

学 位 論 文 題 名

Studies on the Protein Molecules of Nuclear Envelopes
and Their Physiological Changes in Mung Bean Seedlings

(ヤエナリ実生の核膜を構成するタンパク質分子
およびそれらの生理学的変動に関する研究)

学位論文内容の要旨

近年、植物細胞においても、分子生物学の発展とともに、DNAの複製装置、転写装置、発現調節因子などについて研究が進められている。しかし、核膜を中心とする、核の構造・機能をつかさどる要素については、研究の蓄積が少ない。本研究では、植物細胞核の核膜に注目し、そこに含まれるタンパク質分子を同定し、それらの生化学的な性質ならびに細胞生理学的な特徴を解析することとした。その結果、数種類の特徴的なタンパク質分子を同定することができ、その中でも量的に多い糖タンパク質分子の生化学的性質と生理学的性質について詳しい解析を行った。

本研究ではヤエナリ (*Vigna radiata* L.) 黄化実生の胚軸を実験材料とした。はじめに、胚軸組織から比較的多量の核を単離する方法を検討し、ショ糖および Percoll を用いた遠心分離法により、粗核画分から高純度の核を調製する方法を確立した。さらに、精製した核から核膜画分を分離する方法も確立した。こうして得られた核膜画分のタンパク質成分について生化学的解析をおこない、以下に述べる特徴的な数種類のタンパク質を同定した。(1) 10種類以上のタンパク質はATP存在下でリン酸化され、中でも分子サイズ28 kDaと24 kDaのタンパク質はカルシウムイオンに依存したリン酸化を受ける。(2) “Stains-all”による染色によりカルシウムイオン結合性タンパク質を検索し、100 kDa、42 kDa、40 kDaの3種のタンパク質を同定した。そして、これらがカルシウム結合能を持つことを放射性標識カルシウム⁴⁵Caを用いて確認した。(3) 核膜画分には50 kDa、49 kDa、47 kDa、43 kDa、35 kDa、32 kDaの6種類の糖タンパク質が含まれる。これらの糖タンパク質は糖結合性タンパク質 Concanavalin A によって認識され、N-結合型(アスパラギン残基の窒素原子を介した結合)の糖タンパク質であった。(4) 32 kDa、19 kDa、18 kDaの3種のタンパク質は、O-結合型(セリン、スレオニンの水酸基の酸素原子を介した結合)の糖鎖を持つ糖タンパク質であった。

これら特徴あるタンパク質の中から、N-結合型の糖鎖を持つ 50 kDaと49 kDaの糖タンパク質をとりあげ、gp50、gp49と名付けるとともに、さらに詳しく分子レベルでの解析を行った。そこでまず、gp50とgp49に対する特異抗体を調製し、生化学的手法で分析したところ、次の結果が得られた。(1) 2つの糖タンパク質は、小胞体膜、細胞質膜、ミトコンドリア膜、液胞膜などには検出されず、核膜画分でのみ特異的に検出された。

(2) 2つの糖タンパク質は核膜を0.5 M以上の高濃度の塩化カリウムで処理することによって核膜から遊離した。(3) 2つの分子はConcanavalin A以外のレクチンとは反応しなかった。また、N-結合型糖鎖に作用する糖鎖切断酵素により糖鎖は消失し、分子サイズは各々約1 kDa分だけ減少した。このことから、gp50とgp49はマンノースを主とする6~7個のヘキソースを糖鎖成分としていると推定される。そして、糖鎖の種類から2つの糖タンパク質はendoplasmic reticulumで合成され、糖鎖修飾を受けた後、核膜に局在するものと考えられる。(4) ゲルろ過法による分析から、gp50とgp49は140 kDaの複合体の一部として存在する事が推定された。(5) これらの2つの糖タンパク質に類似したタンパク質がダイズ(*Glycine max* L.)、アズキ(*Phaseolus angularis* L.)にも存在することも明らかになった。gp50とgp49は上記の性質を共有することから、2つのアイソフォームの関係にあると推定される。さらに、gp50は、細胞分裂直後の若い細胞よりも分裂後2、3日経過した成熟細胞の下胚軸に多いことも見いだした。

これらの生化学的性質に加え、ヤエナリ子葉に大量に存在する種子タンパク質とヤエナリ下胚軸にあるこのgp50 (gp49も含む) とが類似していることを見いだした。この子葉タンパク質を便宜上csp50とした。(1) gp50に対する抗体はcsp50と反応する。

(2) プロテアーゼ処理によって得られるgp50とcsp50のペプチド断片は大部分が一致する。(3) 胚軸のgp50のアミノ末端側の22個のアミノ酸残基のうち18残基がcsp50と一致する。これらの結果から、gp50は種子貯蔵タンパク質csp50と同じファミリーに属する分子種である可能性が示唆された。

これまでの研究で得られた結果のみから、胚軸の核膜画分に見いだされた糖タンパク質gp50の細胞内での機能を確定することは困難であるが、その役割として次の2つの可能性が考えられる。ひとつは、成熟細胞においてgp50が核膜の二重膜構造を内側から支える役割。もう一つは、発芽後期に子葉から胚軸に供給される余剰分のアミノ酸を貯蔵タンパク質として蓄える役割。また、gp50に含まれる比較的短い糖鎖の役割としては、gp50の細胞内輸送、局在化のシグナル、あるいはgp50をタンパク質分解や化学修飾から保護する機能などが考えられる。今後これらの可能性を検討するためには、gp50の全一次構造の解明、免疫組織化学的手法を用いた詳細な局在部位の解析などが必要である。

本研究により明らかにされた、カルシウム結合タンパク質(100 kDa, 42 kDa, 40 kDa)、リン酸化タンパク質(28 kDa, 24 kDa)、そして糖タンパク質(50 kDa, 49 kDa, 47 kDa, 43 kDa, 35 kDa, 32 kDa, 19 kDa, 18 kDa)は、細胞周期、生長、分化、老化および環境に対する生理応答に伴った遺伝情報の発現調節、細胞内輸送と局在における核膜の機能を分子レベルで研究するための基礎となるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 静 夫

副 査 教 授 落 合 廣

副 査 助教授 福 永 典 之

副 査 助教授 前 島 正 義(名古屋大学大学院農学研究科)

学 位 論 文 題 名

Studies on the Protein Molecules of Nuclear Envelopes and Their Physiological Changes in Mung Bean Seedlings

(ヤエナリ実生の核膜を構成するタンパク質分子
およびそれらの生理学的変動に関する研究)

近年、植物細胞においても、分子生物学の発展とともに、DNAの複製装置、転写装置、発現調節因子などについて研究が進められている。しかし、核膜を中心とする、核の構造・機能をつかさどる要素については、研究の蓄積が少ない。本論文では、ヤエナリ (*Vigna radiata* L.)黄化実生の胚軸から得られた細胞核の核膜に注目し、そこに含まれるタンパク質分子を同定し、それらの生化学的な性質ならびに細胞生理学的な特徴を解析した。

はじめに、胚軸組織から比較的多量の核を単離する方法を検討し、ショ糖および Percoll を用いた遠心分離法により、粗核画分から高純度の核を調製する方法を確立した。さらに、精製した核から核膜画分を分離する方法も確立した。こうして得られた核膜画分のタンパク質成分について生化学的解析をおこない、以下に述べる特徴的な数種類のタンパク質を同定した。

(1) 10種類以上のタンパク質がATP存在下でリン酸化され、分子サイズ28 kDaと24 kDaのタンパク質はカルシウムイオンに依存したリン酸化を受けた。(2) “Stains-all” による染色によりカルシウムイオン結合性タンパク質を検索し、100 kDa, 42 kDa, 40 kDaの3種のタンパク質を同定した。(3) 核膜画分には Concanavalin A によって認識される50 kDa, 49 kDa, 47 kDa, 43 kDa, 35 kDa, 32 kDaの6種類のN-結合型の糖タンパク質が存在する。(4) 32 kDa, 19 kDa, 18 kDaの3種のタンパク質は、O-結合型の糖鎖を持つ糖タンパク質であった。

これら特徴あるタンパク質の中から、N-結合型の糖鎖を持つ50 kDaと49 kDaの糖タンパク質をとりあげ、gp50、gp49と名付けるとともに、さらに詳しく分子レベルでの解析を行った。そこで、gp50とgp49に対する特異抗体を調製し、生化学的手法で分析したところ、次の結果が得られた。(1) 2つの糖タンパク質は、核膜画分でのみ特異的に検出され、他のオルガネラ膜では検出されなかった。(2) 2つの糖タンパク質は核膜を0.5 M以上の高濃度の塩処理をすることによって核膜から遊離した。(3) 2つの分子は Concanavalin A 以外のレクチンとは反応しなかった。(4) ゲルろ過法による分析から、これら二つの糖タンパク質は約140 kDaの複合体の一部として存在する事が推定された。

(5) これらの2つの糖タンパク質に類似したタンパク質がダイズ (*Glycine max* L.)、アズキ (*Phaseolus angularis* L.) にも存在することも明らかになった。g p 5 0 と g p 4 9 は上記の性質を共有することから、2つのアイソフォームの関係にあると推定される。さらに g p 5 0 は、細胞分裂直後の若い細胞よりも分裂後2、3日経過した成熟細胞に多いことも見いだした。

これらの生化学的性質に加え、ヤエナリ子葉に大量に存在する種子タンパク質とヤエナリ胚軸にあるこの g p 5 0 (g p 4 9 も含む) とが類似していることを見いだした。この子葉タンパク質を便宜上 c s p 5 0 とした。(1) g p 5 0 に対する抗体は c s p 5 0 と反応する。

(2) プロテアーゼ処理によって得られる g p 5 0 と c s p 5 0 のペプチド断片は大部分が一致する。(3) 胚軸の g p 5 0 のアミノ末端側の22個のアミノ酸残基のうち18残基が c s p 5 0 と一致する。これらの結果から、g p 5 0 は種子貯蔵タンパク質 c s p 5 0 と同じファミリーに属する分子種である可能性が示唆された。

これらの糖タンパク質の役割として、ひとつは、成熟細胞において g p 5 0 が核膜の二重膜構造を内側から支える役割、もう一つは、発芽後期に子葉から胚軸に供給される余剰分のアミノ酸を貯蔵タンパク質として蓄える役割などが考えられる。今後これらの可能性を検討するためには、g p 5 0 の全一次構造の解明、免疫組織化学的手法を用いた詳細な局在部位の解析などが必要である。

本論文で明らかになった、植物の核膜におけるカルシウム結合タンパク質、リン酸化タンパク質そして糖タンパク質の存在は、細胞周期、生長、分化、老化および環境に対する生理応答に伴った遺伝情報の発現調節、細胞内輸送と局在における核膜の機能を分子レベルで研究するための基礎となるものである。本論文の主要な部分は国際的な英文誌に公表され、国内外から高い評価を受けている。去る1月29日に公開発表と最終試験が行われ、審査員一同は申請者が北海道大学博士(理学)の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。