

| | |
|----------|---|
| 氏名 | 井上香織 |
| 学位（専攻分野） | 博士（理学） |
| 学位記番号 | 総研大甲第143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 | 液胞-プロテインボディ相互変換に伴う膜タンパク質 の変動 |
| 論文審査委員 | 主査 教授 村田紀夫 教授 西村幹夫 教授 藤田善彦 助教授 前島正義（名古屋大学） |

植物種子にはタンパク質を貯蔵するオルガネラ、プロテインボディが存在する。登熟種子では、細胞内で合成された貯蔵タンパク質は液胞に蓄積してプロテインボディが形成される。これと反対に、種子が一旦吸収・発芽すると、プロテインボディは互いに融合を始め、内部の貯蔵物質を分解しながら一つの液胞へと発達していく。この液胞-プロテインボディ相互の機能的変換は、植物の種子細胞におけるダイナミックなオルガネラの変動であるにもかかわらず、その分子機構の解析はあまり進んでいない。彼女は、植物種子における液胞-プロテインボディ変換の機構には、プロテインボディの膜成分が重要な役割を果たすと考え、その主要タンパク質に着目して分子レベルでの解析を行った。また、この変換機構におけるプロテインボディ膜貫通型タンパク質の機能を明らかにすることを目的として、酵母細胞による発現系の確立を試みた。

第1章 カボチャプロテインボディ膜に存在するMP27とMP32の解析

カボチャプロテインボディ膜には5種類の主要タンパク質MP23、MP27、MP28、MP32、MP73が存在する。種子発芽後、芽生えの成長に伴っていずれのタンパク質もその量が減少したが、その中でもMP27とMP32は急速に消失した。MP27とMP32が消失する時期に対応してプロテインボディの液胞化が起きることから両タンパク質がプロテインボディから液胞への変換に関与している可能性が考えられた。これを調べるためにMP27とMP32のクローニングによる構造解析を行った。MP32の決定したN末端アミノ酸配列をもとに登熟カボチャcDNAライブラリーをスクリーニングし、ORFを含むクローンを得た。クローンのcDNA全塩基配列を決定したところ、予測アミノ酸配列中にはMP32のN末端アミノ酸配列だけでなく、MP27のN末端アミノ酸配列も含まれることが明らかになった。MP27のN末端側には27残基から成る疎水性が高い配列が存在することから、MP27とMP32は、シグナルペプチド、MP27、MP32の順に並んだプレプロ型前駆体として合成され、co-translational及びPost-translationalな切断を受けると予想された。MP32の決定したN末端アミノ酸配列は、予測アミノ酸配列の親水性領域中のアスパラギン残基の次から始まっていた。一方、植物種子では、貯蔵タンパク質の前駆体分子表面のアスパラギン残基のC末端側を切断する、液胞プロセシング酵素の存在が明らかにされつつある。従って、種子の液胞プロセシング酵素が、MP27とMP32のプロ型前駆体を切断して成熟型へと変換すると考えられた。

種子登熟期におけるMP27-MP32転写産物の量的変動とタンパク質の蓄積を、Northern blot、イムノブロットにより解析した結果、MP27-MP32転写産物の発現パターン、タンパク質の蓄積パターンとも、貯蔵タンパク質11Sグロブリンのそれと類似していたことから、登熟種子におけるMP27-MP32の転写レベルでの発現は貯蔵タンパク質の発現と同様の機構で調節されること及び、MP27-MP32は貯蔵タンパク質の合成の盛んな時期に合成されることが示唆された。

第2章 カボチャプロテインボディの膜貫通型タンパク質MP28とMP23の解析

カボチャプロテインボディ膜の2つの膜貫通型タンパク質、MP28とMP23は免疫化学的に類似する。MP28とMP23それぞれのペプチドマップ解析を行ったところ、両

タンパク質の一次構造が良く似ていることが示唆された。MP 28とMP 23が同じ遺伝子にコードされるのかどうかを確かめるために、MP 23のN末端アミノ酸配列を決定して登熟カボチャ子葉 cDNAライブラリーをスクリーニングし、2種類のクローンを単離した。このうち、一方のcDNA塩基配列を決定したところ、予測アミノ酸配列中にMP 23の決定したN末端アミノ酸配列が含まれたことから、このクローンがMP 23をコードするクローンであることが明らかとなった。また、もう一方のcDNAクローンについてもcDNA塩基配列を決定するとともに、MP 28の内在アミノ酸配列を決定したところ、このクローンがMP 28をコードするクローンであることが判明した。MP 28とMP 23の予測アミノ酸配列は88%相同で、他の植物種子の α -TIPと高い相同性(65%–67%)を示したことから、MP 28とMP 23は α -TIPホモログであることが判明した。4つの種子TIPの疎水性解析と一次構造の比較から、種子のTIPは6つの予想膜貫通領域を持つこと、予想膜貫通領域の1つ目と2つ目の間の親水性領域の配列は4つのTIPの間で著しく異なっており、MP 23のこのグループはこれまで報告されたTIPの中で最も長いことが示唆された。一方、MP 23のN末端配列は、予想膜貫通領域の1つめと2つめの間のループ内のグリシンから始まっていることから、MP 23は29 kDaの前駆体として合成され、N末端側の7 kDaの断片が post-translational に切断されてMP 23が生じることが示唆された。

カボチャ種子登熟期におけるMP 28とMP 23の転写産物の量的変動を調べるためにNorthern blot解析を行ったところ、MP 28とMP 23の転写レベルでの発現は、貯蔵タンパク質のそれよりも早い段階で起きることが示唆された。種子登熟過程におけるMP 28及びMP 23タンパク質の量的変動をイムノブロットにより解析した結果、MP 28とMP 23の転写産物の蓄積の時期に対応して、29 kDa前駆体及びMP 28が検出された。この時期の登熟子葉を用いて免疫組織化学的解析を行ったところ、29 kDa前駆体とMP 28は液胞膜に局在していた。一方、種子登熟の中期まで蓄積していた29 kDa前駆体の量は、登熟中期から後期にかけて減少し、それに伴ってMP 23が出現したことから、29 kDa前駆体のMP 23への変換は種子登熟の中期以降に起きること及び、MP 23前駆体のMP 23への変換は液胞或いはプロテインボディの膜上で起こることが示唆された。

第3章 カボチャプロテインボディ膜貫通型タンパク質の酵母細胞における発現

カボチャプロテインボディ膜のMP 28とMP 23の液胞膜、プロテインボディ膜における生理的役割は不明である。MP 28とMP 23の液胞膜における機能を明らかにするために、MP 28とMP 23に類似したタンパク質を持たない酵母における解析を試みた。GALIプロモーターの下流にカボチャのMP 23前駆体またはMP 28のcDNAをつなげたコンストラクトを構築し、酵母細胞を形質転換した。形質転換体をガラクトースを含む培地で培養すると、MP 23前駆体及びMP 28のcDNAの発現誘導が見られた。発現した両タンパク質は液胞プロテイナーゼAを欠損した(*pep4*)株でのみ蓄積し、野生株では速やかに消失した。MP 23前駆体及びMP 28を蓄積した酵母細胞の細胞分画を行ったところ、MP 23前駆体及びMP 28は細胞内の膜画分に含まれていた。MP 23前駆体とMP 28の細胞内局在を調べるために、両タンパク質を蓄積した酵母細胞の蛍光抗体染色体及びプロテインA-金コロイド染色を行った結果、両タンパク質とも液胞膜へ

局在していたことから、今後、酵母液胞膜におけるMP 2 3 前駆体及びMP 2 8 の物質輸送活性を解析することが可能となった。

審査結果の要旨

植物種子の細胞内に存在するプロテインボディは、内部に大量の貯蔵タンパク質を含むオルガネラである。双子葉植物では、プロテインボディは種子の登熟に伴って液胞から出芽によって形成され生じ、種子発芽後、相互に融合して再び液胞へと発達していく。植物種子細胞における液胞-プロテインボディ相互変換機構を解明するためには、変換過程で出芽や融合を行い動的に変化するオルガネラの膜の構成要素の解析が必要不可欠であると考えられる。

申請者は、プロテインボディ膜に存在するタンパク質が液胞-プロテインボディ変換過程における諸現象に関与すると考え、カボチャをプロテインボディ膜の主要タンパク質を分子レベルで解析した。また、種子登熟及び発芽過程における主要膜タンパク質の発現と量的変動を調べるとともに、膜貫通型タンパク質の機能解析が可能な実験系を、酵母細胞による発現系を用いて確立した。

本研究は、プロテインボディ膜タンパク質の変動を、種子の生活環における細胞内オルガネラの機能変換と結びつけてとらえ、従来のプロテインボディ膜タンパク質の解析に新たな視点を拓いた。それに加えて本研究では、オルガネラの変換に伴って変動する4種のプロテインボディ膜タンパク質のcDNAを単離してその構造を明らかにし、膜タンパク質のオルガネラ変換における役割を将来的に検討し得る土台を築いた。その内の2種の膜タンパク質MP27とMP32は peripheral protein であり発芽時に観察されるプロテインボディから液胞への変換過程で最も早く消失するタンパク質であること、これら2つのタンパク質が1本のポリペプチドとして合成させた後、プロセッシングされることにより成熟型になるものが判明し、これらのタンパク質がプロテインボディの液胞化に関与する新たな膜タンパク質であることを明らかにした。また2種の膜貫通型タンパク質MP28とMP23は6回膜を貫通するタンパク質でいわゆる tonoplast integral protein (TIP) のホモログであることが判明し、MP23は種子登熟後期に特異的にプロセッシングを受け、5回膜貫通タンパク質として機能することが初めて明らかにされた。更に、植物のプロテインボディ膜貫通型タンパク質を酵母の液胞膜に蓄積させることに初めて成功し、タンパク質の機能を解析する上で重要な試験管内実験系を確立した。以上のように、本論文は液胞-プロテインボディ相互変換過程における膜タンパク質の変動を分子レベルで初めて明らかにしたもので、新規の膜タンパク質の同定、プロセッシングによる膜タンパク質機能の調節等新たな知見を明らかにしたもので、液胞-プロテインボディ相互変換に働く調節機構を解明していく上で重要な発見を含んでおり、学位論文として価値があると判断した。なお、これらの成果の一部は Plant Journal に発表されている。

また、申請者による研究成果の説明を30分間行った後、博士論文を中心に、その関係する分野に関する知識について、口述形式による試験を行い、1) 膜タンパク質の膜との結合、2) 膜タンパク質の機能解析の方法、3) 膜タンパク質のトポロジー等について試問した。その結果、審査委員一致して、井上香織氏が学位授与に足る学識と研究遂行能力を持つと判定した。

英語については、これまでの投稿論文2編を審査し、博士の学位に足る十分な能力を有していると判定した。