

氏 名	李 立 新
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3305 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	Novel Factors Responsible For Intracellular Transport of Seed Storage Proteins (種子貯蔵タンパク質の集積機構の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 村 い く こ 教 授 長 谷 あ き ら 講 師 井 上 敬

論 文 内 容 の 要 旨

高等植物の登熟種子では、大量の貯蔵タンパク質が小胞体で前駆体として合成され、タンパク質蓄積型液胞 (PSV) に運ばれて、そこでプロセッシングを受けて成熟型になる。貯蔵タンパク質の小胞体から液胞までの輸送メカニズムは大きく二つのタイプに分類できる。一つは、レセプター依存的なソーティングで、もう一つはアグリゲーションソーティングである。しかし、これらの輸送の分子レベルのメカニズムは不明のままである。貯蔵タンパク質の PSV へのソーティングの分子メカニズムを解明するために、モデル植物シロイヌナズナの正遺伝学的解析を適用することとし、種子に貯蔵タンパク質の前駆体を蓄積する変異体 (*maigo*) を単離して解析を行った。

得られた *maigo2* 変異体は、貯蔵タンパク質の前駆体を蓄積しており、細胞内に電子密度の高いコアを持つ新規構造体 (MAG2 body と命名) を大量に発達させていた。MAG2 body は貯蔵タンパク質の前駆体とともに、小胞体局在型の分子シャペロンを含んでいた。このことは、MAG2 body が小胞体に由来するコンパートメントであることを示唆している。MAG2 タンパク質は、哺乳類の RINT-1 と酵母の Tip20p タンパク質に低いホモロジーを示した。RINT-1 と Tip20p は小胞体とゴルジ間の小胞輸送に働く因子である。MAG2 タンパク質は、小胞体局在型 SNARE タンパク質の AtUfe1 と AtSec20 と相互作用することが分かった。以上の結果より、MAG2 は貯蔵タンパク質の小胞体からの出芽に働くことが示唆された。

MAG2 依存的な輸送メカニズムをより詳細に解明するために、myc-MAG2 を発現する形質転換シロイヌナズナを用いて、MAG2 と相互作用する因子の同定を試みた。その結果、新規因子の MACC1 (MAG2-complex component 1), MACC2 と MACC3 の同定に成功した。これらの因子はいずれも機能未知の新しい分子であった。MACC1 は小胞体に局在し、小胞体とゴルジ間の膜輸送に関与する因子 (哺乳類の ZW10 と酵母の Dsl1p) と低いホモロジーを示した。*macc1* 変異体の種子は貯蔵タンパク質の前駆体を蓄積して、細胞内に MAG2 body 様コンパートメントを持っていた。これらの結果は、MACC1 が MAG2 と協調して、貯蔵タンパク質の小胞体からの出芽に働いていることを示唆している。以上のことから、生体内で、MAG2, MACC1, MACC2 と MACC3 は安定な複合体を形成して、小胞体とゴルジ間の小胞輸送に関与するという新規の機構の存在が浮上した。

さらに、MAG2 相互作用因子 AtUfe1 の機能解析を行った。AtUfe1 は小胞体局在型の SNARE タンパク質である。*atufe1* 変異体の種子は貯蔵タンパク質の前駆体を蓄積しており、種子細胞内の形態は *mag2* 同様に異常がみられた。これらの結果は、AtUfe1 が小胞体とゴルジ間の小胞輸送に重要であることを示している。myc-AtUfe1 を発現する形質転換シロイヌナズナを用いて、AtUfe1 と相互作用する因子の同定を行った結果、SM タンパク質の AtSLY1 が同定された。SM タンパク質とは SNARE タンパク質の syntaxin と結合して、syntaxin の安定性や SNARE 複合体の形成を制御するタンパク質である。この結果は、生体内で、AtUfe1 は AtSLY1 と安定な複合体を形成することを示している。また、myc-MAG2 を発現する形質転換シロイヌナズナを用いた免疫沈降を行ったところ、AtUfe1 が検出された。この結果は、生体内で、MAG2 と AtUfe1 は小胞輸送の過程において、一過的な相互作用があることを示した。即ち、MAG2 と AtUfe1 は独立に安定な複合体を形成

して、小胞体とゴルジ間の小胞輸送において協調的に働くことが分かった。上記の成果により、登熟期の種子の細胞内では、大量の貯蔵タンパク質を合成の場（小胞体）から蓄積の場（タンパク質蓄積型液胞）へ運ぶための新規の分子機構が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

李立新さんは、高等植物の種子の貯蔵タンパク質の集積機構に強い関心を持ち、登熟期の種子細胞における貯蔵タンパク質の合成の場（小胞体）から集積の場（タンパク質蓄積型液胞）への細胞内輸送機構の研究を行った。用いた材料はシロイヌナズナで、手法は正・逆分子遺伝学および細胞生物学的あるいは生化学的解析など、幅広いアプローチを採り、新しい発見を伴う優れた成果を挙げた。特に高く評価された点は、次の通りである。シロイヌナズナの正遺伝学的な解析から、貯蔵タンパク質の細胞内輸送に関わる新規因子MAG2を見いだした。MAG2は、小胞体型SNRE分子と相互作用して、小胞体－ゴルジ体間の輸送に関わることが分かった。一方、タグを付けたMAG2タンパク質を発現させた形質転換シロイヌナズナを用いたプルダウンと質量分析を組み合わせた解析により、MAG2と相互作用する因子を3つ見だし、MACC1, MACC2, MACC3と命名した。これらの結合様式についても解析し、新しい機能複合体（MAG2複合体と命名した）の存在と働きを見事に明らかにした。タンパク質の小胞輸送系は、酵母や動物細胞で精力的に行われているが、このような複合体の存在は知られておらず、タンパク質の大量合成・細胞内輸送を解くヒントを与えた点でも高く評価される。また、細胞生物学的解析から、*mag2*欠損変異体種子細胞に新たな構造体が多数出現することを見だし、これらをMAG2ボディを命名した。MAG2ボディは、貯蔵タンパク質2Sアルブミンの前駆体分子がアグリゲートとして存在しており、その周辺のマトリックス領域には別の貯蔵タンパク質12グロブリンと小胞体シャペロンであるBiPやPDIが存在していた。MAG2ボディは、粗面小胞体で合成された貯蔵タンパク質が小胞体から放出されることができずに、小胞体内腔に形成されたものであることが分かった。この発見は、貯蔵タンパク質の大量輸送機構に新しい視点を与えるものとなった。本研究は、小胞体で大量に合成されるタンパク質の細胞内選別輸送について、新たな装置の存在を示したものとして、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。このように、李さんによって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。