



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12494号
Issue Date	2016-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64603
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshinari_Akira_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 吉 成 晃

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)

ホウ素は植物の微量必須元素であるが、過剰量のホウ素は毒性を示す。植物はホウ素の欠乏や過剰を防ぎ、体内のホウ素栄養の恒常性を保つためにホウ酸輸送タンパク質を利用している。排出型ホウ酸輸送体 BOR1 は、低ホウ素条件下のシロイヌナズナの根に発現し、根から地上部へのホウ素輸送に重要な役割を担う。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、すなわち偏在する。BOR1 の細胞膜上での偏在は、土壌側から中心柱方向へのホウ酸の極性輸送に重要であると考えられている。また、植物が十分量のホウ素に曝されると、細胞膜上の BOR1 はエンドサイトーシスによって細胞内のエンドソームへと取り込まれ、多胞体を経由して液胞へ運ばれ、分解される。このホウ素濃度に応答した BOR1 の分解は、ホウ素の過剰蓄積を防ぐために重要である。しかしながら、BOR1 の偏在と分解を制御する分子機構は未だ明らかになっていない。本学位論文では、BOR1 の偏在と分解の制御におけるエンドサイトーシスの寄与を解析した。

エンドサイトーシスは、細胞膜に局在する輸送体や受容体といった膜貫通型タンパク質、膜結合型タンパク質、細胞外物質、そして細胞膜脂質を細胞の中に取り込む現象である。植物におけるエンドサイトーシス機構には、クラスリン依存的エンドサイトーシス（CME）とクラスリン非依存的エンドサイトーシスが存在する。CME はアダプタータンパク質と積荷タンパク質との結合、小胞被覆タンパク質であるクラスリンの集合、クラスリン被覆ピットの細胞内への陥入、そしてダイナミン GTPase による小胞の切り出しという過程を経る。私は、これらの過程に関わる因子を植物細胞において阻害する実験系を確立し、BOR1 の偏在や分解に対する CME の寄与を解析した。

まず、小胞の切り出しに重要な因子であるダイナミンに着目した。植物には、5つのダイナミン関連タンパク質ファミリー（DRP1～DRP5）が存在し、DRP1 と DRP2 がエンドサイトーシスに関わることが報告されている。そこで私は、斜光照明蛍光顕微鏡法（VAEM）によって、BOR1-green fluorescent protein (GFP)と DRP1A-tag red fluorescent protein (TagRFP)との細胞膜上での共局在を一粒子レベルで解析した。その結果、BOR1-GFP と DRP1A-TagRFP は部分的に共局在し、DRP1A-TagRFP によって BOR1-GFP を含む小胞が切り出される様子が観察された。次に、DRP1A の GTPase 活性を欠損した変異型タンパク質をエストラジオール誘導的に発現させることで、DRP1 による小胞の切り出しをドミナントネガティブ阻害する系を確立した。この系

を用いて BOR1-Green fluorescent protein (GFP)融合タンパク質の細胞内局在と動態を観察した結果、DRP1 が阻害された細胞で BOR1 のエンドサイトーシス、中心柱側への偏在、そしてホウ素に応答した分解が阻害されることが分かった。これらの結果から、BOR1 の偏在と分解には DRP1 に依存した小胞の切り出しが必須であることが示唆された。この結果は、「DRP1-dependent endocytosis is essential for polar localization and boron-induced degradation of the borate transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*」と題して *Plant & Cell Physiology* 誌にオンラインで掲載されている(Yoshinari *et al.*, 2016)。

次に、積荷タンパク質の選別に重要な役割を果たすアダプタータンパク質 AP-2 について解析した。AP-2 は AP2A、AP1/2B、AP2M、AP2S の4つのサブユニットからなるヘテロ四量体タンパク質複合体であり、積荷タンパク質とクラスリンの両者に結合することで、積荷タンパク質の選択的エンドサイトーシスを促すと考えられている。私は、AP2M の機能欠損変異体に BOR1-GFP を導入し、その細胞内局在と動態を解析した。その結果、この変異体では BOR1-GFP の中心柱側への偏在がみられなくなった。一方、興味深いことに、変異体においても BOR1-GFP のホウ素に応答した分解は野生型同様に観察された。これらの結果は、AP-2 依存的なエンドサイトーシスによって BOR1 の偏在性が維持されるとともに、ホウ素十分条件下では BOR1 が AP-2 非依存的なエンドサイトーシスによって細胞の中へ取り込まれ、分解されることを示唆している。

本学位論文で私は、BOR1 の細胞内局在や存在量の調節にエンドサイトーシスが必須であることを示した。さらに BOR1 のエンドサイトーシスがホウ素濃度に応答したアダプタータンパク質の使い分けによって調節される可能性を示した。これらの発見は、植物の栄養素輸送タンパク質の細胞内局在と存在量の調節機構に新たな知見を与えるものである。