

論文の内容の要旨

Identification of the *NSF* gene mutation that causes abnormal Golgi morphology
in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナのゴルジ体形態異常を示す *NSF* 遺伝子変異の同定)

氏名 棚橋 沙由理

序論

真核細胞は、複雑で多様な生体反応の場であるさまざまなオルガネラを内包する。オルガネラは、高度に分業化し相互に緊密に連携を取り合うことで細胞の生命活動を維持する。これらの生体反応に必須なタンパク質を適切なオルガネラに運ぶ仕組みのひとつとして、「膜交通」と称される機構が存在する。この機構において、小胞体で新たに合成されたタンパク質は輸送小胞に積み込まれ、まずゴルジ体へ運ばれる。ゴルジ体で糖鎖修飾をはじめとする加工を施された後、トランスゴルジ網 (TGN) を経て、細胞膜あるいは液胞といった最終目的地へ送り出される。この膜交通の中心地点で機能するゴルジ体は、扁平な袋状の膜 (槽) の積み重なりを基本とする単膜のオルガネラである。槽ごとに異なる糖転移酵素を内包し、層板構造を通常形成する。この構造には極性があり、タンパク質を受け取る側をシス槽、送り出す側をトランス槽とよぶ。この層板構造は、ゴルジ体の形態上最大の特徴であるにも関わらず、どのような分子基盤によって形成、維持されているのか、その詳細についてほとんど明らかにされていない。私は、この仕組みに寄与する分子を明らかにするため、明瞭な層板構造を有するモデル植物シロイヌナズナを材料に用い、ゴルジ体局在タンパク質を蛍光タンパク質と融合させることで可視化したラインを用いて、順遺伝学的な可視化スクリーニングを行った。これによりゴルジ体形態異常変異体を選抜し、その原因遺伝子を明らかにすることで、層板構造の形成、および維持機構のさらなる理解を目指した。

結果と考察

1. 変異体の選抜

ゴルジ体のシス槽マーカーである ERD2-GFP を発現させたシロイヌナズナの株を用いて、共焦点顕微鏡下で観察を行った。すると、ゴルジ体は均一なサイズのディスク状のシグナルとして細胞内に分散して存在する様子が観察された。これに EMS による変異原処理ライン（理研庄田恵子氏より分与）の M2 世代植物について、ゴルジ体形態に着目し顕微鏡下でのスクリーニングを行った。その結果、約 10,000 ラインから 30 個体のゴルジ体形態異常変異体候補を選抜した。さらに、変異体候補の中でサイズの不均一なゴルジ体が混在し、とくに小型化したものが非常に多いという、著しいゴルジ体形態異常を示す変異体 #46-3 について解析を行った（図 1）。

2. ゴルジ体の形態観察

変異体 #46-3 について、ゴルジ体のシス槽とトランス槽の位置関係を調べるためトランス槽マーカーである ST-mRFP を導入して共焦点顕微鏡下で局在比較を行った（図 2）。親株ではシス槽とトランス槽が隣り合って重なるように位置するのに対して、変異体 #46-3 では両者が離れて存在した。加えて、小型化した ERD2-GFP のシグナルうち、ST-mRFP のシグナルを伴わないものが存在した。これにより、変異体 #46-3 では層板構造内のシス槽とトランス槽の位置関係に異常が生じたことが示唆された。次に、ゴルジ体のさらなる詳細な構造解析のため透過型電子顕微鏡による超微細構造観察を行った（図 3）。その結果、共焦点顕微鏡で観察された小型化したゴルジ体が観察された（図 3B）。その一方で、親株ではゴルジ体の層板構造あたり 4-6 枚程度の槽が観察される（図 3A）のに対して、変異体 #46-3 では最大 9 枚の槽が形成される多層化した層板構造が観察された（図 3C）。加えて、トランス槽が異常に大きくなるという形態異常も観察された（図 3D）。

3. 遺伝子同定

変異体 #46-3 に生じた変異の原因遺伝子を同定するために、分子マーカーを用いたラフマッピング、および次世代シーケンサーによる連鎖解析を行った。変異の存在する染色体上の領域を詳細に絞り込んだ結果、変異は第 4 染色体上腕部に生じ

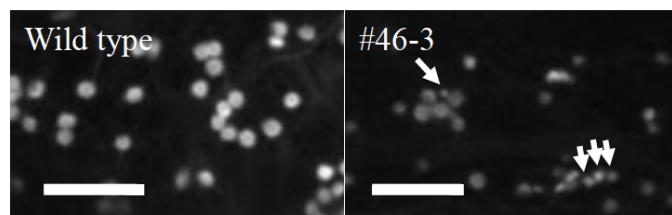


図 1. ゴルジ体形態異常変異体 #46-3 の共焦点顕微鏡像

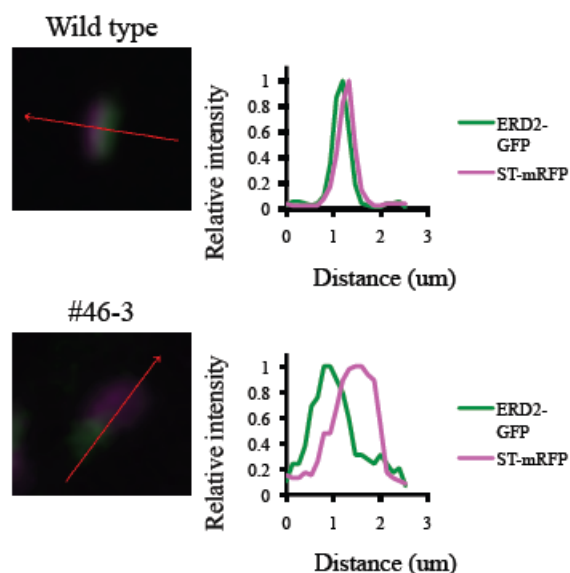
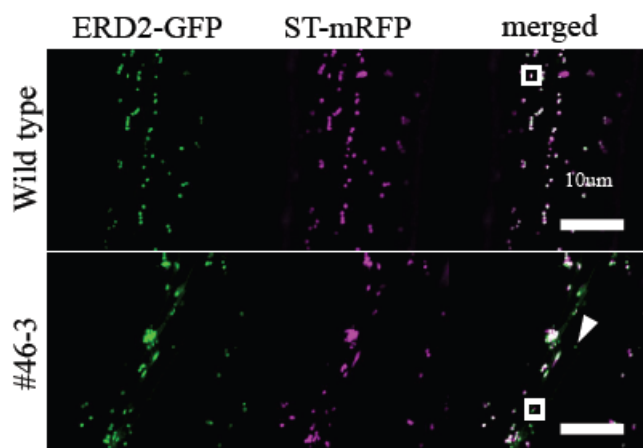


図 2. ゴルジ体のシス-トランス槽の局在比較

た可能性が高いことが明らかになった。この領域に存在する複数の候補遺伝子 (At4g02410、At4g02750、および At4g04910) のコンストラクションを行い、アグロバクテリウムを介して変異体#46-3 に遺伝子導入を行った

(相補性試験)。候補遺伝子 At4g02410 および At4g02750 については、T1 世代植物においてゴルジ体表現型が相補されなかった。残る At4g04910 は NSF をコードする遺伝子であり、アミノ酸置換の生じた部位は真核生物に共通に保存された部位であった。At4g04910 の相補性試験は遺伝子のサイズが比較的大きいため、コンストラクションが非常に難航したが、結果として T1 世代植物および T2 世代植物において、ゴルジ体表現型が相補された (図 5)。これに加え、T-DNA 挿入ラインのアリルを入手して

アレリズムテストも同時に進めた。その結果、3 ラインの変異アリル (SALK_138721C、SAIL_1155_C06、および SAIL_620_E12) のうち、T-DNA がエキソンに挿入されたライン SAIL_620_E12、および T-DNA が 3' -UTR に挿入されたライン SAIL_1155_C06 はホモ接合のとき植物体が致死であった。このことを踏まえ、SAIL_1155_C06 と変異体#46-3 を掛け合わせて、#46-3/ SAIL_1155_C06 ヘテロ接合の植物体を作成した。この植物体を用いてアレリズムテストを行った結果、ゴルジ体形態は変異体#46-3 で観察されたものを表現型模写していた (図 6)。

NSF タンパク質は、真核生物の膜交通において普遍的に保存された膜融合後の解離に寄与する鍵因子であり、巨大な AAA+タンパク質ファミリーのひとつである。小胞と標的膜が融合するさいに Q-SNARE および R-SNARE によって強固な SNARE 複合体が形成されるが、これらが融合後し積み荷を放出した後に SNAP とともに SNARE 複合体を解離させる役割を果たす (Ryu et al., 2016)。これは、細胞内において繰り返し行われ、膜交通に必要不可欠な仕組みである。植物の膜交通では、小胞側の R-SNARE と標的膜側の Q-SNARE が非常に多様化し、それらは厳密な制御を受けていることが知られている。それに対して、NSF 遺伝子はシングルコピーの遺伝子をコードするのみである。NSF タンパク質は 3 個のドメインから成るが、変異はこのうちの SNAP-SNARE 複合体の解離を実行する ATPase 触媒ドメイン (D1) 上に

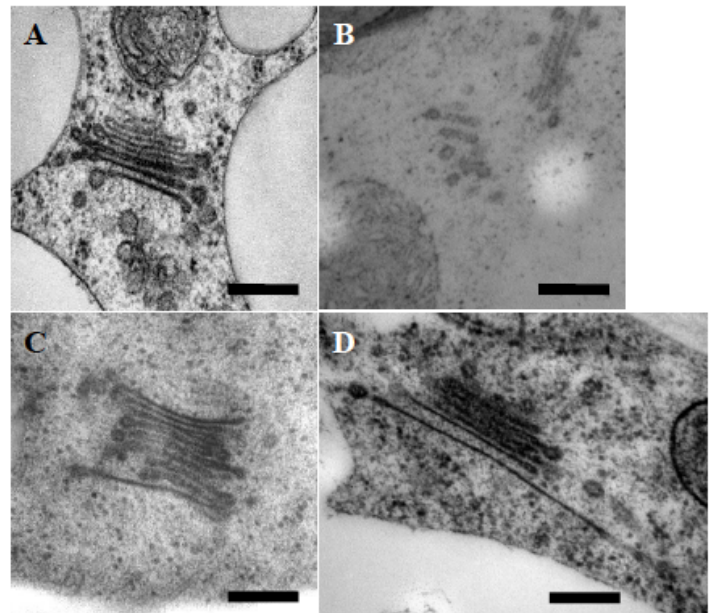


図 3. ゴルジ体の透過型電子顕微鏡像

| Species | Protein ID | Sequence | Position |
|----------------|------------|--|----------|
| Human | 368 | LVI G MTNRPDLI D EALLRPGRLEVK | 392 |
| Mouse | 368 | LVI G MTNRPDLI D EALLRPGRLEVK | 392 |
| Zebrafish | 368 | LVI G MTNRPDLI D EALMRPGRFEVK | 392 |
| Drosophila | 368 | LVI G MTNRRD M I D EALLRPGRLEVQ | 392 |
| Caenorhabditis | 379 | LVI G MTNRRD M I D EALLRPGRLEVO | 403 |
| Arabidopsis | 365 | LL I GMTNRKDL L D E ALLRPGRLEVQ | 389 |
| Yeast | 389 | LVI G MTNRKDL L D S ALLRPGRFEVQ | 413 |

図 4. 真核生物間のD374のアミノ酸配列の比較

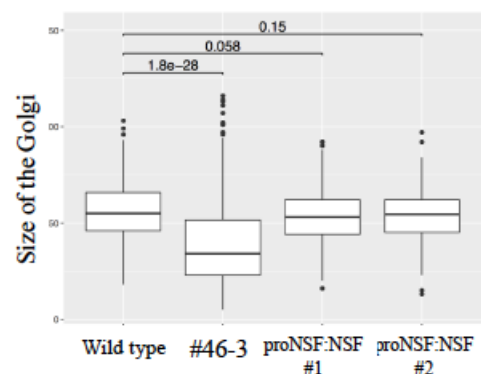
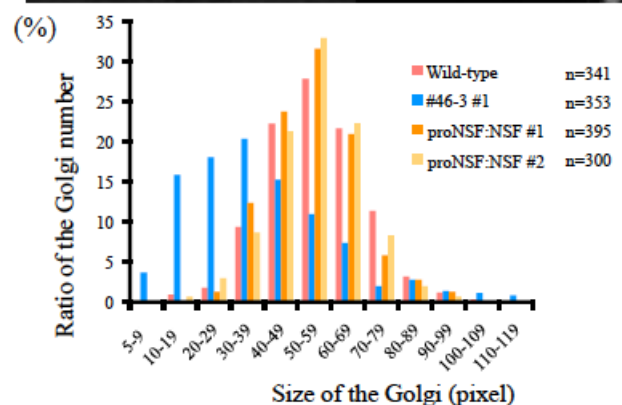
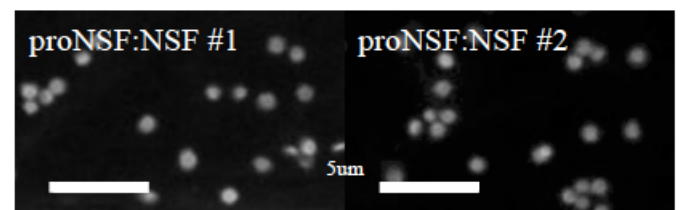


図 5. 相補性試験

存在する 374 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換されるミスセンス変異であった。この部位は、D1 ドメインのなかでも ATP 結合部位に近接しており、あらゆる真核生物に高度に保存されている部位であった (図 3b; Zhao et al., 2010)。

まとめと展望

本研究により、明瞭なゴルジ体層板構造を有するシロイヌナズナを材料に用いることで、膜交通における必須因子である NSF 変異体の単離に成功した。NSF の ATPase 触媒ドメインにおける 1 アミノ酸置換により、多層化をはじめとする多様な形態異常がゴルジ体上に生じた。真核生物のゴルジ体における槽間のタンパク質の輸送機構について、長年にわたる論争の末に「槽成熟モデル」が支持されている。これは、積み荷タンパク質を槽の内部に保持しながら槽自体が成熟して輸送する機構であるが、ここでは槽成熟による順行輸送と COP I 小胞の介する逆行輸送の均衡が非常に重要である。このゴルジ体の槽間のタンパク質の輸送においても NSF が機能すると考えられることから、変異体#46-3 に生じたゴルジ体の多層化は槽間の輸送速度に遅延が生じたことが原因ではないかと推測される (図 7)。これらについて検証するためには、#46-3 における NSF の ATPase 活性の測定、および超解像顕微鏡 (SCLIM) による層板構造内におけるゴルジ体マーカーの挙動の詳細な時空間的解析が必要と考えている。

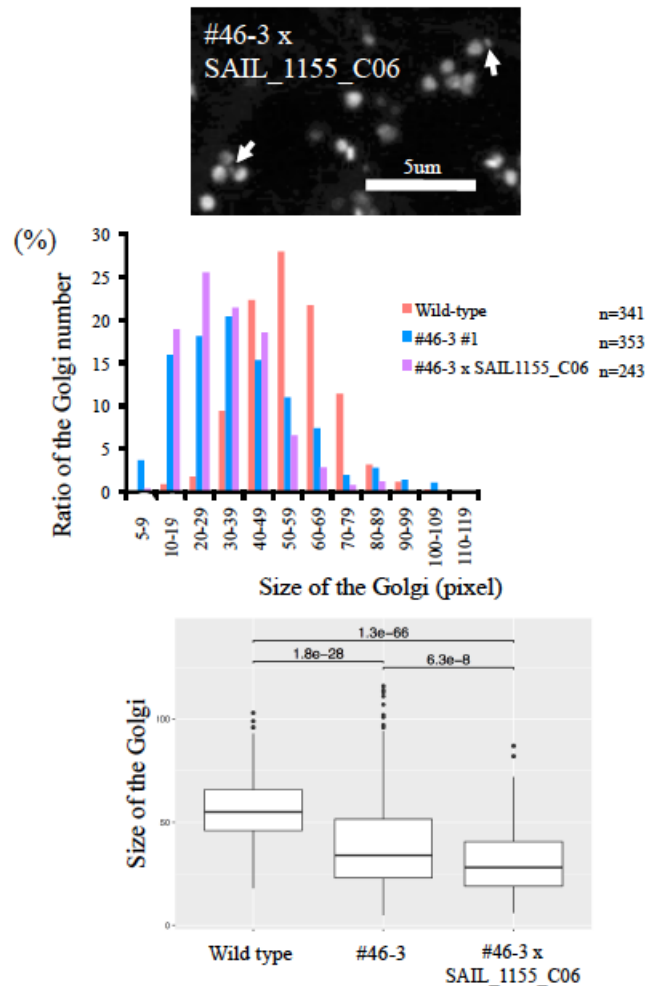


図 6. アレリズムテスト

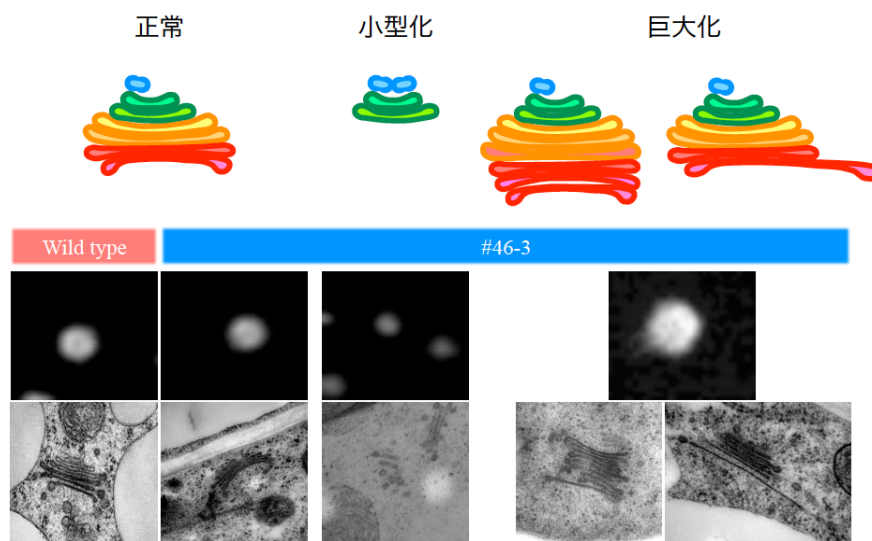


図 7. 変異体#46-3に生じたゴルジ体形態異常のモデル図