

氏 名	もり 森 剛 志
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1548 号
学位授与の日付	平 成 18 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	農 学 研 究 科 農 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Behaviors of Seed Storage Proteins in Vacuolar Sorting Events (液胞輸送過程における種子貯蔵タンパク質の挙動に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 海 成 教 授 谷 坂 隆 俊 教 授 松 村 康 生

論 文 内 容 の 要 旨

種子は、その細胞内に存在するタンパク質貯蔵型液胞 (PSV) に、発芽の際に必要な窒素成分の供給源となる貯蔵タンパク質を蓄積している。これらは、小胞体上でプロ型として生合成された後、輸送小胞を介して PSV へと輸送され、プロセシングを受けて成熟型となり、大量かつ安定に蓄積する。特に、ダイズ種子は他の主要作物種子に比べて多くのタンパク質を含んでいることから、有用タンパク質の生産の場として利用できる可能性がある。しかしながら、種子に目的とするタンパク質を高蓄積させるためには単に発現させるだけではなく、それらを PSV へ正確に輸送させる必要がある。このような観点から、本論文では、登熟種子における貯蔵タンパク質の PSV への輸送経路およびその輸送過程におけるタンパク質の細胞内挙動を明らかにすることを目的とした。その主な内容は以下の通りである。

1. ダイズ種子は貯蔵タンパク質として主にグロブリンを蓄積しており、それらは 7S と 11S に分類される。7S は 3 種類 (α , α' , β), 11S は 5 種類 (グループ I : A1aB1b, A1bB2, A2B1a; グループ II : A3B4, A5A4B3) のサブユニットにより構成されている。これらの液胞輸送経路を詳細に解析するため、野生型とサブユニット組成に変異をもつさまざまな系統の登熟種子について免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、プロ 7S とプロ 11S は小胞体上で生合成された後、基本的にはゴルジ体を経由して PSV へと輸送されており、これらの輸送は、直径 50-100nm の Dense vesicle (DV) と直径約 500nm の Multivesicular body (MVB) 様構造を介して行われていることが明らかとなった。また、プロ 11S の一部は小胞体由来の Protein body (PB) を介して PSV へとゴルジ体を経由せずに輸送されていた。PB は、主に登熟中期から後期の間で観察され、その形成はプロ 11S グループ I の生合成量に依存していた。成熟型では、11S グループ I は 11S グループ II に比べて溶解性が低いことが明らかとなった。これらの結果から、ダイズ登熟種子において、プロ 11S グループ I が PB の形成に関与しており、その形成には溶解性などの物理化学的要因が関与していることが示唆された。

2. これまでに、エンドウプロ 11S はゴルジ体経由、カボチャプロ 11S はゴルジ体非経由で PSV へと輸送されること、そして、それらの輸送は、エンドウプロ 11S は DV を介して、カボチャプロ 11S は、小胞体由来でありダイズ PB と形態的に類似している Precursor-accumulating vesicle (PAC 小胞) を介して行われていることが報告されている。ところが、ダイズ登熟種子では、プロ 11S はゴルジ体経由と非経由の両方で輸送されており、また、PB の観察頻度は登熟期により異なっていた。そこで、カボチャとエンドウの登熟種子について、ダイズ登熟種子と同様に免疫電子顕微鏡観察を行った。カボチャ登熟種子でも、エンドウ登熟種子で見られる MVB と形態的に類似している構造が観察され、この構造中にはプロ 11S が存在していた。このことから、カボチャ登熟種子にもエンドウ登熟種子と同様に MVB を介したプロ 11S の液胞輸送経路も存在することが示唆された。一方、カボチャ登熟種子においては、PAC 小胞は登熟初期においても観察されたが、エンドウ登熟種子ではいずれの時期においても観察されなかった。また、カボチャ登熟種子においては、11S は小胞体だけでなく PSV においても、エンドウ 11S よりもはるかに高密度に集合していた。カボチャとエンドウの各登熟種子より得られた抽出液の SDS-PAGE を行ったところ、カボチャ登熟種子では、エンドウ登熟種子に比べて総タンパク質に占める

11S の割合が高く、その生合成量が初期から多かった。さらに、大腸菌発現系を用いて調製した組換え型を解析した結果、カボチャプロ 11S はエンドウプロ 11S に比べて表面疎水性が高いことが明らかとなった。表面疎水性の高い分子種は互いに相互作用することによって集合し易い。これらのことから、カボチャプロ 11S は互いに集合して塊を形成しやすい性質をもっており、その性質や生合成量が液胞輸送に影響を与えていることが示唆された。

3. ダイズ、エンドウ、カボチャの登熟種子細胞におけるプロ 11S の液胞輸送挙動に違いが見られたが、それらは異なる種類の植物細胞において見られたものであり、植物種の違いによる特殊性のためである可能性がある。そこで、ダイズプロ A1aB1b、プロ A2B1a、エンドウプロ 11S、カボチャプロ 11S を発現するタバコ培養細胞 BY-2 をそれぞれ作製し、同一細胞種における挙動を解析した。その結果、これらの BY-2 における蓄積レベルはプロ A1aB1b>エンドウプロ 11S>>カボチャプロ 11S となり、また、プロ A2B1a は検出できなかった。これらの分子種についてその表面疎水性を比較したところ、プロ A2B1a>カボチャプロ 11S>エンドウプロ 11S>プロ A1aB1b であり、表面疎水性の高いものほど蓄積レベルが低いという関係が見られた。また、ダイズ PB に含まれるプロ 11S は会合体を形成していた。そこで、BY-2 におけるプロ 11S の会合体の細胞内挙動について調べるため、大腸菌では本来の構造を形成できず会合体を形成する改造型プロ A1aB1b を発現する BY-2 を作製した。このタンパク質は BY-2 内でも会合体を形成しており、その内部に BiP を含んでいた。その蓄積レベルはプロ A1aB1b に比べると低いものの、カボチャプロ 11S よりも高かった。これらの液胞輸送について調べたところ、プロ A1aB1b、エンドウプロ 11S、カボチャプロ 11S だけでなく、改造型プロ A1aB1b もゴルジ体経由で液胞へと輸送されていることが明らかとなった。このようなプロ 11S 会合体の液胞輸送は登熟種子でも同様に行われている可能性が考えられる。したがって、疎水性の高いプロ 11S でも生合成量が少ない場合にはゴルジ体を經由して液胞へと輸送されること、また、生合成量が多く小胞体から出ることができなかった会合体がより大きな会合体となり、PB や PAC 小胞を形成する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

登熟種子において、貯蔵タンパク質は小胞体上で生合成された後、PSV へと輸送される。これまでに、植物種により、登熟種子における貯蔵タンパク質の液胞輸送挙動が異なることが報告されていた。本論文は、ダイズ、カボチャおよびエンドウの登熟種子、さらにタバコ培養細胞 BY-2 を用いて、登熟種子におけるプロ 7S とプロ 11S の液胞輸送挙動について詳細な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. ダイズ登熟種子におけるプロ 7S とプロ 11S の PSV への輸送経路およびそれらの輸送に関わる輸送体を明らかにするとともに、プロ 11S は登熟期によって液胞輸送挙動が異なることを示した。

2. サブユニット組成に変異をもつさまざまなダイズ変異系統の電子顕微鏡観察およびそれらのサブユニットの溶解性の比較から、ダイズ登熟種子において、プロ 11S は物理化学的性質の違いによりゴルジ体へ輸送されるものと小胞体で濃縮されるものの二通りに分かれることを示した。

3. カボチャ登熟種子ではエンドウ登熟種子と異なり、11S が PSV と小胞体の両方で高密度に集積していた。カボチャプロ 11S はエンドウプロ 11S に比べて表面疎水性が高かったことから、PSV や小胞体における挙動と表面疎水性に関連があると考えられた。また、カボチャ登熟種子にも、エンドウ登熟種子と同様に MVB 様の構造が存在しており、それらは 11S を含んでいたことから、カボチャプロ 11S の一部はゴルジ体を經由して PSV へ運ばれると考えられた。

4. 種子細胞における液胞輸送挙動の異なるプロ 11S を発現するタバコ培養細胞 BY-2 を作製し、それらの細胞内挙動を解析した。その結果、疎水性の高い分子種ほど蓄積レベルが低く、蓄積しているものについては、ゴルジ体を經由して液胞へと輸送されることが明らかとなった。したがって、表面疎水性の高いプロ 11S も生合成量が少ない場合にはゴルジ体を經由して液胞へと輸送されることが考えられた。

以上のように、本論文は、ダイズプロ 7S とプロ 11S の PSV への輸送経路とそれに関わる輸送体の同定、カボチャプロ 11S とエンドウプロ 11S の種子細胞内における挙動の解析、およびこれらの分子種およびプロ 11S 会合体の BY-2 を用いた細胞内挙動の解析を行い、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たものであり、植物細胞生物学、品質設計開発学、分子育種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18年2月16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。