

氏名	嶋田知生
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第146号
学位授与の日付	平成7年3月23日
学位授与の要件	生命科学研究科 分子生物機構論専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	種子タンパク質の細胞内輸送に関わるデンスベシクル と低分子量GTP結合タンパク質の解析
論文審査委員	主査教授 藤田善彦 教授 村田紀夫 教授 西村幹夫 助教授 佐々木幸子（名古屋大学）

真核細胞内には様々なオルガネラが存在し、それぞれが独自の役割を果たし、また時にはお互いに協調し合いながら、全体として一つの細胞を成り立たせている。個々のオルガネラが首尾良く働くためには、そのオルガネラで特異的な機能を果たしているタンパク質の存在が必要である。それは各々のタンパク質が合成の場からそれぞれのオルガネラに正しく輸送されることが、真核細胞の営みに不可欠であることを意味している。

高等植物の液胞は一般に細胞内でもっとも大きなオルガネラであり、細胞膨圧の維持や代謝物の蓄積など植物細胞にとって重要な機能を果たしている。さらに、液胞はさまざまな加水分解酵素を含み細胞内成分の分解を行っている。また、登熟種子の貯蔵細胞に見られる液胞のように、タンパク質を盛んに蓄積し貯蔵するものもある。液胞タンパク質のcDNA構造解析と実際に精製された液胞タンパク質のN末端アミノ酸配列の比較から、多くの液胞タンパク質はプレプロ型構造をしていることが明らかとなってきた。プレプロ型の液胞タンパク質は粗面小胞体で合成され細胞内を小胞によって液胞に輸送され、液胞に到着するとペプチド結合の切断を受け成熟型へと変換する (Hara-Nishimuraら、1993b)。

本研究では植物細胞における液胞タンパク質の細胞内輸送について解析を加えた。研究材料に登熟カボチャ子葉を選んだが、この細胞は液胞種子タンパク質を多量に合成しており、生化学的解析に向いていると考えたからである。また、特にカボチャの種子タンパク質はその組成が単純であり、解析が容易である利点がある。今回、電子顕微鏡観察により登熟カボチャ子葉細胞内に特異な小胞であるデンスベシクルを見出した。カボチャの主要種子タンパク質である11Sグロブリンと2Sアルブミンに対する特異抗体を用いて登熟子葉の組織免疫電顕観察を行ったところ、どちらの特異抗体を用いても、デンスベシクル上に金粒子が局在し、このデンスベシクルが種子タンパク質を含むことが確認された。このことより、デンスベシクルが種子タンパク質の輸送に関与していることが示唆され、さらに解析を加えた。その結果、分画遠心とパーコール遠心を組み合わせることにより、デンスベシクルを単離することに成功した。これまで、パルス・チェース実験からインゲンマメ (Chrispeels, 1983)、カボチャ (Hara-Nishimuraら、1985; Hara-Nishimuraら、1993a)、およびヒマ (Lord, 1985a; 1985b) の登熟種子細胞でデンスベシクルの存在が知られていたが、その実体についてはよく判っていなかった。今回得られたデンスベシクルは直径約300nmであり、ゴルジ小胞などの輸送小胞に比べるとはるかに大型であった。また、登熟エンドウ子葉から単離されている、種子タンパク質のレクチンを含むクラスリン被覆小胞とも異なるものであった (HarlyとBeever, 1989a)。これらのことから、デンスベシクルは既知の輸送小胞とは明らかに異なるものであると考えられた。デンスベシクルは種子タンパク質の前駆体を多量に含むとともに、それ以外のタンパク質も幾つか検出され、それらが輸送に関与する因子である可能性が考えられた。そして、実際に、デンスベシクルに2種類の低分子量GTP結合タンパク質を見出した。

さらに、分裂酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の低分子量GTP結合タンパク質Vps21pのホモログであるカボチャVpt1pのcDNAクローニングを行った。得られたcDNAクローンpVPT1-1は全長848bpで、199アミノ酸残基のタンパク質Vpt1pをコードするオー

プリーディングフレームを含んでいた。Vpt1pは相同性から見てRab5サブファミリーに属するタンパク質であることが示された。Vpt1pは以下の3つの点から種子タンパク質の輸送に関与していることが示唆された。1つ目はVpt1pがデンスベシクルに存在する点である。デンスベシクルは登熟子葉で種子タンパク質の輸送に関与するオルガネラである(上記; Hara-Nishimuraら、1985)。このデンスベシクルにVpt1pが存在することをイムノブロット解析および免疫電顕観察によって確認した。このことは、Vpt1pが種子タンパク質の細胞内輸送で、特にデンスベシクルの関与する過程で、働いていることを強く示唆するものである。2つ目は、Vpt1pのmRNAの蓄積量が組織および時期特異的に制御されており、それが種子タンパク質の合成の制御とよく一致する点である。種子タンパク質は登熟期の子葉で盛んに合成されている。ノーザンブロット解析で調べたVpt1pのmRNAは、調べた組織の中では登熟子葉に最も多く蓄積していた。子葉におけるVpt1pのmRNAのこの蓄積は、種子タンパク質の合成が止まる発芽期には急速に減少した。これらのことから、Vpt1pが種子タンパク質の合成過程に何らかの関係があることが示唆された。3つ目はVpt1pがVps21pのホモログである点である。Vps21pは分裂酵母において液胞タンパク質の細胞内輸送に関わっていることが示されている(Horazdovskyら、1994)。細胞内の小胞輸送において植物細胞と酵母ではよく似た機構が働いていると考えられている。例えば、ダイズのRab1とアラビドプシスのRab6は、それぞれ分裂酵母の突然変異株ypt1とypt6の形質を回復させることができる(Cheonら、1993; Bednarekら、1994)。このことから、Vpt1pがVps21pの機能を相補しうる可能性は十分考えられ、Vpt1pが種子タンパク質の輸送を担っていることが示唆された。

今回の結果とこれまでの報告をまとめ、さらに動物細胞と酵母におけるリソソーム・液胞の輸送ルートを参考にして、登熟種子細胞における液胞タンパク質の細胞内輸送ルートを考えてみたい。Chrispeels(1983)とLord(1985a;1985b)の結果から、デンスベシクルは輸送経路のうちのゴルジ体と液胞の間に位置していると考えられる。動物細胞と酵母ではリソソーム・液胞の輸送ルートでは、ゴルジ体と液胞の間にはエンドソームが存在している。植物細胞ではこれまでエンドソームの存在はあまり知られていなかった。今回、デンスベシクルにRab5サブファミリータンパク質であるVpt1pが存在していることを明らかにした。動物細胞ではRab5サブファミリータンパク質は早期エンドソームに局在していることが知られている(Chavrierら、1990)。このことから、デンスベシクルが植物細胞におけるエンドソーム様のオルガネラであると考えられる。(植物細胞では早期エンドソームと後期エンドソームの区別が全く知られていないので、ここでは単にエンドソームとする)。そうすると植物細胞においても、液胞タンパク質がゴルジ体からエンドソームを経由して液胞に運ばれることになり、動物細胞や酵母との共通性が浮かび上がってくる。

今回得られたデンスベシクルの解析を通して、植物細胞における液胞タンパク質の輸送機構について更なる知見が得られると期待される。

## 審査結果の要旨

申請論文は高等植物における液胞タンパク質の輸送機構を、登熟カボチャ種子を材料に用いて解析したものである。登熟種子は種子タンパク質を大量に合成し、液胞内に蓄積する。申請者嶋田知生はこの現象に着目して、種子タンパク質の組成が単純であるカボチャを用いることによって、以下の知見を得た。

(1) 登熟種子細胞において種子タンパク質の細胞内輸送に関わる輸送小胞（デンスベシクル）を世界で初めて単離することに成功した。デンスベシクルの存在はこれまで *in vivo* ラベルの実験からその存在は知られていたが、具体的な形態などは未知であった。今回単離したデンスベシクルは直径約 300 nm であり、主要な 3 種の種子タンパク質のプロ型前駆体を大量に含んでいた。さらにそれ以外にも多数のマイナーなタンパク質を検出し、N 末端アミノ酸配列から新規のタンパク質であることを示唆した。これらのタンパク質の解析を通じて、輸送に関わる新たな成分が明らかにされる可能性が考えられる。

(2) デンスベシクルに 2 種類の低分子量 GTP 結合タンパク質（以下 G タンパク質と略す）が存在することを明らかにした。動物や酵母においてはタンパク質の小胞輸送における G タンパク質の関与はよく知られているが、植物ではよく似た機構が働いているだろうという推察の域を出ていなかった。今回得られた結果は、植物でタンパク質の輸送に関わるオルガネラに G タンパク質が存在していることを初めて示したものである。植物のタンパク質の輸送における G タンパク質の役割を知る場合、重要な手がかりになると期待できる。

(3) Rab5 サブファミリーに属するタンパク質 Vpt1p について解析を加えた。cDNA クローニングと構造解析の結果、カボチャ Vpt1p は酵母において液胞タンパク質の輸送に関わる Vps21p のホモログであった。ノーザンブロット解析により種子タンパク質の合成が盛んである登熟種子において Vpt1p の mRNA の発現量が多いことが明らかになった。特異抗体を用いた解析より Vpt1p がデンスベシクルの膜に存在することを明らかにした。以上の結果より、Vpt1p が登熟種子において種子タンパク質の細胞内輸送に関わっている可能性を示唆した。これらの結果を踏まえて申請者は、デンスベシクルがエンドソーム様のオルガネラであり、植物における種子タンパク質の輸送経路が動物のリソソームタンパク質や酵母の液胞タンパク質のそれに類似することを考察している。

本論文は液胞タンパク質の輸送の鍵の一つである輸送小胞（デンスベシクル）を初めて単離し、生化学的解析を加えたもので、液胞タンパク質輸送に関与する成分を同定していく重要な手段を提供するものであり、博士論文として十分に条件を満たすものと判断された。尚、これらの成果の一部は既に 2 編の論文 (*Plant Cell Physiol.* 35, 713-718; 35, 995-1001) として発表されている。

また、提出された学位請求論文の研究分野及びその周辺領域について口述試験を行った。その結果申請者はすべての質問に対し満足すべき回答を与えたので、申請者のもつ研究能力及び学力は課程修了及び学位取得の要件を満たすものと判定された。また、英語に関しては、論文作成及び論文読解において十分な能力を有していると判定された。