

Studies of RAB GTPases in the basal land plant, *Marchantia polymorpha*

その他のタイトル	基部陸上植物ゼニゴケのRAB GTPaseの研究
学位授与年月日	2018-03-22
URL	http://doi.org/10.15083/00077984

論文の内容の要旨

論文題目 Studies of RAB GTPases in the basal land plant, *Marchantia polymorpha*
(基部陸上植物ゼニゴケの RAB GTPase の研究)

氏名 南野 尚紀

【序論】

真核生物の細胞内では、細胞膜を含めた単膜系オルガネラ間で、膜小胞や小管を介した様々な物質のやりとりが行われている。このシステムは「膜交通」と呼ばれ、すべての真核生物において基本的なシステムは保存されている。一方で、真核生物の各系統では、進化の過程で独自の膜交通経路網が獲得されてきた。RAB GTPase (以下 RAB) は、膜交通を制御する進化的に保存された鍵因子のひとつであり、膜交通経路の多様化には、RAB GTPase の多様化が密接に関わっていると考えられている。ゲノム解析の結果から、真核生物の各系統間での RAB の多様化は、遺伝子重複による数の増加とそれに続く機能分化が起こることで駆動されてきたと考えられている。それに加え、最近では、真核生物の共通祖先には現存の生物より多くの種類の RAB が存在し、各系統へと分岐していく過程で一部の RAB の二次的喪失が起こり、現存する真核生物の RAB GTPase の構成が形成されていったという仮説も提唱されている。緑色植物の RAB の構成をみても、ストレプト植物門の進化に伴う RAB11 ファミリーの多様化や、動物ではみられない特徴的な RAB5 メンバーの獲得がみられる一方で、動物では広く保存されている RAB の二次的喪失もみられる。しかしながら、このような RAB の獲得や喪失が、具体的にどのような細胞機能の獲得や喪失と結びついてきたかについては、未解明な点が多い。そこで本研究では、進化的に重要な位置を占める

基部陸上植物であるゼニゴケについて、その RAB の構成を明らかにするとともに、それぞれの機能についての詳細な解析を行い、他の生物の知見と比較することで、RAB の多様化と膜交通の進化との関連についての考察を行った。

【結果と考察】

1. ゼニゴケの RAB GTPase の構成

ゼニゴケのゲノムデータベースから RAB をコードする遺伝子の探索を行った。その結果、17 種類の RAB を同定した。17 種類の RAB について、PCR による器官別の発現パターンの解析、および蛍光タンパク質を融合させたものの細胞内局在の観察を行った。ゼニゴケの RAB の構成について、他の緑色植物と比較したところ、緑色植物に広く保存されている RAB のセットはゼニゴケにも冗長性の低い形で保存されていた。一方でいくつかの特徴的な RAB がみられた。MpRAB2b は雄性生殖器官において特異的に発現しており、C 末端側に鞭毛内輸送を制御する複合体のひとつである INTRAFLAGELLAR TRANSPORT 43 (IFT43) と類似した配列を持つ。このような構造の RAB は他の生物種にはみられないことから、MpRAB2b はタイ類の進化の過程で新規に獲得された種類の RAB である可能性が高い。RAB21 と RAB23 は陸上植物の進化の過程で二次的に失われた RAB であり、このホモログもゼニゴケには存在した。MpRAB23 については、雄性生殖器官における特異的な発現がみられ、雄の生殖機能に関わることが示唆された。RAB23 遺伝子の有無は、緑色植物の系統における鞭毛の有無と強い正の相関がみられ、特に鞭毛機能に関わることが示唆された。

2. ゼニゴケ RAB21 の細胞内機能

MpRAB21 は後期エンドソームに局在する MpRAB5 および MpARA6 と共局在した。ゼニゴケにおける RAB21 の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集技術により、MpRAB21 の遺伝子破壊株を作出した。Mprab21 変異体は、野生型と比較して、葉状体の生育の重篤な遅延が観察された。またメリステムの形成や気室孔の形態にも異常が観察された。これらの結果から、ゼニゴケにおいて RAB21 が正常な生育に必須の役割を果たしていることが示された。Mprab21 変異体における細胞レベルでの異常を明らかにするために、各種オルガネラマーカースや染色試薬を用いた観察を行った。エンドサイトーシスを可視化する FM1-43 の取り込みや、液胞膜に局在するタンパク質の輸送、canonical な分泌のマーカースの輸送には異常はみられなかった。一方で、mCitrine-MpRAB5 が局在するコンパートメントの異常や、細胞膜タンパク質の局在異常および細胞外マトリクス構造の異常が観察された。これらの結果は、Mprab21 変異体において、細胞膜方向への輸送が異常になっていることを示唆している。MpRAB21 が機能する輸送経路で協調的にはたらく因子を調べるため、MpRAB21 の共免疫沈降産物の質量分析を行った。その結果、エンドソームからの逆行輸送で機能するレトロマーと相互作用することが明らかになった。これら

の結果から、MpRAB21 はレトロマーとともに、エンドソームから細胞膜方向への輸送経路で機能していることが示唆された。

3. ゼニゴケの精子機能と RAB23 の解析

RAB23 は運動性の鞭毛・繊毛をもつ生物によく保存されている。実際、ゼニゴケにおいても、*RAB23* 遺伝子は雄性生殖器において特異的に発現していたことから、雄の生殖機能・特に精子機能に関わりを持つことが示唆された。そこで、RAB23 の解析に先立って、まずは精子形成過程における各種オルガネラマーカークの観察を行い、オルガネラ動態の観察を行った。

興味深いことに、細胞膜に局在する SNARE タンパク質は、精子形成が進むにしたがって、細胞膜のシグナルが減少し、細胞内の球状構造に集まる様子が観察された。この球状構造へのシグナルの移動は、ゴルジ体に局在する SNARE タンパク質およびエンドソームに局在する RAB についても観察された。この球状構造の膜には、液胞膜に局在する SNARE タンパク質が局在していたことから、この球状構造は液胞の性質をもつコンパートメントであることが明らかになった。また、電子顕微鏡観察から、多胞体やオートファゴソームなどの分解系のオルガネラが盛んに観察された。これらの結果は、精子形成過程において細胞自立的な分解系の亢進が起こっていることを示しており、精子形成における細胞質の収縮において重要な役割を果たすことが考えられた。さらに、鞭毛内輸送や基底小体のマーカータンパク質として、いくつかの候補分子を選出し、蛍光タンパク質を融合させたものを細胞内で発現させ、その細胞内局在を観察した。その結果、それぞれ鞭毛や基底小体に局在する様子が観察された。

MpRAB23 の機能を詳細に明らかにするために、Homologous recombination を利用した MpRAB23 の遺伝子破壊株の作出を行い、その表現型を観察した。その結果、確立した各種マーカータンパク質の局在には異常が見られない一方で、精子の鞭毛の運動および細胞体の形態の著しい異常が観察された。さらに、透過型電子顕微鏡による微細構造の観察を行った結果、軸糸、および多層構造体と呼ばれる微小管を含む構造に異常がみられた。これらの結果から、MpRAB23 は精子に特徴的な微小管構造の形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。蛍光タンパク質を融合させた MpRAB23 について、精細胞における局在を観察した結果、多くは細胞質、時に細管状およびドット状の構造に局在した。興味深いことに、恒常活性型の MpRAB23 はドット状のコンパートメントによく局在した。加えて、MpRAB23 には C 末側に特徴的なドメイン構造が存在する。変異体の相補性試験から、このドメイン構造が MpRAB23 の機能に重要であることが明らかになった。

【まとめ】

本研究により、ゼニゴケの RAB の全構成と、シンプルかつユニークな膜交通システムの一端が明らかになった。ゼニゴケには、緑色植物が共通してもつ RAB のセットが、冗長性の

低い形で存在していた。一方で、MpRAB2bのような特徴的な構造を持つRABや、RAB21やRAB23のような陸上植物の進化の過程で二次的に失われたRABが存在していた。RAB21はゼニゴケにおいて正常な生育に必須であり、エンドソームから細胞膜への輸送を制御していることが示された。緑色植物の分泌経路は、進化の過程で極端に多様化・複雑化したことが示唆されている。「多様化した分泌経路のいずれかがRAB21の機能する経路を代替し、それに伴いRAB21の喪失が起こった」という仮説が現状最も妥当であると考えられ、シロイヌナズナを含むほかの緑色植物の分泌経路の制御機構との比較解析を行い、検証する。また、RAB23は植物において、鞭毛機能と密接に関連することが示された。陸上植物の進化の過程におけるRAB23の喪失は、鞭毛を用いない生殖様式の進化と関連することが示唆された。RAB23は鞭毛機能にいかんして関わるかについては、動物においても未解明な点も多く、今後ゼニゴケの精子をモデルとして詳細な機能解析を行っていく。これら更なる機能解析を通じて、膜交通因子の二次的喪失の進化的意義が明らかになることが期待される。