

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 篩管を通じた mRNA や蛋白質の長距離移行

2. 研究者名： 藤原 徹

3. 研究のねらい

植物の陸上への進化に伴って発達した通道組織のひとつ、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、原形質連絡を通じて隣接細胞と結ばれている。吸汁昆虫を用いて採取した篩管液には蛋白質や核酸が存在する。これらの遺伝子産物は隣接する細胞で合成され、細胞壁を越えて移行し機能しているものと考えられる。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、病原微生物との関わりにおける役割について検討した。

4. 研究結果及び自己評価：

1) 篩管 RNA のクローニング

篩管液には 100 から 200 塩基程度の長さの RNA が多く含まれている。篩管液を採取し RT-PCR 法を用いて増幅、cDNA ライブラリーを作成した。約 300 クローンの配列を決定したところ、重複はほとんどなく、rRNA, tRNA, 各種 cDNA などの断片が含まれていた。このことから篩管液中の RNA は特定の分子種が多いのではなく、多様な比較的小さな分子の集合であることが推測された。篩管液の RNA についてはじめての網羅的な記述ができたと考えている。

2) 篩管内への物質注入系の構築

イネ篩管への物質注入系を構築した。トビイロウンカの口針をレーザーで切断し、切断後、篩管液が出てきたことを確認したら葉鞘表面の篩管液滴に、蛍光色素液を添加することで、蛍光物質を導入することができた。分子量の異なる蛍光物質を注入することによって、イネ葉鞘の篩部要素 - 伴細胞間の原形質連絡の透過性を推定した。篩管液に存在する物質の解析に必須な手法を開発できたと考えている。

3) GFP mRNA の導入実験

開発した MUSI 法を用いて RNA の注入実験を行った。GFP mRNA の導入を行なったところ低頻度ではあるが、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。篩管液中の mRNA は翻訳されている可能性が示された。篩管液の mRNA が翻訳される可能性については、接ぎ木実験で示唆されていたが、接ぎ木実験では蛋白質の輸送と mRNA の輸送を区別することが難しいのに対して本研究では mRNA を導入しており、より強く mRNA が翻訳され得ることを示せたと考えている。

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。篩部要素には核が無いので、篩部要素のオルガネラには、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。GFP を用いた実験によって、細胞間移行後に蛋白質がオルガネラに局在することを示唆することができた。この結果は、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、植物においては、見掛け上「細胞」であっても機能的には隣接細胞と遺伝情報を交換して機能していることを示すものと考えている。

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

伴細胞でタンパク質の発現量を変化させることによって、篩管液のタンパク質組成を変化させるこ

とに成功した。

#### 6) TRXh を発現する形質転換タバコの解析

イネ TRXh 形質転換タバコで発現させ、原形質連絡の透過性を高めたタバコを作製した。このタバコ植物では、移行蛋白質に変異を持つタバコモザイクウイルスの細胞間移行の頻度が高まっていることを明らかにした。本実験は、植物由来の蛋白質が、植物ウイルスの細胞間移行を補佐することを in planta で示した世界で初めての実験例である。

#### 5 領域総括の見解

イネの篩管ヘウソカの口針を通じて標識 mRNA を注入して隣接細胞への輸送を実証するという独自のアプローチによって、植物での物質輸送について新知見をもたらした。このことは大変興味深いですが、さらなる発展性はなかなか困難といえる。

#### 6. 主な論文等

Ishiwatari Y, Nemoto K, Fujiwara T, Chino M and Hayashi H. "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)

Fujimaki S, Fujiwara T and Hayashi H " A new method of microinjection into a single sieve tube of intact rice plants. " *Plant Cell Physiol.* 41, 124-128 (2000)

Fukuda A, Ishiwatari Y, Abe K, Chino M, Fujiwara, T and Hayashi H " 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

Kuzuhara Y, Isobe A, Awazuhara M, Fujiwara T, and Hayashi H (2000) Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient conditions *Soil Science and Plant Nutrition* 46, 265-270

Mori T, Kawakami S, Hayashi H, Yoneyama T, Watanabe Y, and Fujiwara T " Dilation of Plasmodesmata and Cell-To-Cell Movement of Viruses in Transgenic Tobacco Plants Expressing Rice Thioredoxin h " *Plasmodesma2001*, Cape Town, 2001