

Title	植物のフラボノイド蓄積におけるメンブレントラフィックの関与(Digest_要約)
Author(s)	市野, 琢爾
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2014-09-24
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k18541
Right	学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要旨は2014/12/24に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

植物のフラボノイド蓄積におけるメンブレントラフィックの関与

京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 植物学系
植物分子細胞生物学分科

市野 琢爾

要約

植物の種子は、内部の胚を紫外線などの環境ストレスから保護するために、種皮に二次代謝産物であるフラボノイドを集積している。細胞内で、フラボノイドは小胞体で合成された後、液胞に蓄積することが知られているが、その輸送に関する分子機構はほとんど分かっていない。一方、タンパク質の細胞内輸送機構は、動物や酵母、シロイヌナズナを用いてこれまで詳細に解明されてきた。液胞タンパク質は、フラボノイド同様に小胞体で合成され、その後小胞輸送によって液胞まで運搬される。そこで、フラボノイドの蓄積機構に関して、小胞輸送を含めたメンブレントラフィックという細胞生物学的視点から研究を行った。

まず、所属研究室で作製された液胞タンパク質の小胞輸送に異常を示すシロイヌナズナの *green fluorescent seed (gfs)* 変異体ライブラリーを用いて、種皮の色に異常を示す変異体の探索を行い、11 系統の変異体の単離に成功した。そのうち 2 系統は同一の遺伝子に変異が生じており、これらの変異体を *gfs9* 変異体と命名した。

液胞タンパク質である 12S グロブリンと 2S アルブミンは、小胞体で前駆体として合成された後、ゴルジ体やトランスゴルジネットワーク、エンドソーム等の細胞内膜系オルガネラを経由する小胞輸送経路によって、液胞まで運搬される。その後、液胞内の酵素によってプロセッシングを受けて、成熟型となり貯蔵される。*gfs9* 変異体では、12S グロブリンと 2S アルブミンの前駆体が蓄積しており、液胞タンパク質の輸送異常が示唆された。電子顕微鏡観察によって、*gfs9* 変異体では 12S グロブリンが細胞間隙に異常に蓄積していた。故に、GFS9 はタンパク質の液胞輸送に関与していることが判明した。

種皮におけるフラボノイド (プロアントシアニン及びフラボノール) を標識する DMACA 試薬を用いた染色の結果、野生型の種子は黒く染色されたのに対して、*gfs9* 変異体では染色後も種子が茶色いままであった。実際、定量化によって、*gfs9* 変異体ではプロアントシアニジンの蓄積量が野生型の 30% 以下に減少していることが分かった。さらに LC-MS 解析によって、野生型の種子で検出された 16 種類のフラボノール分子種のすべてが *gfs9* 変異体でその蓄積量が減少していることが明らかになった。

顕微鏡観察によって、*gfs9* 変異体の細胞内では、いくつかの細胞内膜系オルガネラに異常があることが明らかになった。まず、フラボノイドを蓄積する種皮や分裂組織の根の細胞で、野生型と比較して液胞が小型化し、液胞数が増加していた。また、*gfs9* 変異体の根の伸長領域の細胞では、野生型では見られない多数の小胞からなる凝集構造体が存在していた。蛍光マーカーを

用いた観察により、この異常な構造体は肥大化したエンドソーム及び断片化した液胞から構成されていることがわかった。このことから、GFS9は液胞の発生およびエンドソームの成熟化に機能していることが示唆された。

GFS9 遺伝子は 837 アミノ酸からなる機能未知の新規タンパク質をコードしていた。GFS9 タンパク質の細胞内局在性を調査するために、GFS9-GFP および GFP-GFS9 を発現させる植物体を作出した。これらはともに顆粒状構造と細胞質への蛍光分布を示した。GFS9 が局在するオルガネラを同定するために、共発現解析を行い、GFS9 がゴルジ体に局在することを見出した。また、GFS9 の膜結合性を調べるために、GFP-GFS9 を発現する植物体を用いて細胞分画を行い、GFS9 はマイクロソーム画分と可溶性画分に存在することが分かった。さらに、マイクロソーム画分を用いたオルガネラ分画によって、GFS9 は表在性の膜タンパク質であることが判明した。

フラボノイドの蓄積に関与する既知の因子の変異体でタンパク質の液胞輸送は正常であったこと、及びメンブレントラフィックに関与する既知の因子の変異体でフラボノイドの蓄積に異常を示すものはなかったことから、GFS9 はフラボノイドの蓄積とメンブレントラフィックの両方に関与する初めての因子である。

GFS9はゴルジ体に局在する表在性の膜タンパク質で、メンブレントラフィックの3つの経路に関与している;(1) タンパク質の小胞体から液胞への輸送, (2) 液胞同士の同型融合, 及び(3) エンドソームの成熟化. ショウジョウバエの GFS9 オーソログでは保存された N 末端領域を介して HOPS 複合体と相互作用し、エンドソームの成熟化に機能している。HOPS 複合体はエンドソームおよび液胞上での SNARE 依存的な膜融合を司っている。これらの知見を考慮すると、GFS9 は可溶性の HOPS 複合体を内膜系オルガネラの膜上にリクルートすることを介して、HOPS 複合体もしくは SNARE 依存的な液胞での膜融合に寄与していると考えられる。

フラボノイドの蓄積における GFS9 の関与に関しては、2つの可能性が考えられる。第1の可能性は、フラボノイドを小胞によって小胞体から液胞まで運搬する経路において、GFS9 がゴルジ体でその輸送に関与しているという仮説である。第2の可能性は、GFS9 依存的な液胞の発生がフラボノイドの液胞における適切な蓄積には必須であるという仮説である。

本研究は、植物特異的なフラボノイドの蓄積機構と真核生物に普遍的なメンブレントラフィック(小胞輸送及び液胞の発生) が関連している可能性を初めて見出した。今後、種皮の色に異常を示す新規 *gfs* 変異体の解析及び GFS9 の相互作用因子の同定を進めることによって、両者の関係性がより詳細に解明されることであろう。さらに、メンブレントラフィックという細胞生物学的な視点から、二次代謝研究を進めることにより、フラボノイドのみならず植物が生産する多様な二次代謝産物の未知なる関係性を発見することが期待される。