

高等植物の細胞極性確立における小胞輸送システムの解明

Analysis of the role of membrane trafficking on the establishment of the cell polarity in higher plants.

研究代表者 京都府立大学 佐藤 雅彦 Kyoto Prefectural University Masa H. Sato
共同研究者 京都府立大学 江波 和彦 Kyoto Prefectural University Kazuhiko Enami
共同研究者 京都府立大学 西谷 亜衣子 Kyoto Prefectural University Aiko Nishitani
共同研究者 京都府立大学 市川 美恵 Kyoto Prefectural University Mie Ichikawa

Summary

Cell polarity is central to the development of multicellular organisms including plants and animals. Cell polarity could be defined as asymmetric distribution of plasma membrane proteins along the cell axis. In plant, polarized transport of plasma membrane proteins are mediated by the membrane trafficking.

SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) is a key molecule to play an essential role in the membrane fusion event. In *Arabidopsis*, nine SYP1 Qa-SNARE subfamily proteins, SYP111, SYP112, SYP121, SYP123, SAP123, SYP124, SYP125, SYP131 and SYP132, demonstrated to be localized on the PM, although the tissue expression profiles and the distribution patterns on the membrane of these 9 Qa-PM SNARE molecules are largely unknown. To investigate the role of plasma membrane SNAREs on the polarized transport to the PM, we generated transgenic plants expressing these GFP-fused PM-Qa-SNAREs under control of their own-promoters, and found that SYP123 is involved in the tip-growth of root hair, and SYP124 and SYP125 function in the pollen-tube development, respectively.

研究目的

高等真核生物において、細胞の極性確立は形態形成、屈性発現など様々な局面において非常に重要であると考えられている。また、根毛あるいは花粉管の伸長は、先端部分か特異的に成長する、いわゆる先端成長という成長様式で伸長するが、この先端成長は典型的な極性成長のひとつである。細胞が極性を確立するためには、細胞膜上に機能性膜タンパク質が合目的に偏在する必要があるが、高等植物においては、細胞膜上の膜タンパク質の偏在性は、細胞膜への小胞輸送によるエキソサイトーシスと細胞膜からのエンドサイトーシスの動的なバランスによって保たれていることが、オーキシン排出タンパク質である PIN 1 の解析から明らかになっている。しかしながら、極性輸送がいかなる小胞輸送系の分子群によって制御されているかについては依然不明な点が多い。

本研究では、細胞極性に関与する細胞内小胞輸送に関係する分子、特に輸送小胞と標的膜の融合に必要な SNARE 分子の探索、既に同定された極性輸送に関係する SNARE の局在メカニズムの解析、極性輸送に関わる SNARE 分子と相互作用する分子群の探索などを行う。これらの解析を通じて、植物細胞の極性確立がどのように行われているか、更に、小胞輸送システムの動的な挙動が極性確立にどのように関与しているかを分子生物学的に解析し、最終的には細胞内小胞輸送系の動態が、植物の形態形成および生理応答にどのように働いているかについて理解することを目的としている。

研究経過

(1) 細胞膜型 SNARE の組織特異的発現

高等植物であるシロイヌナズナのゲノム上には、60種類を超える SNARE 遺伝子がコードされている。この数は、ヒトなど他の高等真核生物のゲノムに存在する SNARE の数をはるかに超えるものであり、なぜ植物がこのように多くの SNARE を持つのかについては依然不明な点が多い。我々は、先行研究において、シロイヌナズナのほとんどすべての SNARE の細胞内局在を明らかにした。その結果によると、シロイヌナズナでは細胞膜に非常に多くの SNARE タンパク質が局在することが明らかとなった。今回は、細胞膜に存在する9種類の SNARE(SYP111, SYP112, SYP121, SYP122, SYP123, SYP124, SYP125, SYP131, SYP132)各々のプロモーターとコーディング領域の間に GFP を挟み込む形のバイナリベクターコンストラクトを作成し、それを用いて自己プロモーターの制御下で GFP 融合型の SNARE を発現することができる遺伝子組換え植物体を SNARE ごとに9種類作成した。

それらの遺伝子組換え植物体を用いて発達時の組織における発現特異性と細胞膜上の局在性の解析を行った。その結果、根においては、SYP111 は根端の細胞分裂域の分裂中の細胞でのみ発現し、細胞板のみに局在していることが明らかとなった。また、SYP121 は根の分裂・伸長域では表皮と根冠のみで発現し、成熟するに従って根の組織全体で発現がみられるようになった。SYP122 は分裂・伸長域では発現が見られず、分化領域で内皮細胞層で発現し、成熟領域では根の組織全体で発現がみられた。SYP132 は根の組織全体で発達過程移管によらず発現していた。また、SYP123 は、分化領域と成熟領域の根毛細胞のみで発現していることが明らかとなった。以上、根における SNARE の発現様式を Table I にまとめる。

	分裂・伸長領域	分化領域	成熟領域
SYP111	分裂細胞の細胞板	なし	なし
SYP112	なし	なし	なし
SYP121	表皮・根冠	表皮	根全体
SYP122	なし	内皮細胞	全体
SYP123	なし	根毛細胞	根毛細胞
SYP132	全体	全体	全体

Table I Tissue-specific expressions of Plasma membrane Qa-SNAREs in root

地上部における、SNARE の発現は根の組織ほどの特異性は認められず、ほぼすべての SNARE が発現していた。特に SYP132 の発現が各組織で非常に強く、この結果は SYP132 が植物の生育時に恒常的に機能している SNARE であることを強く示唆している。また、花粉においては SYP124, SYP125, SYP132 が特異的に発現していることが明らかとなった。

以上、植物の発達成長時の SNARE の発現様式を **Fig.1** にまとめる。

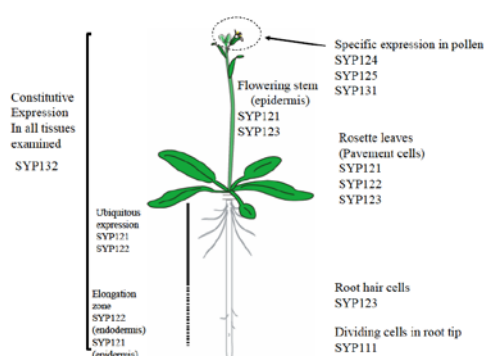


Figure 1 Summary of expression patterns of PM-Qa-SNAREs during plant development

(2) 根毛細胞に特異的に発現する SNARE 分子, SYP123 の解析

細胞膜に局在する Qa-SNARE のうち、SYP123 は根毛細胞特異的に発現している。共焦点レーザー顕微鏡を用いて成長中の GFP-SYP123 が発現している根毛細胞を詳細に解析した結果、根毛の GFP-SYP123 は根毛先端に特異的に偏在することが明らかとなった (**Fig. 2**)。また T-DNA 挿入変異体を用いた解析により SYP123 を欠損した植物は野生型に比べて根毛の長さが 2/3 程短くなっており、*syp123* の変異が根毛の伸長異常をきたすことが明らかになった (**Fig.3**)。更に、SYP123 の根毛先端部への偏在のメカニズムを明らかにすることを目的として、各種阻害剤の影響の解析等を行った。その結果、SYP123 の根毛先端への偏在は、アクチン繊維依存的に起こることが明らかとなった (**Fig.4**)。これらのことより、SYP123 は、アクチンを構成成分とする細胞骨格により根毛先端部分に輸送され、その偏在性はエンドソームと細胞膜とのリサイクリングにより維持されていることが示唆された。

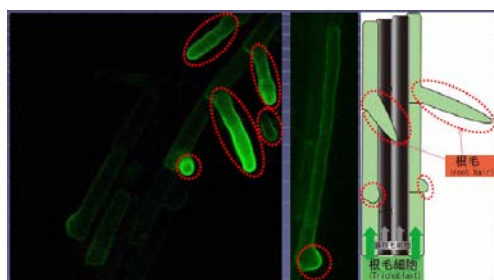


Figure 2
Polarized localization of GFP-SYP123 on the tip region of the root-hair

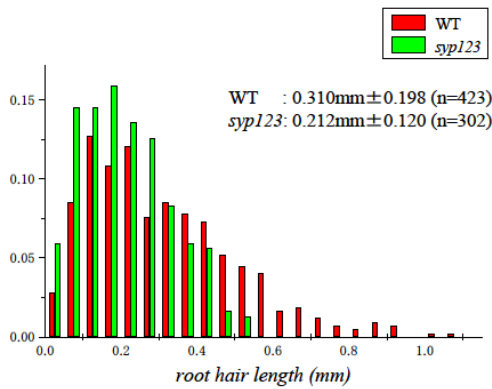


Figure 3

The length of root-hair shortened in *syp123* mutant

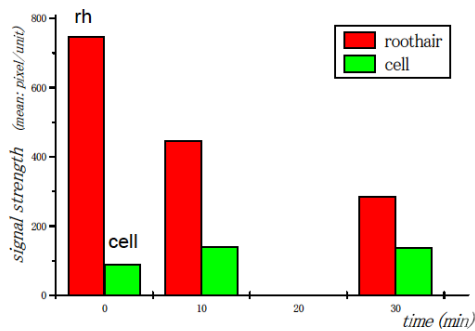


Figure 4

Actin-dependent polarized localization of GFP-SYP123 on the root-hair tip region

(3) 花粉管において特異的に発現する SNARE, SYP124, SYP125, SYP131 の解析

花粉管の伸長は、根毛の伸長と同じく、植物における先端成長の代表的な例であり、その重要性から様々な研究が行われているが、SNARE に関する研究は、皆無である。我々は、花粉管の伸長課程においても機能している SNARE があるのではないかと予測の元、マイクロアレイデータを解析し、花粉のみで発現している SNARE, SYP124, SYP125, SYP131 を抽出した。それらの自己プロモーターで GFP 融合タンパク質を発現するトランスジェニック植物を解析したところ、SYP124 と SYP125 の両者は花粉管の先端部分に偏在するものの、SYP124 は花粉管先端部のクリアゾーンの直下に、SYP125 は花粉管の最先端部分に偏在するという違いが観察された。一方、SYP131 は花粉の細胞膜全体に均一的

に局在し、目立った偏在性は観察されなかった。これらのことより花粉に特異的に発現する3種類のSNAREには機能的な使い分けが存在する可能性が示唆された(Fig. 5)。

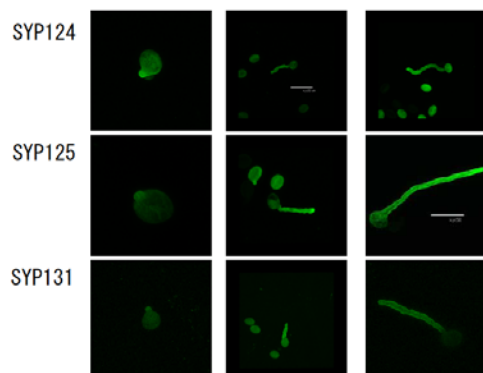


Figure 5

The localizations of pollen-specific Qa-SNAREs during pollen tube elongation

考察

以上のようにシロイヌナズナの細胞膜局在型SNAREの組織発現パターンをそれぞれの細胞における細胞膜上における極性の有無についての解析を行った結果、根毛の伸長過程にはSYP123が、また、花粉管の伸長過程においてはSYP124、SYP124が機能していることが明らかとなった。根毛の伸長と花粉管の伸長は共に先端部分が特異的に伸長していく先端成長という極性をもった成長様式であり、典型的な生物における典型的な極性成長に例である。今まで、このような極性をもった成長にかんよするSNAREタンパク質の報告はなく、これらのSNAREが先端成長に関わるSNAREの初めての例である。また、根毛細胞において根毛の先端成長に関わるSNARE, SYP123と同時にSYP132が細胞膜上に均一に存在することが明らかとなった。このことは、植物細胞では一種類の細胞内に細胞膜上へ向かう小胞輸送経路が少なくとも2種類存在することを示唆している。我々はこのうちの一つがアクチン繊維依存的にSYP123によって輸送が担われていると考えている。

細胞の極性を制御する因子はSNARE以外では、Rab-GTPase, ROP-GTPase, アクチン繊維など様々なものが存在することが知られており、細胞の極性確立は、これらの分子が複雑に関与しながら行われていることが示唆されている。これらのことを考え合わせると

今後は、植物細胞の極性確立においてSNAREとそれ以外の因子がどのように関わっているかについて詳細な解析を行っていく予定である。

研究発表

口頭発表

- (1) 日本植物生理学会 2006年度年会 平成18年3月19日～21日
筑波大学 「イネゴルジ複合体プロテオーム：GFP-SYP31 標識シスゴルジ膜画分の解析」
朝倉 剛、廣瀬 将太、片峰 拓紀、佐藤 雅彦、藤原 正幸、島本 功、縁 秀隆、三ツ井 敏明

- (2) 日本植物生理学会 2006年度年会 平成18年3月19日～21日
筑波大学 「小胞輸送から見た植物細胞の極性確立機構の解析」 江波 和彦、植村 知博、
佐藤 雅彦

- (3) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス 「高等植物におけるトランスゴルジネットワーク (TGN) のダイナミクスの
解析」
植村 知博、庄田 恵子、佐藤 雅彦、上田 貴志、中野 明彦

- (4) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス「シロイヌナズナ根毛細胞特異的発現 SNARE の細胞内動態および機能解析」
江波 和彦、植村 知博、佐藤 雅彦

- (5) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス「新規転写因子 VOZ 変異体のトランスクリプトーム解析」
秋山 昌子、向川 佳子、硯 亮太、光田 展隆、河内 孝之、佐藤 雅彦

- (6) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス「シロイヌナズナの花成制御における VOZ 遺伝子の機能解析」
硯 亮太、向川 佳子、秋山 昌子、光田 展隆、佐藤 雅彦、河内 孝之

- (7) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス
「花粉特異的に機能する SNARE 分子の探索」
市川 美恵、江波 和彦、佐藤 雅彦

- (8) 18th International Conference on Arabidopsis Research
Beijing, China June 20-23, 2007
“Expression profiles and intracellular dynamics of SYP1s;

Plasma-membrane localized Qa-SNARE family in Arabidopsis.”

Kazuhiko Enami, Tomohiro Uemura, Masa H. Sato

(9) 18th International Conference on Arabidopsis Research

Beijing, China June 20-23, 2007

“Analysis of trans-Golgi network(TGN) dynamics in plants.”

Tomohiro Uemura, Keiko Shoda, Takashi Ueda, Masa H. Sato,

Akihiko Nakano

紙上発表

(1) “Isolation and proteomic analysis of rice membranes: cis-Golgi membranes labeled with GFP-SYP31.” Tsuyoshi Asakura, Shota Hirose, Hiroki Katamine, Aya Kitajima, Hidetaka Hori, Masa H. Sato, Masayuki Fujiwara, Ko Shimamoto, Toshiaki Mitsui, *Plant Biotech.* 23, 475-485 (2006).

(2) “The plant specific Qc-SNARE proteins, SYP7s, are localized to the endoplasmic reticulum, endosomes and the plasma membrane.” I Nengah SUWASTIKA, Tomohiro UEMURA, Takashi SHIINA, Masa H. SATO, and Kunio TAKEYASU, “submitted”

(3) “Expression profiles of Arabidopsis plasma membrane resident SYP1 proteins”

Kazuhiko Enami, Tomohiro Uemura and Masa H. Sato “manuscript in preparation”