

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370019

研究課題名(和文)植物の膜交通多様化機構の解明

研究課題名(英文)Studies on diversification of membrane trafficking pathways in plants

研究代表者

上田 貴志 (UEDA, TAKASHI)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10311333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物特異的RAB GTPaseであるARA6の機能発現機構を詳細に解析した。エフェクター分子として同定したPUF2の機能解析を通して、ARA6と保存型RAB5であるARA7が液胞輸送経路において拮抗的に機能する仕組みを明らかにした。

また、植物特異的な膜融合実行因子であるVAMP727について、その分子機能の獲得にいたる進化の道筋を再構築することを試みた。その結果、longin domainへの挿入配列の付加と、その挿入配列の酸性化の2段階でVAMP727の機能が獲得されたことが明らかとなった。

この他、ゼニゴケの膜交通網の全貌をつかむべく、RAB GTPaseとSNAREの網羅的解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of a plant-unique RAB5 GTPase, ARA6, and found that ARA6 negatively regulated the vacuolar trafficking pathway counteracting conventional RAB5 GTPases. We also revealed that this counteracting function was fulfilled through the function of an effector protein of ARA6, PUF2. We also tried to reconstruct molecular evolution of a plant-specific membrane fusion machinery, VAMP727, and found that functional conversion of VAMP727 from the ancestral function of VAMP72 members was mediated by two-step events: acquisition of an insertion sequence in the N-terminal longin domain followed by acidification of the inserted region. Furthermore, we systematically analyzed RAB GTPases and SNARE molecules in the liverwort, *Marchantia polymorpha*, to collect information on the membrane trafficking system in the basal land plant.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：膜交通 進化 RAB GTPase SNARE

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞は膜に囲まれた様々な細胞小器官を含んでおり、それらは膜に囲まれた小胞や小管を介した物質輸送システムにより結ばれている。この輸送システムは膜交通とよばれ、真核細胞の生命維持や多細胞生物の高次機能発現において極めて重要な役割を担っている。膜交通は、オルガネラ機能の発現や細胞内外の情報のやりとりには不可欠な機構であり、全ての真核細胞にとってその生存に必須の現象である。そこで機能する分子についても、多くのものが真核生物に共通に存在していることから、膜交通の基本的な仕組みが原始真核細胞において既に獲得されていたことが窺える。一方、現存する真核生物はそれぞれ独自の進化を遂げ、多様な体制や独自の生理現象を獲得している。それら各生物にユニークな生命現象においても、小胞輸送はその基盤機構として重要な役割を果たしている。このことから、膜交通も生物の進化に伴い多様化を果たしてきたと推測されるが、膜交通の多様化と進化がどのようにおこり、それがどのような形質の進化に結びついたのかは、ほとんど明らかにされていなかった。そのような中、我々は植物が進化の過程で独自に獲得した RAB GTPase である ARA6 と、膜融合の実行因子である SNARE の一種 VAMP727 の解析をおこない、それらの機能を明らかにするとともに、新規の膜交通経路の獲得が分子装置の新生と共役して起こることを実例を挙げて証明することに成功した。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでの研究により、新たな分子装置の獲得が膜交通経路の新規開拓に寄与したことを示すことに成功したが、そこに介在した分子メカニズムに関する知見は得られていなかった。また、シロイヌナズナと基部陸上植物であるゼニゴケを用いた解析結果の比較から、陸上植物内においても膜交通経路が多様化している可能性があることを突き止めた。そこで本研究課題では、これまでの研究成果をさらに発展させるべく進化細胞生物学的な手法を用いた研究を展開し、ARA6 が制御する膜交通経路の機能が陸上植物でどのように多様化しているのかを明らかにするとともに、SNARE の機能分化がいかにしておこったのかを解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) SNARE タンパク質の機能多様性獲得機構の解明

VAMP7 のメンバーは、陸上植物の R-SNARE の中でも際立った機能の多様性を持つ。この VAMP7 の多様性が、進化の過程でどのように獲得されたのかを明らかにするため、シロイヌナズナの VAMP7 グ

ループのうち、longin domain 中に特殊な挿入配列を持つ植物特異的な R-SNARE、VAMP727 に特に注目して研究を行った。VAMP727 はエンドソームに局在し、エンドソーム-液胞間、およびエンドソーム-細胞膜間の 2 つの輸送経路において機能する。一方、VAMP727 以外の VAMP72 メンバーは、挿入配列以外の一次構造は VAMP727 と高い類似性を示すにも関わらず、TGN と細胞膜に局在し、分泌経路で機能する。この機能分化を決定づけている要素を明らかにするため、挿入配列依存的に VAMP727 に結合する分子の探索を、酵母 two hybrid 法および共免疫沈降産物の質量分析解析により行った。また、既知の被覆複合体との相互作用についても解析を行った。さらに、基部陸上植物ゼニゴケの SNARE の網羅的解析を通して、VAMP72 メンバーの機能分化がタイ類において既に起こっていたのかを調べた。

### (2) ARA6 が制御する膜交通経路の分子機構と多様性の解析

シロイヌナズナの ARA6 は、エンドソームに局在し、液胞輸送経路とエンドソームから細胞膜への輸送経路を制御する。この機能がどのように発現されているのかを明らかにするため、ARA6 のエフェクターの単離と解析をこれまで進めてきた。一方ゼニゴケでは、ARA6 がエンドソームから葉緑体への輸送を制御していることを示唆する結果を得ている。そこで本研究では、ゼニゴケにおける ARA6 とそのエフェクター候補の機能解析を通して、陸上植物の間で ARA6 の機能がいかに多様化しているのかを明らかにすることを試みた。具体的には、ゼニゴケ ARA6 の恒常活性型変異体をゼニゴケ葉状体で強制発現し、その影響を電子顕微鏡を用いた形態観察や葉緑体外包膜マーカーを用いた可視化解析により詳細に解析した。また、ゼニゴケ ARA6 のエフェクター候補を単離し、その局在と機能の解析を通して、シロイヌナズナとゼニゴケの間で ARA6 の機能がどのように多様化しているのかを明らかにすることを目指した。

## 4. 研究成果

### (1) SNARE タンパク質の機能多様性獲得機構の解明

VAMP727 と相互作用する分子の候補を共免疫沈降と質量分析により多数単離し、さらに酵母 two-hybrid 法によってその相互作用の確認を行った。その結果、VAMP727 の挿入配列の有無に依存して相互作用が変化する被覆複合体を単離することに成功した。さらに、この挿入配列中に酸性アミノ酸が増加するに従って、細胞内局在と相互作用因子が変化することも突き止めた。これらの結果から、longin domain への挿入配列の付加と、その挿入配列の酸性化の 2 段階で VAMP727 の

機能が獲得されたことが明らかとなった。また、ゼニゴケの膜交通経路の全貌をつかむため、SNARE および RAB GTPase の網羅的解析を行った。その結果、ゼニゴケにおいては、VAMP727 様の longin domain に挿入配列を有する分子と挿入配列を持たない分子が同一の遺伝子から選択的スプライシングにより作られていることが明らかとなった。

## (2) ARA6 が制御する膜交通経路の分子機構と多様性の解析

シロイヌナズナにおいて、ARA6 のエフェクターである PUF2 の機能解析を進めた。その結果、PUF2 が GTP 結合型の ARA6 に結合すると同時に保存型 RAB5 との共通の活性化因子である VPS9a と結合すること、これにより ARA6 と PUF2 が保存型 RAB5 の機能を負に制御していることを突き止めた。この結果は、変異体を用いた遺伝学的相互作用によっても支持された。

続いて、PUF2 のゼニゴケホモログについても機能解析を進めた。ゼニゴケ PUF2 はゼニゴケ ARA6 とエンドソーム上で共局在し、両者の共発現はエンドソームの凝集を引き起こすことから、ゼニゴケにおいても、ARA6 と PUF2 は協調して機能していることが明らかとなった。これらの結果から、シロイヌナズナとゼニゴケでは ARA6 の機能する輸送経路が異なっているにも関わらず、共通のエフェクター分子を介してその機能を発現していることが明らかとなった。

## 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)

[雑誌論文](計 34 件)

- 1) Tsutsui, T., Nakano, A. and Ueda, T. (2015) The plant-specific RAB5 GTPase ARA6 is required for starch and sugar homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Phys.* in press, doi: 10.1093/pcp/pcv029, 査読有
- 2) Hoepflinger, M.C., Geretschlaeger, A., Sommer, A., Hoeflberger, M., Tenhaken, R., Ueda, T., and Foissner, I. (2015) Molecular analysis and localization of CaARA7 a conventional RAB5 GTPase homolog from characean algae. *Traffic*, in press, doi: 10.1111/tra.12267, 査読有
- 3) Fujimoto, M., Suda, Y., Vernhettes, S., Nakano, A. and Ueda, T. (2015) Phosphoinositides have distinct roles in intracellular trafficking of the cellulose synthase complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Phys.*, 56: 287-298, doi:10.1093/pcp/pcu195 (selected as Editor-in-Chief's Choice), 査読有
- 4) 海老根一生, 上田貴志 (2015) 細胞壁の構築・維持と膜交通システム. 植物の生長調節. Vol.50: 印刷中, 査読無
- 5) Ebine, K., Inoue, T., Ito, J., Ito, E., Uemura T., Goh, T., Abe, A., Sato, K., Nakano, A., and Ueda, T. (2014) Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways. *Curr. Biol.*, 24: 1375-1382, doi: 10.1016/j.cub.2014.05.004, 査読有
- 6) Cui, Y., Zhao, Q., Gao, C., Ding Y., Zeng, Y., Ueda, T., Nakano, A., and Jiang, L. (2014) Rab7 activation by the MON1-CCZ1 complex is essential for PVC-to-vacuole trafficking and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 26: 2080-2097, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.123141, 査読有
- 7) Hoepflinger, M., Hametner, C., Ueda, T. and Foissner I. (2014) Vesicular trafficking in characean green algae and the possible involvement of a VAMP72-family protein. *Plant Signaling & Behavior*, e28466, doi: 10.4161/psb.28466, 査読有
- 8) Kawai-Toyooka, H., Mori, T., Hamaji, T., Suzuki, M., Olson, BJSC., Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A., Toyoda, A., Fujiyama, A. and Nozaki, H. (2014) Sex-specific Post-translational Regulation of the Gamete Fusogen GCS1 in the Isogamous Volvocine Alga *Gonium pectoral*. *Eukaryotic Cell*, 13: 648-656, doi: 10.1128/EC.00330-13, 査読有
- 9) Fujiwara, M., Uemura, T., Ebine, K., Nishimori, Y., Ueda, T., Nakano, A., Sato, MH. and Fukao, Y. (2014) Interactomics of Qa-SNARE in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Phys.* 55: 781-789, doi: 10.1093/pcp/pcu038, 査読有
- 10) Hashiguchi, Y., Yano, D., Nagafusa, K., Kato, T., Saito, C., Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A., Tasaka, M. and Morita, MT (2014) A unique HEAT repeat-containing protein SHOOT GRAVITROPISM 6 is involved in vacuolar membrane dynamics in gravity sensing cells of *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Cell Phys.* 55, 811-822, doi: 10.1093/pcp/pcu020, 査読有
- 11) Uemura, T., Suda, Y., Ueda, T. and Nakano, A. (2014) Dynamic behavior of the trans-Golgi network in root tissues of *Arabidopsis* revealed by super-resolution live imaging. *Plant Cell Phys.* 55, 694-703, doi: 10.1093/pcp/pcu010, 査読有
- 12) Uemura, T. and Ueda, T. (2014) Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22: 116-121, DOI: 10.1016/j.pbi.2014.10.002, 査読有
- 13) Ueda, T. (2014) Cellulase in Cellulose Synthase: A Cat among the Pigeons? *Plant Physiol.*, 165: 1397-1398. DOI:

- <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.245753>,  
査読有
- 14) Inada, N. and Ueda, T. (2014) Membrane Trafficking Pathways and their Roles in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell Phys.* 55: 672-686, DOI: 10.1093/pcp/pcu046, 査読有
  - 15) Ito, E. and Ueda, T. (2014) Analysis of Rab GTPase-effector interaction in endosomal trafficking by bimolecular fluorescence complementation. *Methods in Molecular Biology*, 1209: 97-105, DOI: 10.1007/978-1-4939-1420-3\_7, 査読無
  - 16) 藤本優, 上田貴志 (2014) 膜交通経路の多様性獲得機構から見た植物のポストゴルジ輸送網. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) Vol. 5: 3-20, 査読無
  - 17) Hoepflinger, M., Geretschlaeger, A., Hoeffberger, M., Sommer, A., Nishiyama, T., Sakayama, Hammerl, P., H., Tenhaken, R., Ueda, T., Foissner I. (2013) Molecular and biochemical analysis of the first ARA6 homolog, a Rab5 GTPase, from green algae. *J. Exp. Bot.* 64, 5553-68, doi: 10.1093/jxb/ert322, 査読有
  - 18) Nakamura, H., Xue, Y., Miyakawa, T., Hou, F., Qin, H., Fukui, K., Shi, X., Ito, E., Park, S., Miyauchi, Y., Asano, A., Totsuka, N., Ueda, T., Tanokura, M., and Asami, T. (2013) Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat. Commun.* 4: 2613 doi: 10.1038/ncomms3613, 査読有
  - 19) Inoue, T., Kondo, Y., Naramoto, S., Nakano, A., and Ueda, T. (2013) RAB5 activation is required for multiple steps in *Arabidopsis thaliana* root development. *Plant Cell Phys.* 54, 1648-1659, doi: 10.1093/pcp/pct109, 査読有
  - 20) Asaoka, R., Uemura, T., Nishida, S., Fujiwara, T., Ueda, T. and Nakano, A. (2013) New insights into the role of RABA1 GTPases in salinity stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, e25377 doi: 10.4161/psb.25377, 査読有
  - 21) Jia, T., Gao, C., Cui, Y., Wang, J., Ding, Y., Cai, Y., Ueda, T., Nakano, A. and Jiang, L. (2013) ARA7(Q69L) expression in transgenic *Arabidopsis* cells induces the formation of enlarged multivesicular bodies. *J. Exp. Bot.* 64, 2817-29, doi: 10.1093/jxb/ert125, 査読有
  - 22) Fukuda, M., Wen, L., Satoh-Cruz, M., Kawagoe, Y., Nagamura, Y., Okita, T.W., Washida, H., Sugino, A., Ishino, S., Ishino, Y., Ogawa, M., Sunada, M., Ueda, T., and Kumamaru, T. (2013) A guanine nucleotide exchange factor for Rab5 proteins is essential for intracellular transport of the proglutelin from the Golgi apparatus to the protein storage vacuole in rice endosperm. *Plant Phys.* 162: 663-674, doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113>, 査読有
  - 23) Choi, S., Tamaki, T., Ebine, K., Uemura, T., Ueda, T. (corresponding author), and Nakano, A. (2013) RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the FLAGELLIN SENSING 2 receptor. *Plant Cell*, 25; 1174-1187, doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.108803>, 査読有
  - 24) Uejima, T., Ihara, K., Sunada, M., Kawasaki, M., Ueda, T., Kato, R., Nakano, A., and Wakatsuki, S. (2013) Direct metal recognition by guanine nucleotide exchange factor in the initial step of exchange reaction. *Acta Cryst. D.* 69: 345-351, doi:10.1107/S0907444912047294, 査読有
  - 25) Asaoka, R., Uemura, T., Ito, J., Fujimoto, M., Ito, E., Ueda, T., and Nakano, A. (2013) RABA1 GTPases are involved in transport between the *trans*-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. *Plant J.* 73:240-249, DOI: 10.1111/tbj.12023, 査読有
  - 26) Era, A., Kutsuna, N., Higaki, T., Hasezawa S., Nakano, A., and Ueda, T. (2013) Microtubule stability affects the unique motility of F-actin in *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.*, 126, 113-119, DOI: 10.1007/s10265-012-0496-4, 査読有
  - 27) Ebine, K., Uemura, T., Nakano, A., and Ueda, T. (2012) Flowering time modulation by a vacuolar SNARE via *FLOWERING LOCUS C* in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 7 (7): e442239, DOI: 10.1371/journal.pone.0042239, 査読有
  - 28) Uemura, T., Ueda, T., and Nakano, A. (2012) The physiological role of SYP4 in the abiotic stress response. *Plant Signaling & Behavior*, 7: 1118-1120, DOI: 10.4161/psb.21307, 査読有
  - 29) Ito, Y., Uemura, T., Shoda, K., Fujimoto, M., Ueda, T., and Nakano, A. (2012) *cis*-Golgi proteins accumulate near the ER exit sites and act as the scaffold for Golgi regeneration after brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells. *Mol. Biol. Cell*, 23: 3203-3214, DOI: 10.1091/mbc.E12-01-0034, 査読有
  - 30) Nielsen, M.E., Feechan, A., Böhlenius, H., Ueda, T., and Christensen, H.T. (2012) The *Arabidopsis* ARF-GEF, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of PEN1. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 109: 11443-11448, DOI: 10.1073/pnas.1117596109, 査読有
  - 31) Higaki, T., Kutsuna, N., Hosokawa, Y., Akita, K., Ebine, K., Ueda, T., Kondo, N.,

- and Hasezawa, S. (2012) Statistical organelle dissection of Arabidopsis guard cells using image database LIPS. *Sci. Rep.*, DOI: 10.1038/srep00405, 査読有
- 32) Fujimoto, M. and Ueda, T. (2012) Conserved and plant-unique mechanisms regulating plant post-Golgi traffic. *Front. Plant Sci.*, 3: 197. DOI: 10.3389/fpls.2012.00197, 査読有
- 33) 恵良厚子, 上田貴志 (2012) ゼニゴケ細胞生物学. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) Vol. 3: 114-121, 査読無
- 34) 藤本優, 上田貴志 (2012) 細胞壁資材の細胞内輸送-植物の膜交通と細胞壁-. 遺伝. Vol. 66: 47-52, エヌ・ティー・エス, 査読無

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) Takashi Ueda (Invited speaker) (2015) Diversification of membrane trafficking pathways during land plant evolution. Front Lines of Plant Cell Wall Research. 21st March. Nara, Japan
- 2) Takashi Ueda (Invited speaker) (2014) Conserved and unique aspects of membrane trafficking in *Marchantia polymorpha*. Marchantia workshop 2014. 8th-10th December. Kobe, Japan
- 3) Takashi Ueda (Invited speaker) (2014) Diversification of membrane trafficking pathways ~lessons from plants~. The first International Conference on Organelle Biogenesis and Function in Hong Kong. 4th-6th December. Chinese University of Hong Kong, Hong Kong
- 4) Takashi Ueda (Selected speaker) (2014) Diversification of membrane trafficking pathways ~lessons from plants~. The 38th NAITO Conference on Molecule-based biological systems. 9th October. Sapporo, Japan
- 5) Takashi Ueda (Invited speaker) (2014) Expected and unexpected roles of membrane traffic in stress response. Gordon Research Conference on Salt & Water Stress in Plants. 5th August. Newry, USA
- 6) Takashi Ueda (Invited speaker) (2013) Diversification of membrane trafficking pathways ~lessons from plants~. UK-Japan joint meeting on Plant Cell Biology. 16 July. Hopkins building, Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK
- 7) Takashi Ueda (Invited speaker) (2013) Mechanism and function of plant-unique membrane trafficking pathways. International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, 27 March. Kurashiki, Japan
- 8) 上田貴志 植物に学ぶ膜交通の多様化と進化 感染研学友会シンポジウム 2014年11月28日, 東京
- 9) 上田貴志 比べて分かる~植物に学ぶ膜交通の保存性と多様性~ 第66回日本細胞生物学会大会 2014年6月12日, 奈良, シンポジウム「比べてみよう: 細胞ダイナミクスの共通性と独自性」, co-organizer
- 10) 上田貴志 細胞内の交通網~植物に学ぶその多様化と進化~ 生命科学シンポジウム 2013年7月8日, 東京
- 11) 上田貴志 植物における膜交通経路の機能と多様性 シンポジウム「明日の植物科学を探る—ゲノムから細胞機能の統合を目指して—」, 2012年11月7日, 奈良
- 12) 上田貴志 植物の膜交通: 分子機構と高次機能, そして進化. 公開シンポジウム「タンパク質の細胞内交通整理」, 2012年9月10日, 東京
- 13) 上田貴志 植物におけるポストゴルジ輸送経路の多様化と進化. 日本植物学会第76回大会, 2012年9月16日, 姫路, シンポジウム「植物科学が拓く進化細胞生物学」, co-organizer

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 植物細胞壁—基礎と応用— 西谷和彦, 梅澤俊明編(分担執筆), 講談社, 349ページ
- 2) Ueda, T., Sato, M.H., and Uemura, T. (2012) The role of Rab GTPases and SNARE proteins in plant endocytosis and post-Golgi trafficking. *Endocytosis in Plants*, Edited by Jozef Samaj, Springer, 201-216. DOI: 10.1007/978-3-642-32463-5\_10

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ  
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hasseipl/HP/japanese/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
 上田 貴志 (UEDA, Takashi)  
 東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
 研究者番号: 10311333
- (2) 研究分担者  
 なし
- (3) 連携研究者  
 なし