

氏 名	河合 博光
博士の専攻分野の名称	博士 (学術)
学位記号番号	博理工甲第 933 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	シロイヌナズナのグリセロール 3-リン酸輸送体ファミリータンパク質 G3Pp4 の分子生理学的解析
論文審査委員	委員長 教授 大西 純一 委員 教授 円谷 陽一 委員 准教授 小竹 敬久 委員 准教授 仲本 準

論文の内容の要旨

トリアシルグリセロール (TAG) は植物の種子や果実に含まれる主要な貯蔵脂質の一つである。TAG の生合成経路の内ジアシルグリセロールの段階までは、膜脂質の主要な成分である極性グリセロ脂質の合成系と重なっている。極性グリセロ脂質の生合成において、グリセロール 3-リン酸 (G3P) はその骨格となる重要な基質である。油糧植物のモデル植物であるシロイヌナズナにおいて G3P の生合成はプラスチドと細胞質の両画分において独立した経路で行われる。また、G3P はシロイヌナズナの病原菌応答にも関与している。近年の研究により、プラスチド - 細胞質間で G3P を直接的に輸送する経路が存在する可能性が示唆されているが、その輸送体や生理学的な意義はいまだ明らかにされていなかった。そこで、われわれは大腸菌の Major Facilitator Superfamily に属する G3P 輸送体 GlpT と相同性をもつシロイヌナズナの G3Pp ファミリーについて、逆遺伝学的な解析を行った。その結果、G3Pp ファミリーの一つである G3Pp4 が (i) 胚発達後期過程で強く発現し、(ii) シロイヌナズナの貯蔵脂質の蓄積量に関与し、(iii) プラスチド局在性を有し、さらに (iv) G3P 輸送活性を有することを明らかにした。

まず、シロイヌナズナに存在する 5 つの G3Pp ファミリータンパクについて、大腸菌の G3P 輸送体 GlpT と、その近縁のグルコース 6-リン酸輸送体 UhpC との間で、どちらにより類似性が高いかを調べた。Blast 解析を行ったところ、G3Pp4 は UhpC よりも GlpT のほうに高い類似性を示したのに対し、他の G3Pp ファミリータンパクは GlpT よりも UhpC のほうに類似性が高いことが示された。この結果より、G3Pp4 は G3P 輸送活性を持っている可能性が高いと考え、これに着目してさらに解析を行った。

G3Pp4 遺伝子のプロモーター領域 (翻訳開始点より上流 1894 bp) をクローニングし、*uidA* 遺伝子の上流に挿入したコンストラクトを構築した。このコンストラクトをアグロバクテリウム法によってシロイヌナズナに形質導入し、GUS 染色によって G3Pp4 が発現する組織を観察した。その結果、根・葉・茎のそれぞれに存在する維管束、気孔の孔辺細胞、葯および花粉、胎座および胚発達後期過程の胚において G3Pp4 の強いプロモーター活性が認められた。

G3Pp4 遺伝子座に T-DNA が挿入されたシロイヌナズナの変異株を SALK 研究所と Max-Planck 研究所からそれぞれ 1 ラインずつ取り寄せた (*g3pp4-1* と *g3pp4-2*)。これらの変異株と野生株を比較して、*g3pp4* 変

異による表現型を調べた結果、種子においていくつかの表現型が観察された。まず、種子に含まれる貯蔵脂質量を測定したところ、両変異株では野生型の約 67%まで減少していた。次に、水溶性テトラゾリウム塩を用いて種皮の透過性を調べたところ、変異株の乾燥種子はテトラゾリウム色素の侵入が観察されたことから種皮のバリア機能が低下していることが示された。一方で、植物体の大きさや稔性などにおいては野生型との違いは認められなかった。

G3Pp4 の N 末端側に EYFP が融合したキメラタンパク EYFP::G3Pp4 をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター下で発現する DNA コンストラクト (pGWB542-EYFP::cG3Pp4) を構築し、パーティクルガンを用いてタマネギ表皮細胞に対して一過的に発現させた。この細胞を共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、EYFP::G3Pp4 の蛍光シグナルは、プラスチド局在型 DsRed の蛍光シグナルと共局在性を示した。また、pGWB542-EYFP::G3Pp4 をアグロバクテリウム法を用いて *g3pp4* 変異株に形質導入したところ、種子貯蔵脂質量が野生型レベルまで回復した。これらの結果より、プラスチド局在能を有する EYFP::G3Pp4 はシロイヌナズナにおける G3Pp4 本来の機能を持つことが示された。一方で、G3Pp4 の C 末端側に sGFP が融合したキメラタンパク G3Pp4::sGFP の蛍光シグナルは内膜系に局在したが、*g3pp4* 変異株の表現型を相補することはできなかった。

Keio Collection より取り寄せた、*GlpT* 遺伝子を欠損し G3P 取り込み活性が欠失した大腸菌 *ΔglpT* 変異株に、pGWB542-EYFP::G3Pp4 を導入したところ、その菌体による ¹⁴C-G3P の取り込み活性が検出された。この結果より、G3Pp4 は G3P 輸送機能を有することが示された。以上の結果より、シロイヌナズナの G3Pp4 は胚発達後期過程において特に発現するプラスチド局在型 G3P 輸送体であることが示された。貯蔵脂質の蓄積に関与することから、プラスチドで合成された G3P を細胞質へ輸送することで、小胞体で行われる TAG の生合成に寄与していることが考えられる。また、種皮のバリア機能にも関与することから、細胞外脂質エステル生合成にも関与することも想定される。この研究により、これまでによく知られたプラスチド型リン酸輸送体とは異なるタイプのプラスチド-細胞質間における新しい代謝物輸送経路の存在が明らかにされた。

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、2014年2月17日に埼玉大学理学部3号館で論文発表会を公開で開催した。発表会には学位論文審査委員会委員のみならず、分子生物学コース後期課程担当教員も多数出席し活発な質疑応答に加わった。以下に論文審査結果を要約する。

トリアシルグリセロール (TAG) は植物の種子や果実に含まれる主要な貯蔵脂質の一つである。TAGの生合成経路の内、ジアシルグリセロールの段階までは、膜脂質の主要な成分である極性グリセロ脂質の合成系と重なっている。極性グリセロ脂質の生合成において、グリセロール 3-リン酸 (G3P) はその骨格となる重要な基質である。油糧植物のモデル植物であるシロイヌナズナにおいて G3P の生合成はプラスチドと細胞質の両画分において独立した経路で行われる。また、G3P はシロイヌナズナの病原菌応答にも関与している。近年の研究により、プラスチド - 細胞質間で G3P を直接的に輸送する経路が存在する可能性が示唆されているが、その輸送体や生理学的な意義はいまだ明らかにされていなかった。そこで、われわれは大腸菌の Major Facilitator Superfamily に属する G3P 輸送体 GlpT と相同性をもつシロイヌナズナの G3Pp ファミリーについて逆遺伝学的な解析を行った。その結果、G3Pp ファミリーの一つである G3Pp4 が、(i) 胚発達後期過程で強く発現し、(ii) シロイヌナズナの貯蔵脂質の蓄積量に関与し、(iii) プラスチド局在能を有し、さらに、(iv) G3P 輸送活性を有することを明らかにした。

まず、シロイヌナズナに存在する 5 つの G3Pp ファミリータンパクについて、大腸菌の G3P 輸送体である GlpT と、その近縁のグルコース 6-リン酸輸送体 UhpC との間で、どちらにより類似性が高いかを調べた。Blast 解析を行ったところ、G3Pp4 は UhpC よりも GlpT のほうに高い類似性を示したのに対し、他の G3Pp ファミリータンパクは GlpT よりも UhpC のほうに類似性が高いことが示された。この結果より、G3Pp4 は G3P 輸送活性を持っている可能性が高いと考え、これに着目してさらに解析を行った。

G3Pp4 遺伝子のプロモーター領域 (翻訳開始点より上流 1,894 bp) をクローニングし、*uidA* 遺伝子の 5' 上流に挿入したコンストラクトを構築した。このコンストラクトをアグロバクテリウム法によってシロイヌナズナに形質導入し、GUS 染色によって *G3Pp4* が発現する組織を観察した。その結果、根・葉・茎のそれぞれに存在する維管束、気孔の孔辺細胞、蒴および花粉、胎座および胚発達後期過程の胚において *G3Pp4* の強いプロモーター活性が認められた。

G3Pp4 遺伝子座に T-DNA が挿入されたシロイヌナズナの変異株を SALK と GABI-KAT からそれぞれ 1 ラインずつ取り寄せた (*g3pp4-1* と *g3pp4-2*)。これらの変異株と野生株を比較して、

g3pp4 変異による表現型を調べた結果、種子においていくつかの表現型が観察された。まず、種子に含まれる貯蔵脂質量を測定したところ、両変異株では野生型の約 80% まで減少していた。次に、水溶性テトラゾリウム塩を用いて種皮の透過性を調べたところ、変異株の乾燥種子ではテトラゾリウム色素の侵入が観察されたことから、種皮のバリア機能が低下していることが示された。一方で、植物体の大きさや稔性などにおいては野生型との違いは認められなかった。

G3Pp4 の N 末端側に EYFP が融合したキメラタンパク EYFP::*G3Pp4* をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター下で発現する DNA コンストラクト (pGWB542-EYFP::*cG3Pp4*) を構築し、パーティク

ルガンを用いてタマネギ表皮細胞に対して一過的に発現させた。この細胞を共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、EYFP::G3Pp4 の蛍光シグナルは、プラスチド局在マーカーである pWxTP-DsRed の蛍光シグナルと共局在性を示した。また、pGWB542-EYFP::G3Pp4 をアグロバクテリウム法を用いて *g3pp4* 変異株に形質導入したところ、種子貯蔵脂質含量が野生型レベルまで回復した。これらの結果より、プラスチド局在性を有する EYFP::G3Pp4 はシロイヌナズナにおける G3Pp4 本来の機能を持つことが示された。一方で、G3Pp4 の C 末端側に sGFP が融合したキメラタンパク G3Pp4::sGFP の蛍光シグナルは内膜系に局在したが、*g3pp4* 変異株の表現型を相補することはできなかった。

Keio Collection より取り寄せた、*GlpT* 遺伝子を欠損し G3P 取り込み活性が欠失した大腸菌変異株 (*ΔglpT*) に、pGWB542-EYFP::G3Pp4 を導入したところ、その菌体による ¹⁴C-G3P の取り込み活性が検出された。この結果より、G3Pp4 は G3P 輸送機能を有することが示された。

以上の結果より、シロイヌナズナの *G3Pp4* は胚発達後期過程において特に高発現するプラスチド局在型 G3P 輸送体であることが示された。貯蔵脂質の蓄積に関与することから、プラスチドで合成された G3P を細胞質へ輸送することで、小胞体で行われる TAG の生合成に寄与していることが考えられる。また、種皮のバリア機能にも関与することから、細胞外脂質の生合成にも関与することも想定される。この研究により、これまでによく知られたプラスチド型リン酸輸送体とは異なるタイプのプラスチド-細胞質間における新しい代謝物輸送経路の存在が明らかにされた。

上述のとおり本論文は学術的に新規で有意義な研究結果を含んでいる。これらの一部は既に国際誌に掲載あるいは採択されている。以上のことから、本学位論文審査会は、本論文を博士（学術）の学位を授与するに値するものと判断し、合格と判定した。