

論文の内容の要旨

論文題目 : **Study of the tethering complexes acting on vacuolar trafficking pathways of *Arabidopsis thaliana***
(シロイヌナズナを用いた液胞輸送経路ではたらく繫留複合体の研究)

氏名 竹元 廣大

<序論>

Rab5/Ypt5、Rab/Ypt7 は出芽酵母のエンドソーム-液胞間の輸送に機能する Rab GTPase として知られており、前者とは CORVET が、後者とは HOPS が結合し、それぞれ繫留因子としてはたらいている。CORVET と HOPS は 4 つのサブユニットをコアとして共有し、さらにそれぞれ 2 つの特異的なサブユニットが結合した複合体である。シロイヌナズナにおいても、各サブユニットのホモログが保存されており、一部のサブユニットについては、液胞の形態や液胞輸送経路に関わっていることが示されている。

近年の研究から、植物細胞においては TGN が初期エンドソームとして機能しており、RAB5 が後期エンドソームに局在すること、液胞輸送経路が少なくとも 3 つの経路からなることなどが明らかになってきた。このような植物に特有のポストゴルジ輸送経路の特徴と、液胞輸送経路で機能する繫留因子である CORVET、HOPS 両複合体の機能がどのように関連しているのかは、これまでにほとんど明らかにされていない。私はこれら 2 つの複合体について、コアサブユニットである VPS18 と CORVET、HOPS それぞれに特異的なサブユニットである VPS3、VPS39 をあわせて解析することにより、シロイヌナズナにおけるエンドソーム-液胞間の輸送経路の制御機構をより詳細に明らかにすることを試みた。

<結果と考察>

◆CORVET と HOPS のサブユニット間の相互作用解析

Yeast Two Hybrid 法を用いて VPS3 と VPS39 がコアサブユニットである VPS11 と相互作用することを確認した。これに加えて免疫沈降-質量分析解析により、ほぼ全てのサブユニットが VPS18 を bait とした共免疫沈降物中に検出された。また、VPS3 と VPS39 を bait とした共免疫沈降物中にはそれぞれ CORVET と HOPS のサブユニットが検出されたことから、CORVET と HOPS のサブユニットはシロイヌナズナでも複合体を形成することが示唆された。

◆ CORVET と HOPS のサブユニットの細胞内局在の解析

VPS18、VPS3、VPS39 の蛍光タグとの融合タンパク質をシロイヌナズナ植物体で発現させ、根の分裂域の表皮細胞での細胞内局在を観察した。その結果、VPS3 は細胞質中のドット様構造に、VPS39 は液胞膜上のサブドメインと少数の細胞質中のドット様構造に局在している様子が観察された (図 1)。また、VPS18 は液胞膜上のサブドメインと細胞質中のドット状構造に局在しており (図 1)、VPS3、VPS39 とともにそれぞれドット様構造上、液胞膜上のサブドメイン上で共局在していた。このことから、CORVET は細胞質中のドット様構造に、HOPS は主に液胞膜上のサブドメインに主に局在していると結論づけた。

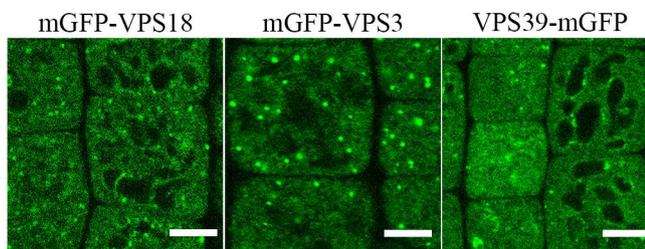


図1：HOPS/CORVETサブユニットの細胞内局在

◆CORVET、HOPS と RAB GTPase の関係性

共免疫沈降法を用いて VPS3 と VPS39 がそれぞれ RAB5、RAB7 と相互作用することを確認した。またその細胞内局在を比較すると、VPS3 は RAB5 と細胞質中のドット様構造上で、VPS39 は液胞膜上のサブドメインと一部の細胞質中のドット様構造上で RAB7 と共局在していた (図 2)。

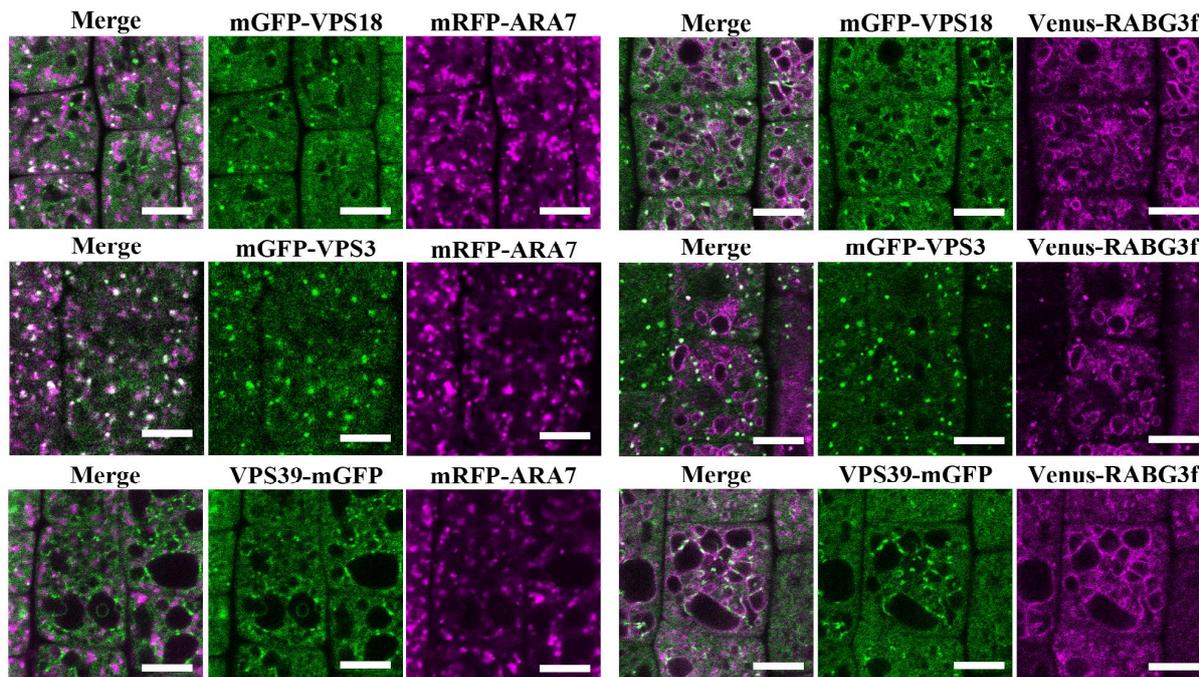


図2：CORVET、HOPSサブユニットとRAB GTPaseの局在比較

これらのことから、CORVET はエンドソーム上で RAB5 と、HOPS は RAB7 と液胞前区画及び液胞膜上で協調的に機能していることが示唆された。

◆CORVET、HOPS サブユニットの変異体の表現型解析

VPS18、*VPS3*、*VPS39* の T-DNA 挿入変異体について、表現型の解析を行った。いずれの変異体も変異ヘテロの植物の次世代で変異をホモでもつ個体は現れず、そのさやを開くと野生型ではみられない白い種子がみられた。この白い種子を透明化して観察した結果、異常な形態の胚がみられ、いずれも胚致死性の変異体であることが明らかになった。この結果から、HOPS/CORVET はシロイヌナズナの胚発生において必須の因子であることがわかった。

◆CORVET、HOPS の変異体背景における液胞輸送経路の解析

先行研究から、SYP22 は RAB5 依存かつ RAB7 非依存的な液胞輸送経路の積荷タンパクであることが明らかとなっている。HOPS/CORVET の変異体背景の胚での SYP22 の局在を観察した結果、*vps18*、*vps3* 背景では SYP22 が細胞膜に誤輸送され、*vps39* 背景では細胞質中のドット様構造に局在している様子が観察された (図 3)。このことから、SYP22 が輸送される経路に CORVET が関わるということが明らかになった。

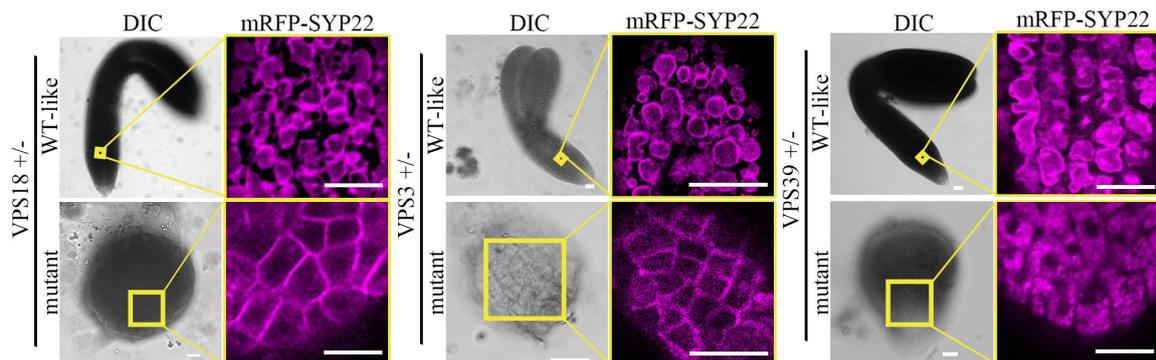


図3 : HOPS/CORVET変異体背景におけるSYP22の細胞内局在

◆HOPS/CORVET 複合体と SNARE の関係性

液胞への膜融合に関わる SNARE 複合体には、R-SNARE として VAMP713 が含まれるものと VAMP727 が含まれるものの 2 種類が存在する。これら 2 つの SNARE 分子と VPS3、VPS39 の局在を比較したところ、VPS3 は VAMP727 と、VPS39 は VAMP713 とよく共局在し、逆は共局在しないことが明らかになった (図 4)。これにより、CORVET は VAMP727 が、HOPS は VAMP713 が機能する経路ではたらくことが示唆された。

<まとめ>

本研究により、酵母でその存在が示されてきた CORVET と HOPS がシロイヌナズナでも複合体を形成し、胚発生過程において必須の役割を担うことが示された。また、これらの複合体のサブユニットと RAB、SNARE との相互作用や細胞内局在の比較、液胞輸送積荷タンパクの輸送の解析結果から、CORVET は RAB5 および VAMP727 と協調的に機能して、エンドソームと液胞膜の融合の繫留因子として機能するのに対し、HOPS は RAB7、VAMP713 と協調的に機能して、液胞同士融合の繫留因子としてはたらくことを明らかにした (図 5)。

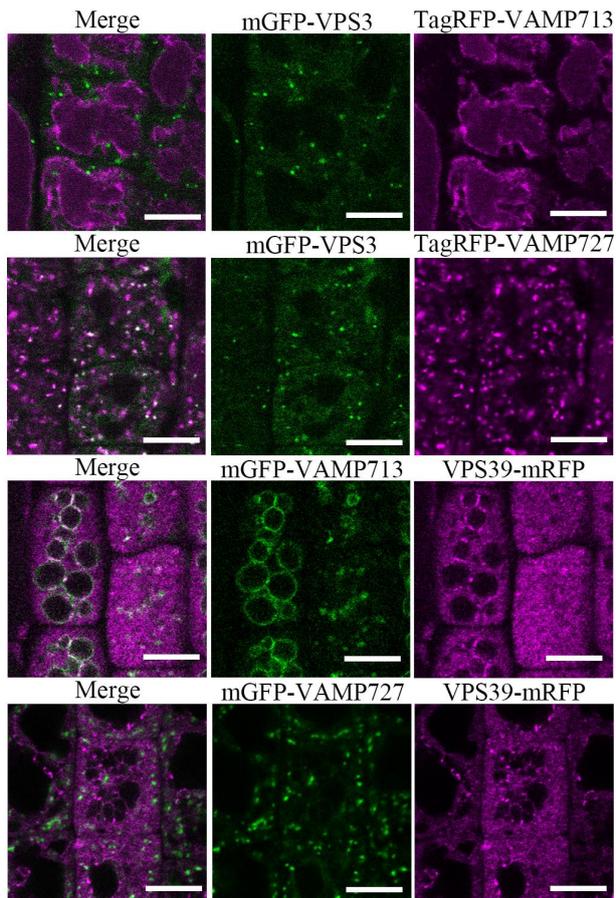


図4 : HOPS/CORVETサブユニットとSNAREの細胞内局在比較

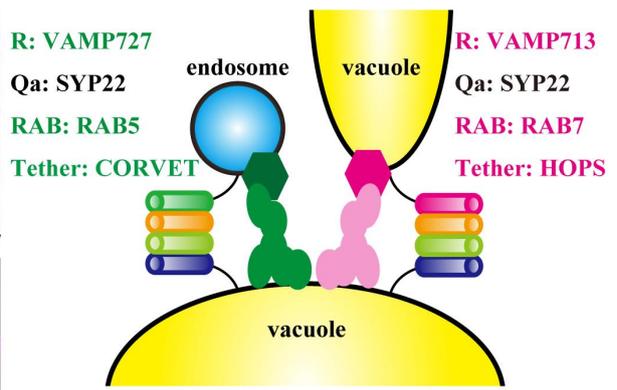


図5 : エンドソーム - 液胞間の膜融合モデル図