

氏 名 (本 籍)	たか はし せい し 高 橋 征 司 (福 島 県)
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2515 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	生物科学研究科
学 位 論 文 題 目	Studies on the Phosphoinositide-turnover System in Plant Signal Transduction under Hyperosmotic Stress (高等植物の浸透圧ストレス応答におけるイノシトールリン脂質代謝を介した情報伝達系の解析)
主 査	筑波大学客員教授 理学博士 篠 崎 一 雄 (理化学研究所筑波研究所)
副 査	筑波大学教授 理学博士 鎌 田 博
副 査	筑波大学教授 理学博士 林 純 一
副 査	筑波大学助教授 理学博士 佐 藤 忍

論 文 の 内 容 の 要 旨

高等植物が乾燥、塩などの浸透圧ストレスを受けると、細胞外からの流入あるいは細胞内のプールからの放出によって細胞質中の Ca^{2+} が数秒で一過的に上昇する。さらに細胞内の Ca^{2+} 放出により浸透圧ストレスに対する種々の生理応答が引き起こされる。この Ca^{2+} 濃度の一過的上昇はイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) の阻害剤により部分的に抑制されること、PI-PLC の代謝産物であるイノシトール 1,4,5-三リン酸 (Ins (1,4,5) P_3) の導入により細胞内に Ca^{2+} の放出がおきること等の知見から、浸透圧ストレス応答のシグナル伝達機構に Ins (1,4,5) P_3 による細胞内 Ca^{2+} 上昇が関与していると考えられていた。しかし、このような浸透圧ストレスによる細胞内 Ca^{2+} の一過性上昇に左記だって起こるような Ins (1,4,5) P_3 の上昇、あるいは PI-PLC 活性の上昇はこれまで報告されていなかった。本研究では、高等植物における浸透圧ストレス応答の情報伝達機構と PI 代謝との関係を明らかにする目的で、シロイヌナズナ培養細胞を材料として、浸透圧ストレスに対する PI-PLC の活性調節について解析を行った。

種々の浸透圧ストレス処理を加えたシロイヌナズナ T87 培養細胞より Ins (1,4,5) P_3 を抽出、定量した結果、NaCl、マンニトール、乾燥の処理後数秒で Ins (1,4,5) P_3 量の一過的上昇が検出された。Ins (1,4,5) P_3 の一過的上昇はネオマイシン、U73122 等の PI-PLC 阻害剤処理により抑制されること、PI-PLC の基質であるホスファチジルイノシトール 4,5 二リン酸 (PtdIns (4,5) P_2) の供給量の急速な一過的上昇は検出されなかったこと等から、浸透圧ストレスにより PI-PLC 活性が上昇することが示唆された。PI-PLC 活性の変化が浸透圧ストレス応答機構に与える影響を解析するため、PI-PLC 阻害剤を処理した細胞における種々の乾燥応答性遺伝子の発現誘導について解析を行った結果、マンニトール処理による *rd29A* や *rd17* 等の発現誘導はネオマイシンや U71322 により有意に抑制されることが明らかとなった。これらの遺伝子の発現は、主に乾燥ストレス応答に働く転写のシス因子である DRE によって制御されているが、浸透圧ストレスに対する PI-PLC の活性化がこれらの遺伝子発現誘導機構の一端を担っていることが初めて示された。

浸透圧ストレス応答の情報伝達における PLC の役割をさらに直接的に解析するため、T87 培養細胞の形質転換

系を確立し、シロイヌナズナのPI-PLCであるAtPLC1s及びAtPLC2のセンス、アンチセンス形質転換培養細胞を作成した。浸透圧ストレスに応答したIns (1,4,5) P₃の上昇レベルおよびrd29Aの発現誘導レベルは各々のPI-PLCを高発現している細胞では増大しており、また、PI-PLC発現が抑制された細胞においてはやや減少していた。また、ストレス処理をしていない状態におけるIns (1,4,5) P₃量、rd29A発現量において野生型と形質転換体において有意な差はみられなかった。これらの結果は浸透圧ストレスに応答してPI-PLCが活性化され、それを引き金として細胞内に情報が伝達されていることを示している。以上のことから、高等植物においてPI-PLCはセカンドメッセンジャーのIns (1,4,5) P₃を産生することによって浸透圧ストレス応答情報伝達の初期の段階で重要な役割を果たしていることが示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、高等植物において初めてPI代謝、特にPI-PLCを介した経路が浸透圧ストレス応答機構の初期段階に関与していることを、以下の点について明らかにすることにより示したものである。

高等植物シロイヌナズナの培養細胞において、乾燥、浸透圧ストレスにより非常に迅速かつ一過的なIns (1,4,5) P₃の上昇がおきることを初めて明らかにした。また、このIns (1,4,5) P₃の一過的上昇がPI-PLCの阻害剤により抑制されること、PI-PLCの基質の供給量の一過的上昇は検出されなかったこと等から、PI-PLCが浸透圧ストレスにより一過的に活性化される事を示した。また、PI-PLC活性を抑制することによりシス因子のDREによって抑制される浸透圧ストレス誘導性遺伝子の遺伝子発現が抑制されることを明らかにした。さらに、PI-PLCのセンス、アンチセンス形質転換培養細胞を作成することに成功し、これを用いた解析により、セカンドメッセンジャーであるIns (1,4,5) P₃を産生することでPI-PLCが浸透圧ストレス応答に重要な役割を果たしていることを直接的に示した。

本研究は、培養細胞およびその形質転換体を用いて解析を行うことにより、植物細胞内における浸透圧ストレス応答の情報伝達におけるPI-PLCの関与を明確に示した点で独創性があり、これまで不明であった浸透圧ストレス受容の初期段階の解明において重要な知見を示した事により、植物の環境ストレス応答機構研究の進展に大きく貢献するものと評価される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。