

## 学位論文要旨

### Modulation of stress-responsive rapid production of the phytohormone abscisic acid *via* endoplasmic reticulum dynamics

(ストレスに応答したアブシシン酸の迅速生成の小胞体ダイナミクスを  
介した調節に関する研究)

氏名 HAN Yiping

アブシシン酸(ABA)は、種子の成熟や休眠、気孔閉鎖を調節する植物ホルモンとして古くから知られるが、乾燥や低温、塩分などに対する応答や適応機構を誘導することからストレスホルモンとも呼ばれる。植物はこれらのストレスに曝されるとABAを急速に蓄積するが、その生成には二つの経路が知られている(新生と脱配糖化)。カロテノイドを始発物質とする新生はABA蓄積の主要経路であり、葉緑体と細胞質に跨がる多段階の酵素反応である。一方、脱配糖化では、不活性なABAプールを構成する糖エステル(ABA-GE)から、小胞体(ER)や液胞に局在する $\beta$ -グルコシダーゼ(BGLU)がABAを遊離する。一段階の加水分解反応である脱配糖化は、複数の酵素が関わる新生と比較してABAを迅速に生成可能な利点を持つ。また、この反応を担うBGLUの遺伝的欠損は、シロイヌナズナのABA応答を鈍化させ、そのストレス適応能を著しく低下させる。これらの点から、ストレスに応答したABA生成における脱配糖化経路の重要性が示唆されているが、新生経路と比較してその研究事例は遙かに少なく、解明すべき課題が数多く残されている。シロイヌナズナでは、ABA-GEの分解を担うERや液胞のBGLU活性は、乾燥などのストレスに応答して増大する。この活性化には、各オルガネラに特異的な調節機構が存在すると考えられているが、その実態は不明である。本学位論文では、その欠損が液胞局在型酵素よりも重篤なストレス感受性を与えるER局在型BGLU(BGLU18、或いはAtBG1とも呼ばれる)に着目し、ストレスに応答した迅速なABA生成の調節機構におけるERの動態変化(小胞体ダイナミクス)の関与を調査した。

第1章では、BGLU18の組織分布・細胞内局在について解析した。植物では土壌の乾燥に  
応答したABAの生成は地上部で起こるため、葉器官における組織分布をイムノブロット法で調  
べたところ、BGLU18の大半は葉身よりも葉柄に検出された。次いで、ER残留シグナルを付加  
した緑色蛍光タンパク質によりERを可視化した形質転換植物を用い、細胞分画法により  
BGLU18の細胞内局在部位を調べた。その結果、BGLU18の多くはERではなく、ERから派  
生する紡錘状顆粒(ERボディ)に局在していた。この結果は、赤色蛍光タンパク質との融合タ  
ンパク質の一過性発現解析からも確認した。ERボディはアブラナ科に固有なタンパク質集積  
オルガネラで、病原菌の侵入や昆虫の食害などの生物ストレスに対する防御機構に関与する  
と報告されている。シロイヌナズナでは子葉や植物体の根に分布するが、この解析過程で成熟  
葉にも恒常的に存在することが明らかとなった。したがって、ERボディが脱配糖化によるABA  
の生成や、乾燥などの非生物ストレスに対する防御応答にも関与することが示唆された。

第2章では、葉柄のERボディが非生物ストレスに  
応答し、BGLU18を介したABA生成に関  
与する可能性を検証した。植物体を乾燥、高浸透圧、高塩濃度の各ストレスに曝したところ、何  
れの場合も葉柄細胞ではERボディの数が有意に増加した。最も応答が早かった乾燥条件下

での経時変化を追跡したところ、ER ボディの数は乾燥処理後 30 分で有意に増加し、60 分で最大になり、さらにその後の 60 分間でサイズが縮小した。しかし、ストレスを除去すると、これらの変化は通常状態に復帰したことから、観察された ER ボディの動態変化はストレス生理応答の一環であると考えられた。シロイヌナズナでは、ストレス応答を活性化するアラントインや、アラントインを蓄積させる *aln* 変異が、BGLU18 を恒常的に活性化し、通常条件でも ABA を亢進することが報告されている。そこで、外因性アラントインで処理した野生株や、*aln* 変異株における ER ボディを観察したところ、これらの処理や変異で ER ボディの数は有意に増加していたが、*aln* 変異株に BGLU18 欠損 (*bglu18*) 変異を導入すると、その数は減少した。以上の結果から、ER ボディの動態変化と BGLU18 の活性化には正の相関があること、また、ストレスに応答した ER ボディの増加に BGLU18 は必須の因子であることが示された。ER ボディは基本的に貯蔵オルガネラであり、そこに集積するタンパク質は生理的に不活性であるため、その数の増加だけで BGLU18 の活性化を説明することはできない。しかし、同時に形態変化も観察されたことから、これらの一連の ER ボディの動態変化は BGLU18 が ER に移行する可能性を示唆するものと考えた。

この点を明らかにするため、第3章ではストレスに応答した ER ボディの動態変化と、BGLU18 の活性化ならびに脱配糖化による ABA の迅速生成との因果関係を調査した。30 分の乾燥処理により、葉柄細胞ではマイクロソーム (ER) 画分における BGLU18 の存在比が増大し、ABA-GE 分解活性や ABA レベルが上昇した。この結果から、ストレスに応答した ER ボディの動態変化に伴い BGLU18 が ER に移行し、ABA-GE の分解を触媒することが示唆された。この仮説を検証するために、ER ボディを欠損し、BGLU18 が ER に存在する *nai2-2* 変異株を用いて同様な解析を行った。*nai2-2* 変異株では、通常条件でも ABA-GE 分解の活性化が見られた。さらに、この変異株は乾燥に応答して野生株の 3 倍の ABA を蓄積したが、*bglu18* 変異の導入により ABA-GE 分解活性や ABA レベルの増大は消失した。以上の結果は、上記の仮説と矛盾せず、その妥当性が支持された。興味深いことに、*nai2-2* 変異株における ABA の上昇は乾燥条件下のみで観察されたことから、ABA-GE は通常条件では ER に存在せず、その ER への取り込みにはストレスで活性化される膜輸送系の存在が示唆された。ストレス遭遇初期の ABA 生成における BGLU18 の寄与を評価するために、乾燥に応答した ABA 蓄積の経時変化を、野生株、*bglu18* 変異株および *aba2-1* 変異株 (新生経路の漏出変異株) の間で比較した。*bglu18* 変異株では、野生株と比較して ABA の上昇に 60 分の遅延が観察された。一方、*aba2-1* 変異株では乾燥に応答して 30 分以内で ABA-GE 由来と考えられる ABA の上昇が見られた。以上の結果から、ストレスに応答した ABA 生成において、BGLU18 が触媒する脱配糖化が新生を先行することが示された。新生経路を構成する酵素の遺伝子発現は、ABA の蓄積により正のフィードバック制御を受けることから、新生経路に先立つ脱配糖化による ABA の生成は、ストレス適応の誘導のみならず、新生経路の活性化にも関わっている可能性がある。

本研究は、ABA の生成酵素の活性化が、ストレスに応答した ER ダイナミクスにより制御されていることを証明したものである。このような翻訳後の調節機構は、環境変動に対する迅速な植物の生理応答を可能にする重要な仕組みの一つと考えられる。