

論文内容の要旨

論文題目 Studies on Effector Molecules of Plant-unique RAB5, ARA6 in *Arabidopsis thaliana*
(植物固有型 RAB5, ARA6 のエフェクターを介した機能発現機構の研究)

氏名 伊藤 瑛海

<序論>

真核生物細胞の中は、生体膜によりオルガネラと呼ばれるコンパートメントに区画化され、それぞれが特有の性質をもつ。オルガネラ間では、メンブレントラフィックにより、活発な物質・情報交換が行われており、これにより、さまざまな生命現象が制御されている。低分子量 GTPase である RAB は、メンブレントラフィックにおいて膜融合の過程を制御する。また、RAB は、活性型と不活性型をサイクルする分子スイッチとして機能し、活性型時に、エフェクターと呼ばれる分子群と相互作用することにより、膜融合のみならず、多様な下流現象を制御することが明らかになっている(図1A)。なかでも RAB5 は、エンドサイトーシス経路で機能することが知られている。RAB5 のホモログは、植物を含む真核生物に広く保存されているが、陸上植物は保存型 RAB5 に加え、ユニークな一時構造をもつ RAB5 ホモログを有するという特徴をもつ(図1B)。モデル植物であるシロイヌナズナには、保存型 RAB5 である ARA7・RHA1 と、植物固有型である ARA6 が存在し、最近の研究から、この二種類の RAB5 が、異なる輸送経路を制御することにより、花成や細胞分化、根の形態形成、非生物学的ストレスに対する応答などの現象の制御に関わることが分かってきた。このような RAB5 の機能は、さまざまなエフェクターとの相互作用を介して発現していると考えられるが、植物には、これまで動物で報告されている RAB5 エフェクターのホモログは見いだされず、その仕組みは全く明らかになっていない。そこで、本研究では、シロイヌナズナの植物固有型 RAB5 である ARA6 に注目し、エフェクターの同定と機能解析を行った。修士課程にお

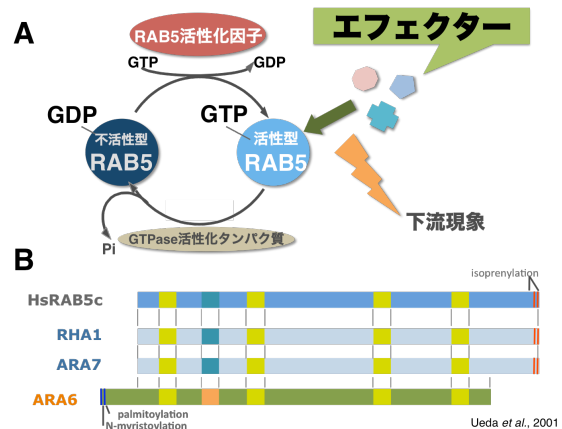


図1:(A) RAB GTPase サイクル. (B) シロイヌナズナに存在する三つの RAB5 メンバーの一次構造

いて、yeast two-hybrid スクリーニングにより、活性型 ARA6 と相互作用する 7 つのエフェクター候補を獲得し、plant-unique RAB5 effectors (PUF1~7) と名付けた。博士課程では、培養細胞を用いた一過的発現系において、ARA6 エンドソームに局在することが明らかになった PUF2, PUF3, PUF7 について機能解析を行った。

<結果と考察>

第一章 PUF2 は VPS9a の制御を介して、二種類の RAB5 が制御する輸送経路を統御する

PUF2 が、ARA6 の機能発現機構に関わる分子かどうかを調べるため、*puf2* 変異体背景で活性型 ARA6 を過剰発現する形質転換体を作成し、PUF2 の影響を見た。その結果、*puf2* 背景では、活性型 ARA6 の過剰発現による塩ストレス耐性獲得効果が見られなかった (図 2)。このことから、PUF2 は ARA6 の機能発現を制御する分子であることが分かった。

PUF2 の細胞内での機能を調べるため、*pPUF2::PUF2-GFP* を形質転換した植物個体を作成し、PUF2-GFP の局在解析を行った。結果、PUF2 は、brefeldin A と wortmannin に感受性を示すオルガネラに局在した。次に、各種オルガネラマーカールとの共局在性を調べたところ、PUF2-GFP は、ARA6-mRFP や mRFP-ARA7 が局在するエンドソームに局在した。ARA6 と ARA7 は一部オーバーラップしながらも異なるエンドソーム集団に局在することから、PUF2-GFP, ARA6-VENUS, mRFP-ARA7 が発現する形質転換体を作成し、局在を比較したところ、PUF2 は ARA6 に比べ、ARA7 とよりよく共局在した (図 3)。また、PUF2-GFP は、*ara6* 変異体や、ARA6 と保存型 RAB5 の共通の活性化因子である VPS9a の変異体(*vps9a-2*)の細胞中でも、エンドソームに局在した。このことから、PUF2 は ARA6 や VPS9a 非依存的にエンドソームに局在できることが分かった。

次に、*puf2* 変異体中での ARA6 と ARA7 の局在を調べた。その結果、ARA6-GFP と mRFP-ARA7 の局在パターンに変化はなかったが、*puf2* 変異体中では、wortmannin 処理により生じる空胞化したエンドソームのサイズが減少した。また、*puf2* 変異体中では、VPS9a エンドソームの数が減少する様子が見られた。以上の結果から、PUF2 がエンドソーム同士の融合、ならびに、VPS9a のエンドソームへのリクルートに寄与する可能性が示された。

続いて、*puf2* 変異体を用いた遺伝学的解析を行った。*puf2* や *ara6puf2* は単独では目立った表現型を示さなかったが、*rha1puf2* は矮化の表現型を示した (図 4)。また、液胞輸送経路で膜融合を制御する SNARE タンパク質である VAM3/SYP22 の変異体 (*vam3-1/syp22-1*)や、*vps9a-2* との二重変異体を作成したところ、*puf2* 変異はこれらの表現型を昂進した。これと同様の作用が保存型 RAB5 の変異でも見られることから、PUF2 は *vam3-1/syp22-1*, *vps9a-2* に対して保存型 RAB5 と同じ遺伝学的相互作用を示すことが分かった。そこで、PUF2 が保存型 RAB5 の制御する液胞輸送経路に関与すると考え、種子貯蔵タンパク質のプロセッシングを調べたところ、*puf2vam3*,



図 2 : *puf2* 背景での活性型 ARA6 の過剰発現の影響。Q93L; GTP 固定型

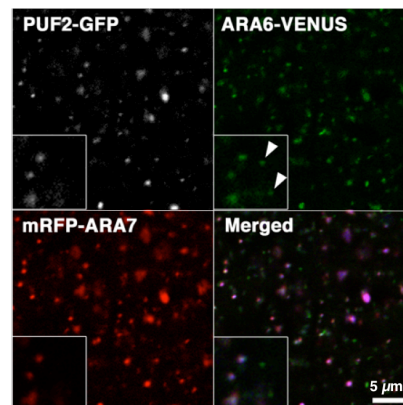


図 3 : PUF2, ARA6, ARA7 の細胞内局在

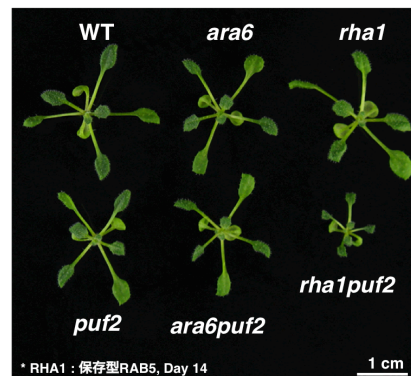


図 4 : *puf2*, および *ara6puf2*, *rha1puf2* の表現型

puf2^{+/+}vps9a-2 の種子で 12S グロブリンの前駆体の蓄積が見られた。また、液胞に輸送される積み荷の一つである SP-GFP-CT24 の局在を観察したところ、*puf2vam3*, *puf2^{+/+}vps9a-2* の胚において、GFP-CT24 が細胞外に誤輸送される様子が観察された。これらの結果から、PUF2 が液胞輸送経路の制御に関与することが明らかになった。また、*puf2* と *vps9a-2* の間には、強い遺伝学的相関が見られた。*puf2^{+/+}vps9a-2* は実生致死となり、*puf2vps9a-2* は、異常な形態の胚を形成し、胚致死となった。さらに、PUF2 の過剰発現は *vps9a-2* でみられる主根伸長の異常などの表現型を抑圧した。このことから、PUF2 が VPS9a の機能を制御する可能性が示された。

PUF2 の関わる分子機構について理解を深めるため、PUF2 の一時構造を調べたところ、PUF2 は、4 つの coiled-coil 領域を持つ分子であることがわかった。そこで、エンドソームに局在する他分子との相互作用を調べたところ、PUF2 は、PUF3 と VPS9a と相互作用することが分かった。これらの結果から、PUF2 が二種類の RAB5 が制御する輸送経路を統御する因子であると考え、その分子機構について図 5 に示すモデルを提唱した。

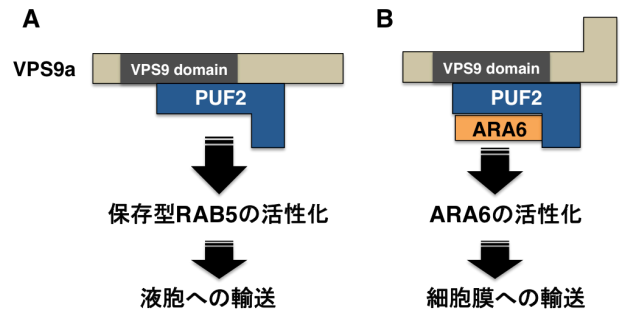


図 5 : PUF2 による輸送経路振り分けモデル. PUF2 は二種類の RAB5 が制御する輸送経路を統御する. (A) PUF2-VPS9a 複合体が保存型 RAB5 を優先的に活性化することにより、液胞への輸送が実行される. (B) ARA6-PUF2-VPS9a 複合体は ARA6 を優先的に活性化する. これにより細胞膜への輸送が実行される.

第二章 PUF3 は核とエンドソームをシャトルするシグナル分子として機能する

PUF3 の一時構造を調べたところ、coiled-coil 領域と C 末端側に pleckstrin-homology ドメインを持つことが明らかになった。そこで、ファットウエスタン法により PUF3 の脂質親和性を調べたところ、ホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) に親和性を持つことが明らかになった。PUF3 は植物個体の細胞内において、ARA6 エンドソームだけでなく、核と細胞質にも局在する様子が観察された。さらに、活性型 ARA6 を過剰発現させた形質転換体中での PUF3 の局在を調べたところ、PUF3 が局在するエンドソームの数と、PUF3 のエンドソーム局在量が増加し、PUF3 の核局在量が減少する様子が観察された。一方、不活性型 ARA6 を過剰発現させた形質転換体中では、PUF3 の細胞質局在量とエンドソーム局在量が共に減少し、核局在量が増加した。また、PUF3 の coiled-coil 領域には転写活性可能があった。これらの結果から、PUF3 は ARA6 が活性型のときにはエンドソームにとどめられており、不活性型になるとエンドソームから解離して核に移行し、下流遺伝子の転写調節を行うシグナル分子である可能性が示された (図 6)。

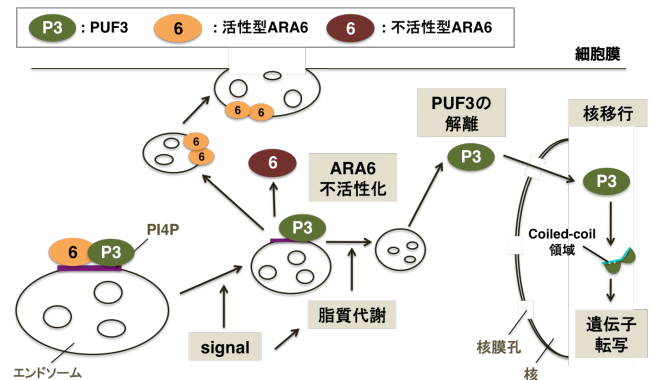


図 6 : PUF3 によるエンドソームシグナリングモデル. PUF3 は活性型 ARA6 と PI4P 依存的にエンドソームに局在する. ARA6 の不活性化や脂質代謝により、PUF3 は安定してエンドソーム局在できなくなり、エンドソームから解離し、核へと移行する. 核へ移行した PUF3 は coiled-coil 領域が露出し、下流遺伝子の転写調節を行う。

第三章 ライブイメージングによるクラスリンの動態解析

PUF7 はクラスリン重鎖をコードしており、活性型 ARA6 と相互作用を示したことから、クラスリンが ARA6 の機能発現に関わる可能性が示唆された。クラスリン被服小胞を介した輸送は、植物細胞において最もメジャーな輸送手段であるが、その細胞内分布や挙動について明らかになっていない。

そこで、本研究では、クラスリン重鎖と複合体を形成するクラスリン軽鎖を GFP で可視化し、ライブイメージングによるクラスリンの動態解析を行った。pCLC::CLC-GFP 観察の結果、クラスリンは細胞膜、細胞板、細胞内のドット上のオルガネラに局在した。細胞板上でのクラスリンとダイナミンの局在を比較したところ、これらは一部重なりながらも異なるドメインに存在した。また、細胞内のクラスリンとオルガネラマーカ―の局在の比較を行った。シグナル間の重心間距離を半自動的に測定するマクロを構築し、クラスリンの細胞内局在を評価したところ、クラスリンはトランスゴルジネットワークに最も良く局在し、ARA6 エンドソームの近傍にも局在することが明らかになった。また、細胞膜上のクラスリンは brefeldin A や wortmannin に対して感受性を示した。

<まとめ>

本研究により、植物固有型 RAB5 のエフェクターが初めて同定され、その機能が明らかになった。得られた結果をふまえ、本研究では、**図 7** に示すエフェクターによる ARA6 の機能発現機構モデルを提唱した。

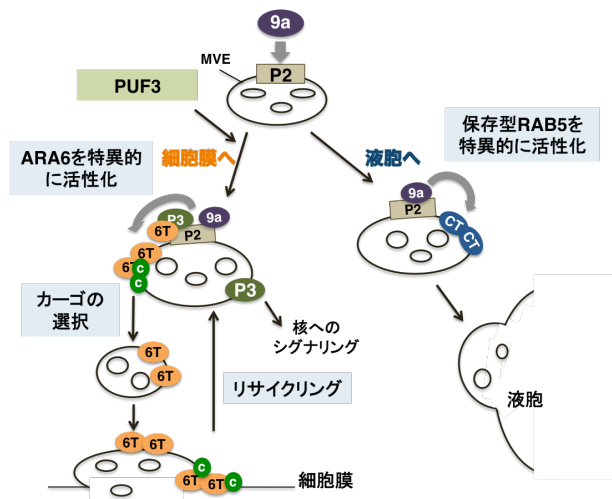
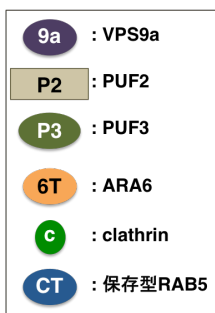


図 7 : エフェクターによる ARA6 の機能発現モデル。PUF2 は VPS9a をエンドソームにリクルートし、PUF2-VPS9a 複合体は、保存型 RAB5 を特異的に活性化することにより、液胞への輸送が実行される。一方、ARA6-PUF2-VPS9a 複合体は、ARA6 を優先的に活性化し、細胞膜への輸送が実行される。PUF3 は、ARA6 と PUF2 の両方と相互作用することから、ARA6 を PUF2-VPS9a 複合体にリクルートする役割を持つ。また、PUF3 は ARA6 エンドソームから核への情報伝達を行う。クラスリンは ARA6 エンドソーム上で、細胞膜に輸送するカーゴの濃縮や、細胞膜から ARA6 が解離する過程、または、リサイクリングする過程で機能する。