

論文の内容の要旨

Studies on Rab5 effectors in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナにおける Rab5 エフェクターの研究)

桜井 一

【序論】

RAB はそれぞれ異なるオルガネラ膜上に局在し、GTP 結合型と GDP 結合型をサイクルすることで下流因子（エフェクター）の機能発現を調節する。なかでも RAB5 は多彩なエフェクター分子を介して、複雑なエンドソーム機能の制御をおこなうことが動物で明らかにされている (Zerial and McBride, 2001; Galvez et al., 2012)。近年、植物においてもエンドサイトーシスの重要性が脚光を浴びるようになり、その分子機構の解析が急速に進んでいる (Geldner and Jürgens, 2006; Saito and Ueda, 2009; Beck et al., 2012)。陸上植物には、植物特異的 RAB5 (ARA6) と真核生物に普遍的に保存された RAB5 (ARA7, RHA1) の 2 種類の RAB5 が存在し、それらがシロイヌナズナにおいてはエンドソームからの異なる輸送経路を制御することが明らかになっている (Ueda et al., 2001; Ebine et al., 2011)。さらに、保存型 RAB5 やその活性化に異常を持つシロイヌナズナ変異体は、矮性、配偶体致死、胚致死といった表現型を示すことから、これらの分子が植物の多様なステージで重要な役割を担っていることが示唆されている (Goh et al., 2007; Dainobu, unpublished)。しかし、動物で見いだされている RAB5 エフェクターは植物には保存されておらず、植物は動物とは全く異なる RAB5 の機能発現機構を獲得していると考えられる。

この保存型 RAB5 の生存に必須な機能がいかに発現されているのかを明らかにするため、修士課程ではそのエフェクター候補を酵母ツーハイブリット法により探索し、*At3g15920* にコードされるタンパク質を得た。この候補は、ARA7 の活性型固定変異を導入した QL 型と野生型に相互作用を示し、ARA7 の不活性型固定変異を導入した SN 型と ARA6 には相互作用を示さなかった。この機能未知のタンパク質を、EREX (Endosomal Rab Effector with PX-domain) と命名した。シロイヌナズナゲノム中には EREX と類似性の高いタンパク質が他に 2 つコードされており、それらを EREL1, EREL2 (EREX-Like protein1) とそれぞれ命名したが、酵母ツーハイブリット法ではこれらと RAB5 との相互作用は検出されなかった。

【結果と考察】

EREX は活性型 ARA7 と相互作用する

EREX と ARA7 との相互作用をさらに詳細に酵母ツーハイブリット法によって解析した結果、EREX の 65~273 a.a. の領域が ARA7 との相互作用に必須であることを明らかにした。この EREX⁶⁵⁻²⁷³ と ARA7, ARA6 に各タグを融合したタンパク質を大腸菌より精製し、プルダウンアッセイを行った。その結果、EREX⁶⁵⁻²⁷³ は ARA7 の活性状態依存的に、直接相互作用することが明らかとなった (図 1-A, B)。

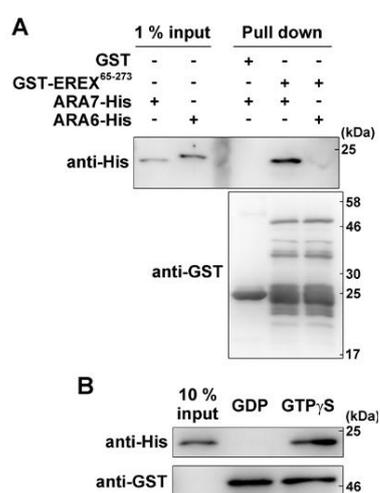


図 1. EREX と ARA7 との相互作用解析

(A) GST 融合タンパク質と His タグ融合タンパク質を結合バッファー中で反応させ、GST 融合タンパク質を Glutathione sepharose 4B でプルダウンした。

(B) GST-EREX⁶⁵⁻²⁷³ と ARA7-His との相互作用を A と同様の方法で検出した。結合バッファー中には過剰量の GTP γ S または GDP を添加した。

RAB5 の活性化によって、EREX はエンドソーム上に局在化する

次に、シロイヌナズナの培養細胞における一過的発現系を用いて、EREX の細胞内局在を観察した。その結果、EREX はエンドソームで ARA7 と共局在することが明らかとなった。また、この EREX のエンドソーム局在性は ARA7 の共発現によって顕著に上昇した。一方、SN 型の ARA7 を共発現した細胞では、EREX はエンドソームには局在せず、細胞質中に拡散している様子が観察された (図 2-A)。培養細胞での観察結果と一致

して、RAB5 の活性化に部分的な機能欠損を持つ *vps9a-2* 変異体植物の根においても GFP-EREX はエンドソーム局在せずに、細胞質中に拡散して観察された (図 2-B)。これらの結果から、EREX の細胞内局在が RAB5 の活性化状態によって制御されている

ことが示唆された。

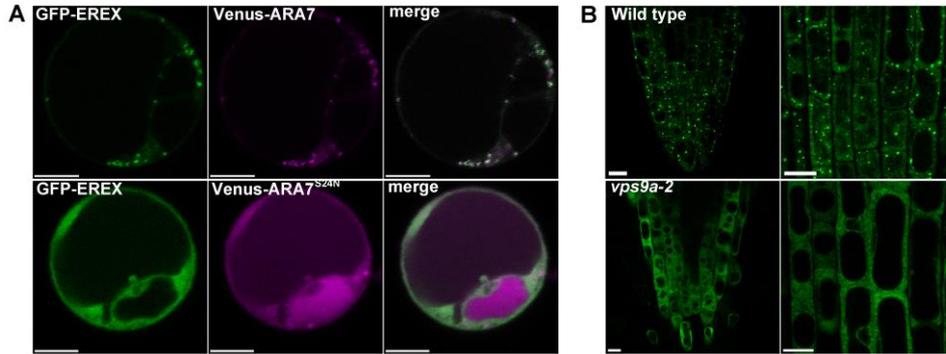
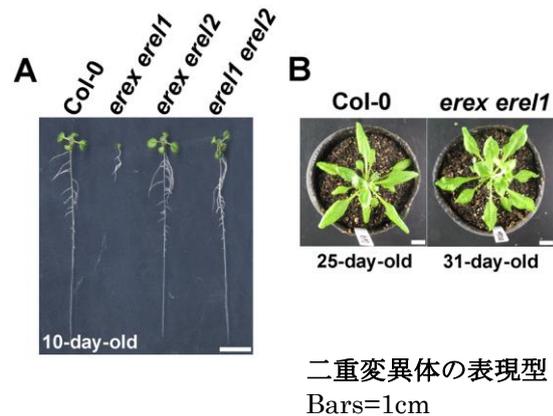


図2. GFP-EREX の細胞内局在

(A) 根の培養細胞に GFP-EREX と Venus-ARA7/ARA7^{S24N} をそれぞれ共発現した。Bars=5 μ m. (B) GFP-EREX を異所的に過剰発現して細胞内局在性を観察した。右図では左図と同じ形質転換体植物の別の根の表皮細胞を示している。Bars=10 μ m.

EREX と EREL1 は一部冗長して機能する

全ての *erex*, *erel* 単独変異体において、野生型と顕著に異なる表現型は観察されなかった。そこで、*vps9a-2* との各二重変異体の作出を試みたところ、*erex vps9a-2* と *erel1 vps9a-2* は共に致死であることが判明した。さらに、*erex*, *erel* 間で各二重変異体を作成したところ、*erex erel1* 二重変異体は顕著な生育遅延を示した(図3)。以上の結果から、EREX と EREL1 は少なくとも一部冗長した機能を持ち、それらの機能が RAB5 と密接に関連していることが示唆された。



二重変異体の表現型
Bars=1cm

EREX, EREL1 は液胞輸送経路で機能する

EREX のプロモータ制御下で発現させた *GFP-EREX* が *erex erel1* 二重変異体の表現型を相補することを確認するとともに、同プロモータ領域を用いてプロモータ・レポート・アッセイを行った。その結果、*EREX* は成熟過程の胚や若い植物体で主に発現していることが明らかになった。*erex erel1* 二重変異体では初期成育に遅延が起こることからも、種子貯蔵タンパク質の輸送に着目した。

シロイヌナズナの主要な種子貯蔵タンパク質である 12S グロブリンは、種子成熟の過程で小胞体から貯蔵型液胞へと輸送される過程においてプロセッシングを受ける (Hara-Nishimura et al., 1991; Shimada et al., 2003b). *vps9a-2* 変異体のような液胞

輸送経路に異常を持つ変異体の種子では、12S グロブリン前駆体の蓄積が検出されることが知られている (Ebine et al., 2011). *erex erel1* 二重変異体の種子においても、12S グロブリン前駆体の蓄積が検出されたことから、EREX, EREL1 は少なくとも種子において液胞輸送経路で機能することが示された (図 4-A). さらに、免疫電顕による観察結果より、*erex erel1* 二重変異体の種子では 12S グロブリンが細胞間隙へと誤輸送されていることも明らかとなった (図 4-B). これらの結果から、EREX, EREL1 が、貯蔵型液胞への正確な輸送に必要であることが示された.

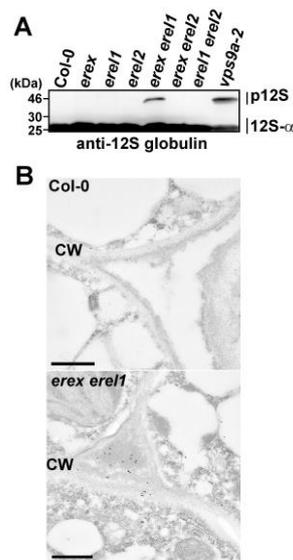


図 4. 種子貯蔵タンパク質の解析

(A) 成熟種子における 12S グロブリン前駆体の検出.

(B) 抗 12S グロブリン抗体を用いた胚細胞間隙の免疫電顕観察

Bars=500nm

【まとめ】

EREX は ARA7 の活性化状態依存的に相互作用することでエンドソーム上へと局在化する、植物 RAB5 のエフェクターであることを示した. エンドソームに局在化した EREX に相互作用する因子を特定することにより、EREX の膜交通制御機構を解明できるのではないかと期待する.