

論文内容の要旨

申請者氏名 野口 真大

水や無機塩類の運搬に機能する道管細胞の分化過程では、二次細胞壁の形成とプログラム細胞死の進行、細胞の空洞化を経ることで形成される。これまでに、道管細胞分化の鍵転写因子として NAC ドメイン転写因子 VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 (VND7) が同定され、さらに VND7 下流因子として多くの二次壁合成や細胞死の関連遺伝子が明らかにされてきた。しかしながら、道管細胞分化の実行部隊であるタンパク質の量的・質的動態に迫るプロテオーム解析は不十分であった。

そこで本研究では、道管細胞分化を人為的に誘導することが可能な形質転換タバコ BY-2 細胞 (BY-2/35S::VND7:VP16:GR ライン) を用いて定量的プロテオーム解析を行った。この分化誘導系では、誘導後 24 時間目に二次壁形成が観察され始め、36 時間目には 80%近い細胞に二次壁沈着が確認され、誘導 48 時間目には、90%の細胞でプログラム細胞死が起こり、道管細胞分化が完了する。本研究では、二次元電気泳動によるプロテオーム解析と Label-free 法による定量的プロテオーム解析を行った。Label-free 法では、サンプル全体で合計 1093 種のタンパク質を同定し、このうち 977 種のタンパク質について、Normalized Spectral Abundance Factor 法に基づいて定量的データを取得し、階層的クラスタリング解析 (Ward D 法) と多重統計検定解析 (Tukey-Kramer 法) を行った。その結果、7 つのクラスターに有意に変動するタンパク質群が多く含まれることが示された。つぎに、これら 7 つのクラスターについて Gene Ontology (GO) term 解析を行ったところ、分化誘導 24 時間目には、細胞壁・液胞関連タンパク質が蓄積し始めると同時にミトコンドリアや葉緑体の機能が低下し始め、36 時間目以降にはタンパク質や転写といった生合成活性も低下し、細胞内のタンパク質分解が進行することが示唆された。さらに、道管細胞分化の過程で一過的に蓄積上昇を見せるクラスターについて詳細な GO term 解析を行ったところ、分化誘導 24 時間目に細胞壁および初期エンドソーム関連タンパク質が蓄積し、36 時間目あるいは 48 時間目に細胞壁 (とくにリグニン生合成) および細胞死関連タンパク質がそれぞれ濃縮されていることが分かった。このことから、道管細胞分化において重要なイベントである二次壁形成とプログラム細胞死が、関連タンパク質の分化段階に沿った発現・蓄積によって制御されている可能性が考えられた。また、得られたプロテオームデータと先行研究で取得済みのトランスクリプトームデータを相関性解析 (Pearson's correlation coefficient 法) によって比較することで、細胞壁修飾 (とくにペクチン関連酵素) やプロテアソームの関連タンパク質が分化過程で高い蓄積を見せる一方で、転写物は減少することが示された。このように、本研究における道管細胞分化過程のプロテオーム解析により、分化段階に沿ったタンパク質の多段階的な発現・蓄積制御によって、新規の二次壁形成とプログラム細胞死の協調的な進行をなし得ていると可能性を示すことができた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 野口 真大

道管細胞は水や無機塩類の運搬を司る重要な細胞である。これまでに、道管細胞の分化過程について、詳細な細胞生物学的解析や網羅的なトランスクリプトーム解析を含む分子生物学的解析、分子遺伝学的解析が精力的に進められ、道管細胞分化の鍵転写因子として NAC ドメイン転写因子 VND7 が同定されるなど、道管細胞分化の制御メカニズムに関する情報が徐々に蓄積されてきた。しかしながら、分化制御の実行因子となるタンパク質の量的・質的動態については不明な点が多く残されていた。そこで申請者は、道管細胞分化の人為的誘導が可能な形質転換タバコ BY-2 細胞 BY-2/35S::VND7:VP16:GR を用いてプロテオーム解析を行い、以下に示す知見を得た。

1. 二次元電気泳動によるプロテオーム解析により、道管分化過程で増減する多数のスポットを見いだした。MS/MS 解析の結果、道管分化の形態形成の実行因子となる既知の様々なタンパク質の増減が確認されたとともに、一部のタンパク質が分化の過程で多様な翻訳後就職を受けていることが示された。

2. Label-free 法による定量的プロテオーム解析として LTQ Orbitrap XL による MS/MS 解析を行った。同定した合計 1093 種のタンパク質のうち 977 種のタンパク質について、Normalized Spectral Abundance Factor 法に基づく定量的データの取得と階層的クラスタリング解析 (Ward D 法)、多重統計検定解析 (Tukey-Kramer 法) を行い、有意に変動するタンパク質群を含む 7 つのクラスターを提示することに成功した。

3. 7 つのクラスターについて Gene Ontology term 解析を行い、分化の開始後速やかに、細胞壁・液胞関連タンパク質が蓄積し、同時にミトコンドリアや葉緑体の機能が低下、続いて、タンパク質や転写の活性が低下し、さらには、細胞内のタンパク質分解が進行することが示唆された。加えて、分化の過程で一過的に蓄積上昇を見せるクラスターには細胞壁および初期エンドゾーム関連タンパク質が濃縮されていることなどが分かった。

4. 本研究で得られたプロテオームデータを、先行研究で取得済みのトランスクリプトームデータと相関性解析によって比較し、細胞壁修飾 (とくにペクチン関連酵素) やプロテアソームの関連タンパク質の一部が、転写物とは異なる蓄積パターンを示すことを見だし、分化段階に沿ったタンパク質の多段階的な発現・蓄積制御の重要性を示唆した。

以上のように、本論文は、道管細胞分化の過程を初めてプロテオームレベルで詳細に解析することで、道管細胞分化のメカニズムに一端を明らかにしたことから、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。