

氏名 三橋尚登

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第495号

学位授与の日付 平成12年9月29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 高等植物の液胞の動態：新規の膜タンパク質と
GFPによる可視化

論文審査委員 主査 教授 大隅 良典
教授 西村 幹夫
教授 飯田 滋
教授 西村 いく子（京都大学）

論文要旨の内容

高等植物の液胞は、植物の生長・分化の過程や環境の変化に応じてその構造と機能が大きく変動するオルガネラである。この液胞の分化が、植物の細胞分化や環境応答に重要な役割を果たしていることが最近明らかになってきた。液胞は、栄養器官に見られる分解型液胞と種子に見られるタンパク質蓄積型液胞の2種類に大別される。分解型液胞は細胞内の不要な成分の分解に関わるのに対し、タンパク質蓄積型液胞は種子タンパク質を貯蔵するという全く逆の機能を発揮する。この2種類の液胞は、膜タンパク質の入れ替えを伴って、可逆的に相互変換する能力を供えている。したがって、液胞膜タンパク質を指標として液胞の分化転換機構の解析が可能である。前半は、液胞の相互変換が行われる種子の登熟・発芽期に一過的に発現する新規の液胞膜タンパク質であるMP73の構造と性質についての解析結果を示す。後半では、液胞のダイナミックな動態や液胞タンパク質の輸送機構を解析する新たな実験系の構築を目指し、GFPを指標として液胞を含む植物細胞の分泌輸送経路を可視化した。

第1章 カボチャプロテインボディ膜に存在するMP73の解析

乾燥種子に一過的に発現する液胞膜タンパク質の機能を調べるために、カボチャ乾燥種子から純度の高いプロテインボディ膜画分を調製した。そこに含まれる主要な膜タンパク質のうち、未同定のMP73の構造とその性質について解析を行った。

単離したMP73のcDNAから予測されたアミノ酸配列から、MP73前駆体は、シグナルペプチド、p24領域、MP73の3つの領域から構成されていることが判明した。MP73のC末端には非常にユニークな13回繰り返し配列を含む親水性の高いGlu/Arg-rich domainが存在した。二次構造予測の結果、この領域は α -ヘリックス構造をとっている可能性が高い。また、MP73にはN-グリコシダーゼFで切断されるN結合型糖鎖が付加されていることから、プロテインボディの内腔側に存在することが明らかとなった。さらに、ハイドロバシープロットで膜貫通領域が認められなかったことと、アルカリ溶液で可溶性であることから、膜表在タンパク質であることが示された。

抗MP73抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察および単離PACベシクル画分のイムノプロット解析の結果から、MP73は小胞体(ER)でN末端にp24領域を持つ102kDaのプロ型前駆体として合成された後、PACベシクルを経由して液胞に輸送され、液胞内でプロセシングを受けてp24領域とMP73になることが示唆された。MP73はプロテインボディ膜上で100kDaの複合体を形成しているが、このMP73複合体の大きさは、PACベシクル画分で検出されたプロ型前駆体とほぼ等しいことから、p24領域と複合体を形成していることが示唆された。MP73は、種子の乾燥期に一過的に出現することから、液胞膜の乾燥耐性や構造維持に関与している可能性が強く示唆された。

第2章 GFPによる液胞・分泌輸送系オルガネラの可視化

高等植物の液胞のダイナミックな動態および液胞への輸送機構を解明するため、GFPをレポータータンパク質として、タバコ培養細胞BY-2に発現させる実験系を構築した。

GFPのN末端に2SアルブミンのシグナルペプチドをつないだSP-GFPは、ERで合成され

培地中に分泌された。SP-GFP の C 末端に ER 残留シグナル HDEL を付加した SP-GFP-HDEL は、ER に局在し、明瞭な細胞内ネットワーク構造が観察された。液胞輸送シグナルであるカボチャ 2S アルブミンの C 末端 18 アミノ酸を SP-GFP の C 末端に付加した SP-GFP-2SC は、液胞内に一過的に蓄積し、植え継ぎ 7-8 日目に急激に消失することが分かった。GFP が蓄積した液胞は、酸性コンパートメントを染色するニュートラルレッドによって強く染色された。この結果は、これまで GFP の蛍光は観察されないとされてきた酸性液胞内に GFP が蓄積されることを示すはじめての報告である。

液胞輸送レセプター PV72 の膜貫通領域と細胞質領域を SP-GFP の C 末端につないだ SP-GFP-PV72C は、細胞質中でのゴルジ体様の構造物に局在するが、栄養飢餓状態の細胞では、GFP の蛍光は液胞に移行した。この 2 つのタイプの細胞に対して抗 GFP 抗体を用いてイムノプロット解析を行ったところ、ゴルジ型の局在を示す細胞では GFP-PV72 の全長が検出されるのに対し、液胞に移行した細胞では GFP のみの大きさで検出された。おそらくはプレ液胞コンパートメントで膜貫通領域と GFP の間が切断され、GFP のみが液胞に移行したと考えられた。

細胞内の 2 種類の液胞を識別するため、分解型液胞膜タンパク質_-TIP とタンパク質蓄積型液胞膜タンパク質_-TIP を GFP につないだ融合タンパク質をタバコ培養細胞 BY-2 に発現させた。各々の融合タンパク質が正しく液胞膜に輸送されていることを確認した。これまで、それぞれの TIP には、2 種類の液胞それぞれへ選別輸送されるための異なるシグナルが存在すると思われていたが、BY-2 細胞内で_-TIP と_-TIP が同じ液胞に輸送されることが分かった。

本研究により、ダイナミックな液胞の動態を生きた細胞を用いて解析するための実験系が確立された。今後この系をシロイヌナズナなどの植物体に導入することによって、各器官で分化転換した液胞の生理的役割が明らかにされることが期待される。

論文の審査結果の要旨

高等植物の液胞は、植物の生長・分化の過程や環境の変化に応じてその構造と機能が大きく変動するオルガネラである。液胞は、栄養器官に見られる分解型液胞（LV；Lytic vacuole）と種子に見られるタンパク質蓄積型液胞（PSV；Protein storage vacuole）の2種類に大別されるが、両者は相互変換可能であり、また同一細胞内に共存することも可能である。この液胞の分化が、植物の細胞分化や環境応答に重要な役割を果たしていることが最近明らかになっている。

申請者は、液胞の相互変換が行われる種子の登熟・発芽期に一過的に発現する新規の液胞膜タンパク質である MP73 の構造と性質について解析した。また、液胞のダイナミックな動態や液胞タンパク質の輸送機構を解析する新たな実験系の構築を目指し、タバコ培養細胞 BY-2 を用いて、GFP を指標として液胞を含む植物細胞の分泌輸送経路を可視化することに成功した。

カボチャ乾燥種子に一過的に発現する液胞膜タンパク質 MP73 の構造とその性質について解析を行った。MP73 は、新規のタンパク質であり、C 末端には非常にユニークな 13 回繰り返し配列を含む親水性の高い Glu/Arg-rich domain が存在し、この領域は α -ヘリックス構造をとっていることが予測された。また、免疫電子顕微鏡観察の結果から、MP73 が PAC 小胞 ;Precurso-accumulating vesicles を介して液胞に輸送されることが示されたが、これは、膜タンパク質が PAC 小胞を介して輸送されることを示した最初の報告であり特筆される。MP73 の機能に関して、種子のみならず花粉での発現も見られることから、乾燥・吸水に対して液胞膜の強度を維持する働きがあると推測される。

GFP をレポータータンパク質として用いた液胞タンパク質の輸送機構の解析では、2S アルブミンの C 末端 18 アミノ酸（2SC）が液胞ターゲティングシグナルとして機能することを明らかにし、酸性化した液胞においても GFP が蓄積し蛍光指標として機能し得ることが初めて示すことに成功した。さらにその蛍光パターンが、BY-2 細胞の培養周期に依存して周期的に変化することを見出した。また、2SC ドメインを認識する液胞輸送レセプター PV72 がゴルジ体に局在することを明らかにするとともに、ゴルジ体とプレ液胞コンパートメント間をリサイクリングしている可能性を指摘した。さらに、2 種類の水チャネル a-TIP と g-TIP は、それぞれ PSV と LV に局在すると考えられていたが、BY-2 細胞では同一の液胞に局在することを明らかにし、両膜タンパク質の輸送の共通性が示された。

これらの結果は、液胞の分化転換機構を解明する上で重要な発見を含んでおり、学位論文として十分に価値があると判断した。なお、これらの成果の一部は、既に国際誌に発表されている。

専門領域及び関連領域に関する口述試験として、(1) 液胞膜タンパク質の生合成機構、(2) 酸性条件下での GFP 蛍光の発現、(3) 種子形成及び発芽における水の移動などについて質問した。申請者の返答は妥当なものであり、問題点もよく把握していることが確認された。この結果、審査委員全員一致で三橋尚登が博士の学位授与に足る学識と能力を持つと判定した。

英語の能力に関しては、既に公表されている欧文の論文から判断して博士として十分であると判定した。