

氏 名	う え 植 村 とも ひろ 植 村 知 博
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 34 号
学位授与の日付	平 成 17 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	生 命 学 研 究 科 統 合 生 命 学 専 攻
学位論文題目	Visual Biology of Membrane Traffic in Plant: Identification of specific SNARE molecules that govern distinct organelle targeting. (植物におけるメンブレントラフィックのビジュアルバイオロジー)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 安 邦 夫 教 授 佐 藤 文 彦 教 授 佐 邊 壽 孝

論 文 内 容 の 要 旨

単膜系オルガネラで満たされた真核生物の細胞内において、オルガネラ間で行われるタンパク質輸送は、“メンブレントラフィック”システムにより、精妙かつダイナミックに制御されている。植物細胞では、液胞機能が多様化していることから植物細胞内における輸送経路網が複雑であると考えられ、ダイナミックな“膜の流れ”によって結ばれる輸送経路網を明らかにすることは、植物を分子レベルで理解することに必要不可欠である。本研究では、メンブレントラフィックにおいて膜融合を行う際に重要な役割を果たしている SNARE 分子に注目して、以下のような解析を行った。

(1)液胞膜ダイナミクスの解析。液胞膜に存在する Qa-SNARE 分子 (AtVam3p) に GFP を融合させた分子 (GFP-AtVam3p) を発現する形質転換シロイヌナズナ (At1/GFP-AtVam3p) を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細な観察を行った。この結果から、静的で単なる袋状のオルガネラであると考えられていた高等植物の液胞は、内部に複雑な構造を持ちダイナミックに動いている動的なオルガネラであることを明らかにした。(第2章)

(2)SNARE 分子の細胞内局在の網羅的な解析。ゲノム配列の解読が終了したモデル植物シロイヌナズナより酵母・動物の既知の SNARE 分子を指標に54種類の SNARE 遺伝子を単離し、分子系統分類法により18種類の Qa-SNARE, 11種類の Qb-SNARE, 8種類の Qc-SNARE, 14種類の R-SNARE, 3種類の SNAP25 に分類した。細胞内局在を決定するために、それぞれの SNARE 分子と GFP との融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し、それらをシロイヌナズナ培養細胞に導入後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。この結果から、植物細胞におけるそれぞれの小胞輸送経路に関与する各 SNARE 分子を同定し、高等植物においてゴルジ体とトランスゴルジ網 (TGN) とは互いに独立したオルガネラであることを明らかにした。(第3章)

(3)R-SNARE 分子が液胞に局在するために必要なドメインの同定。アミノ酸の相同性が高い R-SNARE 分子をモデルとし、細胞内局在が異なる分子間の様々なドメインをシャッフルさせたキメラ分子を用いて、液胞に局在するドメインの決定を行った。この結果から、R-SNARE 分子の膜貫通領域ではなく、N 末端の領域 (longin domain and linker region) が液胞への局在に必須であることを明らかにした。(第4章)

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

真核生物の細胞内は、緻密に分化した膜系 (オルガネラ) で満たされ、その多くがダイナミックな膜の流れ“メンブレントラフィック”によって結ばれている。本研究は植物細胞のダイナミックな膜の動態を可視化することにより、メンブレントラフィック機構の解明を目指したものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

- 1) 植物細胞特有のオルガネラである液胞を生きたままの状態でも可視化することを試み、液胞膜に局在するタンパク質 (AtVam3) に GFP を融合させたタンパク質 (GFP-AtVam3) を発現する遺伝子組み換え植物を作成することにより生細胞で液胞を観察することに成功している。

- 2) 液胞膜の内部構造及び動態を三次元立体構築とタイムラプス観察の手法を用いて詳細に解析し、液胞膜外側から内側に陥入しているシート状の構造体や筒状の構造体が存在することを同定した。また、これらの内部構造は、時間経過で構造が変化するアクチン依存的な非常に動的でダイナミックな構造体であること、浸透圧によってもダイナミックに変化することを明らかにした。これらの結果から、高等植物の液胞は、静的な袋状のオルガネラではなく、内部にシート・筒状の構造体をもった動的なオルガネラであることが分かった。
- 3) メンブレントラフィックにおいて膜融合を行う際に重要な役割を果たしている SNARE 分子をシロイヌナズナのゲノム上から54種類同定し、細胞内局在の解析を行った。その結果、6種類の小胞体に局在する SNARE 分子、9種類のゴルジ体に局在する SNARE 分子、7種類のトランスゴルジ網 (TGN) に局在する SNARE 分子、2種類のエンドソームに局在する SNARE 分子、21種類の細胞膜に局在する SNARE 分子、9種類の液胞膜に局在する SNARE 分子を決定し、植物細胞内のそれぞれの小胞輸送経路に関与する各 SNARE 分子を明らかにした。
- 4) SYP41/AtTlg2a の細胞内局在から、高等植物のトランスゴルジネットワーク (TGN) は動物のようなゴルジ体とひと続きになったオルガネラではなく、ゴルジ体とは独立したオルガネラであることを明らかにした。
- 5) SNARE 分子の細胞内局在機構を明らかにすることを目的として、アミノ酸の相同性が高いにもかかわらず細胞内局在が異なる R-SNARE 分子をモデルとして、細胞内局在が異なる分子間の様々なドメインをシャッフルさせたキメラ分子を用いて液胞への局在に必要なドメインの単離を行った。その結果、SNARE モチーフの N 末端側に存在する longin ドメインと linker 領域が液胞膜への局在を制御していることを明らかにした。

以上の結果は、高等植物における体軸形成や重力屈性などの高次生命現象の分子基盤としてメンブレントラフィックが必須であることが明らかになりつつある現在、そのメンブレントラフィック機構を理解する上で非常に有用な知見であり、植物分野に限らず一般的な分子細胞生物学に寄与するところが大きい。よって、本論分は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成17年1月25日、論文内容及びそれに関連した分野にわたり口頭試問を行った結果、博士（生命科学）の学位を授与される能力が十分にあるものと認めた。