



Title	Endocytosis and Intracellular Trafficking of a Borate Transporter BOR1 in Arabidopsis thaliana [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	吉成, 晃
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第12494号
Issue Date	2016-12-26
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/64603">http://hdl.handle.net/2115/64603</a>
Rights(URL)	<a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Yoshinari_Akira_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏名 吉 成 晃

審査担当者	主 査	准教授	尾之内 均
	副 査	教 授	橋床 泰之
	副 査	教 授	久保 友彦
	副 査	教 授	内藤 哲（本学大学院生命科学院）
	副 査	教 授	高野 順平（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）

### 学位論文題名

#### Endocytosis and Intracellular Trafficking of a Borate Transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナのホウ酸輸送体 BOR1 のエンドサイトーシスと細胞内輸送に関する研究)

本論文は、英文 146 頁、図 50、表 4、3 章からなり、参考論文 1 編が添えられている。

ホウ素は高等植物の必須栄養素の一つであり、細胞壁ペクチンを架橋することにより植物の生長に重要な役割を果たす。一方、過剰量のホウ素は毒性を示す。シロイヌナズナ BOR1 はホウ酸の細胞外への排出を促進する細胞膜局在型ホウ酸トランスポーターであり、根においてホウ素の中心柱方向への輸送を担う。BOR1 は根の様々な細胞において内側（中心柱側）の細胞膜ドメインに極性をもって局在（偏在）する。BOR1 の偏在は方向性を持った効率的なホウ素輸送に寄与すると考えられる。また、BOR1 は高濃度のホウ素に応答し細胞膜から液胞へすみやかに輸送されて分解される。これはホウ素の過剰蓄積を防ぐための応答反応である。このようなトランスポーターの偏在と分解は他の栄養素のトランスポーターにおいても報告されており、栄養輸送における普遍的な現象と考えられる。本研究では、BOR1 の偏在と分解を制御する分子機構の解明を目的とし、特にエンドサイトーシスの寄与を解析した。

#### 1) ダイナミン様タンパク質 DRP1 に依存したエンドサイトーシスは BOR1 の偏在と分解に必要である

本研究ではまず、BOR1 の局在とエンドサイトーシスの詳細なイメージング解析を行った。植物細胞において細胞膜タンパク質の内在化の主要機構はクラスリン依存エンドサイトーシスと考えられている。クラスリン依存エンドサイトーシスは以下の 4 過程を経て進行する。1: アダプタータンパク質の結合による積荷タンパク質のリクルート、2: 被覆タンパク質クラスリンの集合、3: クラスリン被覆ピットの細胞内への陥入、4: ダイナミン様 GTPase による小胞の切り出し、である。本研究では、根の細胞膜における主要なダイナミン様 GTPase である DRP1A をマーカーとして用い、DRP1A-tag red fluorescent protein (TagRFP) と BOR1-green

fluorescent protein (GFP) の細胞膜上での局在を斜光照明蛍光顕微鏡法 (VAEM) によって一分子レベルで追跡した。その結果、BOR1-GFP と DRP1A-TagRFP の細胞膜上での部分的な共局在と、共に細胞膜から消失する様子をとらえた。これは BOR1 のエンドサイトーシスの一分子レベルでの可視化に成功したものである。

続いて、BOR1 の偏在と分解におけるエンドサイトーシスの重要性を解析した。従来植物細胞におけるエンドサイトーシスの阻害にはクラスリンの機能阻害が用いられてきた。しかしながらクラスリンには分泌経路や液胞輸送経路などでの機能が指摘されており、特異性に問題があった。そのため、DRP1A の GTPase 活性を欠損した変異型タンパク質を誘導発現させることで、DRP1 による小胞の切り出しを阻害する実験系を確立した。これを用いてエンドサイトーシスを阻害すると、BOR1-GFP の中心柱側への偏在性が失われ、ホウ素に応答した分解も阻害された。本成果は BOR1 の偏在と分解に DRP1 に依存したエンドサイトーシスが必要であることを明確に示したものである。

## 2) クラスリンアダプタータンパク質複合体 AP-2 は BOR1 の偏在に必要であるが分解には寄与しない

BOR1 の細胞内輸送におけるクラスリンアダプタータンパク質複合体 AP-2 の役割について解析した。その結果、BOR1 と AP-2 が細胞膜上で部分的に共局在することと、結合することを示した。さらに、AP-2  $\mu$  サブユニットの機能欠損変異体において、BOR1-GFP は中心柱側へ偏在せず細胞膜にはほぼ一様に分布すること、本変異体においても BOR1-GFP のホウ素に応答した分解は正常であることを示した。これらの結果は、BOR1 の偏在性は AP-2 に依存したエンドサイトーシスとそれに引き続いたエキソサイトーシス (リサイクリング) により維持されることと、ホウ素に応答した分解は AP-2 とは異なるアダプターに依存したエンドサイトーシスにより進行することを示唆している。

以上のように本研究は、ホウ酸トランスポーターBOR1 の偏在と分解におけるエンドサイトーシスの重要性を明確に示した。さらには、植物細胞が異なるエンドサイトーシス機構を使い分けトランスポーターの偏在性と分解を制御することを発見した。研究の過程では、エンドサイトーシス特異的阻害実験系という今後の植物細胞生物学に重要なツールを確立した。本研究は植物の栄養素輸送タンパク質の細胞内局在と蓄積量の制御機構に新たな知見を与える先駆的なものであり、植物栄養学および細胞生物学的価値が高い。

よって、審査員一同は、吉成晃が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。