

## 論文の内容の要旨

### 論文題目: **Study on RABA1 GTPases in *Arabidopsis thaliana***

### (シロイヌナズナにおける細胞内輸送制御因子 RABA1 の研究)

氏名 浅岡 凜

#### 〈序論〉

細胞の中にはさまざまな細胞小器官が存在し、それらが厳密に機能分化し、連携することにより複雑な生命現象を実現している。細胞小器官間の物質輸送は、真核細胞生物に普遍的に備わる膜交通という機構により行なわれている。この機構は、細胞の恒常性の維持に重要な役割をはたすだけでなく、必要に応じてタンパク質や脂質の局在を機敏に調節することで多細胞生物の形態形成や環境応答などのさまざまな現象にも関与している。膜交通における制御因子の一つである RAB は、低分子量の GTPase であり、活性型である GTP 結合型と不活性型である GDP 結合型をサイクルすることにより、分子スイッチとして機能する。RAB は、物質を積んだ輸送小胞が正しく標的膜に融合するための制御因子として働き、積み荷が誤った場所へ輸送されることを防いでいると考えられている。

RAB11 グループは、真核細胞生物に広く保存された RAB GTPase の一群であり、動物や酵母では、RAB11 グループのメンバーが 1~3 個存在する。これに対し、植物の RAB11 メンバーは非常に多様化し、巨大なグループを形成しており、シロイヌナズナのゲノム中にコードされる 57 個の RAB のうち、半数近くに及ぶ 26 メンバーが RAB11 グループに分類される。このことは、植物独自の膜交通システムのありかたに RAB11 が寄与している可能性を示している。RAB11 グループは、さらに RABA1 から RABA6 の 6 つのサブグループに分けられ、このうち RABA2, RABA3 グループは細胞板の形成に、RABA4 グループの RABA4b, RABA4d は根毛の伸長と花粉管の伸長にそれぞれ関与していることが明らかになっている。しかし、機能の分かっていないメンバーがまだまだ多く残っており、多様化した植物 RAB11 の包括的理解には

遠く及ばないのが現状である。そこで私は、RABA1 メンバーの詳細な細胞内局在解析を行なうことで、RABA1 メンバーがポストゴルジ網の中のどのような輸送経路を制御しているかを調べるとともに、機能欠失変異体・優勢阻害型変異体の解析から、RABA1 メンバーの制御する輸送経路がどのような高次生命現象に関与しているのかを明らかにすることを目的として研究を行なった。また、細胞内局在解析の解析を通して観察された RABA1b コンパートメントのダイナミックな運動に関して、その動きのメカニズムを解析した。

〈結果と考察〉

◆RABA1 メンバーはトランスゴルジ網 (TGN) と細胞膜の間の輸送を制御する

RABA1 サブグループは RABA1a から RABA1i の 9 つのメンバーから成る。このうち、根端分裂組織で主に発現する 3 つのメンバーである RABA1a, RABA1b, RABA1c にそれぞれ GFP, Venus, または mRFP を融合したタンパク質をネイティブプロモーター制御下で発現する形質転換体を作成し、それぞれの二重染色を行うことで、3 つのメンバーが共局在することを明らかにした。そこで GFP-RABA1b とポストゴルジ網のさまざまなオルガネラマーカースとの局在を比較したところ、GFP-RABA1b は mRFP-SYP43 および VHA-a1-mRFP でラベルされる TGN

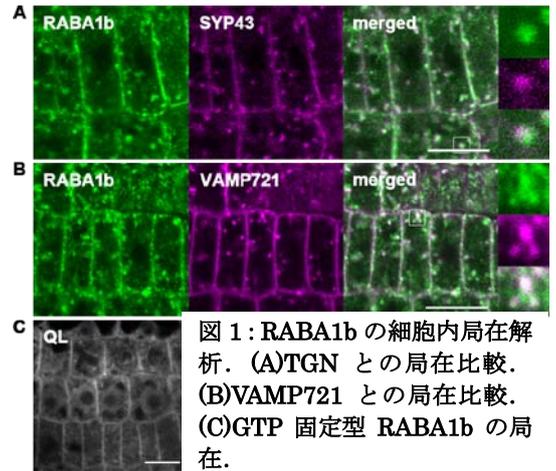


図 1: RABA1b の細胞内局在解析. (A)TGN との局在比較. (B)VAMP721 との局在比較. (C)GTP 固定型 RABA1b の局在.

に近接した粒状のコンパートメントと、活発に動く小胞様の構造に局在した(図 1A). また、GFP-RABA1b は分泌経路で機能することが知られている R-SNARE である VAMP721/722 と共局在した(図 1B). さらに、RABA1b の GTP 固定型は制御する輸送の標的膜に蓄積することが予想されるが、根端細胞においては細胞膜に局在した(図 1C). 一連の結果から、RABA1b が TGN から細胞膜へ向けての輸送を制御することが示唆された。

◆RABA1b の局在する小胞はアクチン依存的に運動する

斜照射顕微鏡での観察により、GFP-RABA1b の局在する細かい小胞は列をなして非常に速く細胞内を運動することが明らかになった。マーカータンパク質との局在比較と阻害剤実験により、この列がアクチン繊維に沿っていること、RABA1b コンパートメントの運動にはアクチン繊維の重合が必要であることを示した。このことから、RABA1b コンパートメントの速い運動は、アクチン繊維に依存していることが示された。

◆RABA1 メンバーは塩ストレス耐性に必要である

*raba1a raba1b raba1c raba1d* 四重変異体を用いた塩ストレス試験の結果から、RABA1a, RABA1b, RABA1c, RABA1d の 4 メンバーが塩ストレス耐性に必要であることが示された。また、この表現型がいずれか 1 メンバーの発現により相補されることから、4 メンバーが塩ストレス耐性に対し

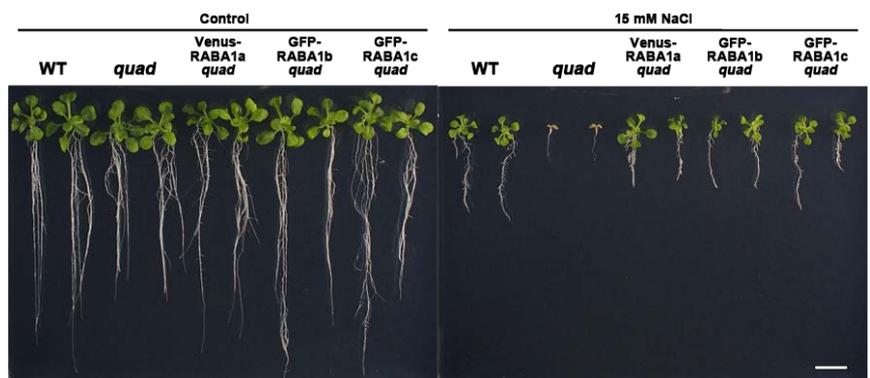


図 2: 四重変異体の表現型解析. スケールバー, 1 cm.

冗長的に機能していることがわかった(図 2). さらに, ソルビトールを用いた浸透圧ストレス試験では, 野生型と変異体で生育に差が見られなかったことから, 四重変異体の生育阻害は高浸透圧ではなく塩そのものによることが明らかになった.

#### ◆*raba1* 変異体の塩ストレス耐性低下はナトリウム取り込み・排出の異常が原因ではない

RABA1メンバーがどのようなメカニズムで塩ストレスに関与しているのかを知る手がかりとして, NaCl を添加した培地条件において四重変異体がナトリウムを異常蓄積しているかどうかを誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用いて調べた. その結果, 四重変異体のナトリウム蓄積量は野生型と同程度だった(図 3). このことから, 変異体の塩ストレス条件下における生育阻害は, ナトリウムの取り込みおよび排出の異常によるものではないことが示唆された.

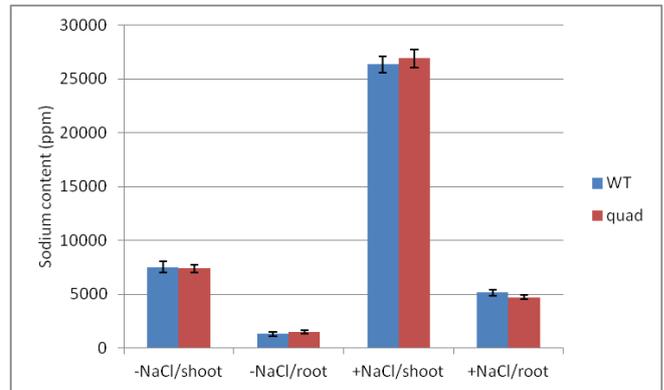


図 3: 野生型・四重変異体におけるナトリウム蓄積量の比較.

〈まとめ〉

本研究により, RABA1メンバーが TGN から細胞膜への輸送に関わっていることが示唆され, また, コンパートメントのダイナミックな運動性がアクチン依存的であることが示された. さらに, 植物 RAB11 のストレス耐性への関与が初めて示された. 今後は, 相互作用因子の探索等を進めることにより, 塩ストレス耐性における RABA1 輸送経路の役割を明らかにできると期待される.