九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Rab5/GEF system is essential for intracellular transport of the proglutelin from the Golgi apparatus to the protein storage vacuole in rice endosperm

文, 柳瓔

https://hdl.handle.net/2324/1398420

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏　　名　：文　柳瓔

論文題目　：Rab5/GEF system is essential for intracellular transport of the proglutelin from the Golgi apparatus to the protein storage vacuole in rice endosperm
（Rab5/GEF システムはイネ種子におけるグルテリンのゴルジ体から貯蔵型液胞への細胞内輸送に不可欠である）

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

本研究はイネ種子貯蔵タンパク質グルテリン前駆体のゴルジ体から貯蔵型液胞への細胞内輸送に関する遺伝的制御機構を明らかにすることを目的として、①Small GTPase Rab5（以下 Rab5）に対する活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor: 以下 GEF)の同定、②Rab5 と GEF の 2 重劣性変異体の解析、③Rab5 ホモログと GEF ホモログの同定と活性化解析を行った。

①グルテリン前駆体を顕著に集積する突然変異 *glup4* と *glup6* はそれぞれ Rab5 と GEF をコードする遺伝子の変異であることが明らかとなっている（それぞれ *glup4/rab5* 変異体と *glup6/gef* 変異体)。また両変異はグルテリン前駆体を細胞外に集積し新規構造体（paramural body: PMB）を形成するという類似の表現型を示す。さらに、GLUP4/Rab5 と GLUP6/GEF は共にグルテリン前駆体のゴルジ体から貯蔵型液胞への輸送に関与することが示唆されている。GLUP6/GEF が GLUP4/Rab5 の活性化因子であることを明らかにするために、両タンパク質を大腸菌で発現させたタンパク質を用いて in vitro GEF assay を行った。その結果、GLUP6/GEF は非活性型である GTP 結合型 GLUP4/Rab5 を活性型である GTP 結合型に変換すること、GLUP6/GEF はシロイヌナズナの Rab5 ファミリーも活性型に変換することが明らかになった。これらの結果は GLUP6/GEF は GLUP4/Rab5 の活性化因子であることを示している。両組み換えタンパク質を混合したゲル濾過による解析の結果、GLUP6/GEF と GLUP4/Rab5 はタンパク質相互作用を有することが明らかとなった。これらの結果から、イネ種子中におけるグルテリンのゴルジ体からの輸送において、GLUP6/GEF によって活性化された GLUP4/Rab5 が関与すると考察した。

②*glup4/rab5* 変異体と *glup6/gef* 変異体は類似の表現型を示すものの、両変異の二重劣性型においてグルテリン前駆体の量は単一遺伝子の変異よりも相加的に増加する。二重劣性型のタンパク質組成を解析した結果、グルテリン前駆体の量の増加と共に成熟型グルテリンの量が顕著に減少していた。両変異の二重劣性の影響が組織の表現型まで及ぶかどうかを明らかにするために、種子の免疫組織学的解析を行った。二重劣性型においても両変異と類似した PMB が観察され、単独の変異と比べて巨大化していた。さらに二重劣性型の貯蔵型液胞は両変異と比較して顕著に縮小していた。二重劣性型の表現型がより激しくなった結果から、グルテリン前駆体のゴルジ体からの輸送に他の

Rab5 と他の GEF も関与すると考察した。

③グルテリン前駆体のゴルジ体からの輸送に他の Rab5 と他の GEF が関与することを明らかにすることを目的として、イネ種子で発現するそれぞれのホモログをデータベースによって検索した結果、GEF に関して 1 個（GEF2）、Rab5 に関して 4 個のホモログ（Rab5b, Rab5c, Rab5d, Rab5e）を検出した。これらの組み換えタンパク質を用いて in vitro GEF assay を行った結果、GLUP6/GEF と GEF2 は非活性型 GLUP4/Rab5、Rab5b、Rab5d を活性型に変換することが明らかとなった。これらの結果は、グルテリン前駆体のゴルジ体からの輸送に少なくとも 3 個の Rab5 タンパク質が関与し、2 つの GEF がそれらの活性化に携わっていると考察した。