

氏 名 後藤 志野

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1460 号

学位授与の日付 平成 23 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Functional analysis of peroxisomal protein transport
using Arabidopsis mutants

論文審査委員 主 査 教授 川口 正代司
教授 西村 幹夫
教授 長谷部 光泰
准教授 加藤 朗 （新潟大学）

論文内容の要旨

Peroxisomes are single membrane-bound organelles that are ubiquitous in eukaryotic cells. Plant peroxisomes are differentiated into several types, including glyoxysomes and leaf peroxisomes. Their functions are adapted to environmental and developmental changes, and tightly regulated by multiple factors involved in peroxisome biogenesis, such as protein transport. Since peroxisomes do not have their own genome unlike mitochondria and chloroplasts, the enzymes participated in peroxisomal functions are encoded in nuclear genome and are transported into peroxisomes after protein synthesis in the cytosol. However, the precise mechanism of peroxisomal protein transport has not been clarified. To identify the factors regulating peroxisome biogenesis, *aberrant peroxisome morphology (apem)* mutants that exhibit abnormal peroxisome morphology have screened. Each *apem* mutant exhibits different phenotype, such as the inhibition of protein transport to peroxisomes, abnormally shaped peroxisomes, or peroxisomes with different sizes. A primary focus of my project is to understand the mechanism of peroxisomal protein transport at the molecular level. In this study, two *apem* mutants, *apem9* and *apem10* were attempted to be analyze to identify novel components for protein transport to peroxisomes.

Chapter 1 describes the isolation of a novel *Arabidopsis* mutant, *apem9*, which showed the reduction of protein transport to peroxisomes. Therefore, *APEM9* gene product is considered to be compromised in protein transport into peroxisomes. The *APEM9* gene was found to encode an unknown protein. Hydropathy profile revealed that *APEM9* protein has a transmembrane domain (TMD) at its C-terminus. According to the transient expression assay, it is revealed that *APEM9* localizes on peroxisomal membrane. From these results and *apem9* phenotype, it is speculated that *APEM9* acts as a component of the transport machinery complex, which consists of several PEXOXINs (PEXs). Most of these PEXs are localized to peroxisomal membranes with own TMD or via interaction with another membrane protein. The AAA-ATPase PEX1-PEX6 complex, which has no TMD, was reported to be retained to peroxisomal membranes via protein-protein interactions with peroxisomal membrane proteins Pex26 and Pex15p in mammals and yeast, respectively. However, tethering proteins, which interact with PEX1 and PEX6, were not identified in plant cells. The transient expression analysis showed that expression of *APEM9* alters subcellular localization of PEX6, but not PEX1, from the cytosol to peroxisomes. Furthermore, protein-protein interaction assays revealed that PEX1 and PEX6 could bind together, and that this complex is recruited to peroxisomal membranes via the interaction with *APEM9* and PEX6. This finding shows that *APEM9* functions as an anchoring protein, such as Pex15p in yeast and Pex26 in mammals. However, these anchoring proteins differ at the amino acid level, indicating that, although the association of the PEX1-PEX6 complex with peroxisomal membranes is essential for peroxisomal functions, the protein that anchors this complex evolved uniquely in plants.

In addition, the T-DNA insertion lines, *apem9-2* and *apem9-3*, did not produce homozygous seeds, and self-fertilized fruits from heterozygous lines contained around 20%

aborted seed. Based on the result of the reciprocal cross of *apem9-2/+* with wild-type Columbia (Col), transmission of *apem9-2* allele was affected through pollen, but not through ovule. Interestingly, *apem9-2* pollen was matured as well as wild-type successfully, and they had the ability to germinate in the artificial germination condition. However, when *apem9-2* and wild-type pollens were attached to the same Col pistils, majority of embryo-reached pollen tubes seems to be wild-type. These results showed that the defect of peroxisomal function by way of APEM9 decreases the fertility of pollen, indicating that peroxisomal functions are responsible for reproductive events.

Chapter 2 describes the analysis of another *apem* mutant, *apem10*, which exhibited a defect of protein transport and abnormally sized peroxisomes. Map-based cloning revealed that *APEM10* encodes a protein annotated as LON protease 2 (LON2). Arabidopsis LON2 is a typical LON protease containing LON N-terminal domain, AAA-ATPase domain and peptidase domain. According to immunoblot analysis, accumulation of peroxisomal proteins was altered in *apem10* and transient expression analysis showed that GFP-tagged LON2 localized in both peroxisomes and cytosol. These data implicate that LON2 contributes protein stability during peroxisomal protein transport. To approach the hypothesis, the variant *LON2* gene construct controlled by *LON2* promoter were introduced into the *apem10* mutants. This complementation assay indicates that peroxisomal protein transport requires LON2 N-terminal domain, which is thought to be involved in chaperone-like activity, but not peptidase activity.

In conclusion, this study discovered that an anchoring protein for the PEX1-PEX6 complex evolved as APEM9 in plants, which is a functional homolog of mammal Pex26. APEM9 is required for the functioning of the peroxisome throughout the plant life cycle. Additionally, the study on APEM10 suggested that unidentified controlling systems are present in peroxisomal protein transport. This study will provide help in mechanistic understanding of protein import into plant peroxisomes.

核にコードされているペルオキシソームタンパク質はサイトゾルで合成された後、ペルオキシソームへと輸送される。ペルオキシソームが正常に機能し、形態を維持するためには、この輸送機構が非常に重要となる。本研究は高等植物におけるペルオキシソームタンパク質輸送機構の分子メカニズムを明らかにするために、輸送機構が異常となった変異体の解析を行ったものである。後藤氏はペルオキシソーム輸送シグナル(PTS1)を融合したGFPでペルオキシソームを蛍光観察可能にしたGFP-PTS1植物に、EMSを処理して変異を誘発した*apem* (*aberrant peroxisome morphology*) 変異体シリーズを材料として用いた。様々な表現型を示すこれら変異体のうち、GFPがペルオキシソームに輸送されずサイトゾルに蓄積する変異体、*apem9*、*apem10*をとりあげ、それらの原因遺伝子、タンパク質の同定および機能解析を行った。

*apem9*変異体の原因遺伝子*APEM9*は植物ゲノムにのみ保存された機能未知遺伝子であることを明らかとした。GFPを用いた*APEM9*の細胞内局在解析において、*APEM9*はペルオキシソームに局在することを示した。また、*APEM9*のアミノ酸配列中には膜貫通領域が予測でき、このことから*APEM9*がペルオキシソーム膜において機能すると考えた。ペルオキシソームの膜にはタンパク質輸送に必須の因子群が集合する。これら因子群の多くは膜タンパク質であるか、他の膜タンパク質と結合してペルオキシソーム膜に局在している。しかしながら、AAA-ATPaseであるPEX1とPEX6は膜貫通領域をもたず、また相互作用する因子も明らかになっていなかった。実際にPEX6を植物細胞において一過的に発現させるとその局在はサイトゾルである。しかしながら、同時に*APEM9*を発現させることで、PEX6の局在はペルオキシソームに変化することを明らかにした。またPEX1は、PEX6と複合体を形成しPEX6-*APM9*間の相互作用を介してペルオキシソームに局在することを明らかにした。*APEM9*遺伝子の抑制株 (*apem9i*) を作出し表現型の解析を行ったところ、*apem9i*ではペルオキシソームの機能が著しく低下し、植物体の生長も抑制されることを見いだした。さらには、*APEM9*遺伝子破壊株では配偶子稔性の低下および胚発達異常が生じ、種子を形成することが出来ない。これら一連の結果から、*APEM9*はペルオキシソームの輸送に必須のAAA-ATPase複合体をペルオキシソーム膜に繋ぎ止める因子であり、ペルオキシソームの形成・機能や植物の存続に必須の因子であることを明らかにした。

*apem10*変異体は輸送異常変異体として単離されたが、その後の解析から生長が進んだ個体はペルオキシソームが巨大化する形態異常の表現型を示すことがわかった。原因遺伝子の同定により、*apem10*の原因遺伝子はLONプロテアーゼ2 (*LON2*) であることを明らかにした。LONプロテアーゼは原核生物、真核細胞のオルガネラに保存されている。機能は異常・不要タンパク質の除去が良く知られているが、タンパク質を解きほぐすというシャペロン様活性も示唆されている。後藤氏は、*apem10*において観察される多面的表現型は*LON2*の多機能性に由来するのではないかと考え解析を進めた。その結果、ペルオキシソームへのタンパク質輸送には*LON2*のシャペロン様機能に関与すると考えられているN末端領域が必要であり、さらにプロテアーゼ活性は必要ないことを明らかにした。今後はペルオキシソーム形態における*LON2*の機能解析を行い、輸送と形態維持における*LON2*機能の使い分けを考察するとしている。

以上の結果はペルオキシソームタンパク質輸送機構において鍵となる遺伝子群の機能を明らかにしたもので、その成果の一部は国際誌に発表されている。適切な実験方法とともに、得られた結果、導かれる結論も明瞭であり、本論文は博士論文として十分であると審査員全員一致で結論した。