

氏 名	富 士 健 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3174 号
学位授与の日付	平 成 19 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	シロイヌナズナ種子貯蔵タンパク質の細胞内輸送機構の解明

論文調査委員	(主 査) 教 授 西村いくこ	教 授 長谷あきら	教 授 岡 田 清 孝
--------	--------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

高等植物の種子では、種子登熟期の一時的に大量の種子貯蔵タンパク質を合成し、小胞輸送経路を介して、タンパク質蓄積型液胞へと運搬・蓄積している。この一時的な大量発現・大量輸送機構は植物が独自に発達した分子機構の1つとして大変興味深い生命現象といえる。本研究は当初、この輸送機構の一部を明らかにする事で、全体像へ迫る事ができると考えた。しかし、ある1つの発見からアプローチの方法が大きく転回し、結果的に大きく成果を遂げる事となった。

まず、最初に液胞移行シグナルが生体内で液胞選別輸送レセプターに認識されていることの証明を行った。液胞移行シグナルは、液胞への輸送に必要な配列で、それが欠損すると液胞へ輸送されなくなる(必要条件)。さらに、分泌型タンパク質に付加すると液胞へと輸送される(十分条件)。様々な植物種の液胞タンパク質においてその配列が同定されていたが、その中でも特に、種子貯蔵タンパク質であるうえ、移行シグナルとしての必要十分条件を満たしていたダイズの β コングリシニン α' サブユニットの液胞移行シグナルを用いた。この種子貯蔵タンパク質の液胞移行シグナルはC末端の10アミノ酸配列である。次に、液胞選別輸送レセプターにはAtVSR1を用いた。欠損株を用いた解析から、その機能が種子貯蔵タンパク質の輸送であると証明されていた。AtVSR1欠損株に β コングリシニン α' サブユニットそのもの、または、輸送シグナルを付加したGFP融合タンパク質(GFP-CT24)を発現させて、その動態を観察した。その結果、どちらのタンパク質も、液胞へと運ばれずに細胞外へ分泌された。したがって、いずれの分子もAtVSR1依存的に選別輸送されており、*in vitro*で液胞選別輸送レセプターAtVSR1が液胞移行シグナル配列を認識することから、液胞移行シグナルを液胞選別輸送レセプターが認識していることが証明された。

この研究の二次的な結果として、AtVSR1欠損株で「GFP-CT24が分泌されると種子のGFP蛍光が増大すること」を見出した。これが大きなブレイクスルーになった。この結果から逆に、「GFP蛍光が強い種子がGFP-CT24が分泌している輸送変異体であるとすれば、単離するのは容易となる」という可能性に気づき、検証をおこなった。その結果、この『種子が光る表現型』が輸送変異体に共通するものと証明され、これにより極めて簡便に輸送変異体のスクリーニングができることが判明した。これにより、輸送変異体を単離して多数の関連因子を同定する遺伝学的なアプローチから、種子貯蔵タンパク質の輸送機構の解明を目指す事となった。

実際に、変異処理を行った種子からスクリーニングを行うと、多数の変異体を容易に単離できた。このスクリーニング法では、マップベースクローニングも比較的効率的に行えたため、現在までに、種子貯蔵タンパク質の輸送に関与する遺伝子を6つ同定することに成功した(既知の因子を含む)。

そのうちの2つがクラスリン被覆小胞の形成に関わるアダプター複合体の各サブユニットだった。また、液胞選別輸送レセプターAtVSR1にはアダプター分子に認識されるドメインが存在するため、このアダプター複合体がAtVSR1を介して、種子貯蔵タンパク質の輸送に関与していることが強く示唆された。

また、別の変異体では、輸送変異体として同定した変異体の中に、種皮の薄色化を示す表現型や、花茎の重力屈性に異常

を示す表現型をもつものが見つかった。これらは、いずれも輸送に変異をもたらす原因遺伝子による表現型であった。

このため、本研究で開発したスクリーニング法が、種子貯蔵タンパク質の輸送機構の解明だけでなく、さらには、他の器官において小胞輸送が及ぼす生理機能についての新たな知見を得るための有用な手段に成りうることを期待できる。

論文審査の結果の要旨

高等植物の液胞は細胞内で最大の体積を占めるオルガネラであり、現在まで様々な視点から、その生理学的な解析が行われ、多岐にわたる液胞の機能が明らかになっている。栄養器官で見られる分解型液胞は、多くのプロテアーゼやグルコシダーゼ、リパーゼといった種々の加水分解酵素を含み、細胞内の不要成分の分解を行っている。この機能は酵母の液胞や動物細胞におけるリソソームの働きに似通っている。それとは、全く逆の機能をもつ液胞として、主に種子で見られるタンパク質蓄積型液胞がある。種子のタンパク質蓄積型液胞には、発芽時の窒素源として大量の貯蔵タンパク質が蓄積されている。これら種子貯蔵タンパク質は、種子の登熟期に時期特異的に合成され、液胞へと運ばれる。その後、タンパク質蓄積型液胞は種子の乾燥とともに脱水され、最終的にはプロテインボディと呼ばれるオルガネラになる。また、花卉や種皮の液胞では、アントシアニンやアントシアニジンなどのフラボノイド色素を蓄積することにより、各々の器官の発色に関係している。他にも糖や有機酸などを蓄積する機能が知られている。このような多様な生理学的機能をもつオルガネラであるが、その機能タンパク質の細胞内選別輸送に関する知見は非常に乏しい。富士君は、液胞へのタンパク質の選別輸送の機構を解明する目的で、登熟期の種子における貯蔵タンパク質の細胞内輸送に注目して解析を行った。登熟期の種子は大量の貯蔵タンパク質を盛んに合成し、タンパク質蓄積型液胞へ輸送・蓄積することから、液胞タンパク質の輸送機構の研究の格好の材料と言える。これまでに貯蔵タンパク質の輸送に関わる因子は全く同定されていなかった中、富士君は液胞選別輸送レセプターを同定することに成功した。このレセプターの欠損変異体に液胞局在型緑色蛍光タンパク質（GFP）を種子特異的プロモータの下流で発現させると、液胞型 GFP が液胞へ輸送されずにデフォルト経路を通して、細胞外に分泌されてしまい、その結果種子が強い緑色蛍光を発することを見いだした。この発見が端緒となって、網羅的な液胞選別輸送異常を示す変異体の画期的なスクリーニング法を確立した。この方法は、液胞型 GFP を種子特異的プロモータの下流で発現する形質転換シロイヌナズナを変異源処理した集団の中から、光る種子を選抜するというもので、非常に簡単に多数の変異体を得ることを可能にした。富士君は既に300万粒の種子から200ライン近い変異体を得ている。この内の13種類については既に原因遺伝子を同定しており、液胞への選別輸送に関わる全く新しい分子機構の存在が示唆されると言う大変興味深い成果を得ている。この変異体は種子が蛍光を発することから *green-fluorescent seed* (*gfs*) と命名されたが、これらの原因遺伝子の中には未知の分子機構を担うものも存在することは確実で、今後の細胞生物学分野への貢献が大いに期待できるという点で高く評価された。本学位論文の内容の一部は、国際誌 *Plant Cell* 誌に掲載されている。以上のように、本研究の仕事の質は高く、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。