



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Endocytosis and Intracellular Trafficking of a Borate Transporter BOR1 in Arabidopsis thaliana [an abstract of entire text]
Author(s)	吉成, 晃
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/64605
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshinari_Akira_summary.pdf



学位論文内容の要約

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)

研究の背景

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。本学位論文研究の目的は、BOR1 の偏在と分解の制御機構に対するエンドサイトーシスの寄与を明らかにすることである。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。

本学位論文の構成

本学位論文は、Chapter 1. Introduction、Chapter 2. DRP1-dependent endocytosis is essential for polar localization and boron-induced degradation of a borate transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*、Chapter 3. Clathrin adaptor protein AP-2 is required for polar localization but not for boron-induced degradation of a borate transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*、Chapter 4. References、Chapter 5. Acknowledgements の5章から成る。ここでは、Chapter 1 から3の内容についての要約を記す。

Chapter 1. Introduction

本章は序論として、植物におけるホウ素栄養の生理学的意義、植物におけるホウ酸輸送機構、植物におけるエンドサイトーシスと細胞内膜輸送機構、BOR1 の細胞内輸送機構、様々な細胞膜タンパク質の極性をもった局在について、現在まで知見を示した。

Chapter 2. DRP1-dependent endocytosis is essential for polar localization and boron-induced degradation of a borate transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*

本章では、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与することが報告されている。本研究では DRP1 に着目し、BOR1 のエンドサイトーシスへの寄与を評価した。私はまず、BOR1-green fluorescence protein (GFP)および DRP1A-Tag red fluorescent protein (TagRFP) は細胞膜および細胞板上で共局在することを明らかにした。さらに斜光照明蛍光顕微鏡法 (VAEM) によっても、細胞膜における一分子イメージングによって BOR1-GFP と DRP1A-TagRFP が共局在することを明らかにした。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。

Chapter 3. Clathrin adaptor protein AP-2 is required for polar localization but not for boron-induced degradation of a borate transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*

本章では、クラスリン被覆タンパク質およびクラスリンアダプター複合体 AP-2 の、BOR1 のエンドサイトーシスへの寄与を解析した。まず、共焦点蛍光顕微鏡観察によって、BOR1 とクラスリンが細胞膜、細胞質中の小胞、トランスゴルジ網と考えられる細胞内小器官で共局在することが分かった。また、VAEM による一分子イメージングによって、一部の BOR1-GFP とクラスリン軽鎖(CLC)-mKO が細胞膜上で共局在することが明らかになった。さらに、BOR1-GFP を免疫沈降法によって回収した結果、クラスリン重鎖タンパク質が共沈した。この結果から、BOR1 はクラスリン被覆小胞に積み込まれる積荷タンパク質の一つであることが示唆された。クラスリンをドミナントネガティブ阻害する HUB タンパク質を誘導的に発現することで BOR1-GFP の構成的エンドサイトーシス、偏在、分解が阻害された。これらの結果を総合し、クラスリン依存的エンドサイトーシスは BOR1 の細胞内への取り込み、さらには偏在性の維持と液胞輸送に重要であることが示唆された。

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。VAEM による一分子イメージングによって、BOR1-GFP と AP2M-TagRFP が細胞膜上で共局在し、同時に消える様子が観察された。この結果は、BOR1 が AP-2 複合体とともにエンドサイトーシスされることを示唆している。さら、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。

結論

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。