

論文内容の要旨

申請者氏名 稲井 康二

タバコの主要アルカロイドであるニコチンは摂食動物や昆虫に対する防御物質としての役割をもっている。しかしながら、根におけるニコチン生合成酵素遺伝子の発現制御や根で生合成されたニコチンがどのような機構を介して葉へ輸送・転流されるかは不明である。本研究ではニコチン生合成の調節遺伝子 *NIC* によって発現が制御されている BTB/POZ ドメインを持つ *Jasmonate Early Inducible 1 (JEI1)* と *NtMATE1/2* の解析を行いニコチン生合成の未知なる部分の研究を行った。

JEI1 は BTB/POZ ドメインと WD40 様リピート配列を持つタンパク質をコードしていた。*JEI1* は *NIC* 依存的に傷害処理およびメチルジャスモン酸処理に対して初期応答性を示した。これらの結果より *JEI1* 遺伝子はニコチン生合成に関与する傷害・ジャスモン酸初期応答性の新規遺伝子である可能性が示唆された。

H^+ /organic cation antiporter として機能する MATE(multidrug and toxin efflux) family と相同性をもつ *NtMATE1*, *NtMATE2* に関して遺伝子発現様式を解析したところニコチン生合成酵素遺伝子の発現様式と非常に類似していることがわかった。また、GFP 融合タンパク質および抗 *NtMATE1* 抗体を作成・精製しウェスタンブロット解析・免疫電顕解析を行ったところ、*NtMATE1* はタバコの根の液胞膜に局在することが確認されたことから、*NtMATE1/2* はタバコの根のニコチン生合成細胞で機能するトランスポーターであると推察された。

形質転換体を用いた実験によりニコチンの輸送の変化を観察したところ、*NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞ではニコチンの細胞外への排出量が増大することが確認された。また RNAi 法によって発現抑制を行ったタバコでは、ニコチン含量が葉においては低下し、根では増大する傾向が観察された。また発現抑制体において導管中のニコチン含量の低下していることが観察されたことから、*NtMATE1/2* はニコチン転流に関与するトランスポーターであると結論した。

ニコチンは低分子の塩基性窒素化合物という性質から細胞内では細胞内 pH 分布に依存してプロトン化を受けるためイオントラップ機構により液胞内への捕捉・蓄積されることが考えられている。そこで、*NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞における細胞内 pH を測定したところ、細胞質 pH の低下と液胞内 pH の上昇が観察された。このことから、*NtMATE1/2* が発現することにより、タバコ細胞内 pH の分布を変化させ、ニコチンの液胞内蓄積の障害が起きていると考察した。

以上のことから、*NtMATE1/2* は根のニコチン生合成細胞において発現し、生合成細胞内の pH 分布を変化させることにより、間接的に細胞外へのニコチンの排出を促進することで、ニコチンの転流に関与していることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 稲井 康二

アルカロイドなどの植物二次代謝産物の多くは、生合成された細胞と蓄積する細胞が異なっており、両細胞間のアルカロイドの移動（転流）が植物体で起こっている。ニコチンなどの弱塩基性タバコアルカロイドは葉肉細胞などの液胞にイオントラップ機構により蓄積すると提唱されているが、その証明はまだない。イオントラップ機構では、中性付近の細胞質でニコチンは非イオン型として存在し、液胞膜を容易に通過した後、酸性の液胞内でプロトン型となり、再び液胞膜を通過できなくなる（トラップされる）。しかし、タバコアルカロイドが生合成される細胞でも同様の機構が働いているとすると、生合成細胞の液胞内にアルカロイドがトラップされて、細胞外に分泌されにくくなり、蓄積細胞への転流に不都合なはずである。

本研究では、まず、タバコのニコチン生合成の調節因子変異株で発現が顕著に抑制されている新規遺伝子を2種類単離し、その発現様式を詳細に調べている。本研究の大部分はそのうちのトランスポーター様遺伝子 MATE1/2 に関するものである。このタバコトランスポーターはニコチン生合成酵素遺伝子と非常に類似した発現様式を示すことから、タバコアルカロイドの移動に関与する可能性があるものとして、さらに詳細にその機能が解析された。

種々の実験によりタバコ MATE1/2 は根のニコチン生合成細胞の液胞膜に局在することが示された。さらに、過剰発現タバコ培養細胞では、タバコアルカロイドが培地中に放出されることを示した。また、発現抑制タバコ植物体では、根から地上部へのニコチンの転流が阻害されることを見出した。これらの知見は、タバコ MATE1/2 が液胞内から細胞質へのアルカロイドの移動を促進している、又は液胞内へのアルカロイドの蓄積を阻害していることを示している。

さらに、本研究では細胞質と液胞内の pH を測定している。その結果、タバコ MATE1/2 過剰発現タバコ培養細胞では、野生型に比べ、液胞内がアルカリ化し、反対に細胞質が酸性化することが判明した。すなわち、タバコ MATE1/2 発現細胞ではイオントラップ機構が働きにくい環境であること、言い換えれば、タバコ MATE1/2 はイオントラップ機構を阻害することにより、タバコアルカロイドの液胞内への蓄積を阻害し、間接的にアルカロイドの根から地上部への転流を促進していることが示唆された。

以上のように、本論文はアルカロイドの液胞内蓄積機構と植物器官間の転流機構を分子生物学的に解析したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。