

植物細胞は、多くのタンパク質を細胞壁や細胞間隙などに分泌している。それらのタンパク質は、細胞壁の構築、構造変化、病原体に対する防御やさまざまなシグナル伝達に関与し、重要な生理機能を担っていると予想される。動物細胞では、多くの分泌タンパク質が同定され、それらを対象にタンパク質の分泌機構が盛んに研究されている。しかし、植物では分泌タンパク質自体についての情報も少なく、分泌機構に関する知見も十分ではない。そこで本研究では、タバコ BY2 培養細胞を材料に、新規分泌タンパク質の単離を行い、同定したタンパク質を指標に用いて、分泌機構を N-結合型糖鎖の役割を中心に調べた。さらに、小胞体ストレスの情報伝達に関わると考えられる IRE1 のホモログをイネより単離し、その機能解析を行った。

BY2 細胞は増殖に伴って大量のタンパク質を培養液中に分泌する。二次元電気泳動によって、100 個以上の分泌タンパク質を確認した。その多くは塩基性の糖タンパク質であった。さらに培養液中のタンパク質を陽イオン交換カラムと SDS-PAGE によって精製し、主要な 6 個について、N 末端あるいは内部のアミノ酸配列を決定した。これらのタンパク質のうち 2 つは、タバコで既知のペルオキシダーゼであった。他の 3 つは部分アミノ酸配列の相同性検索により、それぞれアスコルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-グルカンエキソヒドロラーゼであることが予想された。残りの 1 つについては、部分アミノ酸配列に基づいて単離した cDNA の配列より、コムギで全身獲得抵抗性に関連して誘導されるタンパク質のホモログではないかと考えられた。NiPRp27 と名付けたこのタンパク質は、病原菌感染の他、傷害やエチレン、乾燥などのストレス処理に応答して mRNA が蓄積することから、新しい塩基性の PR (pathogenesis-related) タンパク質であると結論した。

培養液中のタンパク質のほとんどが糖タンパク質であったことから、引き続き BY2 培養細胞を用いて分泌と糖鎖の関連を調べた。先に同定した特に分泌量の多い糖タンパク質であるペルオキシダーゼを指標として用い、糖鎖の付加、あるいはプロセッシングの分泌への影響を調べた。糖鎖合成阻害剤であるツニカマイシンによる処理は、細胞外へのタンパク質分泌をほぼ完全に阻害した。それに対して、糖鎖のプロセッシング阻害剤であるカスタノスペルミンによる処理は分泌への影響は少なく、糖鎖がプロセッシングされないペルオキシダーゼでも一部細胞外に分泌されることが示された。分泌阻害の原因として、糖鎖の異常がタンパク質のフォールディングを妨げることが考えられたため、薬剤処理が BiP をはじめとする小胞体シャペロン遺伝子の転写に及ぼす影響を調べた。その結果、ツニカマイシン処理、カスタノスペルミン処理共に BiP を誘導することが示された。このことは、薬剤処理により小胞体ストレスがかかり、フォールディングの異常なタンパク質 (unfolded protein) が小胞体内に蓄積することを示唆している。

小胞体ストレスにより、小胞体のシャペロンやフォールディング酵素が転写レベルで誘導されるという現象は UPR (unfolded protein response) と呼ばれ、小胞体から核への情報伝達系を介する、真核生物で広く保存されたストレス応答である。高等植物における UPR 情報伝達機構の解析の手がかりとして、酵母で UPR 情報伝達のシグナル分子として同定されている IRE1 のホモログを探索した。Ire1p は小胞体膜上に存在すると考えられる膜貫通型の kinase/RNase で、転写因子 Hac1p の産生を mRNA のスプライシングレベルで制御することで小胞体シャペロン遺伝子群の転写レベルの誘導に関与する。Ire1p と相同性のあるポリペプチドをコードするイネ EST クローンの配列をもとに cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、イネ IRE1 ホモログの全長鎖 cDNA (*OsIre1*; *Oryza sativa* Ire1) を単離した。予想されるアミノ酸配列から、*OsIre1* タンパク質は、N 末端にシグナルペプチド、中央部に膜貫通ドメインをもち、C 末端側には保存された kinase ドメインと RNase ドメインが存在することが示された。小胞体内腔に存在し、unfolded protein のセンサーとして機能すると考えられている N 末端側の領域については酵母との相同性は低かった。また、*OsIre1* の mRNA は、イネ植物体の各組織で低いレベルながら恒常的に発現していた。GFP 融合タンパク質を用いて細胞内局在性を調べたところ、*OsIre1* タンパク質は核膜・小胞体上に存在することが示された。*OsIre1* の構造、細胞内局在などは酵母 Ire1p と類似しており、イネ細胞内で UPR のシグナル分子として機能している可能性が示唆された。

酵母 Ire1p はオリゴマー化と自己リン酸化により下流へのシグナル伝達経路を活性化すると考えられているが、大腸菌で GST 融合タンパク質として大量発現させた OsIre1 タンパク質も、*in vitro* で自己リン酸化能を有していた。さらに、OsIre1 がイネ細胞内で UPR 情報伝達に関与するかどうかを調べるため、一過的発現系、あるいは OsIre1 の発現レベルを変化させた形質転換植物を用いた機能解析を行った。しかし、どちらの系によっても OsIre1 がイネ細胞内で UPR のシグナル分子として機能しているという明確な結果は得られなかった。

そこで、OsIre1 が酵母内で機能的かどうかを検討するため、*ire1* 欠損株 ( $\Delta ire1$ ) を用いた相補性試験を行った。酵母  $\Delta ire1$  細胞は、UPR の誘導ができず、ツニカマイシンを含む培地上では生育が著しく阻害される。OsIre1 全長鎖 cDNA を  $\Delta ire1$  細胞に導入し、恒常的に発現させた時は、 $\Delta ire1$  細胞のツニカマイシン耐性は復帰しなかった。このことから、OsIre1 の N 末端側か C 末端側のどちらか、あるいはその両方が酵母では機能しないことが考えられる。特にイネと酵母で相同性の低い N 末端のセンサー部分が共通に機能するかどうかを調べるため、OsIre1 の N 末端ドメインのみを酵母の相当する領域と置換したイネ/酵母のキメラ IRE1 コンストラクトを作成し、 $\Delta ire1$  細胞で発現させてその影響をみた。その結果、キメラ IRE1 の発現は  $\Delta ire1$  細胞のツニカマイシン耐性を復帰させ、OsIre1 の N 末端センサー領域は酵母でも機能することが示された。このことから、OsIre1 がイネ細胞内で小胞体内での *unfolded protein* の蓄積を感知して活性化され、下流に何らかの情報を伝えるシグナル分子として機能している可能性が示唆された。

本研究により、新規の PR タンパク質や細胞壁タンパク質を同定するなど、高等植物の分泌タンパク質についての新しい知見を得た。また、高等植物からはじめて IRE1 ホモログ遺伝子を単離し、UPR 情報伝達経路を解明する手がかりを得た。これらの知見は、高等植物でタンパク質分泌機構を解析するためのモデルシステムの確立や、UPR 情報伝達経路の解析のために役立つと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 奥島葉子

本研究では、タバコ BY2 培養細胞を材料に、新規分泌タンパク質の単離を行い、同定したタンパク質を指標に用いて、分泌機構を N-結合型糖鎖の役割を中心に調べた。さらに、小胞体ストレスの情報伝達に関わると考えられる IRE1 のホモログをイネより単離し、その機能解析を行った。

BY2 細胞は増殖に伴って大量のタンパク質を培養液中に分泌する。二次元電気泳動によって、100 個以上の分泌タンパク質を確認した。その多くは塩基性の糖タンパク質であった。そのうち、主要な 6 個について、N 末端あるいは内部のアミノ酸配列を決定し、機能を同定した。その結果、ペルオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、 $\beta$ -D-グルカンエキソヒドロラーゼなどが得られた。未知の 1 個は、部分アミノ酸配列に基づいて単離した cDNA の配列より、コムギで全身獲得抵抗性に関連して誘導されるタンパク質のホモログであった。NiPRp27 と名付けたこのタンパク質は、病原菌感染、傷害、エチレン、乾燥などのストレス処理に反応して mRNA が蓄積することから、新しい塩基性の PR (pathogenesis-related) タンパク質であると結論した。

培養液中のタンパク質のほとんどが糖タンパク質であったことから、引き続き BY2 培養細胞を用いて分泌と糖鎖の関連を調べた。ペルオキシダーゼを指標として用い、糖鎖の付加、あるいはプロセシングの分泌への影響を調べた。糖鎖合成阻害剤であるツニカマイシンによる処理は、細胞外へのタンパク質分泌をほぼ完全に阻害した。それに対して、糖鎖のプロセシング阻害剤であるカスタノスペルミンによる処理は分泌への影響は少なく、糖鎖がプロセシングされないペルオキシダーゼでも一部細胞外に分泌されることが示された。このことは、薬剤処理により小胞体ストレスがかかり、フォールディングの異常なタンパク質 (unfolded protein) が小胞体内に蓄積することを示唆した。

小胞体ストレスにより、小胞体のシャペロンやフォールディング酵素が転写レベルで誘導されるという現象は UPR (unfolded protein response) と呼ばれる。そこで、酵母で UPR 情報伝達のシグナル分子として同定されている IRE1 のホモログを探索した。Ire1p と相同性のあるポリペプチドをコードするイネ EST クローンの配列をもとに cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、イネ IRE1 ホモログの全長鎖 cDNA (*OsIre1*; *Oryza sativa* Ire1) を単離した。GFP 融合タンパク質を用いて細胞内局在性を調べたところ、*OsIre1* タンパク質は核膜・小胞体上に存在することが示された。*OsIre1* の構造、細胞内局在などは酵母 Ire1p と類似しており、イネ細胞内で UPR のシグナル分子として機能している可能性が示唆された。そのことを検討するため、酵母の *ire1* 欠損株 ( $\Delta ire1$ ) を用いた相補性試験を行った。酵母  $\Delta ire1$  細胞は、UPR の誘導ができず、ツニカマイシンを含む培地上では生育が著しく阻害される。*OsIre1* 全長鎖 cDNA を  $\Delta ire1$  細胞に導入し、恒常的に発現させた時は、 $\Delta ire1$  細胞のツニカマイシン耐性は復帰しなかった。しかし、*OsIre1* の N 末端ドメインのみを酵母の相当する領域と置換したイネ/酵母のキメラ IRE1 は  $\Delta ire1$  細胞のツニカマイシン耐性を復帰させた。このことから、*OsIre1* がイネ細胞内で小胞体内での unfolded protein の蓄積を感知して活性化され、下流に何らかの情報を伝えるシグナル分子として機能している可能性が示唆された。

本研究では、新規の PR タンパク質や細胞壁タンパク質を同定するなど、高等植物の分泌タンパク質についての新しい知見を得るとともに、高等植物からはじめて IRE1 ホモログ遺伝子を単離し、UPR 情報伝達経路を解明する手がかりを得た。今後、高等植物でタンパク質分泌機構を解析するために、これらの結果は貴重な指針を与えるであろう。