

# 学位論文内容の要旨

博士 (環境科学)

氏名 廣口 覚彦

## 学位論文題名

Molecular genetic studies on *Transmembrane Nine 1* for rhamnogalacturonan II deposition in *Arabidopsis thaliana*  
(ラムノガラクトロンII合成におけるシロイヌナズナ*Transmembrane Nine 1*の分子遺伝学的研究)

### 【背景】

細胞接着は細胞同士もしくは細胞と細胞間隙をつなぎ合わせて組織を構築し、多細胞生物の個体発生および成長を支える。植物において、堅さと柔軟性の両方を持つ細胞壁が細胞接着の主要な役割をしている。細胞壁の最外層に位置する一次細胞壁の多糖はペクチン、セルロース、ヘミセルロースから構成されている。ペクチンはゲル状の性質をもち、セルロース繊維同士を接着する役割をしている。ペクチンにはホモガラクトロン(HG)、ラムノガラクトロンII (RG-II)、ラムノガラクトロンI (RG-I)と呼ばれる多糖の構造領域があり、植物の必須微量元素であるホウ素は細胞内でホウ酸の形態で存在し、ホウ酸はRG-IIを架橋する。ホウ酸によるRG-IIの架橋は正常なペクチンネットワークの形成に重要であり、ホウ素が不足した環境では架橋されたRG-IIが減少し、葉の展開や根の伸長抑制、また不稔などの深刻な生育障害が生じる。RG-IIは12種類以上の単糖から形成される複雑な構造を持つが、陸上植物の進化の過程で高度に保存されている。RG-IIはゴルジ体で生合成され、小胞輸送により細胞外へ運ばれると考えられており、これら一連の過程を合成ととらえられる。これまでに、RG-II合成に関わる遺伝子が複数単離されているが、複雑なRG-II合成の全体像はほとんど明らかになっていない。

既知のRG-II合成変異株にはホウ素栄養応答が変化する株があることから、先行研究ではRG-II合成やRG-II架橋に関わる因子を単離するため、ホウ素栄養応答に異常を持つシロイヌナズナ変異株が計22株単離された。本研究では類似した表現型を示した2株を対象とし、詳細な遺伝学および生理学的解析によりRG-II合成に関わる新たな分子の同定を目的とした。

### 【結果および考察】

#### ゴルジ体局在タンパク質のTMN1の機能欠失によりホウ素栄養応答が変化した

固形培地の低ホウ素条件で野生型株は主根伸長が深刻に抑制されるのに対し、変異株の根は野生型株と比較して伸長した。ホウ素十分条件で変異株の根は野生型株と比較して伸長抑制を示した。この結果から、変異株のホウ素栄養応答に異常が生じていると考えられた。遺伝子マッピングと次世代シーケンサーのゲノム解析により、2つの変異株が同一の遺伝子*TMN1*に一塩基置換を持つことが分かった。一方の変異株No.19 (*tmn1-1*)ではエキソン上に終止変異、もう一方の変異株No.45 (*tmn1-2*)ではイントロンの5'スプライスドナーサイトに変異が存在した。その結果、*tmn1-2*のcDNAには未成熟終止コドンが生じていた。さらに、*TMN1*にT-DNA挿入をもつ*tmn1-3*も双方の変異株と同様の主根伸長の表現型を示したこと、*tmn1-1*での相補性試験から、*TMN1*の機能欠失がホウ素栄養応答変化の原因であることが示された。加えて、顕微鏡観察により変異株の主根伸長変化は細胞伸長変化に起因することが観察され、*TMN1*が根の細胞伸長に関わることが示された。

*TMN1*は222アミノ酸残基のN末端領域に続き、9回の膜貫通領域とさらに18残基のC末端領域を持つ。*TMN1*のアミノ酸配列はRG-II合成に関わる既知のタンパク質と類似性を示さず、先行研究でゴルジ体に局在することが示されているが、分子の機能は不明であった。興味深いことに、*TMN1*の相同遺伝子はヒトを含む多くの真核生物で保存されているが、植物における変異株は報告されておらず、その生理学的機能は不明であった。

## 長期の水耕栽培における変異株のロゼット葉と根の乾燥重量が野生型株と比べて減少した

TMN1変異株の個体成長を調べるため、蒸散および根の培地へのアクセスの点で固形培地よりも自然環境に近い水耕栽培栽培を行った。培地に低濃度、通常、高濃度のホウ素を加えた条件を設け、シロイヌナズナが栄養成長を続ける短日条件下で成長を観察した。低ホウ素条件下で変異株の根は野生型株より長く伸長し、固形培地と同様の表現型が再現された。一方で、いずれのホウ素条件下でも変異株のロゼット葉のサイズと根の長さは減少し、乾燥重量も野生型株より減少した。つまり、低ホウ素条件下の根の伸長の点では変異株のホウ素栄養応答が変化しているが、TMN1変異株の個体成長はホウ素条件とは関係なく常に抑制されていた。

## 変異株の細胞壁中のRG-IIとRG-I量が野生型株と比較して減少した

TMN1の生理学的機能を明らかにするため、ホウ素条件に関係なく引き起こされている変異株の個体成長抑制の原因を調べた。植物で示されているホウ素の作用点が細胞壁であるため、細胞壁中のホウ素濃度を測定した。ロゼット葉と根の細胞壁中のホウ素濃度は、極めて低濃度のホウ素条件下において変異株と野生型株との間に減少は認められなかったが、マイルドな低ホウ素条件下から高ホウ素条件下において、変異株のホウ素濃度は野生型株よりも減少した。ホウ素が十分に存在する条件下においては野生型株のRG-IIの90%以上がホウ酸に架橋されていると想定されるため、変異株ではホウ酸に架橋されたRG-IIの量が減少していると考えられた。

上記の結果から、変異株では(1)ホウ酸によるRG-II架橋の効率が低下している可能性、(2)RG-II自体の全体量が減少している可能性が考えられた。(1)の可能性を検証するためサイズ排除液体クロマトグラフィーにより、架橋されたRG-IIと架橋されていないRG-IIを検出し、ピーク面積から相対的なRG-II架橋率を算出した。いずれのホウ素条件下でも変異株のRG-II架橋率が野生型株と比較して減少は認められなかったため、(1)の可能性は低いと考えられた。(2)の可能性を検証するため、RG-II特異的に存在する2-ケト-3-デオキシ糖を呈色反応により定量した。いずれのホウ素条件下でも変異株のロゼット葉と根の2-ケト-3-デオキシ糖は野生型株よりも20%–30%減少したため、変異株のRG-II自体の全体量が減少していると考えられた。さらに、RG-II抗体を用いた免疫染色の結果、変異株でのシグナルの低下が示され、RG-II量減少が支持された。ホウ素条件に関係なくロゼット葉と根で見られたRG-II全体量の減少は、変異株の乾燥重量の減少パターンと一致したため、RG-II全体量の減少が変異株における乾燥重量の減少の一因であると考えられた。さらに産業技術総合研究所の協力によるロゼット葉の細胞壁中の単糖組成分析において、変異株のラムノース量の減少が観察された。細胞壁中のラムノースの多くはRG-I由来であるため、変異株ではRG-I量も減少していると考えられた。これらより、TMN1が細胞壁RG-IIやRG-I量の維持に機能することが明らかにされた。

TMN1の分子機能に関する知見を得るため、GFPタグを付加したTMN1を*tmn1-1*変異株に発現させ局在観察を行った。エキソサイトーシス阻害剤のBFA処理下で、GFP-TMN1の多くが脂質膜染色試薬FM4-64のBFAコンパートメントの周囲に観察された。この局在パターンは先行研究で示されているゴルジ体局在タンパク質と類似していた。さらに、細胞膜からのエンドサイトーシスを阻害するDynasore処理下で、GFP-TMN1が細胞膜上に局在することは観察されなかった。このことから、大部分のGFP-TMN1は細胞膜へ向かう輸送小胞には局在していないことが示された。よってTMN1はペクチンを細胞外へ運ぶ働きよりも、ゴルジ体でペクチンを生合成する過程に機能していると考えられた。

## 【結論】

本学位論文は、機能未知であった植物のTMNファミリーがペクチン質多糖のRG-IIとRG-I合成において重要な因子であり、TMN1が植物の正常な成長に必須であることを示した。また、TMN1変異株の解析を通して、低ホウ素条件下における細胞伸長がペクチン量によって制御されていることを明らかにした。本研究結果は植物の成長の分子機構に新たな知見を与えるものである。