

氏名	たむらけんたろう 田村謙太郎
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理博第2808号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	高等植物の細胞内膜系の維持に関わる分子機構

論文調査委員 (主査) 教授 西村いくこ 教授 岡田清孝 教授 長谷あきら

論文内容の要旨

真核生物は細胞内に膜で囲まれたコンパートメントを持ち、それらは独自に文化史機能する一方で、互いに協調して真核細胞の複雑な生命活動を支えている。特に、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER), ゴルジ体, エンドソーム, 液胞, 細胞膜といったオルガネラは小胞輸送によって、互いに膜成分及び内容物の交換を活発に行っている。このように小胞輸送がオルガネラ群を結んでいるダイナミックなネットワークを細胞内膜系 (endomembrane system) と呼ぶ、植物細胞には酵母や動物細胞にはみられない独自の細胞内幕系を発達させている。この植物細胞の独特の細胞内膜系の発達は、植物細胞がもつ分化全能性と深く関わっている。本研究ではシロイヌナズナの細胞内膜系を GFP (green fluorescent protein) によって可視化し、生細胞でのその動態の解析を目的とした。細胞内膜系の可視化によって、大きくわけて三つの研究成果があがった。即ち、1) 高等植物体における細胞内膜系の可視化ツールの確立、2) 新規輸送経路の発見とその可視化、3) 細胞内膜系の構造維持に関わる遺伝子の同定である。

多くの試みがなされたにも関わらず、現在までに植物体の液胞における GFP 蛍光の観察報告はない。タンパク質の輸送経路に沿った細胞内膜系の可視化のために、液胞輸送型 GFP である SP-GFP-2SC を発現する形質転換シロイヌナズナ (GFP-2sc) を作出した。GFP-2sc を明所で培養した時、液胞内に GFP 蛍光は観察されなかった。しかし驚くべき事に、植物体を暗所で培養すると液胞内に強い GFP 蛍光が観察された。本研究により、GFP は酸性条件下で吸光すると、システインプロテアーゼによってアタックを受けやすい立体構造に変化することが明らかになった。GFP-2sc は ER からゴルジ体を経て液胞までのタンパク質の輸送の全経路を可視化できる形質転換体、細胞内膜系の解析において非常に強力なツールになることがわかった。

ER を中心とした細胞内膜系は植物体の高次機能のどのように関わっているのだろうか？ また、どのようなメカニズムによって細胞内膜系の構造が確立されているのだろうか？ これらの疑問に答えるべく、シロイヌナズナ GFP-2sc を変異処理したラインから細胞内膜系の構造の異常のある変異体を選抜した。得られた突然変異体 *katamaril* (*kam1*) は細胞内膜系がアグリゲードを形成し、著しい矮性の表現を示した。ポジショナルクローニングにより *kam1* 変異体の原因遺伝子 *KAM1* を同定した。*KAM1* タンパク質は、新規のゴルジ体局在の Type II 型の膜貫通タンパク質であることがわかった。植物細胞におけるオルガネラの動き及び配向はアクチン繊維が重要な役割を果たしている。そこで、*kam1* 変異体のアクチン繊維を蛍光染色し観察したところ、*kam1* 変異体で見られる細胞内膜系のアグリゲードのある箇所ではアクチン繊維の配向が異常になっていた。ラトランクリン B で親株である GFP-2sc のアクチン繊維を破壊すると、*kam1* 変異体で見られた細胞内膜系のアグリゲードが出現した。共免疫沈降実験によって *KAM1* タンパク質はアクチンタンパク質と細胞内で相互作用していることが明らかになった。以上の結果から、ゴルジ体膜タンパク質である *KAM1* タンパク質はアクチンのオーガナイズに関与していることが示唆された。オルガネラ膜に存在するタンパク質が実際にアクチンの配向を制御する報告は本研究が初めてである。

論文審査の結果の要旨

田村君は、高等植物の細胞内膜系の構造の維持に関わる分子機構を解明する目的で、自ら細胞内膜系を可視化できる形質転換体を作製し、目的の遺伝子を単離するべく研究を展開した。緑色蛍光タンパク質は、生きた状態の細胞の中でのタンパク質分子の動態を観ることを可能にしたため、近年急速に、動物・植物細胞で用いられるようになってきた。高等植物でも、様々な遺伝子産物の細胞内局在や細胞内での動態の解析に盛んに用いられるようになってきた。しかしながら、高等植物の特徴的な細胞小器官オルガネラである液胞をGFP蛍光で可視化することはできないとされてきた。田村君は、この原因を究明し、GFP分子が、酸性の条件下で青色光（GFP励起光）を吸収することにより、立体構造変化を引き起こし、液胞内のシステインプロテアーゼにより速やかに分解されることを見いだした。この光依存的なGFP分解機構の発見により、植物細胞の液胞をはじめとする細胞内膜系で安定的にGFP蛍光を発する実験系を確立することができた。申請者は、自ら開発したこの系を用いて、細胞内膜系が異常になるシロイヌナズナの突然変異体を単離し、その原因遺伝子を突き止め、*KAM1*と命名した。この遺伝子がコードするタンパク質は、ゴルジ体膜に局在するタイプII型の膜タンパク質で、短いN末端部分を細胞質側に持つ。動物・植物を通して新規の膜タンパク質であったが、特異抗体を用いた生化学的な解析から、*KAM1*タンパク質は、アクチンと相互作用して、細胞の内膜系を構成するオルガネラ群の分布に関わっていることが明らかになった。細胞内のオルガネラを中心とする構造の維持にゴルジ体膜のタンパク質が関与するという報告はこれまでになく、全く新しい発見といえる。得られた遺伝子がコードするタンパク質は、オルガネラの細胞内配置に関するもので、このような視点の解析はこれまでなされてこなかった。新しい細胞内構造維持の制御機構の解明に向けた大きな一歩となることが期待される。本研究は、細胞内膜系の可視化系の開発から、変異体の単離と原因遺伝子の単離、さらには新規タンパク質の解析までを含む非常に内容に富むものとなっており、植物生理学上新たな知見を与えるものであると考えられる。本学位論文の内容の一部は、国際誌Plant Journal誌に掲載されている。このように、行われた仕事の質は高く、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。