

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

文, 柳瓊

<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・(本籍・国籍)	ウェン リュウイン 文 柳 瓔 (中 国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第717号
学位授与の日付	平成25年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 遺伝子資源工学専攻
学位論文題目	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)
論文調査委員	(主査) 准教授 熊丸敏博 (副査) 教授 石野良純 教授 松岡健

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。

論文審査の結果の要旨

本論文は、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制御機構の遺伝学的基盤を明らかにすることを目的として、① Small 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、② Rab5 と GEF の 2 重劣性変異体の解析、③ Rab5 ホモログと GEF ホモログの同定と活性化解析を行ったものである。

① 小胞体上で翻訳されたグルテリン前駆体はゴルジ体を経て貯蔵型液胞に輸送され、同液胞内で二つのサブユニットに開裂し集積する。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。*glup4/rab5* 変異体と *glup6/gef* 変異体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参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組換え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 GDP 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を明らかにした。これらの結果は、GLUP6/GEF が GLUP4/Rab5 の活性化因子であることを示している。両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 はタンパク質間相互作用を有することを明らかにした。これらの結果から、GLUP6/GEF によって活性化された GLUP4/Rab5 が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参与すると考察した。

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。その結果、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こと、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ことが明らかとなった。二重劣性型において変異の表現型がより顕著になったことから、グルテリン前駆体のゴルジ体からの輸送に他の Rab5 及び GEF ホモログも参与すると考察した。

③ グルテリン前駆体のゴルジ体からの輸送に他の Rab5 及び GEF ホモログが参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を明らかにした。これらの結果から、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 タンパク質が参与し、2 つの GEF がそれらの活性化に携わっていると考察した。

以上要するに、本論文はイネ種子グルテリンの貯蔵型液胞への輸送に係る分子機構の細胞生物学的知見を明らかにしたものであり、植物遺伝学及び植物生理学に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有すると認める。

論文審査の結果の要旨

生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は脳の神経分泌細胞で産生・分泌されるアミノ酸 10 個からなるペプチドホルモンで、魚類は 2 あるいは 3 種の GnRH 分子種をもつ。脊椎動物における複数の GnRH 分子種は遺伝子重複によって生じたもので、3 つのグループに分けられる GnRH パラログをそれぞれ GnRH1、GnRH2、GnRH3 とよぶ。ニシン、マイワシ、カタクチイワシはニシン目に属し、海産食料資源として世界で最も重要な位置を占める魚種であるが、ニシン目魚類の生殖生

理に関する情報は現在においてもほぼ皆無である。本研究は、飼育下で長期間にわたり産卵するカタクチイワシを対象にして、その GnRH システムを明かにすることを目的とした。

まず、GnRH の遺伝子クローニングを行った結果、本種は GnRH1 (ニシン型 GnRH)、GnRH2 (ニワトリ II 型 GnRH) および GnRH3 (サケ型 GnRH) をもつことが明らかとなった。他魚種の既存の情報と比較した結果、アミノ酸配列でそれぞれ 21-35% (GnRH1)、62-67% (GnRH2)、33-40% (GnRH3) の相同性を示した。つぎに、ISH 法および免疫組織化学的手法により、脳内における 3 種 GnRH の産生細胞の分布局在を調べた。GnRH1 の特異抗体は新たに作製した。その結果、GnRH1 細胞は視索前核と嗅球に、GnRH2 細胞は中脳被蓋に、GnRH3 細胞は嗅球および終神経節に分布しており、このうち、視索前核に局在する GnRH1 細胞から伸長した神経軸索は、脳下垂体の前葉主部にある GnRH 産生細胞へ直接投射していた。これら 3 種 GnRH 細胞の分布パターンにおける雌雄間での差異は認められなかった。以上の結果より、カタクチイワシでは視索前核の GnRH1 細胞で産生される GnRH1 が、本種の生殖に関与することが示唆された。さらに、繁殖周期に伴う脳内における 3 種 GnRH の mRNA 量の発現解析を行った。その結果、いずれの GnRH の mRNA 量においても、統計的変化は認められなかったものの、唯一、排精期の雄において GnRH3 mRNA 量の上昇が認められた。

以上、本研究において、初めてニシン目魚類における GnRH の分子種および各種 GnRH 細胞の脳内分布が明らかとなり、今後、本種を用いたニシン目魚類の繁殖に関する脳機能研究が進展することが期待される。