

篩管を通じた mRNA や蛋白質の長距離移行

「形とはたらき」領域 藤原 徹

要 旨

植物の細胞間には原形質連絡と呼ばれる構造体が存在しており、植物個体を構成するほとんどの細胞の細胞質は互いにつながっている。本研究では篩管に存在するタンパク質やRNAの研究を通じて、高等植物においてタンパク質や核酸が細胞間を移行すること、篩管に存在するタンパク質が原形質連絡の透過性を高めること、原形質連絡と相互作用して植物ウイルスの移行を促進することなどを明らかにした。タンパク質や核酸の細胞間、器官間移行が植物の分化や病原体との相互作用における役割が明らかにされつつある。

1. 研究のねらい

植物は陸上への進化に伴って、水と養分を吸収する根は地下に、光合成を担う葉は地上に広げようになり、離れた器官間での物質の輸送を担う通導組織が発達した。光合成産物の輸送経路である篩管は篩部要素とよばれる脱核した細胞によって構成されており、原形質連

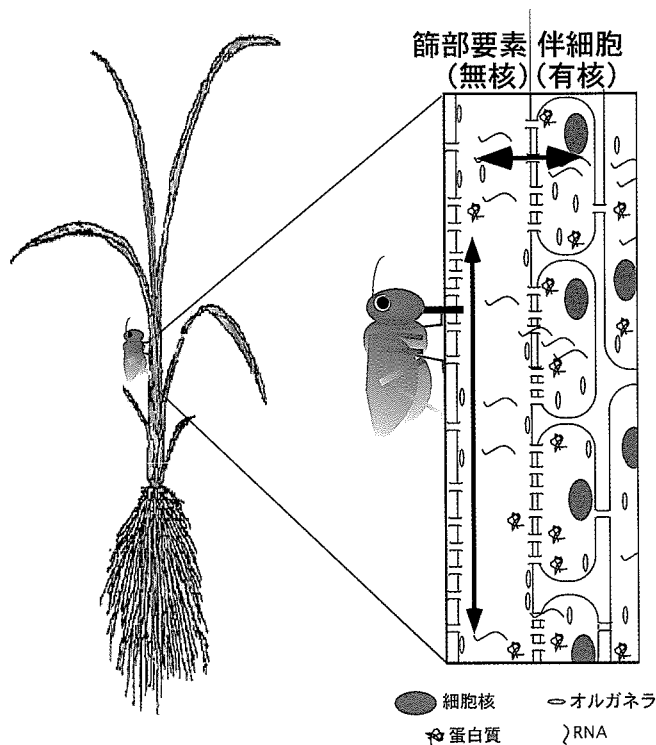


図1 イネからの篩管液採取と篩部の構造の模式図イネにトビイロウンカを吸汁させると、篩管から吸汁する。篩管は脱核した篩部要素とそれを取りまく伴細胞(有核)からなり、篩部要素と伴細胞の間には原形質連絡が存在している。篩部要素にはミトコンドリアやプラスチドが存在している。篩管液を採取するにはトビイロウンカの口針をレーザーで切断する。篩管液には蛋白質やRNAが存在しており、これらは原形質連絡を通じて伴細胞から移行し、植物体内を長距離移行していると思われる。

絡を通じて隣接する伴細胞とよばれる細胞と結ばれている（図1）。原形質連絡は、細胞壁を貫く植物特有の筒状構造体で、その内部は細胞膜や ER 膜と共に、タンパク質が存在しており、通常条件では比較的分子量の小さい物質（1000 ダルトン以下）しか通過させない。

われわれは吸汁昆虫の口針を切断する方法（インセクトレーザー法）で得た篩管液（図1）にチオレドキシン h（TRXh）をはじめとする蛋白質や mRNA が存在することを見いだした。これらの蛋白質や mRNA は植物体内を転流していると考えられる。また、これらの脱核した細胞に存在する蛋白質や mRNA は周辺の細胞から篩部要素へ移行してきていると考えられ、移行の経路は原形質連絡であると考えられている。

本研究では、このような高等植物に特有に見られる、蛋白質や mRNA の細胞間や器官間移行のしくみと、その植物の生育や分化、病原体との関わりにおける役割について検討した。

2. 研究方法と成果

2-1 篩管 RNA のクローニング

本研究開始直前に、TRXh など数種の mRNA が篩管液に存在することを RT-PCR 法により示した。篩管液の RNA のプロフィールを知ることが目的に以下の実験を行なった。

インセクトレーザー法によりイネ篩管液を約140 μ l 採取し、含まれる RNA を精製し RNA の 3' 側に polyA を付加した後、RT-PCR 法を用いて増幅、cDNA ライブラリーを作成した。これらのライブラリーのインサート長を確認し、約300クローンの配列を決定した。インサート長の短いものが多かったが、相同性検索によってイネのクローンであると確認されたものの中では、重複（同じ遺伝子由来であったもの）はほとんど無く、各種 RNA 由来の断片が含まれていた。篩管液中の RNA は多様な分子の集合であることが推測された。（図2）

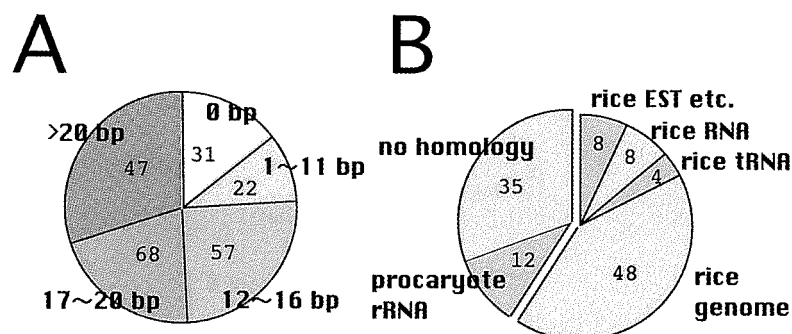


図2 イネ篩管液から作成した cDNA ライブラリーの配列解析結果 A 配列決定したクローンのインサート長（polyA 部分を除く）の分布。B 配列決定したクローンのうち、17 塩基対以上のものについての相同性検索の結果を示す。多くのクローンがイネのゲノムや cDNA 配列と一致した。

2-2 篩管内への物質注入系の構築

篩管内容物の機能解析には、篩管への注入実験が必要である。篩管液採取法を逆手に取り、トビイロウンカの口針を利用した物質注入法 (The method of micro-introduction using stylet of insect, MUSI method, Fujimaki et al., 2000) を開発した。MUSI 法の概略を図3に示す。この方法で FITC dextran (42 kDa) を注入したところ蛍光物質が篩部要素にとどまっていた (図4)。

さらに、FITC dextran (42 kDa) と TMR-dextran (3 kDa) を混合して注入し、移行した先 (注入部位から数 mm の部分) の横断切片でそれぞれの蛍光物質を観察したところ、FITC-dextran はほぼ一つの篩部要素に局在していたが、TMR-dextran は細胞の境を越えて篩部領域全体に広がっていることが観察された。これによってイネ葉鞘の篩部要素-伴細胞間の原形質連絡の SEL が 3 kDa から 42 kDa の間にあることを示すことができた。

2-3 GFPmRNA の導入実験

開発した MUSI 法を用いて RNA の注入実験を試みている。In vitro transcription で合成した GFPmRNA の導入を行なっている。導入した部分から離れた葉から蛋白質を抽出し、抗 GFP 抗体で western analysis を行なったところ、GFP に相当する位置にバンドが得られた場合もあるが、しかし、実験バンドが出現する頻度は低く、更なる検討が必要であると考えている。

2-4 篩部要素内のオルガネラへのタンパク質輸送の可能性

篩部要素内にはミトコンドリアやプラスチド等のオルガネラが存在する。これらのオルガネラは DNA を持っているが、多くの核コードの遺伝子産物が輸送されてくることも知られている。前述の様に篩部要素内には核は存在していないので、篩部要素内のオルガネラには、細胞の境を越えて輸送されてきた蛋白質が局在している可能性が考えられる。このような現象が起こっているとすれば、それは、植物においてはオルガネラはその属する細胞の核によってのみ支配されているのではなく、隣接する細胞核によっても支配されている、ことを意味しており、植物における「細胞」のあいまいさを意味するものでもある。具体的には以下の3つの実験を行なった。

1. ミトコンドリア移行シグナルを持つ緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する形質転換イネの篩部要素を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、篩部要素内壁にミトコンドリアに相当すると思われる GFP の局在を認めた。
2. ミトコンドリア移行シグナルを持つ GFP を発現する形質転換イネの篩管液を western

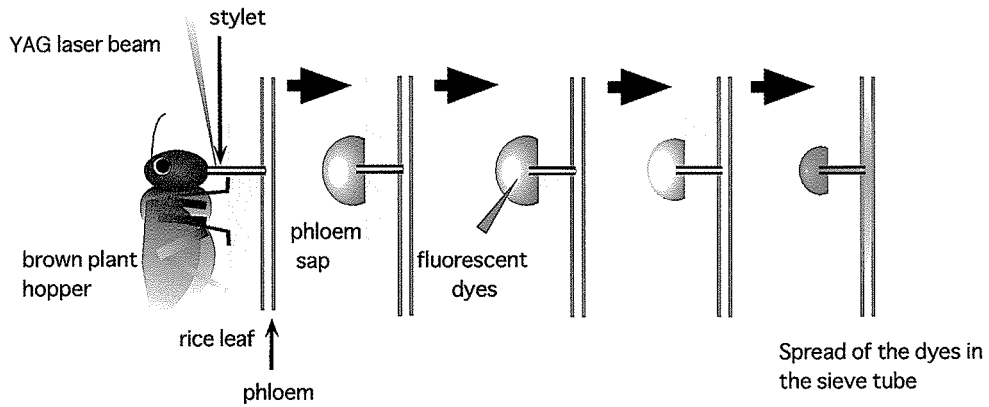


図3 MUSI法の概略図
 インセクトレーザー法を行なって篩管液が出てきたら、蛍光物質を混ぜて放置するという簡単な方法で篩管に物質を注入することができる。

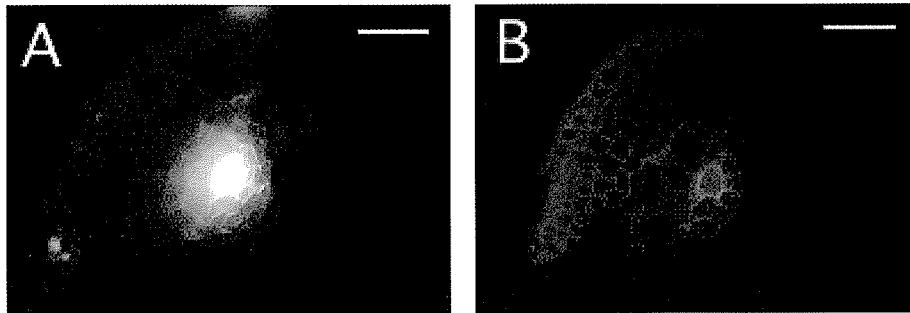


図4 MUSI法によってFITC-デキストランを注入した篩管の横断面図
 A FITCの蛍光像。B 自家蛍光の像 Aの中心部の明るく光る細胞が篩部要素である。bar=25 μM

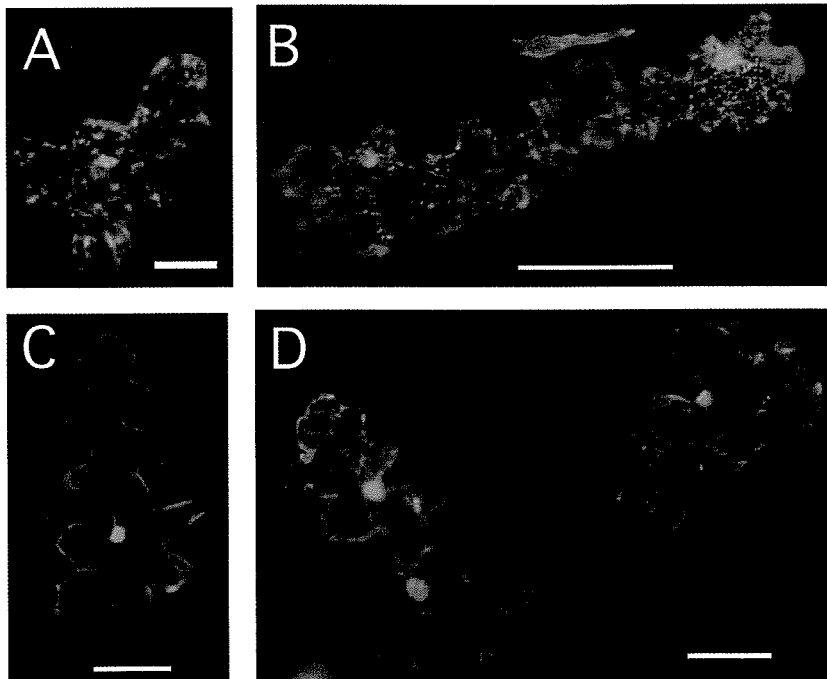


図5 パーティクルボンバードメント法によってタバコ葉の表皮細胞に導入したGFPとミトコンドリア移行シグナルを持つGFPの蛍光像
 ミトコンドリア移行シグナルを持つGFPを導入し単一細胞に蛍光が観察された例(A)と連続する複数細胞に蛍光が観察された例(B)。いずれの場合もGFPは細胞内に斑点状(ミトコンドリア)に局在している。GFPを導入した例(C, D)ミトコンドリアは核と細胞質に局在している。Bars=50 μm

解析したところ、移行シグナルのついた GFP に相当するバンドが検出された。

3. ミトコンドリア移行シグナルを持つ GFP を particle bombardment によってタバコの葉に導入した。複数の隣接細胞が蛍光を発する場合には全ての細胞で GFP はミトコンドリアに局在していた (図 5)。これらのことは、GFP 細胞間移行したのちミトコンドリアに局在していることを示唆している。

2-5 篩部伴細胞でのタンパク質の発現による篩管液タンパク質組成の調節

篩管液に存在する蛋白質は伴細胞から移行してくると考えられている。伴細胞でタンパク質の発現量を変化させることで、篩管液のタンパク質組成が変化するかどうかを検証した。

各種蛋白質を篩部要素で発現する形質転換イネを作成し、篩管液を採取して western 解析を行なったところ、TRX、オリザシスタチン、GFP を過剰発現する形質転換体では、篩管液の蛋白質濃度が高まっており、アンチセンス RNA を発現する個体では相当する蛋白質濃度が低下していた。特に GFP の場合には発現量に応じて篩管液中のタンパク質濃度が高い傾向が見られた (図 5)。これらの結果は、伴細胞での発現量が篩部要素の蛋白質量に反映されることを示している。

2-6 TRXh 遺伝子破壊イネの検索と発現

イネの TRXh 遺伝子のイントロンに Tos17 の挿入の起こった変異株を検索して得た。Tos17 の挿入がホモ接合型になった株を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行なったが、TRX h 遺伝子に Tos17 の挿入が起こっていない野生型株と比べて、mRNA の蓄積量に有意な変化は認められなかった (図 6)。

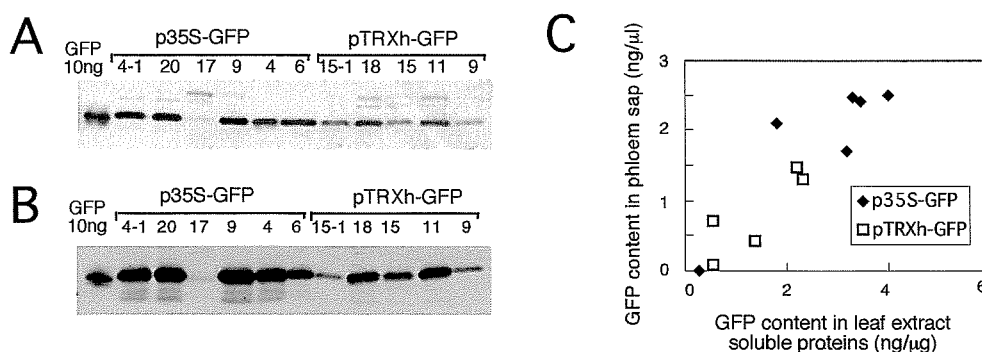


図 6 GFP を発現する形質転換イネの篩管液および葉の抽出物中の GFP の western 解析
 A 篩管液の Western 解析 B 葉の抽出物の Western 解析。抗 GFP 抗体を用いた。それぞれのレーンは独立の形質転換体を示す。GFP を発現するプロモータとしては CaMV 35S RNA プロモータまたはチオレドキシシン h プロモータを用いた。C 篩管液の GFP 濃度と葉の抽出物の GFP 濃度の相関関係 ◆は CaMV 35S RNA プロモータを持つ形質転換ライン、□はチオレドキシシン h プロモータを持つ形質転換ラインを表わす。

表1 TRXhを発現する形質転換タバコを用いたマイクロインジェクション実験。タバコ葉肉細胞に図に示す蛍光物質をマイクロインジェクションし、隣接細胞への移行を観察した。移行回数/実験回数 を示す。277 はタバコモザイクウイルスの移行蛋白質を発現する個体、6-2、13-3、28-4 はTRXhを発現する個体。

植物ライン	LYCH (457 Da)	12 kDa F-dextran	19.6 kDa F-dextran	42 kDa F-dextran
野生型	16/20	1/10	1/20	1/20
277	16/20	11/20	7/20	3/20
6-4	15/20	14/20	5/20	Not tested
13-3	8/20	12/20	7/20	3/20
28-4	16/20	10/20	9/20	3/20

表2 TRXhを発現する形質転換タバコへのTMVの感染実験。移行蛋白質の37残基目のセリンがグルタミン酸に置換された変異を持つTMVを感染させ、7日後に感染班での感染細胞数(GFPで検出)を数えたもの。

植物ライン	総感染班数	単一細胞に感染が起 こったもの	2個以上の細胞に感 染が起こったもの	2個以上の細胞に感 染が起こった割合(%)
野生型	207	167	40	19
6-4	179	89	90	50
13-3	177	100	77	44
28-4	131	87	44	34

2-7 TRXhを発現する形質転換タバコの解析

イネTRXhを過剰発現する形質転換タバコを3系統得た。葉肉細胞へのマイクロインジェクション法により原形質連絡の分子量限界を調べた(表1)。これらの形質転換植物ではタバコモザイクウイルス(TMV)のMPを発現する形質転換体277(Deom et al. 1987)と同程度に原形質連絡の透過性が高まっていることが明らかになった。しかし、これらの形質転換体の成長は正常であった。

これらの形質転換植物でのウイルスの感染実験を行なった。TMVの移行蛋白質を欠損する変異型ウイルスでは、野生型と形質転換植物で違いは見られなかったが、移行蛋白質の一部にアミノ酸置換変異を持つ変異型ウイルスでは、形質転換植物において、感染細胞周辺でのウイルス感染が高い頻度で観察された(表2)。これは、植物由来の蛋白質が、植物ウイルスの細胞間移行を補佐した、世界で初めての実験例である。

3. 今後の展望

本研究によって、植物における蛋白質やmRNAの細胞間、器官間輸送の一端が明らかになったのではないかと考えている。蛋白質やRNAの細胞間、器官間移行は植物固有の個体制御のしくみであり、分化や植物ウイルスとの関係において重要な役割を果たしていると考え

えられる。本研究はその端緒に過ぎない。今後の研究の進展が期待される。

4. 謝 辞

本研究の遂行に当っては、東京大学大学院農学生命科学研究科植物栄養・肥料学研究室のスタッフや学生の皆さまに大変お世話になりました。また、独立行政法人農業生物資源研究所の広近博士には TRXh 遺伝子破壊株の検索で、岡山大学の坂本巨博士にはミトコンドリア移行シグナルを持つ GFP を発現するイネを提供していただきました。ここに心より感謝の意を表します。

5. 発表リスト

論 文

Yutaka Ishiwatari, Keisuke Nemoto, Toru Fujiwara, Mitsuo Chino and Hiroaki Hayashi “*In situ* hybridization study of the rice phloem thioredoxin h mRNA accumulation - possible involvement in the differentiation of vascular tissues. *Physiol. Plant.* 109, 90-96 (2000)

Shu Fujimaki, Toru Fujiwara and Hiroaki Hayashi “A new method of microinjection into a single sieve tube of intact rice plants.” *Plant Cell Physiol.* 41, 124-128 (2000)

Akari Fukuda, Yutaka Ishiwatari, Keiko Abe, Mitsuo Chino, Toru Fujiwara, Hiroaki Hayashi “Control of protein content in the rice phloem sap. in *Plant Nutrition: Molecular Biology and Genetics*, Gissel-Nielsen and Jensen eds, Kluwer academic publishers b.v. pp39-45 (2000)

Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Yang ZM, Baluska F, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto H (2000) Aluminum-Induced 1→3-β-D-Glucan Inhibits Cell-to-Cell Trafficking of Molecules through Plasmodesmata. A New Mechanism of Aluminum Toxicity in Plants. *Plant Physiol.* 124, 991

Yusuke Kuzuhara, Amiko Isobe, Motoko Awazuhara, Toru Fujiwara, and Hiroaki Hayashi (2000) Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient

conditions Soil Science and Plant Nutrition 46, 265-270

(他数編準備中)

学会発表 (国外)

Tomoko Mori, Shigeki Kawakami, Hiroaki Hayashi, Tadakatu Yoneyama, Yuichiro Watanabe, and Toru Fujiwara “Dilation of Plasmodesmata and Cell-To-Cell Movement of Viruses in Transgenic Tobacco Plants Expressing Rice Thioredoxin h” Plasmodesma2001, Cape Town, 2001

Toru Fujiwara, Tomoko Mori, Takaaki Sasaki, Yutaka Ishiwatari, Akari Fukuda, Hideki Hanakoka, Hironori Mano, Hiroaki Hayashi, Mitsuo Chino (2000) Thioredoxin h in rice phloem sap-A model for cell-to-cell and long distance transport of proteins and RNA in higher plants. 4th Workshop on sulphur metabolism, Wengen, Switzerland, 2000

Toru Fujiwara, Takaaki Sasaki, Yutaka Ishiwatari, Akari Fukuda, Hiroaki Hayashi, and Mitsuo Chino “mRNA in rice phloem sap” KEYSTONE SYMPOSIA, Idaho USA, 1999

Toru Fujiwara, Hironori Mano, Eiichi Akahoshi, Hideki Hanaoka, Akari Fukuda, Nobuo Suzui, Hiroaki Hayashi “Macromolecules in rice phloem sap” Botanical congress, St.Louis, USA, 1999

他 4 件

国内発表 12件

特許 2 件