

論文内容の要旨

Studies on Two Vps9 Domain-Containing Proteins, Activators for Rab5 GTPases

in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナ Rab5 GTPases の Vps9 ドメインを有する活性化制御因子の研究)

郷 達明

<序論>

植物の細胞膜タンパク質や細胞壁の構成成分は、エンドサイトーシス経路によってその局在や量が制御されている。このエンドサイトーシス経路を介した物質輸送は、細胞極性の確立や維持、細胞板の形成、植物ホルモンであるオーキシンの極性輸送、環境応答などの植物の多様な機能に深く関与することが近年明らかになりつつある。しかしながら、植物のエンドサイトーシス経路の分子機構には未解明な点が多く、どのように植物の高次機能に関わっているかはほとんど明らかになっていない。

低分子量 GTPase である Rab ファミリーは、細胞内のオルガネラに特異的に局在し、不活性型である GDP 型と活性型である GTP 型をサイクルすることにより、小胞の繫留、オルガネラの動態、膜の脂質組成、シグナル伝達などを制御する分子スイッチとして機能している。シロイヌナズナには、57 の Rab GTPase が存在し、これらは動物や酵母との相同性から 8 つのサブファミリーに分類することができる。このうち Rab5, Rab7, Rab11, Rab18 の 4 つのサブファミリーは植物のエンドサイトーシス経路に関わると推測されており、特にエンドソームに局在する Rab5 メンバーは、エンドサイトーシスの制御で中心的な役割を担っていると考えられる。シロイヌナズナには、ARA7, RHA1, ARA6 の 3 つの Rab5 メンバーが存在する。このうち ARA7 と RHA1 は、動物の Rab5 のオルソログであると考えられるが、ARA6 はその構造、脂質修飾、活性制御などが異なる植物に特異的な Rab5 メンバーである。

Rab5 の機能にとって、GDP 型から GTP 型への活性化が非常に重要であり、この過程は GDP と GTP の交換反応を促進するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)によって厳密に制御されている。そこで、本研究では、シロイヌナズナ Rab5 メンバーの GEF を単離し、生化学的な解析を行うとともに、その変異体の解析により、Rab5 が関与する植物のエンドサイトーシス経路の分子機構と機能の解明を目指した。

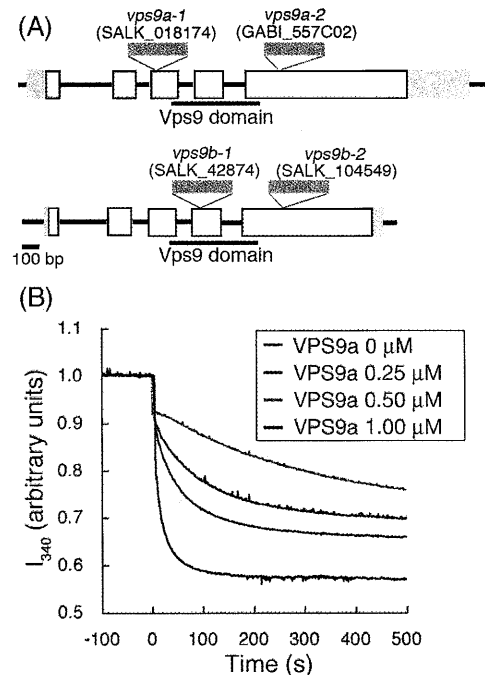


Fig. 1 VPS9a と VPS9b の遺伝子構造 (A) と VPS9a の ARA7 に対する GEF 活性(B)

<結果と考察>

第1章 VPS9a はシロイヌナズナの Rab5 メンバーすべてを制御する GEF であり、植物の発生に重要である

これまでに動物や酵母から単離された Rab5 GEF には、Vps9 ドメインが保存されており、この Vps9 ドメイン単独で Rab5 に対する GEF 活性を示すことが知られている。そこで、シロイヌナズナゲノム中において Vps9 ドメインを有するタンパク質をコードする遺伝子を検索したところ、VPS9a, VPS9b の2つの遺伝子が見出された (Fig. 1A)。第1章では VPS9a について解析を行った。

VPS9a は、N 末側に Vps9 ドメインを持つ約 62 kDa のタンパク質をコードしていた。VPS9a とシロイヌナズナの Rab GTPase との相互作用を調べたところ、VPS9a は3つの Rab5 メンバー (ARA6, ARA7, RHA1) の GDP 型と nucleotide free 型に対して、特異的に相互作用することが明らかとなった。

次に、Rab GTPase が GDP 型から GTP 型へと構造変換するのに伴って、トリプトファン自家蛍光が変化することを指標とし、VPS9a の GEF 活性の測定を行った (Fig. 1B)。その結果、VPS9a は、ARA7, RHA1, ARA6 のすべての Rab5 メンバーに対して GEF 活性を有することが明らかとなった。このことから、ARA7/RHA1 と ARA6 は、その構造的差異にかかわらず、同一の GEF により制御されていることが明らかとなった。一方、Rab5 以外のサブファミリーに対して、VPS9a は GEF 活性を示さなかったことから、VPS9a は Rab5 メンバー特異的な GEF であることが結論された。

VPS9a が制御するエンドサイトーシス経路の機能を明らかにするために、VPS9a 遺伝子のそれぞれ異なる位置に T-DNA が挿入された2つの *vps9a* 変異体 (*vps9a-1*, *vps9a-2*) の解析を行った (Fig. 1A)。*vps9a-1* 変異体では、Vps9 ドメインに T-DNA が挿入され、Rab5 GEF の機能を完全に失っていると推測される。この *vps9a-1* 変異体のホモ個体は、魚雷型胚で胚発生が停止し、胚致死となった (Fig. 2)。胚の微細構造を観察すると、胚発生の早い時期から、細胞分裂の方向や細胞板形成に異常がみられ、細胞の肥大や細胞膜と近接する多胞化した異常なオルガネラが多数観察された。Rab5 メンバーの活性化が細胞板の形成や細胞膜上の多胞化したオルガネラの形成に重要であることが示唆された。魚雷型胚ではゴルジ体由来と思われる小胞やオートファゴソーム様構造の蓄積も観察されたことから、エンドサイトーシス経路の異常が、ゴルジ体からのタンパク質の輸送や胚の栄養状態などにも影響を及ぼしていることが示唆された。

vps9a-1 変異体の胚における GFP-ARA7 と ARA6-GFP の局在を観察したところ、野生型ではともにエンドソームに局在するのに対し、*vps9a-1* 変異体では細胞質に拡散していた (Fig. 3A-D)。GTP 固定型の Rab5 はエンドソームに局在し、GDP 固定型の Rab5 は細胞質へと拡散することが報告されていることから、*vps9a-1* 変異体では ARA7, ARA6 ともに活性化されず、GDP 型の状態で存在していることが示唆された。このことから、VPS9a が *in vivo* でも ARA7, RHA1, ARA6 のすべてを制御していることが示された。

続いて、VPS9a が細胞極性の維持において果たす役割の検証を行った。オーキシン排出キャリアである PIN1 は細胞膜に極性をもって局在する膜タンパク質であり、Arf GEF である GNOM に依存して ARA7/RHA1 が局在するエンドソームと細胞膜との間をリサイクリングしている。この PIN1 の局在を観察したところ、野生型では極性をもって細胞膜に局在したのに対し、*vps9a-1* 変異

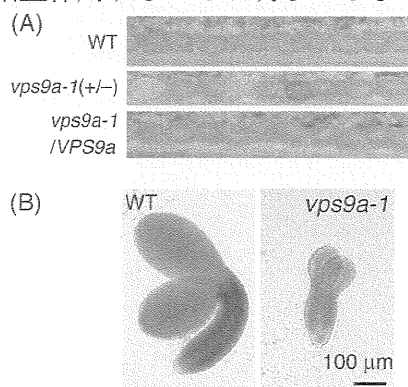


Fig. 2 *vps9a-1* 変異体は魚雷型胚で胚発生が停止する

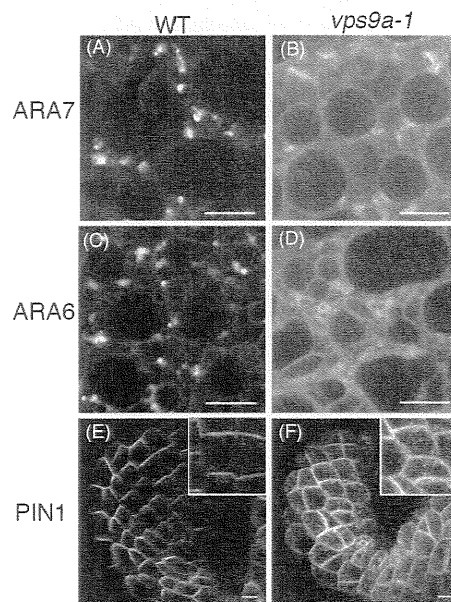


Fig. 3 *vps9a-1* 変異体における GFP-ARA7, ARA6-GFP, PIN1-GFP の局在
Scale bar = 5 μm

体では、極性を失い細胞膜全体に局在していた(Fig. 3E, F). また、細胞内のエンドソームにも局在が観察された。このことから、PIN1 の極性をもった局在の維持には、VPS9a による Rab5 メンバーの活性化が重要であることが示唆された。

一方、Vps9 ドメインよりも C 末側に T-DNA が挿入された *vps9a-2* 変異体では、胚発生は終了するが、発芽後に根の形態異常と伸長阻害が見られた (Fig. 4)。この *vps9a-2* 変異体では、約 30 kDa の変異タンパク質が少量発現しており、この変異タンパク質によって Rab5 メンバーが不完全に制御されるために、*vps9a-2* の表現型が現れると考えられた。そこで、アミノ酸変異を導入して GTP 型に固定した ARA7 と ARA6 をそれぞれ *vps9a-2* 変異体に過剰発現して表現型への影響を観察したところ、ARA7 の GTP 固定型を発現させた時のみ、根の伸長阻害が抑圧され、野生型と同等の伸長を示した。このことから、*vps9a-2* 変異体の根の伸長阻害は、主に ARA7/RHA1 が GTP 型へと活性化されないことに起因することが示唆された。一方、ARA6 の GTP 型の過剰発現では *vps9a-2* を抑圧できず、逆に、ARA6 の欠損変異体によって抑圧された。このことから、植物特異的な ARA6 は、ARA7/RHA1 とは拮抗的な機能をもつことが示唆された。

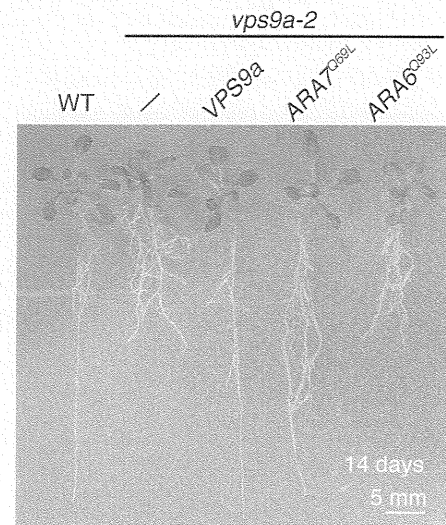


Fig. 4 *vps9a-2* 変異体の表現型とそれに対する GTP 固定型 Rab5 メンバーの過剰発現の影響

第 2 章 VPS9a と VPS9b による Rab5 メンバーの活性化は花粉の機能に重要である

VPS9b はアミノ酸配列レベルで VPS9a と非常によく似ているにもかかわらず、VPS9a に比べて Rab5 に対する GEF 活性は弱かった。また、VPS9a は植物体全体で発現しているのに対して、VPS9b は花粉と胚嚢特異的に発現していた(Fig. 5)。*vps9b* 単独変異体は顕著な表現型を示さなかったため、*vps9a-1(+/-)vps9b-1(-/-)*を作成し、そのさやを開いて観察した。その結果、褐色に変色し胚致死となる種子の割合が、*vps9a-1(+/-)*では約 25%観察されたが、*vps9a-1(+/-)vps9b-1(-/-)*では、約 12%しか観察されなかった。このことは、*vps9a-1* と *vps9b-1* の両方の変異をもつ花粉では、受精する確率が *vps9b-1* のみの変異をもつ花粉よりも低下していることが示唆している。以上の結果より、VPS9a と VPS9b の 2 つの Rab5 GEF により制御される Rab5 メンバーの活性化が花粉の機能に重要であることが示唆された。

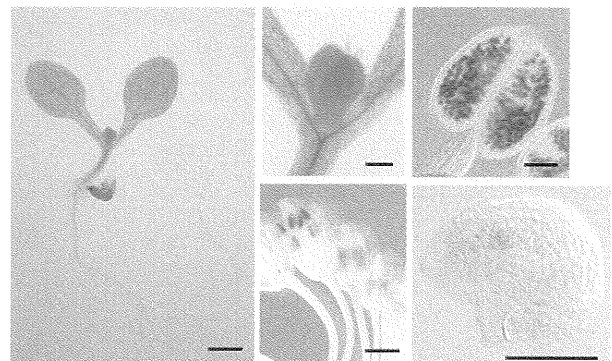


Fig. 5 VPS9b の発現パターン

<まとめ>

VPS9a と VPS9b は、シロイヌナズナのすべての Rab5 メンバーを制御する GEF であり、Rab5 メンバーの活性制御を通して、植物の発生や分化に関与していることが示唆された。また、ARA7/RHA1 と植物特異的な ARA6 の間には、明らかな構造と機能の分化が存在しているにもかかわらず、それらが同一の活性化因子の制御を受けていることは非常に興味深い。さらに、動物では、複数の Rab5 GEF が機能分担してエンドサイトーシス経路を制御するのに対して、植物では 1 種類の Rab5 GEF が 2 つのタイプの Rab5 を制御するという異なる仕組みによってエンドサイトーシス経路が制御されていることが明らかになった。