

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18551

研究課題名(和文)膜融合装置から探る植物液胞機能の発現機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of vacuolar membrane fusion regulated by SNARE proteins in plant cells

研究代表者

海老根 一生 (EBINE, Kazuo)

基礎生物学研究所・細胞動態研究部門・助教

研究者番号：90590399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：液胞は植物細胞の体積の90%以上を占めるオルガネラで、物質の貯蔵や空間充填など植物特有の機能を持つ。これらの機能に関わる液胞への輸送経路は複数あるが、その使い分けや制御メカニズムは不明である。液胞輸送経路の詳細な解析から、RAB5依存的でRAB7やAP3に非依存的な経路が小胞体から液胞への直接的な輸送経路であることが示唆された。また、液胞膜融合実行因子の変異体sgr3-1の解析から、植物の新規液胞制御因子としてalpha-SNAPを単離した。

研究成果の概要(英文)：The multifunctional vacuole is the largest organelle in plant cells, to and in which many proteins and other components are transported and stored. Three vacuolar transport pathways exist in Arabidopsis cells, but detail mechanisms of these pathways are still unclear. The analysis of transport mechanism of VHP1 to the vacuole suggests that RAB5-dependent RAB7-AP3-independent pathway, which is one of the plant unique pathways, is related to the transport pathway from ER to the vacuole. SNARE proteins are conserved key molecules regulating membrane fusion in membrane trafficking pathways. Vacuolar transport also involves a set of SNARE proteins, which mainly reside on the vacuolar membrane. Vacuolar SNAREs have also been shown to be required for vacuolar morphogenesis. VAM3/SYP22/SGR3 is a Qa-SNARE localizing on the vacuolar membrane. By the analysis of sgr3-1 mutant, alpha-SNAP was isolated as a novel regulator of vacuolar dynamics in plant.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：液胞 オルガネラ 膜交通 SNARE

### 1. 研究開始当初の背景

液胞は植物細胞の体積の 90% 以上を占める巨大なオルガネラで、真核生物に共通する不要物の分解に加え、物質の貯蔵、膨圧の発生、空間充填など、植物に特有の機能を有している。この多様かつ重要な機能を発現するためには、液胞機能を支える種々の物質が液胞へ正確に輸送される必要がある。また花茎の重力応答、乾燥ストレス応答、塩ストレス応答、自然免疫などの様々な現象に液胞が関与し、そこには液胞形態のダイナミックな変化を伴うことが報告されている。

このような液胞への輸送や、液胞の形態制御には、膜交通と呼ばれるメカニズムによる制御が重要な役割を果たしていることが知られている。SNARE は膜交通のなかでも膜融合のステップを実行する鍵因子である。標的膜上に局在する Q-SNARE と輸送小胞上に局在する R-SNARE による複合体によって膜融合が実行され、この複合体形成の特異性が正確な膜交通制御に重要な役割を担っている。植物の液胞制御に関わる Q-SNARE として、SYP2-VTI1-SYP5 の 3 つが知られている。一方 R-SNARE としては VAMP71 と VAMP727 の 2 つがそれぞれこの 3 つの Q-SNARE と複合体を形成することが知られていた。しかしながら、これらの SNARE 複合体が細胞内でどのような液胞膜制御を行うか、そのメカニズムの違いについては明らかになっていない部分が多く残されていた。また、植物における液胞輸送経路は単一ではなく、少なくとも 3 つの経路が存在すること、液胞に局在する SNARE である SYP2 と VAMP71 は異なる液胞輸送経路で液胞まで運ばれることが知られていたが、これらの複数の液胞輸送経路の制御メカニズムや意義については不明な点が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

多様な液胞機能の理解には、そこで機能するタンパク質の制御メカニズムの理解が必要である。本研究の目的は、膜交通による輸送経路が複数あることに注目し、個々の輸送経路の制御メカニズムを明らかにすることで、液胞輸送制御の詳細を理解することである。さらに、特に膜交通の鍵因子として機能する SNARE について、その時空間的な制御メカニズムの詳細を明らかにすることで、液胞輸送以外の段階における液胞膜融合制御による液胞機能制御メカニズムを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) 液胞に局在する Q-SNARE である SYP22 のノックアウト変異体である *vam3-1* は、葉の形態異常や花成遅延など多面的な表現型を示し、これらの表現型は VAMP727 を含む複合体による液胞輸送制御の異常に起因することが明らかになっている。一方で、SYP2 の 1 アミノ酸置換型変異体である *sgr3-1* は、

*vam3-1* で見られるような表現型はなく、花茎の重力屈性に強い異常を示すこと、それ以外にも孔辺細胞の液胞機能制御に異常があることが報告されている。これまでの *sgr3-1* 変異体の解析から、この変異体では VAMP71 を含む複合体制御特異的に異常を持つことを明らかにしており、このことは、花茎の重力屈性や孔辺細胞の形態などの表現型が VAMP71-SYP22 複合体制御異常に起因することを示している。そこで、*sgr3-1* 変異体を用いて、その変異の影響を特に分子メカニズムに注目して詳細に解析することで、液胞動態制御に関わる因子の単離を試みる。

(2) SNARE による膜融合制御において、実際の細胞内のどのようなタイミングで複合体を形成しているかを解析する手法として、蛍光タンパク質間の FRET (Förster resonance energy transfer) を用いた液胞に局在する SNARE の相互作用部位の可視化は有効な手段であると考えられる。そこで、SYP2 と VAMP71 に GFP と RFP を融合させ、両者の間の FRET を解析することで、細胞内における SNARE 複合体形成の可視化を試みる。さらに、液胞輸送に異常がある変異体背景でこの解析を進めることで、SNARE の複合体形成を制御する因子がどのような経路で液胞に運ばれているかを解析する。

### 4. 研究成果

(1) 液胞に局在する Q-SNARE である SYP22 の 1 アミノ酸置換型の変異体である *sgr3-1* 変異体を用いた解析から、この変異体では VAMP71-VAM3 複合体が安定化することを明らかにしていた。そこで、VAMP71-SYP22 複合体の安定化を制御する新規因子の単離を目的として、野生型および *sgr3-1* 変異型の SYP22 にタグとして GFP を付与したタンパク質をシロイヌナズナに発現させ、抗 GFP 抗体を用いた共免疫沈降実験とそのサンプルの LC-MS 解析による相互作用因子の網羅的解析を行った。その結果、*sgr3-1* 変異体を用いた解析から予測された VAMP71-SYP22 複合体を形成する SNARE の結合量の増加に加え、*sgr3-1* 変異体では alpha-SNAP の結合量が同様に増加していた。この結果は抗 alpha-SNAP 抗体を用いた方法でも確認できた。alpha-SNAP の機能として、膜融合を実行した後の SNARE 複合体全般に結合することが知られている。そこで、細胞膜に局在する Q-SNARE に *sgr3-1* 型の変異を導入したものを発現させ、同様に alpha-SNAP との相互作用の変化を検証したが、野生型と変異型の間で顕著な差は見られず、細胞内局在にも変化が見られなかった。これらの結果から、*sgr3-1* 変異によって alpha-SNAP を介した液胞膜の SNARE 複合体の安定化がおこっていること、この制御メカニズムは SYP22 特異的なものであることが明らかになった。

(2) *sgr3-1* の変異体では VAMP71-SYP22 複合体が安定化する。この際に VAMP71 の細胞内局在を観察すると、液胞膜上のしわ状の構造に集積することが確認されていた。この領域に局在するタンパク質について解析したところ、VHP1 や VHA-a3 といった液胞膜局在型のトランスポーターは局在せず、*sgr3-1* 変異型の SYP22 はここに局在することが明らかになった。さらに、VAMP727 についても局在解析を行った結果、VAMP727 はこのしわ状構造に局在しないことが明らかになった。このことは、VAMP71-VAM3 複合体制御に関わる因子がこの領域に集積していること、VAMP727-VAM3 複合体と VAMP71-VAM3 複合体が異なる液胞膜融合制御を行っていることを示唆している。そこで、前項で新規液胞膜 SNARE 複合体制御因子として単離した alpha-SNAP について、蛍光タンパク質を付与したタンパク質を発現させ、細胞内局在を解析したところ、*sgr3-1* 変異体において VAMP71 が濃縮するしわ状構造に集積することが明らかになった。このことから、*sgr3-1* 変異体で見られるしわ状構造が確かに *sgr3-1* 変異の影響を受ける液胞膜融合制御因子の集積部位であることが確認された。

(3) 酵母において液胞膜同士の融合には RAB7 とそのエフェクターとして機能する繫留因子複合体である HOPS 複合体が重要な役割を担っていることが知られている。*sgr3-1* 変異体でおきる alpha-SNAP-VAMP71-VAM3 複合体の安定化が液胞膜融合制御の異常であるか、膜融合後の SNARE 複合体の乖離の異常であるかを明らかにするため、*sgr3-1* 変異体における RAB7 や HOPS 複合体の構成因子の細胞内局在解析をおこなった。その結果、これらの因子が *sgr3-1* 変異体においてしわ状構造に集積することが明らかになった。このことから、*sgr3-1* 変異による影響は SNARE 複合体形成後で、液胞膜同士の膜融合前の段階で起きていることが示唆された。さらに、野生型において VAMP71 と HOPS 複合体構成因子の細胞内局在を比較したところ、両者が液胞膜の一部に濃縮する様子が確認された。このことから、*sgr3-1* 変異体で見られた液胞膜融合制御因子の濃縮は、野生型においても同様のステップが存在することが示唆された。また、酵母では HOPS 複合体の構成因子の一つは液胞の SNARE と結合することが報告されていることから、植物においても HOPS 複合体が液胞の SNARE と結合すること、この結合が *sgr3-1* 変異によって変化する可能性が考えられる。そこで、SYP2 と HOPS 複合体構成因子の結合を共免疫沈降実験によって解析した結果、両者がシロイヌナズナ細胞内においても複合体を形成することが確認されたものの、*sgr3-1* 変異の影響による結合量の変化は観察されなかった。このことから、HOPS 複合体は *sgr3-1* 変異の影響を受ける直接の液胞膜 SNARE 複合体制御因子ではないことが示

唆された。

(4) 液胞の動態制御にはアクチン骨格を介した運動が重要な役割を担っている。*sgr3-1* 変異体の解析から、この変異体では液胞膜上に膜融合制御因子が濃縮されたドメインが形成されていることが示されたが、このドメインが液胞動態制御と関連するかを調べるため、*sgr3-1* 変異体における VAMP71 とアクチンの 2 重可視化を行い、ライブイメージングによって両者の関係性を解析した。その結果、特に膜融合制御因子の濃縮する領域には顕著なアクチン繊維が見られず、形成されたしわ状の領域の一部はアクチン繊維と沿った運動を示すものの、大部分は独立した動きをすることが明らかになった。このことから、*sgr3-1* 変異体の液胞膜に見られるしわ状構造はこれまで知られているアクチン繊維による液胞動態制御メカニズムとは独立したメカニズムの異常によって形成されたものであることが示唆された。

(5) 液胞の SNARE の複合体形成を蛍光タンパク質間の FRET を用いて解析する目的で、SYP22 と VAMP713 にそれぞれ GFP や TagRFP を付与したタンパク質を発現させたところ、TagRFP-SYP22 を発現させた形質転換植物において、一部 *sgr3-1* 変異体様の表現型が観察され、さらに液胞膜上の一部に TagRFP-SYP22 が濃縮する様子が観察された。近年液胞膜に局在するタンパク質において、蛍光タンパク質のダイマー化によって液胞形態へ異常が起きることが報告されている(引用文献 1)。一方、*sgr3-1* 変異体の解析から、その表現型の原因は VAMP71-VAM3 複合体の安定化に起因することが明らかになっている。このことから、TagRFP-SYP22 発現株の巨視的な表現型も、液胞膜上の異所的な SNARE 複合体形成によるものであると考えられることから、*sgr3-1* の解析結果を支持するものであると考えられる。その一方で、GFP を SYP22 に、TagRFP を VAMP713 に付与したタンパク質を発現させた植物を用いて FRET 解析を行ったが、両者の間に顕著な FRET は観察されなかった。

(6) これらの *sgr3-1* 変異の詳細な解析の結果、液胞膜動態制御には alpha-SNAP を介した SNARE 複合体形成のステップがあり、これがアクチンを介した動態制御と独立していること、この液胞膜の SNARE 複合体形成の制御が花茎の重力屈性や孔辺細胞の液胞動態制御に関わっていることが示唆された。近年の酵母の *in vitro* における解析から、酵母の液胞膜の SNARE 複合体制御においても alpha-SNAP の結合を介したメカニズムが提唱されており、alpha-SNAP には従来知られている NSF と協調した SNARE 複合体乖離メカニズムとは異なる機能があることが提唱されているが、実際の酵母の細胞内におけるこの

システムの寄与についての知見は少ない。本研究の結果はalpha-SNAPによる液胞膜SNARE複合体形成制御メカニズムが実際の細胞内の液胞動態制御に関わるものとして、酵母の知見を補完するものである可能性もあり、植物のみならず広い生物種におけるSNARE複合体制御の理解につながるものであると考えられる。

(7) GFP-SYP22の野生型と*sgr3-1*変異型の共免疫沈降実験において、VHP1の結合量を比較したところ、両者において差が見られなかったため、FRET解析のコントロールとして、VHP1-mGFPを入手し、様々な液胞輸送に異常がある変異体に導入した。その結果、RAB7の活性化因子の変異体やAP-3の変異体では正常に液胞に運ばれるのに対し、RAB5の活性化因子の変異体においては一部が細胞膜上に局在することが明らかになり、SYP22同様VHP1がRAB5依存的でRAB7とAP3非依存的経路で液胞に運ばれていることが明らかになった。さらに、この表現型は、他の巨視的な表現型同様、植物固有型RAB5であるARA6の変異によって回復することが示された。これらの結果から、RAB5機能欠損変異体で見られる巨視的な形態異常の一部もしくは全てがRAB5依存的でRAB7-AP3依存的な輸送経路の異常に起因することが示唆された。これまでの研究から、VHP1は小胞体の一部から直接液胞膜に運ばれることが報告されている(引用文献2)。このことから、これまで実態の不明であったRAB5依存的でRAB7とAP3非依存的経路が、小胞体から液胞への直接的な輸送経路であることが示唆された。これについてさらに詳細を明らかにするべく、VHP1とRAB5の2重可視化株を作製し、VHP1が液胞に運ばれる途中の段階でRAB5との共局在が見られるかを解析したが、両者の間に明確な共局在は観察されなかった。このことから、小胞体から液胞への直接的な輸送経路において、RAB5はこれを間接的に制御する、もしくは直接的に制御するがその段階は一過的であり、植物体全体ではごくわずかなもので検出が困難であることが考えられた。イネにおいてRAB5の変異体種子において小胞体の形態に異常が見られることが報告されており(引用文献3)、本研究で解析しているRAB5依存的でRAB7-AP3非依存的な液胞輸送経路についても同様の小胞体制御の異常の結果であることも可能性として考えられる。このRAB5依存的でRAB7-AP3非依存的な輸送経路について、特にRAB5の機能に注目した詳細な分子メカニズムの解析から、植物における液胞輸送経路の独自性が明らかになることが期待される。

#### <引用文献>

Segami S, Makino S, Miyake A, Asaoka M, Maeshima M. (2014) Dynamics of vacuoles and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase visualized by

monomeric green fluorescent protein in Arabidopsis: artifactual bulbs and native intravacuolar spherical structures. *Plant Cell* 26:3416-34. doi: 10.1105/tpc.114.127571

Viotti C, Krüger F, Krebs M, Neubert C, Fink F, Lupanga U, Scheuring D, Boutté Y, Frescatada-Rosa M, Wolfenstetter S, Sauer N, Hillmer S, Grebe M, Schumacher K. (2013) The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell*. 25:3434-49. doi: 10.1105/tpc.113.114827.

Fukuda M, Satoh-Cruz M, Wen L, Crofts A, Sugino A, Washida H, Okita T.W, Ogawa M, Kawagoe Y, Maeshima M, Kumamaru T. (2011) The small GTPase Rab5a is essential for intracellular transport of proglutelin from the Golgi apparatus to the protein storage vacuole and endosomal membrane organization in developing rice endosperm. *Plant Physiol.* 157: 632-644. doi: 10.1104/pp.111.180505

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2件)

Kazuo Ebine, Kodai Takemoto, Chieko Saito, Tomohiro Uemura, Akihiko Nakano, and Takashi Ueda. “Molecular mechanisms of vacuolar membrane fusion regulated by SNARE proteins in plant cells” 第58回日本植物生理学会年会 2017年3月17日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

海老根 一生, 齊藤 知恵子, 植村 知博, 中野 明彦, 上田 貴志 “液胞膜のSNARE複合体制御メカニズムの解析” 第80回日本植物学会大会 2016年9月16日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

海老根 一生(EBINE, Kazuo)

基礎生物学研究所・細胞動態研究部門・助教

研究者番号: 90590399