

氏 名	にし ざわ け い と 西 澤 け い と
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1374 号
学位授与の日付	平 成 15 年 11 月 25 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Vacuolar Sorting Determinants of Soybean β -Conglycinin (ダイズ β -コングリシニンの液胞輸送シグナルに関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 内 海 成 教 授 森 友 彦 教 授 谷 坂 隆 俊

論 文 内 容 の 要 旨

双子葉植物の種子貯蔵タンパク質は種子の登熟期に粗面小胞体で合成され、タンパク質貯蔵液胞 (Protein Storage Vacuole, PSV) に蓄積する。これらのタンパク質が小胞体から PSV へ輸送されるには、その小胞輸送過程において何らかの分子 (レセプター) に認識される「液胞輸送シグナル」をもつことが必要である。これまでに報告されている液胞輸送シグナルは特徴的な共通配列を持つシグナル (ssVSD) と C 末端部に存在し配列も長さも様々であるが疎水性アミノ酸に富んだシグナル (ctVSD) に分類される。本論文では、様々な種子作物の中でも特にタンパク質含量の高い作物であるダイズのタンパク質蓄積機構を解明する一環として、その主要な貯蔵タンパク質の一つである β -コングリシニン (7S グロブリン) の液胞輸送シグナルの解析を種子において行った。その内容の主な点は、以下の通りである。

1. β -コングリシニンは小胞体で 3 量体へ分子集合した後、ゴルジ体を経て PSV へ輸送される。構成サブユニットとして α 、 α' 、 β の 3 種が存在し、種子中にはこれらがランダムに組み合わさった種々の分子種が存在する。 α 及び α' は、3 種のサブユニット間で相同性の高いコア領域の N 末端側に、プロ領域とエクステンション領域をもつ。また、 α 及び α' のコア領域には 2 個、 β には 1 個の高マンノース型糖鎖が付加されている。これらの部位の機能は未解明である。そこで、野生型及び各部位を単独もしくは複数欠損した変異型 α' 及び β を蓄積する形質転換シロイヌナズナを作成し、種子細胞内における輸送状態の免疫電子顕微鏡観察を行うことにより、PSV への輸送における各部位の関わりを解析した。PSV は、種子貯蔵タンパク質の多くが蓄積するマトリックス、及び、フィチン酸塩の結晶が蓄積し膜で囲まれたグロボイド区画より形成されているが、いずれの α'/β もマトリックスとグロボイド区画に 3 量体として蓄積していることが確認された。このことから、プロ領域、エクステンション領域及び糖鎖は α' や β の構造形成及び PSV への輸送・蓄積に関与していないことが明らかとなった。また α'/β の C 末端部 6 残基 (ILRAFY/ILGALY) もしくは 10 残基 (PLSSILRAFY/PFPSILGALY) を欠損した変異型 α'/β (Δ CT6 及び Δ CT10) についても同様に解析を行った。これも種子中で 3 量体として蓄積していた。 α'/β Δ CT6 はマトリックスとグロボイド区画に存在することが確認された。一方、 α'/β Δ CT10 については、一部は PSV 中のグロボイド区画に蓄積していたが、細胞外へ分泌され細胞間隙に蓄積していたことから、C 末端部がマトリックスへの輸送に必須であることが明らかとなった。しかし、 β Δ CT10 の一部はマトリックスにも蓄積していたことから、 β については C 末端部以外の部位にもマトリックスへのシグナルが存在する可能性が示された。

2. ダイズ登熟種子において液胞輸送能を迅速に解析できる、パーティクルガンによる緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の導入とその一過性発現に基づくシステムを構築した。シグナルペプチドを付加した GFP (spGFP) は細胞外へ分泌されるが、一部は PSV へも輸送されることが知られていたため、spGFP の C 末端部に 4 残基の Gly を連結することにより PSV への輸送能を完全に失わせた mGFP をレポーターとして用いた。mGFP の C 末端部に α'/β の C 末端部 10 残基を付加した mGFP- α'/β CT10 は PSV へ輸送されたことから、C 末端部 10 残基がダイズ種子においても液胞輸送シグナルとして機能することが確認された。また、C 末端部 10 残基中の N 末端側 4 残基及び C 末端側 6 残基はどちらもシグナルとして機能でき

ることが明らかとなった。

3. α'/β のシグナルの特性を解析した結果、 α'/β のシグナルはC末端部に位置することによりのみ機能するctVSDであることが明らかとなった。また、ctVSDが機能するには主鎖のC末端とC末端付近の疎水性アミノ酸側鎖の両方がレセプターに認識されることが必要であると考えられた。さらに、シグナル中の配列を様々なアミノ酸に置換した結果、C末端付近の疎水性度の高さや疎水性アミノ酸の種類はctVSDとしての機能に重要ではなく、疎水性アミノ酸を含み分子表面に露出していればPSVへの輸送シグナルとして機能し得ることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

種子のタンパク質貯蔵液胞 (PSV) へ輸送されるタンパク質の輸送シグナルの同定は、従来、葉や栄養器官由来である培養細胞を用いて行われていた。しかし、種子細胞中にはPSVへの輸送を行う特有の小胞輸送経路が存在することから、種子タンパク質のシグナルの同定は種子を用いて行う必要があると考えられる。本論文は、ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質である β -コングリシニン (7Sグロブリン) の輸送シグナルのシロイヌナズナ種子における同定、ダイズ種子において液胞輸送能を迅速に解析するシステムの構築、及び同定されたシグナルの特性解析を行ったものである。評価される主な点は以下の通りである。

1. ダイズ β -コングリシニンを構成するサブユニットのうち α 及び β サブユニットについて、それらの野生型もしくは変異型を蓄積する形質転換シロイヌナズナを作成し、PSVへの輸送シグナルがC末端部10残基中に存在することを、世界で初めて種子を用いて明らかにした。

2. PSVを構成する2つの区画 (マトリックス及びグロバイド区画) への独立した輸送経路が存在し、上記のシグナルはマトリックスへの輸送経路において機能することを明らかにした。

3. パーティクルガンと緑色蛍光タンパク質 (GFP) を利用することにより、種子におけるタンパク質の液胞輸送能を迅速に解析できるシステムを構築した。なお、GFPは小胞輸送系の解析において頻繁に使用されているが、シグナルペプチドを付加して小胞輸送系に導入すると一部が液胞へ輸送されてしまうことが問題である。本システムでは、C末端部をブロックすることにより液胞輸送能を完全に失わせたGFPを作成し、用いている。

4. 上記のシステムを用い β -コングリシニンの輸送シグナルがC末端型シグナルであり、C末端部においてのみ機能することを明らかにした。また、C末端型シグナルが機能するには主鎖のC末端とC末端付近の疎水性アミノ酸側鎖の両方がレセプターに認識されることが必要であることを示唆した。さらに、C末端付近の疎水性度の高さや疎水性アミノ酸の種類はシグナルとしての機能に重要ではないこと、すなわち、C末端部に位置し、分子表面に露出していれば、疎水性アミノ酸を含む様々な配列がPSVへの輸送シグナルとして機能し得ることを示した。

以上のように、本論文は β -コングリシニンのPSVへの輸送シグナルの同定、種子細胞での迅速な液胞輸送能解析システムの構築、及びシグナルの特性解析を行い、種子における貯蔵タンパク質の輸送・蓄積機構の一端を解明し、また、さらなる解析のための基盤を確立したものであり、植物細胞生物学、新食糧設計学、食糧資源学などに寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年9月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。