

論文内容の要旨

論文題目 **Studies on activation mechanism of two types of RAB5 in *Arabidopsis thaliana***

(植物における 2 つの RAB5 グループの活性化機構の研究)

氏名 砂田麻里子

<序>

膜交通は、細胞内に存在する多様なオルガネラの物質のやり取りに欠かせない機能でありながら、多細胞生物の高次の生命現象にも重要な役割を担っている。植物でも膜交通の重要性が明らかになりつつあり、中でも特にエンドサイトーシスは、環境応答や形態形成の様々な側面に密接に関与すると報告されている。しかし、その分子機構については未解明な点が多く残されている。

RAB5 は、真核生物に広く保存されたエンドサイトーシス制御因子の 1 つであり、GDP が結合した不活性型と GTP が結合した活性型とをサイクルすることにより、分子スイッチとして機能している。RAB5 は、動物においては多様なエンドソーム機能の発現に関わることが知られている。陸上植物には、この真核生物保存型 RAB5 に加えて、植物特異的な ARA6 が保存されている。われわれの研究室では、シロイヌナズナにおいて保存型 RAB5(ARA7・RHA1)と ARA6 が、一部共局在しながらも異なるエンドソーム群に局在し、さらに制御する輸送経路も異なることを明らかにした (Ebine *et al.*, 2011) しかし、これら RAB5 メンバーは、その明確な構造と機能の分化にも関わらず、共通のグアニンヌクレオチド交換因子 (RAB5 GEF; VPS9a) により活性化される (Goh *et al.*, 2007)。植物の RAB5 GEF は活性に必要な VPS9 ドメイン以外には目立ったドメイン構造は予測されていない。そこで、植物の RAB5 GEF がどの

ように2つの RAB5 グループを制御するのか, VPS9a の機能未知な C 末端側の機能に注目して研究を行った。

<結果と考察>

□ VPS9a の C 末端領域は ARA6 の制御, VPS9a の多量体形成及び正しい細胞内局在に関わる

VPS9a の機能未知な C 末端側の領域 (以下 C-terminal region, CTR) の機能を調べるため, CTR を削った変異型 VPS9aS304* を作製し, 解析を行った。VPS9aS304* の GEF 活性を調べたところ, 保存型 RAB5 である ARA7 に対しては変化がみられず, 植物特異的な ARA6 に対しては GEF 活性が上昇した。このことから, CTR は ARA6 に対する制御に関与することが示唆された (図 1)。

さらに, 相互作用解析の結果から, VPS9a は CTR を介して多量体を形成することが明らかになった。中でも CTR 内に存在する, 植物の RAB5 GEF の C 末端領域によく保存された 36 アミノ酸からなる配列, PSR (Plant-specific high similarity region) が多量体形成に重要であることが示唆された (図 2)。

しかしながら, 内在性の VPS9a の C 末端側を削った S304* という変異型 VPS9a で代替させた植物に目立った異常は観察されない。そこで, 細胞内局在について詳細に解析を行った (図 3)。VPS9a-GFP と S304*-mRFP を発現する植物を作製し, 細胞内局在を観察したところ, 一部重なりながらも異なる局在を示し, PI3K の阻害剤であるウォルトマンニン (Wm) 処理を行った場合にエンドソームが肥大化したリング状構造が多く観察された。また, ARF 阻害剤である Brefedeldin A 処理を行った場合には, BFA BFA 非感受性の VPS9a-GFP が観察された (図 3)。このことは, CTR が VPS9a の正しい細胞内局在にも寄与することを示唆している。

□ ゼニゴケにおいても Vps9 ドメインを持つ MpVPS9 が RAB5 GEF として働き, CTR を介

して多量体を形成する

基部陸上植物であるゼニゴケにも, 保存型 RAB5 (MpRAB5) と植物特異的な ARA6 が 1 つずつ保存されている。どちらも多胞体に局在するが, 薬剤処理時の挙動や, 活性固定型の局在はそれぞれ異なることが明らかになっている (恵良, 未発表)。また, ゼニゴケの RAB5 GEF については, これまで解析がされていなかった。

ARA6 が陸上植物に保存されていることから, ゼニゴケにおいて RAB5 GEF として働くと考えられる, VPS9 ドメインを持つ遺伝子を探索した結果, Vps9 ドメインを持つものが 1 つみつかり, これを MpVPS9 と名付けた。植物の Vps9 ホモログを用いてアライメント解析したところ, Vps9 ドメイン以外には既知のドメイン構造やモチーフが予測されていないこと, C 末端領域に PSR が保存されていることが明らかになった。

ゼニゴケ VPS9 (以下 MpVPS9) を用い, 酵母ツーハイブリッド法で, 野生型・活性型・不活性型の

RAB5 との相互作用を観察したところ、これまでの RAB5 GEF にみられるように、不活性型の RAB5 と結合することが明らかになった (図 4)。また、シロイヌナズナ RAB5 GEF である VPS9a と同様に、MpVPS9 も CTR を介して多量体を形成することを示唆する結果を得た (図 5)。

次に、精製タンパクを用い、トリプロファン自家蛍光の変化を用いて GEF 活性の測定を行ったところ、MpVPS9 は保存型 RAB5 である MpRAB5 のみならず、植物特異的な MpARA6 にも GEF 活性を持つことが明らかになった (図 6)。MpARA6 に対しては、濃度依存性がみられなかったため、より低濃度で測定を行ったところ、濃度依存性が観察された。これらの結果は、ゼニゴケにおいても Vps9 ドメインを持つものが RAB5 GEF として働くことを示しただけでなく、ARA6 に対する感受性の違いや、CTR の機能が植物の RAB5 GEF 間で保存されていることを示している。

<まとめ>

本研究では、生化学的、遺伝学的アプローチを行い、シロイヌナズナ RAB5 GEF である VPS9a の C 末端側の領域が、ARA6 に対する GEF 活性や相互作用の調節していることに加えて、VPS9a の細胞内局在やダイマー形成に関与していることを明らかにした。これらは、植物がどのように 2 つの RAB5 グループを制御しているのかを解明する重要な手がかりである。

また、ゼニゴケやヒメツリガネゴケで VPS9 ドメインを持つものについて、保存型 RAB5 の GDP 型と結合することを示すとともに、それらがダイマーを形成する可能性を示した。このことは、植物の VPS9 ドメインをもつ分子が、RAB5 GEF として 2 種類の RAB5 の活性化制御を共通して担っていること、およびコケ植物から被子植物まで共通した RAB5 活性化機構を持つことを示唆する結果である。今後、相互作用因子の探索や、他の植物を用いた解析を推し進めることで、植物の RAB5 活性化機構の解明に寄与できると考えている。

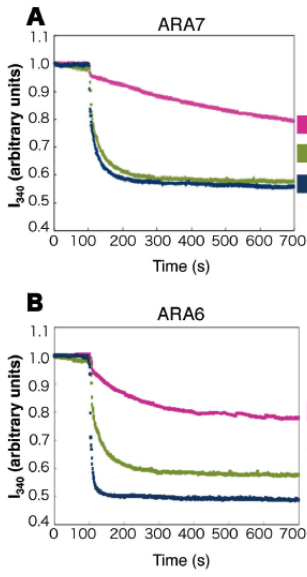


図1. S304*を用いたGEF活性の測定

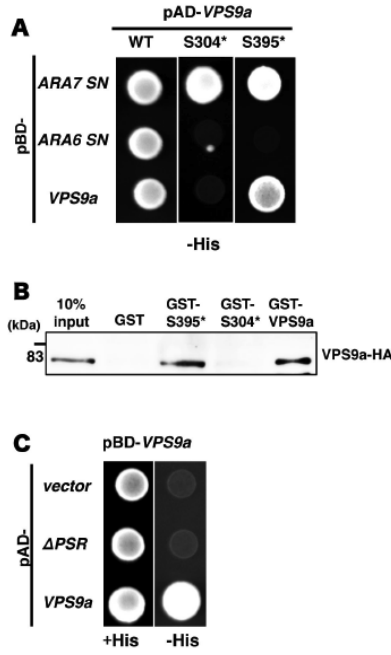


図2. VPS9aはCTRを介して多量体を形成する

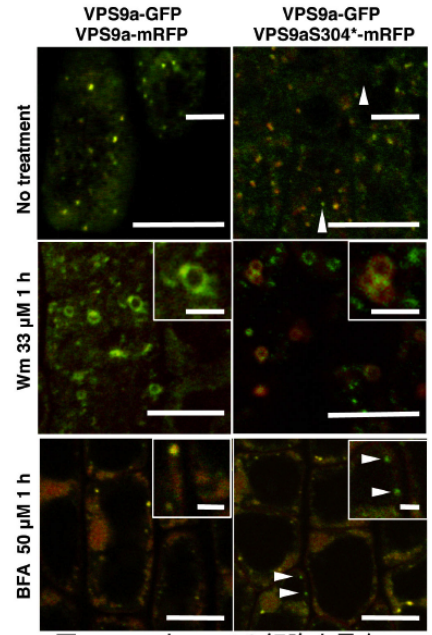
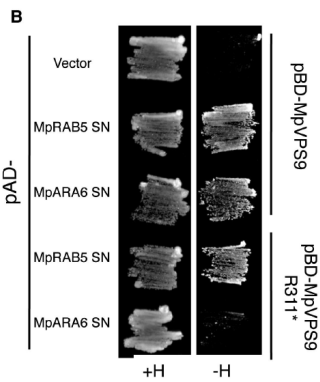
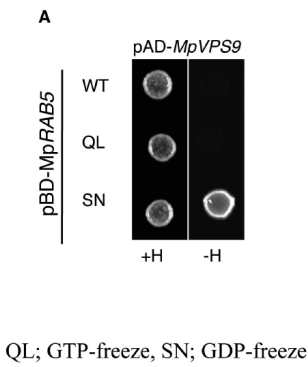


図3. VPS9aとS304*の細胞内局在



QL; GTP-freeze, SN; GDP-freeze

図4. MpVPS9は不活性型のMpRAB5、MpARA6と相互作用する

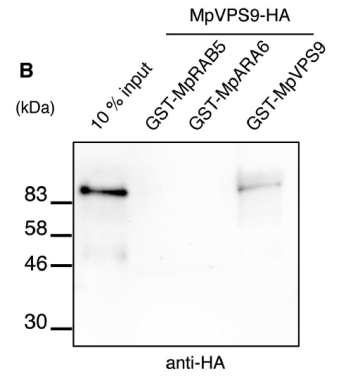
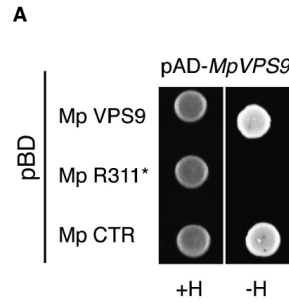


図5. MpVPS9はCTRを介して多量体を形成する

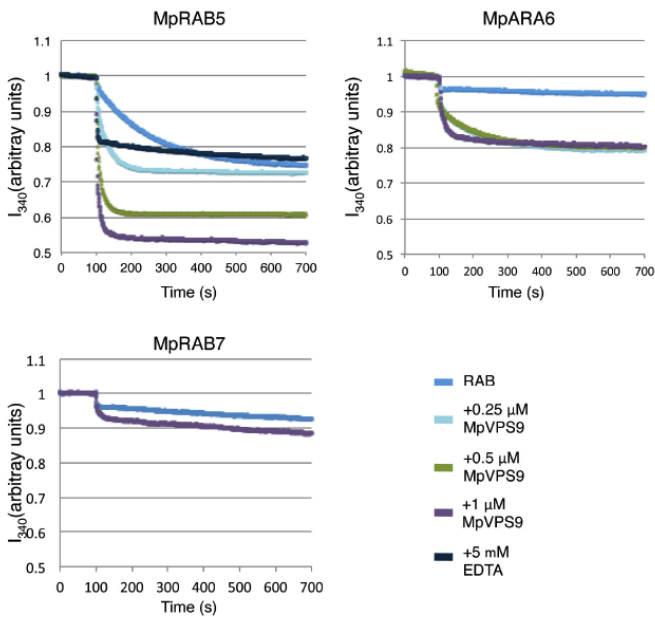


図6. MpVPS9はMpRAB5とMpARA6を活性化する