博士論文

植物のポストゴルジ膜交通における小胞形成装置に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

生産・環境生物学専攻

平成 24 年進学 黄 嘉禾 (Huang Jiahe)

指導教員 堤 伸浩

目次

第一章　緒言 **2**

第二章　植物のダイナミン様タンパク質 DRP2 に関する解析 **6**

2.1 緒論 7

2.2 材料と方法 10

2.3 結果 16

2.3.1 DRP2A および DRP2B の T-DNA 両ヘテロ挿入系統は配偶体致死を示す 16

2.3.2 DRP2A および DRP2B の T-DNA 両ヘテロ挿入系統は雌雄両性配偶体の形成が途中で停止する 19

2.3.3 DRP2A および DRP2B は類似の発現パターンを示す 21

2.3.4 DRP2A と DRP2B は相互作用する 23

2.3.5 DRP2A および DRP2B は共局在する 25

2.3.6 DRP2 はさまざまなポストゴルジオルガネラに局在する 27

2.3.7 ホスファチジルイノシトールの代謝や細胞骨格の重合は細胞膜上における DRP2 の動態制御に重要な役割を果たす 29

2.4 考察 31

2.4.1 DRP2 は雌雄両配偶体の形成に重要な役割を果す 31

2.4.2 DRP2A と DRP2B は機能的に冗長である 31

2.4.3 DRP2 はポストゴルジ膜交通に関わるさまざまなオルガネラで機能する 32

第三章　ポストゴルジ膜交通における新規の小胞形成関連分子の探索 **33**

3.1 緒論 34

3.2 材料と方法 36

3.3 結果 37

3.4.1 陸上植物における既知の CME 関連分子は分子複合体を形成する 63

3.4.2 構造解析から新規の CME 関連分子が同定される可能性がある 63

第四章　総合考察 **65**

第五章　摘要 **68**

参考文献 **72**

謝辞 **80**

第一章　緒言

真核生物はその進化の過程でさまざまなオルガネラを獲得してきたが，同時にオルガネラ間を連絡する物質輸送システムもまた発達させてきた．このオルガネラ間の物質輸送のうち小胞や細管を介して行われるものを膜交通と呼ぶ．その存在は 1950 年代に電子顕微鏡や放射同位体の利用によってタンパク質の分泌経路が発見されたことに遡る (Farquhar and Palade, 1963; Caro and Palade, 1964)．さらに，パルス-チェイス法の利用によりタンパク質輸送経路の詳細や，ゴルジ体の関与が明らかになり，1898 年の発見時から謎に包まれていたゴルジ体機能の一端が解明された (Jamieson and Palade, 1967)．その後，さまざまな生物種において，ゴルジ体以降の膜交通経路の複雑性が示され，高度な輸送ネットワークを実現している分子メカニズムの共通性や多様性が明らかにされてきた (Novick and Schekman, 1979; Balch *et al.*, 1984; Kaiser and Schekman, 1990; Söllner *et al.*, 1993a; Sollner *et al.*, 1993b)．

膜交通の過程は，供与オルガネラからの小胞形成と標的オルガネラへの輸送，標的オルガネラへの繋留および融合という三つのプロセスに分けることができる．供与オルガネラごとに小胞形成に関わるタンパク質が異なれば，標的オルガネラによって小胞の繋留，融合に必要な膜タンパク質も異なるといったように，各プロセスに関連する分子群は経路ごとに特殊化している場合が多い．とりわけ小胞形成のステップでは，タンパク質や脂質を迅速かつ正確に濃縮する必要性があり，各供与オルガネラに固有の分子群がこの選択的な濃縮を実行する (Aridor and Traub, 2002)．

真核生物の各系統間において比較的よく保存された小胞形成を担う分子装置としては，clathrin や COPI, COPII といった被覆複合体の存在が挙げられる (Rothman and Orci, 1992; Doherty and McMahon, 2009)．このうち，特に研究が進んでいるものの一つに，細胞膜やトランスゴルジネットワーク (*trans*-Golgi netowork: TGN) からの小胞の形成を担う clathrin によるものがある (Brodsky *et al.*, 2001). Clathrin は，豚の脳から小胞を被覆するタンパク質として同定され (Pearse, 1975; Pearse, 1976)，三脚巴状の構造を基本単位として重合し，格子を作って膜を湾曲することにより生体膜から小胞の形成を促す (Kirchhausen, 2000)．そして，この clathrin 格子が足場となり，アダプタータンパク質などが小胞形成部位に集合し積み荷となるタンパク質や脂質を選択的に濃縮する (Aridor and Traub, 2002)．

Clathrin は植物にも存在し，動物や菌類と同様に細胞膜などで小胞の形成に寄与している (Blackbourn and Jackson, 1996, Konopla *et al.*, 2008, Ito *et al.*, 2012)．しかし，動物では数多く見つかっている小胞形成関連因子の明確なオルソログは，ダイナミン様タンパク質やアダプタータンパク質の一部を除いてほとんど植物では同定されていない．現在，細胞膜上でのエンドサイトーシス小胞形成は，植物にとっても適切かつ迅速に外部環境を感知し変化に応答するために重要であり，最適な環境の感知と応答をするための独自の発達を遂げてきたと予想される

(Ebine and Ueda, 2009). そこで, 本研究では未解明な点が多い植物における小胞形成機構を解明すべく, 陸上植物固有のダイナミン様タンパク質である DRP2 に関する解析と, 質量解析を利用した植物における新規の小胞形成関連分子の探索を行った.

第二章ではまず clathrin 依存的な小胞形成において, 供与膜の切断を実行する dynamin のシロイヌナズナにおけるオルソログであるダイナミン様タンパク質 (dynamin-related protain: DRP) に関する解析を行った. シロイヌナズナゲノム中には DRP1, 2, 3, 4, 5A および 5B の 6 グループの DRP が存在し, そのうち DRP1 と DRP2 に関してポストゴルジ膜交通への関与が報告されている (Fujimoto *et al.*, 2010). この二種の DRP は共に細胞膜上に局在し相互作用しながら小胞形成に寄与するが, DRP1 がほぼ全ての緑色植物類に保存されている一方で, DRP2 は現時点で陸上植物類からしか同定されていない (Miyagishima *et al.*, 2008)(図 1). このため, DRP2 は陸上植物が独自に発達させてきた小胞形成機構の一部を担っている可能性が推察される. そこで, まずは DRP2 に関する基礎的な知見を得るべく, 欠損変異体の表現形や植物体における発現部位, 細胞内での局在や挙動, 多量体形成能の有無などに関する検証を行った.

次に, 第三章では clathrin 依存性の小胞形成に寄与する未知分子の探索を行った. 前述のように, 植物における小胞形成機構は膜交通経路と同様に独自の発達を遂げたと予想され, 単純な動物の関連分子を用いたアミノ酸レベルにおける相同性検索では候補分子を得ることは困難であった. そこで本研究では植物固有の小胞形成機構関連分子を明らかにすべく, シロイヌナズナにおいてポストゴルジ膜交通への関与が既に示されている clathrin, アダプタータンパク質 AP2α, ダイナミン様タンパク質 DRP1, DRP2 の共免疫沈降産物に対する質量解析から, 各種相互作用因子の網羅的な同定を試みた.

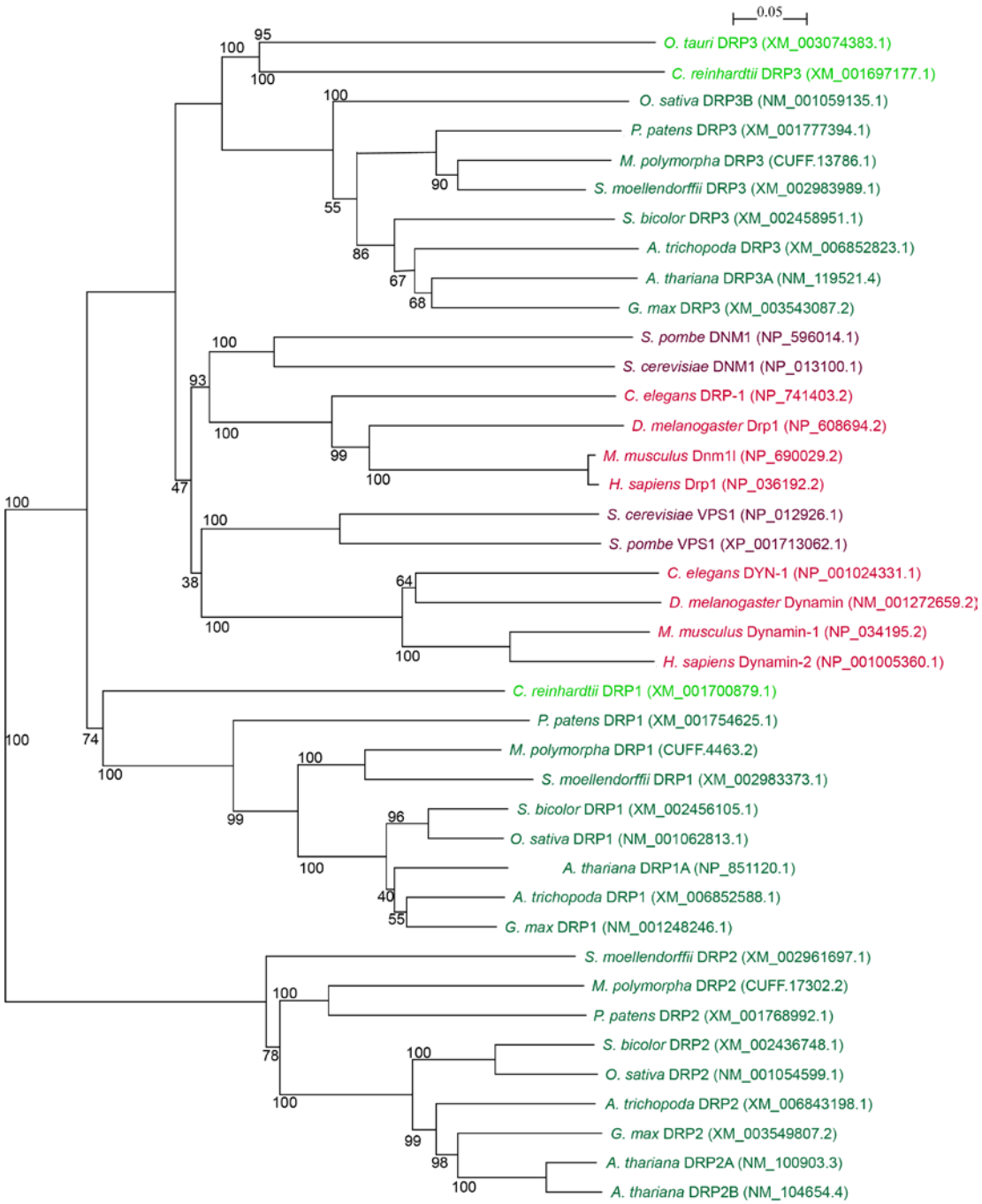


図 1 Dynamin 様タンパク質 DRP1, DRP2, DRP3 の分子系統樹.

各タンパク質のアミノ酸配列を CLUSTALX2 でアライメントし，近隣結合法で分子系統樹を作成した．深緑色は陸上植物類 (*Amborella trichopoda*, *Arabidopsis thariana*, *Glycine max*, *Marchantia polymorpha*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii, Sorghum bicolor*)，淡緑色は緑藻類 (*Chlamydomonas reinhardtii*i, *Ostreococcus tauri*)，赤色は動物類 (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*) 紫色は菌類 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) を，図中の数字はブートストラップ確率を，バーは枝長を示す．

第二章　植物のダイナミン様タンパク質 **DRP2** に関する解析

2.1 緒論

ダイナミン様タンパク質 (dynamin-related protain: DRP) は，細胞分裂やエンドサイトーシス，液胞輸送，ミトコンドリアの融合と分裂，ペルオキシソームの形成，小胞体形態の維持などさまざまな細胞活動の際に発生する生体膜の切断，融合や管状化に関与する GTPase である (Praefcke and McMahon, 2004, Hu *et al.*, 2009). DRP は幅広い真核生物種に保存され,機能に対応した分子構造を持つサブファミリーに分類される．なかでも，その性質が特に詳細に知られている分子種の一つに，動物細胞の clathrin 依存的なポストゴルジ膜交通に関与する Dynamin が挙げられる．Dynamin は小胞形成過程において，内側に貫入した生体膜の根元付近にリング，または螺旋状の多量体を形成し，GTP の加水分解によって発生するエネルギーを利用して機械的に生体膜を括り切る (Sever, 2002, Faelber *et al.*, 2011, Ford *et al.*, 2011).

アミノ酸配列解析から，dynamin は 5 つのドメインを持つと考えられている (図 2-1A) (Schmid and Frolov, 2002, Faelber *et al.*, 2012). GTPase domain は GTP の加水分解によりタンパク質立体構造変化のためのエネルギー供給を担う. Middle domain は後述の GTPase-effector domain とともにホモ二量体形成のためのタンパク質間相互作用を担う．GTPase-effector domain (GED) は GTPase 活性の調節を担う．また，middle domain と GED 近辺はそれぞれ bundle signaling element (BSE) とも呼ばれ，dynamin が機能的な構造となるための分子内相互作用を担う．Pleckstrin homology (PH) domain はホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PI4,5P2) と結合し，生体膜の湾曲や切断に寄与する. Proline-rich domain (PRD) はアクチンと結合する Src homology 3 (SH3) domain を持つタンパク質と相互作用し，dynamin を小胞形成部位に輸送する．PH domain および PRD の存在により，ホスファチジルイノシトールや細胞骨格が，dynamin 様タンパク質の局在や動態の制御に関与する可能性が推測される. GTPase domain, middle domain, GED は全ての DRP に保存されているが，PH domain と PRD を持つ分子種は動物と陸上植物にしか同定されていない. 陸上植物のゲノム中には DRP1-DRP4, DRP5A および DRP5B の 6 種類の DRP が存在し (Hong *et al.*, 2003)，このうち DRP1 と DRP2 がポストゴルジ膜交通への関与が報告されている (Fujimoto *et al.*, 2010).

シロイヌナズナの DRP1 グループは，DRP1A から DRP1E の 5 コピーから構成される．このうち，DRP1A, DRP1C, DRP1E が主に発現しており，clathrin 依存的なエンドサイトーシスを含むポストゴルジ膜交通に関与し，細胞伸長や細胞板形成に寄与している (Bednarek and Backues, 2010). DRP1A と DRP1C は細胞膜や細胞板の新規形成部位に局在する．*drp1a* 変異体は細胞板形成異常，細胞の成長極性異常，細胞壁の構成成分の変化，エンドサイトーシス活性の低下といった表現型を示す (Fujimoto and Tsutsumi, 2014). また DRP1A はオーキシンの排出輸送体である PIN タンパク質とも結合する (Mravec *et al.*, 2011). DRP1 グループのタンパク質は PH domain および PRD を持っておらず (図 2-1A)，現在までのところ一部の緑藻類を除いてほぼ全ての緑色植

物類のゲノム中で見つかっている.

一方 DRP2 グループはシロイヌナズナゲノム中には非常に高いアミノ酸配列相同性 (92%) を持つ DRP2A と DRP2B の 2 コピーが存在する (図 2-1B). DRP2A と DRP2B は共に細胞板の新規形成部位やトランスゴルジネットワーク, 細胞板に局在する (Jin *et al.*, 2001, Fujimoto *et al.*, 2008, Bednarek and Backues, 2010). DRP2A と DRP2B の優性阻害変異型タンパク質を発現させると, エンドサイトーシスが活性化し根毛の形態が異常となる (Taylor, 2011). DRP2 グループのタンパク質は PH domain および PRD を持ち, ドメイン構造は動物の dynamin と非常によく似ている. しかし, DRP2 グループは陸上植物類のゲノム中からしか同定されていない.

当研究室の先行研究により, DRP2B と DRP1A が細胞膜上で相互作用しながら共局在し, ポストゴルジ膜交通における小胞形成に機能することを明らかにした (Fujimoto *et al.*, 2010). しかし, DRP2 の生理的, 分子的機能に関する知見は DRP1 と比べて著しく少ない. そこで, 本研究では DRP2A と DRP2B に関して(i) DRP2 の T-DNA 挿入変異体はどのような表現型を示すか, (ii) DRP2A と DRP2B の発現パターンに差異はあるか, (iii) DRP2A と DRP2B は異性多量体を形成するか, (iv) DRP2 はポストゴルジ膜交通においてどのオルガネラに局在するか, (v) どのような分子が DRP2 の局在を制御しているかという点について解析を行った.

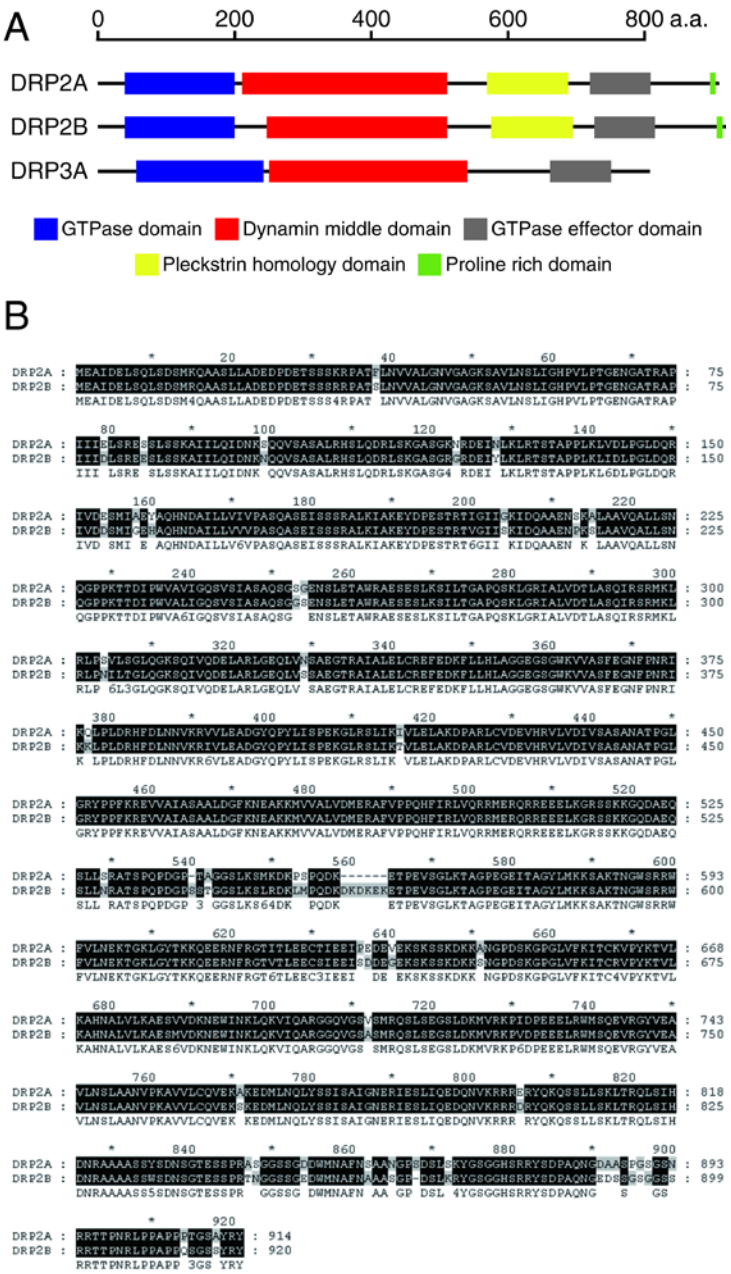


図 2-1 DRP のドメイン構造比較及び DRP2A と DRP2B のアミノ酸アライメント.

(A) DRP2A, DRP2B 及び DRP3A のドメイン構造の PFAM program (http://pfam.sanger.ac.uk) による予測結果.

(B) DRP2A と DRP2B のアミノ酸配列について CLUSTALX を用いて比較したアミノ酸アライメント. 網掛けされている領域は DRP2A 及び DRP2B が同一のアミノ酸を持つ領域を示す.

2.2 材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Colunmbia-0) およびタバコ (*Nicotiana benthamiana*, SR-1) はジフィーセブン (Jiffy Products) または 1x Murashige Skoog (MS) 固形培地 (Murashige and Skoog, 1962) 上で 22℃, 連続光条件下で生育した. *DRP2A*, *DRP2B* の T-DNA 挿入系統は Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University) より分譲を受けた (*drp2a-1*: SALK_018859, *drp2a-2*: SALK_011319, *drp2b*: SALK_041330). 細胞内局在解析に用いた DRP2B と GFP の融合タンパク質 (DRP2B-GFP) および DRP3B と単量体 KusabiraOrange の融合タンパク質 (DRP3B-mKO) を発現する形質転換植物体は当研究室の先行研究で作製された T2 系統を使用した (Fujimoto *et al.*, 2008, Fujimoto *et al.*, 2009). 発現パターン解析に用いた GUS レポーター遺伝子が DRP2A のネイティブプロモーター下 (*DRP2Apro:GUS*) や DRP2B のネイティブプロモーター下で (*DRP2Bpro:GUS*) で発現する形質転換植物体と, 細胞内局在解析に用いた DRP2A と GFP の融合タンパク質 (*DRP2A-GFP*) および DRP2B と TagRFP の融合タンパク質 (*DRP2B-TagRFP*) を発現する形質転換植物体は, アグロバクテリウム C58C1 株を用いたフローラルディップ法により作製した (Ye *et al.*, 1999). *mRFP-ARA7* および *ST-mRFP* を発現する形質転換植物体は, 東京大学の中野明彦教授, 上田貴志准教授, 植村知博助教および理化学研究所の庄田恵子協力技術員より分譲を受けた. GFP, TagRFP, mRFP や mKO など複数の蛍光タンパク質を発現する形質転換植物体に関しては交配により作成し, F1 集団を顕微鏡観察に用いた.

推定アミノ酸配列解析

推定アミノ酸の比較には Clustal X multiple alignment program (Thompson *et al.*, 1997) および GeneDoc program を用いた.

DRP2A および *DRP2B* に関する組換え遺伝子の構築

シロイヌナズナの DRP2A および DRP2B の EST クローン (DRP2A EST: accession no. AV529341, DRP2B EST: accession no. AV528687) はかずさ DNA 研究所より分譲を受けた. Yeast two-hybrid 法に用いるベクターや *DRP2A* および *DRP2B* の ORF やプロモーター領域を含むバイナリベクターなどは, In-Fusion HD cloning kit (Clontech) または Gateway cloning technology (Life technologies) を用いて作製した. 組換え遺伝子作成のために用いた Oligonucleotide primer は表 2-1 に示した.

DRP2A および *DRP2B* の発現部位解析用の GUS レポーター遺伝子を発現させる形質転換用 Ti プラスミドは以下のように作製した. まず, *DRP2A* および *DRP2B* それぞれの染色体上の上流に存在する遺伝子の 3′UTR の直後から開始コドンの直前までのそれぞれ 1545 塩基および 1436

塩基をプロモーター領域とし PCR により増幅した．その後，これらの PCR 産物は Directional TOPO Cloning Kit を用いて pENTR Gateway entry vector にサブクローニングした．サブクローニングした *DRP2A* および *DRP2B* のプロモーター領域は上述の Gateway cloning technology の LR 組換え反応によって pHGWFS7 に導入した (Karimi *et al.*, 2002).

DRP2A の C 末端に GFP を付加した融合タンパク質をコードする遺伝子を発現させる形質転換用 Ti プラスミドは以下のように作製した．まず，*DRP2A* の cDNA を上述の EST クローンから PCR により増幅した．その後，上述の各プロモーター領域と対応する cDNA の PCR 断片を 1 セットとし，両断片をオーバーラップする primer を用いて両断片が連続した断片を増幅する double-template PCR を行った．その結果，*DRP2Apro:DRP2A* という PCR 産物を得た．その後，これらの PCR 産物は Directional TOPO Cloning Kit を用いてサブクローニングした．サブクローニングした *DRP2Apro:DRP2A* フラグメントは LR 組換え反応によって pB7FWG (Karimi *et al.*, 2002) に導入した.

DRP2B の C 末端に TagRFP を付加した融合タンパク質をコードする遺伝子を発現させる形質転換用 Ti プラスミドは以下のように作製した．当研究室の先行研究により作製した *DRP2Bpro:DRP2B* フラグメントを pGWB659 (Nakamura *et al.*, 2010)に BP 組換え反応および LR 組換え反応により導入した.

蛍光蛋白質再構成法に用いるプラスミドは，以下のように作製した．*DRP2A*, *DRP2B* および *DRP3A* の ORF を Directional TOPO Cloning Kit を用いてサブクローニングした．サブクローニングしたフラグメントは LR 組み換え反応により pDEST-VYNE(R)^{GW} および pDEST-VYCE(R)^{GW} に導入した (Gehl *et al.*, 2009).

Yeast two-hybrid 法に用いるプラスミドは，以下のように作製した．サブクローニングした *DRP2A*, *DRP2B* および *DRP3A* の ORF を *Eco*RI および *Bam*HI の切断サイトを含む primer で PCR し，*Eco*RI および *Bam*HI で処理した．そして，同様に制限酵素処理した pGADT7 および pGBKT7 と In-Fusion HD system を用いて結合した.

T-DNA 挿入系統の遺伝子型解析

播種後 30 日目のシロイヌナズナ成葉のゲノム DNA は Edward ら (1991)の方法により抽出した．抽出した DNA を用いて以下の primer で PCR を行った後，電気泳動により遺伝子型の解析を行った．*DRP2A* および *DRP2B* の野生型を検出するための primer はそれぞれの遺伝子における T-DNA 挿入位置を挟むように，変異型を検出するための primer は T-DNA 内と挿入位置の直後に設計した．検出に用いた primer set は表 2-1 に示した.

DAPI による核染色

開花した花の雄蕊をピンセットで取り出し，カバーガラス上に垂らした水滴に雄蕊の先端を触れさせて花粉を水滴上に移した．その水滴中に 10 μg/ml DAPI を滴下し，後述の通り，共焦点顕微鏡を用いて観察を行った．

グルタールアルデヒド固定処理による胚珠内部構造の可視化

胚珠の内部構造の可視化は，Christensen ら (1997) の方法に従って行った．グルタールアルデヒドにより固定処理をすると核などにグルタールアルデヒドが蓄積し，自家蛍光が発生することが知られている．開花直前期 (受精前) の花から雌蕊を取り出し，固定液 (4% glutaraldehyde, 30mM HEPES 緩衝液 (PH 6.9)) 中に入れて 30 分減圧した．その後，一晩室温で固定した．固定液を取り除いた後 20, 40, 60, 80, 100%のエタノールシリーズに 10 分ずつ浸けて脱水した．そして，カバーガラス上に垂らした透明化液 (2:1 mixture of benzyl benzoate: benzyl alchol) に雌蕊を投入し，ピンセットで分解し共焦点顕微鏡ユニットを用いて観察を行った．

半定量 RT-PCR 解析

播種後 30 日目シロイヌナズナ成葉の total RNA は RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い，メーカーのマニュアルに従って抽出した．抽出した RNA は RNase-free DNase I (QIAGEN) を用いて精製し，SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行った．その後，KOD FX (TOYOBO) を用いて半定量 PCR 反応を行った．PCR 反応に用いた primer set は表 2-1 に示した．

定量 RT-PCR 解析

シロイヌナズナの各組織の total RNA は RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い，メーカーのマニュアルに従って抽出した．抽出した RNA は RNase-free DNase I (Ambion) を用いて精製し，SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った．得られた cDNA を用いて，7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Premix Ex Taq (Probe qPCR) および Dual Labeled TaqMan probes (FAM-TAMRA) (TaKaRa Bio) により *DRP2A*, *DRP2B* and *ACT8* の転写量の定量を行った．*DRP2A* および *DRP2B* の転写量は *ACT8* の転写量により標準化した．解析に用いた primer および probe は表 2-1 に示した．

GUS 染色

まず，サンプルを含む容器に 90%アセトンを加え，氷上に一晩静置した．静置後，サンプルを 100 mM リン酸バッファー (pH 7.0) で洗浄し，アセトンを取り除いた．続いて GUS 染色液

(50 mM リン酸バッファー (pH 7.0), 1 mM EDTA・2Na (pH 8.0), 0.5 mM ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム, 0.5 mM ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム, 0.5 mg/ml X-Gluc, H_2O) を適量加え, 減圧下で 15 分静置した. 減圧後は 37℃暗所にて 12 時間インキュベートした. その後エタノール / 酢酸 (1:1) を加え, クロロフィル等の色素を除去した後, Hoyer's solution (7.5 g gum Arabic, 5 ml glycerin, 100 g chloral hydrate, 30 ml H_2O) を用いてサンプルの透明化処理を行った (Stangeland and Salehian, 2002). 顕微鏡観察は正立顕微鏡 Eclipse E600 (Nikon)と対物レンズ (N.A. = 0.13, 4 倍) および CCD カメラ DS-Ri1 (Nikon) で観察, 記録した. 得られた画像は出力に際して Photoshop CS5 (Adobe) により調整した.

共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy: CLSM)

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察は, 共焦点レーザー顕微鏡ユニット C1Si (Nikon) または LSM780 (Carl Zeiss)と, 油浸レンズ (N.A. = 1.40, 63 倍または 100 倍) を用いて行われた. 両システム共に, DAPI の励起には 405- nm ダイオードレーザーが, GFP と Venus の励起には 488- nm Ar/Kr レーザーが, mKO, mRFP, TagRFP および自家蛍光の励起には 561- nm ダイオードレーザーが用いられた. DAPI の蛍光シグナルの検出には 460/25- nm フィルター, GFP および Venus の蛍光シグナルの検出には 515/30- nm フィルター, mKO, TagRFP および mRFP の検出には 590/70- nm フィルター, 自家蛍光の検出には 650- nm ロングパスフィルターを用いた. 得られた画像は Photoshop CS5 (Adobe) により調整し, Image-pro plus 4.0 (Media Cybernetics) により解析を行った.

斜照明蛍光顕微鏡 (Variable Incidence Angle Fluorescent Microscopy: VIAFM)

斜照明蛍光顕微鏡を用いた観察は, Fujimoto ら (2010) の方法に従って行った. 全ての画像は蛍光顕微鏡 Eclipse Ti (Nikon) および CMOS カメラ Zyla 4.2s (Ander) を用いて取得した. 得た画像は Photoshop CS5 (Adobe)により調整し, Image-pro plus 4.0 (Media Cybernetics) により解析を行った.

Yeast two-hybrid (Y2H) 法

DRP2A, DRP2B および DRP3A の ORF がそれぞれ導入された pGADT7 および pGBKT7 を一対ずつ酵母 Y2HGold 株 (Clontech) に形質転換した. Y2HGold 株はロイシン, トリプトファン, ヒスチジンおよびアデニンの合成能を失っている. 形質転換株は SD/−Leu/−Thr 培地 (ロイシン, スレオニン欠失合成デキストロース培地) を用いてコロニー選抜を行った. その後, SD/−Leu/−Trp/−His 培地 (ロイシン, スレオニン, ヒスチジン欠失合成デキストロース培地) 上での二日後の生育を観察した.

蛍光蛋白質再構成 (Bi-molecular Fluorescent Complementation: BiFC) 法

発芽 3 週間後のタバコの葉へのアグロバクテリウムインフィルトレーション法による一過的発現系を用いて解析を行った. DRP2A, DRP2B および DRP3A の ORF と nVenus および cVenus (nVenus: Venus の N 末端 173 残基, cVenus: Venus の C 末端 84 残基) の融合タンパク質を発現するプラスミドをそれぞれアグロバクテリウム C58C1 株に導入した. 各形質転換株は 5 ml の YEB 液体培地 (50 µg/ml rifampicin, 10 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Kanamycin) 中で 28℃で一晩培養した. 培養後のアグロバクテリウムは集菌後インフィルトレーション溶液 (10 mM MES, 10 mM $MgCl_2$, and 0.15 mM acetosyringone) 中に再撹拌した. 再撹拌されたアグロバクテリウムはタバコの葉にシリンジを用いて適切な圧力で浸透させた. 二種類のプラスミドを共発現させるため, 二種類のアグロバクテリウムを接種前に混合した. 接種後 48 時間のタバコの葉を共焦点レーザー顕微鏡での観察に用いた.

Co-immunoprecipitation mass spectrometry (CoIP-MS) 法

約 0.7 g の発芽 10 日後のシロイヌナズナの形質転換幼植物体を海砂と共に 1 ml の抽出バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 400 mM sucrose, 1% (v/v) Triton X-100, a complete mini EDTA 破砕した. 得られた抽出物を 4 度条件下で 2 回 (5,000 xg および 20,000 xg) それぞれ 15 分間遠心分離し, 上清を得た. 得られた上清を µMACS Anti-GFP Beads (Miltenyi Biotec) を用いて共免疫沈降し, SDS-PAGE により含まれるタンパク質を分離した. 得られた共免疫沈降物は Fujiwara ら (2014) の方法に従って調整し, 質量解析を行った.

阻害剤処理

発芽 10 日後のシロイヌナズナ幼植物体は各種阻害剤(10 µM oryzalin, 50 µM latrunculin B, 50 µM wortmannin)を加えた 1x MS 液体培地中で 1 時間 (oryzalin および latrunculin B) または 2 時間 (wortmannin) 培養し, 観察に用いた. この際, 同様の培養時間で 1% (oryzalin および wortmannin) または 2% (latrunculin B) の DMSO で処理したシロイヌナズナ幼植物体をそれぞれコントロールとして用いた.

表 2-1 本研究で用いた primer および probe のリスト.

Name	Sequence
DRP2A GUS fw	CACCGTCCGCAGATCTTGCCAGAT
DRP2A GUS rv	CGCGACTAGCAAAAGCCCTC
DRP2B GUS fw	CACCGAGTACAGAGAACAGGAGGA
DRP2B GUS rv	CGTAACTTGCACAGCGAATC
DRP2A pro-ORF fw	AGGGCTTTTGCTAGTCGCGATGGAGGCGATCGATGAGTTG
DRP2A pro-ORFrv	CAACTCATCGATCGCCTCCATCGCGACTAGCAAAAGCCCT
DRP2A pGADT7 fw	GGAGGCCAGTGAATTCATGGAGGCGATCGATGAGTTGTCT
DRP2A pGADT7 rv	CGAGCTCGATGGATCCCTAATACCTATAAGCTGAACCTGT
DRP2A pGBKT7 fw	CATGGAGGCCGAATTCATGGAGGCGATCGATGAGTTGTCT
DRP2A pGBKT7 rv	GCAGGTCGACGGATCCCTAATACCTATAAGCTGAACCTGT
DRP2B pGADT7 fw	GGAGGCCAGTGAATTCATGGAGGCGATCGATGAGTTGTCT
DRP2B pGADT7 rv	CGAGCTCGATGGATCCCTAATACCTGTAAGATGATCCAGA
DRP2B pGBKT7 fw	CATGGAGGCCGAATTCATGGAGGCGATCGATGAGTTGTCT
DRP2B pGBKT7 rv	GCAGGTCGACGGATCCCTAATACCTGTAAGATGATCCAGA
DRP3A pGADT7 fw	GGAGGCCAGTGAATTCATGACTATTGAAGAAGTTTCCGGT
DRP3A pGADT7 rv	CGAGCTCGATGGATCCTTAGAATCCGTATCCATTTTGGTG
DRP3A pGBKT7 fw	CATGGAGGCCGAATTCATGACTATTGAAGAAGTTTCCGGT
DRP3A pGBKT7 rv	GCAGGTCGACGGATCCTTAGAATCCGTATCCATTTTGGTG
tag check DRP2A insertion fw	CGATTTCGGAACCACCATCAAACAG
tag check DRP2A WT fw	GGAACGCGCTTTTGTACCAC
tag check DRP2A rv	CTCTCCAAGAAGGAAACAGTG
tag check DRP2B insertion fw	CGATTTCGGAACCACCATCAAACAG
tag check DRP2B WT fw	TGGTCCCGTAACCTAGGAG
tag check DRP2B rv	TCTATGAAGCCCTACAGCCA
RT-PCR DRP2A fw	GTGCTTTGAGACATTCTCTG
RT-PCR DRP2A rv	AAAACGGGACACAATGCGCTTC
RT-PCR DRP2B fw	CTCACAATGCGTTGGTTCTC
RT-PCR DRP2B rv	GAAACAGGGACCAATCCGAA
RT-PCR ACT8 fw	ACATCAAGGAGAAGCTTTCC
RT-PCR ACT8 rv	CCGTCATGGAAACGATGTCT
qRT-PCR DRP2A fw	GACAACAGTGGCACTGAGAGTA
qRT-PCR DRP2A rv	CGTACTTTGACAATGAGTCTGAGG
qRT-PCR DRP2B fw	GACAATAGTGGCACTGAAAGCA
qRT-PCR DRP2B rv	TATCTCTTCAATGAGTCAGGTCCA
qRT-PCR ACT8 fw	TCGTGGCACCACCCGAGA
qRT-PCR ACT8 rv	GCCTTAGAGATCCACATCTGCTG
DRP2A probe	AAGGCATTCATCCAGTCGTCCCCTGAAG
DRP2B probe	TCATCCAGTCCTCTCCTGATGACCCTCC
ACT8 probe	TTGGTGGTTCTATCCTTGCTTCCCTCAGC

2.3 結果

2.3.1 *DRP2A* および *DRP2B* の T-DNA 両ヘテロ挿入系統は配偶体致死を示す

DRP2 遺伝子の植物体における機能を探索するために, *DRP2A* および *DRP2B* に T-DNA が挿入された系統を用いて両遺伝子もしくはそれぞれの単独遺伝子破壊株における表現型の解析を行った. *DRP2A* に対しては, T-DNA が第 5 イントロンに挿入されている *drp2a-1* と第 14 イントロンに挿入されている *drp2a-2* を, *DRP2B* に対しては T-DNA が第 4 エキソンに挿入されている *drp2b* という系統を用いた (図 2-2A). これらの T-DNA 挿入系統における遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析したところ (primer 位置は図 2-2A に示す), *drp2a-1*, *drp2a-2* および *drp2b* の全ての系統で *DRP2A* および *DRP2B* 両遺伝子の mRNA 蓄積量が野性株と比較して著しく低下していた (図 2-2B). しかし, *drp2a-1* と比較して *drp2a-2* でより明確に mRNA 蓄積量が低下していたため, 今後の実験においては *DRP2A* の遺伝子破壊系統として *drp2a-2* を, *DRP2B* の遺伝子破壊系統として *drp2b* を用いた. 以下, *DRP2A*, *DRP2B* 各遺伝子座に T-DNA が挿入されていないものは大文字で (*A* または *B*), 挿入されているものは小文字で (*a* または *b*) と表記する.

次に, *DRP2A*, *DRP2B* 両遺伝子の単独遺伝子破壊系統の生育における表現型を解析した. 発芽 20 日後, 40 日後共に野生株との間で生育に顕著な差は見られなかった (図 2-2C). そこで, *DRP2A* および *DRP2B* 両遺伝子が共に破壊されている系統 (*drp2aabb*) の作出を目指し, 交配後代からそのような個体系統を選抜しようと試みたが, そのような系統は得られなかった. また, *DRP2A* にホモに *DRP2B* にヘテロに T-DNA が挿入されているもの (*drp2aaBb*) や, 逆に *DRP2A* にヘテロに *DRP2B* にホモに T-DNA が挿入されているもの (*drp2Aabb*) も得られなかった. 以上の結果から *DRP2* 遺伝子の配偶体形成過程, 生殖過程または胚発生過程への関与が示唆された.

そこで, 変異株で上記のどの過程で表現型が現れているか, つまり, *DRP2* がどの過程に関わっているのかを調べるために, *DRP2A* および *DRP2B* 座への T-DNA 挿入が共にヘテロとなっている変異株 (*drp2AaBb)* と野生株 (*drp2AABB*) との間で正逆交雑を行い, その後代での遺伝子型の解析を行った (表 2-2A). その結果, 正逆交雑後代から遺伝子型が *drp2AaBb* となっている個体は得られなかった. つまり,遺伝子型が *drp2ab* となっている配偶体は致死であることがわかった. よって, *2A* および *2B* 両遺伝子の最低 1 コピーが雌雄両配偶体の形成もしくは配偶子発生に必須であることが示唆された. 同様の結果は, Backues ら (2010) によっても報告されている.

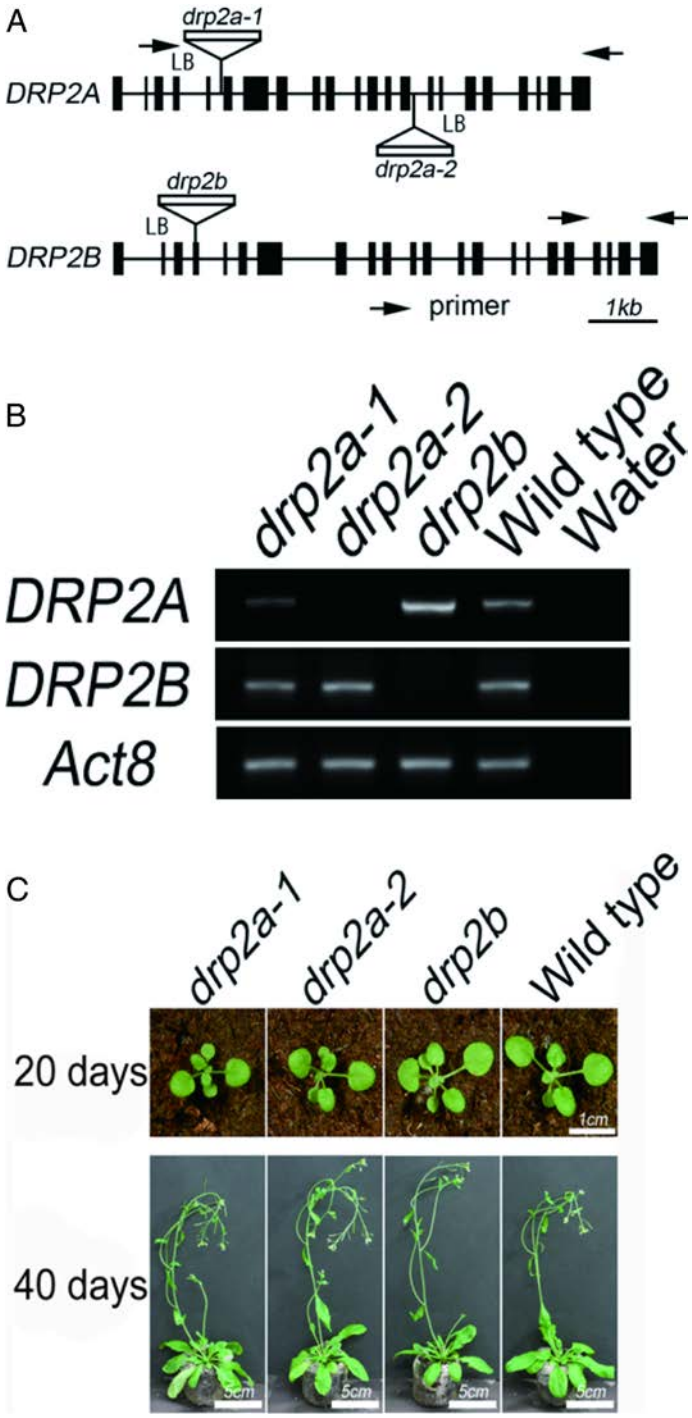


図 2-2 DRP2A 及び DRP2B の T-DNA 挿入系統の表現型.

(A) 各 T-DNA 挿入系統における DRP2A, DRP2B 遺伝子上の T-DNA 挿入位置.
矢印は RT-PCR で用いたプライマーの位置を示す.

(B) 各 T-DNA ホモ挿入系統における DRP2 及び ACT8 の半定量 RT~PCR 産物の電気泳動像.

(C) 各 T-DNA ホモ挿入系統における表現型観察. 発芽 20 日後及び 40 日後に
おける生育を比較した.

表 2-2 野生株 (*drp2AABB*) と T-DNA 両ヘテロ挿入系統 (*drp2AaBb*) の正逆交雑で得られた後代の遺伝子型の分離

♀ ＼ ♂		T-DNA 両ヘテロ挿入系統 (*drp2AaBb*)			
		drp2AB	*drp2Ab*	*drp2aB*	*drp2ab*
野生株 (*drp2AABB*)	*drp2AB*	*drp2AABB* 30	*drp2AABb* 10	*drp2AaBB* 14	*drp2AaBb* 0

♂ ＼ ♀		T-DNA 両ヘテロ挿入系統 (*drp2AaBb*)			
		drp2AB	*drp2Ab*	*drp2aB*	*drp2ab*
野生株 (*drp2AABB*)	*drp2AB*	*drp2AABB* 19	*drp2AABb* 19	*drp2AaBB* 16	*drp2AaBb* 0

2.3.2 *DRP2A* および *DRP2B* の T-DNA 両ヘテロ挿入系統は雌雄両性配偶体の形成が途中で停止する

前節の結果から *DRP2* 遺伝子の配偶体形成過程への関与が示唆された. *DRP2* 遺伝子の欠損が引き起こす表現型をより詳細に観察するため, まず, 雄性配偶体の形態を解析した. 成熟期である葯裂開後の花粉を光学顕微鏡により観察したところ, T-DNA 両ヘテロ挿入系統 (*drp2AaBb*) の花粉からは, 小さく皺が寄るといった形態を示すものが観察された (図 2-3A, 矢尻).

この異常な形態を示す花粉の割合を測定したところ, 野生株と比較して有意に高く (図 2-3B), その割合は 19% (S.D. = ±2) となっていた. よって, これらの花粉の異常な形態は, 前節の結果と考え合わせると, *DRP2A*, *DRP2B* 両方の遺伝子への T-DNA 挿入による破壊が原因のものと考えられた.

そこで, 異常な形態を示す花粉の内部の状態を DAPI による核染色を利用して観察した. すると, 野生株の正常な花粉では 3 核となっているが, 異常な形態を示した花粉では 2 核となっており, 花粉の発生が中途で停止していることが確認された (図 2-3C).

次に, 雌性配偶体である胚珠の形態を調べた. 受粉直前期の胚珠を観察したところ, 野生株と変異株 (*drp2AaBb*) の間で明確な差異は見られなかった. 次に, 受粉後ある程度発達した莢内の胚珠を観察したところ, 変異株の莢からは萎縮した胚珠が多く見られた (図 2-3D, 矢尻).

そこで, 花粉と同様にその割合を測定したところ, 野生株と比較して有意に高く (図 2-3E), その割合は 21% (S.D. = ±1.3) となっていた. この結果から, 雌性配偶体形成においても *DRP2A*, *DRP2B* 両遺伝子への T-DNA 挿入による影響は明らかであり, 雌性配偶体形成のより早い時期においても野生株と変異株 (*drp2AaBb*) の間で差異は現れているものと考えられた.

そこで, 受粉直前期の胚珠の内部構造をグルタールアルデヒド固定処理により可視化して観察した (図 2-3F). その結果, 野生株ではすでに全ての胚珠で極核が融合して 1 個になっている時期でも, 変異株においては極核が融合しない胚珠や, 卵細胞および助細胞の形態や核の配置が異常となった胚珠が観察された.

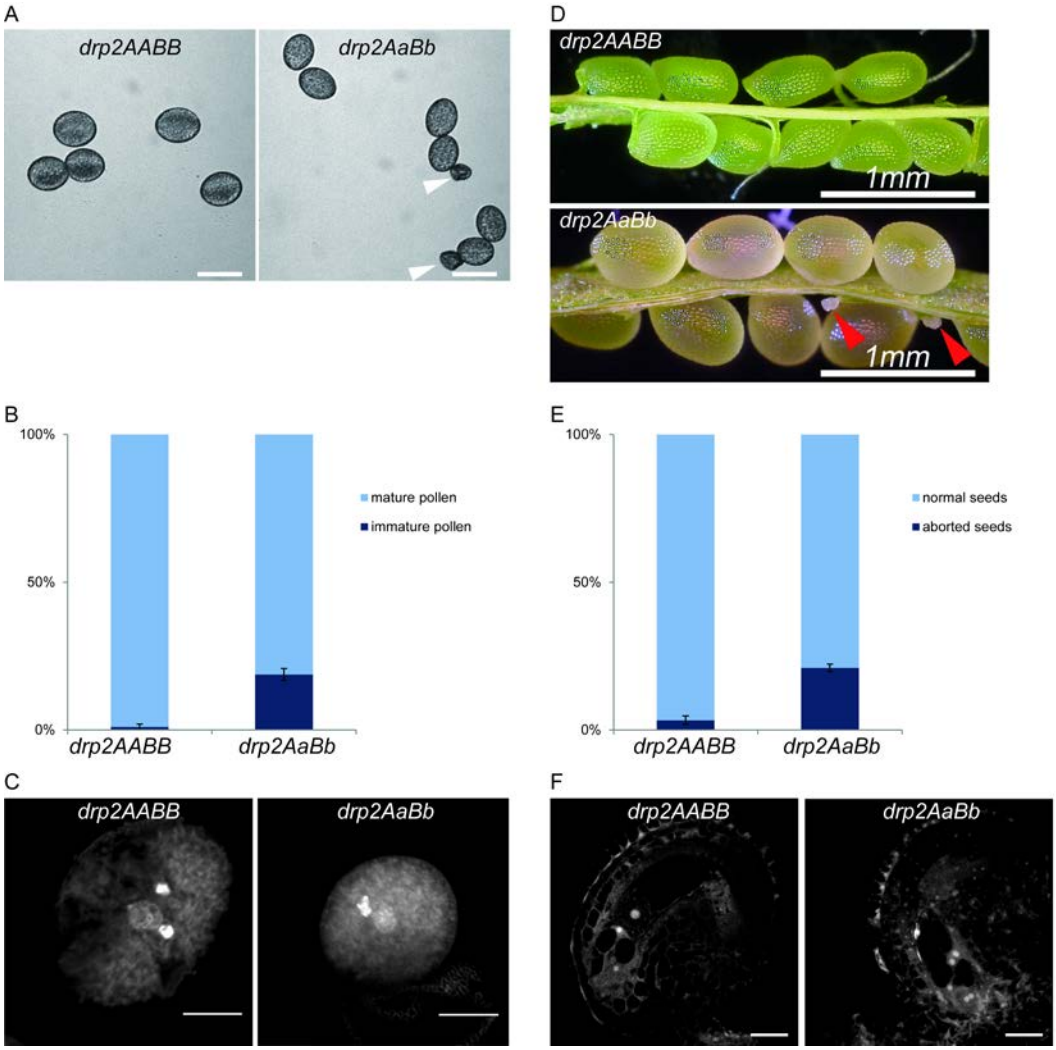


図 2-3 野生型株(*drp2AABB*)と T-DNA 両ヘテロ挿入系統 (*drp2AaBb*) における雌雄両性配偶体の形態の比較.

(A) 野生株及び両ヘテロ挿入系統から得た花粉の顕微鏡像. 裂開直後の葯から得た. 矢尻は形態異常の花粉を示す. バーの長さはそれぞれ 50 μm.

(B) 野生株及び両ヘテロ挿入系統から得た花粉における異常な形態を示す花粉の割合. n = 100. 3 反復. エラーバーは標準偏差を示す. *P < 0.05. student's t-test.

(C) DAPI 染色ににより核を染色した野生株及び両ヘテロ挿入系統から得た花粉の蛍光顕微鏡像. バーの長さはそれぞれ 10 μm.

(D) 野生株及び両ヘテロ挿入系統から得た胚珠の顕微鏡像. 開花 10 日後の莢から得た. 矢尻は形態異常の胚珠を示す.

(E) 野生株及び両ヘテロ挿入系統から得た胚珠における異常な形態を示す胚珠の割合. n ≥ 40. 3 反復. エラーバーは標準偏差を示す. *P < 0.05. student's t-test.

(F) グルタールアルデヒド処理により内部構造を可視化した野生株及び両ヘテロ挿入系統から得た胚珠の蛍光顕微鏡像. バーの長さはそれぞれ 20 μm.

2.3.3 DRP2A および DRP2B は類似の発現パターンを示す

高いアミノ酸配列相同性を持つ *DRP2A* と *DRP2B* の発現パターンの差異を検証するため，両遺伝子の mRNA を識別可能な定量 RT-PCR 用の probe を設計した．この probe を用いて野生型および *DRP2A* と *DRP2B* それぞれの T-DNA 挿入変異株 (*drp2aaBB*, *drp2AAbb*) の葉で定量 RT-PCR を行ったところ，野生型からは *DRP2A*, *DRP2B* 共に検出されたが, *DRP2A* のホモ T-DNA 挿入変異株 (*drp2aaBB*) では *DRP2A* の，逆に *DRP2B* のホモ T-DNA 挿入変異株 (*drp2AAbb*) からは *DRP2B* の著しい減少が検出された (図 2-4A, B). また，*DRP2A* の T-DNA 挿入変異株 (*drp2aaBB*)における *DRP2B* の転写量は 1.3 倍に，*DRP2B* のホモ T-DNA 挿入変異株 (*drp2AAbb*)における *DRP2A* の転写量は約 2 倍になっていた．以上の結果から，この実験系で *DRP2A* および *DRP2B* の転写量を特異的に検出できることが確認された．

次に，*DRP2A* と *DRP2B* の発現パターンを比較するため，シロイヌナズナの各組織において定量 RT-PCR を行った．その結果, *DRP2A* および *DRP2B* は共に発芽 10 日後の幼植物体, 葉，茎，花でその発現が検出された (図 2-4A, B). 以上の結果から, *DRP2A* および *DRP2B* は雌雄両性配偶体だけでなく植物体の様々な組織で発現している可能性が示唆された．

より詳細に *DRP2A* および *DRP2B* の発現パターンの差異を検証するため, GUS レポーター遺伝子を用いた両遺伝子発現パターンの組織間比較を行った．*DRP2A* および *DRP2B* それぞれのプロモーター制御下で GUS が発現する形質転換植物体の発芽 10 日後の幼植物体を用いて観察を行ったところ，両遺伝子共に植物体全体で GUS が発現していた (図 2-4C). また，両遺伝子共に根端分裂組織付近および維管束近辺で特に強い発現が観察された (図 2-4C，矢尻). これらの結果から，*DRP2A* および *DRP2B* は植物体内でほぼ同様の発現パターンを示すことが明らかになった．

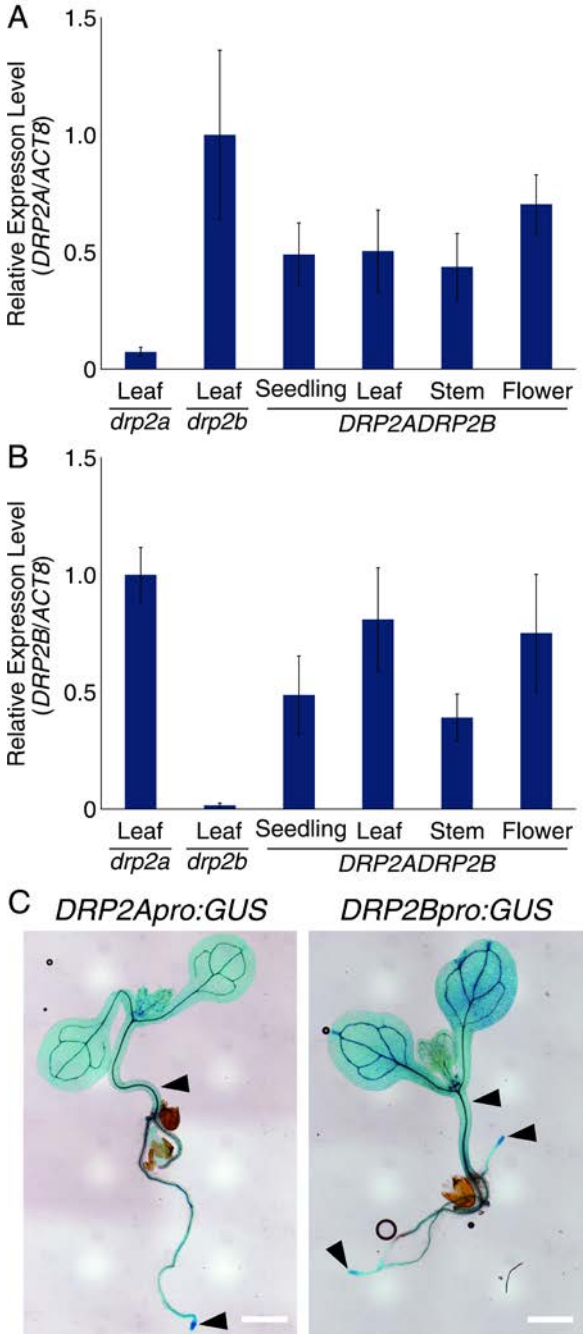


図 2-4 シロイヌナズナにおける *DRP2A* 及び *DRP2B* の発現パターン解析.

(A, B) 定量 RT-PCR による各器官における *DRP2A* (A) 及び *DRP2B* (B)の mRNA 転写量の比較. エラーバーは標準偏差を示す.

(C) 発芽 10 日後のシロイヌナズナの幼植物体における *DRP2Apro:GUS* と *DRP2Bpro:GUS* の発現パターン解析. 矢印は根端分裂組織を, 矢尻は維管束を示す. バーの長さはそれぞれ 1 mm.

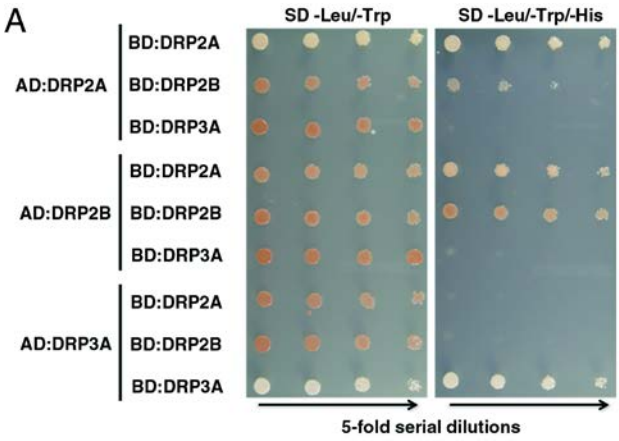
2.3.4 DRP2A と DRP2B は相互作用する

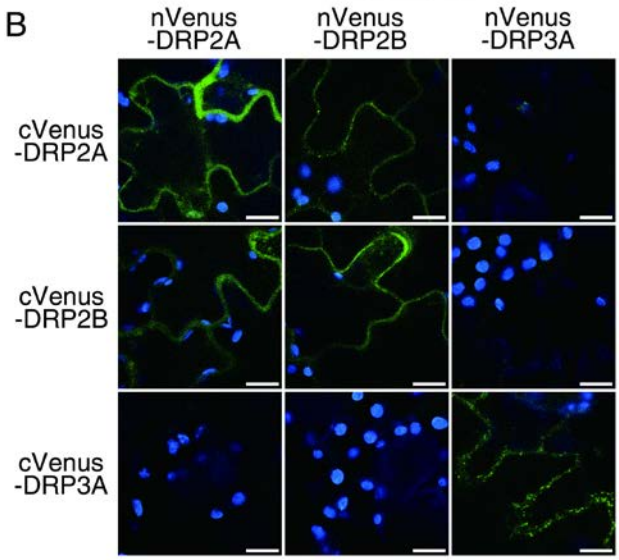
DRP2A と DRP2B の相互作用の有無を確認するため, DRP2A, DRP2B, DRP3A 間での yeast two-hybrid (Y2H) 法による解析を行った. DRP3A は DRP2A および DRP2B とは異なるドメイン構造を示す DRP で, 多量体を形成しミトコンドリア分裂に関与することが知られている (Arimura *et al.*, 2004) (図 2-1A). その結果, DRP2A-DRP2A 間, DRP2B-DRP2B 間および DRP2A-DRP2B 間で相互作用が認められた (図 2-5A). DRP3A-DRP3A 間での相互作用は確認されたが, DRP2A-DRP3A 間および DRP2B-DRP3A 間の相互作用は確認されなかった.

さらに植物体内での DRP2A と DRP2B との相互作用の有無を検証するため, タバコの葉へのアグロインフィルトレーション法を用いた蛍光蛋白質再構成 (Bi-molecular Fluorescent Complementation: BiFC) 法による分子間相互作用解析を行った. cVenus および nVenus と DRP2A および DRP2B の結合タンパク質を共発現させると, cVenus-DRP3A と nVenus-DRP3A を共発現させた時と同様に, Venus のシグナルが観察された (図 2-5B).

加えて, シロイヌナズナ植物体内における DRP2A と DRP2B の相互作用の有無を検証するため, DRP2A-GFP 発現形質転換植物体の抽出物に対し抗 GFP 抗体を用いて共免疫沈降を行い, その共免疫沈降物を質量解析することにより含まれる相互作用するタンパク質を網羅的に同定した. 3 回の独立の共免疫沈降および質量解析の結果のいずれからも DRP2A および DRP2B は検出された (図 2-5C). しかし, コントロールとして用いた GFP 単体を発現する形質転換植物体からは DRP2A も DRP2B も検出されなかった.

以上の結果から, シロイヌナズナ植物体中で DRP2A 同士, DRP2B 同士, そして DRP2A と DRP2B 間で相互作用することが明らかになった.





C

Accession	Annotation	Score		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
AT1G10290	dynamin-like protein 6, DRP2A	2497	1036	752
AT1G59610	dynamin-like 3, DRP2B	1782	770	360

図 2-5 DRP2A と DRP2B にける相互作用の有無の検証.

(A) DRP2A, DRP2B, DRP3A 間における yeast two-hybrid 解析. 酵母にそれぞれ対となるプラスミドを導入し，選抜培地における生育を比較した.

(B) DRP2A, DRP2B, DRP3A 間における BiFC 解析. 各パネルは各種 DRP と cVenus または nVenus の融合タンパク質をそれぞれ一過的に発現させたタバコの葉の共焦点レーザー顕微鏡像. グリーンのシグナルが蛍光タンパク質 Venus の蛍光を，ブルーのシグナルは葉緑体の自家蛍光を表す. バーの長さはそれぞれ 20 μm.

(C) DRP2A-GFP の共免疫沈降物の質量解析結果における DRP2A と DRP2B のスコア. 植物材料として DRP2A-GFP 発現植物体を，抗体として抗 GFP 抗体を用いた. スコアは Mascot (Matrix Science) を用いて算出した.

2.3.5 DRP2A および DRP2B は共局在する

前節までの結果により DRP2A および DRP2B の発現部位と相互作用が明らかになったが，両タンパク質が同一細胞内で共発現し，さらに共局在するか否かを明らかにするため，DRP2A-GFP と DRP2B-TagRFP を共に native promoter 下で発現する形質転換植物体を作出し，その細胞内局在を比較した．まず，共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて形質転換植物体の根の表皮細胞を観察したところ，両蛍光シグナルが細胞内においてドット状の構造体を形成するとともに (図 2-6A)，細胞板 (図 2-6A，矢尻) において共局在する様子が観察された．

また，細胞膜上における DRP2A および DRP2B の詳細な局在パターンを比較するため，同植物体をさらに斜照明蛍光顕微鏡 (VIAFM)を用いて観察した．VIAFM は細胞壁の存在する植物細胞においてもカバーガラス界面から 100-400 nm に存在する蛍光タンパク質のみを励起することが出来るため，細胞膜近傍の高感度な蛍光観察が可能である．この観察方法を用いた解析の結果，輝点ごとのシグナル強度に差はあるものの，ほぼ全ての輝点で両蛍光タンパク質のシグナルが直径 200-500 nm のドット状に共局在していた (図 2-6B)．

以上の結果から，DRP2A および DRP2B は同一細胞中で共発現しており，細胞膜や細胞板を含めたオルガネラにおいて，ドット状の構造体に共重合している可能性が示唆された．

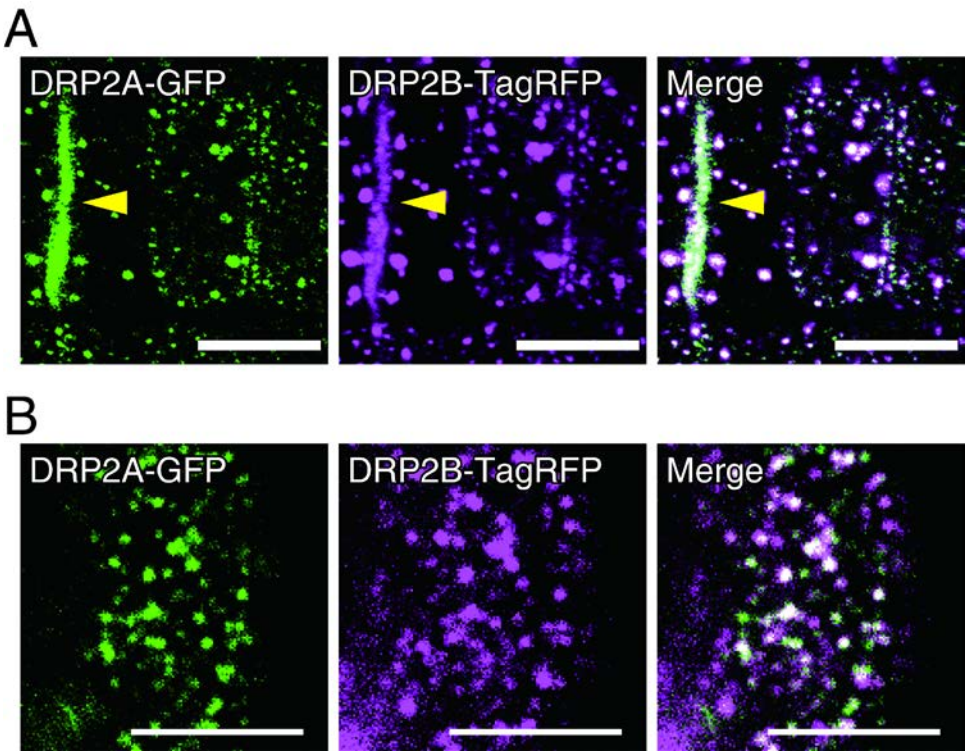


図 2-6 DRP2A と DRP2B の共局在の有無の検証.

(A) DRP2A-GFP (グリーン) 及び DRP2B-TagRFP (マジェンタ) を共発現するシロイヌナズナ根表皮細胞の共焦点レーザー顕微鏡像. 矢尻は形成中の細胞板を示す. バーの長さはそれぞれ 10 μm.

(B) DRP2A-GFP (グリーン) 及び DRP2B-TagRFP (マジェンタ) を共発現するシロイヌナズナ根表皮細胞の斜照明蛍光顕微鏡像. バーの長さはそれぞれ 5 μm.

2.3.6 DRP2 はさまざまなポストゴルジオルガネラに局在する

前節の結果から，DRP2 が細胞膜や細胞板に局在することが示されたが，他のポストゴルジ膜交通に関わるオルガネラへの局在を検証するため，各種ポストゴルジオルガネラマーカー, mRFP-ARA7 (エンドソーム) (Ebine *et al.*, 2011), ST-mRFP (ゴルジ体) (Uemura *et al.*, 2014), CLC-mKO (トランスゴルジネットワーク: TGN) および細胞膜 (PM) (Ito *et al.*, 2012)) と DRP2A-GFP または DRP2B-GFP を共発現する形質転換植物体を作出し，根の表皮細胞を CLSM で観察した．その結果, DRP2A-GFP および DRP2B-GFP 大部分は CLC-mKO と共局在し，さらに mRFP-ARA7 と ST-mRFP の一部とも共局在していた (図 2-7A)．また，これらポストゴルジオルガネラマーカーとの共局在の割合は，ネガティブコントロールとして用いたミトコンドリアの切断部位に局在する DRP3B-mKO と比べ有意に高い値を示した (図 2-7B, C)．

以上の結果から, DRP2A と DRP2B は共に，エンドソームやゴルジ体, TGN，細胞膜を始めとした幅広いポストゴルジオルガネラに局在することが示唆された．

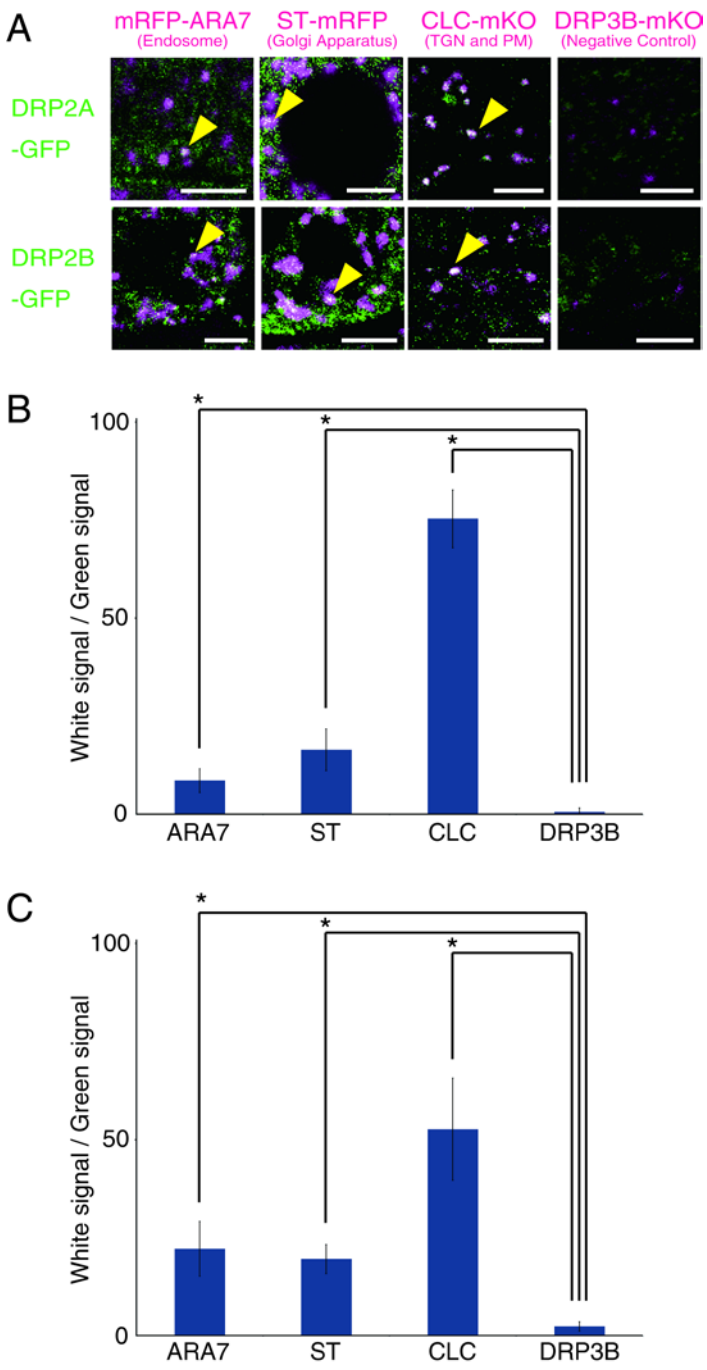


図 2-7 DRP2A 及び DRP2B の細胞内局在解析.

(A) DRP2A-GFP または DRP2B-GFP (グリーン) と各種ポストゴルジオルガネラマーカー (マジェンタ) を共発現するシロイヌナズナ根表皮細胞の共焦点レーザー顕微鏡像. 矢尻は両シグナルが共局在する部位を示す. バーの長さはそれぞれ 5 μm.

(B, C) DRP2A-GFP (B) 及び DRP2B-GFP (C) の全シグナル中で各種ポストゴルジオルガネラマーカーと共局在するシグナルの割合. 3 枚の 225 μm^2 の共焦点レーザー顕微鏡像から算出した. エラーバーは標準偏差を示す. *P < 0.05. student's t-test.

2.3.7 ホスファチジルイノシトールの代謝や細胞骨格の重合は細胞膜上における DRP2 の動態制御に重要な役割を果たす

前述したように DRP2 の分子構造は dynamin と類似しており，ホスファチジルイノシトールや細胞骨格付随タンパク質への結合ドメインが存在する．そこでホスファチジルイノシトール代謝や細胞骨格重合が DRP2 の小胞形成部位における集散に果たす役割を検証するため，各種の阻害剤処理が細胞膜上における DRP2 の挙動に及ぼす影響を検証した．実際の解析では，phosphoinositide 3-kinase (PI3K) および phosphoinositide 4-kinase (PI4K) の阻害剤 wortmannin (Wm)，微小管重合の阻害剤 oryzalin (ORY)，actin 重合の阻害剤 latrunculin B (Lat B) をそれぞれ処理した DRP2A-GFP, DRP2B-GFP 植物体の根表皮細胞を VIAFM により経時観察し，GFP シグナルの滞留時間を比較した

まず，各種阻害剤が DRP2 の細胞膜上での動態に与える影響を解析するため，VIAFM を用いて阻害剤処理した形質転換植物体の根の表皮細胞を 15 秒間連続的に撮影し，撮影開始時点 (t = 0 s) のシグナルをグリーンに，撮影終了時点 (t = 15 s) のシグナルをレッドに擬似的に表示し重ねあわせた (Fig. 2-8 A-C)．この重ね合わせ画像において，グリーンの輝点 (図 2-8 A，矢尻) は撮影開始時点では存在していたが撮影終了時点では消失した DRP2A-GFP または DRP2B-GFP のシグナル，レッドの輝点 (図 2-8 A，矢印) は逆に撮影開始時点には存在していないものの 15 秒間の撮影中に出現したシグナル，イェローの輝点 (図 2-8 A，アステリスク) は 15 秒間存在し続けたシグナルをそれぞれ表す．DMSO 処理によるコントロールと比較すると，Wm，ORY，Lat B 全てで有意にグリーンやレッドのシグナルの割合が減り，イェローのシグナルの割合が増加していた (図 2-8 A-F)．この結果から，これらの阻害剤処理が，細胞膜上での DRP2A-GFP や DRP2B-GFP の輝点の出現や消失の頻度を低下させ，細胞膜上に留まる時間を増大させることが明らかになった．

さらに，各阻害剤処理が DRP2A-GFP および DRP2B-GFP の輝点数に与える影響を検証した．上記の実験と同様に，VIAFM を用いて形質転換植物体の根の表皮細胞を撮影し，画像中のシグナルの数を定量化し比較を行った．DRP2A-GFP および DRP2B-GFP の輝点数は DMSO 処理に依るコントロール (DRP2A-GFP: 44.8 ± 17.2, DRP2B-GFP: 49.1 ± 7.3) と比較すると，Wm 処理したものでは有意に減少していた (DRP2A-GFP: 81.2 ± 11.7, DRP2B-GFP: 58.4 ± 9.4)．この結果から，Wm 処理は細胞膜上での DRP2A-GFP および DRP2B-GFP の輝点の形成を阻害することが明らかになった．

以上の結果から，PI3K もしくは PI4K の活性および微小管や actin の重合は細胞膜への DRP2A および DRP2B の集散に重要な役割を果たしていることが示唆された．

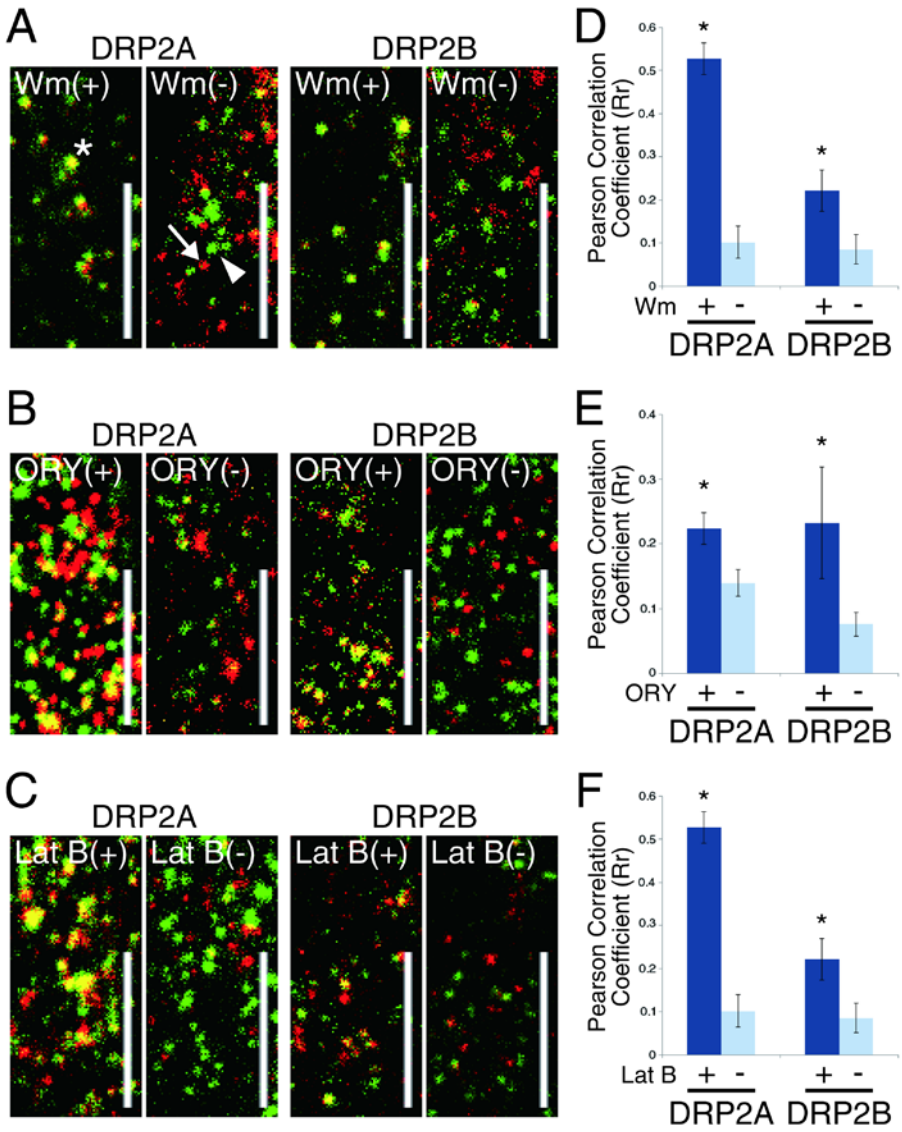


図 2-8 各種阻害剤による細胞膜上での DRP2 の動態に与える影響の観察.

(A, B, C) Wortmannin (Wm) (A), oryzalin (ORY) (B), latrunculin B (Lat B) (C) を処理した DRP2A-GFP または DRP2B-GFP を発現するシロイヌナズナ根表皮細胞の斜照明蛍光顕微鏡像. 15 秒間連続的に撮影し, 撮影開始時点 (t = 0 s) をグリーンに, 撮影終了時点 (t = 15 s) をレッドに表示し, 一枚の画像に重ね合わせた. バーの長さはそれぞれ 5 µm.

(D, E, F) 各種阻害剤処理による DRP2A-GFP 及び DRP2B-GFP の輝点のの動態変化の解析. 上記で得た画像を用いてピアソン相関係数を算出した. それぞれ 8 枚の 81 μm^2 の斜照明蛍光顕微鏡像を用いた. エラーバーは標準偏差を示す. *P < 0.05. student's t-test.

2.4 考察

2.4.1 DRP2 は雌雄両配偶体の形成に重要な役割を果す

雌雄両配偶体の形態観察の結果から，*DRP2* の T-DNA 両ヘテロ挿入系統から得られた花粉では 2 核から 3 核への移行過程に，胚珠では核分裂完了後 7 核 8 細胞という成熟した胚珠の形成過程において配偶体形成が停止していることが明らかとなった．一方他グループによる同様の研究では，雌雄両配偶体共に最初の有糸分裂の前で配偶体形成が停止しているという報告がなされている (Backues *et al.*, 2010)．この表現型の差は，T-DNA 挿入位置や生育条件の違いによる，機能的な DRP2 の残存量の差が原因である可能性がある．

また，このグループによる *DRP2* の T-DNA 両ヘテロ挿入系統の花粉の電子顕微鏡観察では，*DRP1C* の変異体とは異なる細胞内の膜構造の異常が見られた．*drp1c* 変異体の花粉では，過剰となった細胞膜が細胞内に陥入したような構造が見られた (Kang *et al.*, 2003)．しかし，*DRP2* の T-DNA 両ヘテロ挿入系統ではそのような変異は見られず，細胞板やゴルジ体に形態異常が観察された (Backues *et al.*, 2010)．このことからも，*DRP1* と *DRP2* の配偶体形成における機能が異なっていることが示唆される．

雌雄両配偶体において，T-DNA 両ヘテロ挿入系統 (*drp2AaBb*) から得られた異常な形態を示す配偶体の割合が理論値 (25%) より低かったことについては，両遺伝子が共に第一染色体上に存在することから，遺伝子の連鎖による影響や，異常な形態を示す配偶体は小さいため観察されにくく見落としてしまった可能性が考えられる．また，減数分裂が完了し遺伝子型が *drp2ab* となった配偶体がすぐに致死にならずある程度発生が進行するのは，母細胞の DRP2 タンパク質を一定量引き継いでいる可能性が示唆される．

以上の知見と T-DNA 両ヘテロ挿入系統 (*drp2AaBb*) の表現型を考慮すると，DRP2A および DRP2B はシロイヌナズナの配偶体形成において核分裂後の細胞化を完了する上で重要な役割を果たしている可能性が示唆される．

2.4.2 DRP2A と DRP2B は機能的に冗長である

本研究の結果，DRP2A および DRP2B が相互作用し，共局在することが明らかになった．このことは，DRP2A と DRP2B がポストゴルジ膜交通に寄与する際に，ホモまたはヘテロ多量体を形成することを強く示唆している．また，*DRP2A* および *DRP2B* がほぼすべての組織で恒常的に発現しており，根端分裂組織付近や維管束近辺で特に強く発現していることが明らかになった．DRP1 グループの遺伝子が単独の破壊系統でも明確な表現型を示すのに対し (Bednarek and Backues, 2010)，*DRP2A* および *DRP2B* の単独の T-DNA ホモ挿入系統 (*drp2a* または *drp2b*) では生育に異常が見られなかったことを考慮すると，シロイヌナズナにおいて *DRP2A* および *DRP2B* は機能的に冗長であることが示唆される．

2.4.3 DRP2 はポストゴルジ膜交通に関わるさまざまなオルガネラで機能する

蛍光タンパク質を用いた顕微鏡観察の結果から，DRP2A および DRP2B は共に clathrin を中心とした幅広いポストゴルジオルガネラマーカーと共局在していた．この結果は，DRP2 の細胞膜 (Fujimoto *et al.*, 2010; Taylor, 2011), TGN (Jin *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2002), 細胞板の新規形成部位 (Fujimoto *et al.*, 2008) への局在といった現在までの報告と一致している．動物の dynamin もまた細胞膜や TGN, エンドソームへの局在と clathrin 依存的な小胞形成への関与が報告されている (Praefcke and McMahon, 2004). したがって, DRP2 もまたポストゴルジ膜交通に関わるさまざまなオルガネラで clathrin 依存的な小胞形成に関与する可能性が推測される．

また，本研究の結果, PI3K および PI4K の阻害剤 (wortmannin) が細胞膜上での DRP2 の集散が共に遅延することが明らかとなった．DRP2 の PH domain は，ホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (エンドソーム，液胞前区画，液胞), ホスファチジルイノシトール-4-リン酸 (ゴルジ体，TGN，細胞膜), ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (細胞膜) など複数種のイノシトールリン脂質と結合することが報告されている (Backues *et al.*, 2010; Lam *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). 故に, DRP2 の多様なポストゴルジオルガネラへの局在は, PH ドメインを介した複数種のイノシトールリン脂質への結合能に由来するものと推測される．また，細胞膜上での DRP2 の集散は微小管や actin の重合阻害剤 (oryzalin, latrunculin B) によっても遅延していた．DRP2A の PRD は，actin 依存的に動物の dynamin を膜陥入部位の根元に輸送する能力を持つタンパク質のオルソログである AtSH3P3 と SH3 domain を介して結合することが報告されている (Shpetner *et al.*, 1996). しかし，植物では依然として細胞骨格がどのような機構で DRP2 の局在を制御しているかは未解明である．今後，DRP2 の相互作用因子とその機能の探索から，植物独自のポストゴルジ膜交通における小胞形成機構の解明が期待される．

第三章　ポストゴルジ膜交通における
新規の小胞形成関連分子の探索

3.1 緒論

膜交通における小胞形成は，各種オルガネラ上のタンパク質や脂質の量・配置の制御を通じ，さまざまな細胞活動に重要な役割を果たす．特に，細胞膜上での小胞形成から始まるエンドサイトーシスは，外部環境からの養分の取込や細胞間シグナルの受容と制御，さらには古くなった細胞膜タンパク質の品質管理などにとって必須の現象である．その中でも，clathrin が関与する細胞膜からの小胞形成は，トランスゴルジネットワークなどにおける小胞形成などからは区別され特に clathrin-mediated endocytosis (CME) と呼ばれており，その頻度と重要性から分子機構について広範な生物種において研究が盛んなトピックの一つとなっている．

CME は，細胞膜の湾曲開始，積荷の選別，コートタンパク質の集合，細胞膜の切断そしてコートタンパク質の脱離という 5 つのステップに大別される (McMahon and Boucrot, 2011)．まず細胞膜の湾曲開始段階においては，動物細胞の場合，細胞膜の曲率を感知する F-BAR ドメインを持つ FCHO タンパク質が細胞膜に結合し，その湾曲を実行することが知られている．続いて AP2 複合体が中心となって，積荷タンパク質ごとに対応した分子が相互作用し，積荷の選別が行われる．そしてコートタンパク質である clathrin が AP2 複合体と結合しながら小胞形成部位に集合し，格子構造を形成して細胞膜を覆うことにより小胞の出芽を促進する．この出芽した小胞の根元には GTPase ドメインを持つ dynamin が集合してリングまたは螺旋状の構造を形成し，GTP の加水分解により得たエネルギーを利用した立体構造の変化により細胞膜を切断する．最後に，小胞を覆っている clathrin の格子構造が ATPase タンパク質である HSC70 によって分解され，小胞の形成が完了する．これ以外にも小胞形成部位に局所的に存在するホスファチジルイノシトールに結合するタンパク質や，F-BAR とは異なる曲率の細胞膜と結合する BAR ドメインを持つタンパク質，上記の主要分子の小胞形成部位への局在を促進するタンパク質やその分子間を架橋するタンパク質など数十種もの分子が小胞の形成完了までに関与するものと考えられている．

高い膨圧が存在する陸上植物の細胞では，エンドサイトーシスの存在自体が疑問視されていたが，2000 年代にはいって膜トレーサー試薬の利用によりその存在が発見されて以降，精力的に解析が行われてきた．その結果，現在までに clathrin (Kitakura *et al.*, 2011)や，AP2 複合体 (Fan *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Di Rubbo *et al.*, 2013; Yamaoka *et al.*, 2013)，ダイナミン様タンパク質 (dynamin-related protein)(Fujimoto *et al.*, 2010) などがその制御因子として報告されている．しかし，その数という点では，動物において同定されている CME 関連分子のそれに遠く及ばない．その原因の一つとしては，植物ゲノムにおける動物の CME 関連因子を元にした単純な相同性検索では，その明確なオルソログと思われる候補遺伝子が発見できないことが挙げられる．また，このことから考えると，clathrin などの主要な分子を除けば，植物はその進化の過程で，多数の CME 制御因子を独自に獲得してきたものと予想される．

そこで，本研究では陸上植物固有の CME 関連分子を網羅的に同定すべく，既知のエンドサ

イトーシス関連分子に対して共免疫沈降を行い，その産物を質量解析した．この手法を用いることにより，細胞中で実際に既知の CME 関連分子と直接もしくは間接的に相互作用している分子群を精製し，動物の CME 関連分子と相同性はない植物固有の制御分子を同定することが可能であると期待される．この手法は植物細胞においても既に核孔形成を担う因子 (Tamura *et al.*, 2010) や生体膜の繋留融合に関連する因子 (Fujiwara *et al.*, 2014) の同定などの成果を挙げている．本研究では，シロイヌナズナの clathrin である clathrin light chain (CLC), AP2 複合体の一部である AP2α, dynamin である DRP1A および DRP2A を対象としてこの手法を行い，同定されたタンパク質を比較することにより植物固有の CME 関連分子の同定を目標とした．

3.2 材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Colunmbia-0) は 1x Murashige Skoog (MS) 個体培地 (Murashige and Skoog, 1962) 上で 22 度, 連続光条件下で生育した. CLC と GFP の融合タンパク質 (CLC-GFP) を発現する形質転換植物体は東京大学理学部の伊藤瑛海助教より分譲を受けた (Ito *et al.*, 2012). AP2α サブユニットと GFP の融合タンパク質 (AP2α-GFP) を発現する形質転換植物体は島根大学生物資源科学部の西村浩二助教より分譲を受けた. DRP1A と GFP の融合タンパク質 (DRP1A-GFP) を発現する形質転換植物体は当研究室の先行研究において作製したものを使用した (Fujimoto *et al.*, 2010). DRP2A と GFP の融合タンパク質 (DRP2A-GFP) を発現する形質転換植物体は前章に記載がある通り作出した. GFP のみを発現する形質転換植物体は東京大学理学部の上田貴志准教授より分譲を受けた.

Co-immunoprecipitation mass spectrometry (CoIP-MS) 法

約 0.7 g の発芽 10 日後のシロイヌナズナの形質転換幼植物体を海砂と共に 1 ml の抽出バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 400 mM sucrose, 1% (v/v) Triton X-100, a complete mini EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche), 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, and 5 mM $MgCl_2$, 100 μM GTP-γ-s) 中ですりつぶした. 得られた抽出物は 4℃条件下で 2 回 (5,000 xg および 20,000 xg) それぞれ 15 分間遠心分離し, 上清を回収した. 得られた上清は μMACS Anti-GFP Beads (Miltenyi Biotec) を用いて共免疫沈降し, SDS-PAGE により含まれるタンパク質を分離した. 得られた共免疫沈降物は Fujiwara ら (2014) らの方法に従ってアクリルアミドゲルから回収し, 質量解析を行った. 同時に単体の GFP を発現する形質転換植物体でも同様の解析を行い, 検出されたタンパク質は各サンプルの検出タンパク質リストから除いた. 以上の解析を各形質転換植物体 2 反復ずつ行った.

3.3 結果

CME の各段階における関連分子を同定すべく，細胞膜を湾曲し小胞の形成を促す CLC, CME 関連分子と積荷タンパク質の間を繋ぐ AP2α, 細胞膜の切断を担う DRP1A および DRP2A と GFP の融合タンパク質に加え，GFP 単体を発現する形質転換シロイヌナズからタンパク質を抽出し，抗 GFP 抗体を用いて共免疫沈降を行った．さらに，得られた共免疫沈降物に対し質量解析を行った．これら一連の解析を 2 回試行し，GFP 単体の共免疫沈降物から同定されたタンパク質をそれぞれのリストから除いた結果, CLC-GFP 発現植物体からは 197 種 (表 3-1), AP2α-GFP 発現植物体からは 70 種 (表 3-2), DRP1A-GFP 発現植物体からは 78 種 (表 3-3), DRP2A-GFP 発現植物体からは 165 種 (表 3-4) の CME 関連分子候補が得られた．このうち, 2 回の試行で共に検出されたタンパク質は CLC-GFP 発現植物体からは 24 種 (表 3-1, 赤字), AP2α-GFP 発現植物体からは 9 種 (表 3-2, 赤字), DRP1A-GFP 発現植物体からは 9 種 (表 3-3, 赤字), DRP2A-GFP 発現植物体からは 26 種 (表 3-4, 赤字) だった．また, CLC-GFP, AP2α-GFP, DRP1A-GFP, DRP2A-GFP 発現植物体の 2 者間，3 者間，4 者間で共通に検出された CME 関連分子候補も複数得られた (表 3-5).

CLC-GFP 発現植物体から得られた CME 関連分子候補には，CLC 自身のパラログと共に clathrin の格子構造を形成する際に結合する clathrin heavy chain (CHC) が検出された. AP2α-GFP 発現植物体からは AP2 複合体を形成する他のサブユニットが得られた. DRP1A-GFP 発現植物体からは多量体を形成する他の DRP1 グループの分子や DRP2 グループの分子が得られた. DRP2A-GFP 発現植物体からも同様に DRP1 グループの分子が得られた．このように，各 GFP 融合タンパク質発現植物体から既知の CME 関連分子が検出され，なおかつ同じ分子が複数の GFP 融合タンパク質発現植物体から検出された．以上の結果から，本手法によって実際に CME 関連分子を同定可能であることが示唆された.

また，各 CME 関連分子ごとに検出されたタンパク質を解析していくと，それぞれに特徴的なタンパク質が含まれていることが判明した．まず，CLC-GFP 発現植物体からは exostosin ファミリーのタンパク質が 2 種検出された．Exostosin はゴルジ体に局在するタンパク質で (McCormick *et al.*, 1999), clathrin がゴルジ体でも機能を持つことが推測された．また，ENTH domain または ANTH domain を持つタンパク質が 5 種検出された．ENTH domain および ANTH domain は細胞膜上のホスファチジルリン脂質との結合能を有し (Itoh *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2001)，これらのタンパク質が clathrin や AP2 複合体の足場となっている可能性が示唆された．オーキシンのシグナル応答に関わる分子は 3 種検出された．オーキシンのシグナル伝達には CME が重要な役割を果たしていることが報告されており (Robert *et al.*, 2010; Kitakura *et al.*, 2011)，これら分子の細胞膜上での局在量の CME による調節がオーキシンのシグナル伝達の制御に関わることが示唆された．細胞膜への局在が報告されている kinase は 5 種類検出された．特に leucine-rich repeat を持つ kinase は自身およびリン酸化される相手分子が CME による制御を受け

ることが報告されており (Hanafusa *et al.*, 2011) , これらの kinase も，自身が CME の積荷となるか, または積荷タンパク質の選別に関与している可能性が示唆された. 植物において CME により制御される leucine-rich repeat を持つ kinase として，病原微生物の認識に関わる flagellin-sensitive 2 (FLS2)があるが (Robatzek *et al,*, 2006), 他にも耐病性に関わる分子が 3 種検出された. これらの分子も CME の新規の積荷タンパク質として有望だと思われる. また, HSc70/HSP70 は 5 種, そして HSC70 を clathrin 被覆小胞に誘導する機能を持つ DNAJ domain を持つタンパク質も 1 種検出された. これらの分子の中に clathrin の格子構造の分解に関わる分子が含まれている可能性が高い. このように, CLC-GFP 発現植物体からは小胞形成の初期段階である, 小胞形成装置の集合に関わる分子や積荷タンパク質の選別に関わる分子, そして最終段階である clathrin の格子構造の分解に関わる分子の候補が得られた.

AP2α-GFP 発現植物体からは, FtsH ファミリーの protease が検出された. FtsH は ATP 依存性の protease の中で唯一の膜タンパク質で (Akiyama *et al.*, 1995), CME により制御されている可能性が示唆された. 他にも液胞型 ATP アーゼである vma12 も検出されている. 液胞型 ATP アーゼはエンドソームなど単膜系オルガネラ内の酸性化を通じて受容体依存性エンドサイトーシスに関与することが知られており (Mellman *et al.*, 1986), この分子も何らかの機能を果たしていると予想される. また, clathrin も検出されており, 直接相互作用している可能性と, clathrin と AP2 複合体を繋ぐ分子が検出されている可能性が示唆された. それ以外にも機能未知のタンパク質が複数検出されており, 積荷タンパク質と AP2 複合体を繋ぐアダプタータンパク質が得られている可能性がある.

DRP1A-GFP および DRP2A-GFP 発現植物体からは, カルシウムイオン依存的に脂質と結合するタンパク質が検出された. 動物の神経細胞ではカルシウムイオンの流入がエンドサイトーシスのトリガーとなることが知られており (Neves *et al.*, 2001), 植物の CME でも関与している可能性が示唆された. 他にも G タンパク質である Transducin/WD40 が 2 種検出された. この分子は他のアダプタータンパク質との相互作用が報告されており (Gadeyne *et al.*, 2014), この種の分子が植物の CME で何らかの機能を持つものと考えられる. さらに small GTPase である Rab も検出された. Rab は膜交通において複合体形成の分子スイッチとしての機能を担っており (Hutagalung *et al.* 2013), この Rab が CME に関与する可能性が示唆された.

表 3-1 CLC-GFP 発現植物体からの抽出物から検出された同定タンパク質リスト．赤字は 2 回の試行で共に検出されたタンパク質．

Accession #	Annotation
AT1G01210.1	DNA-directed RNA polymerase, subunit M, archaeal
AT1G02020.1	nitroreductase family protein
AT1G02570.1	unknown protein
AT1G02680.1	TBP-associated factor 13
AT1G03365.1	RING/U-box superfamily protein
AT1G03540.1	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein
AT1G04750.1	vesicle-associated membrane protein 721
AT1G06950.1	translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 110
AT1G07790.1	Histone superfamily protein
AT1G08380.1	photosystem I subunit O
AT1G11020.1	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein
AT1G11420.1	DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 724 2
AT1G11870.1	Seryl-tRNA synthetase
AT1G12900.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
AT1G13220.2	nuclear matrix constituent protein-related
AT1G13440.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
AT1G14460.1	AAA-type ATPase family protein
AT1G14640.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
AT1G15820.1	light harvesting complex photosystem II subunit 6
AT1G16030.1	heat shock protein 70B
AT1G17580.1	myosin 1
AT1G20010.1	tubulin beta-5 chain
AT1G20620.1	catalase 3
AT1G20630.1	catalase 1
AT1G22300.1	general regulatory factor 10
AT1G22930.1	T-complex protein 11
AT1G22960.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT1G28190.1	unknown protein
AT1G29910.1	chlorophyll A/B binding protein 3

AT1G30380.1	photosystem I subunit K
AT1G31330.1	photosystem I subunit F
AT1G32220.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT1G34260.1	FORMS APLOID AND BINUCLEATE CELLS 1A
AT1G34270.1	Exostosin family protein
AT1G34410.1	auxin response factor 21
AT1G34420.1	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein
AT1G35240.1	auxin response factor 20
AT1G47300.1	F-box family protein
AT1G48180.1	unknown protein
AT1G49240.1	actin 8
AT1G49980.1	DNA/RNA polymerases superfamily protein
AT1G50840.1	polymerase gamma 2
AT1G53040.1	Protein of unknown function (DUF616)
AT1G53660.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT1G54270.1	eif4a-2
AT1G55060.1	ubiquitin 12
AT1G55670.1	photosystem I subunit G
AT1G55840.1	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
AT1G56290.1	CwfJ-like family protein
AT1G56520.2	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G58420.1	Uncharacterised conserved protein UCP031279
AT1G61050.1	alpha 1,4-glycosyltransferase family protein
AT1G61520.1	photosystem I light harvesting complex gene 3
AT1G66245.1	unknown protein
AT1G67190.1	F-box/RNI-like superfamily protein
AT1G67580.1	Protein kinase superfamily protein
AT1G68470.1	Exostosin family protein
AT1G70140.1	formin 8
AT1G71070.1	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
AT1G71220.1	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferases
AT1G72250.1	Di-glucose binding protein with Kinesin motor domain

AT1G72740.1	Homeodomain-like/winged-helix DNA-binding family protein
AT1G73710.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT1G74720.1	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein
AT1G75980.1	Single hybrid motif superfamily protein
AT1G76880.1	Duplicated homeodomain-like superfamily protein
AT1G78230.1	Outer arm dynein light chain 1 protein
AT1G79040.1	photosystem II subunit R
AT1G80210.1	Mov34/MPN/PAD-1 family protein
AT2G01600.1	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
AT2G07732.1	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain, catalytic domain
AT2G15695.1	Protein of unknown function DUF829, transmembrane 53
AT2G17060.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT2G18700.1	trehalose phosphatase/synthase 11
AT2G18969.1	sequence-specific DNA binding transcription factors;transcription regulators
AT2G20760.1	Clathrin light chain protein, CLC
AT2G25430.1	epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein / clathrin assembly protein-related
AT2G25760.1	Protein kinase family protein
AT2G25840.1	Nucleotidylyl transferase superfamily protein
AT2G29130.1	laccase 2
AT2G30870.1	glutathione S-transferase PHI 10
AT2G33490.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
AT2G36450.1	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT2G36900.1	membrin 11
AT2G37190.1	Ribosomal protein L11 family protein
AT2G37620.1	actin 1
AT2G38860.1	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
AT2G39730.1	rubisco activase
AT2G40060.1	Clathrin light chain protein, CLC
AT2G40460.1	Major facilitator superfamily protein
AT2G42100.1	Actin-like ATPase superfamily protein
AT2G44760.1	Domain of unknown function (DUF3598)

AT2G45720.1	ARM repeat superfamily protein
AT2G47220.1	DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 724 5
AT2G48060.1	unknown protein
AT3G01250.1	unknown protein
AT3G02100.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT3G02260.1	auxin transport protein (BIG)
AT3G03060.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT3G04140.1	Ankyrin repeat family protein
AT3G04250.1	F-box associated ubiquitination effector family protein
AT3G04840.1	Ribosomal protein S3Ae
AT3G06340.1	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
AT3G08530.1	Clathrin, heavy chain, CHC
AT3G08590.1	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent
AT3G09440.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
AT3G09760.1	RING/U-box superfamily protein
AT3G11130.1	Clathrin, heavy chain, CHC
AT3G12580.1	heat shock protein 70
AT3G13080.2	multidrug resistance-associated protein 3
AT3G14920.1	Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A protein
AT3G14990.1	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
AT3G15520.1	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein
AT3G18390.1	CRS1 / YhbY (CRM) domain-containing protein
AT3G20050.1	T-complex protein 1 alpha subunit
AT3G22950.1	ADP-ribosylation factor C1
AT3G25650.1	SKP1-like 15
AT3G26650.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit
AT3G27900.1	Protein of unknown function (DUF1184)
AT3G28150.1	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 22
AT3G42050.1	vacuolar ATP synthase subunit H family protein
AT3G45140.1	lipoxygenase 2
AT3G45610.1	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein
AT3G46950.1	Mitochondrial transcription termination factor family protein

AT3G47470.1	light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4
AT3G47910.1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related protein
AT3G49710.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT3G49730.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT3G51890.1	Clathrin light chain protein, CLC
AT3G54380.1	SAC3/GANP/Nin1/mts3/eIF-3 p25 family
AT3G54890.1	photosystem I light harvesting complex gene 1
AT3G60110.1	DNA-binding bromodomain-containing protein
AT4G02110.1	transcription coactivators
AT4G02650.1	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
AT4G03430.1	pre-mRNA splicing factor-related
AT4G08097.1	myosin heavy chain-related
AT4G10340.1	light harvesting complex of photosystem II 5
AT4G12800.1	photosystem I subunit l
AT4G13870.1	Werner syndrome-like exonuclease
AT4G14250.1	structural constituent of ribosome
AT4G14340.1	casein kinase I
AT4G15210.1	beta-amylase 5
AT4G16890.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
AT4G20360.1	RAB GTPase homolog E1B
AT4G21380.1	receptor kinase 3
AT4G22745.1	methyl-CPG-binding domain 1
AT4G24280.1	chloroplast heat shock protein 70-1
AT4G24290.2	MAC/Perforin domain-containing protein
AT4G25940.1	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
AT4G28390.1	ADP/ATP carrier 3
AT4G32260.1	ATPase, F0 complex, subunit B/B', bacterial/chloroplast
AT4G32285.1	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
AT4G32630.1	ArfGap/RecO-like zinc finger domain-containing protein
AT4G39260.1	cold, circadian rhythm, and RNA binding 1
AT5G01530.1	light harvesting complex photosystem II
AT5G01730.1	SCAR family protein 4

AT5G02490.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
AT5G02500.1	heat shock cognate protein 70-1
AT5G02870.1	Ribosomal protein L4/L1 family
AT5G05590.2	phosphoribosylanthranilate isomerase 2
AT5G06520.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
AT5G07100.1	WRKY DNA-binding protein 26
AT5G07350.1	TUDOR-SN protein 1
AT5G09810.1	actin 7
AT5G10170.1	myo-inositol-1-phosphate synthase 3
AT5G13490.1	ADP/ATP carrier 2
AT5G14040.1	phosphate transporter 3;1
AT5G14105.1	unknown protein
AT5G14780.1	formate dehydrogenase
AT5G16930.1	AAA-type ATPase family protein
AT5G17920.1	Cobalamin-independent synthase family protein
AT5G17980.1	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein
AT5G18590.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT5G18820.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
AT5G19770.1	tubulin alpha-3
AT5G20010.1	RAS-related nuclear protein-1
AT5G20980.1	methionine synthase 3
AT5G22580.1	Stress responsive A/B Barrel Domain
AT5G24890.1	unknown protein
AT5G27750.1	F-box/FBD-like domains containing protein
AT5G28030.1	L-cysteine desulfhydrase 1
AT5G29807.1	unknown protein
AT5G35370.1	S-locus lectin protein kinase family protein
AT5G35750.1	histidine kinase 2
AT5G38570.1	F-box/RNI-like superfamily protein
AT5G39030.1	Protein kinase superfamily protein
AT5G39330.1	Protein of unknown function (DUF1163)
AT5G39870.1	Protein of unknown function (DUF1216)

AT5G42080.1	dynamin-like protein, DRP1A
AT5G42870.1	phosphatidic acid phosphohydrolase 2
AT5G46070.1	Guanylate-binding family protein
AT5G46800.1	Mitochondrial substrate carrier family protein
AT5G48600.1	structural maintenance of chromosome 3
AT5G49910.1	chloroplast heat shock protein 70-2
AT5G50390.1	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein
AT5G51870.1	AGAMOUS-like 71
AT5G52040.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
AT5G52980.1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: ATPase, vacuolar ER assembly factor, Vma12
AT5G53000.1	2A phosphatase associated protein of 46 kD
AT5G53860.1	embryo defective 2737
AT5G55710.1	TRANSLOCON AT THE INNER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 20-V
AT5G62230.1	ERECTA-like 1
AT5G64040.1	photosystem I reaction center subunit PSI-N, chloroplast, putative / PSI-N, putative (PSAN)
AT5G64450.1	Putative endonuclease or glycosyl hydrolase
AT5G65430.1	general regulatory factor 8
ATCG00120.1	ATP synthase subunit alpha
ATCG00520.1	unfolded protein binding

表 3-2 AP2α-GFP 発現植物体からの抽出物から検出された同定タンパク質リスト．赤字は 2 回の試行で共に検出されたタンパク質．

Accession #	Annotation
AT1G06770.2	DREB2A-interacting protein 1
AT1G11040.1	HSP40/DnaJ peptide-binding protein
AT1G12150.1	Plant protein of unknown function (DUF827)
AT1G15520.1	pleiotropic drug resistance 12
AT1G17580.1	myosin 1
AT1G31390.1	TRAF-like family protein
AT1G31400.1	TRAF-like family protein
AT1G31960.1	unknown protein
AT1G36050.1	Endoplasmic reticulum vesicle transporter protein
AT1G47830.1	SNARE-like superfamily protein, AP2S
AT1G49240.1	actin 8
AT1G63280.1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
AT1G65220.1	ARM repeat superfamily protein
AT1G67840.1	chloroplast sensor kinase
AT1G71235.1	unknown protein
AT1G74880.1	NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex subunit O
AT2G07732.1	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain, catalytic domain
AT2G13370.1	chromatin remodeling 5
AT2G15695.1	Protein of unknown function DUF829, transmembrane 53
AT2G31320.1	poly(ADP-ribose) polymerase 2
AT2G33510.1	unknown protein
AT2G34730.1	myosin heavy chain-related
AT2G37320.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT2G40060.1	Clathrin light chain protein, CLC
AT2G44760.1	Domain of unknown function (DUF3598)
AT2G47620.1	SWITCH/sucrose nonfermenting 3A
AT3G04854.1	unknown protein
AT3G05140.1	ROP binding protein kinases 2
AT3G07060.1	NHL domain-containing protein

AT3G08530.1	Clathrin, heavy chain, CHC
AT3G16000.1	MAR binding filament-like protein 1
AT3G19570.1	Family of unknown function (DUF566)
AT3G20050.1	T-complex protein 1 alpha subunit
AT3G21210.1	zinc ion binding
AT3G25100.1	cell division cycle 45
AT3G27040.1	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein
AT3G27290.1	RNI-like superfamily protein
AT3G28820.1	Protein of unknown function (DUF1216)
AT3G44530.1	homolog of histone chaperone HIRA
AT3G52260.1	Pseudouridine synthase family protein
AT3G53920.1	RNApolymerase sigma-subunit C
AT3G54360.1	zinc ion binding
AT3G55440.1	triosephosphate isomerase
AT3G56820.1	unknown protein
AT3G59880.1	unknown protein
AT3G60360.1	embryo sac development arrest 14
AT3G63400.1	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein
AT4G09350.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT4G11380.1	Adaptin family protein, AP1/2B1
AT4G14150.1	phragmoplast-associated kinesin-related protein 1
AT4G17270.1	Mo25 family protein
AT4G21070.1	breast cancer susceptibility1
AT4G22190.1	unknown protein
AT4G23460.1	Adaptin family protein
AT4G23940.1	FtsH extracellular protease family
AT4G25080.1	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase
AT4G26660.1	unknown protein
AT4G31530.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT5G01310.1	APRATAXIN-like
AT5G06520.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
AT5G22770.1	alpha-adaptin, AP2A1

AT5G24890.1	unknown protein
AT5G35980.1	yeast YAK1-related gene 1
AT5G42710.1	unknown protein
AT5G43790.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT5G46630.1	Clathrin adaptor complexes medium subunit family protein, AP2M
AT5G52980.1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: ATPase, vacuolar ER assembly factor, Vma12
AT5G57123.1	unknown protein
AT5G58510.1	unknown protein
AT5G66850.1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5

表 3-3 DRP1A-GFP 発現植物体からの抽出物から検出された同定タンパク質リスト．赤字は 2 回の試行で共に検出されたタンパク質．

Accession #	Annotation
AT1G07660.1	Histone superfamily protein
AT1G10290.1	dynamin-like protein 6, DRP2A
AT1G12900.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
AT1G14830.1	DYNAMIN-like 1C, DRP1C
AT1G16030.1	heat shock protein 70B
AT1G31390.1	TRAF-like family protein
AT1G32120.1	unknown protein
AT1G47270.1	tubby like protein 6
AT1G47655.1	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein
AT1G47960.1	cell wall / vacuolar inhibitor of fructosidase 1
AT1G48090.1	calcium-dependent lipid-binding family protein
AT1G49240.1	actin 8
AT1G50300.1	TBP-associated factor 15
AT1G53541.1	unknown protein
AT1G56190.1	Phosphoglycerate kinase family protein
AT1G60110.1	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT1G63280.1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
AT1G65220.1	ARM repeat superfamily protein
AT1G67140.1	HEAT repeat-containing protein
AT1G67260.1	TCP family transcription factor
AT1G67840.1	chloroplast sensor kinase
AT1G70380.1	F-box and associated interaction domains-containing protein
AT1G75410.1	BEL1-like homeodomain 3
AT1G80280.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G80730.1	zinc-finger protein 1
AT1G80780.1	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
AT2G05990.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT2G24530.1	unknown protein
AT2G38040.1	acetyl Co-enzyme a carboxylase carboxyltransferase alpha subunit

AT2G38110.1	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6
AT2G39730.1	rubisco activase
AT2G40360.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT2G42690.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT2G45290.1	Transketolase
AT3G03810.1	O-fucosyltransferase family protein
AT3G04854.1	unknown protein
AT3G06250.1	FAR1-related sequence 7
AT3G07790.1	DGCR14-related
AT3G07980.1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
AT3G17490.1	F-box and associated interaction domains-containing protein
AT3G19050.1	phragmoplast orienting kinesin 2
AT3G19570.1	Family of unknown function (DUF566)
AT3G20050.1	T-complex protein 1 alpha subunit
AT3G20610.1	non-race specific disease resistance protein, putative
AT3G21210.1	zinc ion binding
AT3G22670.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT3G27290.1	RNI-like superfamily protein
AT3G28820.1	Protein of unknown function (DUF1216)
AT3G51770.1	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
AT3G54360.1	zinc ion binding
AT3G54560.1	histone H2A 11
AT3G56820.1	unknown protein
AT3G57350.1	Nucleoporin interacting component (Nup93/Nic96-like) family protein
AT3G59880.1	unknown protein
AT3G60190.1	DYNAMIN-like 1E, DRP1E
AT4G01290.1	unknown protein
AT4G09350.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT4G10340.1	light harvesting complex of photosystem II 5
AT4G17270.1	Mo25 family protein
AT4G20360.1	RAB GTPase homolog E1B
AT4G21820.1	binding;calmodulin binding

AT4G23720.1	Protein of unknown function (DUF1191)
AT4G27595.1	Plant protein of unknown function (DUF827)
AT4G35170.1	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family
AT5G02500.1	heat shock cognate protein 70-1
AT5G06610.1	Protein of unknown function (DUF620)
AT5G18820.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
AT5G26900.1	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
AT5G38430.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein
AT5G42080.1	dynamin-like protein, DRP1A
AT5G44510.1	target of AVRB operation1
AT5G46070.1	Guanylate-binding family protein
AT5G50890.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT5G51780.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT5G56290.1	peroxin 5
AT5G61330.1	rRNA processing protein-related
AT5G63240.1	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
ATCG00340.1	Photosystem I, PsaA/PsaB protein

表 3-4 DRP2A-GFP 発現植物体からの抽出物から検出された同定タンパク質リスト．赤字は 2 回の試行で共に検出されたタンパク質．

Accession #	Annotation
AT1G03360.1	ribosomal RNA processing 4
AT1G04410.1	Lactate/malate dehydrogenase family protein
AT1G04820.1	tubulin alpha-4 chain
AT1G05090.1	dentin sialophosphoprotein-related
AT1G06700.1	Protein kinase superfamily protein
AT1G07660.1	Histone superfamily protein
AT1G07970.1	Cytochrome B561-related, N-terminal (InterPro:IPR019176)
AT1G09665.1	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein
AT1G10290.1	dynamin-like protein 6, DRP2A
AT1G12900.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
AT1G13440.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
AT1G14830.1	DYNAMIN-like 1C, DRP1C
AT1G15210.1	pleiotropic drug resistance 7
AT1G16670.1	Protein kinase superfamily protein
AT1G20260.1	ATPase, V1 complex, subunit B protein
AT1G20620.1	catalase 3
AT1G21620.1	pumilio 20
AT1G21640.1	NAD kinase 2
AT1G27400.1	Ribosomal protein L22p/L17e family protein
AT1G28190.1	unknown protein
AT1G31330.1	photosystem I subunit F
AT1G31400.1	TRAF-like family protein
AT1G31960.1	unknown protein
AT1G36050.1	Endoplasmic reticulum vesicle transporter protein
AT1G49240.1	actin 8
AT1G50300.1	TBP-associated factor 15
AT1G54270.1	eif4a-2
AT1G54710.1	homolog of yeast autophagy 18 (ATG18) H
AT1G55490.1	chaperonin 60 beta

AT1G55740.1	seed imbibition 1
AT1G55900.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT1G56190.1	Phosphoglycerate kinase family protein
AT1G56290.1	CwfJ-like family protein
AT1G59610.1	dynamin-like 3 DRP2B
AT1G63280.1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
AT1G65220.1	ARM repeat superfamily protein
AT1G65800.1	receptor kinase 2
AT1G66050.1	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT1G67540.1	unknown protein
AT1G67840.1	chloroplast sensor kinase
AT1G69040.1	ACT domain repeat 4
AT1G70140.1	formin 8
AT1G71695.1	Peroxidase superfamily protein
AT1G72370.1	40s ribosomal protein SA
AT1G76730.1	NagB/RpiA/CoA transferase-like superfamily protein
AT1G77330.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G78900.1	vacuolar ATP synthase subunit A
AT2G02860.1	sucrose transporter 2
AT2G15695.1	Protein of unknown function DUF829, transmembrane 53
AT2G17000.1	Mechanosensitive ion channel family protein
AT2G22560.1	Kinase interacting (KIP1-like) family protein
AT2G23350.1	poly(A) binding protein 4
AT2G25730.1	unknown protein
AT2G30330.1	GCN5L1 family protein
AT2G33860.1	Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related
AT2G35630.1	ARM repeat superfamily protein
AT2G35800.1	mitochondrial substrate carrier family protein
AT2G36160.1	Ribosomal protein S11 family protein
AT2G37620.1	actin 1
AT2G39730.1	rubisco activase
AT2G44590.1	DYNAMIN-like 1D, DRP1D

AT2G44760.1	Domain of unknown function (DUF3598)
AT2G46320.1	Mitochondrial substrate carrier family protein
AT2G47220.1	DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 724 5
AT2G47500.1	P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein with CH (Calponin Homology) domain
AT2G47620.1	SWITCH/sucrose nonfermenting 3A
AT3G02100.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT3G02660.1	Tyrosyl-tRNA synthetase, class Ib, bacterial/mitochondrial
AT3G03330.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT3G03780.1	methionine synthase 2
AT3G04854.1	unknown protein
AT3G06660.1	PAPA-1-like family protein / zinc finger (HIT type) family protein
AT3G08530.1	Clathrin, heavy chain
AT3G09440.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
AT3G11130.1	Clathrin, heavy chain
AT3G11400.1	eukaryotic translation initiation factor 3G1
AT3G12780.1	phosphoglycerate kinase 1
AT3G13470.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
AT3G13530.1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
AT3G14415.1	Aldolase-type TIM barrel family protein
AT3G14420.1	Aldolase-type TIM barrel family protein
AT3G14590.1	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
AT3G14730.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT3G16810.1	pumilio 24
AT3G17100.1	sequence-specific DNA binding transcription factors
AT3G17490.1	F-box and associated interaction domains-containing protein
AT3G20820.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT3G22790.1	Kinase interacting (KIP1-like) family protein
AT3G22950.1	ADP-ribosylation factor C1
AT3G24430.1	ATP binding
AT3G25100.1	cell division cycle 45
AT3G27290.1	RNI-like superfamily protein

AT3G27440.1	uridine kinase-like 5
AT3G28820.1	Protein of unknown function (DUF1216)
AT3G29410.1	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT3G32980.1	Peroxidase superfamily protein
AT3G44530.1	homolog of histone chaperone HIRA
AT3G47520.1	malate dehydrogenase
AT3G47800.1	Galactose mutarotase-like superfamily protein
AT3G51070.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT3G52500.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT3G52930.1	Aldolase superfamily protein
AT3G54360.1	zinc ion binding
AT3G54570.1	Plant calmodulin-binding protein-related
AT3G56820.1	unknown protein
AT3G58260.1	TRAF-like family protein
AT3G59880.1	unknown protein
AT3G60190.1	DYNAMIN-like 1E, DRP1E
AT3G60360.1	embryo sac development arrest 14
AT3G61760.1	DYNAMIN-like 1B DRP1B
AT3G63090.1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein
AT4G03570.1	Cystatin/monellin superfamily protein
AT4G04640.1	ATPase, F1 complex, gamma subunit protein
AT4G09820.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT4G12780.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT4G14760.1	kinase interacting (KIP1-like) family protein
AT4G15020.1	hAT transposon superfamily
AT4G17270.1	Mo25 family protein
AT4G18150.1	Kinase-related protein of unknown function (DUF1296)
AT4G18790.1	NRAMP metal ion transporter family protein
AT4G18850.1	unknown protein
AT4G20360.1	RAB GTPase homolog E1B
AT4G21820.1	binding;calmodulin binding
AT4G22070.1	WRKY DNA-binding protein 31

AT4G22970.1	homolog of separase
AT4G23940.1	FtsH extracellular protease family
AT4G24390.1	RNI-like superfamily protein
AT4G26660.1	unknown protein
AT4G27850.1	Glycine-rich protein family
AT4G31690.1	Transcriptional factor B3 family protein
AT4G32285.1	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
AT4G35090.1	catalase 2
AT4G36400.1	FAD-linked oxidases family protein
AT4G38970.1	fructose-bisphosphate aldolase 2
AT5G02490.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
AT5G04480.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT5G06520.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
AT5G06550.1	Transcription factor jumonji/aspartyl beta-hydroxylase, F-box domain, Skp2-like, Transcription factor jumonji; transferases, transferring glycosyl groups (TAIR:AT1G78280.1);
AT5G08670.1	ATP synthase alpha/beta family protein
AT5G11920.1	6-&1-fructan exohydrolase
AT5G11940.1	Subtilase family protein
AT5G17920.1	Cobalamin-independent synthase family protein
AT5G18820.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
AT5G24890.1	unknown protein
AT5G25980.2	glucoside glucohydrolase 2
AT5G27310.1	Transcription factor IIS family protein
AT5G28540.1	heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
AT5G35630.1	glutamine synthetase 2
AT5G42080.1	dynamin-like protein, DRP1A
AT5G44340.1	tubulin beta chain 4
AT5G45520.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT5G49310.1	importin alpha isoform 5
AT5G50320.1	radical SAM domain-containing protein / GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein

AT5G51680.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
AT5G52000.1	importin alpha isoform 8
AT5G52980.1	ATPase, vacuolar ER assembly factor, Vma12
AT5G58510.1	unknown protein
AT5G60410.1	DNA-binding protein with MIZ/SP-RING zinc finger, PHD-finger and SAP domain
AT5G61190.1	putative endonuclease or glycosyl hydrolase with C2H2-type zinc finger domain
AT5G62260.1	AT hook motif DNA-binding family protein
AT5G62390.1	BCL-2-associated athanogene 7
ATCG00120.1	ATP synthase subunit alpha
ATCG00280.1	photosystem II reaction center protein C
ATCG00340.1	Photosystem I, PsaA/PsaB protein
ATCG00480.1	ATP synthase subunit beta

表 3-5 複数の GFP 融合タンパク質発現植物体からの抽出物から検出されたタンパク質リスト.

Combination	#	Accession #	Annotation
CLC-AP2α	11	AT1G17580.1	myosin 1
		AT1G49240.1	actin 8
		AT2G07732.1	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain, catalytic domain
		AT2G15695.1	Protein of unknown function DUF829, transmembrane 53
		AT2G40060.1	Clathrin light chain protein
		AT2G44760.1	Domain of unknown function (DUF3598)
		AT3G08530.1	Clathrin, heavy chain
		AT3G20050.1	T-complex protein 1 alpha subunit
		AT5G06520.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
		AT5G24890.1	unknown protein
		AT5G52980.1	ATPase, vacuolar ER assembly factor, Vma12
CLC-DRP1A	11	AT1G12900.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
		AT1G16030.1	heat shock protein 70B
		AT1G49240.1	actin 8
		AT2G39730.1	rubisco activase
		AT3G20050.1	T-complex protein 1 alpha subunit
		AT4G10340.1	light harvesting complex of photosystem II 5
		AT4G20360.1	RAB GTPase homolog E1B
		AT5G02500.1	heat shock cognate protein 70-1
		AT5G18820.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
		AT5G42080.1	dynamin-like protein, DRP1A
		AT5G46070.1	Guanylate-binding family protein
CLC-DRP2A	29	AT1G12900.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
		AT1G13440.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
		AT1G20620.1	catalase 3
		AT1G28190.1	unknown protein
		AT1G31330.1	photosystem I subunit F
		AT1G49240.1	actin 8

		AT1G54270.1	eif4a-2
		AT1G56290.1	CwfJ-like family protein
		AT1G70140.1	formin 8
		AT2G15695.1	Protein of unknown function DUF829, transmembrane 53
		AT2G37620.1	actin 1
		AT2G39730.1	rubisco activase
		AT2G44760.1	Domain of unknown function (DUF3598)
		AT2G47220.1	DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 724 5
		AT3G02100.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
		AT3G08530.1	Clathrin, heavy chain
		AT3G09440.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
		AT3G11130.1	Clathrin, heavy chain
		AT3G22950.1	ADP-ribosylation factor C1
		AT4G20360.1	RAB GTPase homolog E1B
		AT4G32285.1	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
		AT5G02490.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
		AT5G06520.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
		AT5G17920.1	Cobalamin-independent synthase family protein
		AT5G18820.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
		AT5G24890.1	unknown protein
		AT5G42080.1	dynamin-like protein, DRP1A
		AT5G52980.1	ATPase, vacuolar ER assembly factor, Vma12
		ATCG00120.1	ATP synthase subunit alpha
AP2α-DRP1A	16	AT1G31390.1	TRAF-like family protein
		AT1G49240.1	actin 8
		AT1G63280.1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
		AT1G65220.1	ARM repeat superfamily protein
		AT1G67840.1	chloroplast sensor kinase
		AT3G04854.1	unknown protein
		AT3G19570.1	Family of unknown function (DUF566)

		AT3G20050.1	T-complex protein 1 alpha subunit
		AT3G21210.1	zinc ion binding
		AT3G27290.1	RNI-like superfamily protein
		AT3G28820.1	Protein of unknown function (DUF1216)
		AT3G54360.1	zinc ion binding
		AT3G56820.1	unknown protein
		AT3G59880.1	unknown protein
		AT4G09350.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
		AT4G17270.1	Mo25 family protein
AP2α-DRP2A	27	AT1G31400.1	TRAF-like family protein
		AT1G31960.1	unknown protein
		AT1G36050.1	Endoplasmic reticulum vesicle transporter protein
		AT1G49240.1	actin 8
		AT1G63280.1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
		AT1G65220.1	ARM repeat superfamily protein
		AT1G67840.1	chloroplast sensor kinase
		AT2G15695.1	Protein of unknown function DUF829, transmembrane 53
		AT2G44760.1	Domain of unknown function (DUF3598)
		AT2G47620.1	SWITCH/sucrose nonfermenting 3A
		AT3G04854.1	unknown protein
		AT3G08530.1	Clathrin, heavy chain
		AT3G25100.1	cell division cycle 45
		AT3G27290.1	RNI-like superfamily protein
		AT3G28820.1	Protein of unknown function (DUF1216)
		AT3G44530.1	homolog of histone chaperone HIRA
		AT3G54360.1	zinc ion binding
		AT3G56820.1	unknown protein
		AT3G59880.1	unknown protein
		AT3G60360.1	embryo sac development arrest 14
		AT4G17270.1	Mo25 family protein
		AT4G23940.1	FtsH extracellular protease family
		AT4G26660.1	unknown protein

		AT5G06520.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
		AT5G24890.1	unknown protein
		AT5G52980.1	ATPase, vacuolar ER assembly factor, Vma12
		AT5G58510.1	unknown protein
DRP1A-DRP2A	25	AT1G07660.1	Histone superfamily protein
		AT1G10290.1	dynamin-like protein 6, DRP2A
		AT1G12900.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
		AT1G14830.1	DYNAMIN-like 1C, DRP1C
		AT1G49240.1	actin 8
		AT1G50300.1	TBP-associated factor 15
		AT1G56190.1	Phosphoglycerate kinase family protein
		AT1G63280.1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
		AT1G65220.1	ARM repeat superfamily protein
		AT1G67840.1	chloroplast sensor kinase
		AT2G39730.1	rubisco activase
		AT3G04854.1	unknown protein
		AT3G17490.1	F-box and associated interaction domains-containing protein
		AT3G27290.1	RNI-like superfamily protein
		AT3G28820.1	Protein of unknown function (DUF1216)
		AT3G54360.1	zinc ion binding
		AT3G56820.1	unknown protein
		AT3G59880.1	unknown protein
		AT3G60190.1	DYNAMIN-like 1E, DRP1E
		AT4G17270.1	Mo25 family protein
		AT4G20360.1	RAB GTPase homolog E1B
		AT4G21820.1	binding;calmodulin binding
		AT5G18820.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
		AT5G42080.1	dynamin-like protein, DRP1A
		ATCG00340.1	Photosystem I, PsaA/PsaB protein
CLC-	2	AT1G49240.1	actin 8

AP2α-DRP1A		AT3G20050.1	T-complex protein 1 alpha subunit
CLC-AP2α-DRP2A	7	AT1G49240.1	actin 8
		AT2G15695.1	Protein of unknown function DUF829, transmembrane 53
		AT2G44760.1	Domain of unknown function (DUF3598)
		AT3G08530.1	Clathrin, heavy chain
		AT5G06520.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
		AT5G24890.1	unknown protein
		AT5G52980.1	ATPase, vacuolar ER assembly factor, Vma12
CLC-DRP1A-DRP2A	6	AT1G12900.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
		AT1G49240.1	actin 8
		AT2G39730.1	rubisco activase
		AT4G20360.1	RAB GTPase homolog E1B
		AT5G18820.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
		AT5G42080.1	dynamin-like protein, DRP1A
AP2α-DRP1A-DRP2A	11	AT1G49240.1	actin 8
		AT1G63280.1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
		AT1G65220.1	ARM repeat superfamily protein
		AT1G67840.1	chloroplast sensor kinase
		AT3G04854.1	unknown protein
		AT3G27290.1	RNI-like superfamily protein
		AT3G28820.1	Protein of unknown function (DUF1216)
		AT3G54360.1	zinc ion binding
		AT3G56820.1	unknown protein
		AT3G59880.1	unknown protein
		AT4G17270.1	Mo25 family protein
CLC-AP2α-DRP1A-DRP2A	1	AT1G49240.1	actin 8

3.4 考察

3.4.1 陸上植物における既知の CME 関連分子は分子複合体を形成する

本研究の結果, 2 種類の既知 CME 関連分子間で共通に検出されたタンパク質が 11〜29 種, 3 種類の既知 CME 関連分子間で共通に検出されたタンパク質は 2〜11 種, 全ての分子間で共通に検出されたタンパク質も 1 種得られた (表 3-5). これらの分子は, CME 関連分子である可能性が高いタンパク質だと推測される.

また, CME はアダプタータンパク質 AP2 やコートタンパク質 clathrin, dynamin 様タンパク質 DRP1/DRP2 など, 数十種もの分子が小胞形成の進行段階に応じて相互作用し, 集散を繰り返しながら進んでいく (図 3A). AP2α-GFP 発現植物体から検出されたタンパク質は, 他の分子と共通で検出された割合が高かった (CLC: 18.9%, AP2α: 50.0%, DRP1A: 43.6%, DRP2A: 35.2%). このことから, 植物 CME の小胞形成においてもアダプター複合体が分子間を繋ぐ中心的役割を果たしていることが推測される (図 3B). 他にも植物 CME に関わるアダプター複合体が発見されており, 新規アダプター複合体の同定が植物 CME の小胞形成機構の解明に大きく貢献するものと期待される.

3.4.2 構造解析から新規の CME 関連分子が同定される可能性がある

本研究の結果, 多くの有望な分子候補が得られたが, 機能などが全く未知の特徴的なドメイン様構造を持つタンパク質も多く得られた. これらの分子に関しても, タンパク質の高次構造やその機能解析を通じて, CME への関与が明らかになる可能性がある. 例えば, 動物の BAR domain を含むタンパク質は, 特定の直径のリポソームにのみ結合することから細胞膜の曲率感知を担うと考えられている (Peter *et al.*, 2004). BAR domain 様の一次配列を有するタンパク質は, 当初その数が非常に少なく動物や酵母といった限定的な生物種にのみ存在すると考えられてきた. しかし, BAR domain の二次構造が解明された結果, 類似の二次構造を持つ分子種が真核生物の各系統において多数存在し, 大きな分子ファミリーを形成することが示唆されている (Tarricone *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2004). さらには, BAR domain の立体構造を元に生体膜の曲率形成に関わる類似の分子構造が探索された結果, 異なる直径の膜に結合する F-BAR domain を持つタンパク質も発見された (Itoh *et al.*, 2005).

動物などと比べ小さいエンドサイトーシス小胞を形成する植物では, BAR domain を持つタンパク質はほとんど見つかっていない (McMahon and Boucrot, 2011; Koizumi *et al.*, 2005). つまり, 植物では, 同様の二次構造を持ちながらより小さい径の膜に結合するタンパク質が存在することが推察される. 今回得られた機能未知のタンパク質群について構造解析を行うことにより, 植物における膜の曲率感知を担う分子の発見が期待される.

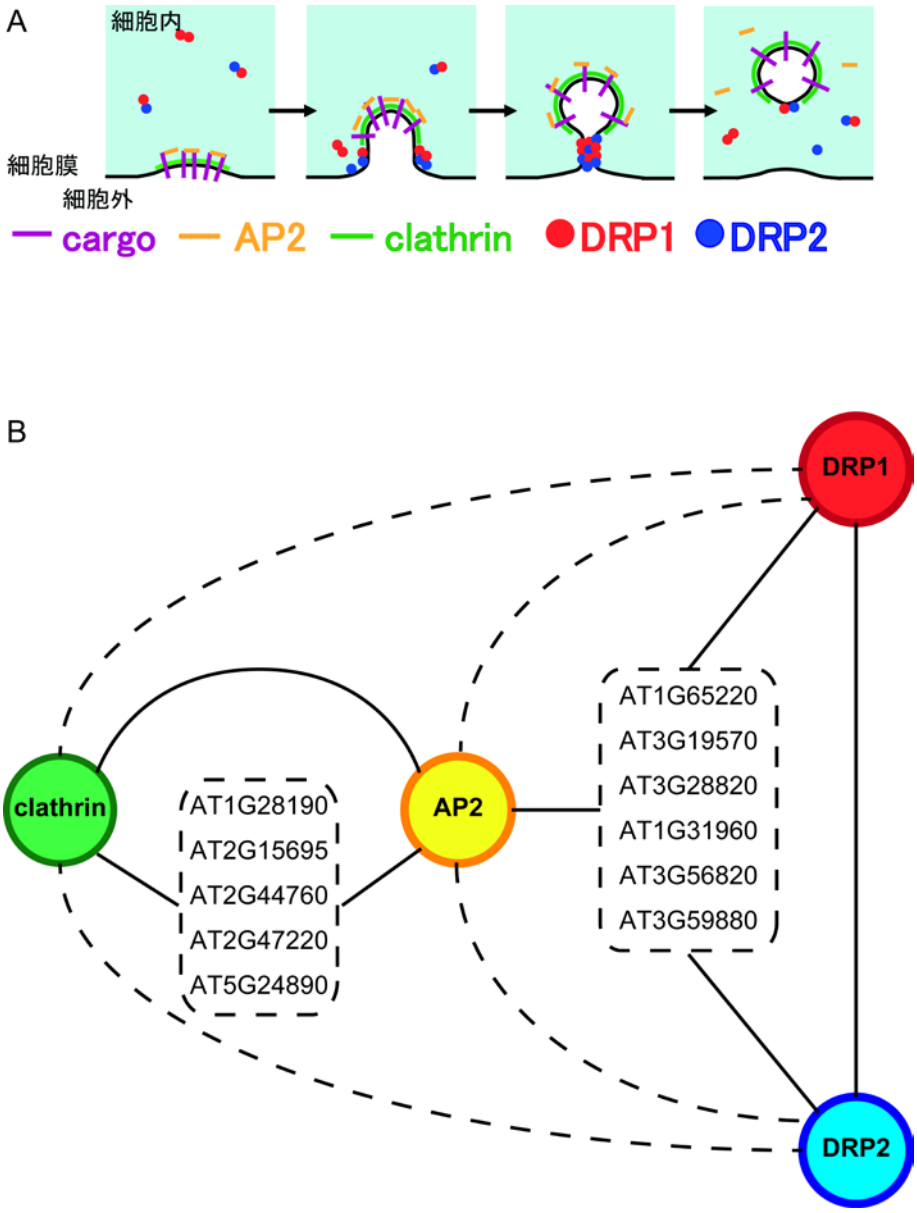


図 3 植物における CME 小胞形成の分子機構モデル.

(A) 植物の CME 小胞形成機構のモデル図.

(B) 植物 CME 関連分子の予想ネットワーク図. 質量解析の結果と動物における研究から得られている知見を合わせて作製した. 実線は植物と動物共通のもの, 破線は植物固有と推測されるもの示す.

第四章　総合考察

真核生物にとって，膜交通，特にその最初のステップである小胞形成は，生体膜上のタンパク質や脂質の量や配置を制御し，オルガネラを適切な状態で維持するために必須の現象である (Doherty and McMahon, 2009). 動物や酵母細胞では解析が早くはじまったことも一因となり，小胞形成のメカニズムについて多くの知見が得られている (McMahon and Boucrot, 2011). しかし，植物細胞では，当初その存在自体が検証の対象であったが故に，メカニズムの解明を志向した研究の開始が比較的遅く，先行して得られた動物細胞における小胞形成関連分子の相同性検索が奏功しない場合も多いため，小胞形成に関わる分子とその機能の多くが未解明となっている．つまり植物では小胞形成機構が独自の発展を遂げてきたと予想され，本研究では植物固有の小胞形成関連分子の機能解析と探索を行った．

まず第二章では陸上植物固有のダイナミン様タンパク質である DRP2 に関する解析を行った．シロイヌナズナの小胞形成には DRP1 と DRP2 の 2 種類の dynamin が共に機能することが報告されている (Fujimoto *et al.*, 2010). T-DNA 挿入系統の解析から, DRP2 の機能が欠失すると配偶体致死となった．また, DRP2 は植物体全体で発現しており，植物体の生育には DRP1 だけでなく, DRP2 が必須だということが示唆された．また, DRP1 がほぼ全ての緑色植物類で保存されている一方で DRP2 は陸上植物にしか存在しない (Miyagishima *et al.*, 2008). 以上のことを考え合わせると，DRP2 は植物が進化の過程で新たに獲得したものだという可能性が想起され，DRP1 と DRP2 における生理的機能の差異の存在が示唆される．

また，dynamin は多量体のらせん，またはリング構造を形成して機能することが数々の報告から明らかになっており (Faelber *et al.*, 2011; Ford *et al.*, 2011), DRP1 と DRP2 も相互作用することが示唆されているが (Fujimoto *et al.*, 2010), この 2 つの DRP はアミノ酸配列の全長や domain 構造が異なっている．そのため，無秩序に多量体を形成した場合，いびつな形のらせん，またはリング構造となると予想される．しかし，実際にはダイナミンのらせん，またはリング構造はほぼ真円状になっており，この多量体の形成様式の解析から DRP1 と DRP2 の分子的機能および立体構造の差異が解明されることが期待される．

第三章では，共免疫沈降法と質量解析を利用した新規エンドサイトーシス小胞形成関連分子の探索を行った．植物における小胞形成関連分子は，動物や酵母からの知見をもとにした相同性検索を介して発見されたものは限られており，植物固有の制御因子の存在が強く示唆されている．しかし，オルガネラ膜からの小胞形成は，積荷の選別と生体膜の構造変化をほぼ同時に

実行するために多様な分子が協調的に関与する必要が有り，分子複合体の形成は必須だと考えられる．そこで既知の小胞形成関連分子の共免疫沈降物から，新規の，また植物独自の構成因子を単離することを目標として研究を行った．

既知 CME 関連分子共免疫沈降物の質量解析の結果からは，既知のエンドサイトーシス小胞形成因子の多量体やそれらと複合体を形成すると予想される分子が多数，そして確度を示すスコアが高い値で検出された．このことから，本手法による相互作用分子単離系での各構成因子の検出頻度および確度は，結合する分子数や時間長に依存する可能性が示唆された．また，機能未知な分子も多く検出されており，細胞内局在解析や変異体の表現型解析，そして分子構造分析により，この中から多くエンドサイトーシス小胞形成関連分子が同定されることが期待される．

さらに，この手法はタンパク質を抽出する植物体に，薬剤処理や外部刺激を加えることが可能である．細胞膜上のタンパク質や脂質は外部環境を感知し変化に応答するために，劇的に変化する (McMahon and Boucrot, 2011). 様々な環境変化を模した処理を植物体に施した後，本手法により単離される分子の種類と量を分析することで，植物の環境応答機構の一端を明らかにすることができると期待される．

第五章　摘要

真核生物はその進化の過程でさまざまなオルガネラを獲得すると同時に，同時にそれらを連絡する物質輸送システムも発達させてきた．このうち小胞や細管を介して行われる物質輸送の仕組みを膜交通と呼び，その過程は，供与オルガネラからの小胞形成と標的オルガネラへの輸送，標的オルガネラへの繋留および融合という三つのプロセスに分けることができる．供与オルガネラごとに小胞形成に関わるコートタンパク質が異なれば，標的オルガネラによって小胞の繋留，融合に必要な膜タンパク質も異なる．このように，経路ごとに各プロセスに関連する分子は多様化している．特に小胞形成のステップでは，輸送されるタンパク質や脂質が選択的に濃縮される．故に，供与オルガネラからタンパク質や脂質を適切に標的オルガネラに届けるためには，小胞の積荷となるタンパク質や脂質の濃縮に最適化した小胞形成装置を用いる必要がある．

ポストゴルジオルガネラにおいて小胞形成を担う主要な分子の一つに clathrin がある.特に，細胞膜やトランスゴルジネットワークからの clathrin 依存的な小胞形成の仕組みは，動物や酵母を用いて盛んに研究されてきた．Clathrin は植物にも存在し，既に細胞膜などにおける小胞形成への寄与が示されている．しかし，動物や酵母に存在する小胞形成関連因子の明確なオルソログは，一部を除いてほとんど植物では同定されていない．細胞膜上での小胞形成は，植物にとっても適切かつ迅速に外部環境を感知し変化に応答するために重要だと考えられる．むしろ，他のプロセスと同様に小胞形成に関しても最適な環境の感知と応答をするための独自の発達を遂げてきたと予想される．そこで，本研究では未解明な点が多い植物における小胞形成機構を解明すべく，陸上植物固有のダイナミン様タンパク質である DRP2 に関する解析と，質量解析を利用した植物における新規の小胞形成関連分子の探索を行った．

1. 植物のダイナミン様タンパク質 DRP2 に関する解析

Dynamin-related protein 2 (*DRP2*) は動物の *dynamin* のオーソログであり，シロイヌナズナゲノム中に *DRP2A* と *DRP2B* の 2 コピーが存在する．この両分子は 92%という非常に高いアミノ酸配列相同性を持ち，共にエンドサイトーシスにおける小胞形成への関与が示唆されている．まず，両分子の機能的差異を明らかにするため，シロイヌナズナの T-DNA 挿入系統の表現型の解析を行った．その結果，両遺伝子共に単独の T-DNA ホモ挿入系統では植物体の生育に顕著な異常は観察されなかった．野生型と両遺伝子共に T-DNA がヘテロに挿入されている系統間で正逆

交雑を行ったところ，雌性配偶体，雄性配偶体がともに致死になっていることが明らかになった．両配偶体についてさらに詳細な観察を行った結果，両配偶体共に核分裂やその後の細胞化が途中で停止していた．以上の結果から，DRP2 が配偶体形成に必須だということが明らかになった．

DRP2 が配偶体以外でも機能を持つのか，そして DRP2A と DRP2B 間で発現パターンに差異はあるのかを明らかにすべく，両遺伝子の発現部位を解析した．まず，定量 RT-PCR を行った結果，DRP2A，DRP2B 共に幼植物体，葉，茎，花器官の全てで mRNA の転写が確認された．次に *DRP2Apro:GUS* および *DRP2Bpro:GUS* 導入植物体を GUS 染色したところ，両形質転換植物体共に全身で GUS のシグナルが観察され，特に根端分裂組織付近や維管束で強いシグナルが観察された．以上の結果から，両分子共に植物体全体で機能を持つことが示唆された．

Dynamin は一般的に多量体を形成して機能することが知られている．そこで，DRP2A と DRP2B が相互作用するか否かを明らかにすべく，相互作用の有無の検証を行った．Yeast two-hybrid 法と蛍光蛋白質再構成法の結果から, DRP2A と DRP2B はそれぞれ自分自身と，そして相互に結合することが示唆された．さらに, DRP2A-GFP 発現植物体からタンパク質を抽出し，抗 GFP 抗体により精製した共免疫沈降産物を質量解析にかけたところ, DRP2A, DRP2B に由来するペプチドが多量に検出された．以上の結果から，DRP2 はホモまたはヘテロポリマーを形成することが示唆された．

次に, DRP2 の細胞内局在を解析した．まず DRP2A, DRP2B 両分子を異なる蛍光タンパク質で標識し共焦点レーザー顕微鏡および斜照明蛍光顕微鏡で観察を行った．その結果，両分子が細胞膜上で直径 200-500 nm のドット状，そして細胞板の新規形成部位で共局在することが明らかになった．さらにさまざまなポストゴルジオルガネラマーカーと両 DRP2 分子の局在を比較した結果，DRP2 が細胞膜だけでなく一部のエンドソームやゴルジ体，トランスゴルジネットワーク上にも局在することが明らかになった．以上の結果から，DRP2 がさまざまなポストゴルジオルガネラでの小胞形成を実行する可能性が示唆された．

さらに，DRP2 の動態を制御するメカニズムを明らかにするため，タンパク質の生体膜表面への局在を担うイノシトールリン脂質代謝や細胞骨格重合の阻害剤処理が細胞膜上における DRP2 の局在や重合・脱重合に及ぼす影響を解析した．その結果, phosphoinositide 3-kinase および phosphoinositide 4-kinase の機能を阻害する wortmannin や微小管の重合を阻害する oryzalin, actin

の重合を阻害する latrunculin B を処理すると，DRP2 の細胞膜上における集散の速度が低下することが示唆された．また, wortmannnin 処理により細胞膜上の DRP2 の局在が減少することが示唆された．以上の結果から，DRP2 の動態はイノシトールリン脂質や細胞骨格と関連することが示唆された．

2. ポストゴルジ膜交通における新規小胞装置関連分子の探索

動物や酵母細胞における研究の結果，一連のエンドサイトーシス小胞形成過程では，多様な分子が関与することが明らかになっている．しかし, clathrin, AP2 アダプター, dynamin 以外の分子のオーソログは，シロイヌナズナゲノム中での相同性検索からは発見できなかった．そこで，シロイヌナズナにおける新規小胞形成関連分子の同定を目指し，幼植物体から抗 GFP 抗体を用いて抽出・精製した CLC-GFP, AP2α-GFP, DRP1A-GFP, DRP2A-GFP の共免疫沈降産物を質量解析した．その結果, CLC-GFP からは 197 種, AP2α-GFP からは 70 種, DRP1A-GFP からは 78 種, DRP2A-GFP からは 165 種のタンパク質が同定された．同定されたタンパク質群には他の既知分子が互いに含まれており，本手法がシロイヌナズナゲノム中の相同性検索では発見できなかった未知の小胞形成分子を得る上で有効だということが示唆された．また，複数の既知分子から共通に得られた分子も多数存在し，植物細胞でも動物細胞と同様に多数の分子が連続的に機能することにより，小胞が形成されることが示唆された．

以上の結果から，陸上植物特有のダイナミンである DRP2A および DRP2B は 多様なポストゴルジ間を結ぶ膜交通経路において協調的に機能しており，また，その機能発現機構はイノシトールリン脂質の代謝や細胞骨格などによって制御されていることが明らかになった.また，既知のエンドサイトーシス関連因子の共免疫沈降物に対する質量解析の結果,この手法が新規の小胞形成分子を得る上で有効であり，植物における小胞形成には既知の分子間を仲介する多様な分子が存在することが示唆された．

参考文献

Akiyama, Y., Yoshihisa, T., and Ito, K. (1995). FtsH, a membrane-bound ATPase, forms a complex in the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 23485–23490.

Aridor, M., and Traub, L.M. (2002). Cargo selection in vesicular transport: The making and breaking of a coat. *Traffic* **3**, 537–546.

Arimura, S., Aida, G.P., Fujimoto, M., Nakazono, M., and Tsutsumi, N. (2004). Arabidopsis dynamin-like protein 2a (ADL2a), like ADL2b, is involved in plant mitochondrial division. *Plant and Cell Physiology* **45**, 236–242.

Balch, W., Dunphy, W., Braell, W., and Rothman, J. (1984). Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* **39**, 405–416.

Bednarek, S.Y., and Backues, S.K. (2010). Plant dynamin-related protein families DRP1 and DRP2 in plant development. *Biochemical Society Transactions* **38**, 797–806.

Blackbourn, H., and Jackson, A. (1996). Plant clathrin heavy chain: sequence analysis and restricted localisation in growing pollen tubes. *Journal of Cell Science* **109**, 777–787.

Backues, S.K., Korasick, D. a, Heese, A., and Bednarek, S.Y. (2010). The Arabidopsis dynamin-related protein 2 family is essential for gametophyte development. *The Plant Cell* **22**, 3218–3231.

Brodsky, F.M., Chen, C., Knuehl, C., Towler, M.C., and Wakeham, D.E. (2001). Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **17**, 517–568.

Caro, L., and Palade, G. (1964). Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. *The Journal of Cell Biology* **20**, 473–495.

Christensen, C. a., King, E.J., Jordan, J.R., and Drews, G.N. (1997). Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the Gf mutant. *Sexual Plant Reproduction* **10**, 49–64.

Di Rubbo, S., Irani, N.G., Kim, S.Y., Xu, Z.-Y., Gadeyne, A., Dejonghe, W., Vanhoutte, I., Persiau, G., Eeckhout, D., Simon, S., et al. (2013). The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**, 2986–2997.

Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 857–902.

Ebine, K., and Ueda, T. (2009). Unique mechanism of plant endocytic/vacuolar transport pathways. *Journal of Plant Research* **122**, 21–30.

Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M.H. Thordal-Christensen, H., Tsutsumi, N., Nakano, A., and Ueda, T. (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nature Cell Biology* **13**, 853–859.

Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**, 1349–1349.

Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., Haucke, V., Noé, F., and Daumke, O. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* **477**, 556–560.

Faelber, K., Held, M., Gao, S., Posor, Y., Haucke, V., Noé, F., and Daumke, O. (2012). Structural insights into dynamin-mediated membrane fission. *Structure* **20**, 1621–1628.

Fan, L., Hao, H., Xue, Y., Zhang, L., Song, K., Ding, Z., Botella, M. a, Wang, H., and Lin, J. (2013). Dynamic analysis of Arabidopsis AP2 σ subunit reveals a key role in clathrin-mediated endocytosis and plant development. *Development* **140**, 3826–3837.

Farquhar, M., and Palade, G. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology* **17**, 375–412.

Ford, M.G.J., Pearse, B.M.F., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2001). Simultaneous Binding of PtdIns(4,5)P2 and Clathrin by AP180 in the Nucleation of Clathrin Lattices on Membranes. *Science* **291**, 1051–1056.

Ford, M.G.J., Jenni, S., and Nunnari, J. (2011). The crystal structure of dynamin. *Nature* **477**, 561–566.

Fujimoto, M., Arimura, S., Nakazono, M., and Tsutsumi, N. (2008). Arabidopsis dynamin-related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the leading edge of the forming cell plate. *Plant Cell Reports* **27**, 1581–1586.

Fujimoto, M., Arimura, S., Mano, S., Kondo, M., Saito, C., Ueda, T., Nakazono, M., Nakano, A., Nishimura, M., and Tsutsumi, N. (2009). Arabidopsis dynamin‐related proteins DRP3A and DRP3B are functionally redundant in mitochondrial fission, but have distinct roles in peroxisomal fission. *The Plant Journal*. **58**, 388–400.

Fujimoto, M., Arimura, S., Ueda, T., Takanashi, H., Hayashi, Y., Nakano, A., and Tsutsumi, N. (2010). Arabidopsis dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 6094–6099.

Fujimoto, M., and Tsutsumi, N. (2014). Dynamin-related proteins in plant post-Golgi traffic. *Frontiers in plant science* **5**, 408.

Fujiwara, M., Uemura, T., Ebine, K., Nishimori, Y., Ueda, T., Nakano, A., Sato, M.H., and Fukao, Y. (2014). Interactomics of Qa-SNARE in Arabidopsis thaliana. *Plant & Cell Physiology* **55**, 781–789.

Gadeyne, A., Sánchez-Rodríguez, C., Vanneste, S., Di Rubbo, S., Zauber, H., Vanneste, K., Van Leene, J., De Winne, N., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Cannoot, B., Vercruysse, L., Mayers, J.R., Adamowski, M., Kania, U., Ehrlich, M., Schweighofer, A., Ketelaar, T., Maere, S., Bednarek, S.Y., Friml, J., Gevaert, K., Witters, E., Russinova, E., Persson, S., De Jaeger, G., and Van Damme, D. (2014). The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. *Cell* **156**, 691–704.

Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.-R., and Hänsch, R. (2009). New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Plant* **2**, 1051–1058.

Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S.-I., Natsume, T., Komada, M., Shibuya, H., Nara, A., and Matsumoto, K. (2011). Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nature Communications* **2**, 158.

Hong, Z., Bednarek, S.Y., Blumwald, E., Hwang, I., Jurgens, G., Menzel, D., Osteryoung, K.W., Raikhel, N.V., Shinozaki, K., Tsutsumi, N., and Verma, D.P.S. (2003). A unified nomenclature for Arabidopsis dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Molecular Biology* **53**, 261–265.

Hu, J., Shibata, Y., Zhu, P.-P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W. a, Rapoport, T. a, and Blackstone, C. (2009). A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell* **138**, 549–561.

Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews* **91**, 119–149.

Ito, E., Fujimoto, M., Ebine, K., Uemura, T., Ueda, T., and Nakano, A. (2012). Dynamic behavior of clathrin in Arabidopsis thaliana unveiled by live imaging. *The Plant Journal* **69**, 204–216.

Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., and Takenawa, T. (2001). Role of the ENTH Domain in Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Binding and Endocytosis. *Science* **291**, 1047–1052.

Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Developmental Cell* **9**, 791–804.

Jamieson, J.D., and Palade, G.E. (1962). Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. *The Journal of Cell Biology* **34**, 577–596.

Jin, J.B., Kim, Y.A., Kim, J., Lee, H., Kim, H., Cheong, G., and Hwang, I. (2001). A new Dynamin-Like Protein , ADL6 , is involved in trafficking from the trans -Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**, 1511–1525.

Kaiser, C.A., and Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* **61**, 723–733.

Kang, B.-H., Rancour, D.M., and Bednarek, S.Y. (2003). The dynamin-like protein ADL1C is essential for plasma membrane maintenance during pollen maturation. *The Plant Journal* **35**, 1–15.

Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY^{TM} vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**, 193–195.

Kim, S.Y., Xu, Z.-Y., Song, K., Kim, D.H., Kang, H., Reichardt, I., Sohn, E.J., Friml, J., Juergens, G., and Hwang, I. (2013). Adaptor protein complex 2-mediated endocytosis is crucial for male reproductive organ development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**, 2970–2985.

Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 187–198.

Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Löfke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., and Friml, J. (2011). Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**, 1920–1931.

Koizumi, K., Naramoto, S., Sawa, S., Yahara, N., Ueda, T., Nakano, A., Sugiyama, M., and Fukuda, H. (2005). VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. *Development* **132**, 1699–1711.

Konopka, C. a, Backues, S.K., and Bednarek, S.Y. (2008). Dynamics of Arabidopsis dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. *The Plant Cell* **20**, 1363–1380.

Lam, B.C.-H., Sage, T.L., Bianchi, F., and Blumwald, E. (2002). Regulation of ADL6 activity by its associated molecular network. *The Plant Journal* **31**, 565–576.

Lee, S.H., Jin, J.B., Song, J., Min, M.K., Park, D.S., Kim, Y.-W., and Hwang, I. (2002). The intermolecular interaction between the PH domain and the C-terminal domain of Arabidopsis dynamin-like 6 determines lipid binding specificity. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 31842–31849.

McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.T., and Tufaro, F. (1999). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of

heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 668–673.

McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **12**, 517–533.

Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 663–700.

Miyagishima, S., Kuwayama, H., Urushihara, H., and Nakanishi, H. (2008). Evolutionary linkage between eukaryotic cytokinesis and chloroplast division by dynamin proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15202–15207.

Mravec, J., Petrášek, J., Li, N., Boeren, S., Karlova, R., Kitakura, S., Pařezová, M., Naramoto, S., Nodzyński, T., Dhonukshe, P., Bednarek, S.Y., Zažímalová, E., de Vries, S., and Friml, J. (2011). Cell plate restricted association of DRP1A and PIN proteins is required for cell polarity establishment in Arabidopsis. *Current Biology* **21**, 1055–1060.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.

Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., Sato, Y., and Ishiguro, S. (2010). Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 1315–1319.

Neves, G., Gomis, A., and Lagnado, L. (2001). Calcium influx selects the fast mode of endocytosis in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 15282–15287.

Novick, P., and Schekman, R. (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 1858–1862.

Pearse, B.M.F. (1975). Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *Journal of Molecular Biology* **97**, 93–98.

Pearse, B.M.F. (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 1255–1259.

Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Jonathan, P., Butler, G., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature : The Amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495–500.

Praefcke, G.J.K., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **5**, 133–147.

Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T. (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes & Development* **20**, 537–542.

Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Čovanová, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S.Y., Jones, A.M., Luschnig, C., Aniento, F., Zažímalová, E., and Friml, J. (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* **143**, 111–121.

Rothman, J., and Orci, L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* **355**, 409–415.

Schmid, S.L., and Frolov, V. a (2011). Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27**, 79–105.

Sever, S. (2002). Dynamin and endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 463–467.

Shpetner, H.S., Herskovits, J.S., and Vallee, R.B. (1996). A Binding Site for SH3 Domains Targets Dynamin to Coated Pits. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 13–16.

Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., and Rothman, J.E. (1993a). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409–418.

Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993b). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318–324.

Stangeland, B., and Salehian, Z. (2002). An improved clearing method for GUS assay inArabidopsis endosperm and seeds. *Plant Molecular Biology Reporter* **20**, 107–114.

Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T., and Hara-Nishimura, I. (2010). Identification and characterization of nuclear pore complex components in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* **22**, 4084–4097.

Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. a, Rittinger, K., Gamblin, S.J., and Smerdon, S.J. (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215–219.

Taylor, N.G. (2011). A role for Arabidopsis dynamin related proteins DRP2A/B in endocytosis; DRP2 function is essential for plant growth. *Plant Molecular Biology* **76**, 117–129.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876–4882.

Uemura, T., Suda, Y., Ueda, T., and Nakano, A. (2014). Dynamic behavior of the trans-golgi network in root tissues of Arabidopsis revealed by super-resolution live imaging. *Plant and Cell Physiology* **55**, 694–703.

Yamaoka, S., Shimono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Kawase, T., Hatsugai, N., Tamura, K., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. (2013). Identification and dynamics of Arabidopsis adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development. *The Plant Cell* **25**, 2958–2969.

Ye, G., Stone, D., Pang, S., Creely, W., Gonzalez, K., Hinchee, M., Company, M., and Parkway, C. (1999). Arabidopsis ovule is the target for Agrobacterium in planta vacuum infiltration transformation. *The Plant Journal* **19**, 249–257.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，指導教官である堤伸浩教授には実験計画に対する助言を始めとして終始温かい御指導，御鞭撻を賜りましたこと，そして研究の遂行に最適な環境と実際に実行するチャンスを与えていただいたことを，心より感謝致します．有村慎一准教授には，研究室に所属した当初から，研究計画の立案から実験手法の指導まで，本研究の全般に渡り懇切丁寧なご指導を頂いたことを心より感謝しております．藤本優特任准教授には，研究方針や研究計画の具体的な立案，必要な実験材料の提供や具体的な実験手法の指導など，本研究の全般に渡りさまざまなご指導，ご助力を頂いたことを，心より感謝致します．高梨秀樹助教には，実験手法に関するご助言をはじめ，日々の研究室生活においてさまざまな面で温かいご支援を頂いたことを心より感謝致します．植物分子遺伝学研究室の先輩方，同期，後輩およびスタッフの皆様には，素晴らしい雰囲気の中で研究を遂行させて頂き，そしてさまざまな点で研究室生活を支えていただいたことを心より感謝致します．また，日本学生支援機構には奨学金を頂いたこと，日本学生支援機構には特別研究員奨励費および科学研究費を頂いたことを感謝致します．奈良先端科学技術大学院大学植物グローバル教育プロジェクトおよび教員の皆様には，最先端のバイオイメージング，ゲノム・トランスクリプトームおよびタンパク質質量・ネットワーク解析技術に触れる機会，そして同年代の研究を志す学生と交流する場を与えて頂いたことを心より感謝致します．特に，深尾陽一朗特任准教授および藤原正幸特任助教にはタンパク質質量解析を行うにあたりさまざまなご助言と多大なるご助力を頂いたことを心より感謝致します．東京大学理学部の中野明彦教授，上田貴志准教授および植村知博助教，理化学研究所の庄田恵子氏には実験材料をご提供頂いたことを心より感謝致します．京都大学生命科学研究科の河内孝之教授および山岡尚平助教には DRP のゼニゴケゲノム中における dynamin 様タンパク質配列の検索などのご助力を頂いたことを心より感謝致します．最後に，両親には，ここまで育ててくれ，そしてさまざまな面で支えてくれたことを心より感謝致します．

本論文第 2 章の一部は，Elsevier 社より既に出版されている以下の論文から転載した．

2014 年 12 月 Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 456, No. 1, pp. 238-244,

“Arabidopsis dynamin-related proteins, DRP2A and DRP2B, function coordinately in post-Golgi trafficking”

(Huang, J., Fujimoto, M., Fujiwara, M., Fukao, Y., Arimura, S., Tsutsumi, N.)