頂いた甲南大学 理工学部 生物学科 西村 いくこ教授には厚く御礼申し上げます。アクアポリンの研究全般において、多数のご指摘、ご鞭撻を賜りました岡山大学 資源植物科学研究所 且原 真木教授に深く感謝申し上げます。研究における有益なご意見とご指導を賜った名古屋大学大学院 生命農学研究科 森 仁志教授に心より御礼申し上げます。

私に研究の考え方や実験の方法をご指導くださった藤原 崇志博士には深く感謝申し上げます。そして細胞ダイナミクス研究分野の皆様には6年間本当にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

最後に、長い間、常に見守り、応援してくれた家族に心より感謝いたします。

2019年4月

論文目録

主要論文

- (1) **Ryosuke Sato** and Masayoshi Maeshima (2019) The ER-localized aquaporin SIP2;1 is involved in pollen germination and pollen tube elongation in *Arabidopsis thaliana*. Submitted to *Plant Molecular Biology*. Accepted, in press.
- (2) **Ryosuke Sato** and Masayoshi Maeshima (2019) Morphological change of ER bodies in *Arabidopsis thaliana* lacking SIP2;1, in preparation.

参考論文

- (1) Hiroshi Uno, Natsuki Tanaka-Takada, **Ryosuke Sato**, and Masayoshi Maeshima (2017) Enhancement of cell wall protein SRPP expression during emergent root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 12: 10, e1368940.
- (2) Bilal Cakir, Shota Shiraishi, Aytug Tuncel, Hiroaki Matsusaka, **Ryosuke Satoh**, Salvinder Singh, Naoko Crofts, Yuko Hosaka, Naoko Fujita, Seon-Kap Hwang, Hikaru Satoh, and Thomas W. Okita (2016) Analysis of the rice ADP-glucose transporter (OsBT1) Indicates the presence of regulatory processes in the amyloplast stroma that control ADP-glucose flux into starch. *Plant Physiology*, 170: 1271–1283.
- (3) Abul Kalam Azad, **Ryosuke Sato**, Kai Ohtani, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa, and Hitoshi Shibata (2011) Functional characterization and hyperosmotic regulation of aquaporin in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Science*, 180: 375–382.