

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32615

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15144

研究課題名(和文) 微小管局在型エフェクター、PH15を介した植物固有型RAB5の機能発現機構の解明

研究課題名(英文) Study on microtubule localizing effector of plant-unique RAB5 group

研究代表者

中村 瑛海(伊藤瑛海)(ITO-NAKAMURA, 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、植物にユニークな膜交通制御因子としてPH15を同定し、本研究課題では、この機能解明に取り組んだ。PH15と、PH15のホモログと考えられるPH16それぞれについて、T-DNA挿入変異体ラインを確立し、遺伝学的相互作用解析を行ったところ、PH15は液胞輸送に、PH16は液胞輸送とは拮抗する輸送経路においてはたらくと考えられる結果を得た。PH15とPH16は共に、分裂組織の静止中心細胞で主に発現し、細胞膜や、核周縁のドット状構造に局在した。PH15は、植物固有型RAB5とドット状やリング状のオルガネラ膜上で相互作用し、複数のホスフォイノシチド種との親和性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物独自の膜交通制御因子が関わるシステムを明らかにする基礎的な研究である。膜交通は真核生物に根源的な細胞内現象であることから、本研究に成果は、膜交通の進化的意義の理解を促すものである。また、本研究の成果は、植物膜交通制御機構の体系的な理解を一層に前進させるものであり、将来的に植物を有効活用するための技術基盤の創生を促進し、人口増加に伴う環境問題や食糧問題の解決に寄与するという植物科学の目的に貢献できるものである。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to elucidate the molecular function of PH15 that was isolated as a novel regulator of plant-unique membrane traffic regulations. The genetic interaction analysis using ph15 and ph16 (the possible homolog of PH15) T-DNA insertion mutants established in this study had suggested that PH15 functions at the vacuolar traffic, while PH16 acts at the counteracting trafficking route. PH15 and PH16 were typically expressed at quiescent center of root apical meristem, and in these cells localized to the plasma membrane, and punctate structures surrounding the nucleus. PH15 and the plant-unique RAB5 interacted on large punctate structures inside the cells, and PH15 showed affinity to various types of phosphoinositides.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：RAB5 RAB5エフェクター 膜交通

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞のなかには、オルガネラと呼ばれるコンパートメントに区画化されており、オルガネラ間では膜交通という物質輸送の仕組みを使ったタンパク質や膜脂質のやり取りが行われている。膜交通は生命が恒常性を維持する上で必須な細胞内現象であるため、その基本的な仕組みは真核生物共通に保存されるものと考えられてきた。低分子量 GTPase である RAB5 は、エンドソームと呼ばれるオルガネラに局在し、エンドソーム膜上で、エフェクターと相互作用することで、膜交通を制御するというモデルが知られる。しかしながら、陸上植物と一部の緑色藻類は、保存型 RAB5 に加えて、植物固有の RAB5 をもち、他の真核生物におけるエフェクターのホモログのほとんどを持たないことから、植物が、植物のみがもつ膜交通制御因子を使って、独自の膜交通経路を構築していることが強く示唆される。申請者は、植物固有型 RAB5 が制御する膜交通の分子制御基盤を明らかにするため、これまで、シロイヌナズナにおける植物固有型 RAB5 である AtARA6 を対象としたエフェクタースクリーニングと機能解明に取り組んできた (Ito et al., 2018 他)。その過程で、申請者は、新しい ARA6 のエフェクター候補として、ホスフォイノシチド結合ドメインを有する PH15 タンパク質の同定に成功した。GFP 融合 PH15 を葉の表皮細胞で一過的に発現させると、細胞表層付近において、微小管に沿って数珠状に局在した (図 1A)。植物細胞では、エンドソームは、アクチン線維に沿って運動し、微小管上を横切る際に減速することが報告されているが、この仕組みや、生理的意義は不明である。申請者が取り組んだ予備的な解析結果は、PH15 と ARA6 の相互作用が、微小管上でのエンドソーム動態の制御や、エンドソームの機能発現において、何らかしらの役割を担うことが強く示唆し (図 1B)、申請者は、微小管局在型 ARA6 エフェクターである PH15 による ARA6 の機能発現機構を明らかにするため、本研究計画を立案した。

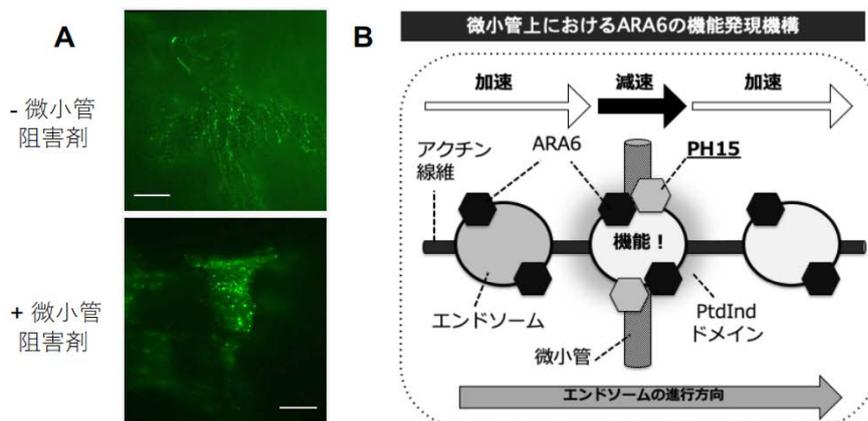


図1 (A) GFP-PH15を、葉の表皮細胞で一過的に発現した際の局在分布 (上)。GFP-PH15の繊維状の局在パターンは、微小管阻害剤に対する感受性を示したことから (下)、GFP-PH15は微小管上に局在すると考えられる。Bars = 10  $\mu$ m。 (B) 研究背景から推察される「PH15を介したARA6の機能発現モデル」

### 2. 研究の目的

本研究課題では、微小管局在型 ARA6 エフェクターである PH15 による ARA6 の機能発現機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、上述の目的を達成するため、(1) 遺伝学的手法による PH15 の機能解明、(2) ライブセルイメージングによる PH15 と ARA6 間の相互作用の可視化、(3) PH15 が相互作用するホスフォイノシチド種の生化学的解明に取り組んだ。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝学的手法による PH15 の機能解明

ARA6 の機能発現における PH15 の役割を明らかにするため、*ph15* 変異体の確立と、PH15 過剰発現体の作出を試みた。また、PH15 のホモログと考えられる PH16 についても、同様の解析に取り組んだ。まず、*ph15* の T-DNA 挿入変異体候補を Arabidopsis Biological Research Center より購入し、野生型と 3 回戻し交雑を行った。得られた、*ph15*、*ph16* 変異体候補につ

いて、PH15、PH16の遺伝子発現がみられないことをRT-PCR法により確認した(図2A)。また、シーケンス解析により、それぞれのアレルのT-DNA挿入位置を確認した(図2B)。PH15過剰発現体については、GFP融合で、35Sプロモーター制御下で発現する形質転換体を作成したものの、得られたT2個体において、GFP蛍光を確認することができなかった。

次に、*ph15*と*ph16*T-DNA挿入変異体の示す表現型を調べた。*ph15-3*、*ph16-2*単独変異体と、*ph15-3 ph16-2*二重変異体は、特に目立った表現型を示さなかったため、液胞輸送経路ではたらく

Qa-SNAREのひとつであるVAM3/SYP22との2重変異体を作成した。その結果、*ph16-2*変異は、*vam3-1*が示す花成遅延や、葉の波打ちといった表現型を抑圧した。これに対して、*ph15-3*変異は、*ph16-2 vam3-1*変異体の表現型を抑圧した(図3)。過去の研究から、ARA6はエンドソームから細胞膜方向への、保存型RAB5はエンドソームから液胞方向への膜交通経路を制御し、*ara6-1*変異は*vam3-1*の表現型を抑圧し、保存型*rab5*変異は*vam3-1*の表現型を亢進することが示されている。従って、*vam3-1*との遺伝学的相互作用から、PH16は、エンドソームから細胞膜経路への、PH15は液胞への膜交通経路制御に関わる可能性が強く示された。

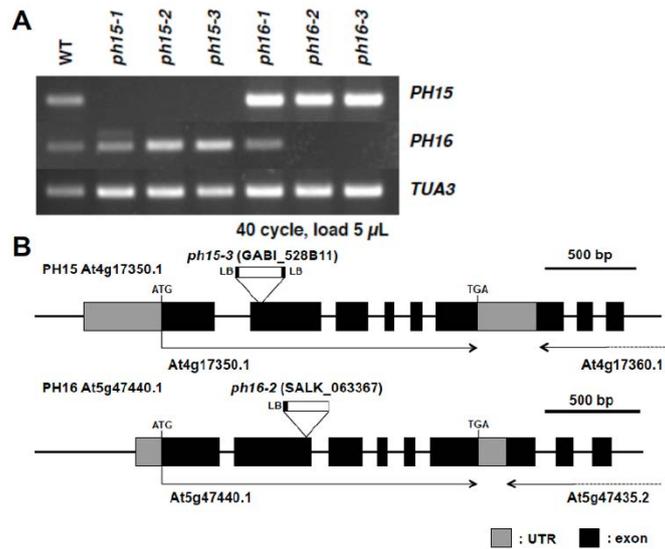


図2 (A)本研究課題で使用した*ph15*、*ph16*変異体系統におけるPH15とPH16の発現解析 (B) *ph15-3*と*ph16-2*変異体のT-DNA挿入位置

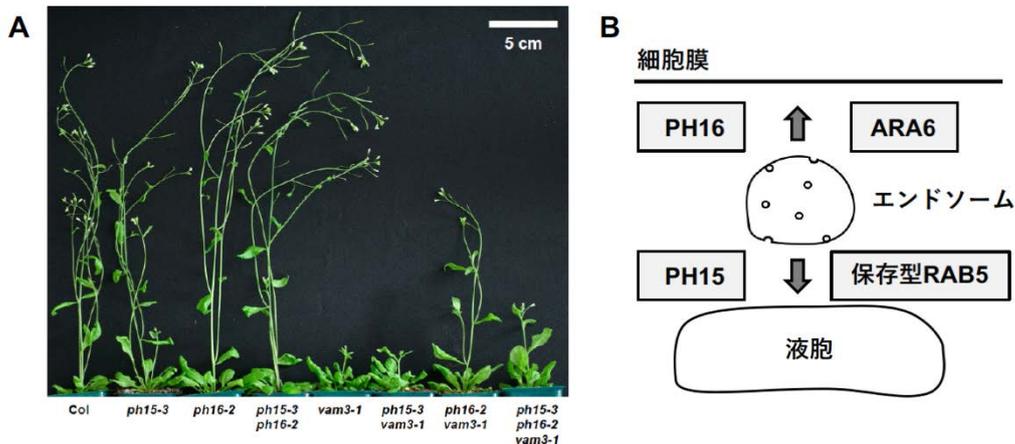


図3 (A) *ph15-3*、*ph16-2*と*syp22-1/vam3-1*の遺伝学的相互作用 (B) 遺伝学的相互作用から推察されるPH15とPH16の制御する膜交通経路

続いて、PH15とPH16がARA6エンドソーム動態に与える影響の調査に取り組んだ。まず、PH15とPH16の発現組織を明らかにするため、それぞれのコーディング領域の上流約2kbpをGUS遺伝子のの上流につないだコンストラクトを作成し、これを発現する形質転換体を作成した。得られたT2植物についてGUS活性を調べたところ、PH15、PH16両者とも、根の分裂組織において発現することがわかった(図4A)。また、PH15とPH16の発現細胞をより詳細に調べるため、GFP融合PH15とPH16、それぞれのプロモーター領域下で発現する形質転換体を作成し、ClearSee法による共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、図4Bに示すとおり、PH15とPH16は共に静止中心細胞で発現し、細胞膜や、核膜と思われる構造上にドット状に分布することがわかった。一方で、これらのコンストラクトは*ph15-3 ph16-2 vam3-1*の表現型を相補しなかったことから、PH15とPH16の正確な発現領域と、細胞内局在分布を理解するためには、より詳細なプロモーター領域の検討が必要と考えられる。これによりPH15とPH16の正確な発現細胞がわかれば、PH15とPH16がARA6エンドソーム動態に与える影響の詳細が明らかになると考えられる。

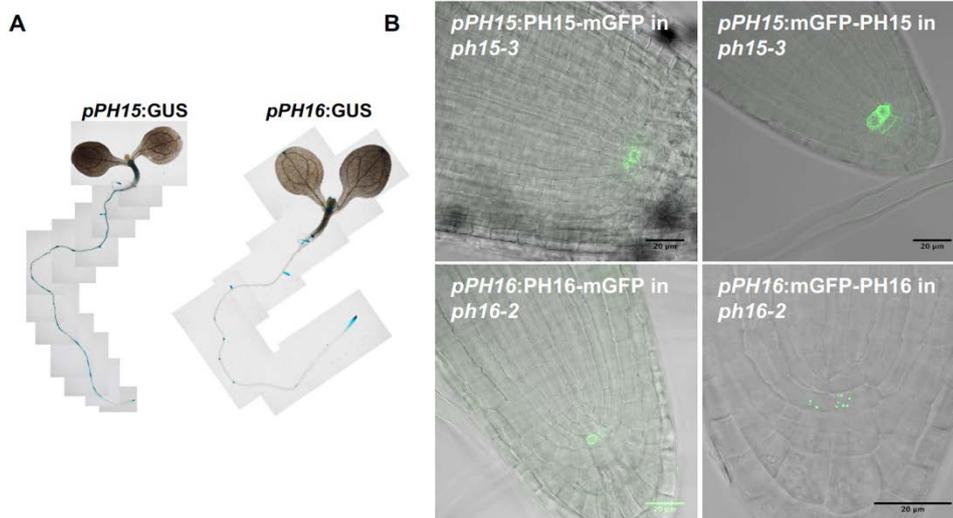


図4 (A) PH15とPH16のプロモーター-GUS解析の結果 (B) PH15、PH16の発現細胞と、発現細胞における細胞内分布 Bars = 20 μm

### (2) ライブセルイメージングによる PH15 と ARA6 の相互作用の可視化

PH15 は活性型の ARA6 の相互作用因子として単離されたものの、ARA6 はエンドソーム上に、PH15 は微小管上にと、細胞内の異なる場所に局在した。PH15 と ARA6 が、「いつ・どこで」相互作用するかを明らかにするため、2 分子蛍光相関 (BiFC) 法による相互作用の可視化を試みた。ベクターは、Leibniz Universität Hannover (ドイツ) の Gehl 博士らより分与いただいた。PH15 と ARA6 をそれぞれ、BiFC プロープに融合し、タバコの葉で一過的に発現させたところ、再構成された YFP シグナルが観察された (図 5A)。また、YFP シグナルは、ドット状 (図 5B 矢印)、もしくはリング状 (図 5B 矢尻) に観察され、これらの構造体が、細胞内の原形質流動にのって、活発に運動する様子が見られた (図 5C)。このことから、PH15 と ARA6 は、運動性の高いオルガネラ上で相互作用することが示唆された。

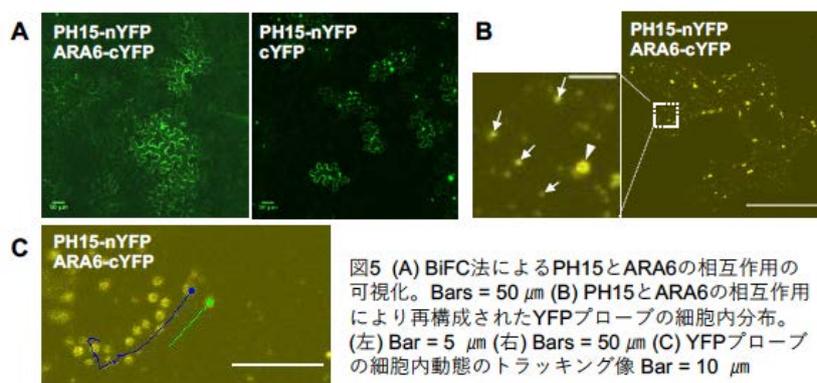


図5 (A) BiFC法によるPH15とARA6の相互作用の可視化。Bars = 50 μm (B) PH15とARA6の相互作用により再構成されたYFPプロープの細胞内分布。(左) Bar = 5 μm (右) Bars = 50 μm (C) YFPプロープの細胞内動態のトラッキング像 Bar = 10 μm

### (3) PH15 が結合するホスフォイノシチド種の解明

PH15 は、ホスフォイノシチド結合性ドメインである *pleckstrin homology* (PH) ドメインを有する。ホスフォイノシチドは、植物細胞内のリン脂質の1%程度を占める膜脂質種で、一過的に産生され、速やかに代謝されることから、膜上でのシグナル伝達の時空間的制御に関わることが知られる。そこで、PH15、微小管、ARA6 が会合する場に存在しうるホスフォイノシチド種を同定するため、生化学的手法による解析に取り組んだ。まず、PH15 の PH ドメインをコードする領域の部分的タンパク質を GST 融合

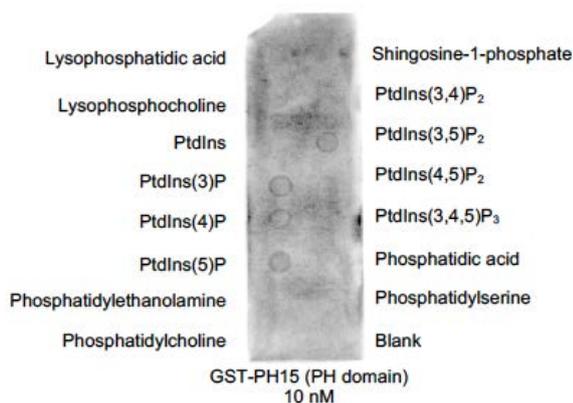


図6 PH15の結合する膜脂質種

タンパク質として精製した。そして、GST-PH15 (PH domain) 精製タンパク質を、ホスホイノシチドを含む 15 種の膜脂質がメンブレンにスポットされた PIP ストリップにオーバーレイし、ウエスタブロットティング法により、相互作用する膜脂質を検出した。その結果、PH15 は PI3P、PI4P、PI5P、PI3,5P<sub>2</sub> と相互作用することが分かった (図 6)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ito E., Ebine K., Choi SW., Ichinose S., Uemura T., Nakano A., Ueda T. | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Integration of two RAB5 groups during endosomal transports in plants  | 5. 発行年<br>2018年 |
| 3. 雑誌名<br>eLife  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>accepted  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ito E., Choi SW., Ebine K., Kato N., Ishihara T., Suzuki C., Sugiyama Y., Nakano A., Ueda T. |
| 2. 発表標題<br>Analysis of PH domain-containing RAB5 effector of Arabidopsis thaliana                       |
| 3. 学会等名<br>22nd ENPER meeting, Valencia, Spain（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤瑛海                        |
| 2. 発表標題<br>膜交通制御因子の機能改変による高機能作物の生産     |
| 3. 学会等名<br>第10回加藤記念バイオサイエンス助成財団研究助成報告会 |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年                  |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>伊藤瑛海                      |
| 2. 発表標題<br>PHドメインをもつRAB5エフェクターの役割の解明 |
| 3. 学会等名<br>第8回エンドメンブレンミーティング         |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Choi S.W., Ebine K., Kato N., Ishihara T., Suzuki C., Sugiyama Y., Tanaka Y., Nakano A., Ueda T., Ito E. |
| 2. 発表標題<br>Identification of RAB5 effectors containing PH domain called REAP2 and REAP3 in Arabidopsis              |
| 3. 学会等名<br>22nd ENPER meeting, Valencia, Spain (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Choi S.W., Ebine K., Kato N., Ishihara T., Suzuki C., Sugiyama Y., Tanaka Y., Kuwano N., Ueda T., Nakano A., Ito E. |
| 2. 発表標題<br>Identification of RAB5 effectors containing PH domain called REAP2 and REAP3 in Arabidopsis                         |
| 3. 学会等名<br>第61回日本植物生理学会(大阪)  |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ito, E   |
| 2. 発表標題<br>Unique machineries in regulation of vacuolar trafficking in plants   |
| 3. 学会等名<br>International Symposium on Biological Material Science -Aiming at Future Interdisciplinary Collaborations (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>伊藤瑛海                     |
| 2. 発表標題<br>脂質結合性RAB5エフェクター、PEAR1の解析 |
| 3. 学会等名<br>第6回エンドメンブレンミーティング        |
| 4. 発表年<br>2017年～2018年               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤瑛海                          |
| 2. 発表標題<br>「核-エンドソーム局在型エフェクター-PUF3の解析」   |
| 3. 学会等名<br>第5回テニュアトラック教員による創造型シンポジウム-叡智- |
| 4. 発表年<br>2017年～2018年                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ito E., Choi SW., Ebine K., Ueda T., Nakano A.                                    |
| 2. 発表標題<br>Nuclear localization of Plant-unique RAB5 effector 3 is regulated by RAB5 GTPases |
| 3. 学会等名<br>第59回日本植物生理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2017年～2018年  |

〔図書〕 計1件

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ito E., Choi SW., Ueda T. (edited by M. Otegui)               | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature | 5. 総ページ数<br>編纂中 |
| 3. 書名<br>Plant Endosome: Methods and Protocols                          |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|