

## 【平成24年4月-12月授与分】博士學位論文内容の要旨及び審査の結果の要旨

<https://hdl.handle.net/2324/26194>

---

出版情報：2013-03-29. 九州大学  
バージョン：  
権利関係：

氏名・(本籍・国籍)	うめもとともえ 梅本朋江 (兵庫県)
学位の種類	博士 (システム生命科学)
学位記番号	シ生博乙第18号
学位授与の日付	平成24年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR $\alpha$ and PPAR $\gamma$ (PPAR $\alpha$ 及びPPAR $\gamma$ のリガンド依存的核-細胞質間輸送)
論文調査委員	(主査) 教授 藤木幸夫 (副査) 教授 諸橋憲一郎      教授 近藤久雄 教授 田村茂彦

### 論文内容の要旨

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) play important roles in diverse biological processes including metabolisms of sugars and lipids and differentiation of cells such as adipocytes. PPARs are transcription factors belonging to the ligand-dependent hormone receptor group. To function as transcription factors, PPARs translocate into nucleus where they associate with transcription apparatus. However, mechanisms underlying nuclear transport of PPARs remain enigmatic. I show here that PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  dynamically shuttle between nucleus and cytoplasm, although they constitutively and predominantly appear in nucleus. With a series of truncation mutants, I identify that PPAR nuclear transport is mediated by at least two nuclear localization signals (NLSs) in DNA binding domain (DBD)-Hinge and activation function 1 (AF1) regions and their respective receptors including importin  $\alpha/\beta$ , importin 7, and an unidentified receptor. PPARs also harbor two nuclear export signals (NESs) in DBD and ligand binding domain (LBD) regions that are recognized by distinct export receptors, calreticulin and CRM1. Moreover, I show that nuclear-cytoplasmic shuttling of PPARs is regulated by respective PPAR ligands and  $Ca^{2+}$  concentration. Taken together, I suggest that the multiple pathways for the nuclear-cytoplasmic transport of PPARs regulate the biological functions of PPARs in response to external signals.

### 論文審査の結果の要旨

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)は、ホルモンレセプターファミリーに属し、糖・脂質代謝、脂肪細胞の分化を含む様々な生理現象に重要な役割を担っているリガンド依存的転写因子である。本申請者は、下記2点に大別される項目内容の如く、PPARの核移行機構についての研究を遂行した。

1. はじめに、PPAR $\alpha$ とPPAR $\gamma$ が見かけ上は常に核に局在するにも関わらず、核・細胞質間をダイナミックにシャトルしていることをfluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP)アッセイ系を用いて示した。

次に、核内移行シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)の検索と解析を行い、それぞれの輸送受容体を同定した。各種部分欠失ミュータントを用いた解析結果から、PPARには少なくとも2つのNLSがあることを明らかにした。NLS1はDNA結合領域(DBD)とHinge領域の境界付近にある61アミノ酸 ( $\alpha$ の127-187番目、 $\gamma$ の134-194番目のアミノ酸) で、塩基性アミノ酸に富み、importin  $\alpha/\beta$ と結合するクラシカルな双極型NLSに似た配列を持っている。実際に、NLS1はimportin  $\alpha/\beta$ と結合する。この領域のアラニンスキャニング及び欠失ミュータントの解析から、双極型NLSだけではなく、そのC末側の塩基性アミノ酸もNLS活性に寄与していることが示唆された。このことは、NLS1がimportin 7にも結合するという結果によっても支持される。NLS2はactivation function 1(AF1)ドメインにあるPPAR $\alpha$ の71-100番目、PPAR $\gamma$ の71-107番目のアミノ酸のそれぞれ30と37アミノ酸にある。NLS2は殆どまたは全く塩基性アミノ酸を含んでおらず、importin  $\alpha/\beta$ 及びimportin 7に結合しない。しかしながら、NLS2による核内輸送は、NLS1と同様に細胞質因子及びエネルギーに依存的である。

さらに、PPARに2つのNESを同定した。NES1はDBDにあるKGGFFRRというアミノ酸配列を含む。NES2はPPAR $\alpha$ の359-436番目、PPAR $\gamma$ の359-436番目のアミノ酸にあり、ロイシン・イソロイシンに富むモチーフを含み、レプトマイシンB(LMB)に感受性があるところからCRM1によって輸送されるNESと推察される。

2. 1.においてPPARの核・細胞質間輸送が複数の核内及び核外輸送経路によることを示したが、このことはPPARの核・細胞質間輸送が細胞内外のシグナルによって調節されている可能性を示唆する。実際に、PPAR $\alpha$ 及びPPAR $\gamma$ のNLS1欠失ミュータント(PPAR $\Delta$ NLS1)はそれぞれのリガンドを加えることで核内への局在が強くなり、また更にその状態の細胞からリガンドを抜くと再び細胞質へと戻っていく。そこで、PPARの核内輸送がリガンドによって調節されているか否かを検証する為に、セミインタクト細胞を用いたin vitro系でのインポートアッセイを行い、PPARの核内輸送がそのリガンドによって促進されることを示した。またpolyethylene glycolによる細胞融合によって得たヘテロカリオンを用いてFRAPアッセイを行い、PPAR $\alpha$ の核外輸送はリガンドによって阻害され、PPAR $\gamma$ では逆に促進されることを示した。

更にNES2への点変異の導入もしくは細胞内のカルシウムを枯渇させてPPARがカルレティキュリンと結合出来なくすると、PPAR $\alpha$ の安定性が増加する一方、PPAR $\gamma$ では逆に低下する。これらの結果は、カルレティキュリンがPPAR安定性の調節に関わっていることを示唆している。

これらのことより、PPAR $\alpha$ 及びPPAR $\gamma$ の核・細胞質間輸送は複数の核内・核外輸送経路を介して行われていることが明らかとなった。

以上の結果は、生命科学、分子細胞生物学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本申請者は、博士(システム生命科学)学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	か い ひろ おみ 甲 斐 浩 臣 (熊本県)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	シ生博乙第17号
学位授与の日付	平成24年5月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Thermotolerant cyclamen with reduced acrolein and methyl vinyl ketone (アクロレイン及びメチルビニルケトンの低減による高温耐性シクラメンの開発)
論文調査委員	(主査) 教授 射場 厚 (副査) 准教授 荒田 博行 准教授 熊丸 敏博 石川県立大学大学院 准教授 濱田 達朗

## 論 文 内 容 の 要 旨

植物に高温耐性を付与する方法として、葉緑体型  $\omega$ -3 デサチュラーゼを抑制し、トリエン脂肪酸の含有量を低下させる方法が知られている (Murakami *et al.* 2000, *Science* 287, 476-479)。しかし、トリエン脂肪酸含有量の低下と高温耐性付与との関連性を明らかにした報告は未だない。そこで、トリエン脂肪酸含有量の低下と高温耐性獲得との関連性について検討した。

材料としては、夏季の高温・強光により葉焼けが発生する上に、今後の地球温暖化により野生種の絶滅が危惧され、また商業生産が困難になると考えられている鉢植え植物のシクラメン (*Cyclamen persicum* Mill.) を用いた。まず、シクラメン由来の葉緑体型デサチュラーゼ遺伝子 (*CpFAD7*) を同定し、この情報を基に RNA interference 法を用いてトリエン脂肪酸を低減させた形質転換シクラメン 2 系統を作出した。これらの形質転換体では、内在性の葉緑体型  $\omega$ -3 デサチュラーゼ遺伝子の発現が抑制され、トリエン脂肪酸の含有量が低下していた。そこで、WT を用いて高温耐性評価条件を検討した結果、38 °C、5 日間、24 時間日長の高温条件で評価したところ、2 日間の処理で葉の褐変や萎れが認められ、5 日間の処理で全ての個体で高温障害が発生した。この高温評価条件で WT と形質転換体の 2 系統の高温耐性を評価した結果、形質転換体 2 系統については、WT と比較して 5 日間の高温処理でも褐変や萎れなどの高温障害の発生が少なく、高温障害を呈した個体数も有意に少なかった。また WT の高温耐性は一般品種の高温耐性とほとんど差が無かったが、形質転換シクラメンの高温耐性は、一般品種の高温耐性より有意に優れていた。これら一般品種におけるトリエン脂肪酸含有量は 45.9~59.7mol% と差があるものの、それによって高温耐性に差が出ることはなかった。さらに、形質転換シクラメンの高温耐性は、開花期まで生育した個体でも維持されていた。これらの結果から、シクラメンにおいてもトリエン脂肪酸を低下させることで高温耐性が付与できることが明らかになった。

一方、トリエン脂肪酸は生体内で酵素的・非酵素的に分解され様々な代謝産物を生成し、このうち  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニルを有する代謝産物は、細胞毒性を有する事が知られている。そのため、トリエン脂肪酸含有量の低下により、このような細胞毒性を有する代謝産物の生成が抑制され、その結果、高温耐性を獲得しているのではないかと考えた。このような毒性を有する代謝産物のうち、acrolein (ACR)、methyl vinyl ketone (MVK)、4-hydroxy-2-nonenal (HNE) は photosystem II に対する影響が報告されている。また、ACR、(E)-2-hexenal、HNE は光合成活性に対する影響が報告されており、さらに ACR、MVK、malondialdehyde (MDA) は過酸化ストレスに応答する遺伝子発現を強く誘導する。更に ACR、MVK、MDA の長期被曝により葉に障害が発生させるといった報告がある。これらの既報から、本論文では ACR、MVK、(E)-2-hexenal、HNE、MDA に着目し、

高温条件下における WT と形質転換シクラメンのそれぞれの代謝産物について葉内濃度を調べた。その結果、ACR と MVK については、WT における高温障害の発生と同調するように両物質の濃度が上昇したが、形質転換シクラメンでは両物質の濃度上昇は認められなかった。一方、(E)-2-hexenal については WT において一過性の濃度上昇が認められたものの、WT における高温障害との関連性が認められなかった。また、HNE、MDA については WT、形質転換シクラメン共に同様の発生活長を示した。これらの結果から、高温障害の発生程度と葉内濃度の上昇とに関連性が認められた ACR と MVK に着目し、WT の葉に ACR 及び MVK を添加する実験をおこなった。高温処理 (38 °C、5 日間、24 時間日長) で障害が認められた生葉に蓄積していた ACR 及び MVK 含有量を調べた結果、それぞれ 63.0 ng g<sup>-1</sup> FW、6.9 µg g<sup>-1</sup> FW であった。通常の生育条件 (20 °C、16 時間日長) において、このような生葉内濃度になるように ACR 及び MVK についてそれぞれ様々な添加濃度及び処理時間を検討した結果、ACR 添加区では 5 ppm、3 日間の添加処理で葉内濃度が 69.7 ng g<sup>-1</sup> FW に、MVK 添加区では 50 ppm、2 日間の添加処理で 6.0 µg g<sup>-1</sup> FW になった。このような添加条件で ACR を蓄積させると、通常の生育条件でも高温障害による褐変と同様の症状が認められた。また同様に MVK を蓄積させると同じく通常の生育条件でも高温障害による萎れと似た症状が認められた。これらの結果から、高温条件により発生する葉の褐変や萎れの原因の一つとして、トリエン脂肪酸由来で細胞毒性を有する ACR や MVK 等が増加するものと考えられた。一方、トリエン脂肪酸を低下させた植物では、乾燥耐性が低下する報告がある。そのため、形質転換シクラメンについても乾燥耐性を評価したが、乾燥による葉の萎れ程度、灌水中断及び灌水再開後の生育を WT と比較した結果、大きな差は認められず、形質転換シクラメンの乾燥耐性は低下していないことが明らかになった。

このように高温条件で ACR や MVK 等が増加するシクラメンのような植物種では、トリエン脂肪酸含有量を下げることによって、これらの代謝産物の生成を抑制または遅延し、それによって高温条件による細胞死が軽減され、高温耐性を獲得する一因になったと考えられた。一方で、高温条件における ACR、MVK の生体内蓄積程度は、植物の高温適応力を評価する一つの基準になる可能性がある。このようにトリエン脂肪酸を低下させた植物体は、突然変異育種法等によって葉緑体型 ω-3 デサチュラーゼの生成を抑制することで、遺伝子組換え技術を利用することなく作出できるため、今後の高温耐性植物の作出にも大いに寄与できると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

葉緑体型脂肪酸不飽和化酵素 ω-3 デサチュラーゼの発現抑制によって、トリエン脂肪酸の含有量を低下させると、植物の高温耐性が向上することが知られている。しかし、トリエン脂肪酸含有量の低下と高温耐性獲得との関連性については明らかになっていない。本論文は、両者の関連性について、夏季の高温・強光により葉焼けが発生する上に、今後の地球温暖化により野生種の絶滅が危惧され、また商業生産が困難になると考えられているシクラメン (*Cyclamen persicum* Mill.) を用いて検討した。まず、シクラメン由来の葉緑体型デサチュラーゼ遺伝子 (*CpFAD7*) を同定し、RNA interference 法を用いてトリエン脂肪酸を低減させた形質転換シクラメン系統を作出し、その高温耐性を評価した結果、形質転換に用いた野生株と比較して高温障害が緩和されることが確認された。また、形質転換シクラメンの高温耐性は、一般品種の高温耐性より有意に優れていた。さらに、形質転換シクラメンの高温耐性は、開花期まで生育した個体でも維持されていた。

一方、トリエン脂肪酸は生体内で酵素的・非酵素的に分解されさまざまな代謝産物を生成し、このうち α, β-不飽和カルボニルを有する代謝産物は、細胞毒性を有することが知られている。そのため、トリエン脂肪酸含有量の低下により、このような細胞毒性を有する代謝産物の生成が抑制され、

その結果、高温耐性を獲得しているのではないかと考えた。このような毒性を有する代謝産物として、acrolein (ACR)、methyl vinyl ketone (MVK)、4-hydroxy-2-nonenal (HNE)、(E)-2-hexenal、malondialdehyde (MDA) に着目し、高温条件下における野生株と形質転換シクラメンのそれぞれの代謝産物について葉内濃度を調べた結果、ACR と MVK については、野生株における高温障害の発生と同調するように両物質の濃度が上昇したが、形質転換シクラメンでは両物質の濃度上昇は認められなかった。一方、(E)-2-hexenal については野生株において一過性の濃度上昇が認められたものの、高温障害との関連性が認められなかった。また、HNE、MDA については野生株、形質転換シクラメン共に同様の発生消長を示した。これらの結果から、高温障害の発生程度と葉内濃度の上昇とに関連性が認められた ACR と MVK に着目し、野生株の葉に ACR 及び MVK を添加する実験をおこなった。高温処理で障害が認められた生葉に蓄積していた ACR 及び MVK 含有量と同じ生葉内濃度になるように ACR 及び MVK を添加した結果、そのような添加条件で ACR を蓄積させると、通常の生育条件でも高温障害による褐変と同様の症状が認められた。また同様に MVK を蓄積させると同じく通常の生育条件でも高温障害による萎れと似た症状が認められた。これらの結果から、高温条件により発生する葉の褐変や萎れの原因として、トリエン脂肪酸由来で細胞毒性を有する ACR や MVK 等の増加が考えられた。

このように高温条件で ACR や MVK 等が増加するシクラメンのような植物種では、トリエン脂肪酸含有量を下げることによって、これらの代謝産物の生成を抑制または遅延し、それによって高温条件による細胞死が軽減され、高温耐性を獲得したと考えられた。一方で、高温条件における ACR、MVK の生体内蓄積程度は、植物の高温適応力を評価する一つの基準になる可能性がある。このようにトリエン脂肪酸を低下させた植物体は、突然変異育種法等によって葉緑体型  $\omega$ -3 デサチュラーゼの生成を抑制することで、遺伝子組換え技術を利用することなく作出できるため、今後の高温耐性植物の作出にも大いに寄与できると考えられ、植物分子生理学分野および植物育種学分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認められる。