

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06303

研究課題名(和文)植物の液胞輸送メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of vacuolar transport mechanisms 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：液胞は貯蔵・分解・空間充填・浸透圧調節など多様な機能を担う植物細胞を特徴づけるオルガネラの一つであり、複数の輸送経路でタンパク質が液胞へと輸送されていることが明らかになっているものの、その詳細と意義については不明な点が多い。液胞への輸送経路の中でも、動物のリソソーム輸送や酵母の液胞輸送にはない、植物固有の液胞輸送経路について詳細な解析を行い、これが少なくとも2つの輸送経路に分けられること、そのうち1つがストレス応答に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、植物細胞における液胞への輸送メカニズムの一端が明らかになった。液胞は植物の主要なオルガネラの一つとして国内外の植物細胞生物学分野において注目・研究されており、本研究成果はその理解において重要な貢献をするものと言える。また、植物固有の液胞輸送経路がストレス応答に関わることを示されたことから、植物の環境応答メカニズムの理解を介した有用植物の作成など、応用的分野においても基礎研究の知見として貢献することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：The vacuole is the largest and multifunctional organelle in plant cells, and many proteins are transported to and stored in this organelle through membrane traffic pathways. We analyzed detail molecular mechanisms of transport pathways to the vacuole, especially focus on plant-unique vacuolar transport pathway. We found that at least two plant-unique vacuolar transport pathways exist in plant cells, and one of this pathway contributes to the stress response of plant.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：膜交通 植物 液胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の中は小胞体、ゴルジ体、エンドソームなど、それぞれ独自の機能を担う多様な単膜系オルガネラによってなりたっている。個々の細胞におけるオルガネラの種類、性質はそれぞれの細胞の役割・機能に併せて多様化しており、このことは、生物の多様性を細胞レベルで理解するうえで、オルガネラの理解が必須であることを意味している。植物の細胞を形成するオルガネラの中でも、液胞は細胞の体積の90%以上を占めるオルガネラで、動物のリソソームと共通である分解機能に加え、物質の貯蔵・空間充填・浸透圧調節など多様な機能を担っており、植物の細胞の性質を理解する上で重要なオルガネラの一つである。

植物の液胞には、その多様な機能を行うために、分解酵素や貯蔵タンパク質・トランスポーターなど多様なタンパク質が、膜交通と呼ばれるメカニズムによって運ばれている。膜交通では、Adapter protein (AP) 複合体などを介した積荷タンパク質の輸送小胞への集積と、RAB GTPase を介した輸送小胞の標的オルガネラへの正確な輸送と膜融合制御、の2点はその正確性を維持するメカニズムとして機能している。これまで、シロイヌナズナを用いた液胞輸送に関わる膜交通の鍵因子の研究から、植物の液胞輸送経路には動物や酵母のリソソーム・液胞輸送経路と相同のメカニズムのみではなく、RAB5 によって制御される植物独自の輸送経路も存在し、少なくとも3つの経路があること、さらにRAB5 が小胞体から provacuole を介して液胞へと運ばれる経路と関与することを明らかにしてきた(図1)。しかしながら、なぜ3つの液胞輸送経路が必要なのか、その使い分けの分子メカニズムと生理的意義、という重要な問題は未解明なままである。

### 2. 研究の目的

植物の細胞の理解において、その特徴的なオルガネラである液胞の制御メカニズムの理解は必須である。植物の3つの液胞輸送経路を制御する鍵因子の中でも、RAB5 依存的で RAB7 非依存的液胞輸送経路が植物固有の液胞輸送経路であり、最も重要であると考えられる。しかしながら、RAB5 は他の液胞輸送経路においても機能することから、この植物固有の液胞輸送経路について、鍵となる制御因子である RAB5 の使い分けのメカニズムの解明が大きな課題として残っている。さらにこの経路で機能する積荷の選抜メカニズムについても明らかになっていない。そこで、本研究では特にこの2つの問題を解明することを通して、植物が固有の液胞輸送経路を獲得した意義を明らかにすることを目的とする(図1)。

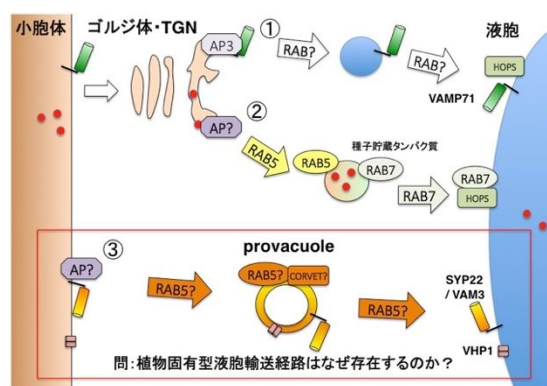


図1: 研究開始当初の植物の液胞輸送モデルと本研究課題の中心となる「問い」

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物固有の液胞輸送経路で機能する AP 複合体の解析

植物の細胞では、AP1、AP3、AP4 の3つの AP 複合体が液胞への輸送に関わることが報告されているが、AP1 と AP4 複合体については解析する組織・積荷タンパク質の違いからこれまで明らかにしてきた3つの液胞輸送経路との関連は明らかになっていない。そこで、これらの変異体における液胞輸送異常の詳細な解析を通して、それぞれが制御する液胞輸送経路を明らかにする。

#### (2) RAB5 の相互作用因子の網羅的解析を通じた、RAB5 の使い分けメカニズムの解析

2つの液胞輸送経路に関わる RAB5 の機能発現メカニズムとして、それぞれの液胞輸送経路で RAB5 と結合する因子が異なることが想定される。そこで、個々の輸送経路で機能する RAB5 相互作用因子を、共免疫沈降と質量分析によって単離する。この際、RAB5 の下流で機能する繫留因子の変異体では、その繫留因子が機能する液胞輸送経路の前段階で RAB5 の機能が停止することが想定される。これらの液胞輸送異常変異体における RAB5 の相互作用因子を比較することで、個々の液胞輸送経路で機能する相互作用因子の単離を行う。

#### (3) 液胞輸送異常変異体の表原型解析を通じた、液胞輸送経路の生理的意義の解析

上述の方法によって単離された、個々の液胞輸送経路特異的な因子の変異体の表現型解析に加え、複数の液胞輸送経路に関わる鍵因子の変異体について、それぞれの表現型の共通点と相違点を明確にすることで、共通する液胞輸送経路異常の影響を抽出することが期待される。そこで、特に RAB5 関連因子の変異体に注目し、これらの変異体での輸送異常と巨視的な表現型の関連性の比較を行うことで、個々の液胞輸送経路の制御異常がもたらす影響を抽出する。これらの方法で、植物が複数の液胞輸送経路を必要とした理由に対して答えを出す。

#### 4. 研究成果

##### (1) 植物固有の液胞輸送経路で機能する AP 複合体の解析

液胞輸送経路において積荷の選抜に関わると想定される遺伝子の変異体を収集し、植物固有の液胞輸送経路で液胞に運ばれることが明らかになっている SYP22 の細胞内局在を解析した。その結果、AP4 複合体の変異体において SYP22 が細胞膜に誤輸送されることが明らかになり、AP4 複合体が植物固有の液胞輸送経路において積荷の選抜を行なっていることが示された。また、これまでの解析から VHP1 や VHA-a3 といったタンパク質は小胞体から provacuole と呼ばれる区画を通して液胞へと輸送されること、植物固有の液胞輸送経路で運ばれるタンパク質同様 RAB5 の機能欠損によって細胞内で誤輸送されることから、植物固有の液胞輸送経路が provacuole 経路と関連することが示されていたが、これらのタンパク質について AP4 変異体における局在を解析したところ、VHP1 については SYP22 同様細胞膜へと誤輸送される様子が確認されたが、VHA-a3 に関しては顕著な異常が見られなかった。このことから、植物固有の液胞輸送経路には AP4 に依存する経路と AP4 非依存的に機能する provacuole 経路の 2 つがあり、SYP22 は AP4 依存的経路、VHA-a3 は AP4 非依存的経路、VHP1 はその両方で液胞へと運ばれていることが示唆された (図 2)。

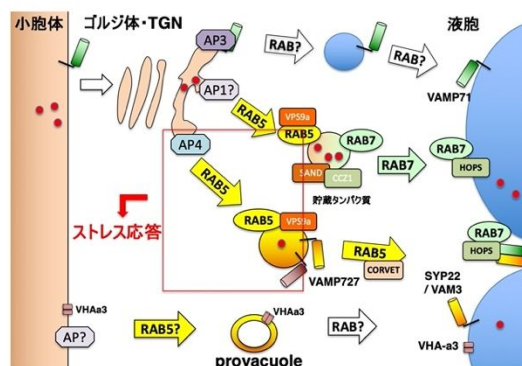


図 2: 本研究成果から提案される植物の液胞輸送経路モデル

##### (2) RAB5 の相互作用因子の網羅的解析を通じた、RAB5 の使い分けメカニズムの解析

液胞輸送経路の鍵因子として機能する RAB5 については、複数の液胞輸送経路において機能することが示されているものの、これがどのように制御分けられているかについては詳細が明らかになっていない。そこで、共免疫沈降法により RAB5 の相互作用因子を網羅的に解析し、新規の液胞輸送経路制御因子の単離を試みた。これまでの解析から RAB5 は CORVET と呼ばれる複合体を介して植物固有の液胞輸送経路における膜融合を制御していることが明らかになっている。このことから、CORVET の機能欠損変異体においては RAB5 は輸送小胞上において蓄積していることが想定され、野生型および CORVET の機能欠損変異体において RAB5 と複合体を形成する因子を比較することで、特に植物固有の液胞輸送経路で機能する因子が単離できると期待される。そこで、CORVET の構成因子の一つである VPS3 の条件誘導型機能欠損変異体を用いて、通常時と機能欠損誘導時において RAB5 と複合体を形成する因子を共免疫沈降実験により単離、質量分析を用いてこれを網羅的に解析した。その結果、DRP1 や ISTL2 といった因子が RAB5 と相互作用する因子の候補として単離された。ISTL2 はエンドソーム内に膜タンパク質を取り込む機能をもつ ESCRT 複合体を制御すると考えられる因子の一つである。このことから、RAB5 が ISTL2 を介して植物固有の液胞輸送経路において膜タンパク質の取り込みを制御していることが示唆された。DRP1 は植物細胞において細胞膜に局在し、エンドサイトーシスの制御因子として機能することが知られている。そこで RAB5 やその関連因子の局在について詳細な解析を行った結果、RAB5 自身は細胞膜上にはほとんど局在しないものの、その活性化因子である VPS9a の一部が細胞膜上のクラスリン被覆小胞の形成部位に局在する様子が認められた。このことから、エンドサイトーシス経路の初期過程にはすでに VPS9a が輸送小胞に局在しており、細胞膜から小胞が出芽した後 VPS9a を介して RAB5 が小胞上にリクルートされるモデルが立てられた。さらに、DRP1 について詳細な細胞内局在解析を行った結果、これまでよく知られている細胞膜上の局在の他、一部がエンドソーム上にも局在することが明らかになった。このことから、DRP1 がエンドサイトーシス制御の他に多様な細胞内輸送経路で機能しており、植物固有の液胞輸送経路においても RAB5 と協調して輸送制御を行なっている可能性が示唆された。

##### (3) 液胞輸送異常変異体の表原型解析を通じた、液胞輸送経路の生理的意義の解析

AP4 の変異体についてはトランスポーター等の輸送制御を介して環境応答に関わることが報告されていることから、植物固有の液胞輸送経路は植物の環境応答戦略の一つとして機能していることが示唆された。そこで、液胞輸送制御に異常を示す変異体を用いてストレス応答の比較を行うことで、それぞれの液胞輸送経路がストレス応答に果たす寄与について詳細な解析を試みた。その結果、液胞輸送の鍵因子の一つである VPS9a の機能欠損変異体が糖欠乏環境で顕著に矮化することが明らかになり、植物の糖応答に液胞輸送制御に関わることが示唆された。また、糖欠乏時の VPS9a タンパク質の状態を western blotting で解析した結果、VPS9a タンパク質の一部のバンドシフトが認められ、VPS9a タンパク質が修飾を受けることで糖欠乏時における液胞輸送を厳密に制御している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujimoto Masaru, Ebine Kazuo, Nishimura Kohji, Tsutsumi Nobuhiro, Ueda Takashi	4. 巻 117
2. 論文標題 Longin R-SNARE is retrieved from the plasma membrane by ANTH domain-containing proteins in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 25150 ~ 25158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2011152117	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Shimizu Yutaro, Takagi Junpei, Ito Emi, Ito Yoko, Ebine Kazuo, Komatsu Yamato, Goto Yumi, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Ueda Takashi, Kurokawa Kazuo, Uemura Tomohiro, Nakano Akihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Cargo sorting zones in the trans-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22267-0	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海老根 一生, 竹元 廣大, 齊藤 知恵子, 植村 知博, 中野 明彦, 上田 貴志
2. 発表標題 液胞膜の膜融合装置の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海老根一生, 上田貴志
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるRAB5を中心とした膜交通経路の分子メカニズムの解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物の発生や器官成長に重要な膜交通タンパク質のリサイクルシステムを発見  
<https://www.nibb.ac.jp/press/2020/09/22.html>

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------