

氏 名 二 藤 和 昌

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第608号

学位授与の日付 平成14年3月22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 ペルオキシソームタンパク質輸送機構の解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 飯田 滋
教授 西村 幹夫
教授 長谷部 光泰
教授 大隅 隆 (姫路工業大学)

高等植物のペルオキシソームは個体の成長段階に合わせて、その酵素群を変化させ様々な生理機能を果たしている。脂肪性種子の発芽段階において、ペルオキシソームは内包する脂肪酸 β 酸化系とグリオキシル酸回路の諸酵素を用いて、子葉に蓄えられた貯蔵脂肪を糖へと変換するために中心的に機能する。そして、さらに生長が進み光を浴び、緑化すると脂質代謝を担っていた酵素群は減少し、変わって光呼吸に関与する酵素群がペルオキシソーム内に蓄積し機能しはじめる。このようなペルオキシソームの劇的な機能転換には、翻訳後のペルオキシソームタンパク質が適切にペルオキシソームへと輸送されることが重要である。そこで本研究論文では、ペルオキシソームタンパク質輸送の分子メカニズムという視点から、ペルオキシソームの機能獲得について理解するべく研究を進めた。

第1章では、ペルオキシソーム膜タンパク質の *AtPex14p* を欠損した結果、ペルオキシソームの PTS 依存的タンパク質輸送が低下し、そのためペルオキシソーム機能不全となった *ped2* 変異体を足がかりとして、マトリクスタンパク質輸送機構の解明を行った。*AtPex14p* 以外にペルオキシソームへのタンパク質輸送に関わる因子として、PTS1 レセプターと PTS2 レセプターとして機能する可能性が示唆されている *AtPex5p* と *AtPex7p* の cDNA 配列がシロイヌナズナで報告されており、これらも含めて機能を同定した。

ペルオキシソームタンパク質輸送過程における機能分担を明らかにするため、*AtPex14p*、*AtPex5p*、*AtPex7p*、PTS1 型タンパク質、PTS2 型タンパク質間の相互作用について解析を行ったところ、以下の結果が得られた。(1) *AtPex14p* は *AtPex5p* と結合するが、*AtPex7p* および PTS1 型タンパク質、PTS2 型タンパク質とは直接結合しない。(2) *AtPex5p* は PTS1 型タンパク質と結合する。(3) *AtPex7p* は PTS2 型タンパク質と結合する。(4) *AtPex5p* は *AtPex7p* と結合する。(5) それぞれの結合領域は互いに重複していない。以上の結果から、新規に合成された PTS1 型タンパク質および PTS2 型タンパク質は細胞質中に存在する *AtPex5p-AtPex7p* レセプター複合体によって捕捉された後に、*AtPex5p* を介してペルオキシソーム膜上の *AtPex14p* に結合し、巨大な初期輸送複合体を形成すると考えられる。さらに、*AtPex7p* が *AtPex5p* を介して *AtPex14p* と結合することから、シロイヌナズナにおいて PTS2 型タンパク質の輸送が *AtPex5p* に依存的であり、付加的な経路であることが示された。

また、シロイヌナズナの様々な器官における、これら3つの輸送因子の発現をイムノブロットにより解析したところ、*AtPex14p* と *AtPex5p* はほとんどの器官で検出されるのに対して、PTS2 レセプターの *AtPex7p* は限られた器官でのみ検出された。この結果は、PTS2 型タンパク質の発現は高い器官特異性を持っていることを反映しており、これらの発現が植物ペルオキシソームの機能分化を支えている可能性を示唆している。

第2章では、マトリクスタンパク質とは異なる経路で輸送されていることが示唆されているペルオキシソーム膜貫通型タンパク質の局在化機構について解析を行った。この解析にはペルオキシソームに局在する 31 kDa 膜貫通型タンパク質であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (pAPX) を用いて行った。

pAPX の細胞内局在をシヨ糖密度勾配遠心法により解析したところ、pAPX はペルオキシソーム画分のみならず、小胞体画分にも検出された。しかしながら、マグネシウムシフト法による解析の結果からは、少なくとも pAPX が粗面小胞体に局在する可能性は否定され、それ以外の何らかの膜系に局在することがわかった。pAPX がどのような膜構造物に局在しているかを免疫電子顕微鏡観察により解析したところ、pAPX はペルオキシソーム膜に局在するとともに、未同定の膜構造物上にも検出された。この結果は pAPX の局在化に未同定の膜構造物が関与することを示唆している。ペルオキシソーム膜貫通型タンパク質の局在化がこのような膜構造物を介して輸送されているという可能性は、ペルオキシソーム形成における由来や分泌小胞との関連を考察する上で興味深い。

本研究により、高等植物ペルオキシソームへのマトリクスタンパク質、膜貫通型タンパク質両輸送機構の一端が明らかになった。これらの結果は輸送機構のみならず、これまで不明であったペルオキシソームというオルガネラの起源や新規なペルオキシソーム機能に関して新たな知見を与えるものと考えている。

論文の審査結果の要旨

高等植物のペルオキシソームは、個体の生長に合わせて様々な生理機能を担っている。その中で最もよく知られた機能は、脂質代謝と光呼吸である。興味深いことに、このような植物ペルオキシソームの機能は、内包する酵素群を変化させることで可逆的に転換することが知られている。このような機能転換は、翻訳後のタンパク質が適切に輸送されることが重要であり、ペルオキシソームタンパク質輸送機構がその一端を支えていると考えられる。申請者は、ペルオキシソームへのタンパク質輸送が不完全となったために、ペルオキシソーム機能を欠損したシロイヌナズナ *ped2* 変異体を手がかりとして、植物ペルオキシソームへタンパク質輸送機構の解明を行った。

PED2 遺伝子にコードされていたタンパク質のアミノ酸配列は、酵母や哺乳類の研究からペルオキシソームタンパク質輸送に関わると報告されている Pex14p と相同性を示すことが分かった。そこで本タンパク質を AtPex14p と命名した。AtPex14p の細胞内局在を解析したところ、ペルオキシソーム膜の細胞質側に表在していることが明らかとなった。Pex14p 以外にペルオキシソームタンパク質輸送に関わる因子として、細胞質に局在しペルオキシソーム輸送シグナル(PTS1 または PTS2)を認識するレセプター AtPex5p と AtPex7p の cDNA 配列のみが報告されている。そこで、申請者は AtPex14p に加えてこれらレセプターの機能同定と役割分担についてタンパク質間相互作用を中心に解析し、得られた結果から以下のようなタンパク質輸送モデルを提唱した。新規に合成された PTS1 型タンパク質および PTS2 型タンパク質は細胞質中に存在する AtPex5p-AtPex7p レセプター複合体によって捕捉された後に、AtPex5p を介してペルオキシソーム膜上の AtPex14p に結合し、巨大な初期輸送複合体を形成すると考えられる。このような輸送モデルから、高等植物のペルオキシソームタンパク質輸送機構は、酵母や哺乳類と異なる独自の様式であることが判明した。

さらに、これらのタンパク質輸送因子の発現は、発芽や緑化の過程といったペルオキシソーム機能分化の時期に対応していることも確認している。この結果は、オルガネラ分化におけるタンパク質輸送機構の重要性を示している。また、これまで PTS1 と PTS2 の使い分けについて言及されていなかったが、それぞれのレセプターの発現から、PTS1 依存的なタンパク質輸送経路の方がより中心的に機能していることが推測された。

本論文は、植物ペルオキシソームの機能分化とタンパク質輸送機構の関係を追求した独創的な研究であり、今後のオルガネラ研究における新しい展開を期待させるものであった。これらの成果の一部は既に国際誌に発表されており、学位論文として十分な内容をもつものと判断した。

博士論文の内容について質疑応答を行った結果、研究の全体の構想を十分表現でき、研究の細部まで確実に理解していることが判断された。本研究の周辺領域の知識も十分であること、また既に発表している複数の論文から英語による論文記述の能力も十分であると判定された。