

(別紙様式博5)

## 学位論文要旨

学位授与申請者

市川 美恵

題目：シロイヌナズナにおける小胞輸送タンパク質 SNARE とその相互作用因子の解析に関する研究

本研究は、シロイヌナズナにおいて、タンパク質小胞輸送時における輸送小胞と標的オルガネラの融合の特異性に関わる因子 SNARE タンパク質の根毛、花粉管の先端成長時における役割と SNARE タンパク質に相互作用する因子の同定および同定した因子の生理現象における役割を研究・考察したものである。

### 第1章 序論

小胞輸送とは、真核生物細胞において小胞体で合成されたタンパク質をゴルジ体経由で、細胞膜、液胞等などの単膜系オルガネラへ輸送する分子機構であり、形態形成やストレス応答など様々な生理現象で重要な働きをしている。小胞輸送において、SNARE タンパク質は、輸送小胞と目的オルガネラが融合する際に、輸送小胞と標的オルガネラにそれぞれ存在するオルガネラ特異的な SNARE タンパク質が SNARE 複合体を形成することにより輸送経路の各ステップの輸送小胞の融合特異性を決定している。

また、真核生物の細胞では、タンパク質を細胞膜上に極性輸送することで細胞極性を確立し、多様な形態を形成している。植物における細胞極性確立の典型的な例として、根毛や花粉管の先端成長が知られているが、これらの過程における SNARE タンパク質の機能や、小胞輸送と細胞骨格との関係については不明な所が多い。また、植物において SNARE タンパク質に相互作用して、輸送小胞の融合過程を制御する因子については未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、根毛と花粉管の先端成長をモデルとして小胞輸送による高等植物細胞の極性制御機構の解明と SNARE に相互作用する因子の生理現象における役割の解析を行った。

### 第2章 シロイヌナズナ SYP123 と SYP132 は根毛伸長に関与している

根毛特異的に発現する2種類の SNARE, SYP123 と SYP132 について、根毛伸長における役割についての解析を行った。その結果、*syp123* 変異体は野生株と比べて、根毛が有為

に短くなった。さらに、SYP132 の発現を根毛特異的に減少させると、*syp123* 変異体よりも有意に根毛が短くなった。また、両者の挙動を共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP-SYP123, GFP-SYP132 を発現する植物体で解析した。その結果、GFP-SYP123 は、アクチン依存的に根毛先端に局在した。一方、GFP-SYP132 は、根毛細胞の細胞膜全体に均一に存在することが明らかとなった。これらの結果より、SYP123 は、アクチン依存的な根毛の先端への輸送小胞の極性輸送に関与し、SYP132 は、新たに合成されたタンパク質をゴルジ体から細胞膜へ輸送する際に機能していると結論した。

### 第3章 花粉の成熟および花粉管発芽、伸長時における SNARE 分子の局在解析

根毛と同様に先端成長する細胞である花粉管の SNARE の機能についての解析を行った。花粉で特異的に発現する細胞膜局在型の SNARE である SYP124, SYP125, SYP131 の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果、発芽した花粉では、SYP124 と SYP125 は花粉管先端に局在していた。一方、SYP131 は花粉管全体に均一に局在した。このことから、SYP124, SYP125 は花粉管先端への輸送経路専用、SYP131 は細胞全体への輸送に使われていることが示唆された。また、SYP124, SYP125 は発芽前の花粉粒においては、細胞質内に分散した状態で存在し、花粉管発芽と同時に花粉管の先端に局在するようになることを明らかにした。これらが局在する小胞は、花粉管伸長用の輸送小胞であり、花粉管発芽前にあらかじめ花粉粒内に蓄えた状態にしており、花粉管伸長の際に花粉管先端に局在させることで、花粉管の速やかな伸長に関与していると結論した。

### 第4章 老化および病原菌感染時における VAMP タンパク質相互作用因子 PVA31 の役割

次に、SNARE と相互作用するタンパク質を同定し、小胞輸送と極性制御のさらなる解明に取り組んだ。

まず、動物細胞において SNARE と相互作用することが報告されているタンパク質 VAMP Associated Protein (VAP) に着目した。輸送小胞に存在する SNARE である VAMP と相互作用する Plant VAP (PVA) タンパク質がシロイヌナズナにも 13 種類存在している。この中から、老化時および病原菌感染時に発現が誘導される PVA31 の解析を行った。その結果、PVA31 と細胞膜への輸送に関与する SNARE タンパク質 VAMP722 / 721 との相互作用が確認できた。また、細胞内局在を調べたところ、VAMP722 と PVA31 は細胞膜で共局在した。次に、PVA31 過剰発現体を用いて解析を行ったところ、過剰発現体では、老化マーカーである *SAG12* の発現が野生型株より上昇しており、さらに葉の老化が有意に促進されていることが明らかとなった。また、PVA31 過剰発現体においては、抗菌タンパク質 *PRI* 遺伝子の発現が早期に誘導されることが明らかとなった。これらのことより、PVA31 は、老化および病原菌感染時

に、SNARE タンパク質に結合することで、細胞膜上への小胞輸送を調節している可能性が示唆された。

## 第5章 細胞極性確立時における SNARE 相互作用タンパク質 SH3P1 の役割の解析

次に、GFP-SYP123 を用いた共免疫沈降・質量解析法により複数の相互作用タンパク質候補を得た。その中から、細胞骨格系およびエンドサイトーシスに関与する SH3P1 タンパク質に着目し、SH3P1 の局在や変異体を用いた機能解析を行った。その結果、SH3P1 と SYP123 は、根毛において共局在した。阻害剤処理の結果から、両者は、同じ輸送経路で働いていることが明らかとなった。さらに、SH3P1 変異体株を用いて、重力屈性に異常があるか調べた結果、変異体では根の重力屈性に異常が生じることが明らかとなった。この時のオーキシンの分布を調べたところ、変異体では野生型と比較して明らかに変化していた。これらのことから、SH3P1 は、重力刺激感知時のオーキシンの極性輸送に関与していることが示唆された。

## 第6章 総合考察

本論文では、シロイヌナズナの根毛および花粉管の先端成長をモデルとして、植物細胞の極性確立時の SNARE の役割についての解析を行った。その結果、根毛では、SYP123、SYP132 という二種類の SNARE が細胞膜への別系統の輸送経路に働くことにより先端成長が行われていることが明らかとなった。さらに、花粉管においては、SYP124、SYP125 および SYP131 が、それぞれ別経路において機能することで、花粉管が先端成長することが明らかとなった。SNARE 相互作用因子についても、PVA31 および SH3P1 を同定し、解析を行った。その結果、これらの分子は、SNARE タンパク質に相互作用することで、SNARE の機能を調節し、病原菌の感染時や根の重力屈性発現時に機能していることが明らかとなった。

以上の結果は、植物では、様々な SNARE タンパク質およびそれらに相互作用する因子が、細胞膜上への極性輸送において機能することにより、形態形成や多様な生理現象を制御していることを示唆している。