

## 論文内容の要旨

論文題目 A study of vesicle transport system governing vascular continuity  
(維管束の連続性を制御する小胞輸送機構の研究)

氏名 榎本 悟史

### 序

維管束は適切な場所に連続的に配置されることで、細胞、組織間のネットワークを形成する。維管束パターン形成にはオーキシンが中心的役割を果たすことが知られており、オーキシンの極性輸送の正のフィードバックを想定した運河モデルが広く支持されている。しかしシロイヌナズナ *van* 変異体をはじめとして葉脈の不連続な突然変異体が近年多数報告されているが、このような葉脈の不連続性は運河モデルのみでは説明が困難なことが明らかになりつつある。そこで私は維管束の連続性構築機構の解明を目指し、葉脈が不連続となる *van3* (図 1)、*van4* 変異体を用いた解析を行った。

### 結果と考察

#### 1: VAN3 遺伝子の同定

染色体マッピング、及びシーケンス解析の結果 *van3* 変異体では *At5g13300* に一塩基置換が見いだされた。そこでこの変異が *van3* 変異の原因かどうかを明らかにするために *At5g13300* の上流 1.1 kbp 及び下流 1.1 kbp を含むゲノム断片を用いて相補性検定を行った。その結果、相補が確認され、VAN3 は *At5g13300* であると結論づけた。VAN3 は BAR ドメイン、PH ドメイン、ARF-GAP ドメイン、ankyrin repeat からなる ACAP-type の ARF-GAP をコードしていた。ホモロジー検索をしたところ、シロイヌナズナゲノム中には相同な配列を持つ遺伝子が他に 3 個存在することが予想された。そこでこれらを VALs (VAN3 like proteins) と名付けた (図 2,3)。

#### 2: VAN3 及び VALs の遺伝子発現及び細胞内局在解析

まず VAN3 が機能する組織を調べるために、VAN3 の上流 2kbp を *GUS* につないだ遺伝子を導入した植物体を用いて発現解析を行った。その結果、VAN3 は植物体で広く発現したものの維管束に強い発現が観察された。次に VAN3 が制御する小胞輸送経路を明らかにするために、シロイヌナズナの培養細胞を用いて細胞内局在を解析した。VAN3-VENUS は ER マーカーの HDEL-GFP、ゴルジ体マーカーの GFP-SYP31、エンドソームマーカーの ARA6-GFP とは共局在せず、TGN マーカーの GFP-SYP41 と共局在した (図 4)。また VAN3-VENUS の中には TGN に局在しない集団も観察された (図 5)。エンドソームは機能的に分化した集団からなることから、更に多様なエンドソームマーカーを用いてこの未同定の集団の解析を行った。しかしながら VAN3-VENUS との共局在性は見いだされなかった (図 5)。次に GNOM と VAN3 が同一のオルガネラで機能するかどうかを明らかにするために、*gn* 培養細胞における VAN3-VENUS の局在を解析した。VAN3-VENUS により標識されるオルガネラは、*gn* 培養細胞のエンドソームに特徴的なリング状の異常な形態をとらずに、野生型の形態をとった (図 6)。以上の結果は VAN3 は TGN 及び未知のオルガネラで機能し、GNOM と独立に働くことを示している。

VAN3 が真に機能している状態での細胞内局在を知るために、*van3* 変異体に *pVAN3::VAN3-3xmyc*、*pVAN3::VAN3-VENUS* を導入し、*van3* 変異を相補した植物体を用いて以下の解析を行った。まず *pVAN3::VAN3-3xmyc* 形質転換体を用いて膜の可溶化を行い、VAN3 の膜への局在様式を調べた。すると VAN3 は P100 (ミクロソーム画分)、S100 (細胞質画分) に存在し、また P100 の画分は SDS 以外の試薬では可溶化しなかった。このことは VAN3 は細胞質及びミクロソーム画分に存在するタンパク質であり、ミクロソーム膜で TritonX-100 耐性な構造に存在することを示唆している (図 7)。次に

*pVAN3::VAN3-VENUS* 形質転換体を用いて VAN3 の細胞内局在を解析した。その結果、培養細胞と同様に VAN3 は未知のオルガネラ及び TGN の一部の集団に局在することが確認された(図 18.a)。この VAN3 は TGN の一部の集団に局在するという結果は、TGN が機能的に分化していることを強く示唆している。従って、積み荷の選別は従来 TGN においてなされると考えられてきたが、TGN 以前の過程で積み荷の選別が行われる可能性があることが初めて示された(図 9.a)。また興味深いことに、VAN3-VENUS と GFP-SYP41 は一つの TGN 上で部分的に別れて局在した(図 8.D)。エンドソームにおけるドメイン構造の存在が動物において報告されているが、この結果は植物の TGN においてもドメイン構造が存在することを示唆している(図 9.b)。TGN と未知のオルガネラに加え、VAN3 は根において細胞膜の頂端部及び基部に極性をもって局在した(図 8.b)。これらの局在解析の結果を総合して、VAN3 は極性をもったエキソサイトーシスあるいはエンドサイトーシスを制御することが考えられた(図 9.c)。オーキシン取り込み担体の AUX1 及びオーキシン排出担体の PIN1 の極性をもった局在はエンドサイトーシスにより制御されることが報告されている。そこで *van3* 変異体における AUX1、PIN1 の局在解析を行った。BFA 処理によるエキソサイトーシスの阻害、NAA 処理によるエンドサイトーシスの阻害、無処理のいずれにおいても *van3* 変異体では AUX1、PIN1 が野生型と同様の局在を示した(図 10)。この結果は PIN1、AUX1 の局在には VAN3 は関与しないことを示しており、VAN3 は運河モデルとは異なる機構で葉脈の連続性を制御すると考えられる。

動物における AZAP type の ARF-GAP は ACAP、AGAP、ARAP、ASAP の 4 種から構成される。これら AZAP はそれぞれ異なる小胞輸送の制御に中心的役割を果たしている。一方、植物の AZAP は ACAP のみである。そこで植物の ACAP の機能分担を明らかにする第一歩として、遺伝子発現及び細胞内局在を解析した。VAL1 は托葉、QC 近傍に、VAL2 は植物全体で前形成層に、VAL3 は地上部でほぼ全域、地下部では根端及び維管束に発現が観察された。このことは ACAP が組織レベルで機能分担することを示している。次に VALs の細胞内局在解析を行った。すると VAL1、VAL2 は ARA6 と共局在した。一方 VAL3 は大部分が細胞質に存在した。このことから VAN3 と VALs は異なるオルガネラで機能することが示唆された。以上の解析から、植物における ACAP は組織レベル、細胞レベルで機能分担することが示唆された。

### 3: *van4* 変異体の解析

*van3*、*gn/van7* 変異体の原因遺伝子がともに小胞輸送の制御因子であることから、機能未知のタンパク質をコードする VAN4 も小胞輸送に関与する可能性を考え、細胞生物学的解析を行った。まず *van4* 変異体に *pVAN4::VAN4-3xmyc* を導入し、相補された植物体を用いて細胞内局在を解析した。VAN4-3xmyc と ST-GFP、GFP-SYP41、GN-GFP は共局在しなかったが、ARA6-GFP とは共局在が観察された。また ARF-GEF の阻害剤である BFA の処理を行うと VAN4-3xmyc は細胞内に集合体を形成し、その周囲を ST-GFP に標識されるゴルジ体が囲むことが明らかとなった。BFA 処理によりエンドソームが集合体を形成し、周囲をゴルジ体が囲む現象がこれまでに報告されており、このことより VAN4 のエンドソームにおける局在が支持された。また エンドソームに局在する GN-GFP と VAN4-3xmyc は通常は共局在を示さず、BFA 処理した時のみ部分的に共局在した。このことは VAN4 と GNOM は主に異なるエンドソームで機能することを示唆している(図 11)。VAN4 に対して膜の可溶化を行ったところ、P100 画分の VAN4 は Urea、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  により可溶化した(図 12)。この結果から VAN4 は膜表面性タンパク質であると考えられた。次に VAN4、PIN1 の遺伝学的解析及び AUX1、PIN1 の *van4* 変異体における局在解析を行った。*pin1* 変異体では子葉が融合するのに対し、*van4* 変異体は葉脈が不連続となる表現型を示す。*van4 pin1* 二重変異体では子葉が融合しながら葉脈が不連続となる相加的な表現型を示した。また、実際に *van4* 変異体における PIN1、AUX1 の局在及びそれらの BFA 及び NAA の応答を解析したところ、野生型と同様の応答が観察された(図 10)。以上の結果は VAN4 が PIN1、AUX1 とは独立に機能することを示している。

まとめ

本研究により以下の結果が得られた。

- (1) VAN3 は ACAP-type の ARF-GAP をコードする。
  - (2) VAN3 は TGN の一部の集団、未知のオルガネラ、及び細胞の頂端部及び基部側の細胞膜に局在する。
  - (3) VAN3 は TGN でサブドメインを形成する。
  - (4) VAL1、2 はエンドソームに、VAL3 は細胞質に局在する。
  - (5) VAN4 は GNOM とは異なるエンドソームで機能する。
  - (6) *van3*、*van4* 変異体では PIN1、AUX1 は正常な局在をする。
- 以上の結果から、葉脈形成には GNOM ARF-GEF を介した PIN1 の極性制御による維管束パターンの決定に加え、VAN3 ARF-GAP を介した、極性を持った情報伝達による近距離の維管束連続性構築機構が存在すると考えられる(図 13)。

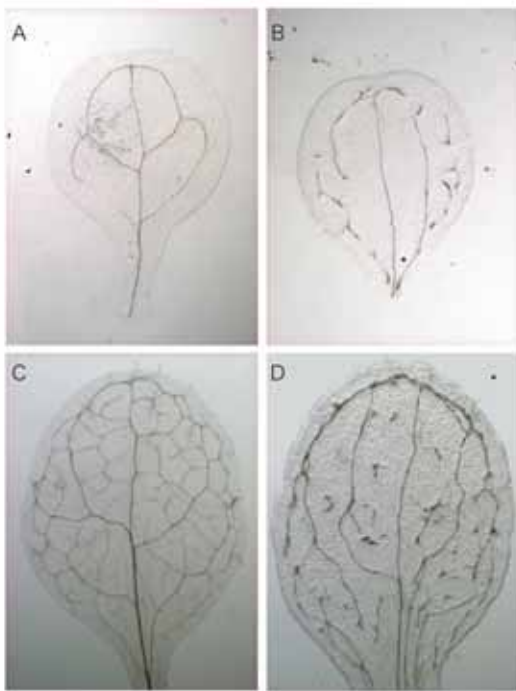


図 1. *van3* 変異体の表現型

(A,B) 播種後 6 日目の子葉における野生型 (A)、及び *van3* 変異体 (B) の葉脈を示す。*van3* 変異体では、葉脈全体の形状は正常にも関わらず、二次脈の顕著な不連続性が観察される。(C,D) 播種後 11 日目の第一葉における野生型 (C)、及び *van3* 変異体の葉脈を示す。*van3* 変異体では、子葉と同様に本葉においても葉脈の不連続性が観察される。

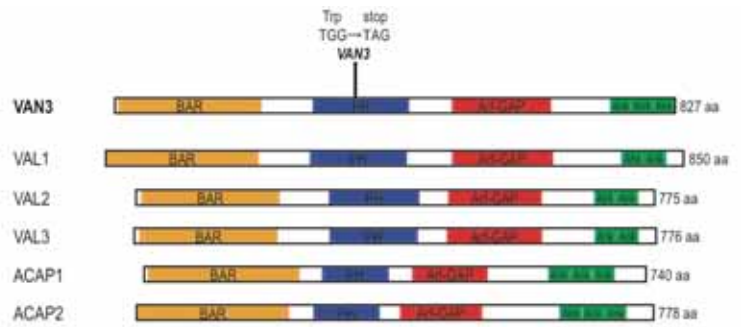


図 2. VAN3 タンパク質、シロイヌナズナにおける VAN3 ホモログ (VALs)、及びヒトにおけるホモログタンパク質のドメイン構造

VAN3 遺伝子はホモあるいはヘテロダイマーを形成し、membrane curvature を認識する BAR ドメイン、脂質との結合能を有する PH ドメイン、ARF-GTPase を活性化化する ARF-GTPase activating protein (ARF-GAP) ドメイン、タンパク質間相互作用能を持つ ankyrin repeat ドメインからなる 827 アミノ酸のタンパク質をコードする。ACAP1,2 はエンドソーム上で、エンドサイトーシスを制御することが報告されている。

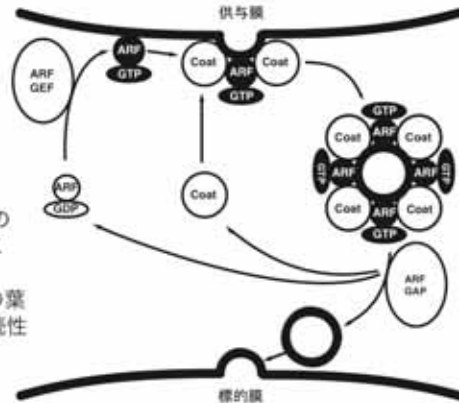


図 3. 低分子量 GTPase ARF の GTPase サイクル

ARF-GTPase は ARF-guanin nucleotide exchange factor (ARF-GEF) により GDP 結合型から GTP 結合型へ変換され、また ARF-GAP により GTP 結合型から GDP 結合型へ変換される。これらの ARF-GEF 及び ARF-GAP の作用による GTPase サイクルにより供与膜からの輸送小胞の出芽が制御されている。

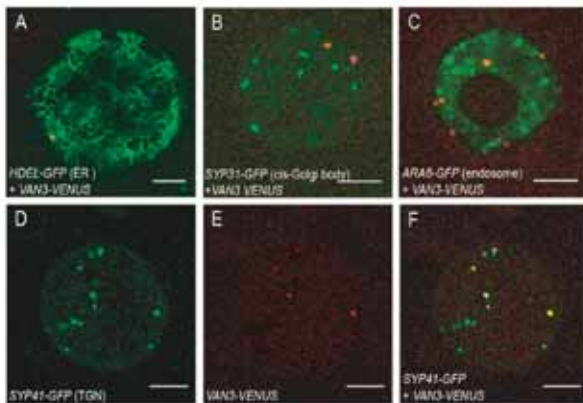


図 4. シロイヌナズナの培養細胞における VAN3 の細胞内局在 (1)

ER マーカーである HDDEL-GFP(A)、ゴルジ体のシス側のマーカーである SYP31-GFP(B)、エンドソームのマーカーである ARA6-GFP(C) とは VAN3-VENUS は共局在しなかった。しかしながら、TGN (trans Golgi network) のマーカーである SYP41-GFP とは共局在した (D,E,F)。オルガネラマーカー GFP を緑色で、VAN3-VENUS を赤色でそれぞれ示している。

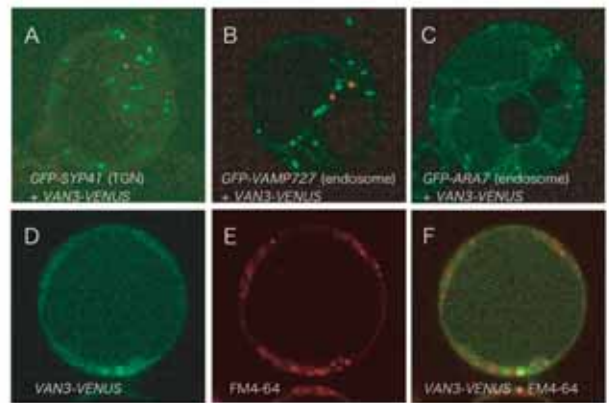


図 5. シロイヌナズナの培養細胞における VAN3 の細胞内局在 (2)

VAN3-VENUS には SYP41-GFP と共局在しない population も存在する (A)。VAN3 VENUS がエンドソームにおいて局在する可能性を様々なエンドソームマーカー (B,C,D,E,F) を用いて解析した。VAMP727-GFP(B)、GFP-ARA7(C) と VAN3-VENUS は共局在しなかった。また、VAN3-VENUS は (D) エンドサイトーシスにより取り込まれる蛍光色素 FM4-64(E) とは共局在しなかった (F)。

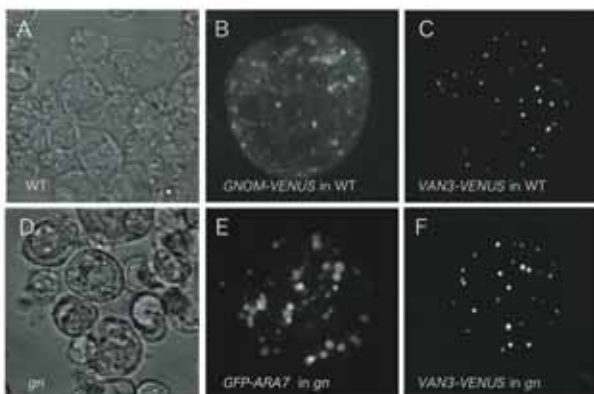


図 6. *gn* 培養細胞における VAN3 の細胞内局在

野生型の培養細胞 (A) における GNOM-VENUS(B)、VAN3-VENUS (C) の三次元構築の結果、GNOM-VENUS と VAN3-VENUS では局在様式が異なることが分かった。また、*gn* 培養細胞 (D) においては、GFP-ARA7 がリング状の異常な膜構造を示す (E) のに対して、VAN3-VENUS は野生型と同様の局在様式を示している (F)。

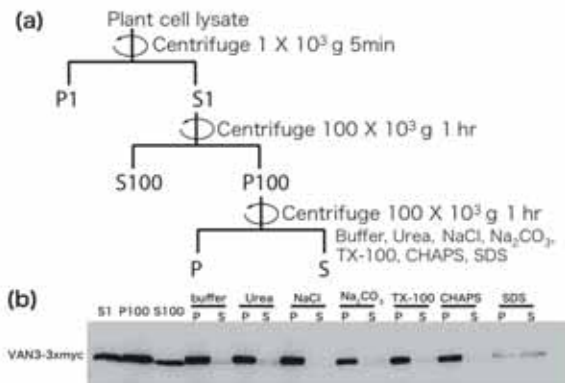
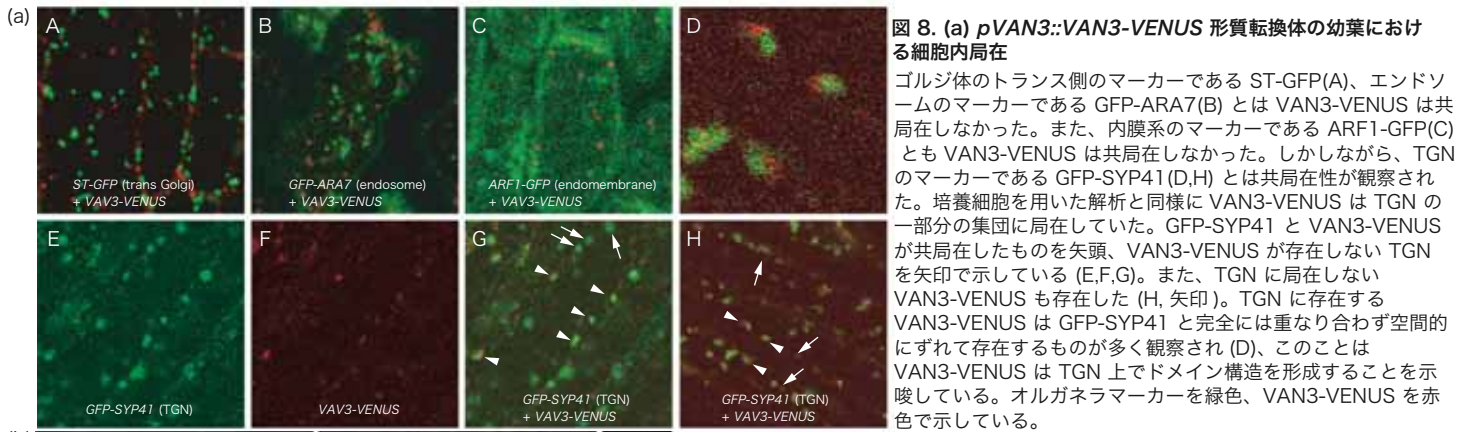


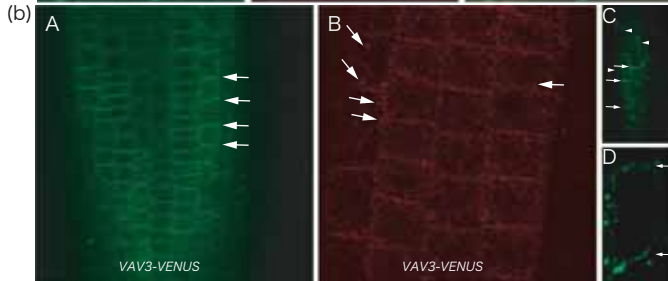
図 7. *pVAN3::VAN3-3xmyc* 形質転換体を用いた膜の可溶性化

(a) 播種後 14 日目の *pVAN3::VAN3-3xmyc* 形質転換体を破碎し、ミクロソーム画分を様々な溶液で可溶性化した実験の流れ (b) VAN3-3xmyc は P100、及び S100 の画分に存在することから、細胞質及びミクロソーム画分の両方に存在することが分かる。また、VAN3-3xmyc は、SDS 以外の如何なる溶液にも可溶性化しなかった。

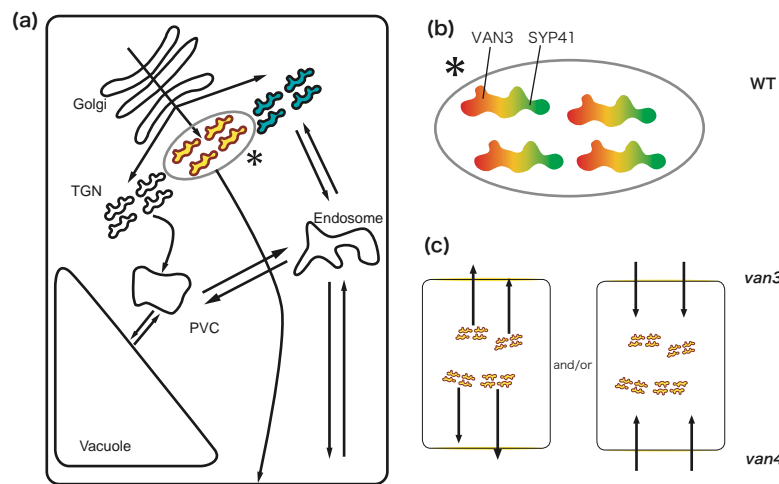




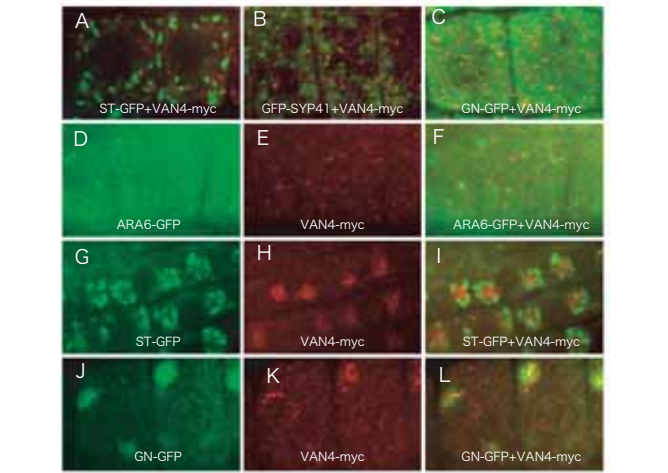
**図 8. (a) pVAN3::VAN3-VENUS 形質転換体の幼葉における細胞内局在**  
 ゴルジ体のトランス側のマーカーである ST-GFP(A)、エンドソームのマーカーである GFP-ARA7(B) とは VAN3-VENUS は共局在しなかった。また、内膜系のマーカーである ARF1-GFP(C) とは VAN3-VENUS は共局在しなかった。しかしながら、TGN のマーカーである GFP-SYP41(D,H) とは共局在性が観察された。培養細胞を用いた解析と同様に VAN3-VENUS は TGN の一部分の集団に局在していた。GFP-SYP41 と VAN3-VENUS が共局在したものを矢頭、VAN3-VENUS が存在しない TGN を矢印で示している (E,F,G)。また、TGN に局在しない VAN3-VENUS も存在した (H, 矢印)。TGN に存在する VAN3-VENUS は GFP-SYP41 と完全に重なり合わず空間的にずれて存在するものが多く観察され (D)、このことは VAN3-VENUS は TGN 上でドメイン構造を形成することを示唆している。オルガネラマーカーを緑色、VAN3-VENUS を赤色で示している。



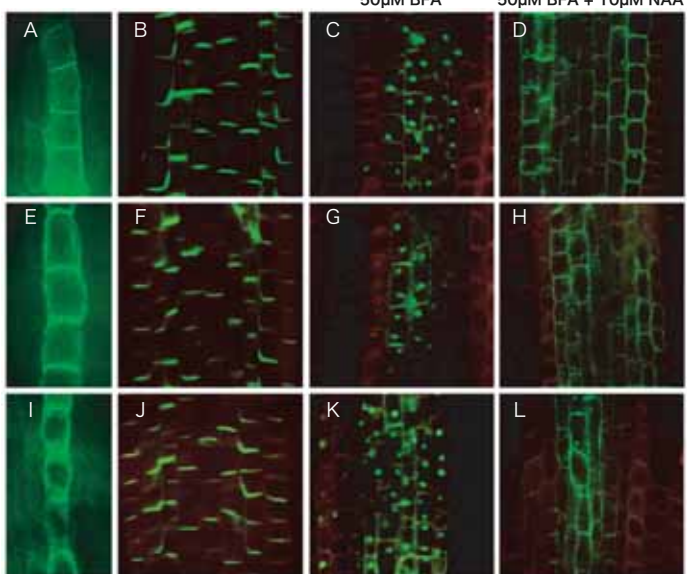
**(b) pVAN3::VAN3-VENUS 形質転換体の根における細胞内局在**  
 播種後 4 日目の植物体の根を観察した。根の分裂組織から伸長領域にかけて VAN3-VENUS が細胞膜に局在することが明らかとなった。表皮細胞付近で VAN3-VENUS は明確な極性をもって細胞膜に局在していた (A, 矢印)。また、皮層細胞において VAN3-VENUS の極性をもって細胞膜への局在以外に、dot 状の構造が観察された (B, 矢印)。維管束細胞においても極性を持った細胞膜への局在 (C, 矢印)、及び dot 状の構造が確認された (C, 矢頭)。pVAN3::VAN3-VENUS 形質転換体を 100mM マンニトール処理により原形質分離を誘導した。原形質分離した細胞の上部および下部の両方に VAN3-VENUS が局在する (D, 矢印) ことから VAN3-VENUS は細胞の頂端部側及び基部側の両方に局在することが明らかとなった。



**図 9. TGN の機能分化及び VAN3 の小胞輸送制御に関するモデル**  
 (a): VAN3 は TGN の一部の集団に局在する。このことは TGN の性質は均一ではなく、機能的に分化していることを示している。これまでに積み荷の選別は TGN においてなされたと考えられてきたが、それ以前のオルガネラ (例えばゴルジ体等) で既に積み荷の選別が行われている可能性が考えられる。  
 (b): (a) の \* の領域を拡大したイメージ図。GFP-SYP41 により標識される TGN の領域と VAN3-VENUS により標識される TGN の領域は部分的にしか重なり合わない。このことから TGN において VAN3 と SYP41 がそれぞれドメイン状の構造をなしている可能性が考えられる。  
 (c): 維管束細胞において TGN に加え、VAN3-VENUS は細胞膜上で極性を持って存在する。従って VAN3 は細胞膜への極性を持ったエキソサイトーシス (左) あるいは細胞膜から細胞内部への極性を持ったエンドサイトーシス (右) を制御すると考えることができる。



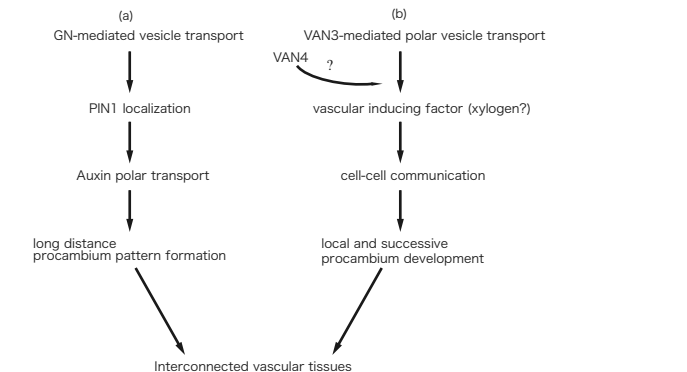
**図 11. pVAN4::VAN4-3xmyc 形質転換体を用いた VAN4 の細胞内局在**  
 播種後 4 日目の植物体の根における抗体染色を行った。ゴルジ体のマーカーである ST-GFP(A)、TGN のマーカーである GFP-SYP41(B) とは VAN4-myc は共局在しなかった。しかしながら、エンドソームのマーカーである ARA6-GFP とは共局在が観察された (D,E,F)。また BFA 処理により、より詳細な局在解析を行ったところ、ST-GFP とは共局在が観察されなかった (G,H,I) が、GN-GFP とは部分的な共局在性が観察された (C,J,K,L)。以上の結果から VAN4 はエンドソームに局在すると考えられる。



**図 10. van3 及び van4 突然変異体における AUX1, PIN1 の細胞内局在**  
 オーキシンプローを制御する AUX1, PIN1 の細胞内局在を調べた。(A,E,I) は AUX1 の局在、(B,F,J) は PIN1 の局在、(C,G,K) は 50µM BFA 90min 処理した際の PIN1 の局在、(D,H,L) は 50µM BFA + 10µM NAA 90min 処理した際の PIN1 の局在を示す。また、(A,B,C,D) は WT、(E,F,G,H) は van3 変異体、(I,J,K,L) は van4 変異体を示している。いずれも播種後 4 日目の植物体の根において観察した。van3 及び van4 変異体において AUX1, PIN1 の局在位置に関する異常は検出されなかった。

S1	P100	S100	buffer		Urea		NaCl		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		TX-100		CHAPS	
			P	S	P	S	P	S	P	S	P	S		
[Western blot image showing bands for VAN4-3xmyc solubility]														

**図 12. pVAN4::VAN4-3xmyc 形質転換体を用いた膜の可溶性実験**  
 図 11 と同様の実験を行った。Urea, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> により VAN4-3xmyc は可溶性化したことから、VAN4 は膜表面性のタンパク質であることが分かる。



**図 13. 葉脈形成に関するモデル図**  
 葉脈形成には (a) GNOM ARF-GEF を介した、オーキシンの極性輸送という長距離シグナル伝達により、葉脈全体のパターンが決定される機構及び (b) VAN3 ARF-GAP を介した、維管束分化誘導因子の局在化による近距離シグナル伝達により、維管束の連続性が構築される機構が存在すると考えられる。VAN4 はオーキシンの極性輸送に関与しないことから、(b) の機構に関与する可能性が考えられる。