

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32615

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18527

研究課題名(和文) RAB5-Ropカスケードを介した細胞内シグナリング機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of RAB5-Rop signaling cascades in plants

研究代表者

中村 瑛海(伊藤瑛海)(Ito, Emi)

国際基督教大学・教養学部・特任助教

研究者番号：80726422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、植物RAB5の新奇エフェクターとして単離同定されたSWAP70がその下流でRho of Plant (Rop)の機能制御を担うと考え、SWAP70が相互作用するROPの同定とその機能制御機構の解明を試みた。相互作用解析の結果、シロイヌナズナSWAP70はROP7と相互作用することがわかった。ROP7は定常状態では細胞膜、核、核小体様構造に局在したが、SWAP70や植物RAB5との共発現によりエンドソームに局在化した。ROP7は組織特異的な発現様式を示す。以上から、RAB5はSWAP70を介してROP7とカスケードを構築することにより組織特異的な機能制御を実行すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I have identified SWAP70 as a novel effector protein of plant RAB5 GTPases. Since SWAP70 is known as a Rac activation factor in other eukaryotic systems, I hypothesized that RAB5 and Rho of Plant GTPases (ROP; counterpart of Rho in plants) constitute a signaling cascade via SWAP70. To test this hypothesis, I cloned Rop members, and tested their interaction with SWAP70. As a result, ROP7 was the only member capable for binding to SWAP70. Next, I examined the effect of SWAP70 and RAB5 members on the subcellular localization of ROP7. ROP7 mainly localized to the plasma membrane, nucleus and nucleolus-like structures in tobacco leaf epidermal cells. When SWAP70 or RAB5s were co-expressed with ROP7, subpopulation of ROP7 shifted to localize to the endosomes. ROP7 is known to show tissue-specific expression patterns. Thus, my results suggest that plant RAB5s trigger tissue-specific phenomena by regulating the subcellular functions of ROP7 through SWAP70.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：RAB GTPases Rho GTPases Rho of Plant (Rop)

1. 研究開始当初の背景

生命の基本単位である細胞のなかには、生体膜によりさまざまな役割をもったコンパートメントに区画化されており、これらはオルガネラと総称される。オルガネラ間では「膜交通」により活発に物質や情報のやりとりが行われており、これは生命が恒常性を維持するうえで重要な仕組みである。低分子量GTPaseであるRAB5は、不活性型と活性型をサイクルし、活性型時にエフェクターとよばれる機能実行因子群と相互作用することにより分子スイッチとして機能する。RAB5は真核生物に広く保存されているが、陸上植物と一部の緑色藻類は「保存型RAB5」に加え、ユニークな一時構造をもつ「植物固有型RAB5」を有する。

我々はこれまで、この2種類のRAB5が拮抗する輸送経路を制御することにより植物固有の現象制御に関わることを明らかにし、報告してきた。このようなRAB5の機能はエフェクターとの相互作用を介して発現していると考えられるが、動物や酵母におけるRAB5エフェクターのホモログのほとんどは植物に存在しないため、その分子基盤には未解明な点が多い。

そこで、申請者は植物固有型RAB5を対象としたエフェクタースクリーニングを行い、その結果、シロイヌナズナSWAP70の単離に成功した。SWAP70は、シグナル伝達や細胞骨格制御に関わるRac GTPaseの活性因子であることから植物ではRAB5がRop(植物におけるRhoファミリーのカウンターパート)の活性化因子と相互作用することによりRAB5-Rac/Ropカスケードを構築し、細胞内シグナリングを制御するという仮説が考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、植物においてRAB5がRopの活性化を制御することによりカスケードを構築し、細胞内シグナリングを制御する可能性の検証とその分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

RAB5によるRopの機能制御の分子機構と細胞内シグナリングにおける役割を明らかにするため、3つの研究を計画した。研究計画1では、SWAP70の基質となるRopの同定を試みた。研究計画2では、RAB5がRopの機能発現に与える影響を明らかにした。研究計画3では、RAB5-Ropカスケードが細胞内シグナリングにおいて果たす役割を評価した。

4. 研究成果

本研究課題では、SWAP70の基質となるRopの探索を行った。シロイヌナズナには11個のRop GTPaseが存在し、それぞれが異なる細胞内シグナル制御に関わる。そこで全て

のROPについてcDNAをクローニングし、相互作用解析を行った。SWAP70がRop活性化因子である場合、不活性型Ropとより強く相互作用することが予想されたため、全てのROPについて、PCR法により不活性型固定型もしくは活性型固定型となる点突然変異を導入し、相互作用解析に用いた。これらのコンストラクトを用いて、酵母2ハイブリッド法による相互作用解析を行った結果、SWAP70は予想に反してどの不活性型Ropとも相互作用を示さず、ROP7の野生型と活性型と相互作用することがわかった。(図1) この結果は、SWAP70がRopの活性化因子ではなく、ROP7の下流で機能するエフェクターである可能性を示唆する。

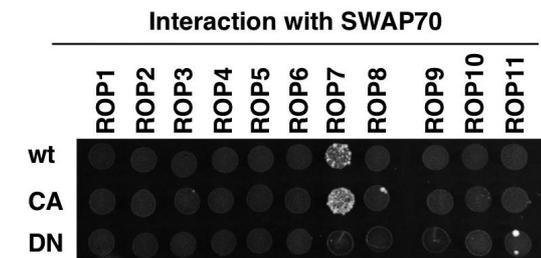


図1: 酵母2ハイブリッド法によるSWAP70とRopの相互作用解析。CA:活性型固定変異導入Rop、DN:不活性型固定変異導入Rop

次に、研究計画2を実施した。研究計画1でSWAP70の相互作用因子がROP7であることが明らかになったため、SWAP70やRAB5がROP7の細胞内局在に与える影響を調査した。まず、ROP7に蛍光タンパク質(mRFP)を融合し、ROP7の細胞内局在を

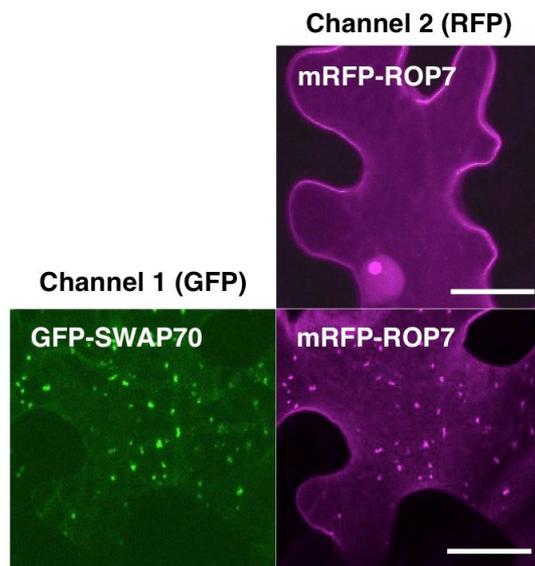


図2: ROP7の細胞内局在。(上)ROP7は細胞膜と核、核小体様の構造に局在する。(下)ROP7は、SWAP70の過剰発現によりエンドソームに局在化する。Bars = 20 μm

共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、ROP7は細胞膜と核、核内の核小体様構造に局在することがわかった(図2上)。つづいて、mRFP-ROP7を発現する細胞に対して、GFP-SWAP70を過剰発現させたところ、ROP7がSWAP70の局在するエンドソームへ局在化する様子が観察された(図2下)。活性型固定および不活性型固定ROP7変異タンパク質についても同様の解析を行った。両者とも野生型と同様の細胞内局在パターンを示したが、不活性型ROP7はSWAP70による影響を受けず、細胞内局在パターンに変化は生じなかったが、活性型ROP7は野生型ROP7と同様にSWAP70の共発現によりエンドソームに局在化する様子が観察された(図3)。このような局在変化は、SWAP70との相互作用を示さなかったROP1やROP2には起こらなかった。また、ROP7のエンドソームへの局在化は、エンドソーム局在タンパク質であるVAMP727の共発現では起こらなかった。

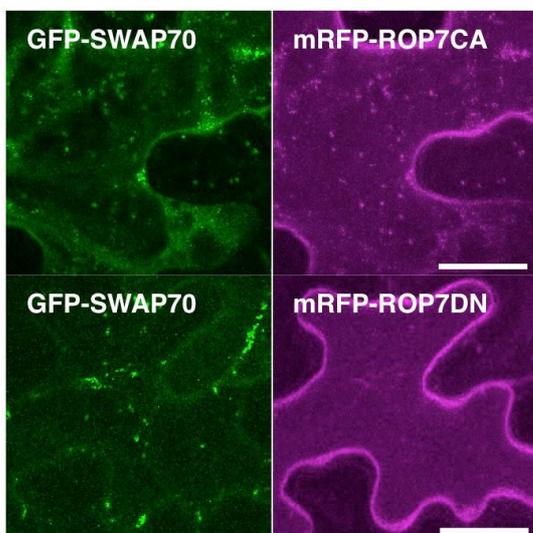


図3：活性型および不活性型ROP7の細胞内局在に対するSWAP70の影響 CA:活性型ROP7、DN:不活性型ROP7 Bars = 20 μm

ここまでの結果から、SWAP70はROP7のエフェクターとしてROP7の細胞内局在制御をされると考えられる。SWAP70は、RAB5のエフェクターでもあり、我々は、SWAP70が保存型RAB5と植物固有型RAB5の両方と結合することを明らかにしている。そこで、RAB5がSWAP70の上流でROP7の細胞内局在制御を担う可能性を調べるため、RAB5の共発現がROP7の細胞内局在に与える影響を調べた。その結果、ROP7は保存型RAB5と植物固有型RAB5の共発現により、エンドソームに局在化することがわかった(図4)。このようなROP7の局在変化は、RAB11の共発現では生じなかった。

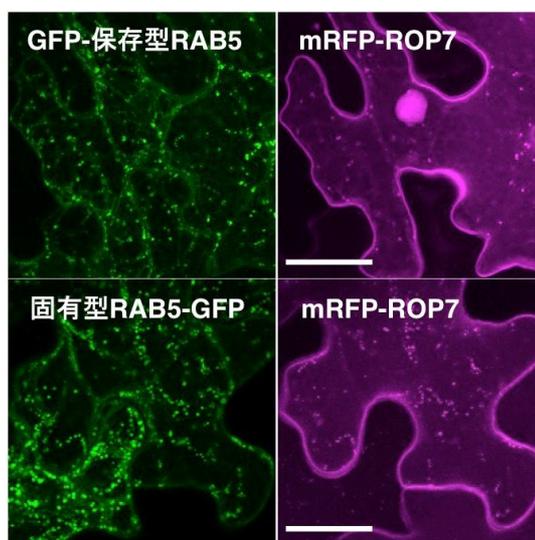


図4：ROP7の細胞内局在に対するRAB5の影響 Bars = 20 μm

最後に、研究計画3を実行した。研究1によりSWAP70がRop7特異的に相互作用することが明らかになったことから、Arabidopsis Biological Resource Centerよりrop7 T-DNA挿入変異体を購入した。野生型植物と3回戻し交雑を行ったのち、表現型解析を行ったが、rop7は目立った表現型を示さなかった。そこで現在、RAB5の活性化因子であるVPS9aの変異体とrop7との二重変異体の作出を試みている。ここまでの結果から、ROP7はSWAP70を介してRAB5の下流で機能すると考えられるため、rop7変異はvps9a-2変異体の表現型を亢進する可能性が考えられる。また、vps9a変異体においてROP7が過剰発現する形質転換体の作出にも着手しており、ROP7の過剰発現がvps9a-2変異体の表現型を回復させる効果をもつかの調査も必要である。

本研究では、RAB5がSWAP70を介してROP7の機能を制御する可能性を初めて示した。ROP7は、維管束組織や気孔など組織特異的な発現パターンを示すことが報告されている一方で(Brembu et al., 2005; Wang et al., 2017) RAB5の組織特異的な機能発現機構は明らかでない。本研究により、組織特異的に発現するRAB5の下流因子を発見したことで、今後、維管束形成過程や維管束を介した長距離シグナリング、気孔開閉機構などにおけるRAB5の役割が明らかになることが期待される。

<引用文献>

- Brembu T., Winge P., Bones AM. (2005) The small GTPase AtRAC2/ROP7 is specifically expressed during late stages of xylem differentiation in Arabidopsis. *J. Exp. Bot* 56 (419):2465-76
- Wang W., Liu Z., Zhang SS et al. (2017)

The RopGEF-ROP7/ROP2 pathway activated by phyB suppresses red light-induced stomatal opening. *Plant Physiol.* 174(2):717-731

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Takemoto K., Ebine K., Askani J., Kruger F., Gonzalez Z., Ito E., Goh T., Schumacher K., Nakano A., Ueda T. (2018) Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in Arabidopsis. *PNAS* 115(10):E2457-E2466

Inada N., Ebine K., Ito E., Nakano A., Ueda T. (2017) Constitutive activation of plant-specific RAB GTPase confers increased resistance against adapted powdery mildew fungus. *Plant Biotech.* 34(2):89-95

Inada N., Betsuyaku S., Shimada T.L., Ebine K., Ito E., Kutsuna N., Hasezawa S., Takano Y., Fukuda H., Nakano A., Ueda T., (2016) Modulation of plant RAB GTPase-mediated membrane trafficking pathway at the interface between plants and obligate biotrophic pathogens. *Plant Cell Physiol* 57(9):1854-64

Ito E., Uemura T., Ueda T., Nakano A. (2016) Distribution of RAB5-positive multivesicular endosomes and the trans-Golgi network in root meristematic cells of Arabidopsis thaliana. *Plant Biotech.* 33:281-286

〔学会発表〕(計 19 件)

伊藤瑛海、加藤直也、石原敬史、鈴木千絵、杉山友希、上田貴志、中野明彦「シロイヌナズナ RAB5 エフェクター、PEAR1 の解析」第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日、東京

伊藤瑛海、加藤直也、石原敬史、鈴木千絵、杉山友希、上田貴志、中野明彦「シロイヌナズナにおける脂質結合性 RAB5 エフェクター、PEAR1 の解析」第 67 回日本細胞生物学会年会、2015 年 7 月 2 日、船堀、東京

Emi Ito, Takashi Ueda and Akihiko Nakano “Plant-unique RAB5 Effector 2 integrates the trafficking pathways mediated by two RAB5 groups in *Arabidopsis thaliana*” 18th European Plant Endomembrane Meeting, 18th August 2015, Leeds, United Kingdom
伊藤瑛海、上田貴志、中野明彦

「Plant-unique RAB5 Effector 2 は ARA6 の機能を保存型 RAB5 の制御する液胞輸

送経路を統御する制御因子である」第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 20 日、盛岡

伊藤瑛海、崔勝媛、星川健、江面浩、溝口剛「マイクロトム (*Solanum*

lycopersicum) における RAB GTPase の網羅的解析」2016 年植物細胞研究会、2016 年 8 月 25 日、三島

有本早季、崔勝媛、溝口剛、伊藤瑛海「シロイヌナズナ RAB5 エフェクター、PH15 の細胞内局在解析」JAMPER2016、2016 年 9 月 29 日、東京

崔勝媛、伊藤瑛海「PH ドメインを持つ、シロイヌナズナの RAB5 のエフェクター、PEAR2 と PEAR3 の機能解析」JAMPER2016、2016 年 9 月 29 日、東京

Ito E., Choi SW, Ebine K, Ueda T and Nakano A “Cellular trafficking machineries support plants’ unique ways of living” The 13th JSOL Consortium International Symposium, 25th Nov., Tokyo

Choi SW, Ebine K, Mizoguchi T, Ueda T, Nakano A, Ito E. “Identification of PH-domain-containing RAB5 effectors” The 13th JSOL Consortium International Symposium, 25th Nov., Tokyo

Arimoto S, Choi SW, Ebine K, Mizoguchi T, Ueda T, Nakano A, Ito E. “Analysis of subcellular localization of pleckstrin homology-containing RAB5 effector, PH15” The 13th JSOL Consortium International Symposium, 25th Nov., Tokyo

伊藤瑛海、崔勝媛、溝口剛、星川健「マイクロトム花と果実における RAB GTPase の発現変動」平成 28 年度拠点報告会、平成 29 年 3 月 14 日、茨城、つくば

Choi SW, Ebine K., Kato N., Ishihara T., Suzuki C., Sugiyama Y., Tanaka Y., Ueda T., Nakano A., Ito E.

“Identification of PH-domain-containing RAB5 effectors PEAR2 and PEAR3 in Arabidopsis.” The 58th annual meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 16th March, 2017, 鹿児島

Arimoto S., Choi SW., Ebine K., Mizoguchi T., Ueda T., Nakano A., Ito E. “Analysis of subcellular localization of PH15, pleckstrin-homology domain-containing protein” The 58th annual meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 16th March, 2017, 鹿児島

Ito E., Choi SW., Ebine K., Ueda T. and Nakano A. “Plant-unique RAB5

effector 3 shuttles from endosomes to nucleus” The 58th annual meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 16th March, 2017, 鹿

児島
崔勝媛、伊藤瑛海「PHドメインをもつシロイヌナズナのRAB5エフェクター、PEAR2とPEAR3の機能解析」第6回エンドメンブレンミーティング、平成29年9月27日、岡崎、愛知

伊藤瑛海「脂質結合性RAB5エフェクター、PEAR1の解析」第6回エンドメンブレンミーティング、平成29年9月27日口頭発表、岡崎、愛知

伊藤瑛海「核-エンドソーム局在型エフェクターPUF3の解析」第5回テニユアトラック教員による創造型シンポジウム～叡智～、平成29年11月17日ポスター発表、東京

Ito E., Choi SW., Ebine K., Ueda T., Nakano A. “Nuclear localization of Plant-unique RAB5 effector 3 is regulated by RAB5 GTPases” 第59回日本植物生理学会年会、平成30年3月30日、札幌

Choi SW., Ebine K., Kato N., Ishihara T., Suzuki C., Sugiyama Y., Tanaka Y., Ueda T., Nakano A., Ito E.

“Identification of PH domain-containing effectors PEAR2 and PEAR3 in Arabidopsis” 第59回日本植物生理学会年会、平成30年3月28日、札幌

〔図書〕(計1件)

上田貴志、伊藤瑛海、藤本優、石井みどり(著)石井忠、石水毅、梅沢俊明、加藤陽治、岸本崇生、小西照子、松永俊朗(編)「植物細胞壁実験法」より『第4章イメージングより4.6 ライブセルイメージング』弘前大学出版 2016年2月24日(初版第1刷発行)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://researchers.icu.ac.jp/icuhp/KgApp?kyoinId=ybbyyobggy&Language=2>

6. 研究組織

(1)研究代表者
中村 瑛海(Nakamura Emi)
国際基督教大学・アーツ・サイエンス学
科・自然科学デパートメント・特任助教
研究者番号：80726422

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()