

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 24 年度博士課程進学

氏名 黄 嘉禾 (Huang Jiahe)

指導教員名 堤 伸浩

論文題目 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

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現象が発見されたことに遡る。その後、パルス-チェイス法の利用によりタンパク質分泌経路の詳細が判明するとともに、膜交通経路におけるゴルジ体の関与が実証され、1898 年の発見時から謎に包まれていたゴルジ体の機能の一端が明らかとなった。その後、ゴルジ体以降の膜交通経路の多様性が判明し、小胞形成を担うコートタンパク質や小胞の標的膜への適切な繫留や融合を担う膜タンパク質 SNARE など、複雑な輸送ネットワークを実現している分子機構が明らかにされてきた。

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繫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繫留、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も多様化している。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、豚の脳から抽出、同定され、三脚巴状の構造をとっており、重合して格子を作って膜を被覆することにより生体膜から小胞の形成を促すコートタンパク質である。そして、この clathrin の格子が足場となり、アダプタータンパク質や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。

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。しかし、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

*Dynamamin-related protein 2 (DRP2)* は動物の *dynamamin* 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。そこで両遺伝子に T-DNA がホモに挿入されている系統の作出を交配により試みたが、そのような遺伝子型の系統や、一方にホモ他方にヘテロに T-DNA が挿入されている系統は得られなかった。そこで、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* 及び *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分析にかけたところ、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及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、wortmannin 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、AP2-GFP、DRP1A-GFP、DRP2A-GFP の共免疫沈降産物を質量分析した。その結果、CLC-GFP からは 197 種、AP2-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。