

学 位 論 文 題 名

Molecular and Biochemical Studies of
Arabidopsis thaliana Small GTP-Binding Proteins

(シロイヌナズナ低分子量 GTP 結合タンパク質の分子的および生化学的研究)

学位論文内容の要旨

近年、酵母やほ乳類などの真核細胞において、細胞内信号伝達経路の研究が盛んに行なわれ、ホルモンレセプターやキナーゼ等細胞内での情報伝達に関与する多くの因子が単離されてきた。また、それらの分子の遺伝学および生化学的解析も盛んに行なわれている。

しかしながら、高等植物細胞における細胞内情報伝達経路についてはほとんど明らかにされておらず、植物分子生物学における重要な課題の一つとなっている。

低分子量GTP結合タンパク質は分子量20~30kDaで広く真核細胞中に存在し、GTPase活性を持ちGTP結合型およびGDP結合型という二つのフォームを取るサイクルを繰り返すことによって、細胞内で分子スイッチとして働いていると考えられている。これらの低分子量GTP結合タンパク質はRAS, RHOおよびYPT/RABという三つのサブグループに分けることができ、それぞれRASは細胞膜に局在して細胞の増殖および分化、RHOは細胞骨格の形成、YPT/RABはゴルジ体やERに結合して細胞内の小胞輸送などを制御していると考えられている。また、これらの低分子量結合タンパク質はそれ自身でも弱いGTPase活性を持っているが、そのGTPase活性を調節する因子であるGAP (GTPase activating protein)やGRF (GDP releasing factor)と共役して働いていることも最近の酵母などにおける研究から明らかになってきた。

私は、高等植物における細胞内信号伝達経路の一端を明らかにするために、これら低分子量GTP結合タンパク質の遺伝子を高等植物から単離しその構造を明らかにするとともに、トランスジェニックタバコや突然変異を導入した組み替えタンパク質を材料として、これらのタンパク質の生化学的な解析を行なうことにした。

第一章では、シロイヌナズナcDNAライブラリーからaraゲノミックDNAの断片をプローブとして低分子量GTP結合タンパク質遺伝子の単離を試みた。この結果、四個の新しい遺伝子ara-2~ara-4を単離することに成功し、高等植物細胞中で低分子

量GTP結合タンパク質遺伝子が遺伝子ファミリーを形成していることを明らかにした。また、遺伝子から予測されるアミノ酸配列から、これらの遺伝子産物は低分子量GTP結合タンパク質に共通する四ヶ所のアミノ酸配列を全て保存しておりカルボキシ末端付近にCys-Cys-Xaa-Xaa (Xaaは任意のアミノ酸) という植物に特徴的な配列を持ち、全体の構造としては動物や酵母において細胞内小胞の輸送に関わっているYPT/RABファミリーのタンパク質に類似していることを示した。さらに、分裂酵母の*ras1*, *ypt1*および*ypt3*の欠損株にこれらの遺伝子を導入し機能的相補性を示さないこと、およびアミノ末端数残基が欠失した*ara-5*遺伝子を野性型の酵母細胞中で発現させると細胞の生育が阻害されること等を明らかにした。以上のことから、*ara*遺伝子ファミリーは少なくとも*ras1*, *ypt1*および*ypt3*遺伝子の植物における相同遺伝子ではなく、異なった経路に働く細胞増殖に必須の遺伝子であると考えられる。

第二章では、低分子量GTP結合タンパク質の植物細胞内での局在を明らかにするために、大腸菌中にて発現させたARA-2およびARA-4の組み替えタンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を作製し、これを用いて生化学的な解析を行なった。この結果、ARAタンパク質を過剰発現したトランスジェニックタバコおよびシロイヌナズナの双方においてARA-2およびARA-4タンパク質は膜画分に存在しており、高塩濃度や尿素処理ではその結合が壊されず0.5%以上のNP-40およびデオキシコール酸ナトリウムにより膜から可溶化される事が明らかになった。このことは、これらのタンパク質が他の生物の低分子量GTP結合タンパク質と同様に、翻訳後カルボキシ末端付近のシステイン残基が脂肪酸によって修飾されることにより膜の表面へ結合するというを示唆している。さらに、タバコとシロイヌナズナにおいて同様の結果が得られていることから、これら翻訳後の修飾機構は異種の植物間でも共通していると考えられる。

第三章では、植物の低分子量GTP結合タンパク質の生化学的性質を明らかにするために、ARA-2およびARA-4に部分的欠失や点突然変異を導入し大腸菌中で発現させたタンパク質を用いて、GTPとの結合活性および加水分解活性を指標として解析を行なった。この結果、低分子量GTP結合タンパク質間で保存されている四ヶ所のアミノ酸配列の全てがGTPとの結合活性に必須であることが明らかとなった。さらに、酵母のYPT1において優性致死の変異として知られているAsnからIleへの点突然変

異を導入したARAタンパク質は、GTPとの親和性が非常に弱くなっており、RASタンパク質の発癌化突然変異として知られるGlnからLeuへの突然変異を導入したARAタンパク質は、GTPの加水分解活性が極端に下がっていることが明らかになった。また、ARAタンパク質とヌクレオチドの反応中間体を免疫沈降によって回収し解析した結果も、以上の結果を支持した。変異を導入していないARAタンパク質はGTPに対して特異的な結合活性ならびに加水分解活性を保持していたことから、植物における低分子量GTP結合タンパク質の生化学的性質は、その他の生物の物と基本的には変わらないと考えられる。

本研究は、高等植物を材料として用い、低分子量GTP結合タンパク質遺伝子の単離からその生化学的解析まで一貫して行なった初めての報告である。この結果から、高等植物においても複数の低分子量GTP結合タンパク質が存在しており、構造的および生化学的解析の結果、これらの分子は構造的にもまた機能的にも酵母や動物細胞に存在するものとほぼ同様の性質を持っている事が明らかになった。このことは、高等植物においてもその多様な細胞内情報伝達経路の一つとして、低分子量GTP結合タンパク質を介した経路が機能しているであろうということを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 藤 茂 行

副 査 教 授 吉 川 正 明

副 査 教 授 内 宮 博 文

(東京大学分子細胞生物学研究所)

副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Molecular and Biochemical Studies of *Arabidopsis thaliana* Small GTP-Binding Proteins

(シロイヌナズナ低分子量 GTP 結合タンパク質の分子的および生化学的研究)

細胞が外部から受けたシグナルは化学物質に変えられ、それは逐次伝達されて最終応答反応、即ち生体物質の合成や物質の移動等が起こる。このシグナル伝達に関与する物質の1つに低分子量GTP結合タンパク質がある。このタンパク質やその遺伝子については、詳細に研究されている動物や酵母に比較して植物での研究は少ないが、しかし、松井らはヒトのras遺伝子に相同性を示すシロイヌナズナの核遺伝子、araをクローン化している。申請者はそのara遺伝子をプローブとして、シロイヌナズナのcDNAライブラリーからara遺伝子のcDNAクローンを選択し、その遺伝子の構造とタンパク質の生化学的性質を解析して次のような知見を得た。

- ① 緑葉のRNAから調製したcDNAライブラリーから低分子量GTP結合タンパク質の4種類のcDNAクローン (ara2, ara3, ara4, ara5) を得てその一次構造を決定した。
- ② その4種類のcDNAをプローブとして行った核DNAの Southern 解析では、パターンの変異性がみられ、ara遺伝子が多重遺伝子族を構成することを示した。

- ③この4種類のcDNAは、酵母、ラット、細胞性粘菌のGTP結合タンパク質に共通してよく保存されている4領域を含み、全体の構造としては細胞内小胞の輸送に働くといわれている酵母のYPTやラットのRABグループに類似することもわかった。
- ④また、アミノ酸順位45近辺の The-Ile-Gly-Val-Asx-Phe 配列も保存性の高い領域として注目された。さらに、C末端は Cys-Cys-Xaa-Xaa という特色があり、ラット、酵母、粘菌の Cys-Cys で終わるものとは対照的であることも知られた。
- ⑤ ara4のトランスジェニックタバコ植物を育成し、それから懸濁培養細胞を調製した。それを用いて、細胞分画と免疫抗体法によってARAタンパク質が膜と結合していることの証拠を示した。
- ⑥ARA-4タンパク質と膜との結合は、膜成分を食塩や尿素で処理しても解離しないが、DOCやNP40処理では離れる事から、それは脂肪酸と結合し、その脂肪酸によって膜にアンカーされていることを示唆した。ARA-4の膜への分布はシロイヌナズナを材料にした細胞分画実験によっても確かめられた。
- ⑦ARA-2とARA-4のcDNAの欠失型と塩基置換型突然変異を、ある発現ベクターに繋ぎ、大腸菌で発現させてGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）-ARAタンパク質を作らせて、そのGTP結合能力を調べた。野生型遺伝子の産物は結合能を示したが、N末より10又は11個以上のアミノ酸が欠けると結合能力が消失した。また、ドメインⅡ領域内の Gln を Leu に置換してもGTP結合能は阻害されないが、ドメインⅢ領域内の Asn を Ile に置換すると顕著に阻害された。
- ⑧野生型のGST-ARA融合タンパク質はGTPをGDPに分解した。なお、ドメインⅡ領域内での Gln → Leu 置換はGTPの分解を阻害しないが、ドメインⅢ領域内での Asn → Ile 置換はGTPの加水分解を顕著に阻害した。また、ARAタンパク質に結合するGTPの量自体の減少も認められた。

以上の成果は、従来乏しかった植物の低分子量GTP結合タンパク質に関する多くの新知見を明らかにしたもので、その生化学的性質は他の生物におけるものに類似しており、従って、このタンパク質の関与するシグナル伝達系が植物にも存在することを強く示唆するもので、高く評価されている。最終試験の結果も満足すべきもので、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受ける十分な資格を有すると認めた。