

論文の内容の要旨

論文題目 高等植物における小胞輸送機構解明に向けた遺伝生化学的研究
—リングフィンガー型ユビキチンリガーゼの発見と解析—

氏名 松田憲之

<はじめに>

高等植物において、小胞輸送は重要な役割を担っているにもかかわらず、その理解は酵母や動物に比べて遅れている。植物の分泌過程の研究の第一歩として、私は修士課程において酵母の小胞輸送変異 (*sec15* 変異) を抑圧するシロイヌナズナ遺伝子 *RMA1* を単離した。博士課程においては *RMA1* のさらなる機能解析を行うとともに (第2章)、植物の小胞輸送に関与すると思われる *PRA2* 遺伝子を酵母小胞輸送変異株を用いて解析した (第1章)。以下その概要を述べる。

第1章：*PRA2* の酵母変異株を用いた解析

Rab/Ypt タンパク質は膜融合の過程で働く低分子量 GTPase である。近年高等植物から多数の *Rab/Ypt* タンパク質が単離されており、そのうちいくつかは酵母の *ypt* 変異を相補できる。一方、上田らによって、シロイヌナズナの *Rab/Ypt* タンパク質 *Ara4* を一連の酵母 *ypt* 変異株中で発現させると、共通の制御因子 *GDI* 等を競合するために、逆にその生育を阻害することが明らかにされている。

本研究ではエンドウ由来の *Rab/Ypt* 低分子量 GTPase *PRA2* を一連の酵母 *ypt* 変異株に導入して、その解析を試みた。まず *PRA2* を酵母の *ypt1(ts)*, *ypt3(cs)*, *sec4(ts)* 変異株に導入し、*PRA2* がこれらの変異を相補できるかどうかを調べた。*PRA2* はいずれの変異も相補しなかったが、逆に *ARA4* と同様に、これらの変異株の増殖を阻害した (表1, 図1)。*ARA4* による増殖阻害は *GDI* の共発現によって一部回復するので、*PRA2* による増殖阻害も *GDI* の共発現によって回復するかどうかを調べた。しかし、*ARA4* の場合とは異なり、*GDI* の共発現では *PRA2* による増殖阻害は回復しなかった (表2)。したがって、*Pra2* は *GDI* とは異なる酵母の制御因子を奪っており、それが種々の *ypt* 変異株の増殖阻害を引き起こしていると考えられる。

Pra2 と結合している因子の手がかりを得るために、生化学的な特性を変化させる種々の変異を *Pra2* に導入して (表3)、その増殖阻害活性を調べた。興味深いことに、*Pra2ΔC* は *ypt1* 変異株の増殖を阻害するが、

ypt3 変異株の増殖は阻害しなかった (図 2). また, GTP固定型の変異体 (Pra2Q79L) やエフェクター領域の変異体 (Pra2T52A) は, *ypt1* 変異株の増殖を野生型 Pra2 と同様に阻害したが, GDP固定型の変異体 (Pra2T34N) や nucleotide free 型の変異体 (Pra2N133I) は増殖を阻害しなかった (図 3). これらの結果から, Pra2 は酵母中で複数の因子を競合しており, ある因子がC末端に依存して Pra2 と結合することで *ypt3* 変異株の増殖を阻害し, 別な因子がC末端に依存せずに GTP型の Pra2 と結合することで *ypt1* 変異株の増殖を阻害していることが示唆された.

これらの実験結果は, 酵母の変異と他生物の相同遺伝子の発現による合成増殖阻害が普遍的に起りえる現象であることを示し, さらに Pra2 と相互作用する因子を酵母変異体を用いて単離・解析するための方法論的な基礎を与えるものだと考えている.

第 2 章: 生化学的手法による Rma1 の機能解析

私は修士課程において, 酵母 *sec15* 変異を抑圧するシロイヌナズナ遺伝子 *RMA1* を単離した. *RMA1* 産物は典型的なリングフィンガーモチーフと膜結合部位を有しているが, その機能は不明であった. ところがごく最近, ユビキチンを標的に付加する酵素であるユビキチンリガーゼ (E3) がリングフィンガーモチーフを持つという報告が相次いだ. しかし Rma1 は既知の E3 と配列上の相同性を示さず, また C末端に膜結合領域を有する点でも, 既知のいかなる E3 とも異なっている. そこで Rma1 が E3 活性を有するかどうかを, 生化学的に検討することにした.

大腸菌より精製したマルトース結合タンパク質 (MBP) と Rma1 の融合タンパク質 (MBP-Rma1) を ATP, ユビキチン, 高いユビキチン化活性を有する小麦胚芽抽出液と反応させると, Rma1 の見かけ上の分子量が 100 kDa 以上にわたり増加した (図 4 A). さらに MBP-Rma1 をアミロースレジンカラム上に固定し, pull-down assay を行ったところ, 上記の見かけ上の分子量の増加した MBP-Rma1 のみが, 抗ユビキチン抗体でも検出された (図 5 A). このことから, MBP-Rma1 がポリユビキチン化されることが示された.

この Rma1 のユビキチン化が, Rma1 を基質とする未知の E3 によるものなのか, Rma1 自身の E3 活性に由来するものなのかに興味を持たれる. そこで, Rma1 自身の E3 活性を自己ユビキチン化を指標に用いて調べた. MBP-Rma1 を ATP, ユビキチン, E1, および図 6 に示した動物由来の各種 E2 と反応させると, Ubc4 あるいは UbcH5a 特異的に Rma1 の自己ユビキチン化が再構成され, 見かけ上の分子量が増加することがわかった (図 6 A). ATP, ユビキチン, E1, および E2 (Ubc4/5) だけで Rma1 のユビキチン化が再構成できることから, Rma1 のユビキチン化は自身の自己ユビキチン化活性によることが, 言い換えれば Rma1 は Ubc4/5 と協調して働く E3 であることが示された.

さらに Rma1 の機能が進化的に保存されているかどうかを調べるために, ヒト Rma1 ホモログを単離し (図 7), 同様の実験を行った. その結果, (1) MBP-ヒトRma1 を ATP, ユビキチン, 網状赤血球抽出液と反応させると, ヒト Rma1 の見かけ上の分子量が 100 kDa 以上にわたり増加すること (図 4 B), (2) その分子量の増加はヒトRma1 のポリユビキチン化によること (図 5 B), (3) ヒトRma1 のユビキチン化も ATP, ユビキチン, E1, および E2 (Ubc4/UbcH5a) だけで再構成できること (図 6 B), が示された.

これらの実験結果から, 私が修士課程において単離した Rma1 は, Ubc4/5 と共に働く広く保存された新しいタイプのユビキチンリガーゼ (E3) であることが生化学的に示された (図 8). Rma1 は高等植物で E3 活性が初めて示されたリングフィンガータンパク質であり, またその C末端に膜結合部位を有する点で前例のない新しいタイプの E3 である. 今後は特に Rma1 の基質に注目しながら, その機能解析を行っていきたいと考えている.

表 1. Growth of wild-type and *ypt* mutant cells carrying either *PRA2* or vector alone.

Strain	Plasmid	Growth				
		14 °C	23 °C	30 °C	35 °C	37 °C
wild-type	<i>PRA2</i>	+	++	++	++	++
	vector	+	++	++	++	++
<i>ypt1</i>	<i>PRA2</i>	NT	-	-	-	-
	vector	NT	++	++	++	-
<i>ypt3</i>	<i>PRA2</i>	-	+	+	+	+
	vector	-	++	++	++	++
<i>sec4</i>	<i>PRA2</i>	NT	+	-	-	-
	vector	NT	+	-	-	-

++, growth; +, slow growth; +/-, almost no growth; -, no growth; NT, not tested.

表 2. Summary of the results of co-expression of GDI.

Mutant	Growth			
	vector	<i>PRA2</i>	<i>PRA2</i> + <i>GDI1/SEC19</i>	<i>PRA2</i> + <i>AtGDI1</i>
<i>ypt1</i>	++	-	-	-
<i>ypt3</i>	++	+	+	+

++, growth; +, slow growth; +/-, almost no growth; -, no growth.

表 3. Summary of the characters of mutant alleles of *PRA2*.

Allele	Amino acid	Description
ΔC	Cys ^{231,233} \rightarrow Δ	Lacking C-terminal prenylation site, cytosolic form
T34N	Thr ³⁴ \rightarrow Asn	Equivalent to Ras Asn-17, putative GDP-bound form
T52A	Thr ⁵² \rightarrow Ala	Mutation in the effector region
Q79L	Gln ⁷⁹ \rightarrow Leu	GTPase deficient and GTP-freeze
N133I	Asn ¹³³ \rightarrow Ile	Nucleotide binding deficient

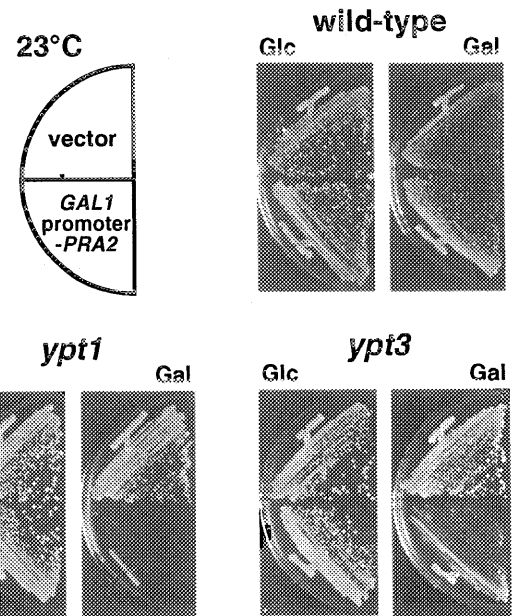


図 1 *PRA2*は酵母 *ypt* 変異株の増殖を阻害する。*ypt1* および *ypt3* 変異株中で、*PRA2*をガラクトース (Gal) により誘導すると、両変異株の増殖が阻害された(下段)。一方で、野生型の酵母細胞中で *PRA2*を過剰発現しても増殖阻害は観察されなかった(上段)。

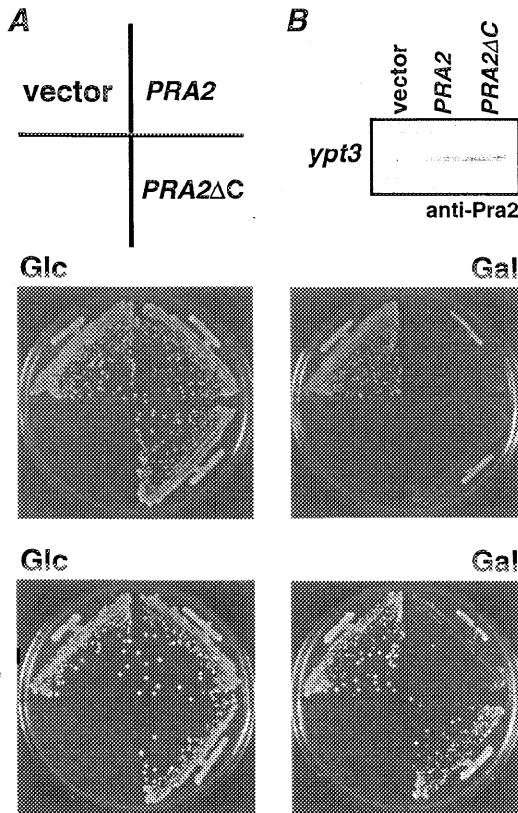


図 2 *PRA2* ΔC は株によって異なる増殖阻害活性を示す。(A) *PRA2* ΔC を *ypt1* および *ypt3* 変異株に導入した。 *PRA2* ΔC は *ypt1* 変異株の増殖を阻害するが、 *ypt3* 変異株の増殖は阻害しなかった。(B) 一方で、 *ypt3* 変異株中の *Pra2* と *Pra2* ΔC のタンパク量に差は無かった。

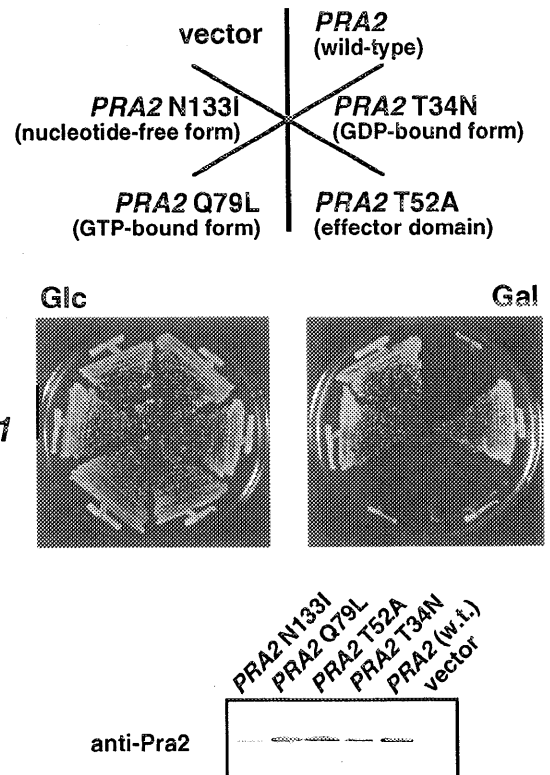


図 3 *Pra2*に種々の変異を導入して増殖阻害活性を調べた。*Pra2*Q79L (GTP固定型)や *Pra2*T52A (エフェクター領域の変異型)は *ypt1* 変異株の増殖を阻害するが、 *Pra2*T34N (GDP固定型)や *Pra2*N133I (nucleotide-free 型)は *ypt1* 変異株の増殖を阻害しなかった(中段)。一方で、いずれの変異タンパク質も発現していることは確認できた(下段)。

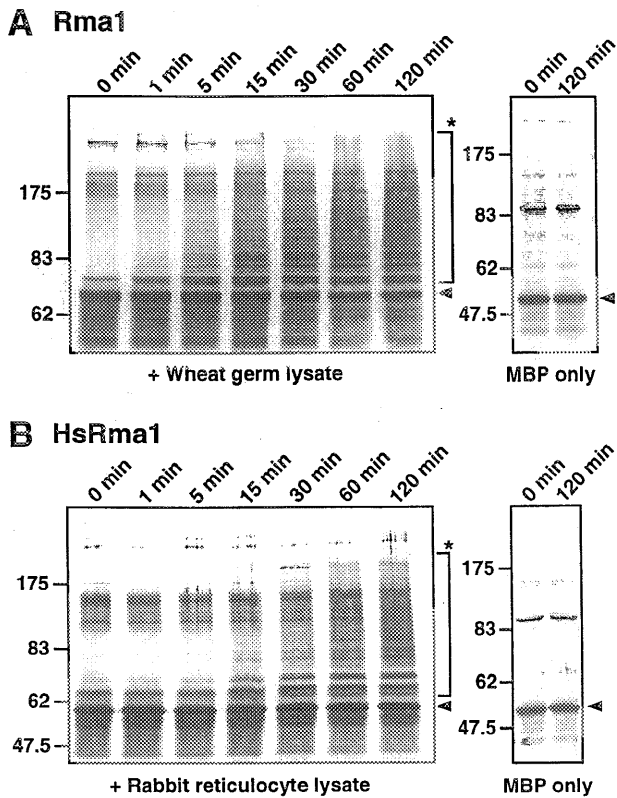


図4 (A) Rma1 を ATP, ユビキチン, および高いユビキチン化活性を有する小麦胚芽抽出液と反応させると, 見かけ上の分子量が本来の分子量 (矢頭) よりも 100 kD 以上にわたって増加した (*). (B) ヒト Rma1 を同様に ATP, ユビキチン, 高いユビキチン化活性を有する網状赤血球抽出液と反応させても, やはり見かけ上の分子量が 100 kD 以上にわたって増加した (*).

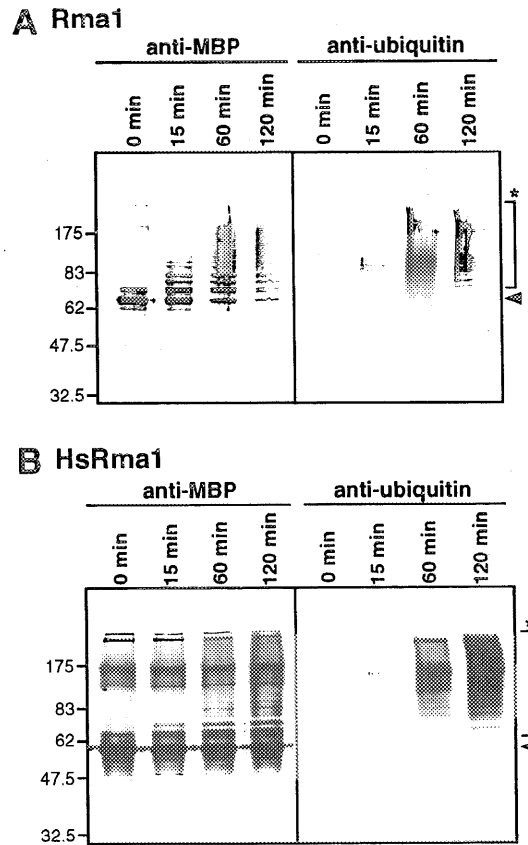


図5 (A) Rma1 の Pull down アッセイの結果. Rma1 (左半分) のうちで, 見かけ上の分子量が増加した Rma1 のみが, 抗ユビキチン抗体 (右半分) でも認識された. (B) ヒト Rma1 についても, 同様に見かけ上の分子量の増加がユビキチン化によることが示された.

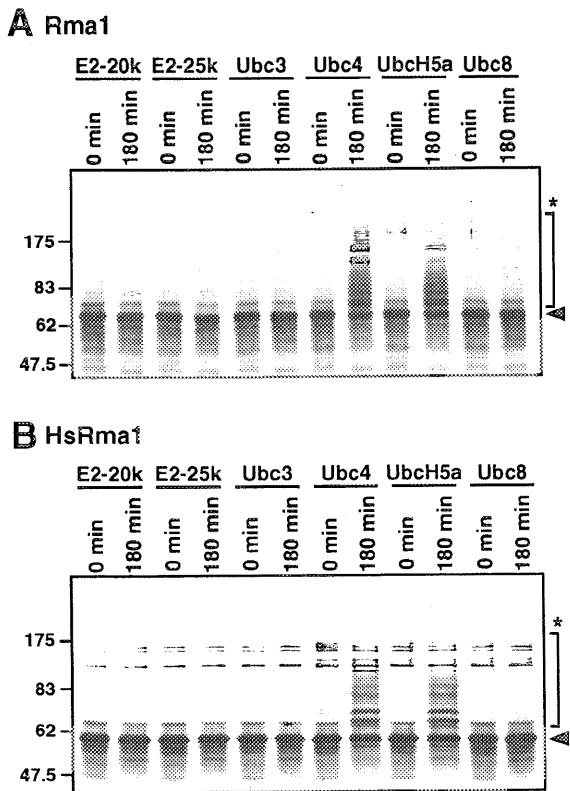


図6 (A) Rma1 を ATP, ユビキチン, E1, Ubc4 あるいは UbcH5a と反応させると, Rma1 の自己ユビキチン化が再構成され, 見かけ上の分子量が増加した (*). その他の E2 ではユビキチン化は再構成されなかった. (B) ヒト Rma1 の自己ユビキチン化も, ATP, ユビキチン, E1, および Ubc4/UbcH5a だけで再構成された.

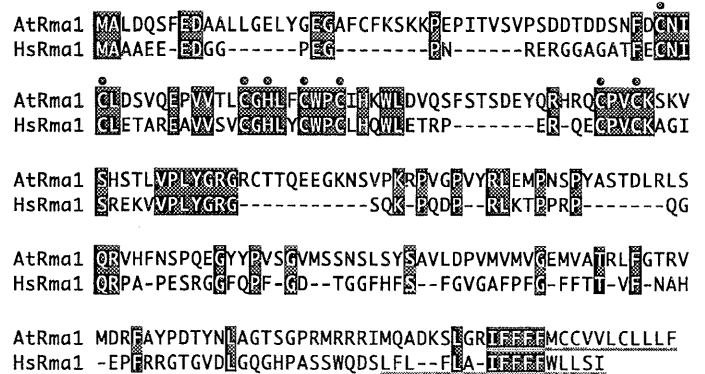


図7 シロイヌナズナ Rma1 (AtRma1) と ヒト Rma1 (HsRma1) の アミノ酸配列の比較. 黒丸はリングフィンガーモチーフのコンセンサス配列を, 下線は膜結合部位と思われる疎水性の領域を示す.

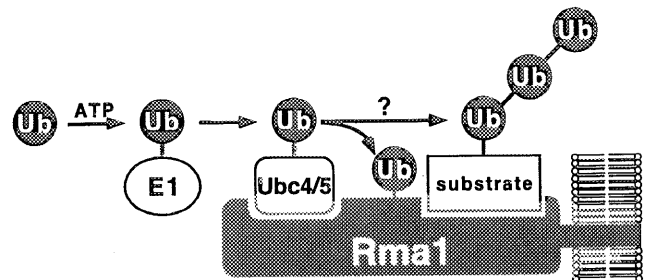


図8 本研究によって, Rma1 が Ubc4/5 ファミリーとともに働く新しいタイプの E3 であることが示された.