

所属 (主指導教員)	植物形態ダイナミクス研究室 (田坂 昌生)		
氏名	橋口 泰子	提出	平成 23 年 12 月 20 日
題目	高等植物細胞の液胞の生成/膜動態に関与する因子の 分子遺伝学的解析		
<p>植物の液胞は、分化し始めた細胞において小胞体やトランスゴルジ網由来の小胞が融合することで生じ、さらに小胞体で合成されたタンパク質や脂質が小胞輸送系因子によって運ばれることで成熟すると考えられている。植物の様々な組織、器官の細胞において、成熟した液胞は膜が内腔に陥入してできたバルブ状やシート状の構造を持ち、これらの構造は形態を変えながら内腔内をダイナミックに動く。</p> <p>高等植物ゲノムの解読以降に行われた逆遺伝学的解析により、植物細胞の液胞へ至る小胞輸送経路には、酵母の順遺伝学的解析によって既に同定されていた因子のオルソログが関与していることが明らかになった。しかしながら、植物のゲノムにおいて、これらの因子の多くは重複し、酵母や動物より多数のパラログを持つ。このことから、植物の液胞は酵母/動物の液胞/リソソームより多様化した液胞生成および液胞機能のための分子基盤を持つ可能性が示されたが、パラログ間の機能重複のため、従来の順遺伝学的手法ではパラログの個々の機能を解析することは難しいという課題が生じた。一方、バルブやシートといった液胞膜の動的構造の形成、維持に関与する因子については極めて報告が少なく、さらにこれらの構造の生理機能も正確にはわかっていない。そこで私は、植物液胞の特異性を支える分子基盤やその高次機能における役割を明らかにすることを目的に、シロイヌナズナの花茎の重力屈性を指標として単離された因子の分子遺伝学的解析を行った。</p> <p>I. シロイヌナズナの形態と花茎の重力屈性に異常を示す <i>zigzag</i> (<i>zig</i>)は、液胞へ至る小胞輸送経路において機能する Qb-SNARE VTI11 の欠損変異体である。<i>zig</i>の細胞内では実際に液胞膜構造に異常が観察されたことから、<i>zig</i>の形態や重力屈性における表現型は細胞内の小胞輸送系の異常を反映したものであると考えられた。そこで本研究室は、高等植物細胞の液胞へ至る小胞輸送系の分子基盤を明らかにするため、<i>zig</i>の表現型を抑圧するサプレッサーを単離、解析してきた。その一つである <i>zig suppressor3</i> (<i>zip3</i>)は <i>zig</i>の表現型を部分的に抑圧する。その原因遺伝子は、出芽酵母において逆行輸送に機能するレトロマー複合体の一構成因子 <i>Vps35</i>のシロイヌナズナオルソログ <i>VPS35A</i>だった。シロイヌナズナレトロマーの別の構成因子と予想される <i>VPS29</i>, <i>VPS26A</i>の機能欠損が <i>zig</i>変異を抑圧したことから、<i>VPS35A</i>, <i>VPS29</i>, <i>VPS26A</i>の3つのタンパク質が相関をもって機能し、シロイヌナズナにおいてもレトロマー複合体を形成している可能性が強く示唆された。</p>			

シロイヌナズナのゲノムには *VPS35* のパラログがもう 2 つ存在する。*VPS35* のパラログにおける *zig* 変異抑圧に関する遺伝学的機能を調べるため、*vps35b* あるいは *vps35c* と *zig* との二重変異体を作成し、重力屈性における表現型を解析した。その結果、*vps35b*、*vps35c* 変異は *zig* の表現型を抑圧しなかった。このことは、*VPS35A* と *B* あるいは *C* とでは、*zig* 変異抑圧に関する遺伝学的機能が異なることを示している。本来ならば、ゲノム中に複数存在するパラログの個々の機能を遺伝学的に解析することは難しいが、形態と重力屈性に明確な表現型を持つ *zig* の抑圧効果を指標とすることで、初めて、パラログ間で遺伝学的機能に差があることが示された。

II. シロイヌナズナ変異体 *shoot gravitropism6 (sgr6)* の花茎は、野生型より若干遅延した重力屈性を示す。*SGR6* は複数の HEAT (huntingtin, elongation factor 3, A-subunit of protein phosphatase 2A and TOR1) repeat 以外に機能を類推させるドメインを持たない。また、*SGR6* のホモログは動物やシロイヌナズナ以外の植物にも保存されているが、それらに関する報告はなされていない。

SGR6 の発現解析から、*SGR6* は花茎において表皮、内皮、維管束、維管束間繊維細胞に発現することがわかった。このうち、内皮細胞は花茎における重力感受細胞である。そこで、*sgr6* において内皮特異的プロモーターの制御下で GFP 融合型 *SGR6* を発現させたところ、重力屈性異常が野生型並みに回復した。このことから、*SGR6* は花茎の重力屈性において内皮で機能していることが示された。内皮細胞内にはデンプンを蓄積したプラスチドであるアミロプラストが多数存在し、重力刺激の感受にはアミロプラストの重力方向への移動が重要である。内皮細胞はその細胞体積のほとんどを液胞によって占められており、他の組織の細胞でも見られるような液胞膜の動的構造を持つ。アミロプラストは一つ一つが液胞膜によって包まれており、アミロプラストの重力方向への移動には、液胞膜の動的構造が必要である。そこでまず、*sgr6* の内皮細胞における液胞膜の動的構造とアミロプラスト動態を観察した。その結果、野生型の内皮細胞において花茎切断から 30 分の間、液胞膜の動的構造とアミロプラスト動態がある程度維持されたのに対し、*sgr6* の内皮細胞においては切断から 30 分後では液胞膜の動的構造とアミロプラスト動態が著しく損なわれていた。そこで、固定した花茎の縦断切片を用いてアミロプラスト動態を解析したところ、*sgr6* の内皮細胞においてアミロプラストの重力方向への移動が野生型より低下していることがわかった。このことから、*SGR6* はアミロプラストの重力方向への移動を介して花茎の重力屈性に関与している可能性が示唆された。

次に、内皮細胞における *SGR6* の局在を調べたところ、*SGR6* のシグナルは液胞マーカのシグナルとのみ重なって見えた。*SGR6* は膜貫通ドメインを持たないが、局在解析から液胞膜近傍に存在することがわかったため、*SGR6* が膜に局在するかを生化学的手法を用いて調べた。その結果、*SGR6* は可溶性画分と膜画分の両方に存在することが確認された。以上の結果から、*SGR6* はシロイヌナズナの内皮細胞において、液胞膜の動的構造の形成/維持に関与する新規因子である可能性が示された。

博士論文番号: 0981019

高等植物細胞の液胞の生成/膜動態に関する因子の
分子遺伝学的解析

橋口 泰子

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物形態ダイナミクス講座
(田坂 昌生 教授)

平成 24 年 1 月 24 日 提出

目次

目次	2
序論	4

第1章

シロイヌナズナ *ZIG/VTI11* 機能欠損変異を抑圧する

レトロマー機能欠損変異体の分子遺伝学的解析

序論	7
材料と方法	11
結果	17
考察	26

第2章

シロイヌナズナ花茎の重力屈性に関与する

SHOOT GRAVITROPISM6 の分子遺伝学的解析

序論	33
材料と方法	37
結果	42

考察	52
結語	57
謝辞	58
引用文献	59
図と表	68

序論

真核生物の細胞内には多種類の単膜系オルガネラが存在する。このうち、酵母、植物細胞における液胞、動物細胞におけるリソソームは酸性オルガネラであり、内腔の加水分解酵素によって細胞内物質の分解が行われる。液胞/リソソームはその代謝機能から、単に“細胞が生む不用物の分解の場”と長い間みなされてきた。しかしながら、近年の液胞/リソソームの機能解析の進展により、液胞/リソソームが輸送タンパク質の選別、pH やイオンの恒常性維持、オートファジーといった多様な細胞機能にも関与することが示された (Li and Kane, 2009)。さらに、植物の液胞に関しては、細胞内空間の充填、分子の貯蔵等の細胞レベルの機能のみならず、胚発生や成長、老化、防御応答といった高次の生理機能においても重要な役割を果たすことが明らかになってきている (Surpin and Raikhel, 2004; Oda et al., 2009)。

高等植物細胞の液胞は、細胞が分化し始めるにつれて形成される。まず、トランスゴルジ網 (trans Golgi network; TGN) から出芽した膜小胞や小胞体の一部が互いに融合し、液胞の前駆体ができる。さらに、小胞体で合成されたタンパク質や脂質が液胞の前駆体へ運ばれることで、成熟した液胞が形成されると考えられている。植物の様々な組織、器官の細胞において、成熟した液胞は細胞体積の 80~90% を占める。この中央液胞は、膜が内側に陥入してできたバルブ状やシート状の構造を持ち、これらの構造は形態を変えながら内腔内をダイナミックに動く。

酵母において、1980 年代を中心に細胞内小胞輸送や液胞の形態形成に関わる因子の大規模なスクリーニングが行われ、多数の *Vps* (*vacuolar protein sorting*)、*Vam* (*vacuole morphology*) 等の遺伝子が同定された (Bowers and Stevens, 2005)。また、動物においては、神経細胞末端における情報伝達の分子機構の解明を一つの目的にウシの脳由来の膜画分について生化学的解析が行われ、SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) 等の膜融合に関与する因子が同定された (Söllner et al., 1993; Jahn and Scheller, 2006)。その後、高等植物ゲノムの解読以降に行われた逆遺伝学的解析により、高等植物細胞の液胞へ至る小胞輸送経路には、酵母や動物においてすでに同定されていた因子のオルソログが関与していることが明らかになった (Zouhar and Rojo, 2009)。興味深いことに、高等植物のゲノムにおいて、これらの因子の多くは重複し、それぞれにパラログ遺伝子が複数存在する (Rutherford and Moore, 2002; Sanderfoot, 2007)。高等植物細胞の液胞へ至る小胞輸送経路には、酵母や動物細胞には見られない高等植物細胞固有の経路が

存在することから (Müntz, 2007)、パラログ遺伝子の個々の機能を遺伝学的に解析することで、酵母や動物細胞より多様で複雑な高等植物細胞の小胞輸送系の分子基盤ならびにその高次機能との関連性を明らかにできることが期待された。しかしながら、パラログ遺伝子間の機能重複のため単独変異では表現型が出ず、従来の順遺伝学的手法ではパラログ遺伝子の個々の機能を解析することは難しいという課題が生じた。一方、バルブやシートといった液胞膜の動的構造もまた酵母/動物の液胞/リソソームには見られない植物液胞特有のものである。したがって、これらの液胞膜の動的構造について遺伝学的知見が得られれば、植物液胞の特異性を支える分子基盤、さらにはこれらの構造の高次機能における未知の役割を明らかにできる可能性が考えられた。しかしながら、現在のところ、バルブやシートの形成、維持に関与する因子についての遺伝学的知見は極めて少ない。この理由として、植物における液胞の重要性のため、その構造形成、維持に関与する因子は胚発生やそれ以降の生育に必須であり、そのような因子の遺伝子破壊による機能解析は不可能であることが推測された。

そこで私は、高等植物のゲノムにおいて重複する小胞輸送関連因子のパラログの個々の機能や、植物液胞に特異的な構造の形成、維持に関与する因子を探るため、シロイヌナズナの花茎の重力屈性を指標として単離された因子の分子遺伝学的解析を行った。まず、第 1 章では、シロイヌナズナの形態と花茎の重力屈性に異常を示す *zigzag-1* (*zig-1*) の抑圧効果を指標としてそのサプレッサーである *zig suppressor3* (*zip3*) を解析することで、ゲノム中で重複するパラログ遺伝子間で *zig* 変異抑圧に関する遺伝学的機能に差が存在することを示した研究成果を報告する。第 2 章では、シロイヌナズナの花茎の重力屈性に異常を示す *shoot gravitropism6* (*sgr6*) の解析を通して、*SGR6* が液胞膜の動的構造の形成/維持に関与する新規因子である可能性を示した研究成果を報告する。

第 1 章

シロイヌナズナ *ZIG/VTI11* 機能欠損変異を抑圧する レトロマー機能欠損変異体の分子遺伝学的解析

序論

様々な高等植物の全ゲノムが解読されたのち、酵母や動物細胞の遺伝学および生化学的解析から得られた知見をもとにしてゲノム配列が解析され、高等植物のゲノム中で推定上の小胞輸送関連因子の多くが重複し、それぞれにパラログ遺伝子が複数存在することが明らかになった。例えば、高等植物のゲノムにおいて、小胞膜と標的オルガネラ膜の特異的な融合を仲介する SNARE の遺伝子数は、酵母や動物と比較してかなり多い (Bock et al., 2001; Lipka et al., 2007)。このことは、高等植物が発生過程や組織、器官に応じて個々のパラログ遺伝子を特異的に機能させることで、植物特有の環境適応能力や形態形成機能を獲得してきた可能性を示唆する。しかしながら、ゲノム中で重複するパラログ遺伝子の個々の機能、さらに他のパラログ遺伝子や他の小胞輸送関連遺伝子との関連性などはほとんど明らかにされていない。そのような中で、形態と重力屈性を指標とした分子遺伝学的解析から、シロイヌナズナのゲノム中で重複する SNARE 因子やそれに機能的に関連する因子の個々の機能が少しずつ明らかになってきている。

本研究室において、重力屈性の研究過程で単離されたシロイヌナズナ変異体 *zigzag-1* (*zig-1*) は、花茎と胚軸の重力屈性に加え、花茎とロゼット葉の形態にも異常を示す (Yamauchi et al., 1997; Kato et al., 2002)。*zig* の原因遺伝子は Qb-SNARE VPS10 interacting 11 (VTI11) をコードし、*zig* 変異体の中で VTI11 は機能を欠損している (Kato et al., 2002)。ZIG/VTI11 は出芽酵母 Qb-SNARE Vti1 のオルソログである。Vti1 はゴルジ体から液胞への順行輸送に関与する (vonMollard et al., 1997)。シロイヌナズナ VTI11 は酵母 *vti1* 変異株において、液胞への輸送異常を一部相補できる。また、VTI11 はシロイヌナズナの根においてトランスゴルジ網 (trans-Golgi network; TGN) および液胞前区画 (prevacuolar compartment; PVC) に局在し (Zheng et al., 1999)、培養細胞において TGN, PVC および液胞に局在する (Uemura et al., 2004) (図 1)。以上の知見より、シロイヌナズナにおいて、ZIG/VTI11 は TGN から PVC/液胞への順行輸送経路で機能することが示唆される。シロイヌナズナの花茎は、外側から 1 層の表皮、3, 4 層の皮層、1 層の内皮が、維管束を含む中心柱を同心円状に取り囲んだ構造をしている (図 2A)。このうち内皮細胞は、花茎における重力感受細胞である (Morita, 2010)。*zig* 変異体の内皮および皮層細胞において液胞膜構造に異常が観察されたことから (Morita et al., 2002)、ZIG/VTI11 が小胞輸送による正常な液胞形成を介して形態形成や重力屈性などの高次の生理機能に関与していることが示唆された。

一方、*sgr3-1* は花茎の形態には異常を示さないが、重力屈性に異常を示す劣性変異体である (Yano et al., 2003)。この変異体内では Qa-SNARE SYP22/VAM3 に 1 アミノ酸置換が起こっていた。野生型 SYP22 は PVC および液胞に局在し、VTI11 および Qc-SNARE SYP51 と複合体を形成する (Sato et al., 1997; Sanderfoot et al., 1999; Sanderfoot et al., 2001) (図 1)。しかしながら、*sgr3* 型 SYP22 ではこの複合体形成能が低下していた。また、*sgr3-1* 変異体内では内皮細胞の液胞膜構造に異常が観察されたことから (Yano et al., 2003)、内皮細胞における SYP22 の介する小胞輸送が液胞形成や重力屈性に重要であること示唆された。

以上の研究を契機として、高等植物細胞の小胞輸送の分子ネットワークを明らかにするため、形態および重力屈性を指標として VTI11 機能欠損による *zig* の表現型を抑圧するサプレッサーのスクリーニングが行われ、独立した 4 系統が単離、解析されてきた (新濱 博士論文 2005)。その一つである *zig suppressor 1 (zip1)* は *zig-1* 変異体の表現型を野生型並みに回復させる優性変異であり、その原因は VTI11 のパラログの一つである VTI12 に起きた 1 アミノ酸置換だった。

VTI12 は VTI11 と 60% の相同性を持つが、機能は VTI11 と異なっている。まず、酵母 *vti* 変異体の輸送異常相補の活性に違いが見られた。酵母においては、以下の 3 つの液胞への輸送経路が明らかにされている。①ゴルジ体から PVC を経由して液胞へ至るカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) 経路、②ゴルジ体から PVC を経由せずに液胞へ至るアルカリフォスファターゼ (ALP) 経路、③細胞質から液胞へ至る Cvt (cytosol-to-vacuole) 経路である (図 3)。酵母 *vti1* 変異株はこれらの輸送経路全てに異常を示す。VTI11 はこの変異株の CPY 経路の輸送異常を相補する (Zheng et al., 1999)。一方、VTI12 は ALP 経路と Cvt 経路の輸送異常を相補する (Zheng et al., 1999)。また、両者は細胞内局在および複合体形成パートナーとなる SNARE も異なる。シロイヌナズナ培養細胞において、VTI12 は主に TGN に局在し、一部は PVC および細胞膜にも局在する (Uemura et al., 2004)。また、VTI12 は TGN において SYP41 および SYP61 と複合体を形成し、SYP22 とはほとんど複合体を形成しない (Bassham et al., 2000; Sanderfoot et al., 2001) (図 1)。一方、*zig-1* 変異体において VTI12 を過剰発現させると *zig* の表現型をある程度相補することから (Surpin et al., 2003)、これら 2 つのタンパク質の機能の一部は重複していると考えられる。

zip1 zig-1 変異体内において、*zip1* 型 VTI12 と、VTI12 の本来の結合パートナーではない SYP22 との結合能が野生型より上昇していた。さらに、シロイヌナズナ培養細胞において野生型 VTI12 が主に TGN に局在するのに対し、*zip1* 型 VTI12 は液胞にも局在を示した (Niihama et al., 2005)。以上の結果から、*zip1 zig-1* 変異体内において、VTI12 は *zip1* 変異を持つことで VTI11 の主な局在部

位である PVC/液胞に局在を変化させ、VTI11 の本来の結合パートナーである SYP22 と結合し、VTI11 の機能を代替することで *zig* の表現型を抑圧したと示唆された。

VTI12 単独変異は明確な表現型を持たず、VTI11 との二重変異は胚性致死をもたらすことから、VTI12 の遺伝子破壊による解析は難しい。ところが、形態と重力屈性に明確な表現型を持つ *zig* のサプレッサーとして *zip1* を解析することで、VTI12 のような遺伝子破壊だけでは機能解析が困難な因子の分子遺伝学的解析が可能になった。このことから、*zig* の他のサプレッサーを個々に解析することで、胚発生やそれ以降の生育に必須な因子の遺伝学的機能、特に *zip1* の場合のようにパラログ遺伝子間の機能の重複度を明らかにできると期待された。

本研究で扱う *zig suppressor3 (zip3)* は、*zig-1* 変異体の花茎とロゼット葉における形態異常を部分的に抑圧することが示されている (高橋 修士論文 2004)。また、マップベースクローニングの結果、*zip3-1 zig-1* ゲノムにおいて *At2g17790* 遺伝子に 1 塩基置換によるナンセンス変異が見つかった (図 4)。データベースによると、*At2g17790* は yeast *VPS35* と似ていると記されている。出芽酵母の *vps* 変異株は、CPY のゴルジ体から液胞への輸送に異常を示す変異株であり、約 70 種あると報告されている (Bowers and Stevens, 2005)。CPY は小胞体で前駆体として新生されたのち、ゴルジ体で CPY の選別受容体である Vps10p と結合する (Marcusson et al., 1994; Cereghino et al., 1995; Cooper et al., 1996)。Vps10p は輸送因子の仲介により小胞に取り込まれ、ゴルジ体から PVC へ輸送される。PVC に輸送されると CPY と Vps10p は解離し、CPY は液胞へ送られる。一方、Vps10p は PVC でレトロマー複合体 (Retromer complex) の仲介を受けてゴルジ体へ逆行輸送 (retrograde transport) され、ゴルジ体で再び選別受容体として働く (Seaman et al., 1997) (図 5)。多数の *Vps* のうち *Vps35*, *29*, *26*, *5*, *17* は Vps10p の逆行輸送に関与し、いずれかが機能を欠損すると、Vps10p は PVC で CPY と解離したのち液胞へ送られ、そこでタンパク質分解を受ける。したがって、小胞体で新生された CPY は、ゴルジ体で Vps10p による選別輸送を受けることができない。このため、CPY は前駆体の状態で細胞外へ誤って分泌される (Horazdovsky et al., 1997; Nothwehr and Hinds, 1997; Seaman et al., 1998; Reddy and Seaman, 2001)。

Vps35, 29, 26, 5, 17p はレトロマー複合体の構成因子であり、可溶性あるいは膜表在型タンパク質である。このうち Vps35p, Vps29p, Vps26p が複合体の大サブユニットを、Vps17p, Vps5p が小サブユニットを形成する。大サブユニットは PVC 膜上で Vps10p のような積荷タンパク質の細胞質ドメインを認識する。このようにして、レトロマーの大サブユニットは、ゴルジ体への逆行輸送の積荷選別過程で機能する (Seaman et al., 2005) (図 6)。

レトロマーの構成因子は進化的に高度に保存されおり (Haft et al., 2000)、その機能は酵母と動物間で類似している。一方、高等植物に関しては、近年シロイヌナズナのゲノム情報に基づいて推定上のレトロマー構成因子が報告された (Oliviusson et al., 2006)。しかしながら、シロイヌナズナにおいては Vps10p 受容体のような積荷タンパク質やそのリガンドについての知見が乏しく、レトロマーの逆行輸送における機能、さらに、高次機能と結びついた形での逆行輸送の役割に関しては未解明な部分が多い。シロイヌナズナのゲノムには、*VPS35* のパラログが他の生物より多く存在する (表 1)。近年、シロイヌナズナ *VPS35* の分子遺伝学的解析がなされ、*VPS35* の 3 つのパラログ間で遺伝学的機能が重複することが示された (Yamazaki et al., 2008)。しかしながら、*VPS35* や他の構成因子のパラログ間で機能に差があるのかはわかっていない。そこで私は、酵母から動植物に至るあらゆる生物のゲノム中に高度に保存されているレトロマーが高等植物の高次の生理機能において果たす役割と各パラログの機能を明らかにすることを目的に、*zig* 変異抑圧効果を指標とした *zig suppressor3* とレトロマー構成因子の分子遺伝学的解析を行った。

材料と手法

植物材料と生育条件

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. の Columbia (Col) 系統を野生型として用いた。 *zig-1/sgr4-1* も Col 系統である。 *zip3-1 zig-1* 二重変異体は EMS 処理した *zig-1* の種子由来 M2 世代から選抜された (新濱 修士論文 2002)。

5% 次亜塩素酸ナトリウム中で 10 分間滅菌した種子を Murashige-Skoog (MS) 寒天培地 (4.65g/L MS 培地用混合塩, 0.5% [w/v] Gellan Gum, 1% [w/v] sucrose, 0.01% [w/v] myo-inositol, 0.05% MES-KOH [pH5.7]) に播種し、春化处理として 2 日間、4°C に静置した。発芽後およそ 10 日目の芽生えを土に移植した。その際、バーミキュライト(ニッタイ)と Metromix G550 (SUN GRO HORTICULTURE) を 5 : 2 の体積比で混合した土壌の上にパーライト I 型を薄く敷いたものを用いた。全ての生育条件は 23°C、連続白色光である。

アグロバクテリウムによる形質転換

植物体への形質転換には Floral dip 法を用いた (Clough et al., 1998)。15 μ g/ml カナマイシン、15 μ g/ml ゲンタマイシンを含む LB 液体培地中でアグロバクテリウム (MP90) を約 24 時間振とう培養し、遠心にて集菌した。この菌体を感染用培地 (5% sucrose、0.001% benzylaminopurine, 0.05% Silvet L-77) で懸濁し、さやを取り除き蕾のみにした植物体 (発芽後 5 週目) に感染させた。約 24 時間ラップで密閉したのち、上述と同様の条件下で生育させた。

花茎重力屈性の測定

茎が 4~8cm に抽苔した植物体を 23°C で 1 時間静置したのち、ポットごと水平方向に倒して重力刺激を与えた。これを 0 分とし、その後 10 分毎に 10 時間、植物体の花茎をデジタルカメラ IXY DIGITAL 500 (Canon) でタイムラプス撮影した。その後、ImageJ にて花茎の屈曲角度を測定した。

花茎切片の作成

4~8cm に伸長した花茎の茎頂から約 2~3cm の部分を試料とした。重力方向を保持した状態でこの試料を 4% [w/v] paraformaldehyde (PFA) に浸し、氷上、減圧条件下で 1 時間固定処理した。その後、エタノールの希釈系列に順次移して脱水処理を行い、Technovit 7100 (Heraeus Kulzer) を用いて包埋した。ミクロトームを用いて固形サンプルから厚さ 4 μ m の縦断切片を作成し、0.5% トルイジンブルーで染色した。これを冷却 CCD カラーカメラ VB-6010

(KEYENCE)を設置した蛍光顕微鏡 ECLIPSE E800 (Nikon)で観察、画像撮影した。

ゲノム DNA の抽出

MS 寒天培地上で生育させた芽生えの子葉を 50 μ l の DNA extraction buffer (200mM Tris-HCl [pH7.5], 250mM NaCl, 25mM EDTA [pH8.0], 0.5% [w/v] SDS)中でホモジェナイズした。100 μ l の 100%エタノールを添加し、4°C、15,000rpm で 5 分間遠心した。沈澱物を乾燥させたのち、50 μ l の TE buffer (10mM Tris-HCl [pH8.0], 1mM EDTA [pH8.0])に溶解した。

T-DNA 挿入位置の確認

鉢植えで生育させた植物体のロゼット葉を 200 μ l の CTAB buffer (100mM Tris-HCl [pH8.0], 1.4M NaCl, 20mM EDTA [pH8.0], 3% cetyl trimethyl ammonium bromide, 0.2% [v/v] 2-mercaptoethanol)中でホモジェナイズし、65°Cで 20 分間静置した。200 μ l のクロロホルムを添加し攪拌した後、室温、6000rpm で 5 分間遠心した。水層を別の 1.5ml 遠心チューブに移し、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH5.2)および 2 倍量の 100%エタノールを添加し、攪拌した。室温で 10 分間静置した後、4°C、15,000rpm で 15 分間遠心した。上清を取り除き、400 μ l の 70%エタノールを添加し、4°C、15,000rpm で 5 分間遠心した。上清を取り除き、沈澱物を 55°Cで 5 分間乾燥させた。その後、沈澱物を 50 μ l の TE buffer (10mM Tris-HCl [pH8.0], 1mM EDTA [pH8.0])に溶解した。得られたゲノム DNA を鋳型とし、以下に記すプライマーを用いて各遺伝子のゲノム断片を増幅した。得られたゲノム断片を鋳型とし、ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems)にて塩基配列解析を行った。

VPS35B (At1g75850):

SALK_014345 (*vps35b*)

SALK-LB 5'-CCCGTCTCACTGGTGAAAAG-3'

AtVPS35a-R1 5'-CTTCTTAAGAAGCCTTGCTGAG-3'

VPS35A (At2g17790):

SALK_039689 (*zip3-3*)

SALK-LB 5'-CCCGTCTCACTGGTGAAAAG-3'

zip3-cR1 5'-CTCCACAAGTTACAGACCATG-3'

SALK_125271 (*zip3-4*)

SALK-LB 5'-CCCGTCTCACTGGTGAAAAG-3'

AtVPS35a-R1 5'-ACAGTTGCTTAACACATGATCC-3'

VPS35C (At3g51310):

SALK_099735 (*vps35c*)

SALK_099733/5-F 5'-TTGTCTTTTCCGCGCTCAAG-3'

SALK-LB 5'-CCCGTCTCACTGGTGAAAAG-3'

VPS26B (*At4g27690*):

SALK_142592 (*vps26b*)

SALK-LB 5'-CCCGTCTCACTGGTGAAAAG-3'

AtVPS26b-R1 5'-AGTTAGTTGCATTTAGAGATTTGG-3'

VPS26A (*At5g53530*):

GABI_053c12 (*vps26a*)

pAC16 PCR 5'-CCCATTTGGACGTGAATGT-3'

VPS26a-R1 5'-TTGGCTAGTGTTTCTGTTTCGACG-3'

VPS29 (*At3g47810*):

maigo1-1

AtVPS29-2.1F 5'-TAAGCTTAACATATTTTTGACTGTTGTAG-3'

TR-1(RB) 5'-CGTCAGTGGAGCATTTTTGACAAG-3'

RNA の抽出および RT-PCR

液体窒素で凍結した芽生えあるいは花茎を Tissue Lyser (QIAGEN) で粉砕処理した。この試料から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) のマニュアルに従って RNA を抽出し、1 μ l 分光光度計 Spectrophotometer ND-1000 (Nano Drop) を用いて定量した。得られた RNA 1 μ g を DNase (Invitrogen) で処理し、Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) のマニュアルに従って逆転写反応を行った。得られた cDNA を滅菌済みのミリ Q 水で 3 倍希釈したのち、PCR 反応の鋳型として 1 μ l を使用した。

T-DNA 挿入系統における mRNA の発現確認

上述の方法により、各変異体の芽生えから RNA を抽出した。この RNA を用いて RT-PCR 反応を行い、得られた cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。コントロールとして *ACT8* 遺伝子を用いた。

***vps35b*:**

cAtVPS35b-F2 5'-AAGAGTTCTTCTCTGTTTAAGACG-3'

cAtVPS35b-R2 5'-TGTGTCTCGGATTTAAGTCACAGC-3'

***vps35c*:**

cAtVPS35c-F2 5'-ATTCTGCAAGACTCCTAAGGAAGC-3'

cAtVPS35c-R2 5'-TCTTCTTGCTGTCTCTGAAACTCG-3'

***vps26b*:**

cAtVPS26b-F1 5'-ATTACGCTCTTAACATCAGCTTGG-3'

cAtVPS26b-R2 5'-ATCTGAGTACACAAAGTCTAAAGC-3'

vps26a:

cAtVPS26a-F1 5'-GTCTCTCTCCGATTGAAATAAACC-3'

cAtVPS26a-R2 5'-TGCATACAGAAAGTCTTGAAAAGG-3'

ACT8:

ACT8 Df 5'-GAGAGATTCAGGTGCCAG -3'

ACT8 Dr 5'-AGAGCGAGAGCGGGTTTTCA -3'

SCRpro: VPS35/zip3-1 zig-1 形質転換体の作成

花茎由来の total cDNA を鋳型として *VPS35A*, *B*, *C* の cDNA 断片を増幅した。用いたプライマーは以下の通りである。

VPS35B:

cAtVPS35B-F3 5'-cttGGATCCATGAGAACGCTCGCCGGAGTAG-3'

cAtVPS35B-R5 5'-cttGGATCCTCACAGCTTGATAGGGTCATA-3'

VPS35A:

cAtVPS35A-F 5'-gttCCCGGGATGATCGCAGACGGATCAGA-3'

cAtVPS35A-Rns 5'-gttCCCGGGTACTTTGATCGCCTGGTATC-3'

VPS35C:

cAtVPS35C-F3 5'-cttGGATCCATGATCGCCGACGACGATGAG-3'

cAtVPS35C-R3 5'-cttGGATCCTCATTCAAACCATTCCATTTTG-3'

得られた cDNA 断片を ZERO Blunt TOPO PCR cloning kit(Invitrogen)の pCR-Blunt II -TOPO ベクターにクローニングした。その後、すでに *SCARECROW(SCR)* プロモーターが挿入してある pBI300 バイナリーベクターの MCS (multi cloning site) に BamHI あるいは KpnI サイトを用いて cDNA 断片を挿入した。このバイナリーベクターを熱処理によりアグロバクテリウムに形質転換し、上述の方法で *zip3-1 zig-1* 二重変異体に形質転換した。

SCR:proVPS35/zip3-1 zig-1 形質転換体における trans gene 由来の mRNA の発現確認

上述の方法により、各形質転換体の花茎から抽出した RNA を用いて RT-PCR 反応を行い、得られた cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。コントロールとして *ACT8* 遺伝子を用いた。用いたプライマーは以下の通りである。

VPS35B:

pSCR(-30)D 5'-TCTTACCTTATTTATAACCTAGGC-3'

cAtVPS35b-R1 5'-GATACATTCTGGGCAATATGTTGC-3'

VPS35A:

pSCR(-30)D 5'-TCTTACCTTATTTATAACCTAGGC-3'

AtVPS35a-R2 5'-ATACAGTCTATTAGGTAATATTGG-3'

VPS35C:

pSCR(-30)D 5'-TCTTACCTTATTTATAACCTAGGC-3'

cAtVPS35c-R1 5'-ATTCATGTGTGCATCACCATCTCC-3'

タンパク質の抽出

芽生え、あるいはさやを除いた植物体 0.5g を 10ml の IP buffer (50mM HEPES-KOH [pH6.5], 10mM KOAc, 100mM NaCl, 5mM EDTA [pH8.0], 400mM sucrose) と 10 μ l の PROTEASE INHIBITOR COCKTAIL(PIC) (SIGMA)の混合液中で、乳鉢を用いて氷上で破碎した。この破碎液をミラクロスで濾しながら 50ml 遠心チューブに移し、4°C、10,000rpm で 30 分遠心した。上清を捨て、沈澱を 1% (v/v) TritonX-100 を含む IP buffer 1ml で懸濁した。さらに 5 μ l の PIC、50 μ l の PreserveX-QML Polymeric Micelles (QBI Life Sciences)を添加し、再び懸濁した。この懸濁液を 1.5ml 遠心チューブに移し、ローテーターを用いて 4°C で 3 時間攪拌した。得られたタンパク質抽出液の濃度を BCA kit (PIERCE)を用いて測定し、植物体の株間で濃度をそろえた。

共免疫沈降法

μ MACS ProteinA MicroBeads (Miltenyi Biotec) 100 μ l と抗体 2 μ l を穏やかに混和し、ローテーターを用いて 4°C で 1 時間以上攪拌した。抗体が結合した ProteinA MicroBeads に濃度補正したタンパク抽出液を混合し、ローテーターを用いて 4°C で 4 時間以上攪拌した。 μ MACS の磁場に μ Column (Miltenyi Biotec)をセットし、1%TritonX-100 を含む IP buffer 200 μ l で洗浄した。その後、攪拌したタンパク質抽出液を μ Column に流した。このときの流出液を 1.5ml 遠心チューブにとり、ローテーターを用いて 4°C で攪拌しておいた。1%TritonX-100 を含む IP buffer 200 μ l で μ Column を 5 回洗浄したのち、冷却された 1×PBS 100 μ l で 2 回洗浄した。その後、95°C に加温した 1×SDS sample buffer (50mM Tris-HCl [pH6.8], 100mM DTT, 2% [w/v] SDS, 10% [v/v] glycerol, 0.1% BPB 適量) 20 μ l を μ Column に加えた。室温で 5 分静置したのち、さらに 95°C に加温した 1×SDS sample buffer 50 μ l を μ Column に加えた。このときの流出液を免疫沈降画分とし、全抽出液、はじめの流出液とあわせて SDS-PAGE を行った。

イムノプロット

12.5%ポリアクリルアミドゲル e-PAGEL (ATTO)に試料をアプライし、40mM の定電流で電気泳動を行った。その後、ゲル内のタンパク質を PVDF 膜 Immobilon (MILLIPORE)に TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO RAD)を用いて 10V の定電圧で転写した。この膜を適量の TBS-TM (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris-HCl [pH7.4], 0.1% [v/v] Tween20, 5% [w/v] skim milk)に移し、室温で 1 時間振とうし、ブロッキングを行った。膜を適量の TBS-T (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris-HCl [pH7.4], 0.1% [v/v] Tween20)に移し、室温で 10 分間振とうした。これを 3 回繰り返す、膜を洗浄した。TBS-TM に適量の一次抗体(抗 SYP22/VAM3 ウサギ抗体: 1/10000, 抗 VTI12 ウサギ抗体: 1/2000, 抗 VPS35B ウサギ抗体: 1/3000)を添加したものと膜をハイブリバックに封入し、室温で 2 時間振とうした。その後、ブロッキング後と同様に膜を洗浄した。TBS-TM に適量の二次抗体 (HRP-linked 抗ウサギロバ抗体 [Amersham Biosciences]: 1/10000)を添加したものと膜をハイブリバックに封入し、室温で 1 時間振とうした。その後、ブロッキング後と同様に膜を洗浄した。バンドの検出には ECL Plus (GE Healthcare Bio-Sciences)を使用した。luminescent image analyzer LAS-1000 (FUJIFILM)を用いて化学発光画像を取得し、Scion Image にてバンドの濃さを定量した。抗 SYP22 ウサギ抗体は京都府立大学の佐藤雅彦博士より、抗 VTI12 ウサギ抗体は University of California, Riverside の Natasha Raikhel 博士より、抗 VPS35B ウサギ抗体は京都大学の西村いくこ博士より分与していただいたものを使用した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察

4~8cm に伸長した花茎の茎頂から約 2~3cm の部分を試料とした。この試料を阪口らの方法に従って縦切りにし (阪口 修士論文 2005)、適量の 0.1% agar を含む MS 液体培地 (1×MS, 1% sucrose)とともにカバーグラスに封入した。*pSCR::GFP-γ TIP* 形質転換体の蛍光観察には共焦点レーザー走査顕微鏡 Fluoview FV1000 (OLYMPAS)を用いた。GFP、RFP をそれぞれ 488nm 光、543nm 光で励起し、GFP 蛍光には 500~520nm、RFP 蛍光には 590~620nm、アミロプラスト自家蛍光には 650~750nm の吸収フィルターを用いた。

結果

***zip3* は *zig-1* の形態と重力屈性における異常を部分的に抑圧する。**

zip3-1 変異は、*zig-1* 変異体の花茎がジグザグな形状になる異常と第二メタマ一の伸長が減少する異常を部分的に回復させることが示されている (高橋 修士論文 2004; 図 7)。そこで、花茎の重力屈性に関して *zip3-1* による *zig* 変異抑圧の程度を定量的に評価した。植物体を 90 度水平に倒して重力刺激を与え、花茎の屈曲角度を 30 分毎連続 10 時間測定した (図 8)。野生型の花茎は重力刺激後約 90 分で 90 度まで屈曲した。その後、約 150 分で 120 度まで屈曲し、約 300 分で 90 度の屈曲に収束した。*zig-1* の花茎は重力刺激後 10 時間でもほとんど重力屈性を示さなかった。*zip3-1* の花茎は重力刺激後約 120 分で 90 度まで屈曲し、その後、野生型のように 90 度以上屈曲することはなく、ほぼ 90 度の屈曲を維持した。一方、*zip3-1 zig-1* の花茎は重力刺激後徐々に屈曲し、約 420 分で 90 度まで屈曲した。その後、90 度以上屈曲することはなく、10 時間後も 90 度のままだった。これらの結果は、*zip3-1* は *zig-1* の花茎の重力屈性異常を部分的に抑圧することを示している。

***ZIP3* は *At2g36810* である。**

zip3-1 は劣性の *zig* 抑圧変異であることが示されている (高橋 修士論文 2004)。*zip3* の原因遺伝子を同定するためマップベースクローニングが行われ、*zip3-1 zig-1* 二重変異体のゲノムにおいて *At2g17790* 遺伝子の第 1 エキシソンの 36 番目の G が A に置換していることがわかっている (高橋 修士論文 2004; 図 4)。この 1 塩基置換により 12 番目のトリプトファン (TGG) が終止コドン (TGA) へ変化することが予想された。シロイヌナズナデータベース TAIR のアノテーションによると、*At2g17790* は yeast *VPS* (*vacuolar protein sorting*) *35* と相溶性が高い。

ZIP3 遺伝子が *At2g17790* であることを確認するため、まず、アレル変異体の表現型解析を行った。本研究室では、*zip3-1* と同じスクリーニングから多数の *zig* suppressor candidate (SC) が単離されている (新濱 博士論文 2005)。その 1 つである SC86-1 は形態および重力屈性における表現型が *zip3-1 zig-1* と類似していたため、SC86-1 のゲノムを用いて *At2g17790* のシークエンス解析を行ったところ、第 6 エキシソンの 10 番目の C が T に置換していることがわかった (図 9A)。この 1 塩基置換により 200 番目のアルギニン (CGA) が終止コドン (TGA) へ変化することが予想された。したがってこの SC86-1 を *zip3-2 zig-1* とし、形態観察および重力屈性測定を行ったところ、*zip3-1 zig-1* 様の表現型を示

した (図 9C, F)。次に、*At2g17790* の第 9 イントロンに T-DNA が挿入された系統 SALK_039689 と、第 19 エキソンに T-DNA が挿入された系統 SALK_125271 を入手し、それぞれの挿入を確認した (図 9A)。これらの T-DNA 挿入系統をそれぞれ *zip3-3*, *zip3-4* とし、*zig-1* との二重変異体を作成した。得られた F3 世代について形態観察および重力屈性測定を行ったところ、*zip3-1 zig-1* 様の表現型を示した (図 9D-F)。また、*zip3* アリルの単独変異体は野生型とほぼ同様の表現型を示すことを確認した (図 10)。

次に、*zip3-1 zig-1* の相補性試験を行った。*At2g17790* の ORF (open reading frame) および開始コドンから上流約 1.4kb の予想プロモーター領域を含む全長約 7.2kb のゲノム断片 (図 4) を *zip3-1 zig-1* 二重変異体に形質転換した。得られた T2 世代は全て *zig* 単独変異体と同様の形態を示すことを目視により確認した (一例を図 11A に示す)。また、T2 世代独立 8 系統について重力屈性測定を行ったところ、*zig* 単独変異体と同様の表現型を示した (図 11B)。

以上の結果より、*zip3* の原因遺伝子は *At2g17790* であると結論できる。

***zip3* は VPS35A の機能欠損変異である。**

zip3 変異が VPS35A タンパク質の発現に影響を与えているかを確認するため、*zip3* アリル変異体からタンパク質を抽出し、抗 VPS35A 抗体を用いてイムノブロット解析を行った。この抗体は VPS35A の N 末端側約 2/3 の領域を抗原として作成されたポリクローナル抗体である。解析の結果、いずれのアリルにおいても野生型と同じ分子量を持つ VPS35A タンパク質が発現していなかった (図 12)。また、このバンドより分子量が小さく、なおかつ *zip3* アリルでのみ見られるものは検出されなかった (data not shown)。VPS35A の最も N 末端側の変異は *zip3-1* (W12→STOP) であるが、*zip3-1 zig-1* の表現型は、他のアリルと *zig-1* との二重変異体のものとほぼ同じであった (図 9)。これらのことから、いずれのアリルも VPS35A の機能欠損変異であると考えられる。

***zip3* は *zig-1* の内皮細胞におけるアミロプラストの局在異常を回復させる。**

花茎の重力感受細胞である内皮細胞にはデンプンを高度に蓄積したプラスチドであるアミロプラストが多数含まれ、アミロプラストは細胞の下部に蓄積している (図 2B)。一方、*zig-1* では、アミロプラストは細胞の上下に偏在している (Morita et al., 2002)。このように、内皮細胞のアミロプラストの重力方向への沈降と重力屈性能には相関があることが示されている。*zip3* 変異が *zig* の重力屈性における異常を部分的に回復させたことから、アミロプラストの局在異常も回復させている可能性が考えられた。このことを確認するため、重力方向を保ったまま固定した花茎試料を包埋した後、縦断切片を作成し、光学顕微鏡

を用いて内皮細胞を観察した (図 13A-D)。これを重力方向に従い上部、中部、下部に 3 等分し (図 13E)、それぞれの区域におけるアミロプラストの個数を計測した (図 13F)。野生型では、ほとんどのアミロプラストが内皮細胞の下部に蓄積していたのに対し、*zig-1* では細胞の上部と下部、さらに中部に分散していた。一方、*zip3-1 zig-1* では野生型と同様、ほとんどのアミロプラストが下部に蓄積していた。また、*zip3-1* でもほとんどのアミロプラストが下部に蓄積していた。以上の結果から、*zip3* 変異は *zig-1* の内皮細胞におけるアミロプラストの局在異常を野生型並みに回復させることが明らかになった。

***zip3* は *zig-1* の内皮細胞における液胞膜構造の異常を部分的に抑圧する。**

内皮細胞は、その細胞体積のほとんどを中央液胞によって占められている。野生型において、内皮細胞内のアミロプラストはわずかな細胞質とともに液胞膜にとり囲まれている (図 2B)。しかしながら、*zig-1* においてアミロプラストは液胞膜にとり囲まれていない。また、*zig-1* の内皮細胞には野生型では見られない小胞様の異常な膜構造が存在する (Morita et al., 2002)。*zip3* の原因遺伝子が出芽酵母において PVC からゴルジ体への逆行輸送に関与する *Vps35* のシロイヌナズナオルソログ *VPS35A* と同定されたことから、*zip3* 変異が *zig-1* の細胞の液胞膜に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、*zip3-1 zig-1* の内皮細胞における液胞膜とアミロプラストとの関係について調べた。*SCR* プロモーターの制御下で GFP 融合型 γ -TIP (tonoplast intrinsic protein) を発現させ (図 14A)、内皮細胞内の液胞膜を可視化した形質転換体の野生型系統はすでに確立されている (Saito et al., 2005)。この系統と各変異体とを掛け合わせるにより、変異体背景の形質転換体を得た。これらの形質転換体の内皮細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、15 秒毎に連続 5 分間画像撮影した (図 14B-D)。定量にあたり、アミロプラストの自家蛍光を示す赤のシグナルが、GFP 蛍光を示す緑のシグナルによって丸く囲まれている場合 (図 14B, D, E 白三角)、このアミロプラストは液胞膜にとり囲まれていると定義し、液胞膜にとり囲まれているアミロプラストの個数を撮影開始 0 分で計測した。野生型では液胞膜にとり囲まれているアミロプラストの個数 (図 14F②) が全個数 (図 14F①) の約半分だったのに対し、*zig-1* ではほとんどとり囲まれいなかった。一方、*zip3-1 zig-1* では全個数の 31% のアミロプラストが液胞膜にとり囲まれていた。また、*zip3-1* では全個数の 67% のアミロプラストが液胞膜にとり囲まれていた。次に、撮影開始 0 分で見られたアミロプラストが 5 分間の観察中、細胞内でほとんど位置を変えなかった場合、このアミロプラストは動きがなかったと定義し、5 分間の観察中、動きのなかったアミロプラストの個数を計測した (図 14F③)。野生型ではほとんどのアミロプラストが動いたのに対し、*zig-1* では全てのアミロプラ

ストが動かなかった。一方、*zip3-1 zig-1*では全個数の63%のアミロプラストが動いた。また、*zip3-1*では野生型と同様、ほとんどのアミロプラストが動いた。植物細胞の液胞に見られるいくつかの液胞膜構造のうち、原形質糸(transvacuolar strand)は液胞を貫通した細い細胞質を包むトンネル状の液胞膜構造である。野生型の内皮細胞において、原形質糸の中を動くアミロプラストが観察されている(Saito et al., 2005)。そこで、5分間の観察中、原形質糸が見られた細胞数を計測した(図 14F④)。野生型では原形質糸が観察された細胞は50個中35個だったのに対し、*zig-1*では50個中5個だった。一方、*zip3-1 zig-1*では50個中29個だった。また、*zip3-1*では野生型とほぼ同数の細胞で原形質糸が観察された。最後に、5分間の観察中、異常な小胞様の構造が見られた細胞数を計測した(図 14F⑤)。野生型では小胞様構造が見られた細胞はなかったのに対し、*zig-1*では50個中13個だった。一方、*zip3-1 zig-1*では35個中6個だった。また、*zip3-1*では野生型と同様、小胞様構造が見られた細胞はなかった。以上の結果から、*zip3*変異は*zig-1*の内皮細胞における液胞膜の異常を部分的に回復させることが明らかになった。また、*SCARECROW (SCR)* プロモーターを用いて、*zip3-1 zig-1*の内皮細胞特異的に*VPS35A*を発現させた形質転換体を作成し、この形質転換体のT2世代独立8系統について、transgene由来のmRNAが発現していることを確認した(図 15A)。これら8系統について重力屈性測定を行ったところ、*zig-1*単独変異体と同様の表現型を示した(図 15B)。

以上の結果から、*zip3*変異は*zig-1*の内皮細胞における液胞膜とアミロプラスト動態の異常を部分的に抑圧することで、*zig-1*の重力屈性異常を部分的に抑圧したことが示唆される。

***zip3*はどのようにして*zig*変異を抑圧したのか？**

ZIP3 = VPS35Aの機能低下はどのようにして*zig*の表現型を抑圧したのだろうか？この点を明らかにするため、ZIG/VTI11のパラログであるVTI12に着目した。*zig-1*においてVTI12の過剰発現は*zig*の形態と重力屈性における表現型をある程度回復させた(Surpin et al., 2003)。また、最初にクローニングされた*zig*のサプレッサーである*zip1*は、*zig*の形態と重力屈性における表現型を野生型並みに回復させる優勢変異であり、VTI12に起きた1アミノ酸置換変異であった(Niihama et al., 2005)。この*zip1*型VTI12では、PVC/液胞膜上のQa-SNAREでありVTI11の本来の結合パートナーであるSYP22/VAM3との相互作用能が上昇していた。また、野生型株においてVTI11がTGN、PVC、液胞に局在するのに対し、VTI12は主にTGNに局在する(Uemura et al., 2004; 図 1)。一方、*zip1*型VTI12は本来の局在場所でない液胞にも局在した(Niihama et al., 2005)。以上の結果から、*zip1*変異によりVTI12の局在がTGNからPVC/

液胞へ移行し、VTI11 機能欠損による *zig* の表現型を相補したと示唆されている (Niihama et al., 2005)。*zip1* が *zig* の形態と重力屈性における表現型を野生型並みに回復させることから、*zip3-1 zig-1* においても VTI12 の SYP22 との相互作用能が上昇している可能性が考えられた。この可能性を検証するため、共免疫沈降法を用いて VTI12 と SYP22/VAM3 との相互作用を調べた (図 16)。ポジティブコントロールとして行った *zip1 zig-1* では、*zig-1* と比較して 2.5 倍量の VTI12 が SYP22 と共免疫沈降することが確認された。一方、*zip3-1 zig-1* では、*zig-1* と比較して SYP22 と共免疫沈降する VTI12 の量に有意な差は見られなかった (図 16B)。さらに、*zip3-1 zig-1* において、VTI12 の局在が TGN から PVC/液胞へ移行しているかを調べるため、GFP 融合型 VTI12 と RFP 融合型 ARA6 とを同時に発現する野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*、あるいは *zip3-1* 背景の形質転換体を作成した。ARA6 は、PVC/後期エンドソームと細胞膜において、小胞膜と標的膜との融合を仲介する低分子量 GTPase、Rab5 である (Saito and Ueda, 2009; Ebine et al., 2011)。ふだん細胞質中に存在し、膜の融合の際にはエンドソーム膜上/細胞膜上にリクルートされる。したがって、蛍光タンパク質と融合された ARA6 のうち、エンドソーム膜上/細胞膜上のはドット状のシグナルとして観察される (図 17B, E, H, K)。そこで、作成した形質転換体の内皮細胞を観察し、細胞 50 個について GFP、RFP シグナルのドット、および GFP と RFP のシグナルが重なったドットの個数をかぞえ、1 細胞あたりの平均値を各変異体間で比較した。その結果、*zip3-1 zig-1* において RFP (ARA6) シグナルと重なった GFP (VTI12) シグナルのドットの数、*zig-1* のものと有意な差が見られなかった (図 17M)。

レトロマー複合体の機能欠損は *zig* 変異を抑圧する。

zip3 の原因遺伝子は出芽酵母 *Vps35* のシロイヌナズナオルソログ *VPS35A* であり、出芽酵母 *Vps35p* は PVC からゴルジ体への逆行輸送に関するレトロマー複合体の構成タンパク質である。酵母や動物のレトロマー複合体の大サブユニットは *VPS35*, *VPS29*, *VPS26* の 3 つのタンパク質によって構成される。シロイヌナズナのゲノムには *VPS35*, *VPS29*, *VPS26* のオルソログがそれぞれ 3 つ、1 つ、2 つ存在する (表 1)。*zip3* 変異がシロイヌナズナ *VPS35* パラログの一つである *VPS35A* の機能欠損変異であることから、*zip3* 変異体内では *VPS35A* を構成タンパク質として含むレトロマーが機能を欠損し、このレトロマー機能欠損が *zig-1* の形態と重力屈性における異常を部分的に抑圧した可能性が考えられた。

シロイヌナズナ *VPS29* は他の多くの生物と同様に、ゲノムにおいて単一遺伝子であり、パラログは存在しない (表 1)。この *VPS29* の完全ノックアウトは致

死であるが、シロイヌナズナ *maigo1-1* (*mag1-1*) 変異体内では *VPS29* の発現が極度に低下している (Shimada et al., 2006)。もし、*zip3* 変異による *zig* 変異の部分的抑圧がレトロマーの機能低下によるならば、*mag1-1* 変異もまた *zig* 変異を抑圧することが期待される。そこで、*mag1-1* と *zig-1* の二重変異体を作成し、表現型の解析を行った。まず、*mag1-1* 単独変異体は重力刺激後 180 分で約 90 度まで屈曲し、その後 90 度の屈曲を維持した (図 18C)。90 度まで屈曲するのに野生型の 2 倍の時間がかかるが、この理由として *mag1-1* は野生型より生育が悪く、花茎の伸長速度が遅いことが考えられる (図 18A)。一方、*mag1-1 zig-1* 二重変異体は *mag1-1* と同様の重力屈性反応を示したことから (図 18C)、*mag1-1* 変異は *zig* の重力屈性における表現型を抑圧することわかった。さらに、*mag1-1 zig-1* は *mag1-1* と同様の形態を示したことから (図 18B)、*mag1-1* 変異は *zig* の形態における表現型も抑圧することがわかった。つまり、レトロマーを構成すると考えられる *VPS29* の発現が低下した *mag1-1* 変異もまた *zig* 変異を抑圧し、その抑圧効果は *zip3* 変異より強いことが示された。

シロイヌナズナの予想されるレトロマー大サブユニットの、別の構成因子である *VPS26* にはパラログが 2 つ存在する (表 1)。そこで At5g53530 を *VPS26A*、At4g27690 を *VPS26B* とした。ゲノム中で単一遺伝子である *VPS29* の発現が低下している *mag1-1* 変異が *zig* 変異を抑圧したことから、*VPS26* パラログのどちらか、あるいは両方の機能欠損変異もまた *zig* 変異を抑圧する可能性が考えられる。*VPS26* の機能欠損が *zig* 変異を抑圧するか調べるため、*VPS26A* のイントロンに T-DNA が挿入された系統 GABI_053C12 と、*VPS26B* の第 12 エキソンに T-DNA が挿入された系統 SALK_142592 を入手し、それぞれの T-DNA 挿入を確認した (図 19A)。また、これらの系統では T-DNA が挿入されている遺伝子について、mRNA が発現していないことを確認した (図 19B)。得られた *vps26a*, *vps26b* 単独変異体について表現型解析を行ったところ、野生型とほぼ同様の形態と重力屈性を示した (図 19C-E)。また、*vps26a* と *vps26b* をかけ合わせて得られた F2 種子から二重変異の遺伝子型を持つ幼植物は出現しなかった (data not shown)。このことは *VPS26* の機能が個体の生存に必須であり、*VPS26A* と *26B* はある程度機能が重複していることを示唆している。

続いてこれらの単独変異体と *zig-1* との二重変異体を作成し、表現型の解析を行った。その結果、*vps26a* 変異は *zig-1* の形態における表現型を抑圧したのに対し、*vps26b* 変異は抑圧しなかった (図 20A, B)。また、重力屈性を測定したところ、*vps26a zig-1* は重力刺激後徐々に屈曲し、約 270 分で 90 度まで屈曲し、その後 90 度の屈曲を維持した。一方、*vps26b zig-1* は *zig-1* と同様にほとんど重力屈性を示さなかった (図 20C)。これらの結果は、ゲノム中に 2 つ存在する *VPS26* パラログのうち、*VPS26A* の T-DNA 挿入変異は *zig* の形態と重力屈性

における表現型を部分的に抑圧するが、*VPS26B*の T-DNA 挿入変異は抑圧しないことを示している。

以上のように、酵母レトロマー構成因子 *Vps35*, *29*, *26* のシロイヌナズナオルソログの中で、*VPS35A*, *29*, *26A* の機能低下はいずれも *zig* 変異を抑圧した。このように 3 つのタンパク質は機能的に強い関連性を持っていることから、シロイヌナズナにおいても *VPS35A*, *29*, *26A* は複合体を形成している可能性が高い。さらには、レトロマーの機能低下が *VTI11* 機能欠損による *zig-1* の表現型を抑圧したと推測される。

vps26a 変異が *zig-1* の表現型を抑圧したため、*vps26a zig-1* において *VTI12* の *SYP22* との相互作用能が上昇している可能性が考えられた。そこで、図 16 と同様にして、共免疫沈降法を用いて *vps26a zig-1* における *VTI12* の *SYP22* との相互作用を調べた。その結果、*vps26a zig-1* において、*zig-1* と比較してこの相互作用が有意に上昇していることがわかった (図 16)。この結果より、*vps26a zig-1* において、またおそらく *zip3-1 zig-1* においても、*zig* 変異抑圧の分子メカニズムに *VTI12* が関与している可能性が示唆された。これは 21 ページで既に述べた *zip3-1 zig-1* における *VTI12* についての解析結果と一見矛盾するように見える。この点に関する考察は 27, 28 ページで記述する。

***VPS35* パラログの機能重複性の検討**

シロイヌナズナの推定上のレトロマー構成因子である *VPS26* のパラログ間で、遺伝学的機能が重複している可能性が示唆されたにもかかわらず、*zig* の表現型に対する抑圧効果に差が見られた。シロイヌナズナのゲノムには *ZIP3=VPS35A* と相同性が高いタンパク質をコードする遺伝子が *At2g17790* 以外に 2 つ (*At1g75850*, *At3g51310*) 存在する。そこで *At1g75850*, *At3g51310* をそれぞれ *VPS35B*, *VPS35C* とし、これらのパラログの間でも *zig* 変異抑圧効果に差があるか調べた。まず、*VPS35B* の第 17 イントロンに T-DNA が挿入された系統 *SALK_014345* と、*VPS35C* の第 17 イントロンに T-DNA が挿入された系統 *SALK_099735* を入手し、それぞれの T-DNA 挿入を確認した (図 21A)。また、これらの系統では T-DNA が挿入されている遺伝子について、mRNA が発現していないことを確認した (図 21B)。さらに、*vps35b*, *vps35c* 単独変異体は、野生型とほぼ同様の形態と重力屈性を示した (図 21C-E)。続いてこれらの T-DNA 挿入系統と *zig-1* との二重変異体を作成し、表現型の解析を行った。その結果、*vps35b zig-1*, *vps35c zig-1* とともに *zig-1* と同様の形態を示した (図 22A, B)。また、重力屈性を測定したところ、*vps35b zig-1*, *vps35c zig-1* とともに *zig-1* と同様、ほとんど重力屈性を示さなかった (図 22C)。これらの結果は、*zig* 変異抑圧に関する *VPS35A (=ZIP3)* 遺伝子の機能と *VPS35B* あるいは *VPS35C* 遺伝子の機能

とが異なっていることを示している。

さらに、*VPS35* パラログ間で *zig* 変異抑圧に関して機能重複が存在するかを確認するため、*zip3-1 vps35b zig-1*, *zip3-1 vps35c zig-1*, *vps35b vps35c zig-1* の3つの三重変異体を作成し、重力屈性における *zig* 変異抑圧の効果を評価した(図 23)。その結果、*vps35b vps35c zig-1* は *zig-1* と同様、ほとんど重力屈性を示さなかった。*zip3-1 vps35b zig-1* は重力刺激後 150 分でまず 30 度まで屈曲し、約 30 分間 30 度の屈曲を保った後再び屈曲し始め、10 時間後には 80 度まで屈曲するという重力屈性を示した。*zip3-1 vps35c zig-1* は重力刺激後徐々に屈曲し、約 300 分で 90 度まで屈曲し、その後 90 度の屈曲を維持した。

以上の結果をまとめると次のようになる。① *vps35b* と *vps35c* の二重変異は重力屈性において *zig* 変異抑圧効果をほとんど示さない。② *vps35b* 単独変異は *zig* 変異抑圧効果を示さないが、*zip3-1 zig-1* 二重変異に *vps35b* が加わると、少なくとも重力刺激から 3 時間では、*zig* 変異抑圧効果が強まった。③ *vps35c* 単独変異は *zig* 変異抑圧効果を示さないが、*zip3-1 zig-1* 二重変異に *vps35c* が加わると、*zig* 変異抑圧効果が強まった。これらのことから、遺伝学的には、*VPS35* パラログが示す *zig* 変異抑圧の効果には若干の機能重複が存在し、その効果は *VPS35A* (=ZIP3) の機能欠損が最も大きく、次が *VPS35C* の T-DNA 挿入変異であり、*VPS35B* の T-DNA 挿入変異が最も小さいと考えられる。

VPS35A, B, C タンパク質間で機能の代替は可能か？

VPS35 パラログがコードする3つのタンパク質間の相同性は *VPS35A* と *35B* の間で 67.5%、*35A* と *35C* の間で 69.4%、*35B* と *35C* の間で 63.4% であり、特に N 末端領域で高い相同性を示した(図 24)。出芽酵母 *Vps35p* と相同性が高いタンパク質をコードする遺伝子をゲノム中に3つ持つ生物は、知られている限りではシロイヌナズナのみである(表 1)。これら3つのタンパク質間には機能に差があるのだろうか。*VPS35A, B, C* タンパク質間で機能の代替が可能であるかを検証するため、*SCR* プロモーターを用いて、*zip3-1 zig-1* 二重変異体の内皮細胞特異的に *VPS35B, C* タンパク質をそれぞれ発現させた形質転換体を作成した。また、これらの形質転換体の T2 世代独立 8 系統について、transgene 由来の mRNA が発現していることを確認した(図 25A, 図 26A)。続いて、内皮細胞特異的に *VPS35A, B, C* タンパク質を発現させたとき、重力屈性における *zip3* 変異の抑圧効果を相補できるか調べた。*VPS35A* (=ZIP3) タンパク質の機能と *35B* あるいは *35C* タンパク質の機能が同じであるならば、*35B* あるいは *35C* を発現させた形質転換体でも *zip3* による *zig* 変異抑圧効果が打ち消され、*zig-1* 様の重力屈性を示すことが期待された。T2 世代独立 8 系統について重力屈性を測定したところ、*VPS35A* を発現させた形質転換体は上述の通り 8 系統のいずれ

も *zig-1* 様の表現型を示した (図 15)。一方、35B を発現させた形質転換体は 8 系統のいずれも *zip3-1 zig-1* 様の表現型を示した (図 25B)。また、35C を発現させた形質転換体は 8 系統間でばらつきはあるものの、*zip3-1 zig-1* に近い表現型を示した (図 26B)。これらの結果は、*zip3-1 zig-1* の内皮細胞において、VPS35B, 35C タンパク質が 35A タンパク質と同じ機能を持つことはできないことを示している。

考察

[I] レトロマー複合体機能欠損による *zig* 変異抑圧の分子メカニズム

レトロマー複合体の機能欠損は *zig* 変異を抑圧する。

今回の研究から、*zigzag-1* (*zig-1*)の形態と重力屈性における表現型を部分的に抑圧する *zig suppressor 3* (*zip3*)が、出芽酵母 *Vps35* のシロイヌナズナオルソログ *VPS35A* の機能欠損変異であることが明らかになった (図 12)。Vps35p は出芽酵母において PVC からゴルジ体への逆行輸送に機能するレトロマー複合体の構成タンパク質である (Seaman, 2005) (図 6)。レトロマーの構成因子は酵母から動物に至る多くの生物のゲノム中に高度に保存されており (Haft et al., 2000)(表 1)、高等植物に関しては、シロイヌナズナのゲノム情報に基づいて推定上のレトロマー構成因子が報告された(Oliviussan et al., 2006)。出芽酵母のレトロマーを構成するタンパク質の機能欠損変異株はいずれも CPY の輸送異常という同じ表現型を示す(Horazdovsky et al., 1997 ; Nothwehr and Hinds, 1997 ; Seaman et al., 1997 ; Reddy and Seaman, 2001)。シロイヌナズナにおいてもレトロマー構成因子のいずれの機能欠損も同じ表現型を示すことが予想された。実際、*VPS29* の機能低下が *zig* の形態と重力屈性における表現型を抑圧し (図 18)、*VPS26A* の T-DNA 挿入変異も *zig* を部分的に抑圧した (図 20)。これらのことから、野生型において、*VPS35A*, *VPS29*, *VPS26A* の 3 つのタンパク質がレトロマー複合体の一部を構成して同様の機能を担っていると推測できる。また、酵母 Two-Hybrid 解析から、*VPS35A*, *VPS29*, *VPS26A* が物理的に結合することが報告されており (Jaillais et al., 2007)、この結果は、我々が得た遺伝学的な解析結果と矛盾しない。

それでは、レトロマーの機能低下はどのようにして *zig* の表現型を抑圧したのだろうか。野生型において、花茎の重力感受細胞である内皮細胞内のアミロプラストは細胞の下部に蓄積している。さらに、このアミロプラストの重力方向への沈降と重力屈性能には強い相関があることが示されている (Kato et al., 2002; Morita et al., 2002; Yano et al., 2003; Silady et al., 2004)。*zip3-1* による *zig-1* の重力屈性異常の抑圧が部分的であったことから、アミロプラスト局在に対する抑圧もまた部分的であると予想された。しかし、*zip3-1 zig-1* の内皮細胞においてその抑圧の度合いは予想を上回り、アミロプラストは野生型と同様の局在を示した (図 13)。一方、最近の研究からアミロプラスト沈降に関して固定試料と生細胞との間で解析結果が異なる例が見られている (Nakamura et al.,

2011)。したがって今回の場合も、固定試料を用いたアミロプラストの局在解析のみでは *zip3-1* の *zig-1* に対する抑圧効果を正確に評価できていない可能性が考えられる。

zig-1 の重力屈性異常の原因は内皮細胞内の内膜構造の異常と関係することが示されている (Morita et al., 2002; Saito et al., 2005)。生細胞を用いた観察から、野生型では、内皮細胞内の約半分のアミロプラストが液胞膜にとり囲まれているが、*zig-1* ではほとんどとり囲まれていないことが示された (図 14F②)。一方、*zip3-1 zig-1* では、液胞膜にとり囲まれたアミロプラストの個数は野生型の 7 割程度まで回復した。また、*zig-1* の内皮細胞内では野生型には見られない小胞様の異常な液胞膜構造が存在するが (Morita et al., 2002) (図 14C)、*zip3-1 zig-1* では小胞様の異常な液胞膜構造が観察された細胞数が *zig-1* の約半分に減少した (図 14F⑤)。以上の結果から、*zip3-1* は *zig-1* の液胞膜構造を部分的に回復させることが示された。したがって、*zig* の重力屈性異常と形態異常に対する抑圧に液胞膜構造の回復が関与している可能性が考えられる。

レトロマー複合体の機能欠損による *zig* 変異抑圧の分子メカニズム

レトロマー複合体が機能を欠損するとなぜ *zig* の表現型、つまり VTI11 の機能欠損を抑圧できるのだろうか？これまでの研究から、*zig* 変異抑圧に ZIG/VTI11 のパラログである VTI12 が関与することが示されている。例えば、*zig-1* 変異体において VTI12 を過剰発現すると、*zig-1* の表現型がある程度回復する (Surpin et al., 2003)。また、*zig suppressor 1 (zip1)* 変異は VTI12 中に生じた 1 アミノ酸置換変異であり、*zig-1* の形態と重力屈性における表現型を野生型並みに回復させる優勢変異である。*zip1* 変異により VTI 12 の局在は本来の局在場所である TGN から液胞に移行しており、なおかつ *zip1* 型 VTI12 は SYP22 との相互作用能が上昇していた (Niihama et al., 2005)。さらに、SYP22 に 1 アミノ酸置換を持つ *sgr3-1* 変異体の解析から、VTI11 と SYP22 との複合体形成量は重力屈性能と相関があることが示されている (Yano et al., 2003)。これらのことから、VTI12 過剰発現あるいは *zip1* 型 VTI12 は、VTI11 非存在下で SYP22 と複合体を形成することにより VTI11 の機能を代替したことが示唆されている。このように、SNARE である VTI11 の機能欠損をそのオルソログである VTI12 が抑圧するという分子メカニズムは比較的理解しやすい。それでは、*zip3-1 zig-1* と *vps26a zig-1* の場合はどうだろうか？まず、*zip3-1 zig-1* と *vps26a zig-1* における SYP22 と VTI12 との複合体形成を *zig-1* 単独変異体と比較した。その結果、*zip3-1 zig-1* では *zig-1* と比較してこの複合体形成に有意な差は見られなかった。一方、*vps26a zig-1* では有意な差が見られた (図 16)。*vps26a zig-1* における VTI12 の SYP22 との複合体形成量の方が *zip3-1 zig-1* の

ものより大きいという結果は、*zig* 抑圧効果の差と正の相関がある。したがって、*vps26a zig-1*、またおそらく *zip3-1 zig-1* においても VTI12 が ZIG/VTI11 の機能欠損の抑圧に関与していることが示唆される。

それではレトロマー複合体が機能を欠損するとなぜ VTI12 の SYP22 との相互作用が上昇するのか？野生型において、VTI12 は主に TGN に局在し、一部は PVC と細胞膜にも局在する (Uemura et al., 2004) (図 1)。細胞内においてタンパク質は常に局在を変化させており、個々のタンパク分子が最も長く局在する部位がそのタンパク質の局在部位ととらえられる。したがって、VTI12 の局在もまた動的平衡の上に成り立っていると考えられる。つまり、VTI12 は TGN から PVC へ輸送され、さらに PVC から TGN へ逆行輸送されるが、VTI12 に対する逆行輸送の速度が順行輸送より速ければ VTI12 は主に TGN に局在しているように見える (図 27A)。このように、VTI12 が TGN と PVC の間を循環していると仮定する。ここに、レトロマー機能欠損によって PVC からゴルジ体への逆行輸送に異常が引き起こされると、SYP22 が多く存在する PVC と液胞に留まる VTI12 の絶対量が増加する (図 27C)。そして、VTI11 がなく、逆行輸送機能が低下した条件下 (*zip3-1 zig-1*, *vps26a zig-1* 背景) では、SYP22 と VTI12 が複合体を形成し、VTI11 の機能欠損を相補したというモデルが考えられる。しかしながら、GFP-VTI12 と RFP-ARA6 (PVC マーカー) とを同時に発現する形質転換体の内皮細胞を観察した結果、*zip3-1 zig-1* において ARA6 と共局在した VTI12 のドットの数、*zig-1* のものと有意な差が見られなかった (図 17)。この点に関しては、RFP-ARA6 はすべての PVC をマークするものではないため、*zip3-1 zig-1* において ARA6-positive でない PVC に VTI12 の局在が移行した可能性も考えられる。もちろん VTI12 に依存しない *zig* 変異抑圧の分子メカニズムが存在する可能性も否定できないが、*vps26a zig-1* においては *zig-1* と比較して SYP22 と共免疫沈降する VTI12 の量に有意な差が見られたことから、複数の PVC マーカーを用いて *vps26a zig-1* 背景においても上記と同様の解析を行う必要がある。

[II] シロイヌナズナレトロマー構成因子のパラログの機能

シロイヌナズナにおいてレトロマー機能は必須である。

シロイヌナズナのゲノムにおいて *VPS29* は他の生物と同様、単一遺伝子であり、*VPS29* の機能欠損は致死である (Shimada et al., 2006)。一方、*VPS35* には 3 つ、*VPS26* には 2 つのパラログが存在する。各パラログの T-DNA 挿入変異体は形態において野生型と同様の表現型を示し、重力屈性においても目立つ

た表現型を示さなかった(図 19, 21)。しかし、*VPS35* の 3 つのパラログ全てに変異を持つ遺伝子型の植物体は芽生え致死である (Yamazaki et al., 2008)。また、*AtVPS26* の 2 つのパラログ両方に変異を持つ遺伝子型の幼植物は出現しなかった (data not shown)。以上のことから、高等植物にとってレトロマーの機能は必須であり、細胞における逆行輸送が形態形成や環境適応能力に重要であることが示唆される。

シロイヌナズナレトロマー構成因子のパラログ間で遺伝学的機能に差が存在する。

VPS35, *26* それぞれのパラログの単独変異体は表現型を示さないが、3 つの *VPS35*、あるいは 2 つの *VPS26* にそれぞれ重複して変異を持つ遺伝子型の植物体は致死であることから、これらのパラログ間で遺伝学的機能が重複している可能性が考えられる。このように、高等植物の小胞輸送関連因子の多くは遺伝子重複のため単独変異では表現型が出ず、各パラログの遺伝学的解析は難しい。今回、*zig* 変異抑圧効果を指標として *VPS26* 遺伝子の機能を解析した結果、*VPS26A* の T-DNA 挿入変異は *zig* の表現型を抑圧したが、*VPS26B* の T-DNA 挿入変異は抑圧しなかった (図 20)。このことは、*VPS26* のパラログ間で *zig* 変異抑圧に関する遺伝学的機能が異なることを示している。

VPS35 の 1 つのパラログである *VPS35B* の T-DNA 挿入変異は *zig* の表現型を抑圧しなかったが (図 22)、*zip3* と *zig-1* の二重変異に *vps35b* 変異が加わると、少なくとも重力刺激から 3 時間では *zig* 変異抑圧効果が上昇した (図 23)。もう 1 つのパラログである *VPS35C* の T-DNA 挿入変異は *zig* の表現型を抑圧しなかったが (図 22)、*zip3* と *zig-1* の二重変異に *vps35c* 変異が加わると *zig* 変異抑圧効果が *vps35b* 変異の場合より大きく上昇した (図 23)。これらの結果から、*VPS35A* と *35B* あるいは *35C* とでは *zig* 変異抑圧に関する機能がわずかに重複しつつ異なることが示された。まとめると、遺伝学的な *zig* 変異抑圧効果は *VPS35A* の機能欠損が最も大きく、次が *VPS35C* の T-DNA 挿入変異であり、*VPS35B* の T-DNA 挿入変異が最も小さい。本来ならば、ゲノム中に複数存在するパラログの個々の機能を遺伝学的に解析することは難しいが、形態と重力屈性に明確な表現型を持つ *zig* の抑圧効果を指標とすることで、初めて、*VPS35* と *VPS26* それぞれのパラログ遺伝子間で遺伝学的機能に差があることが明確に示された。

シロイヌナズナレトロマー構成因子のタンパク質としての機能

シロイヌナズナにおいて重複する *VPS35* の遺伝学的機能の差は何に由来するのか？

SCR プロモーターを用いて *zip3-1 zig-1* の内皮細胞特異的に VPS35 タンパク質を発現させた解析から、VPS35A の発現は *zip3* 変異による *zig* の重力屈性異常の抑圧効果を打ち消すことが示された (図 15)。この VPS35A を発現させた形質転換体の内皮細胞ではおそらく VPS35A を含むレトロマー複合体が機能し、*zig* の状態に戻ったと考えられる。また、*SCR* プロモーター制御下で逆行輸送に十分機能しうる量の VPS35A が発現しているといえる。一方、同じプロモーターを用いて *zip3-1 zig-1* の内皮細胞特異的に VPS35B あるいは 35C タンパク質を発現させた場合、VPS35B, 35C は *zip3* 変異による抑圧効果を打ち消さなかった (図 25B, 26B)。この結果は、同じプロモーターの制御下で同程度発現させても、35B, 35C は 35A の機能を代替できないことを示している。したがって、VPS35B, 35C のタンパク質としての機能は VPS35A とは異なると考えられる。

それでは、3つの VPS35 タンパク質の機能はどのように違うのだろうか？ 出芽酵母や動物において、VPS35 は PVC 膜上で積荷タンパク質の細胞質ドメインと直接結合して選別を行い、そのゴルジ体への逆行輸送を仲介する (Seaman, 2005; Collins, 2008) (図 6)。したがって、シロイヌナズナの 3つの VPS35 間で、積荷タンパク質に対する選別能がある程度は重複しつつも異なっている可能性が考えられる。また、タバコ BY-2 細胞とタマネギの表皮細胞を用いた局在解析から、VPS35 は PVC あるいは MVB (multi vesicular body) に局在することが示されている (Oliviusson et al., 2006; Yamazaki et al., 2008)。しかしながら、3つの VPS35 それぞれの局在部位は明らかになっていない。したがって、3つの VPS35 の機能の差として、PVC 膜上で機能する膜コンパートメントが異なる可能性も考えられる。以上の 2つの可能性は相反するものではないので、VPS35A と 35B あるいは 35C とは両者の点で異なるのかもしれない。シロイヌナズナ VPS35 の多様性の意味を考える上で、これらの可能性は今後の課題として非常に興味深い。

高等植物における逆行輸送の多様性と高次機能との関連

高等植物細胞は液胞をはじめとした単膜系オルガネラが酵母や動物と比べて多様である (Surpin and Raikhel, 2004)。これらの単膜系オルガネラの間で複数の輸送経路が存在し、また、逆行輸送経路も複数存在する可能性がある。今回、*zig-1* 変異体の形態と重力屈性における表現型に対する抑圧効果を指標として、シロイヌナズナ *zig suppressor 3* とそのパラログ遺伝子の分子遺伝学的解析を行った結果、3つの VPS35 のタンパク質機能が異なることが示された。シロイヌナズナの細胞において、3つの VPS35 は異なる単膜系オルガネラの膜上でそれぞれに固有の積荷タンパク質の選別を行っているのかもしれない。このように、シロイヌナズナの細胞は逆行輸送の制御因子を使い分けることで、単

膜系オルガネラの多様性を反映したより複雑な小胞輸送の分子ネットワークを構築しているのかもしれない。今後、レトロマーによって細胞内局在や発現レベルを制御されている受容体などの積荷タンパク質やそのリガンドを同定、解析することで、高等植物が示す環境適応や形態形成などの高次機能において逆行輸送が果たす役割を明らかにできることが期待される。

第 2 章

シロイヌナズナ花茎の重力屈性に関与する *SHOOT GRAVITROPISM6* の分子遺伝学的解析

序論

成熟した植物細胞において、液胞は細胞のほとんどの空間を占める巨大なオルガネラとして観察される。その詳細な形態や構造は、主に電子顕微鏡を用いた解析によって明らかになった。一方、液胞膜の動態に関する研究は、近年の蛍光試薬や蛍光タンパク質を用いた生細胞のイメージング解析によって飛躍的に向上した (Oda et al., 2009)。

植物液胞の構造は細胞分裂過程や細胞成長過程に応じて大きく変化するが、分裂を終え成熟した細胞においては、中央液胞、原形質糸、バルブ、シートの4つの構造に大きく分けられる。中央液胞は細胞体積の80~90%を占め、吸水によって生じた膨圧は細胞、さらには組織全体に機械的強度を与えている。原形質糸は、中央液胞を貫通した細い細胞質を包むトンネル状の液胞膜構造である。中央液胞内腔に陥入したシート状の液胞膜からくびりとられてでき、出現、融合、消失を繰り返す (Ruthardt et al., 2005, Higaki et al., 2006; Sheahan et al., 2007)。中空の細胞質部分にはアクチン細胞骨格が連絡しており、細胞内物質やオルガネラを運ぶための経路として機能している (Ovečka et al., 2005; Ruthardt et al., 2005, Saito et al., 2005)。バルブは、液胞膜をGFPによって可視化したシロイヌナズナの解析により最初に見つかった。バルブ部分の蛍光強度は一重の液胞膜部分より2倍以上高いことから、バルブ形成のモデルの一つとして、内腔に陥入した液胞膜が長く伸び、この細胞質を挟んだ二重の液胞膜が球状になることで形成されると考えられている (Saito et al., 2002; Uemura et al., 2002; 図2B)。このような球状の形と蛍光の強さから、“電球”を意味するバルブ (bulb)と名付けられた (Saito et al., 2002)。バルブは形態を変えながら細胞内を絶えず動き、しばしば原形質糸やシート状の液胞膜と融合する (Uemura et al., 2002)。また、バルブは細胞の肥大、成長に伴い数が減少することから、細胞の成長期において、液胞膜に局在するタンパク質や脂質のリザーバーとして機能しているという説もあるが (Saito et al., 2002)、その細胞内における機能は正確にはわかっていない。さらに、シロイヌナズナ以外の植物においても蛍光脂質や蛍光タンパク質を用いたイメージング解析が行われ、バルブ様の液胞膜構造は、広範な植物種の細胞にも存在することが示されている (Escobar et al., 2003; Vera-Estrella et al., 2004; Reisen et al., 2005; Mohanty et al., 2009)。しかしながら、依然として、バルブ、シートの形成、形態維持を制御する分子機構は、様々な植物種を通じてほとんど明らかになっていない。そのような中で、シロイヌナズナの花茎の重力屈性を指標とした分子遺伝学的解析から、細胞内の液胞膜構造の形成/維持に関する因子が明らかに

なっている。

本研究室において単離されたシロイヌナズナ *shoot gravitropism (sgr)* 変異体は、花茎の重力屈性に異常を示す (Fukaki et al., 1996; Yamauchi et al., 1997; Fukaki et al., 1998; Silady et al., 2004; Nakamura et al., 2011)。花茎における重力感受細胞である内皮細胞は、その細胞体積のほとんどを中央液胞によって占められている。内皮細胞内にはアミロプラストが多数含まれ、アミロプラストは、一つ一つが液胞膜にとり囲まれた状態で存在している (図 2B)。しかしながら、*sgr2*, *sgr3*, *zig/sgr4*, *grv2/sgr8* 変異体では、内皮細胞内の液胞膜構造に異常が見られ、アミロプラストは液胞膜にとり囲まれていなかった。また、固定した花茎の縦断切片を観察すると、野生型では内皮細胞内のアミロプラストは細胞下部に蓄積していたのに対し、これらの変異体ではアミロプラストは細胞の下部に加え、上部、側面にも存在していた (Morita et al., 2002; Yano et al., 2003; Silady et al., 2004)。*SGR2* はホスホリパーゼ A1 様タンパク質をコードし、一部が液胞膜と液胞前区画 (prevacuolar compartment; PVC) に局在する (Kato et al., 2002; 安藤 修士論文 2007)。*SGR3/SYP22/AtVAM3*, *ZIG/VTI11* はそれぞれ Qa-SNARE、Qb-SNARE をコードし、液胞へ至る細胞内小胞輸送経路で機能する (Kato et al., 2002; Yano et al., 2003)。*GRV2/SGR8* は DnaJ ドメインを持つタンパク質をコードし、線虫においてエンドサイトーシスに関与する RME-8 と相同性を持つ (Silady et al., 2004)。さらに、*GRV2/SGR8* はシロイヌナズナの細胞においてエンドソームに局在し、エンドサイトーシス経路で機能する (Silady et al., 2008)。横倒し顕微鏡を用いて重力方向を維持したまま野生型花茎の生細胞を観察すると、内皮細胞の液胞には原形質糸やバルブ、シートが見られ、これらの構造は形態を変えながら内腔内を活発に動いた (Saito et al., 2005)。また、アミロプラストは、液胞膜に包まれた状態で細胞内を活発に動きながらも、比較的細胞の下部に偏って存在していた。さらに、野生型の内皮細胞を重力方向に対して 90 度傾けると、およそ 3 分でアミロプラストが新しい細胞底面へ移動した。一方、*zig/sgr4* 変異体の内皮細胞では、アミロプラストはほとんど動かなかった (Saito et al., 2005)。以上、*SGR2*, *SGR3*, *ZIG/SGR4*, *GRV2/SGR8* の解析から、花茎内皮細胞内の正常な液胞膜構造の形成、維持が、アミロプラストの存在状態や動態を介して花茎の重力屈性に重要であることが示唆された。以上のことから、シロイヌナズナの花茎の重力屈性は内皮細胞の細胞内環境、特に液胞膜構造の状態をよく反映しており、他の *sgr* 変異体を解析することで、内皮細胞内の液胞膜構造の形成、維持に関与する新たな因子を同定できると期待される。

本研究で扱う *sgr6* は花茎の重力屈性と側枝の伸長方向に異常を示す (図 28, 33)。また、*sgr6* は根と胚軸の重力屈性および根、花茎、胚軸の光屈性には顕著

な表現型を示さない (Yamauchi et al., 1997; 長房 修士論文 2001)。マップペー
ースクローニングの結果、*sgr6* のゲノムにおいて *At2g36810* 遺伝子に一塩基置
換が見つかっている (長房 修士論文 2001; 図 29)。この遺伝子がコードするタン
パク質は、1703 アミノ酸残基からなる。タンパク質ドメインデータベースに
よると、このタンパク質は 10 個の HEAT (huntingtin, elongation factor 3,
A-subunit of protein phosphatase 2A and TOR1) repeat を持つが、それ以外に
は機能を類推させるドメインを持たない (図 30)。一つの HEAT repeat は約 50
アミノ酸残基からなる (Andrade et al., 2001)。*At2g36810* がコードするタンパ
ク質の全長のうち、C 末端側の約 300 アミノ酸残基の領域に予測された 10 個の
HEAT repeat のうち 6 個が集中して存在し、それ以外の領域に残り 4 個が散在
している (図 30)。このタンパク質の全長をクエリーとして BLAST 検索を行っ
たところ、酵母のゲノム中にはホモログが見つからなかった。植物においては
イネ (*Oryza sativa*)、トウゴマ (*Ricinus communis*)、ヒメツリガネゴケ
(*Physcomitrella patens*)、ポプラ (*Populus trichocarpa*) のゲノム中にホモログ
が存在する (図 31)。*At2g36810* がコードするタンパク質との相同性は、イネ、
トウゴマ、ポプラのホモログについては比較的高く、ヒメツリガネゴケのホモ
ログについては 30% 程度である (図 32)。これらのホモログについてもタンパク
質ドメインデータベースを用いて解析したところ、4~10 個の HEAT repeat が
予測され、これらの HEAT repeat も *At2g36810* がコードするタンパク質のも
のと同様にそれぞれのタンパク質の C 末端側の領域に集中して存在する (図 32)。
一方、動物においては線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、ショウジョウハエ
(*Drosophila melanogaster*)、マウス (*Mus musculus*)、ヒト (*Homo sapiens*)
のゲノム中にも相同性は低いながらおおむねホモログが存在する (図 31)。これ
らのタンパク質の全長の長さは *At2g36810* がコードするタンパク質とある程度
同じであるが、予測された HEAT repeat は数個だった (図 32)。現在のところ、
これらの植物および動物におけるホモログに関する報告はなく、その遺伝学的
機能および分子機能は不明である。

通常、HEAT repeat は一つのタンパク質中に数十個以上存在する (Perry and
Kleckner, 2003)。HEAT repeat タンパク質は、HEAT repeat の繰り返し配列
から構成される α -ヘリックス状の HEAT モチーフを介して他のタンパク質と
結合する (Andrade et al., 2001)。また、HEAT repeat タンパク質は全ての真核
生物に存在し様々な細胞機能に関与するが、その分子機能を HEAT モチーフの
みから類推することは難しい。以上のようなことから、*SGR6* の分子機能は現
在のところ全く未知である。しかしながらそれゆえに、*SGR6* の解析は植物の
重力屈性の分子機構の解明、さらには、重力屈性以外の植物の高次機能に関連
した研究にも新しい局面を与える可能性がある。そこで私は *sgr6* 変異体の分子

遺伝学的解析を行い、*SGR6*が花茎の内皮細胞内の液胞膜構造の形成/維持に関与する新規因子である可能性を示した。第2章ではその研究成果を報告する。

材料と手法

植物材料

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. の Columbia (Col) 系統あるいは Lernerberg *erecta* (Ler) 系統を野生株として用いた。sgr6-1 変異株は Col 野生株をエチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理した種子群から深城英弘博士により単離された (Yamauchi et al., 1997)。sgr6-2 変異株は Col 野生株を γ 線照射した種子群から加藤荘英博士により単離された。sgr6-3 変異株は Ler 野生株を EMS 処理した種子群から鹿内利治博士のグループにより単離された。sgr6-4 変異株は Ler 野生株を γ 線照射した種子群から高田忍博士により単離された。sgr6-1, sgr6-2, sgr6-3, sgr6-4 は、それぞれの野生株によって少なくとも 3 回戻し交配されたものを解析に用いた。

生育条件

5% 次亜塩素酸ナトリウム中で 10 分間滅菌した種子を Murashige-Skoog (MS) 寒天培地 (4.65 g/L MS 培地用混合塩, 0.5% [w/v] Gellan Gum, 1% [w/v] sucrose, 0.01% [w/v] myo-inositol, 0.05% MES-KOH, [pH5.7]) に播種し、春化処理として 2 日間、4°C に静置した。発芽後およそ 10 日目の芽生えを土に移植した。その際、バーミキュライト (ニツタイ) と Metromix G550 (SUN GRO HORTICULTURE) を 5 : 2 の体積比で混合した土壌の上にパーライト I 型を薄く敷いたものを用いた。全ての生育条件は 23°C、連続白色光である。

アグロバクテリウムによる形質転換

植物体への形質転換には Floral dip 法を用いた (Clough et al., 1998)。15 μ g/ml カナマイシン、15 μ g/ml ゲンタマイシンを含む LB 液体培地中でアグロバクテリウム (MP90) を約 36 時間振とう培養し、遠心にて集菌した。この菌体を感染用培地 (5% sucrose, 0.05% Silvet L-77) で懸濁し、さやを取り除き蕾のみにした植物体 (発芽後 5 週目) に感染させた。約 24 時間ラップで密閉したのち、上述と同様の条件下で生育させた。

花茎重力屈性の測定

花茎が 5~8cm に抽苔した植物体を 23°C の暗所で 1 時間順応させたのち、ポットごと水平方向に倒して重力刺激を与えた。これを 0 分とし、その後 10 分毎に 6 あるいは 10 時間、デジタルカメラ PowerShot SX100 IS (Canon) で花茎をタイムラプス撮影した。その後、ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) にて花茎の

屈曲角度を測定した。

GUS 染色

発芽後 10 日目の芽生え、あるいは 5~8cm の長さに伸長した花茎の茎頂から約 2~3cm の部分を試料とした。試料を冷却した 90% acetone に浸し、氷上で 30 分静置した。acetone を除去後、rinse solution (100 mM NaPO₄buffer [pH7.0], 0.5mM K₃Fe(CN)₆, 0.5 mM K₄Fe(CN)₆, 10 mM EDTA)を添加し、氷上で 5 分洗浄した。rinse solution を除去後、staining solution (100 mM NaPO₄buffer [pH7.0], 0.5 mM K₃Fe(CN)₆, 0.5m M K₄Fe(CN)₆, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.5 mg/ml X-Gluc)を添加し、氷上、減圧条件下で 30 分浸透させた。その後、37°Cのインキュベーターに移し、16 時間染色した。花茎試料については、下記の「花茎切片の作成」の脱水処理以下同様の処理を行った（ただし、横断切片作成後、0.1%ニュートラルレッドで染色した）。芽生え試料については、70% ethanol に浸し、15 分洗浄した。70% ethanol を除去後、chloral hydrate-glycerol solution(8g of chloral hydrate, 1 ml of glycerol and 2 ml of water)を用いてスライドガラス上に封入した。これを冷却 CCD カラーカメラ VB-6010 (KEYENCE)を設置した実体顕微鏡 SMZ-U (Nikon)で観察、画像撮影した。

花茎切片の作成

5~8cm の長さに伸長した花茎の茎頂から約 2~3cm の部分を切り取り、これを試料とした。植物体を上下逆にして重力刺激を与えた場合は、重力刺激後すぐさま茎頂から約 2~3cm の部分を切り取った。あるいは、重力刺激後 23°Cの暗所にて 10, 20, 40 分間インキュベートし、その後茎頂から約 2~3cm の部分を切り取った。重力方向を保持した状態でこの試料を 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA)に浸し、氷上、減圧条件下で 1 時間固定処理した。その後、エタノールの希釈系列に順次移して脱水処理を行い、Technovit 7100 (Heraeus Kulzer)を用いて包埋した。ミクロトームを用いて固形サンプルから厚さ 4 μm の縦断切片を作成し、0.5%トルイジンブルーで染色した。これを冷却 CCD カラーカメラ VB-6010 (KEYENCE)を設置した蛍光顕微鏡 ECLIPSE E800 (Nikon)で観察、画像撮影した。

コンストラクトの作成

SCRpro: GFP-SGR6

前任者により、pBI300 バイナリーベクターの MCS に *SGR6pro: GFP-SGR6* が挿入されたコンストラクト (pBI300_*SGR6pro: GFP-SGR6*)はすでに作成さ

れている (矢野、未発表)。そこで、SalI と SmaI サイトを用いて GFP-SGR6 を切り出し、この DNA 断片をすでに *SCR* プロモーターが挿入してある pBI300 (pBI300_*SCRpro*) の SalI と SmaI に挿入した。

タンパク質の抽出

発芽後 6 週目の植物体の花茎を、10 ml の extraction buffer (100 mM HEPES-KOH [pH7.5], 0.3 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA) と 10 μ l の PROTEASE INHIBITOR COCKTAIL (PIC) (SIGMA) の混合液中で、乳鉢を用いて氷上で破碎した。この破碎液をミラクロスで濾しながら 50 ml 遠心チューブに移した。これを 4°C、1,000g で 10 分遠心し、大きな不要物を沈澱させた。上清をタンパク質抽出液とし、その濃度を BCA kit (PIERCE) を用いて測定した。植物の系統間でタンパク質濃度を揃えた後、抽出液と等量の 2×SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl [pH6.8], 4% SDS, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 4% 2-mercaptoethanol) を添加し、96°C で 5 分熱処理、あるいは室温で一晩静置した。その後、イムノブロットを行った。

膜画分の調整

上記のようにタンパク質抽出液を得た後、4°C、100,000g で 1 時間遠心した。得られた上清を可溶性画分、沈澱を膜画分とした。可溶性画分に等量の 2×SDS sample buffer を、膜画分に可溶性画分と等量の extraction buffer と 2×SDS sample buffer を添加し、室温で一晩静置した。その後、イムノブロットを行った。

膜画分の可溶化

上記のように膜画分を得た後、extraction buffer、high-salt buffer (2 M NaCl, 100 mM HEPES-KOH [pH7.5], 0.3 M sucrose, 5 mM EDTA)、urea buffer (8 M urea, 100 mM HEPES-KOH [pH7.5], 0.3 M sucrose, 5 mM EDTA)、alkaline buffer (100 mM Na₂CO₃, 0.3 M sucrose, 5 mM EDTA)、TritonX-100 buffer (1% [v/v] TritonX-100, 100 mM HEPES-KOH [pH7.5], 0.3 M sucrose, 5 mM EDTA)、SDS buffer (2% [w/v] SDS, 100 mM HEPES-KOH [pH7.5], 0.3 M sucrose, 5 mM EDTA) をそれぞれ 100 μ l 添加し、室温で 30 分静置した。4°C、100,000g で 1 時間遠心し、得られた上清を S100、沈澱を P100 とした。S100 に 800 μ l の extraction buffer と 100 μ l の TCA を添加し、よく攪拌した。氷上で 15 分静置した後、4°C、15,000 rpm で 5 分遠心した。上清を除去後、300 μ l の氷冷した acetone を添加し、よく攪拌した。4°C、15,000 rpm で 5 分遠心し、上清を除去した。得られた S100 由来の沈澱と P100 に 1×SDS sample buffer

(50 mM Tris-HCl [pH6.8], 2% SDS, 10% glycerol, 0.005% bromophenol blue, 2% 2-mercaptoethanol)を添加し、室温で一晩静置した。その後、イムノブロットを行った。

イムノブロット

7.5 あるいは 10%ポリアクリルアミドゲル e-PAGEL (ATTO)に試料をアプライし、10 mA の定電流で電気泳動を行った。その後、SGR6 タンパク質については、PVDF 膜 Immobilon (MILLIPORE)に MINI TRANS-BLOT CELL (BIO RAD)を用いて 100 V の定電圧で転写した。ZIG タンパク質については、PVDF 膜 Immobilon (MILLIPORE)に TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO RAD)を用いて 10V の定電圧で転写した。この膜を適量の TBS-TB (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris-HCl [pH7.4], 0.05% [v/v] Tween20, 2% [w/v] BSA)に移し、室温で 1 時間振とうし、ブロッキングを行った。膜を適量の TBS-T (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris-HCl [pH7.4], 0.05% [v/v] Tween20)に移し、室温で 10 分間振とうした。これを 3 回繰り返す、膜を洗浄した。TBS-TB に適量の一次抗体 (抗 SGR6 ウサギ抗体: 1/1000, 抗 ZIG/VTI11 ウサギ抗体: 1/1000)を添加したものと膜をハイブリバックに封入し、室温で 1 時間振とうした。その後、ブロッキング後と同様に膜を洗浄した。TBS-TB に適量の二次抗体 (HRP-linked 抗ウサギロバ抗体 [Amersham Biosciences]: 1/10000)を添加したものと膜をハイブリバックに封入し、室温で 1 時間振とうした。その後、ブロッキング後と同様に膜を洗浄した。バンドの検出には ECL Plus (GE Healthcare Bio-Sciences)を使用した。luminescent image analyzer LAS-4000 (FUJIFILM)を用いて化学発光画像を取得した。

共焦点顕微鏡を用いた観察

5~8cm の長さには伸長した花茎の茎頂から約 2~3cm の部分を試料とした。この試料を阪口らの方法に従って縦切りにし(阪口 修士論文 2005)、適量の 0.1% agar を含む 1×MS 液体培地 (1×MS, 1% sucrose, 0.05% MES [pH5.0])とともにカバーガラスに封入した。

SCRpro:GFP-γTIP 形質転換体の花茎の内皮細胞の、重力方向を保持した蛍光観察には、CSU10 CONFOCAL SCANNER UNIT (YOKOGAWA)および CCD カメラ Phoenix (KSOLYMPUS)を設置した横倒し共焦点顕微鏡 BX50 (OLYMPUS)を用いた。GFP を 488nm 光で励起し、GFP 蛍光には 503nm~552nm、アミロプラスト自家蛍光には 665~705nm の吸収フィルターを用いた。画像取得、画像処理には iQ image analysis software (Andor technology)を用いた。

sgr6-1/SGR6pro:GFP-SGR6 と各種オルガネラマーカを発現する形質転換体とを掛け合わせて得られた植物体の花茎の内皮細胞の蛍光観察には、共焦点レーザー走査型顕微鏡 Fluoview FV1000 (OLYMPAS)を用いた。GFP、RFP をそれぞれ 488nm 光、543nm 光で励起し、GFP 蛍光には 497nm~517nm、RFP 蛍光には 592~622nm、アミロプラスト自家蛍光には 650~750nm の吸収フィルターを用いた。

SCRpro:GFP-γTIP 形質転換体の花茎内皮細胞の 4D イメージングには、共焦点スキャナボックス CellVoyager CV1000 (YOKOGAWA)を用いた。GFP を 488nm 光で励起し、GFP 蛍光には 520nm~535nm、アミロプラスト自家蛍光には 617~673nm の吸収フィルターを用いた。野生型背景の形質転換体においては、1 時点目の 20 秒間に Z 軸方向に 20 枚の画像を取得し、これを 30 時点 (計 10 分間)繰り返した。*sgr6-1* 背景の形質転換体においては、1 時点目の 25 秒間に Z 軸方向に 25 枚の画像を取得し、これを 25 時点 (計 10.4 分)繰り返した。取得した画像を ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いて時点ごとに統合し、得られた 30 あるいは 25 枚の統合画像を時間軸に沿って動画にした。

結果

sgr6-1 変異体の花茎の重力屈性

SGR6 の機能を探るため、まず *sgr6-1* 変異体の重力屈性における表現型を解析した。Yamauchi ら(1997)により *sgr6-1* 変異体の花茎は重力屈性異常を示すことがすでに報告されているが、より詳細な計測が可能な現在の手法を用いて再度解析した。植物体をポットごと水平方向に倒した時点を 0 分とし、その後 10 分毎に計 6 時間花茎の屈曲の様子をタイムラプス撮影し、屈曲角度を測定した (図 33)。その結果、野生型の花茎が重力刺激後、ほぼ 90 分で 90 度まで屈曲したのに対し、*sgr6-1* 変異体はおよそ 140 分で 90 度まで屈曲した。これは、*sgr6-1* 変異体が野生型より若干遅延した重力屈性を行うことを示している。花茎の重力屈性は花茎の伸長成長を伴う。*sgr6-1* 変異体の花茎の重力屈性異常が花茎の伸長成長に依存するかを調べるために、野生型と *sgr6-1* 変異体の花茎の長さを、花茎が 1.5cm の長さに抽苔した時点で測定を始め、その後 12 時間毎に計 5 日間測定した (図 34)。その結果、*sgr6-1* 変異体の花茎の伸長は野生型のものとほぼ同様であった。このことは、*sgr6-1* 変異体の花茎伸長成長が重力屈性異常に直接関係しない可能性を示唆している。

SGR6 の同定

前任者の行ったマッピングにより、*sgr6-1* ゲノム中の *At2g36810* 遺伝子に C から T への一塩基置換が見つかっている (長房 修士論文 2001; 図 29)。さらに、*At2g36810* の全長もすでにクローニングされている (矢野、未発表)。この *At2g36810* の全長のクローニングから、*sgr6-1* 変異によって *At2g36810* がコードするタンパク質の第 37 エキシソンの 1171 番目のグルタミン (CAA) が終止コドン (TGA) へ変化することが予想された。

SGR6 遺伝子が *At2g36810* であることを確認するため、まず、アリル変異体の表現型解析を行った。*sgr6-1* とは異なるスクリーニングから、*sgr6-2*, *sgr6-3*, *sgr6-4* が得られている (*sgr6-3*, *sgr6-4* 変異体の遺伝的背景は *Landsberg erecta* [Ler] である)。これらアリル変異体のゲノムを用いて *At2g36810* のシークエンス解析が行われ、*sgr6-2* において第 3 エキシソンの G から TT への置換変異が見つかっている (矢野、未発表; 図 29)。この変異によって、45 番目のアスパラギン (AAT) が終止コドン (TAA) へ変化することが予想される。また、*sgr6-3* において第 47 エキシソンの C から T への置換変異が見つかっている (矢野、未発表; 図 29)。この変異によって、1547 番目のグルタミン (CAG) が終止コドン (TAG) へ変化することが予想される。さらに、*sgr6-4* において第 9 エキシソンの ATTTCT

から CC への置換変異が見つかった (矢野、未発表; 図 29)。この変異によって、221 番目から 229 番目までのアミノ酸 FLNSVFELL が、RIQFLSYC と終止コドンへ変化することが予想される。*sgr6-2*, *sgr6-3*, *sgr6-4* 変異体は *sgr6-1* 変異体と同様に、側枝の伸長方向に異常を示した (図 35A, 36A)。長房 (2001) により、*sgr6-2*, *sgr6-3* の花茎の重力屈性はすでに解析されているが、現在の手法を用いて詳細に解析した。その結果、*sgr6-2* 変異体は *sgr6-1* とほぼ同様の重力屈性を示した (図 35B)。また、Landsberg *erecta* (Ler) の花茎が重力刺激後、ほぼ 120 分で 90 度まで屈曲したのに対し、*sgr6-3* 変異体の花茎はおよそ 4 時間でほぼ 90 度まで屈曲した (図 36B)。その後 90 度以上屈曲することはなく、10 時間後までほぼ 90 度のままだった。また、*sgr6-4* 変異体の花茎はおよそ 6 時間でほぼ 90 度まで屈曲し、10 時間後までほぼ 90 度のままだった (図 36B)。これらの結果から、*sgr6-2*, *sgr6-3*, *sgr6-4* 変異体の花茎もまた、野生型より遅延した重力屈性を示すことがわかった。

次に、*sgr6-1* の相補性試験を行った。前任者により、*At2g36810* の開始コドンから上流約 3.0kb の領域をプロモーターと仮定し、その下流に GFP cDNA を 5' 末端につないだ *At2g36810* cDNA を挿入されたコンストラクト、およびこのコンストラクトをホモに持つ形質転換体はすでに得られている (矢野、未発表; 図 37A,B)。そこで、この形質転換体の花茎の重力屈性を解析したところ、野生型と同様の重力屈性を示した (図 37C)。この結果から、使用したプロモーター領域は花茎の重力屈性に十分であること、さらに *At2g36810* が *sgr6-1* の原因遺伝子であることが確認された。また、導入したコンストラクトの最終産物、つまり GFP 融合型 SGR6 は機能的であることが示された。

***sgr6-1* は *At2g36810* がコードするタンパク質の欠失変異である。**

sgr6-1 によって *At2g36810* がコードするタンパク質の 1171 番目のグルタミン (CAA) が終止コドン (TGA) へ変化することが予想された (図 29)。*sgr6-1* が *At2g36810* のコードするタンパク質の発現に影響を与えているかを確認するため、ウェスタンブロット解析を行った。まず、野生型と *sgr6-1* 変異体の花茎をバッファー中で破碎した後、大きな不溶物を沈澱させ、上清をタンパク質抽出液とした。この抽出液にサンプルバッファーを加えて熱処理した後、SDS-PAGE、抗 SGR6 抗体を用いたイムノブロットを行った (図 38A)。この抗体は SGR6 の全長 1703 アミノ酸のうち、621 アミノ酸から 1241 アミノ酸の領域を抗原として作成されたポリクローナル抗体である (矢野、未発表)。その結果、野生型において、予想される分子量の位置にバンドが検出されたが、ゲルのウェルの底にあたる部分にもバンドが検出された (図 38A)。また、これらのバンドは *sgr6-1* 変異体では見られなかった。このことから、この抗体は SGR6 タンパク質を特

異的に認識することが明らかであり、*sgr6-1*にはこの抗体で認識できる正常な SGR6 タンパク質が存在しないことが示された。さらに、上記の方法では SGR6 タンパク質の一部は何かしらの凝集体を形成し、ゲル中へ入らない可能性が考えられた。そこで次に、タンパク質抽出液にサンプルバッファーを加えた後、熱処理をせずに一晩室温にて静置した。その後の操作は上記と同様である。その結果、予想される分子量の位置にのみバンドが検出された (図 38B)。

そこで、この方法を用いて *sgr6* の全アレルにおける SGR6 タンパク質の発現を調べた。その結果、*sgr6-2*, *sgr6-4* 変異体においても、野生型で見られたバンドと同じ位置にバンドは検出されなかった (図 39)。また、*sgr6-1*, *sgr6-2*, *sgr6-4* において正常より小さい分子量のバンドも検出されなかった。この結果から、これら 3 種の変異アレルは *At2g36810* がコードするタンパク質の欠失変異であると考えられる。一方、*sgr6-3* 変異体においては、野生型よりも分子量の小さいバンドが検出された (図 39)。そして、バンドの濃さから、*sgr6-3* 変異によりタンパク質の蓄積量が野生型より低下していると考えられた。*sgr6-3* では、1547 番目のグルタミンが終止コドンへ変化することが予想される。したがって、*sgr6-3* 変異体の花茎の重力屈性異常の原因として、タンパク蓄積量が野生型より低下している、あるいは、*sgr6-3* 型 SGR6 が機能を欠損している可能性が考えられる。

SGR6 の発現パターン

次に、植物個体における SGR6 の発現部位を調べた。相補性試験に用いたプロモーターの制御下で、レポーター遺伝子である GUS を発現する形質転換体はすでに得られている (矢野、未発表)。この形質転換体を用いて GUS 染色を行ったところ、根端および根、胚軸、子葉の維管束、子葉の孔辺細胞に強い GUS 活性が見られた。一方、花茎では表皮、内皮、維管束のうち特に篩管、発達中の後生木部導管、そして維管束間繊維細胞に強い GUS 活性が見られた (図 40)。

内皮特異的プロモーターを用いた相補性試験

内皮細胞は、花茎における重力感受細胞である (Morita, 2010)。GUS を用いた SGR6 の発現解析から、SGR6 は花茎において内皮で発現していることがわかった。そこで、SGR6 の内皮における発現と重力屈性との関係を調べるため、内皮特異的 SCARECROW (SCR) プロモーターの制御下で、相補性試験に用いた GFP-SGR6 を発現する *sgr6* 背景の形質転換体を作成した。T3 世代独立 2 系統の花茎の重力屈性を解析したところ、重力屈性異常が野生型並みに回復した (図 41)。この結果から、内皮における SGR6 の機能が花茎の重力屈性に十分であることがわかった。さらには、SGR6 は花茎の重力屈性において、内皮で機

能していることが示された。

***sgr6-1* 変異体の内皮細胞の液胞膜構造とアミロプラスト動態**

内皮細胞は花茎における重力感受細胞であり、その細胞体積のほとんどを中央液胞によって占められている。内皮細胞内にはアミロプラストが液胞膜に包まれた状態で存在し、細胞内を活発に動く (Saito et al., 2005)。さらに、このアミロプラストの重力方向への移動が重力刺激の感受に重要であることが示されている (Saito et al., 2005; Nakamura et al., 2011)。内皮細胞の液胞には、アミロプラストを包む構造のほか、原形質糸やバルブ、シートが存在し、これらの構造は出現と消失を繰り返しながら細胞内を活発に動く (Saito et al., 2005; 図 42B 矢印)。さらに、アミロプラストの重力方向への移動には、このような液胞膜の動的構造が重要であることが示されている。

SCR プロモーターを用いた相補性試験から、*SGR6* は花茎の重力屈性において内皮で機能していることがわかった。そこで、*SGR6* は内皮細胞内のアミロプラスト動態を介して花茎の重力屈性に関与している可能性が考えられたため、まず、*sgr6-1* の内皮細胞内の液胞膜とアミロプラスト動態を観察した。*SCR* プロモーターの制御下で GFP 融合型 γ -TIP を発現させ、内皮細胞内の液胞膜を可視化した形質転換体の野生型系統 (*SCRpro::GFP- γ -TIP/WT*) はすでに確立されている。この系統と *sgr6-1* をかけ合わせることにより、*sgr6-1* 背景の形質転換体を得た。通常、横倒し顕微鏡を用いて重力方向を維持したまま生細胞を観察する際、植物体から切り取った花茎を一度水平に置いた状態で縦断し、これを試料としている。したがって、この重力刺激に対する細胞内の状態を花茎を切り取る前の状態に戻すため、顕微鏡に試料を固定したのち観察する前に 15 分間静置している (Nakamura et al., 2011)。しかし、15 分間静置せずに、花茎を切って 5~10 分後に内皮細胞を観察したところ (図 42A)、野生型と *sgr6-1* 変異体の両方において、バルブやシートといった液胞膜の動的構造を持つ細胞 (図 42B 左) と持たない細胞 (図 42B 右) が存在した。そこで、複数の花茎切片試料について液胞膜の動的構造を持つ細胞と持たない細胞の個数を数えた。その結果、野生型においては、36 個の細胞のうち、液胞膜の動的構造を持つ細胞は 32 個であり、これは全個数の約 9 割を占めた (図 42C 左)。一方、*sgr6-1* 変異体においては、53 個の細胞のうち、液胞膜の動的構造を持つ細胞は 12 個であり、全個数の 2 割程度だった (図 42C 右)。この結果から、花茎を切片にして内皮細胞を観察すると、野生型においては、ほとんどの細胞が液胞膜の動的構造を持つのにに対し、*sgr6-1* 変異体においては、ほとんどの細胞が液胞膜の動的構造を持たないことがわかった。

そこで次に、野生型については、花茎を切って 5~10 分後に液胞膜の動的構造

を持つ9割の細胞に (図 42C 左)、*sgr6-1* 変異体については、花茎を切って 5~10 分後に液胞膜の動的構造を持つ2割の細胞に着目した (図 42C 右)。まず、野生型において、5~10 分以内に内皮細胞の観察を開始し、4 秒毎に2分間タイムラプス撮影を行ったところ (図 43A)、2 分間の観察中、液胞膜の動的構造がほぼ維持された (図 43B 矢印)。一方、*sgr6-1* においても、2 分間の観察中、液胞膜の動的構造がほぼ維持された (図 43C 矢印)。さらに、花茎を切って 25~30 分後に再び同じ細胞の観察を開始し、4 秒毎に2分間タイムラプス撮影を行ったところ (図 44A)、野生型においては、5~10 分と同様に液胞膜の動的構造が見られたのに対し (図 44B 矢印)、*sgr6-1* の内皮細胞においては、液胞膜の動的構造は完全に失われていた (図 44C)。また、液胞膜構造の変化にともないアミロプラストの動きも失われていた。次に、野生型および *sgr6-1* 変異体において、このような液胞膜構造の変化を示す内皮細胞を定量した。定量にあたり、図 43, 44 の矢印で示すような、2 分間の観察中、形態あるいは位置が変化した液胞膜構造を液胞膜の動的構造と定義した。さらに、花茎を切って 5~10 分の時点で、液胞膜の動的構造を持つ細胞のうち、25~30 分の時点で液胞膜の動的構造を持つ細胞と待たない細胞の個数を数えた (図 45A)。その結果、野生型では、花茎を切って 5~10 分の時点で液胞膜の動的構造を持つ 41 個の細胞すべてにおいて、25~30 分の時点でも液胞膜の動的構造が見られた。一方、*sgr6-1* 変異体では、花茎を切って 5~10 分の時点で液胞膜の動的構造を持つ 36 個の細胞のうち、25~30 分の時点でも液胞膜の動的構造を持つ細胞は4割にとどまった。次に、野生型あるいは *sgr6-1* 変異体におけるアミロプラスト動態の変化を定量した。定量にあたり、撮影開始時点で見えたアミロプラストのうち、図 44B, C のアスタリスクで示すようなアミロプラスト (上下左右に動かさず、回転もしない) を動かなかつたもの、それ以外を動いたものと定義した。さらに、細胞ごとに動いたアミロプラストの個数を計測し、全個数に対する割合を百分率で示した (図 45B)。その結果、野生型において、5~10 分ではほぼすべてのアミロプラストが動いた。25~30 分では有意に減少したものの、7割以上のアミロプラストが動いた。一方、*sgr6-1* 変異体においては、5~10 分では7割のアミロプラストが動いたが、25~30 分では大きく減少し、動いたアミロプラストは3割にとどまった。以上の結果から、*sgr6-1* 変異体では、①花茎切片作成後 5~10 分の時点で内皮細胞を観察すると、8割の細胞が液胞膜の動的構造を持たない、②切片作成後 5~10 分の時点で液胞膜の動的構造を持つ残り 2 割の内皮細胞においても、切片作成から 25~30 分経つと液胞膜の動的構造およびアミロプラスト動態が著しく損なわれることがわかった。これらの結果は、**SGR6** が液胞膜の動的構造の形成/維持に関与することを示唆している。現時点では、5~10 分の時点で液胞膜の動的構造を持たない8割の *sgr6-1* 変異体の内皮細胞が、花茎切断以前から液胞膜の

動的構造を持たないのか、花茎切断から観察開始までの間に液胞膜の動的構造を失っていったのかはわからない。そして一方、このような液胞膜の性質変化のため、花茎切断による現在の生細胞観察法では、*sgr6-1* 変異体のアミロプラスト動態を評価するのは難しいと考えた。

組織学的手法を用いたアミロプラスト動態解析

次に、組織学的手法を用いてアミロプラストの動態解析を試みた。重力方向を維持したまま 1 時間固定した花茎試料を包埋した後、縦断切片を作成し、光学顕微鏡を用いて内皮細胞を観察した (図 46A, B)。1 個の内皮細胞を重力方向に従い 4 等分し、最下部の区画から A, B, C, D とした (図 46C)。さらに、1 本の茎につき 50 個の内皮細胞について、それぞれの区画におけるアミロプラストの個数を計測し、全個数に対する割合を百分率で示した (図 46D)。その結果、野生型では全個数の 90% のアミロプラストが区画 A に存在した。一方、*sgr6-1* 変異体ではおよそ 70% のアミロプラストが区画 A に存在した (図 47)。さらに、区画 B, C におけるアミロプラストの割合は、野生型と *sgr6-1* 変異体間で有意な差が見られたことから、固定した花茎試料の内皮細胞において、*sgr6-1* 変異体のアミロプラストは細胞の下部以外に存在するものが野生型より多いことがわかった。

次に、アミロプラストの動態を解析するため、植物個体を上下逆にして重力刺激を与え、野生型と *sgr6-1* 変異体との間でアミロプラストの新しい重力方向への沈降に差がみられるかを上述の組織学的手法を用いて調べた。上下逆になった植物体の花茎の内皮細胞では、最上部の区画が A であり、最下部の区画が D である (図 48A)。まず、野生型植物体を上下逆にして重力刺激を与えた後、すぐさま花茎を切り取り (これをインキュベート 0 分とする)、新しい重力方向を保ったまま 1 時間固定した。もし、この花茎試料の内皮細胞において、重力刺激を与えた瞬間の状態が固定されたなら、アミロプラストは図 46B の写真を上下逆にした局在を示すはずである。しかしながら、アミロプラストは細胞の左右両側に存在し (図 48B)、各区画間でアミロプラストの割合に有意な差はなかった (図 48C)。この結果は、1 時間の固定の間にアミロプラストが新しい重力方向に従って区画 A から細胞の底に向かって沈降したことを示している。1 時間の固定ではアミロプラストは細胞の底まで完全に沈降しないことがわかったため、次に、植物体を上下逆にした状態で 10, 20 あるいは 40 分間インキュベートし、その後花茎を切り取り、新しい重力方向を保ったまま 1 時間固定した (図 49A)。さらに、上記と同様にして、各区画におけるアミロプラストの割合を定量した。その結果、野生型では上下逆の重力刺激を 10 分間与えると、区画 A, B のアミロプラストの割合が減少し、逆に区画 D のアミロプラストの割合が

増加することがわかった。さらに、上下逆の重力刺激を 20 分間行くと、ほとんどのアミロプラストが区画 D に沈降することがわかった (図 49B)。一方、*sgr6-1* 変異体では、区画 D の 0 分と 20 分の間でアミロプラストの割合が有意に上昇し、区画 B の 20 分と 40 分の間でアミロプラストの割合が有意に減少した。しかしながら、それ以外においてはアミロプラストの割合は有意に変化せず、20 分、40 分の重力刺激によって野生型のようにほとんどのアミロプラストが区画 D に沈降することはなかった (図 49C)。これらの結果から、*sgr6-1* 変異体の内皮細胞において、アミロプラストの重力方向への移動が野生型より低下している可能性が示唆された。

SGR6 は膜画分に存在する。

タンパク質の膜貫通領域予測プログラム SOSUI によると、SGR6 は膜貫通ドメインを持たない。しかし、SGR6 は液胞膜の動的構造の形成/維持に関与する可能性があることから、SGR6 が可溶性タンパク質であるか、膜タンパク質であるかを知ることは SGR6 の機能を考える上で重要である。そこで次に、抗 SGR6 抗体を用いて SGR6 の膜に対する存在様式を調べた。

野生型の花茎からタンパク質を抽出し、10 万 *g* で超遠心することで可溶性画分と膜画分を得た。これらの画分についてウェスタンブロット解析を行ったところ、SGR6 の大部分が膜画分に存在したが、一部は可溶性画分にも存在した (図 50)。また、各画分にサンプルバッファーを添加した後、熱処理をせず室温で一晩静置したにも関わらず、膜画分中の SGR6 の一部はゲルのウェルの底にとどまった (図 50, P100 のレーン)。このことから、SGR6 は超遠心処理によっても凝集体を形成しやすいことがわかった。

SGR6 は主に膜画分に存在することがわかったため、次に、SGR6 が膜から可溶化される条件を調べた。調整した膜画分に、塩等を含むバッファーを添加し、室温で 30 分静置した。その後、再度 10 万 *g* で超遠心し、得られた上清と沈澱についてウェスタンブロット解析を行った。その結果、2M NaCl、8M 尿素、あるいは 0.1M Na₂CO₃ (pH11) のバッファーで処理しても、SGR6 はほとんど可溶化されないことがわかった (図 51)。一方、1% TritonX-100 あるいは 2% SDS で処理すると、SGR6 の一部は可溶化されたが、一部は膜に溶け残った。この結果から、SGR6 は膜に結合している膜表在型タンパク質である可能性が示された。

SGR6 の内皮細胞における局在解析

SGR6 の生化学的解析から、SGR6 は膜上に存在している可能性が示された。そこで、SGR6 がどの膜上に存在するのかを調べるため、まず、相補性試験に

用いた形質転換体 *SGR6pro:GFP-SGR6/sgr6-1* の内皮細胞を観察した。図 52 写真中の緑の大きな球状のシグナル (アスタリスクで示す)はアミロプラストの自家蛍光である。GFP-SGR6 のシグナルは細胞周縁部に沿って存在した (図 52 左 点線は細胞周縁を示す)。この細胞周縁部に沿った GFP シグナルは不均一であり、シグナルの強い部分と弱い部分とが見られた。また、GFP シグナルは細胞内部に環状の形でも存在し (図 52 左 白の四角)、この環状のシグナルにも強い部分と弱い部分とが見られた。さらに、この細胞内部の環状部分には、細胞周縁部にはほとんど見られないとりわけ大きなドット状のシグナルが存在した (図 52 左 青矢印)。また、観察中、環状のシグナルとドット状のシグナルは細胞内を動くことが確認された。別の細胞を見ると、細胞周縁部の GFP シグナルはアミロプラストより細胞中央側に存在したため (図 52 右 白矢印)、SGR6 が細胞膜に局在する可能性は低いことがわかった。また、GFP-SGR6 がアミロプラスト近傍に存在するかどうかについては、アミロプラストの自家蛍光のため今回は判断できない。

次に、これらの GFP-SGR6 のシグナルがどの膜に局在するのかを調べるため、以下のような、SCR あるいは自身のプロモーターの制御下で各種のオルガネラマーカーに mRFP を融合させたタンパク質を発現する形質転換体を用いた。① 小胞体マーカー: *SCRpro:mRFP-er* (小胞体局在化シグナル配列)/WT、② ARA6-positive エンドソームマーカー: *SCRpro:ARA6-mRFP*WT、③ ARA7-positive エンドソームマーカー: *SCRpro:mRFP-ARA7*WT、④ 液胞マーカー: *VAM3pro:mRFP-VAM3/vam3-1* である。これら 4 つの形質転換体と、*SGR6pro:GFP-SGR6/sgr6-1* とを掛け合わせ、両方の transgene および *sgr6-1* 変異 (液胞マーカーの場合は、さらに *vam3-1* 変異)をホモに持つ植物体を作成した。

sgr6-1 変異体の花茎切片の内皮細胞において、液胞膜構造に異常が観察されたことから、まず、液胞マーカーとの掛け合わせにより得られた植物体の内皮細胞を観察した (図 53A)。図 52 と同様、写真 a, c 中の緑の大きな球状のシグナルはアミロプラストの自家蛍光である。GFP-SGR6 のシグナルは細胞周縁部に存在し、それは mRFP-VAM3 のシグナルと重なった。さらに、a-c の白の四角で囲んだ部分を拡大すると (図 53A, d-f)、GFP-SGR6 は液胞膜の陥入構造部分に沿って存在することがわかった。図 52 で見られた細胞内部の環状のシグナルはおそらくこのような液胞膜の陥入構造に沿った局在を表していると考えられる。図 53B は A の 30 秒後の写真であるが、GFP-SGR6 の一部は A で見られたものより大きいドット状のシグナルとして観察され (図 53B, g の白の四角 [j はその拡大写真])、それは mRFP-VAM3 のシグナルと重なった (図 53B, k, l)。小胞体は液胞膜に近接して存在する (Hanton and Brandizzi, 2006)。そこで次に、

GFP-SGR6 と小胞体マーカーとの位置関係を調べるため、小胞体マーカーとの掛け合わせにより得られた植物体の内皮細胞を観察した (図 54)。GFP-SGR6 のシグナルはおそらくバルブ状の液胞膜構造に沿って存在したが (図 54, a の白の四角 [d はその拡大写真])、それは mRFP-er のシグナルとは重ならなかった (図 54, e, f)。また、細胞周縁部の GFP-SGR6 のシグナルも mRFP-er のシグナルとは重ならなかった (図 54, a-f)。GFP-SGR6 とシグナルが重なった VAM3/SYP22 は、PVC にも局在する (Sanderfoot et al., 1999)。そこで、ドット状の GFP-SGR6 のシグナルが PVC と重なるかを調べるため、ARA6-positive エンドソームマーカー、ARA7-positive エンドソームマーカーとの掛け合わせにより得られた植物体の内皮細胞を観察した (図 55, 56)。その結果、GFP-SGR6 のドット状のシグナルは ARA6 のシグナルとは重ならなかった (図 55, a-f)。ARA7 は PVC/後期エンドソームにおいて、小胞膜と標的膜との融合を仲介する低分子量 GTPase、Rab5 である (Saito and Ueda, 2009)。ARA6 と同様にふだん細胞質中に存在し、膜の融合の際にはエンドソーム膜上にリクルートされる。しかしながら、GFP-SGR6 のドット状のシグナルは ARA7 のシグナルとは重ならなかった (図 56, a-f)。これらの結果から、ドット状の GFP-SGR6 は少なくとも ARA6 あるいは ARA7 でラベルされる PVC ではないことがわかった。

以上、4 つのオルガネラマーカーを用いた局在解析から、GFP-SGR6 は液胞膜近傍に存在する可能性が高いことが示された。

***sgr6-1* 変異体花茎切片における内皮細胞の液胞膜構造の変化**

花茎切片を用いた内皮細胞内の液胞膜構造の観察から、野生型において、9 割の内皮細胞が液胞膜の動的構造を持つのにに対し、*sgr6-1* 変異体においては、8 割の内皮細胞が液胞膜の動的構造を持たないことがわかった (図 42)。また、*sgr6-1* 変異体の液胞膜の動的構造を持つ残り 2 割の内皮細胞も、切片作成から 30 分も経つと液胞膜の動的構造を失うことがわかった (図 44)。SGR6 の生化学的解析と局在解析の結果と合わせると、SGR6 は花茎の内皮細胞内の液胞膜上で機能し、液胞膜の動的構造の形成/維持に関与している可能性が考えられる。そこで、SGR6 が内皮細胞の液胞膜構造の形成/維持にどのように関与しているかを調べるため、野生型および *sgr6-1* 変異体において、花茎切片中の内皮細胞内の液胞膜を 4D イメージングを用いて再度観察した。

まず野生型の花茎を切って 10 分後から 10 分間、内皮細胞を 4D 撮影したところ、液胞膜構造は図 43 ですでに示したように内腔内を活発に動くことがわかった。これに加え 4D イメージングにより、動的構造には、内腔側から液胞外周部の膜に取り込まれたように見えるもの (図 57 白矢印)、内腔部分で新しく形成されるもの (図 57 青矢印)、形態が奥行きを持って大きく変化していくもの

などが存在することがわかった (図 57 黄矢印)。また、アミロプラストも液胞膜にとり囲まれた状態で内腔内を活発に動いた。一方 *sgr6-1* 変異体の花茎を切って 10 分後で液胞膜の動的構造を持つ内皮細胞においては、その後見られる動的構造の変化の様子や、動的構造を失った状態になるまでにかかる時間は細胞によって大きく異なる。そこで図 58 に一例を示すと、この細胞において液胞膜構造は野生型のように形態が大きく変化せず、液胞膜構造の一部は内腔部分で折りたたまるようにして蓄積していた (図 58A 白矢印)。さらに、約 10 分の観察の間に液胞膜構造の全体的な動きが次第に失われていき、同時に、アミロプラストの動きも失われていった。そして花茎を切って計 30 分経つと、液胞膜の動的構造とアミロプラスト動態は完全に失われており、小胞様の異常な液胞膜構造が生じていた (図 58B 黄矢印)。以上の結果から、*sgr6-1* 変異体の花茎切片中の内皮細胞において、野生型で見られるような液胞膜構造の形態変化や動態に異常が生じ、結果として、小胞様の異常な液胞膜構造に変化した可能性が考えられる。

考察

***SGR6*は花茎の重力屈性にどのように関わっているのか？**

sgr6-1 変異体において、*SCR* プロモーターの制御下で GFP-*SGR6* を発現させると花茎の重力屈性異常が回復したことから (図 41)、*SGR6* は花茎の重力屈性において内皮で機能していることがわかった。それでは、*SGR6* は内皮細胞において花茎の重力屈性にどのように関与しているのだろうか？内皮細胞は花茎における重力感受細胞であり、デンプンを蓄積したプラスチドであるアミロプラストを多数含む。アミロプラストは重力感受の際、重力方向へ沈む“平衡石”として機能すると考えられており、実際に、これまでに報告された *sgr* 変異体においてアミロプラストの重力方向への移動に異常が観察されている (Morita et al., 2002; Yano et al., 2003; Silady et al., 2004; Nakamura et al., 2011)。

sgr6-1 変異体の花茎の重力屈性異常は、アミロプラストの重力方向への沈降異常による可能性が考えられたため、まず、*sgr6-1* 変異体の内皮細胞におけるアミロプラスト動態解析を試みた。しかしながら、液胞膜構造の変化のため、花茎切断による生細胞観察法では *sgr6-1* 変異体のアミロプラスト動態を評価するのは難しいと考えられた (図 42, 43)。そこで、固定した花茎の切片を用いてアミロプラストの重力方向への移動を評価したところ、野生型においてアミロプラストは植物体を上下逆にした重力刺激によって新しい細胞底面へ移動していくことがわかった (図 48)。さらに、20 分間植物体を上下逆にすれば、ほとんどのアミロプラストは新しい細胞底面に存在することがわかった (図 49)。一方、*sgr6-1* 変異体についても野生型と同様に解析したところ、アミロプラストの重力方向への移動が野生型より大きく低下していた (図 49)。以上の結果から、*SGR6* は生きた花茎の内皮細胞においてもアミロプラストの重力方向への移動に関与し、このアミロプラストの重力方向への移動を介して花茎の重力屈性に関与している可能性が示唆された。

***sgr6-1* 変異体の内皮細胞におけるアミロプラスト沈降異常の原因**

アミロプラストの重力方向への移動に関与するものとして、これまでに内皮細胞内の液胞膜の動的構造と F-アクチンが示されている。液胞膜の動的構造はアミロプラストの重力方向への移動に重要である (Saito et al., 2005)。また、内皮細胞内の多数のアミロプラストの動きは、全体として跳躍的な動きと沈降性の動きとの間で平衡状態にあり、跳躍的な動きはアミロプラストが長いケーブル状の F-アクチンに沿って動くことで生じる (Nakamura et al., 2011)。 *sgr9*

変異体において、アミロプラストの跳躍的な動きが野生型より増加していたことから、**SGR9** は F-アクチンとアミロプラストの相互作用を阻害し、沈降性の動きを増加させることで、アミロプラストの重力方向への移動に寄与している可能性が示されている (Nakamura et al., 2011)。

sgr6-1 変異体の花茎を縦断切片にし、5~10 分後に内皮細胞を観察したところ、8 割近い細胞が液胞膜の動的構造を持たなかった。そこで、花茎切片作成から 5~10 分の時点で液胞膜の動的構造を持つ残り 2 割の細胞に着目したところ、次第に動的構造に異常が現れ、切片作成から 30 分後には動的構造が著しく損なわれた (図 43, 44)。*sgr6-1* 変異体の花茎縦断切片の一部の内皮細胞において見られるこのような液胞膜構造の変化は、これまでに解析された *sgr* 変異体には見られない。しかしながら、*sgr6-1* 変異体の花茎切片作成から 5~10 分の時点ですでに液胞膜の動的構造が失われている内皮細胞と、切片作成から 25~30 分経過したとき液胞膜の動的構造が失われている内皮細胞は、液胞膜構造とアミロプラスト動態において、*zig-1* 変異体の内皮細胞と似ている。*zig-1* 変異体の内皮細胞を電子顕微鏡で観察すると、アミロプラストは液胞膜にとり囲まれず、中央液胞に押しやられるようにして細胞の上部、下部に偏って存在していた。また、液胞膜構造に異常が観察された (Morita et al., 2002)。さらに、*zig-1* 変異体の生きた内皮細胞を観察すると、液胞膜の動的構造は完全に失われており、アミロプラストはほとんど動かなかった (Saito et al., 2005)。これらのことから、内皮細胞内の正常な液胞膜構造の形成がアミロプラストの存在状態や動態を介して花茎の重力屈性に重要であることが示唆されている。したがって、*sgr6-1* 変異体の内皮細胞で見られた液胞膜構造の変化と合わせると、**SGR6** もまた液胞膜の動的構造の形成/維持を介してアミロプラストの重力方向への移動に関与している可能性が示唆された。

では、*sgr6-1* 変異体において、F-アクチンが影響を受けている可能性はないだろうか？シロイヌナズナのトライコームをアクチンフィラメントの重合阻害剤であるラトランキュリン B で処理すると細胞内の液胞が小胞化する (Ovečka et al., 2005)。また、ユリの花粉管をラトランキュリン B で処理すると花粉管内の液胞の形態と膜動態が異常になる (Lovy-Wheeler et al., 2007)。このように液胞の正常な形態形成や膜動態には F-アクチンが必要であることから、*sgr6-1* 変異は内皮細胞内の F-アクチンの性質を変化させ、この性質の変化した F-アクチンが液胞膜の動的構造に影響を及ぼしている可能性も考えられる。したがって、今後、*sgr6-1* 変異体の内皮細胞における F-アクチン、液胞と F-アクチンの関係性を調べる必要がある。

***sgr6-1* 変異体の花茎内皮細胞で見られた液胞膜構造異常から考えられる SGR6**

の機能

sgr6-1 変異体の花茎を切片にして内皮細胞を観察すると、液胞膜の動的構造に異常が見られたことから、**SGR6** は花茎内皮細胞内の、少なくとも液胞膜の動的構造の形成/維持に関与していると推測される。

では、**SGR6** はどのようにして液胞膜の動的構造の形成/維持に関与しているのだろうか？Saito ら (2002)によるバルブの観察や、内皮細胞の電子顕微鏡像から、バルブやシートを形成する液胞膜は、液胞外周部の膜とつながっていると推測される。実際に野生型の内皮細胞の 4D イメージング解析から、内腔内の液胞膜構造が形態を変えつつ活発に動きながら液胞外周部の膜に取り込まれる様子が観察された (図 57)。これらのことから、内腔で新しく形成された動的構造の膜や、奥行きを持って形態が大きく変化していく動的構造の膜は、液胞外周部の膜が元になっていると考えられる。一方 *sgr6-1* 変異体の花茎を切って 10 分後の内皮細胞において、液胞膜構造の一部は折りたたまるようして内腔に蓄積していた (図 58A)。この様子は液胞膜構造が形態変化をともなった動態を正常に行うことができず、その結果、内腔側の膜が液胞外周部の膜へ円滑に取り込まれず行き場を失って溜まっているように見える。細胞内の液胞膜は限られており、*sgr6-1* 変異体の内皮細胞においてこのように液胞膜が内腔に蓄積すると、液胞外周部の膜から新しく別の動的構造を形成したり、すでに存在する動的構造の形態変化を起こすための膜が不足する可能性が考えられる。このため液胞全体として、新しく動的構造を形成する、あるいは動的構造の形態を変化させる能力を失ったように見えるのかもしれない。さらに、このような液胞膜構造の動態や形成に異常がある状態が続くと、結果として膜が小胞化する、もしくは小胞化したように見えるのかもしれない。

SGR6 の生化学的解析から、**SGR6** は膜に結合した膜表在型タンパク質であること (図 50, 51)、また局在解析から、**SGR6** は内皮細胞内の液胞膜近傍に局在する可能性が示された (図 52-56)。したがって上記の考察と合わせると、**SGR6** は内皮細胞内の液胞膜上で内腔に陥入した液胞膜構造の形態変化や動態を制御し、内腔部分の膜と液胞外周部の膜とを頻繁に入れ替えることで、液胞膜の動的構造の形成/維持に関与しているのかもしれない。すでに述べたように、植物細胞の液胞の形態形成や膜動態にアクチンが関与することが示されている。**SGR6** は HEAT タンパク質であり、他のタンパク質と結合して機能している可能性が考えられる。これらのことから、液胞膜上の **SGR6** を含むタンパク質複合体がアクチン繊維と相互作用し、この相互作用を介して **SGR6** は液胞膜の形態変化や動態を制御しているのかもしれない。今後、**SGR6** がどのように液胞膜構造の形態変化や動態を制御しているのかを調べるため、4D イメージングを用いて野生型および *sgr6-1* 変異体の内皮細胞内の液胞膜構造、そして **SGR6** と

液胞膜との関係性をより詳細に解析する必要がある。さらに、液胞膜構造の形態変化や動態を制御する分子機構を知るため、*SGR6* の分子機能や相互作用因子を明らかにする必要がある。

sgr6-1 変異体は花茎の重力屈性における表現型が弱く、*sgr6-1* 変異体の固定した花茎切片試料の内皮細胞において、細胞の下部以外に存在するアミロプラストの個数が野生型より多いものの、7割のアミロプラストが細胞の下部に存在した (図 47)。これらのことから、*sgr6-1* 変異体の花茎切片作成から 5~10 分の時点で液胞膜の動的構造を持たない 8 割の内皮細胞において、花茎切断以前は液胞膜の動的構造は大きくは影響を受けていないと考えられる。したがって、野生型の生きた花茎の内皮細胞における、*SGR6* の液胞膜構造の形態変化や動態制御に対する貢献度はそれほど高くない可能性がある。しかしながら、花茎を固定せずに切片にすると、*SGR6* が機能を失っている条件下では劇的な液胞膜構造の変化が見られた (図 43, 44, 58)。今回、内皮細胞観察のため、花茎を縦断した後、切片をすぐさま 1×MS 液体培地 (「材料と方法」参照) に浸した。出芽酵母を高濃度の NaCl で処理すると、液胞が小胞化することから (Bonangelino et al., 2002)、*sgr6-1* 変異体においても花茎切片を浸した 1×MS 液体培地の塩濃度が液胞膜構造に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、0.5×MS、0.1×MS、-MS のいずれかの液体培地に花茎切片を浸して観察を行った。その結果、野生型においてはいずれの液体培地を用いた場合も、30 分間の観察中、液胞膜の動的構造に大きな変化は見られなかった (data not shown)。一方、*sgr6-1* 変異体においてはいずれの液体培地を用いた場合も、液胞膜の動的構造が著しく損なわれた (data not shown)。つまり、*sgr6-1* 変異体の花茎切片で見られた液胞膜構造の変化は液体培地中の MS の濃度に大きく依存しないことがわかった。現在のところ、*sgr6-1* 変異体の花茎切片中の内皮細胞において液胞膜構造が劇的に変化していく要因は明らかになっていないが、花茎を切片にすることは、内皮細胞において *sgr6-1* 変異が液胞膜構造の形態変化や動態に与える影響に相加的に作用した可能性が考えられる。今後、このような液胞膜構造の変化を回復させるような薬剤を検討することは、*SGR6* がどのようにして液胞膜構造の形態変化や動態を制御しているのかを解くための鍵となる可能性がある。

SGR6 は内皮以外の細胞の液胞膜構造の形成/維持に関与するのか？

GUS を用いた *SGR6* の発現解析から、*SGR6* プロモーターは孔辺細胞において強い活性を持つことがわかった。孔辺細胞においても、液胞はバルブや原形質糸といった液胞膜構造を持ち、気孔の開閉は、孔辺細胞内の液胞の個数と体積の変化と連動して起こる (Gao et al., 2005; Tanaka et al., 2007)。気孔が開い

ているとき、孔辺細胞内は数個の大きな液胞によって占められている。暗条件下におく、あるいはアブシジン酸 (ABA) を与えると気孔が閉じるが、このとき孔辺細胞内の液胞は小胞化し、孔辺細胞と液胞の体積は開孔時より 20% ほど減少する (Tanaka et al., 2007)。このように、孔辺細胞内の液胞は体積を変化させることで、孔辺細胞全体の膨圧を調整し、気孔の開閉を制御していると考えられる。今回、*sgr6-1* 変異体の解析から、**SGR6** は内皮細胞内の液胞膜構造の形成/維持に関与している可能性が示された。したがって、**SGR6** は気孔の開閉時においても孔辺細胞内の液胞膜の構造変化に関与しているのかもしれない。今後、**SGR6** が気孔の開閉を含めた、重力屈性以外の植物固有の高次機能にも関与する可能性を探ることによって、植物細胞で見られる液胞膜動態の生物学的意味、さらには液胞膜動態が支える植物液胞の新しい機能を明らかにできると期待している。

結語

シロイヌナズナ花茎の重力屈性を通して見えた植物の液胞機能解析の可能性

植物において液胞は個体の生存に必須である。またその生成、機能に関わる因子の多くはゲノム中で重複している。このため、液胞生成や液胞機能に必須な因子が機能重複を持たない場合、その遺伝子破壊は致死となり、逆に機能重複を持つ場合は表現型が出ず、順遺伝学的解析を用いてこのような因子の高次機能における役割を知ることは難しい。

本研究室では、シロイヌナズナの花茎の重力屈性に異常を示す *sgr2*, *sgr3*, *zig* 変異体の解析を通して、花茎内皮細胞内の液胞の生成や膜構造形成に関与する因子を明らかにしてきた (Kato et al., 2002; Morita et al., 2002; Yano et al., 2003)。また、*zig* 変異を抑圧するサプレッサーの解析を通して、液胞の生成や膜構造形成に関わる遺伝子のパラログ間の機能の重複度や関係性を明らかにしてきた (Niihama et al., 2005)。興味深いことに、*sgr2*, *sgr3* 変異体は、内皮細胞内の液胞膜構造に異常を持つにも関わらず、光、水分、栄養等が十分な環境下では生育はほぼ正常である (Fukaki et al., 1996; Kato et al., 2002; Yano et al., 2003)。また、*zig* サプレッサーは *zig* 変異体よりも形態や重力屈性における表現型が回復している (Niihama et al., 2005; Niihama et al., 2009)。このことから、花茎の重力屈性異常変異体や *zig* サプレッサーは、高次の生理機能と関連付いた形で液胞の生成や膜構造形成、さらには膜動態の分子基盤を解析するためのツールとなり得ることがわかった。実際、今回の *zig* 変異抑圧効果を指標とした *ZIP3* およびレトロマー構成因子の解析から、高等植物の液胞生成や膜構造形成のための小胞輸送系の機能は酵母や動物より多様化しており、高等植物特異的な小胞輸送系の分子基盤が存在する可能性が示された。また、*sgr6* 変異体の解析から、*SGR6* が内皮細胞内の液胞膜の動的構造の形成/維持に関与する新規因子である可能性が示された。

植物にとって液胞は、外界から受ける様々な刺激やストレス、さらには地球規模での環境変化に適応して生存していくために必須のオルガネラであり、液胞へ至る小胞輸送経路の多様性や液胞膜動態を含めた液胞のダイナミズムは、植物の環境適応能力を支える一つの鍵要素であると考えられる。今後、重力屈性以外の高次機能を指標としてレトロマー構成因子や *SGR6* を解析することで、液胞機能を介した植物の未知の環境適応能力に迫ることができるかもしれない。

謝辞

本研究は、二年間の修士課程と三年間の博士後期課程において行われましたが、この二つの課程の間には一年間のブランクがありました。

田坂昌生教授、ならびに森田(寺尾)美代准教授は、本研究科入学以前から、重力屈性の魅力を示してくださいました。また、修士課程修了後、一度 NASIT を去るときも、一年経ってまた戻って来るときも、それらを聞き入れてくださいました。五年間にわたる教育において賜りました、適宜的確なご助言、ご指導、そしていつ何時も私の意思を尊重して下さったことに対し、深く深く、感謝申し上げます。

そして、九州大学大学院システム生命科学府の藤木幸夫教授には、一年間の技術補佐員としての勤務の後、博士後期課程へ復学することを受け入れてくださいましたこと、心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、University of California, RiversideのNatasha Raikhel 博士には抗VTI12抗体を、京都府立大学大学院生命環境科学研究科の佐藤雅彦博士には抗SYP22/VAM3抗体を、京都大学大学院理学研究科の西村いくこ博士、ならびに嶋田知生博士には抗VPS35A抗体と *maigo1-1* 種子を、東京大学大学院理学系研究科の上田貴志博士、ならびに植村知博博士には *VAM3pro:mRFP-VAM3/vam 3-1* 種子を分与していただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

NAIST での五年間、日々研究に専念する原動力をそれとはなしに与えてくれた田坂研究室の皆様に、心より感謝申し上げます。とりわけ、修士一年の間、*zig suppressor3* の研究について有益なご助言を、また、実験手技等で熱心なご指導を賜りました新濱充博士に、格別な感謝の意を表したく思います。

五年間の研究生活に耐えうる健全な精神と身体を授けてくれた故郷福岡の両親と、いつも無条件に気遣ってくれた姉弟とに、心から感謝いたします。

最後に、一度もお会いすることは叶いませんでしたが、ご自身の投稿論文を通じて私に最初に重力屈性研究の存在を教えてください、*SHOOT GRAVITROPISM6* について、たくさんの素晴らしい研究を残してゆかれた矢野大輔氏に、こころから哀悼の意と感謝の意を表しますとともに、重力屈性研究のさらなる発展に微力ながら貢献いたしますことを、約束したく思います。

どうか、いつも見守っていてください。

参考文献

Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Müller, C.W., and Bork, P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J Mol Biol* 309, 1-18.

Bassham, D.C., Sanderfoot, A.A., Kovaleva, V., Zheng, H.Y., and Raikhel, N.V. (2000). AtVPS45 complex formation at the trans-Golgi network. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2251-2265.

Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., and Scheller, R.H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839-841.

Bonangelino, C.J., Nau, J.J., Duex, J.E., Brinkman, M., Wurmser, A.E., Gary, J.D., Emr, S.D., and Weisman, L.S. (2002). Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p. *J Cell Biol* 156, 1015-1028.

Bowers, K., and Stevens, T.H. (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1744, 438-454.

Cereghino, J.L., Marcusson, E.G., and Emr, S.D. (1995). THE CYTOPLASMIC TAIL DOMAIN OF THE VACUOLAR PROTEIN SORTING RECEPTOR VPS10P AND A SUBSET OF VPS GENE-PRODUCTS REGULATE RECEPTOR STABILITY, FUNCTION, AND LOCALIZATION. *Molecular Biology of the Cell* 6, 1089-1102.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16, 735-743.

Cooper, A.A., and Stevens, T.H. (1996). Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *Journal of Cell Biology* 133, 529-541.

Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M.H., Thordal-Christensen, H., Tsutsumi, N., Nakano, A., and Ueda, T. (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat Cell Biol* 13, 853-859.

Escobar, N.M., Haupt, S., Thow, G., Boevink, P., Chapman, S., and Oparka, K. (2003). High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *Plant Cell* 15, 1507-1523.

Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M. (1996). SGR1, SGR2, SGR3: novel genetic loci involved in shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 110, 945-955.

Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Kato, T., Fujisawa, H., Benfey, P.N., and Tasaka, M. (1998). Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14, 425-430.

Gao, X.Q., Li, C.G., Wei, P.C., Zhang, X.Y., Chen, J., and Wang, X.C. (2005). The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiol* 139, 1207-1216.

Haft, C.R., Sierra, M.D.L., Bafford, R., Lesniak, M.A., Barr, V.A., and Taylor, S.I. (2000). Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: Assembly into multimeric complexes. *Molecular Biology of the Cell* 11, 4105-4116.

Hanton, S.L., and Brandizzi, F. (2006). Fluorescent proteins as markers in the plant secretory pathway. *Microsc Res Tech* 69, 152-159.

Higaki, T., Kutsuna, N., Okubo, E., Sano, T., and Hasezawa, S. (2006). Actin microfilaments regulate vacuolar structures and dynamics: dual observation of actin microfilaments and vacuolar membrane in living tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiol* 47, 839-852.

Horazdovsky, B.F., Davies, B.A., Seaman, M.N.J., McLaughlin, S.A., Yoon, S., and Emr, S.D. (1997). A sorting nexin-1 homologue, vps5p, forms a complex with vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1529-1541.

Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 631-643.

Jaillais, Y., Santambrogio, M., Rozier, F., Fobis-Loisy, I., Miege, C., and Gaude, T. (2007). The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell* 130, 1057-1070.

Kato, T., Morita, M., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama, M., and Tasaka, M. (2002). SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of Arabidopsis. *PLANT CELL* 14, 33-46.

Li, S.C., and Kane, P.M. (2009). The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim Biophys Acta* 1793, 650-663.

Lipka, V., Kwon, C., and Panstruga, R. (2007). SNARE-Ware: The role of SNARE-Domain proteins in plant biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23, 147-174.

Lovy-Wheeler, A., Cárdenas, L., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (2007). Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes. *Cell Motil Cytoskeleton* 64, 217-232.

Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., and Emr, S.D. (1994). THE SORTING RECEPTOR FOR YEAST VACUOLAR CARBOXYPEPTIDASE-Y IS ENCODED BY THE VPS10 GENE. *Cell* 77, 579-586.

Mohanty, A., Luo, A., DeBlasio, S., Ling, X., Yang, Y., Tuthill, D.E., Williams, K.E., Hill, D., Zadrozny, T., Chan, A., Sylvester, A.W., and Jackson, D. (2009).

Advancing cell biology and functional genomics in maize using fluorescent protein-tagged lines. *Plant Physiol* 149, 601-605.

Morita, M.T. (2010). Directional gravity sensing in gravitropism. *Annu Rev Plant Biol* 61, 705-720.

Morita, M.T., Kato, T., Nagafusa, K., Saito, C., Ueda, T., Nakano, A., and Tasaka, M. (2002). Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 47-56.

Müntz, K. (2007). Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *J Exp Bot* 58, 2391-2407.

Nakamura, M., Toyota, M., Tasaka, M., and Morita, M.T. (2011). An *Arabidopsis* E3 ligase, SHOOT GRAVITROPISM9, modulates the interaction between statoliths and F-actin in gravity sensing. *Plant Cell* 23, 1830-1848.

Niihama, M., Takemoto, N., Hashiguchi, Y., Tasaka, M., and Morita, M.T. (2009). ZIP genes encode proteins involved in membrane trafficking of the TGN-PVC/vacuoles. *Plant Cell Physiol* 50, 2057-2068.

Niihama, M., Uemura, T., Saito, C., Nakano, A., Sato, M., Tasaka, M., and Morita, M. (2005). Conversion of functional specificity in Qb-SNARE VTI1 homologues of *Arabidopsis*. *CURRENT BIOLOGY* 15, 555-560.

Nothwehr, S.F., and Hines, A.E. (1997). The yeast VPS5/GRD2 gene encodes a sorting nexin-1-like protein required for localizing membrane proteins to the late Golgi. *Journal of Cell Science* 110, 1063-1072.

Oda, Y., Higaki, T., Hasezawa, S., and Kutsuna, N. (2009). Chapter 3. New insights into plant vacuolar structure and dynamics. *Int Rev Cell Mol Biol* 277, 103-135.

Oliviussen, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y.C., Jiang, L.W., and Robinson, D.G. (2006). Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in *Arabidopsis*, may interact with vacuolar

sorting receptors. *Plant Cell* 18, 1239-1252.

Ovečka, M., Lang, I., Baluska, F., Ismail, A., Illes, P., and Lichtscheidl, I.K. (2005). Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* 226, 39-54.

Perry, J., and Kleckner, N. (2003). The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell* 112, 151-155.

Reddy, J.V., and Seaman, M.N.J. (2001). Vps26p, a component of retromer, directs the interactions of Vps35p in endosome-to-Golgi retrieval. *Molecular Biology of the Cell* 12, 3242-3256.

Reisen, D., Marty, F., and Leborgne-Castel, N. (2005). New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biol* 5, 13.

Ruthardt, N., Gulde, N., Spiegel, H., Fischer, R., and Emans, N. (2005). Four-dimensional imaging of transvacuolar strand dynamics in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 225, 205-215.

Rutherford, S., and Moore, I. (2002). The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr Opin Plant Biol* 5, 518-528.

Saito, C., and Ueda, T. (2009). Chapter 4: functions of RAB and SNARE proteins in plant life. *Int Rev Cell Mol Biol* 274, 183-233.

Saito, C., Morita, M.T., Kato, T., and Tasaka, M. (2005). Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the Arabidopsis inflorescence stem. *Plant Cell* 17, 548-558.

Saito, C., Ueda, T., Abe, H., Wada, Y., Kuroiwa, T., Hisada, A., Furuya, M., and Nakano, A. (2002). A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of Arabidopsis. *Plant J* 29, 245-255.

Sanderfoot, A. (2007). Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants. *Plant Physiol* 144, 6-17.

Sanderfoot, A.A., Kovaleva, V., Zheng, H.Y., and Raikhel, N.V. (1999). The t-SNARE AtVAM3p resides on the prevacuolar compartment in arabidopsis root cells. *Plant Physiology* 121, 929-938.

Sanderfoot, A.A., Kovaleva, V., Bassham, D.C., and Raikhel, N.V. (2001). Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the golgi/prevacuolar system of the arabidopsis cell. *Molecular Biology of the Cell* 12, 3733-3743.

Sato, M.H., Nakamura, N., Ohsumi, Y., Kouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., and Wada, Y. (1997). The AtVAM3 encodes a syntaxin-related molecule implicated in the vacuolar assembly in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 24530-24535.

Seaman, M.N.J. (2005). Recycle your receptors with retromer. *Trends in Cell Biology* 15, 68-75.

Seaman, M.N.J., McCaffery, J.M., and Emr, S.D. (1998). A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *Journal of Cell Biology* 142, 665-681.

Seaman, M.N.J., Marcusson, E.G., Cereghino, J.L., and Emr, S.D. (1997). Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *Journal of Cell Biology* 137, 79-92.

Sheahan, M.B., Rose, R.J., and McCurdy, D.W. (2007). Actin-filament-dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts. *Protoplasma* 230, 141-152.

Shimada, T., Koumoto, Y., Li, L.X., Yamazaki, M., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2006). AtVPS29, a putative component of a retromer complex, is required for the efficient sorting of seed storage

proteins. *Plant and Cell Physiology* 47, 1187-1194.

Silady, R.A., Kato, T., Lukowitz, W., Sieber, P., Tasaka, M., and Somerville, C.R. (2004). The gravitropism defective 2 mutants of *Arabidopsis* are deficient in a protein implicated in endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Plant Physiology* 136, 3095-3103.

Silady, R.A., Ehrhardt, D.W., Jackson, K., Faulkner, C., Oparka, K., and Somerville, C.R. (2008). The GRV2/RME-8 protein of *Arabidopsis* functions in the late endocytic pathway and is required for vacuolar membrane flow. *Plant J* 53, 29-41.

Surpin, M., and Raikhel, N. (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 100-109.

Surpin, M., Zheng, H.J., Morita, M.T., Saito, C., Avila, E., Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Kovaleva, V., Carter, D., Murphy, A., Tasaka, M., and Raikhel, N. (2003). The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. *Plant Cell* 15, 2885-2899.

Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.

Tanaka, Y., Kutsuna, N., Kanazawa, Y., Kondo, N., Hasezawa, S., and Sano, T. (2007). Intra-vacuolar reserves of membranes during stomatal closure: the possible role of guard cell vacuoles estimated by 3-D reconstruction. *Plant Cell Physiol* 48, 1159-1169.

Uemura, T., Yoshimura, S.H., Takeyasu, K., and Sato, M.H. (2002). Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells* 7, 743-753.

Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R.L., Nakano, A., Takeyasu, K., and Sato, M.H. (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*:

Dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Structure and Function* 29, 49-65.

Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., and Pantoja, O. (2004). Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol* 135, 2318-2329.

vonMollard, G.F., Nothwehr, S.F., and Stevens, T.H. (1997). The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *Journal of Cell Biology* 137, 1511-1524.

Yamauchi, Y., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M. (1997). Mutations in the SGR4, SGR5 and SGR6 loci of *Arabidopsis thaliana* alter the shoot gravitropism. *Plant Cell Physiol* 38, 530-535.

Yamazaki, M., Shimada, T., Takahashi, H., Tamura, K., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2008). *Arabidopsis* VPS35, a retromer component, is required for vacuolar protein sorting and involved in plant growth and leaf senescence. *Plant Cell Physiol* 49, 142-156.

Yano, D., Sato, M., Saito, C., Sato, M.H., Morita, M.T., and Tasaka, M. (2003). A SNARE complex containing SGR3/AtVAM3 and ZIG/VTI11 in gravity-sensing cells is important for *Arabidopsis* shoot gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8589-8594.

Zheng, H.Y., von Mollard, G.F., Kovaleva, V., Stevens, T.H., and Raikhel, N.V. (1999). The plant vesicle-associated SNARE AtVTI1a likely mediates vesicle transport from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment. *Molecular Biology of the Cell* 10, 2251-2264.

Zouhar, J., and Rojo, E. (2009). Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading? *Curr Opin Plant Biol* 12, 677-684.

安藤 鮎美 修士論文 (2007) 重力屈性に関与するシロイヌナズナ SGR2 の

機能解析

阪口 敬太郎 修士論文 (2005) シロイヌナズナ花茎の重力刺激応答性遺伝子群の解析

高橋 徹也 修士論文 (2004) シロイヌナズナの重力屈性及び形態に関与する小胞輸送のプロテオミクス及び遺伝学的解析

長房 清志 修士論文 (2001) シロイヌナズナの花茎の重力屈性異常変異株、*sgr6*の解析、並びに *SGR2*の機能解析

新濱 充 修士論文 (2002) シロイヌナズナ重力屈性異常変異体 *zig/sgr4*のサブレッサー因子の解析

新濱 充 博士論文 (2005) 高等植物のポストゴルジネットワークにおける小胞輸送の分子遺伝学的解析

	VPS35	VPS29	VPS26
ヒト	<i>hVPS35</i>	<i>hVPS29</i>	<i>hVPS26A</i> <i>hVPS26B</i>
マウス	<i>mVps35</i>	<i>mVps29</i>	<i>mVps26A</i> <i>mVps26B</i>
ショウジョウバエ	<i>Dvps35</i>	<i>Dvps29</i>	<i>Dvps26</i>
線虫	<i>vps35</i>	<i>vps29</i>	<i>vps26</i>
シロイヌナズナ	<i>VPS35A</i> (At2g17790) <i>VPS35B</i> (At1g75850) <i>VPS35C</i> (At3g51310)	<i>VPS29</i> (At3g47810)	<i>VPS26A</i> (At5g53530) <i>VPS26B</i> (At4g27690)
イネ	Os03g0801600	Os02g0265400	Os11g0629200 Os12g0500700
出芽酵母	<i>Vps35</i>	<i>Vps29</i>	<i>Vps26</i>

表1. レトロマー複合体大サブユニットの構成因子。

レトロマー複合体大サブユニットの構成因子は多くの生物のゲノム中に高度に保存されている。シロイヌナズナのゲノムではVPS35について3つ、VPS26について2つのパラログが存在し、VPS29については単一遺伝子である。

シロイヌナズナの細胞

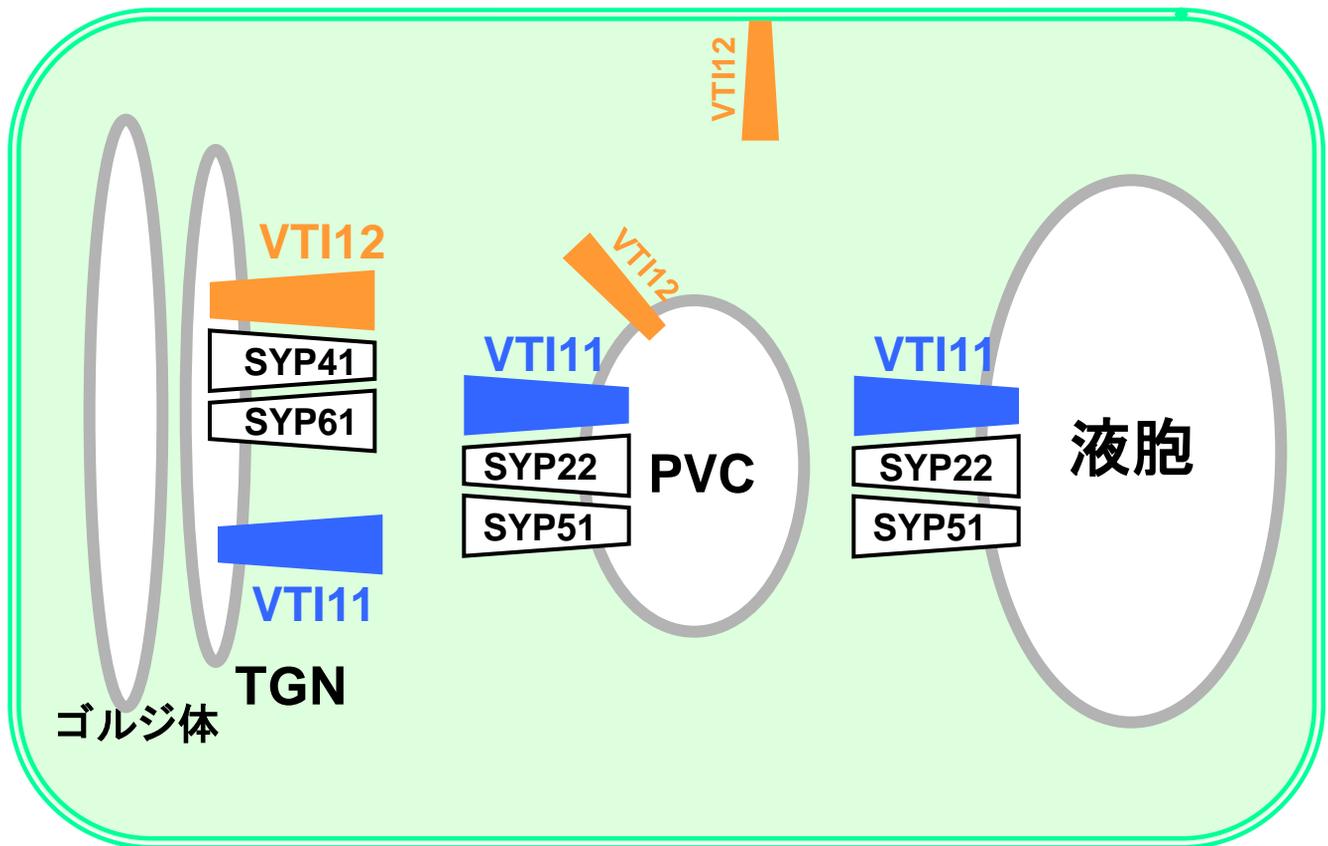


図1. シロイヌナズナZIG/VTI11とVTI12の細胞内局在モデル。

ZIG/VTI11はTGN, PVC, 液胞に局在し、PVCと液胞においてSYP22, SYP51と複合体を形成する。VTI12は主にTGNに局在し、SYP41, SYP61と複合体を形成する。また、VTI12の一部はPVCと細胞膜にも局在する。TGN; trans-Golgi network (トランスゴルジ網), PVC; prevacuolar compartment (液胞前区画)。

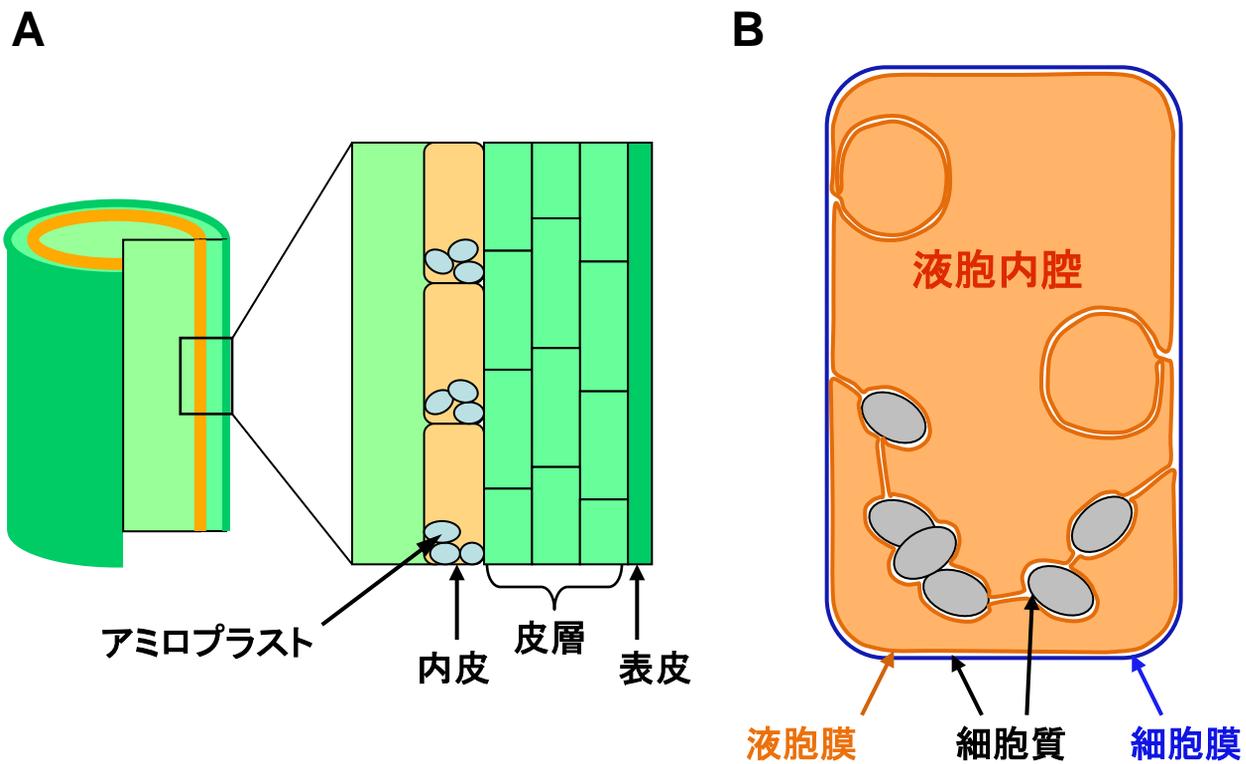


図2. シロイヌナズナの花茎の模式図

(A) シロイヌナズナの花茎の断面図と各組織の名称。

(B) 内皮細胞の拡大図。

出芽酵母

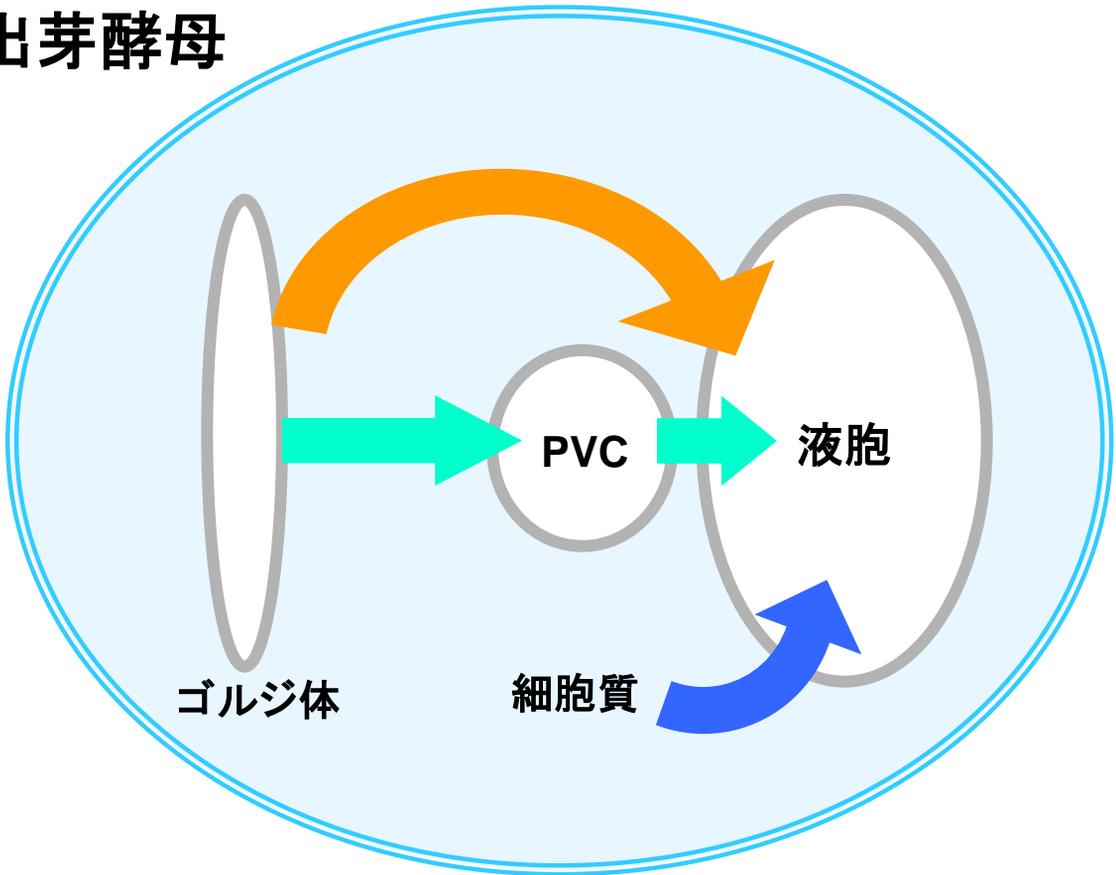


図3. 出芽酵母における液胞へ至る3つの小胞輸送経路。
緑; ゴルジ体からPVCを経由して液胞へ至る経路 (CPY経路)。
橙; ゴルジ体からPVCを経由せず液胞へ至る経路 (ALP経路)。
青; 細胞質から直接液胞へ至る経路 (Cvt経路)。

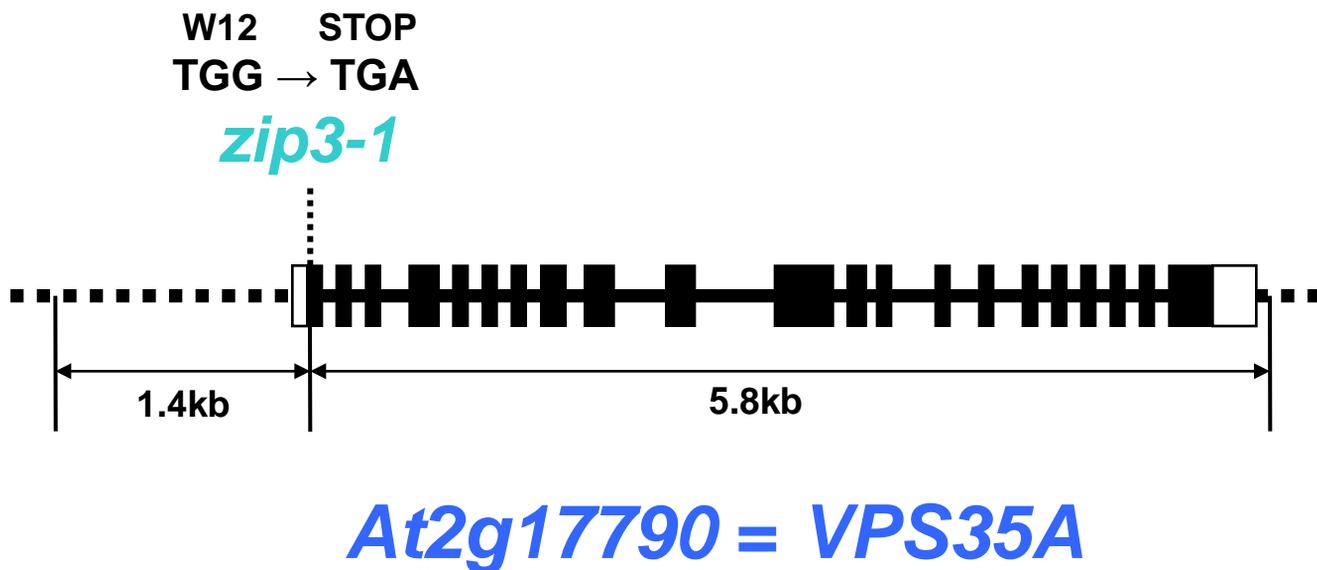


図4. *At2g17790*遺伝子の構造と*zip3*変異の位置。

*At2g17790*遺伝子は21エクソン (黒の四角)と20イントロン (黒の線)からなるORFを持ち、これはVPS35Aをコードする。相補性試験には、このORFを含む約5.8kbの領域と開始コドンから上流約1.4kbの予想プロモーター領域を含む全長約7.2kbのゲノム断片を用いた。白の四角はUTRを示す。

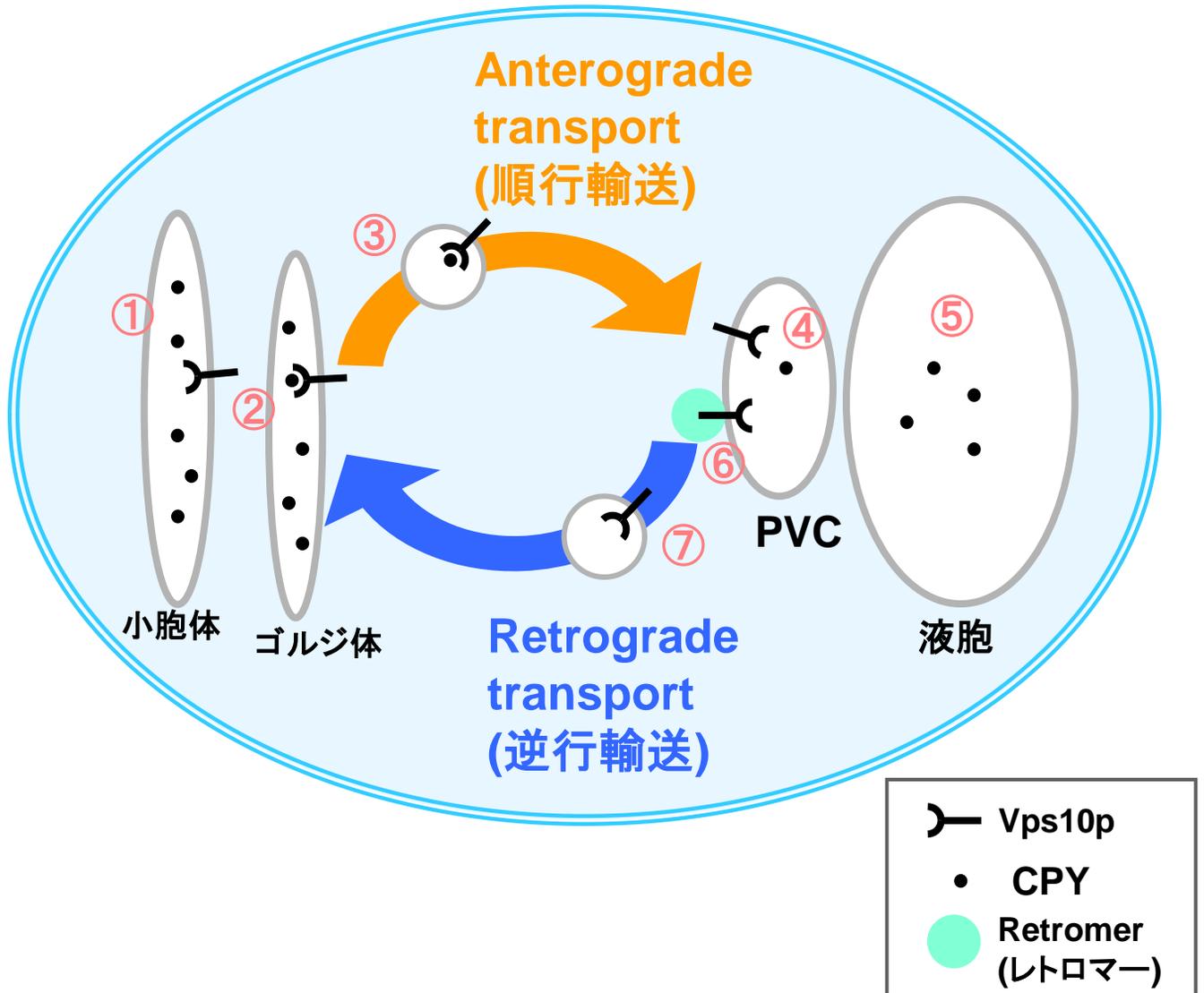


図5. 出芽酵母におけるカルボキシペプチダーゼY (CPY)の液胞への輸送のモデル。小胞体で新生されたCPY (①)はゴルジ体でVps10p受容体と結合し (②)、小胞に取り込まれたのち、PVCへ順行輸送される (③)。PVCでCPYとVps10pは解離し (④)、CPYは液胞へ送られる (⑤)。一方、Vps10pはレトロマーによって選別され (⑥)、PVCからゴルジ体へ逆行輸送される (⑦)。

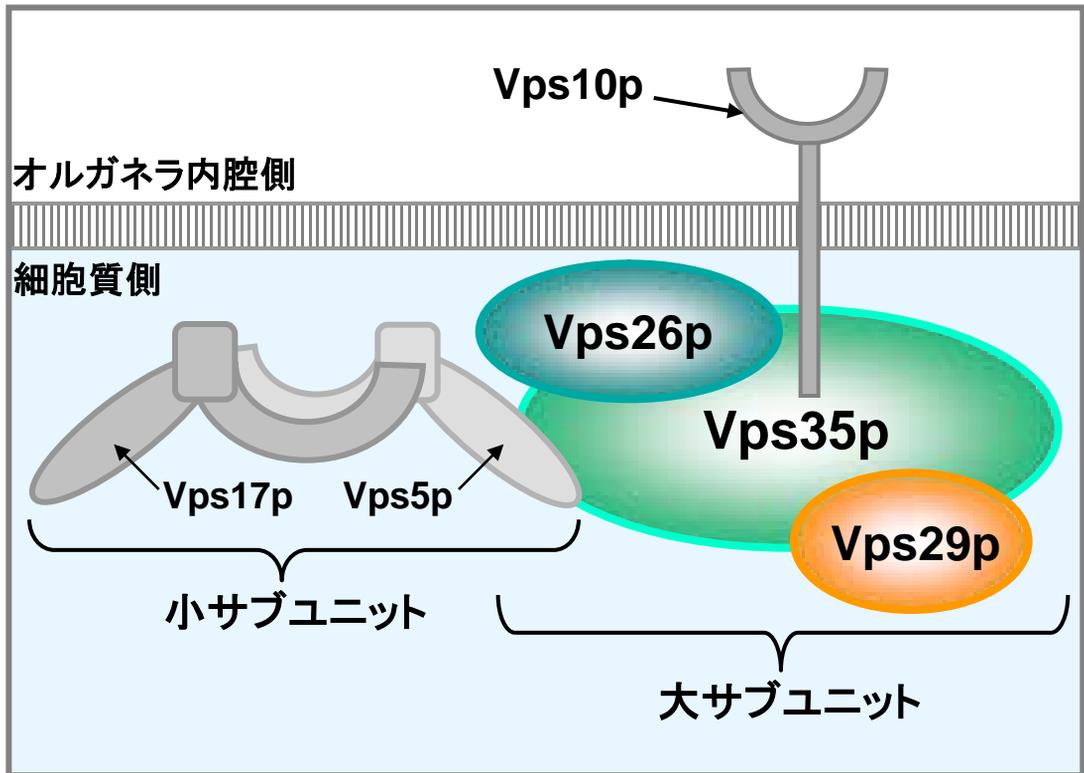


図6. 出芽酵母におけるレトロマー複合体のモデル。

出芽酵母において、レトロマーはPVCでVps10pのような積荷タンパク質を選別し、そのゴルジ体への逆行輸送を仲介する。レトロマーは細胞質側のオルガネラ膜近傍で大小二つのサブユニットを形成すると考えられている。このうち大サブユニットはVps35p, Vps26p, Vps29pから構成される (Seaman, 2005より改変)。

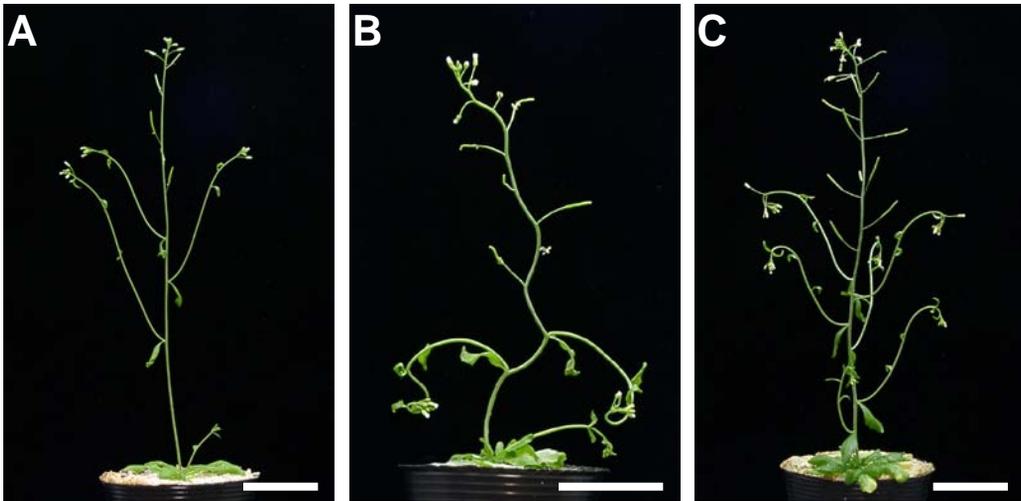


図7. 野生型, *zig-1*, *zip3-1 zig-1*の地上部の形態。
発芽後6週目の各植物体の地上部の形態。(A) 野生型, (B) *zig-1*, (C) *zip3-1 zig-1*。
スケールバーは3 cm。

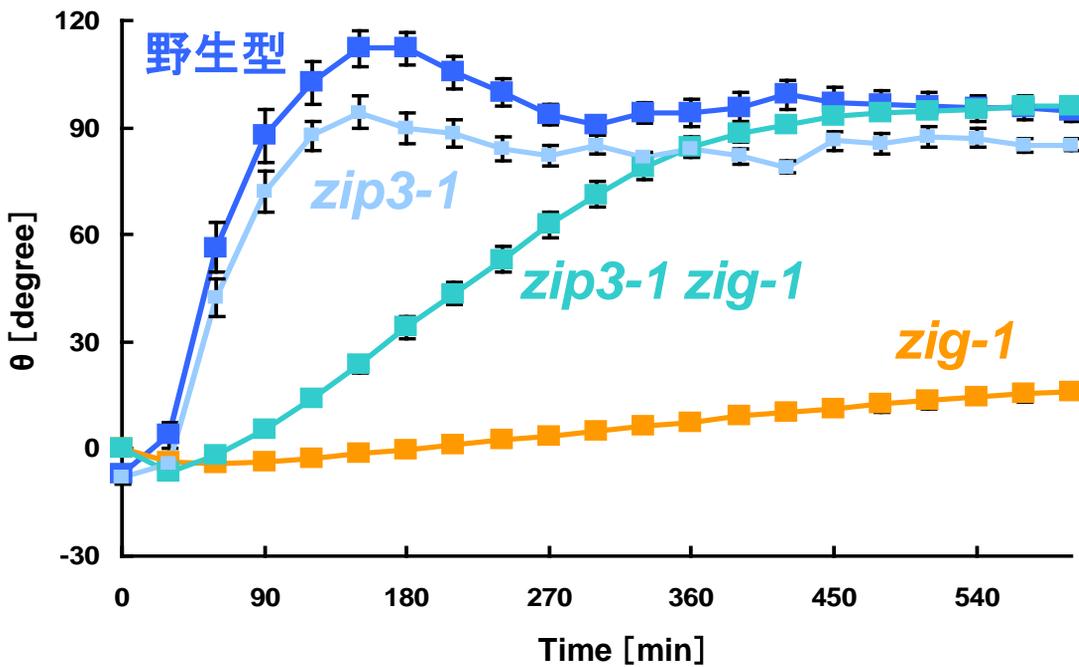
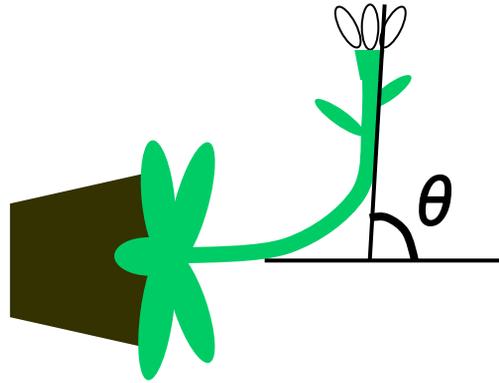


図8. 野生型, *zig-1*, *zip3-1 zig-1*, *zip3-1*の重力屈性反応。
 重力刺激を与えた時点をも0分、茎頂の伸長方向と水平方向の間を屈曲角度 (θ)とし、各経過時間における θ を計測した。N = 20、エラーバーは標準偏差 (SE)を示す。

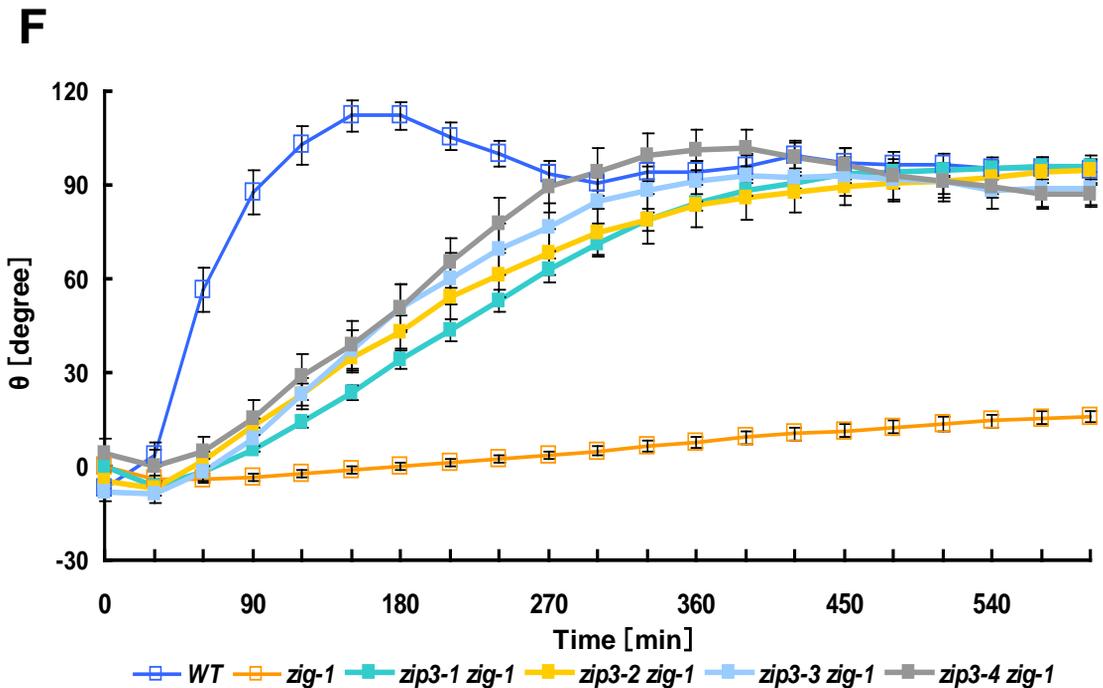
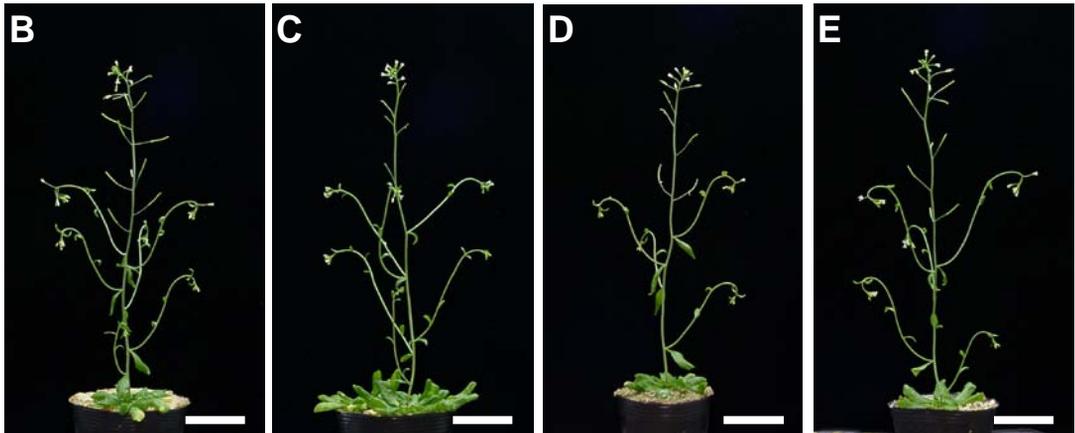
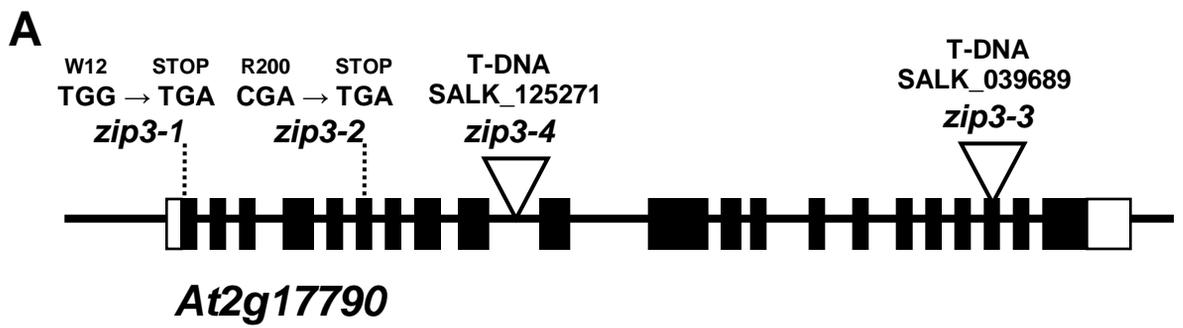


図9. *zip3*アレルと*zig-1*との二重変異体の地上部の形態と重力屈性反応。

(A) *zip3-1*と同じスクリーニングから独立して得られた*zip3-2*のAt2g17790遺伝子における変異位置と*zip3-3*, *zip3-4*のT-DNA挿入位置。

(B-E) 発芽後6週目の各植物体の地上部の形態。(B) *zip3-1 zig-1*, (C) *zip3-2 zig-1*, (D) *zip3-3 zig-1*, (E) *zip3-4 zig-1*。スケールバーは3 cm。

(F) 各植物体の花茎の重力屈性反応。N = 15 (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*はN = 20)。エラーバーはSEを示す。

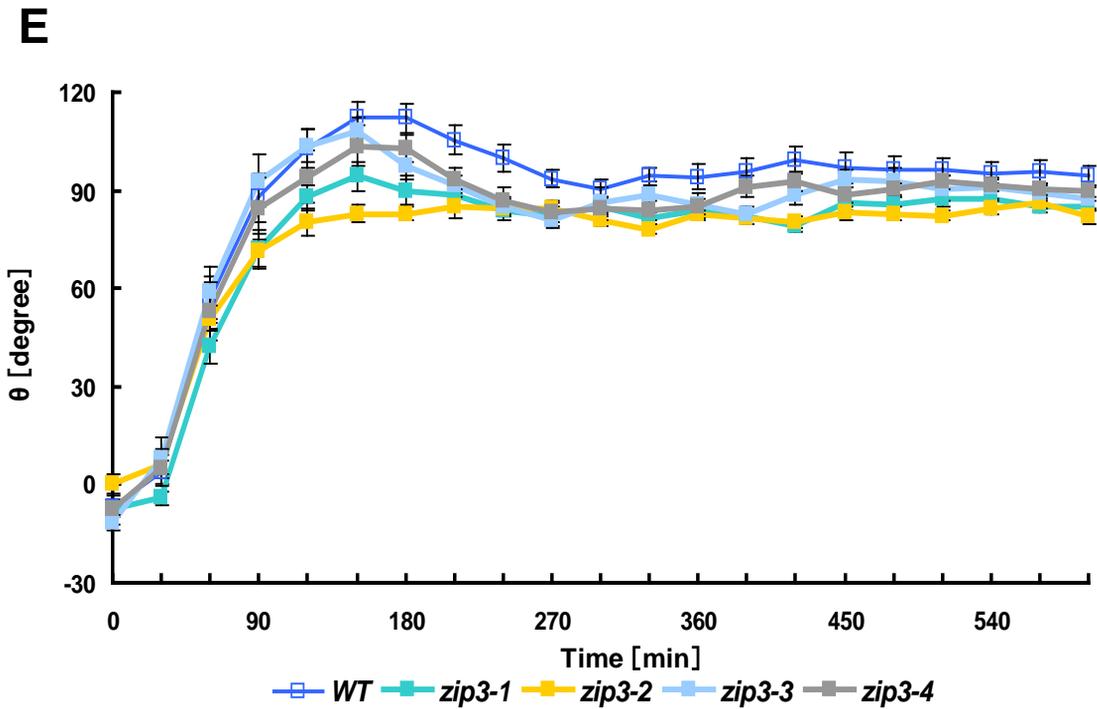
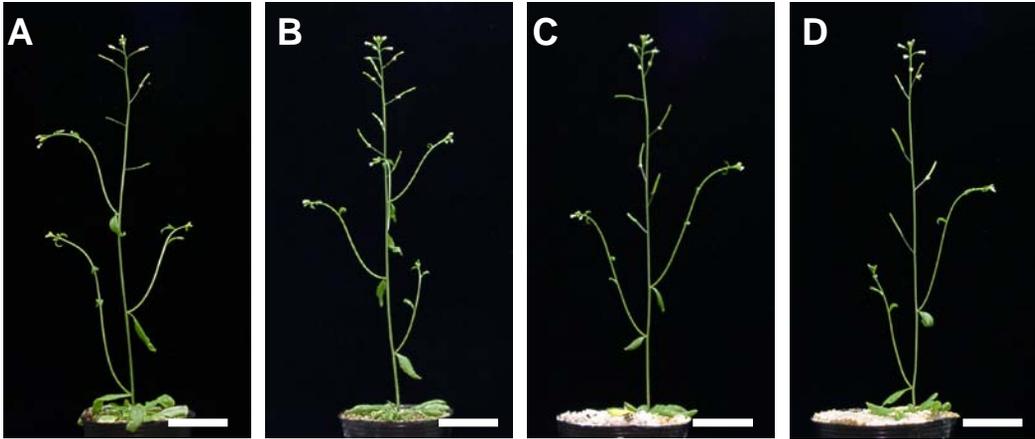


図10. *zip3*アレル単独変異体の地上部の形態と重力屈性反応。

(A-D) 発芽後6週目の各植物体の地上部の形態。(A) *zip3-1*, (B) *zip3-2*, (C) *zip3-3*, (D) *zip3-4*。スケールバーは3 cm。

(E) 各植物体の花茎の重力屈性反応。N = 15 (ただし、野生型、*zip3-1 zip3-1*は N = 20)。エラーバーはSEを示す。

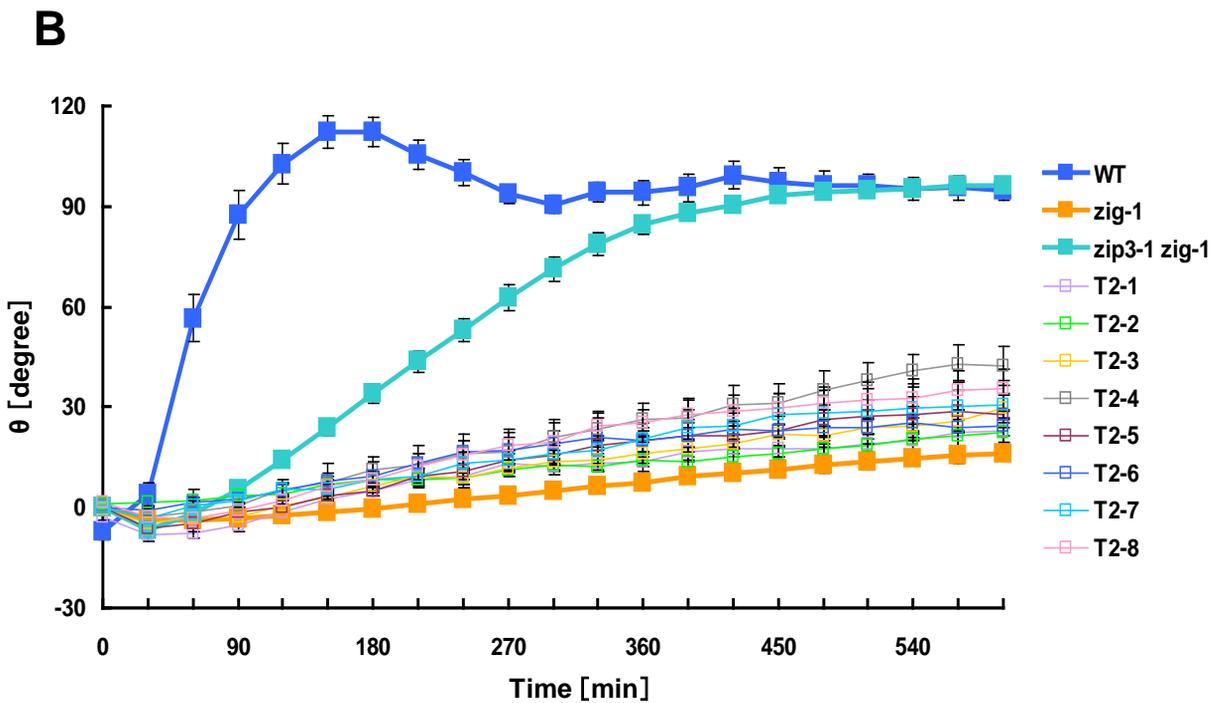
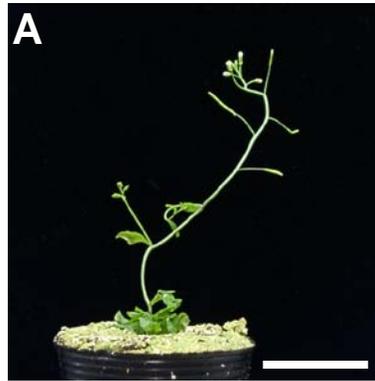


図11. *zip3-1 zig-1*二重変異体の相補性試験。

*zip3-1 zig-1*二重変異体に*At2g17790*遺伝子ゲノムを形質転換した植物体 (T2)の地上部の形態 (A) と重力屈性反応 (B)。形質転換体T2世代の1系統あたり10個体、計8系統について重力屈性測定を行った (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*はN = 20)。スケールバーは3 cm。エラーバーはSEを示す。

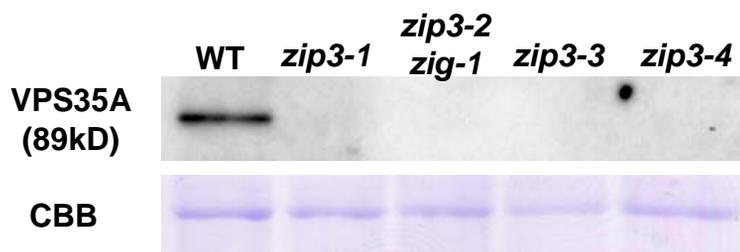
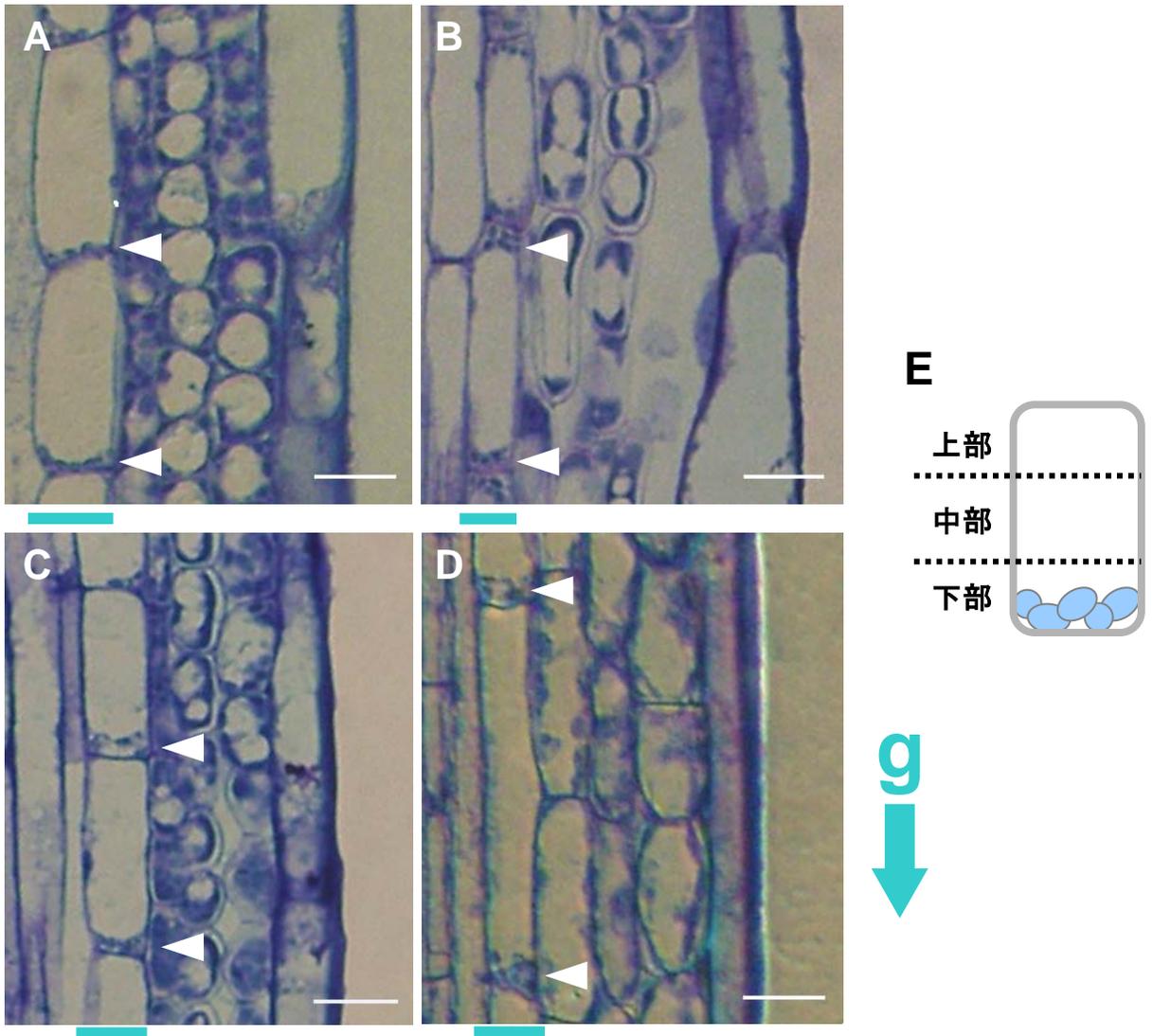


図12. *zip3*アレルにおけるVPS35Aタンパク質の発現。
 発芽後13日目の芽生えからタンパク質を抽出し、抗VPS35A抗体を用いてイムノブロット解析を行った。CBB染色は各レーンのtotalのタンパク質量が揃っていることを示す。



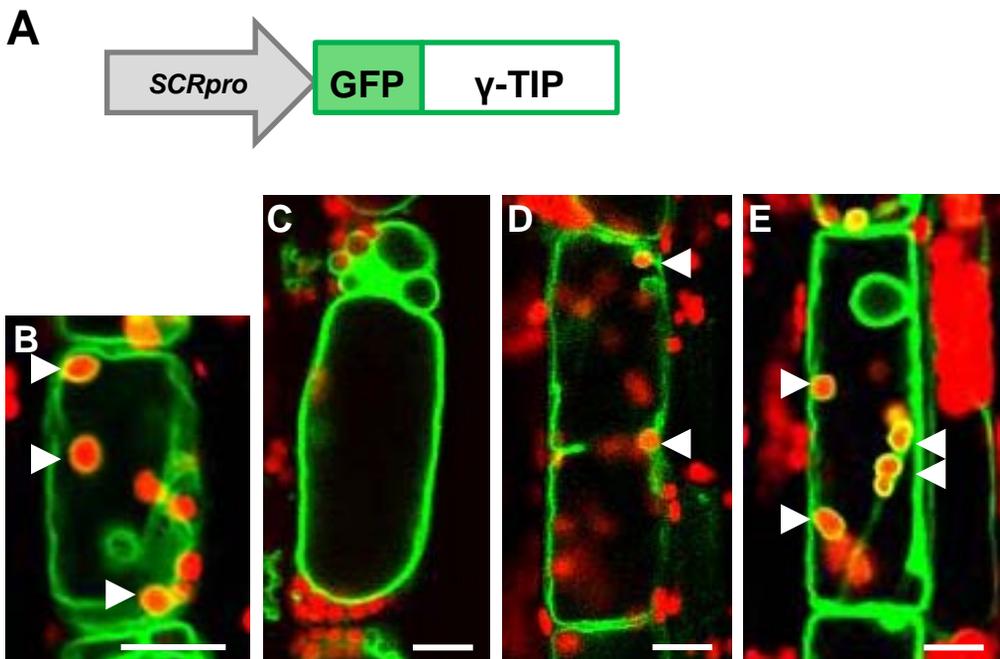
F

位置	野生型	<i>zig-1</i>	<i>zip3-1 zig-1</i>	<i>zip3-1</i>
上部	0.06 ± 0.03	3.2 ± 0.35	0.22 ± 0.07	0.04 ± 0.03
中部	0.18 ± 0.08	2.0 ± 0.51	0.36 ± 0.12	0.24 ± 0.09
下部	5.16 ± 0.24	2.94 ± 0.28	3.78 ± 0.29	4.8 ± 0.33

図13. 野生型, *zig-1*, *zip3-1 zig-1*, *zip3-1*の内皮細胞のアミロプラスト局在。

(A-D) 各植物体の花茎の縦断切片の顕微鏡写真。(A) 野生型, (B) *zig-1*, (C) *zip3-1 zig-1*, (D) *zip3-1*。緑の線は内皮細胞層、白の三角はアミロプラストを指し、gは重力方向を示す。スケールバーは20 μm。

(E,F) 内皮細胞を重力方向に従い上部、中部、下部に三等分し (E)、それぞれの区域におけるアミロプラストの個数を計測した (D)。N = 50、値は平均値 ± SEを示す。



F

	野生型	<i>zig-1</i>	<i>zip3-1 zig-1</i>	<i>zip3-1</i>
①	6.42 ± 0.46	4.12 ± 0.39	5.66 ± 0.48	6.6 ± 0.63
②	3.04 ± 0.34 (47.4%)	0.16 ± 0.0 (3.9%)	1.78 ± 0.23 (31.4%)	4.44 ± 0.49 (67.3%)
③	0.46 ± 0.21 (7.2%)	4.14 ± 0.39 (100%)	2.1 ± 0.30 (37.2%)	0.38 ± 0.14 (5.8%)
④	35	5	29	33
⑤	0	13	6	0

- ① 0分でのアミロプラストの個数
- ② そのうち液胞膜に包まれていたアミロプラストの個数
- ③ 5分間の観察中、動きのなかったアミロプラストの個数
- ④ 5分間の観察中、原形質糸 (transvacuolar strand) が見られた細胞数
- ⑤ 5分間の観察中、小胞様構造が見られた細胞数

図14. 野生型, *zig-1*, *zip3-1 zig-1*, *zip3-1*の内皮細胞のアミロプラストと液胞膜の動態。
 内皮特異的なプロモーター (*SCRpro*)の制御下でGFP融合型 γ -TIP (A)を発現させ、液胞膜を可視化した形質転換体の内皮細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。(B) 野生型, (C) *zig-1*, (D) *zip3-1 zig-1*, (E) *zip3-1*。緑のシグナルはGFP蛍光を、赤のシグナルはアミロプラストあるいはクロロプラストの自家蛍光を、白の三角は液胞膜に包まれているアミロプラストを示す。スケールバーは10 μ m。
 (F) 内皮細胞内のアミロプラストと液胞膜の挙動を①~⑤の項目について定量した。N = 50、値は平均値 \pm SEを示す。() 内の数値は0分でのアミロプラストの全個数に対する割合を示す。

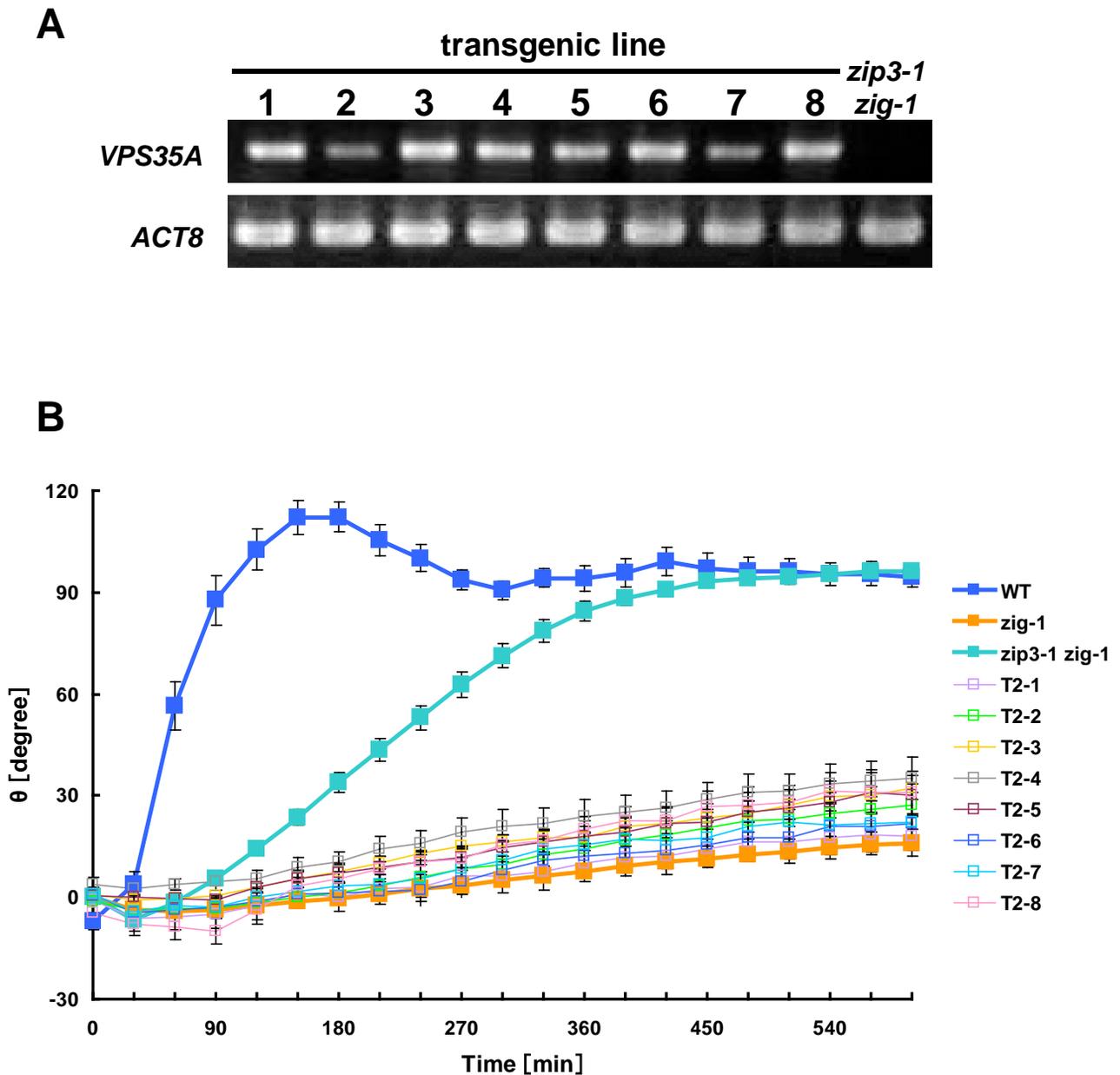


図15. *SCRpro:VPS35A/zip3-1 zig-1*形質転換体のT2世代におけるtransgene由来のmRNAの発現確認と重力屈性反応。

(A) *SCRpro:VPS35A/zip3-1 zig-1*のT2世代8系統それぞれからランダムに1個体を選び、花茎からRNAを抽出した。このRNAを用いてRT-PCR反応を行い、得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行った。コントロールとして*ACT8*遺伝子を用いた。

(B) 形質転換体T2世代の1系統あたり10個体、計8系統について重力屈性測定を行った。(ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*はN = 20)。エラーバーはSEを示す。

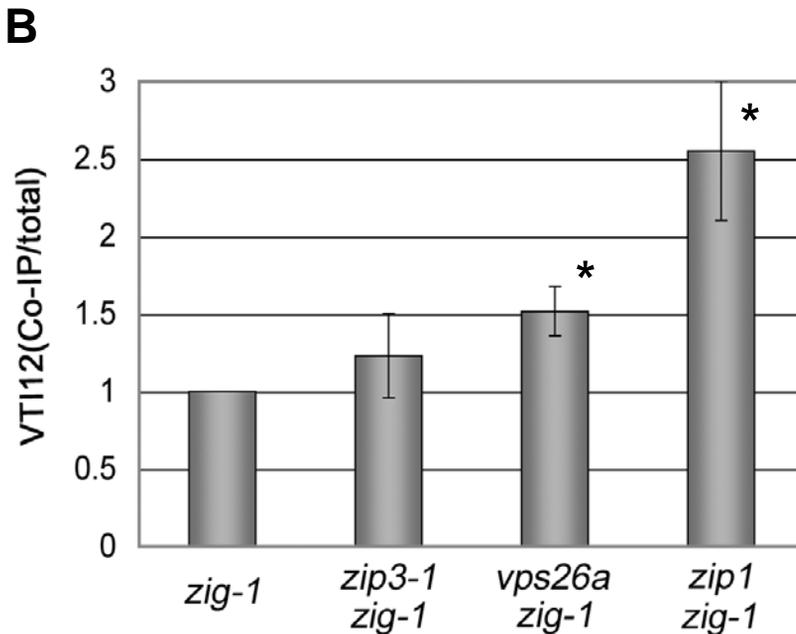
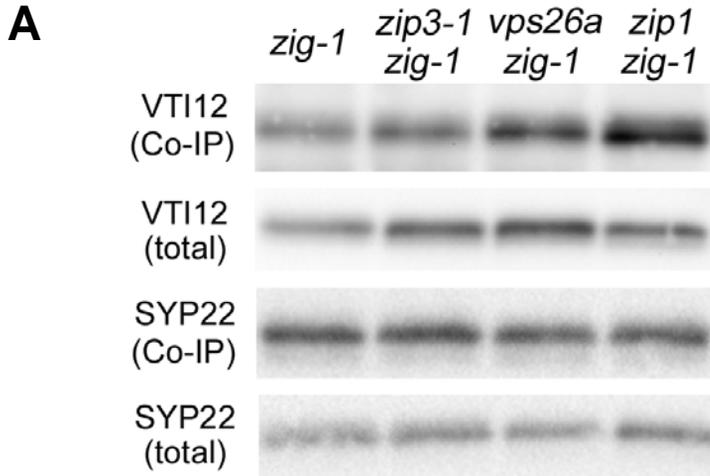
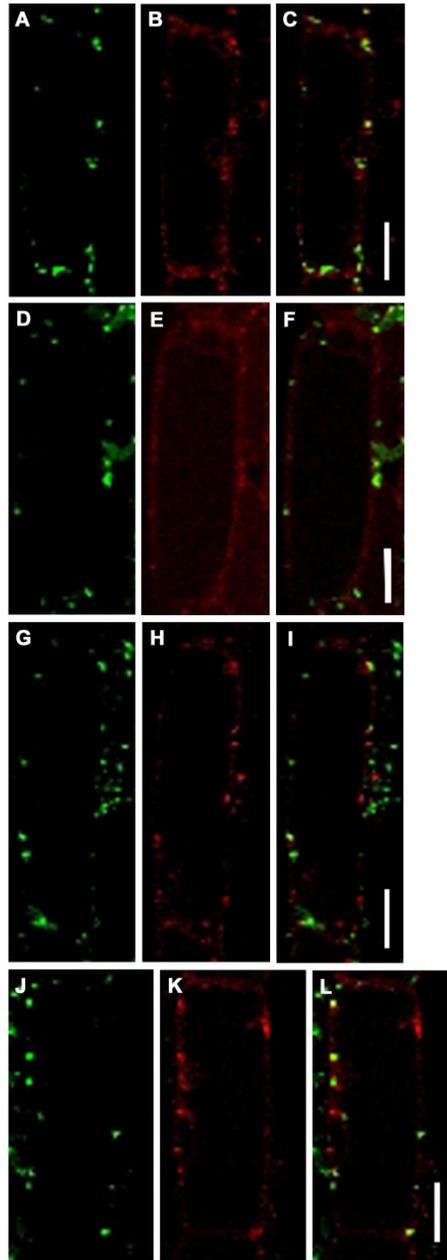


図16. SYP22/VAM3とVTI12の相互作用。

(A) 発芽後6週目の植物体からタンパク質を抽出し、抗SYP22抗体を用いて共免疫沈降を行った。続いて、抗VTI12抗体あるいは抗SYP22抗体を用いてイムノブロット解析を行った。1段目は共沈画分に含まれるVTI12を、2段目は全抽出液に含まれるVTI12を、3段目は共沈画分に含まれるSYP22を、4段目は全抽出液に含まれるSYP22を示す。

(B) SYP22と共沈したVTI12の量。共沈画分に含まれるVTI12を、全抽出液に含まれるVTI12で割り、*zig-1*における値を1とした相対値を求め、独立4回の実験から得られた相対値の平均値を示した。有意差はStudent's *t* testを用いて検定された (**P* < 0.05)。エラーバーは標準誤差 (SD)を示す。



M

	WT	<i>zig-1</i>	<i>zip3-1 zig-1</i>	<i>zip3-1</i>
GFP (VTI12)	10.52±0.66	12.76±0.84	11.98±0.64	11.76±0.60
RFP (ARA6)	12.98±0.80	12.86±0.82	10.02±0.60	12.44±0.64
merge	3.64±0.34	2.72±0.29	2.28±0.21	2.42±0.23

(n = 50)

図17. 内皮細胞におけるGFP-VTI12とARA6-mRFPの局在。

各植物体の内皮細胞内のGFP-VTI12とARA6-mRFPの蛍光写真。

(A-C) 野生型、(D-F) *zig-1*、(G-I) *zip3-1 zig-1*、(J-L) *zip3-1*。

VTI12とARA6はそれぞれGFP蛍光 (A,D,G,H)、RFP蛍光 (B,E,H,K)で検出された。

スケールバーは10 μm。

(M) GFP、RFP、両シグナルについてポジティブなドットの定量的解析。

AからLに示す内皮細胞の写真に見られるドットの数、細胞50個についてかぞえた。値は平均値±SDを示す。

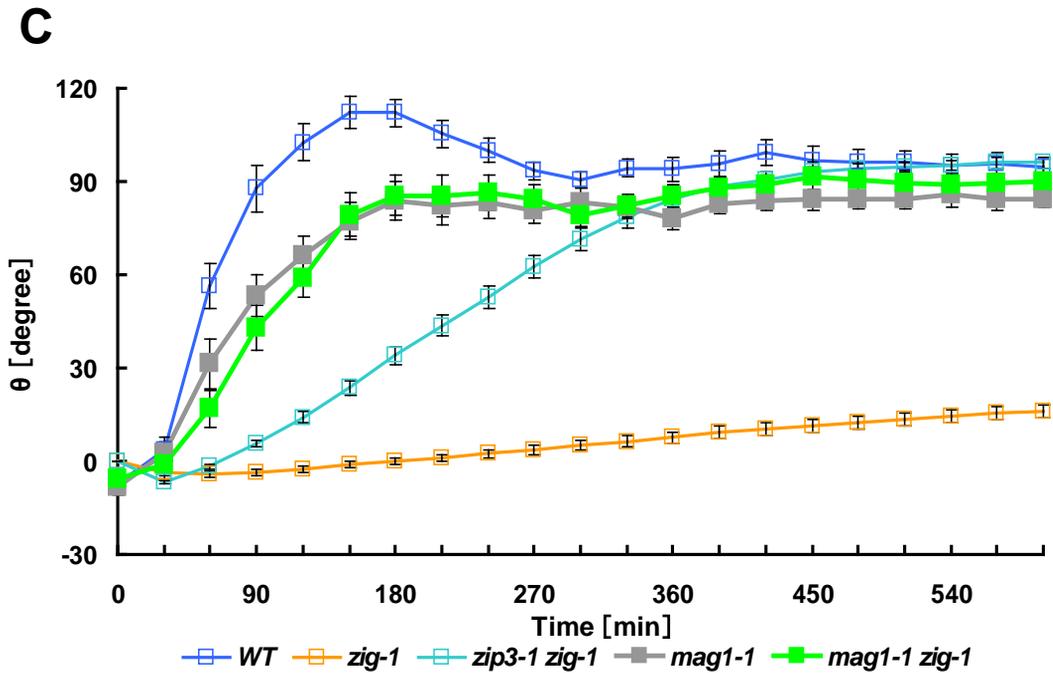


図18. *mag1-1*, *mag1-1 zig-1*の地上部の形態と重力屈性反応。

(A-B) 発芽後6週目の植物体の地上部の形態。(A) *mag1-1*, (B) *mag1-1 zig-1*。
スケールバーは3 cm。

(C) 各植物体の花茎の重力屈性反応。N = 15 (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*は
N = 20)。エラーバーはSEを示す。

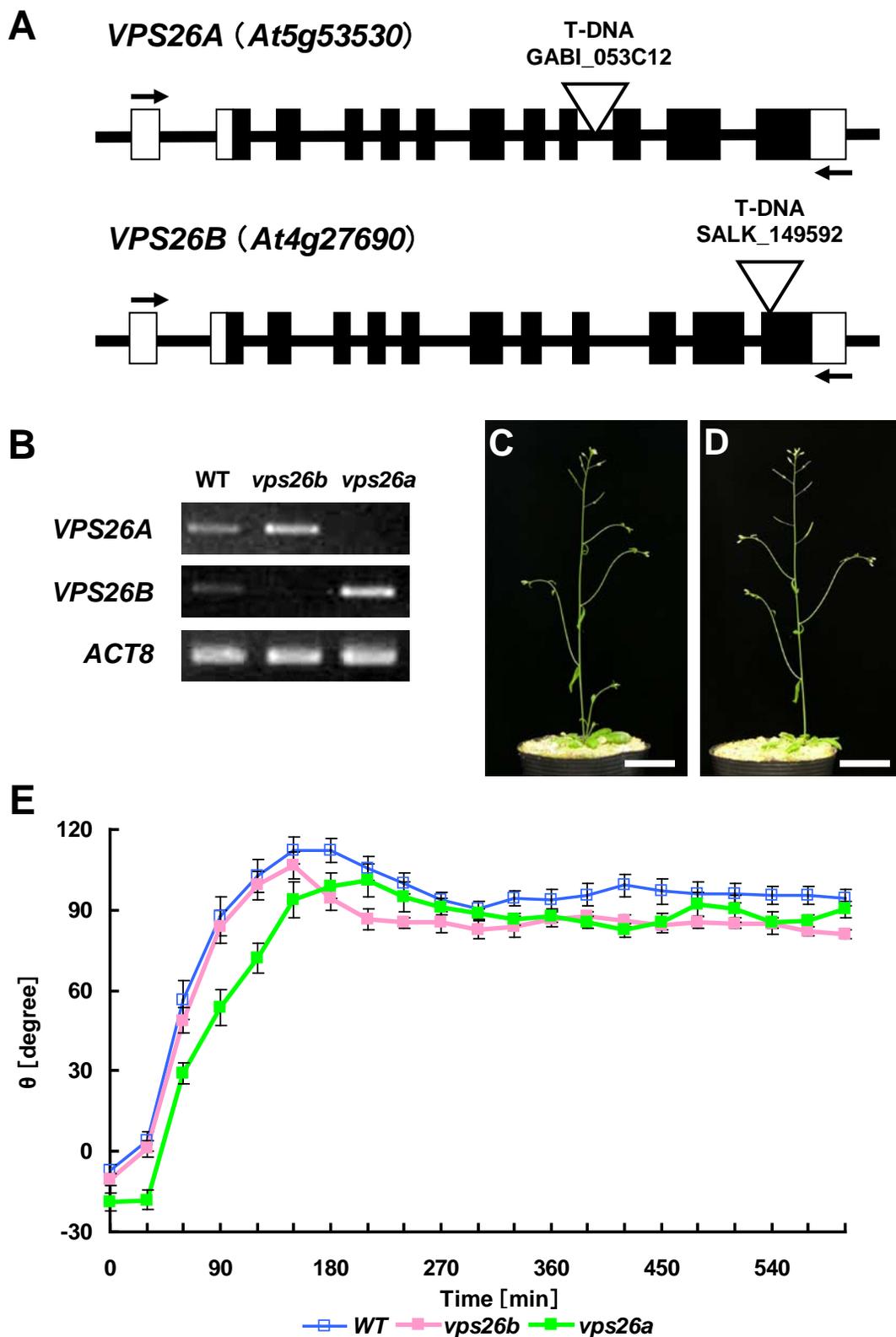


図19. *AtVPS26*の単独変異体の地上部の形態と重力屈性反応。

(A) *AtVPS26*遺伝子の構造。白の三角はT-DNA挿入位置を、矢印は遺伝子発現の確認に用いたプライマーを示す。

(B) *AtVPS26a, b*の T-DNA挿入系統における各遺伝子の発現。

(C-D) 発芽後6週目の各植物体の地上部の形態。(C) *vps26a*, (D) *vps26b*。スケールバーは3 cm。

(E) 各植物体の花茎の重力屈性反応。N = 15 (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1* *zig-1*はN = 20)。エラーバーはSEを示す。

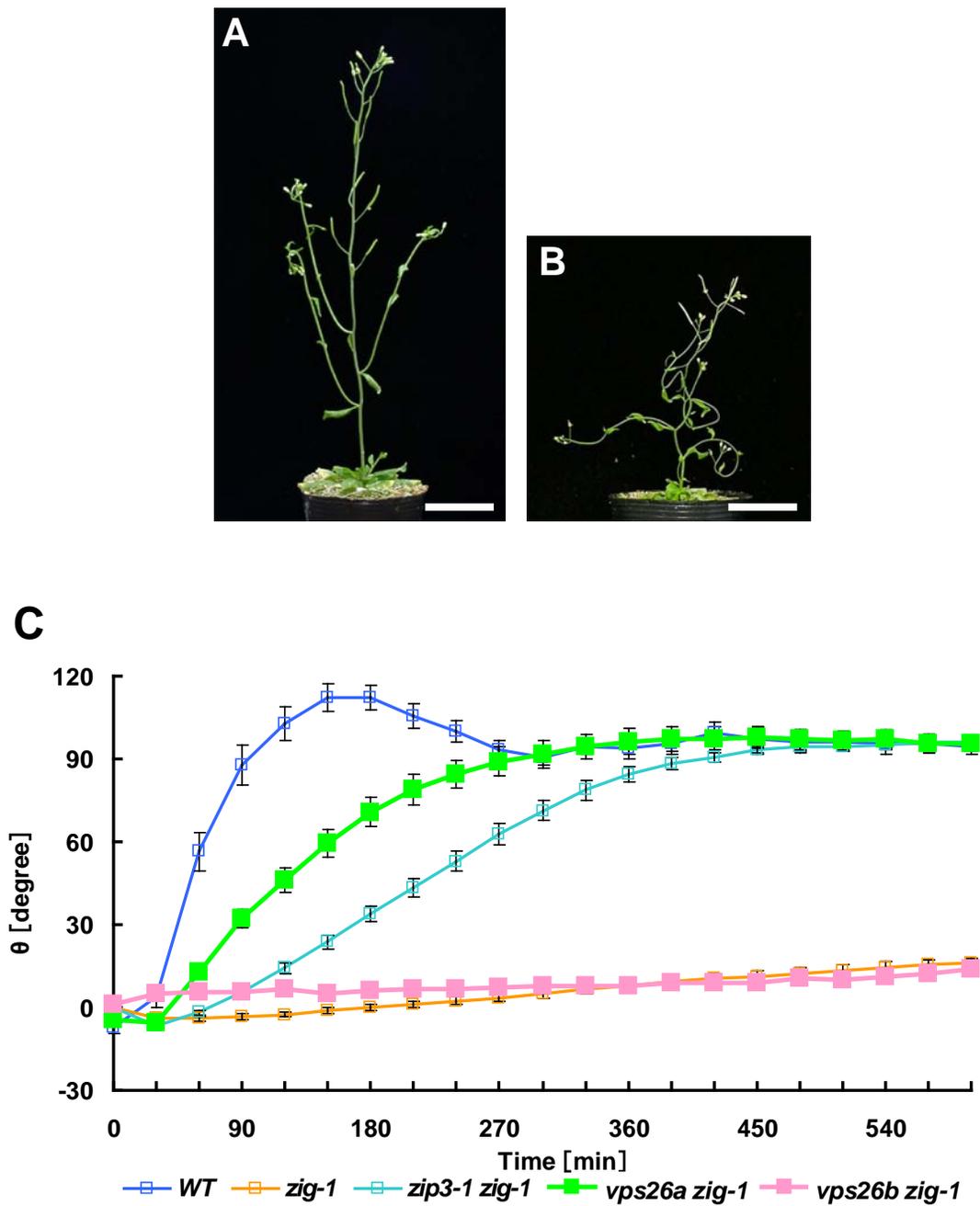


図20. *vps26 zig-1*の地上部の形態と重力屈性反応。

(A-B) 発芽後6週目の各植物体の地上部の形態。(A) *vps26a zig-1*, (B) *vps26b zig-1*。スケールバーは3 cm。

(C) 各植物体の花茎の重力屈性反応。N = 15 (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*はN = 20)。エラーバーはSEを示す。

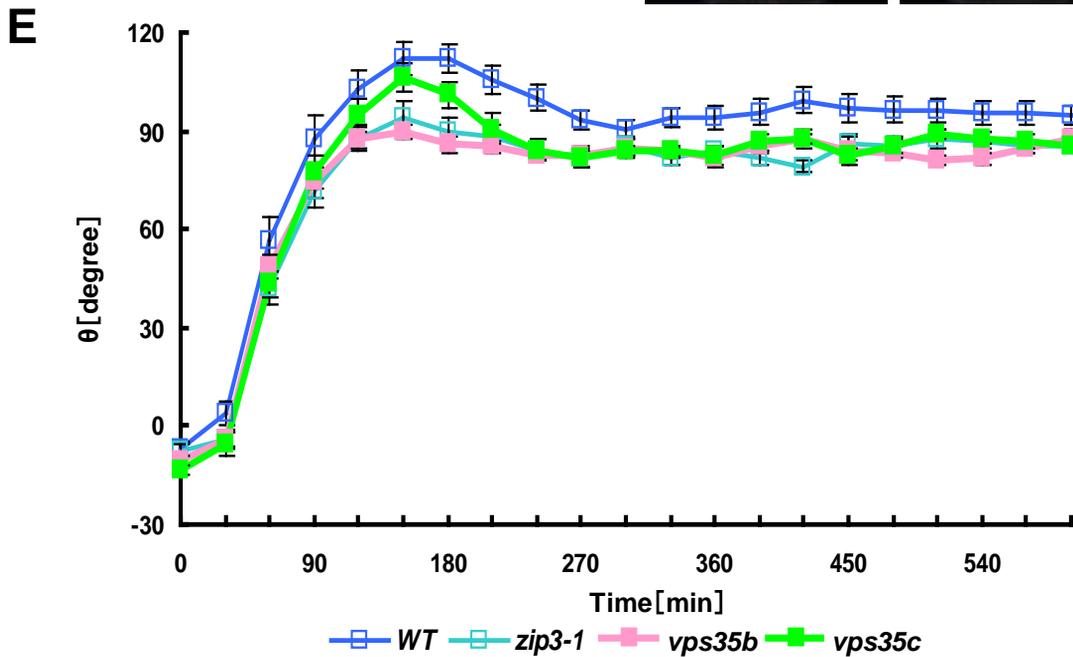
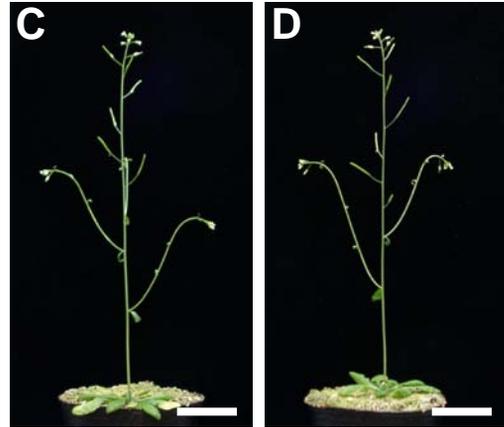
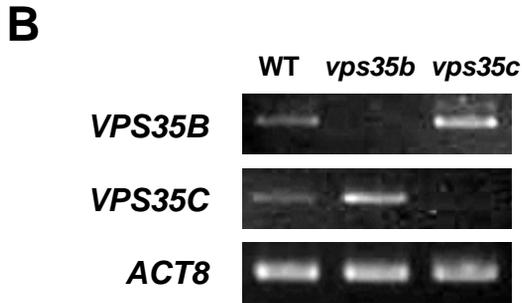
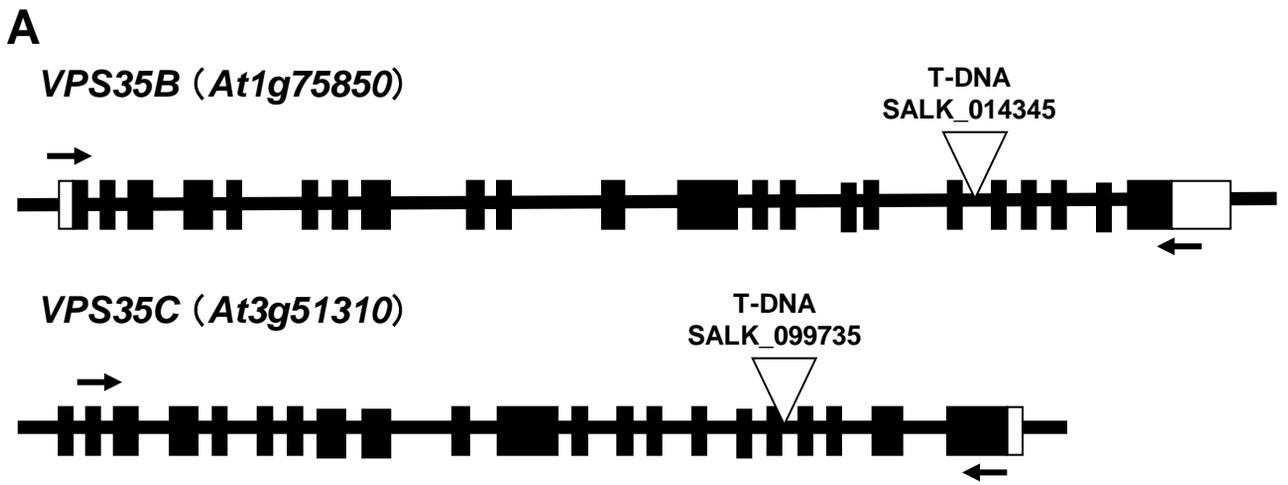


図21. *VPS35*の単独変異体の地上部の形態と重力屈性反応。
 (A) *VPS35*遺伝子の構造。白の三角はT-DNA挿入位置を、矢印は遺伝子発現の確認に用いたプライマーを示す。
 (B) *VPS35b*, *c*の T-DNA挿入系統における各遺伝子の発現。
 (C-D) 発芽後6週目の各植物体の地上部の形態。(C) *vps35b*, (D) *vps35c*。スケールバーは3 cm。
 (E) 各植物体の花茎の重力屈性反応。N = 15 (ただし、野生型、*zig-1*, *zip3-1*はN = 20)。エラーバーはSEを示す。

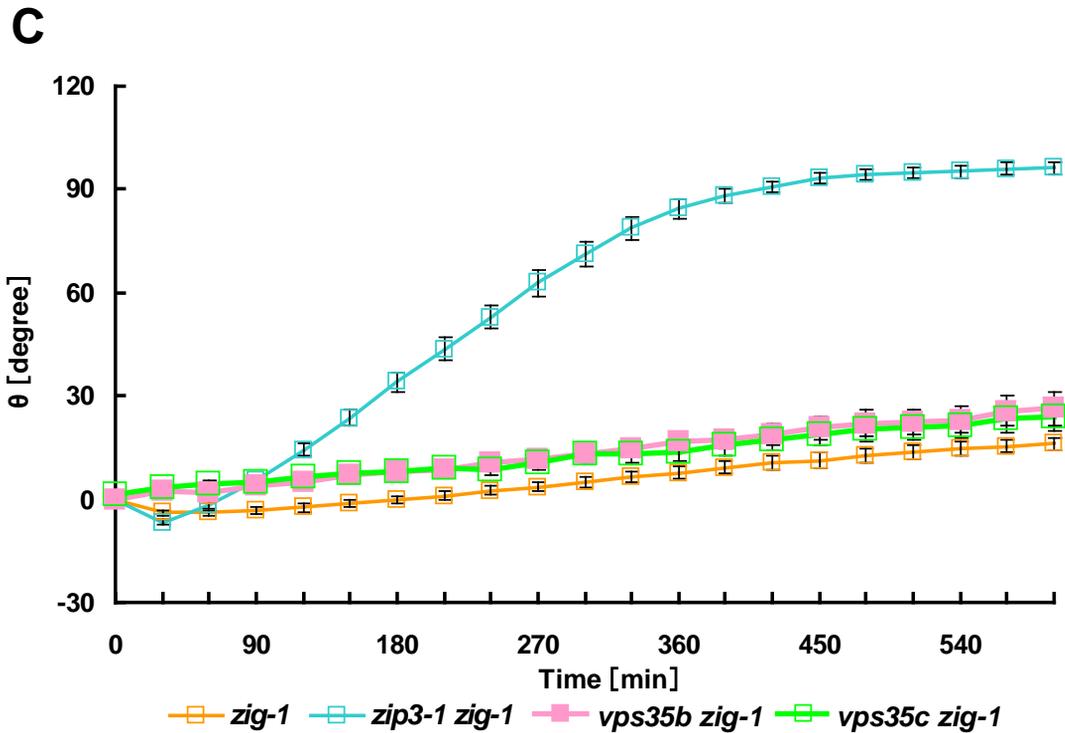
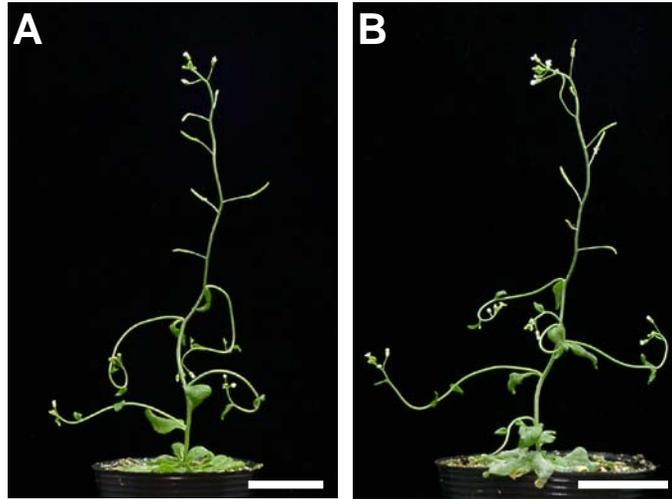


図22. *vps35b zig-1*, *vps35c zig-1*の地上部の形態と重力屈性反応。
 (A-B) 発芽後6週目の各植物体の地上部の形態。(A) *vps35b zig-1*, (B) *vps35c zig-1*。
 スケールバーは3 cm。
 (C) 各植物体の花茎の重力屈性反応。N = 15 (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*は
 N = 20)。エラーバーはSEを示す。

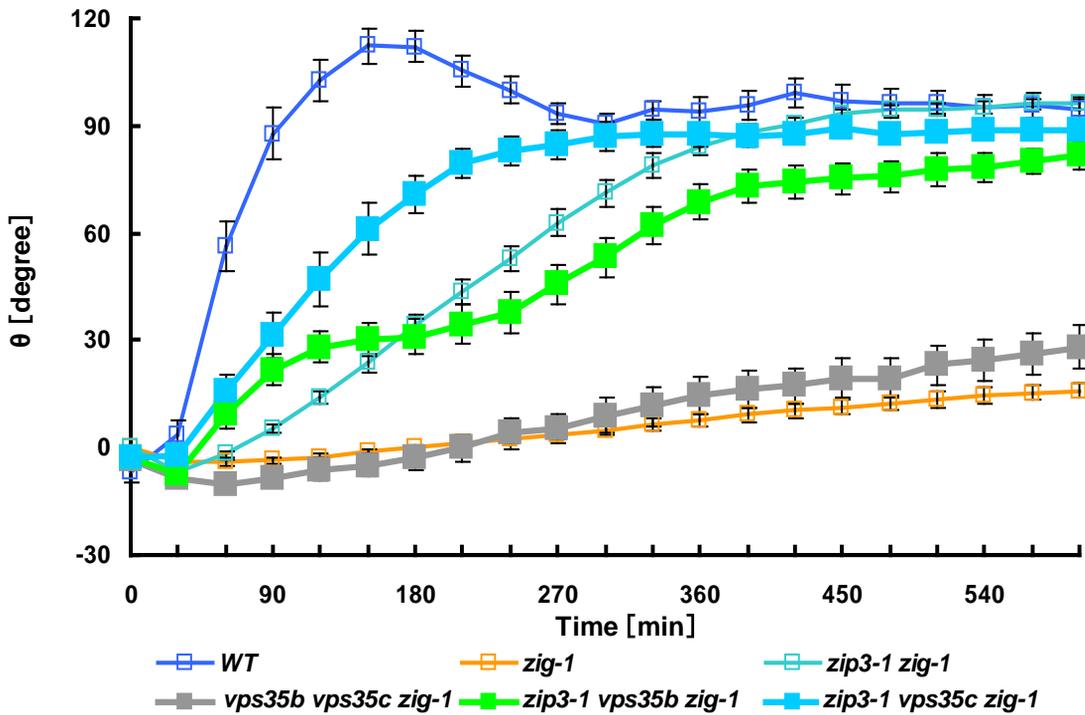


図23. *zip3-1 vps35b zig-1*, *zip3-1 vps35c zig-1*, *vps35b vps35c zig-1* の重力屈性反応。
 各植物体の花茎の重力屈性反応。N = 15 (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*は N = 20)。エラーバーはSEを示す。

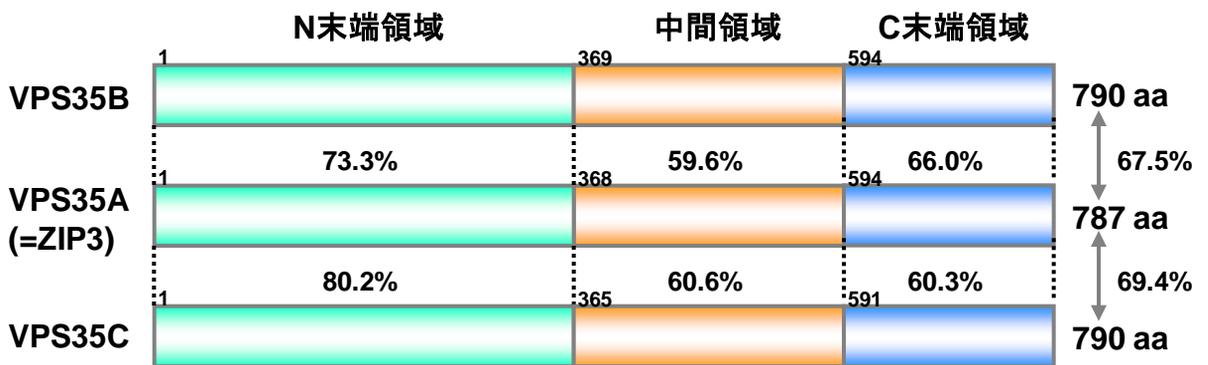


図24. 3つのシロイヌナズナVPS35のアミノ酸配列の相同性。
 出芽酵母VPS35を同定したSeamanらの定義に従い、3つのシロイヌナズナVPS35をN末端領域 (緑)、中間領域 (橙)、C末端領域 (青)に区分し、それぞれについてVPS35A (= ZIP3)と35Bあるいは35Cの相同性を比較した。

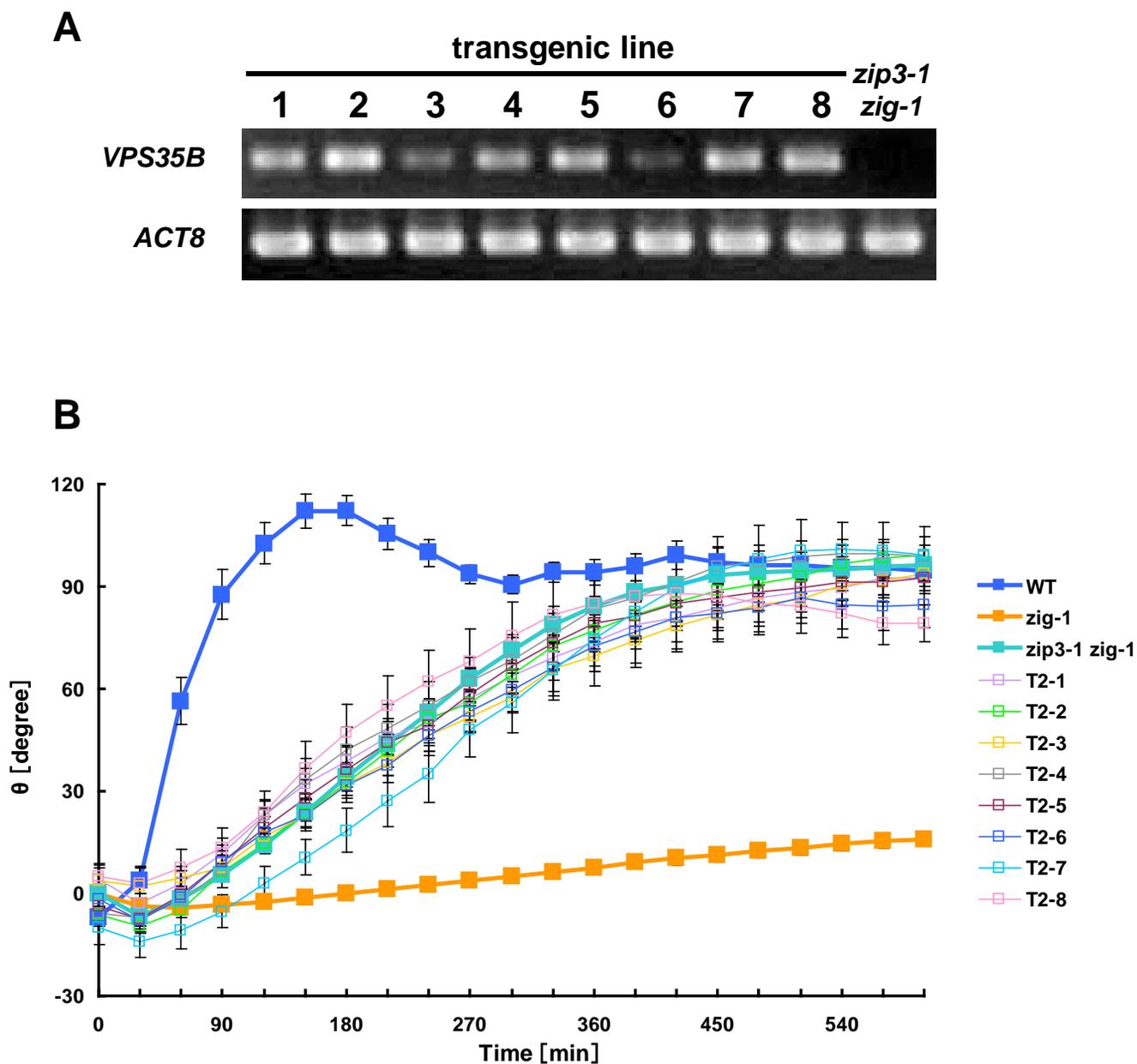


図25. *SCRpro:VPS35B/zip3-1 zig-1*形質転換体のT2世代におけるtransgene由来のmRNAの発現確認と重力屈性反応。

(A) *SCRpro:VPS35B/zip3-1 zig-1*のT2世代8系統それぞれからランダムに1個体を選び、花茎からRNAを抽出した。このRNAを用いてRT-PCR反応を行い、得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行った。コントロールとしてACT8遺伝子を用いた。

(B) 形質転換体T2世代の1系統あたり10個体、計8系統について重力屈性測定を行った (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*はN = 20)。エラーバーはSEを示す。

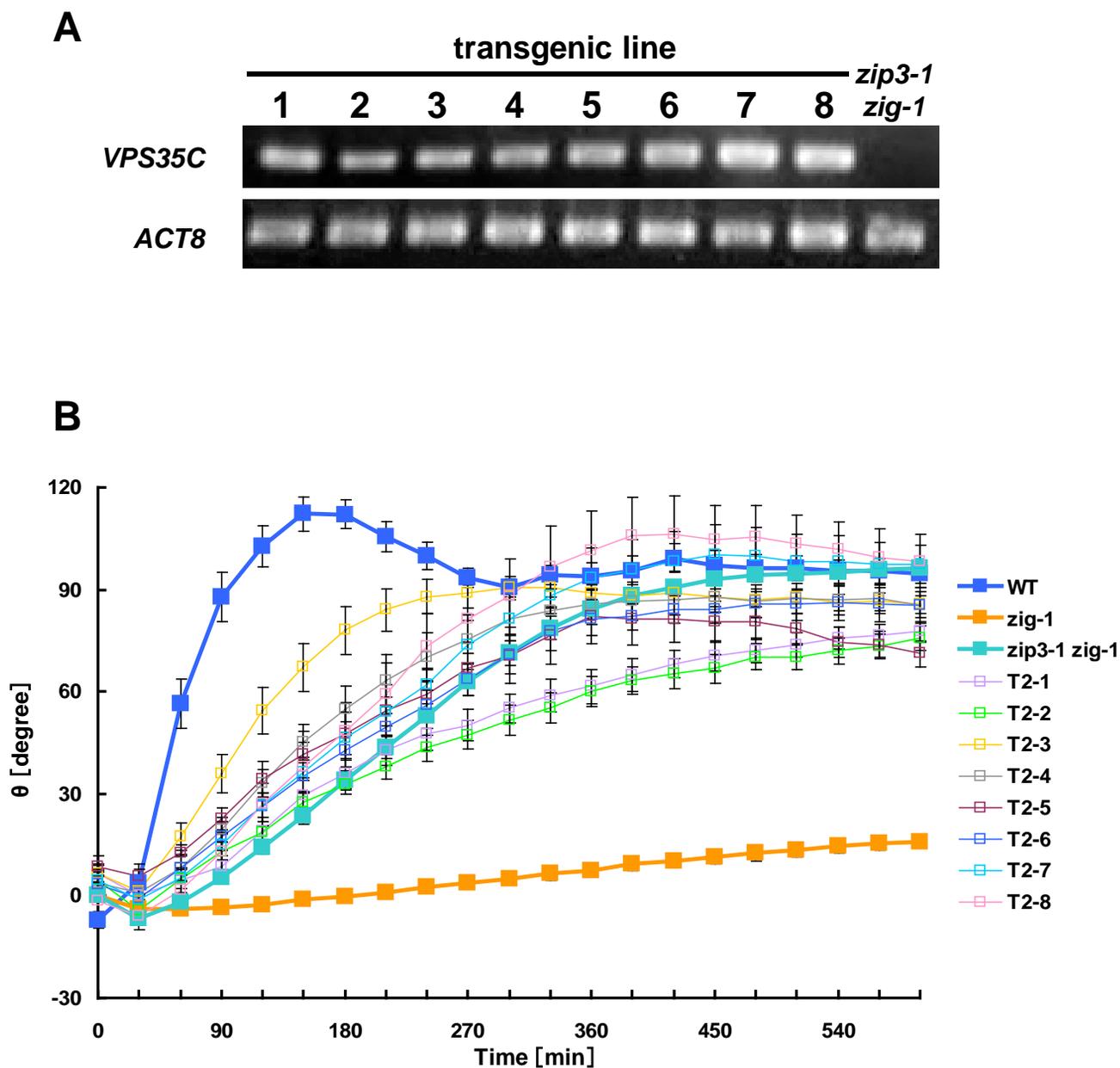
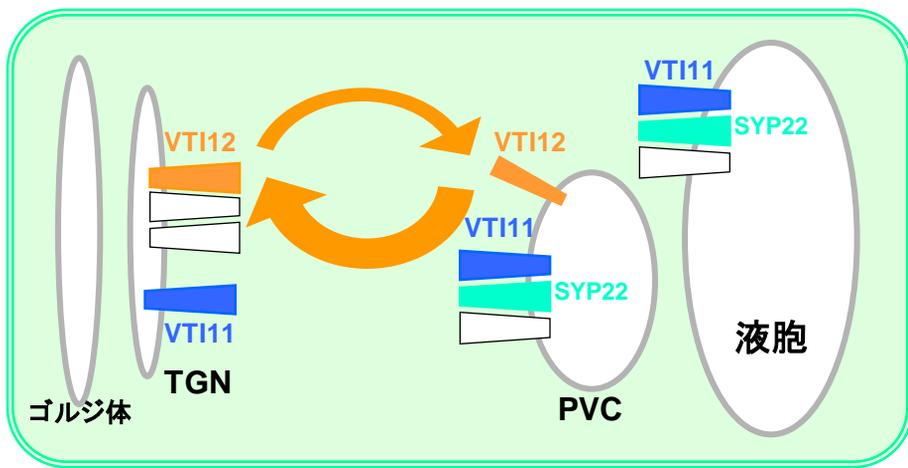


図26. *SCRpro:VPS35C/zip3-1 zig-1*形質転換体のT2世代におけるtransgene由来のmRNAの発現確認と重力屈性反応。

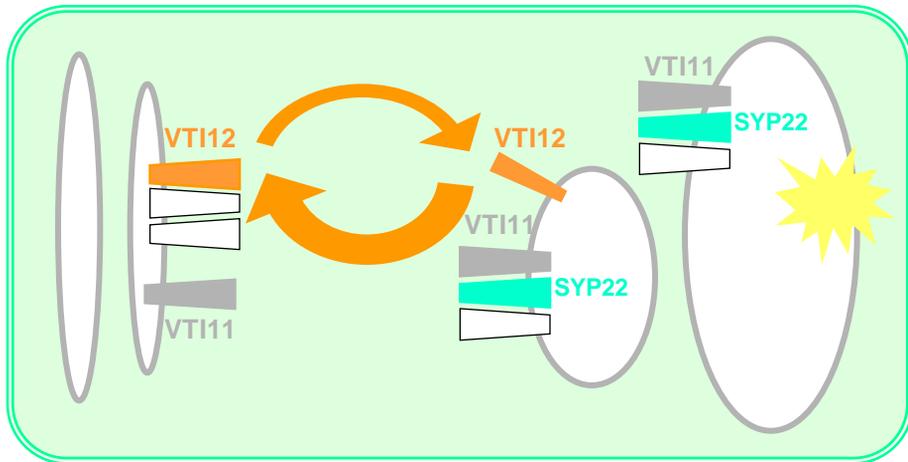
(A) *SCRpro:VPS35C/zip3-1 zig-1*のT2世代8系統それぞれからランダムに1個体を選び、花茎からRNAを抽出した。このRNAを用いてRT-PCR反応を行い、得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行った。コントロールとして*ACT8*遺伝子を用いた。

(B) 形質転換体T2世代の1系統あたり10個体、計8系統について重力屈性測定を行った (ただし、野生型、*zig-1*、*zip3-1 zig-1*はN = 20)。エラーバーはSEを示す。

A



B



C

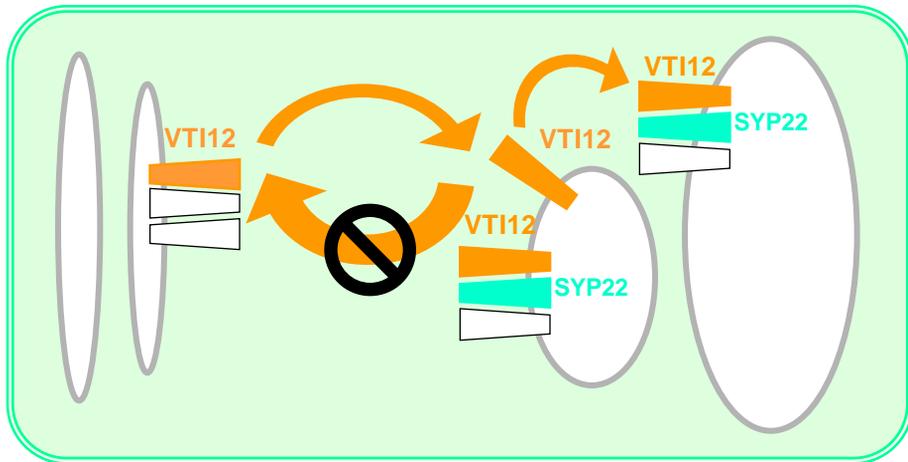


図27. 野生型, *zig-1*, *zip3-1 zig-1*におけるZIG/VTI11とVTI12の細胞内局在モデル。
 (A) 野生型においてZIG/VTI11はTGN, PVC, 液胞に局在し、PVCと液胞でSYP22と複合体を形成している。VTI12は主にTGNに、一部がPVCに局在し、TGNとPVCの間を循環していると考えられている。
 (B) *zig-1*変異体においてZIG/VTI11は機能を欠損し、液胞構造に異常が現れる。
 (C) *zip3-1 zig-1*においてレトロマーの介する逆行輸送に異常が生じる。PVCあるいは液胞に局在するVTI12の量が増加し、SYP22との複合体形成量が増加する。これによりVTI11の機能を代替し、液胞構造が部分的に回復したと考えられる。



図28. 野生型、*sgr6-1*の地上部の形態。
発芽後6週目の野生型(Col)(左)と*sgr6-1* (右)の地上部の形態。
スケールバーは3 cm。

At2g36810

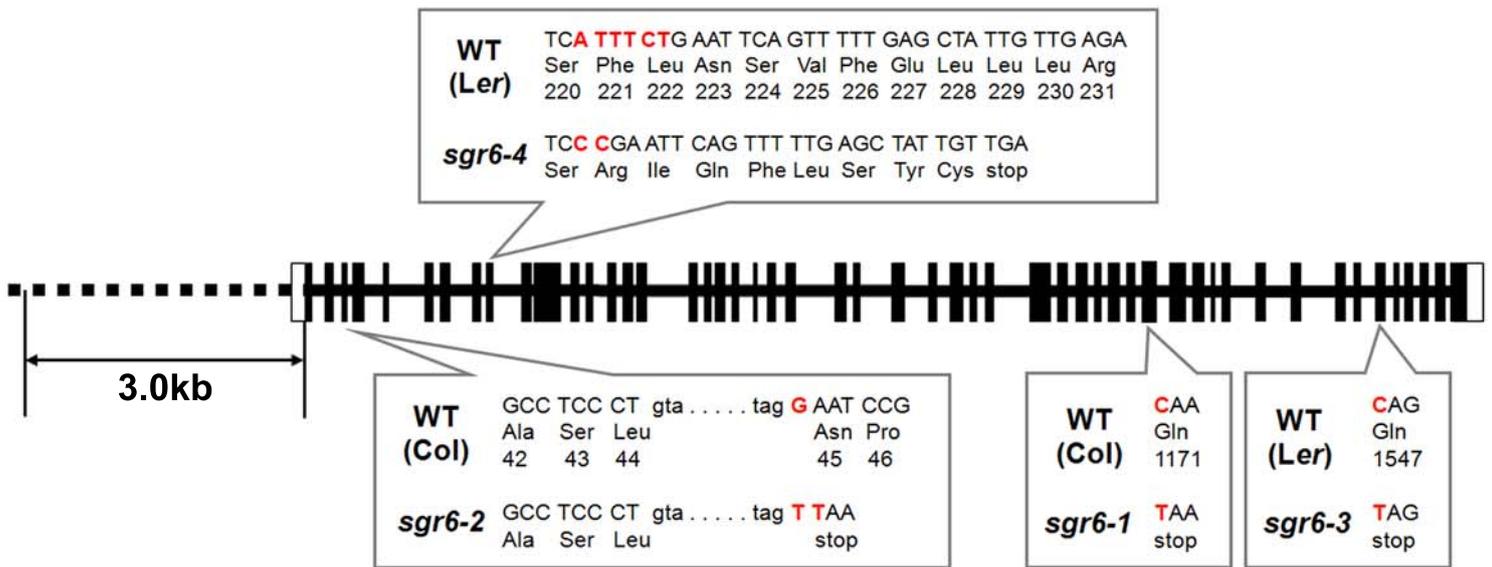


図29. *At2g36810*遺伝子の構造と *sgr6-1*, *sgr6-2*, *sgr6-3*, *sgr6-4*変異の位置。
*At2g36810*遺伝子は51エクソン (黒の四角)と50イントロン (黒の線)からなるORFを持つ。
 開始コドンから上流約3.0kbの領域をプロモーターと仮定すると、全長の長さは約17kbである。
 白の四角はUTRを示す。

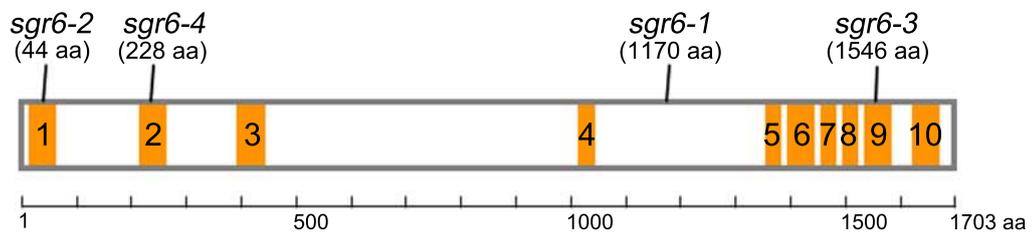


図30. SGR6タンパク質の構造。

SGR6タンパク質は全長にわたって10個のHEAT repeat (オレンジの四角)を持つ (タンパク質ドメインデータベースPfamに基づく。)。棒線はsgr6アレルの位置を示し、括弧内の数字は各変異によってできる切断型SGR6のアミノ酸数を示す。

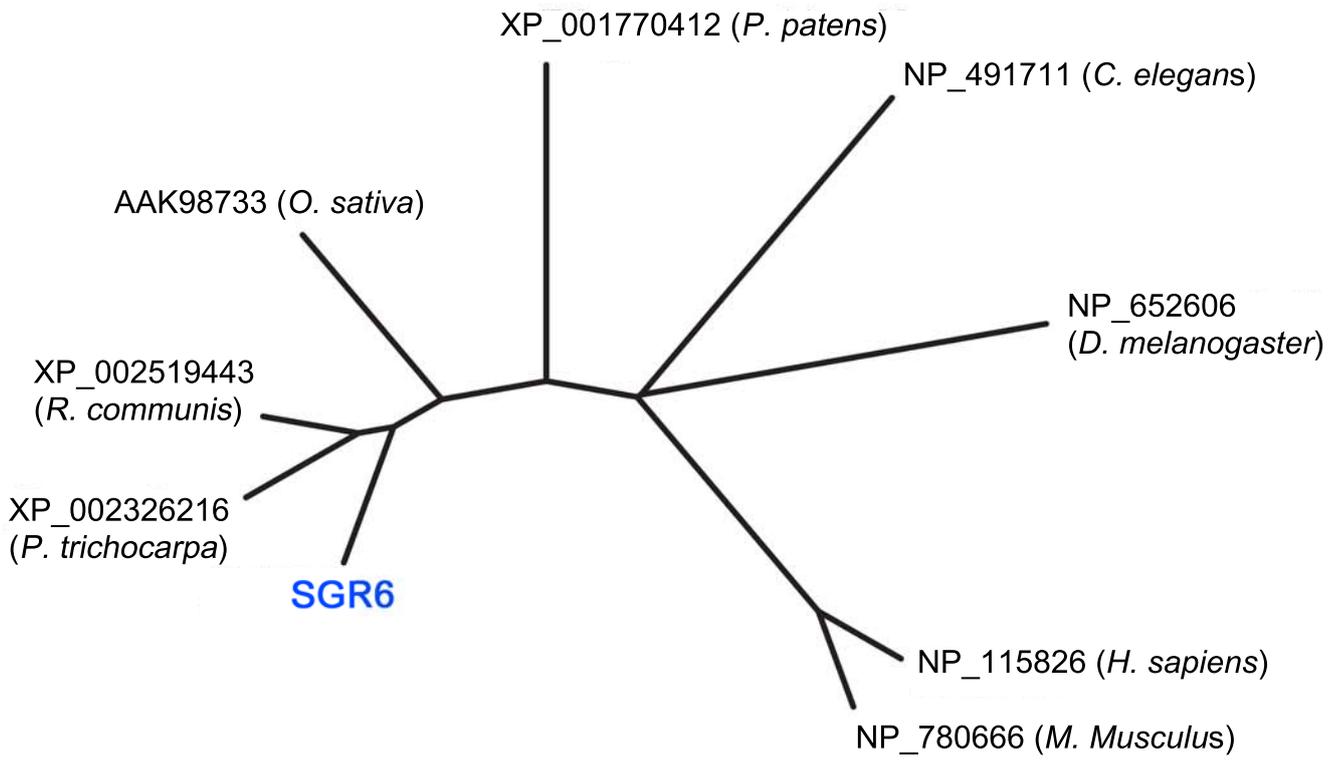


図31. SGR6ホモログの系統樹。

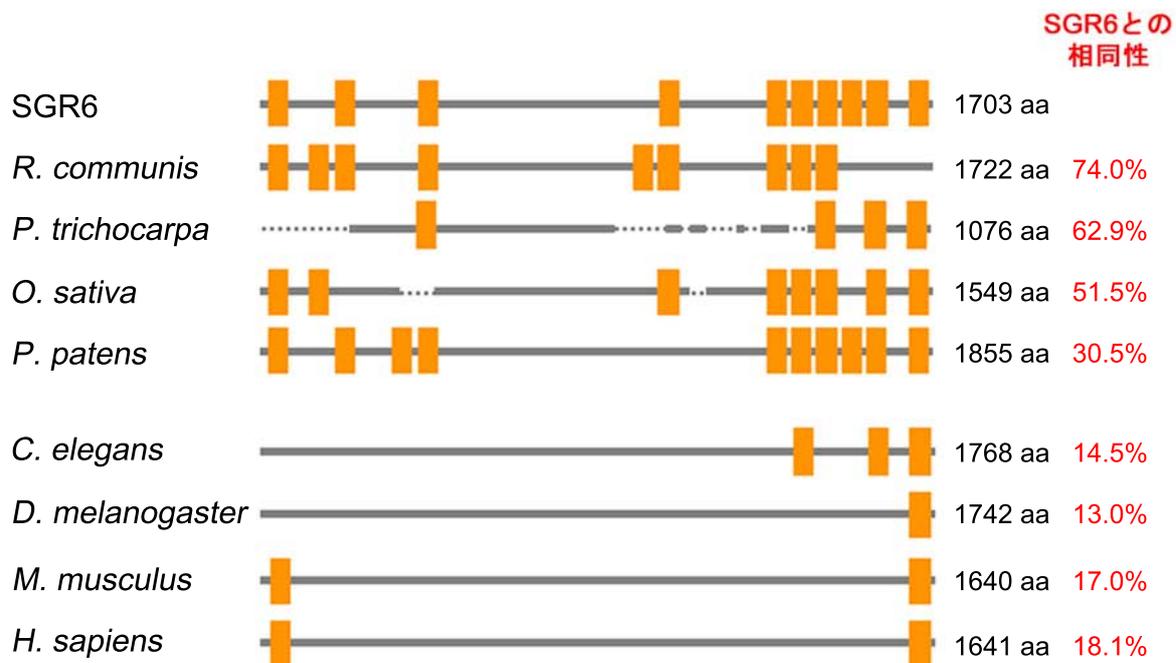


図32. SGR6ホモログの構造。

太線はそれぞれのホモログの全長を、オレンジの四角はホモログ間におけるHEAT repeatの相対的な位置を示す。

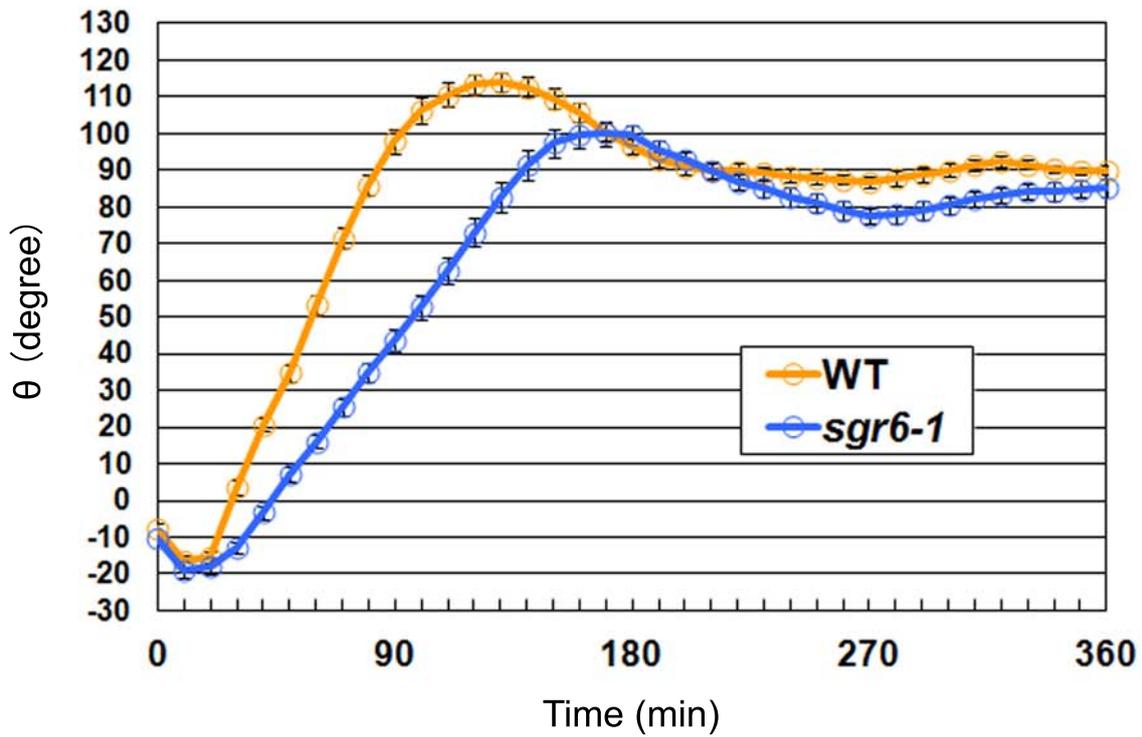
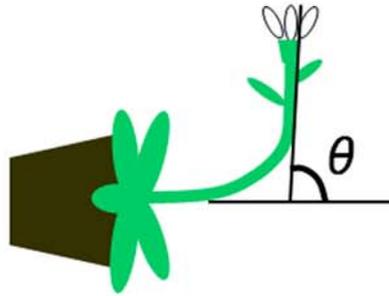


図33. 野生型、*sgr6-1*の重力屈性反応。
 重力刺激を与えた時点をも0分、茎頂の伸長方向と水平方向の間を屈曲角度(θ)とし、各経過時間における θ を計測した。N = 20、エラーバーはSEを示す。

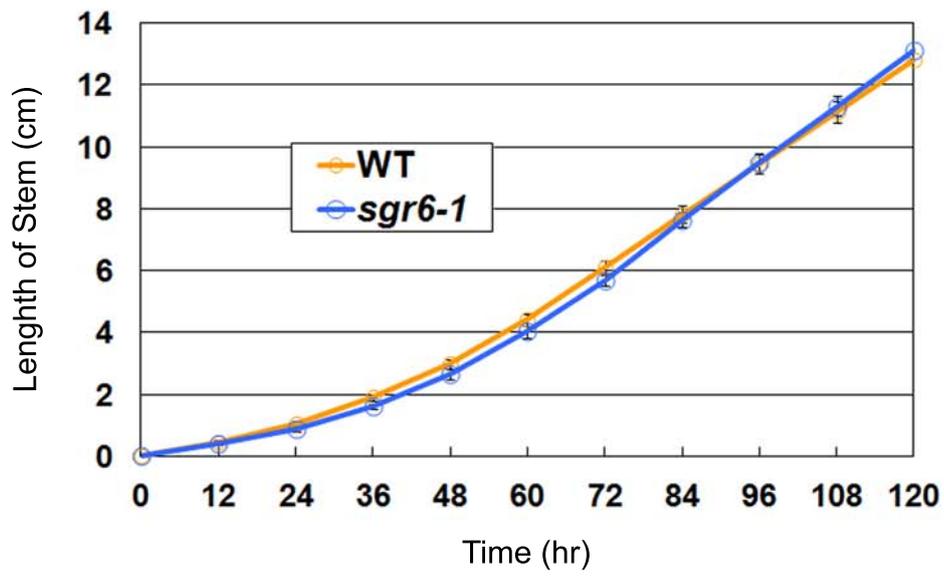


図34. 野生型、*sgr6-1*の5日間の花茎の伸長。
N = 15、エラーバーはSEを示す。

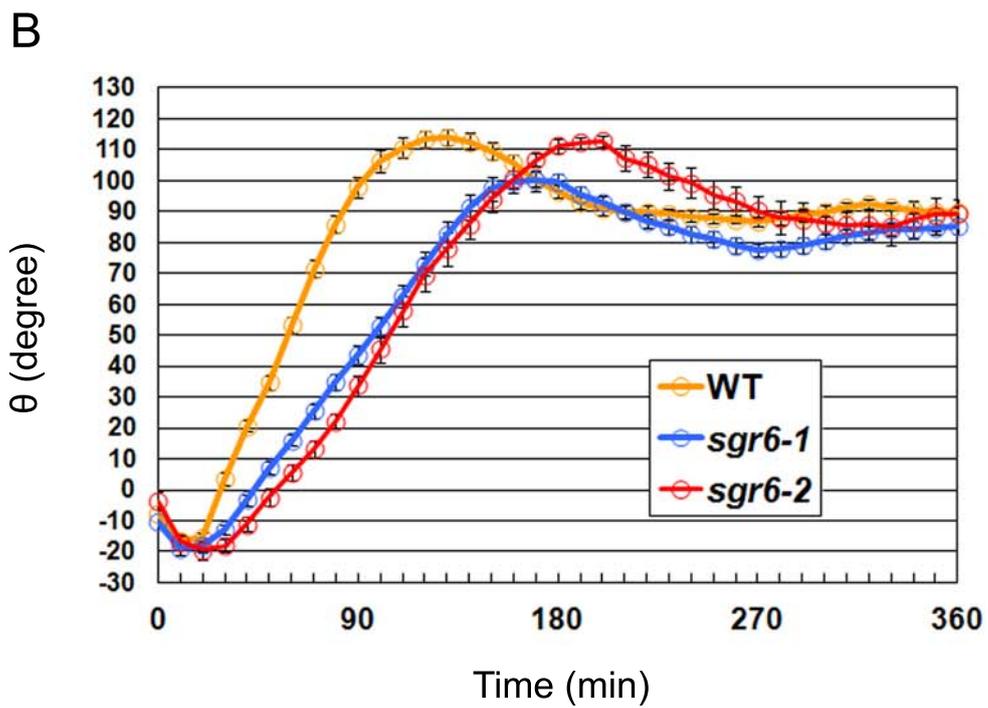


図35. *sgr6-2*アリの地上部の形態と重力屈性反応。
 (A) 発芽後6週目の*sgr6-2*の地上部の形態。スケールバーは3 cm。
 (B) *sgr6-2*の重力屈性反応。N = 10 (ただし、野生型、*sgr6-1*はN = 20)、エラーバーはSEを示す。

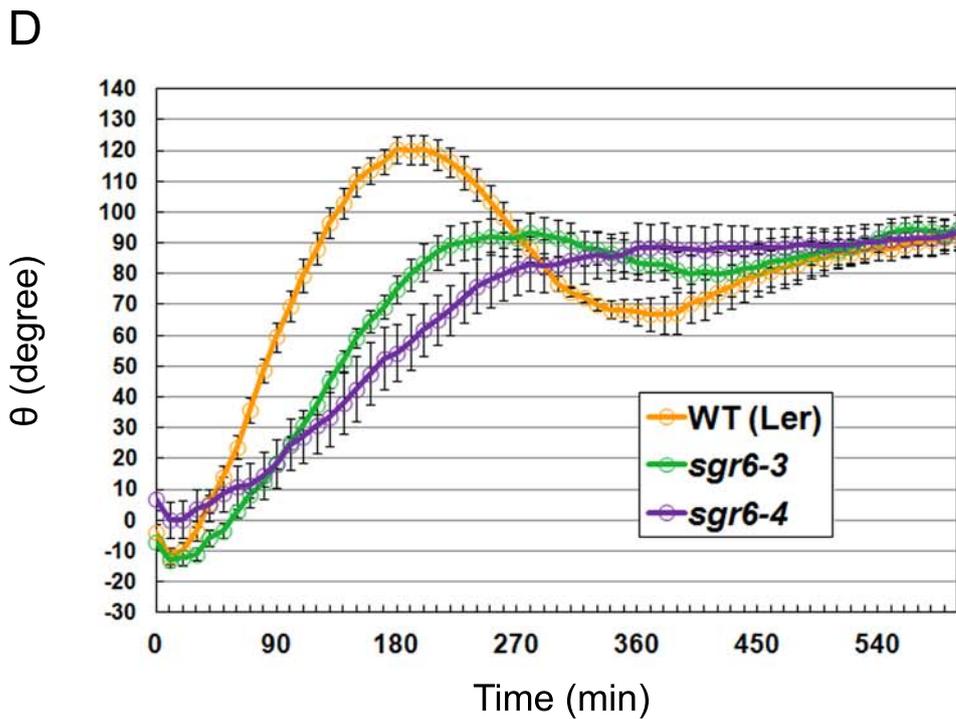
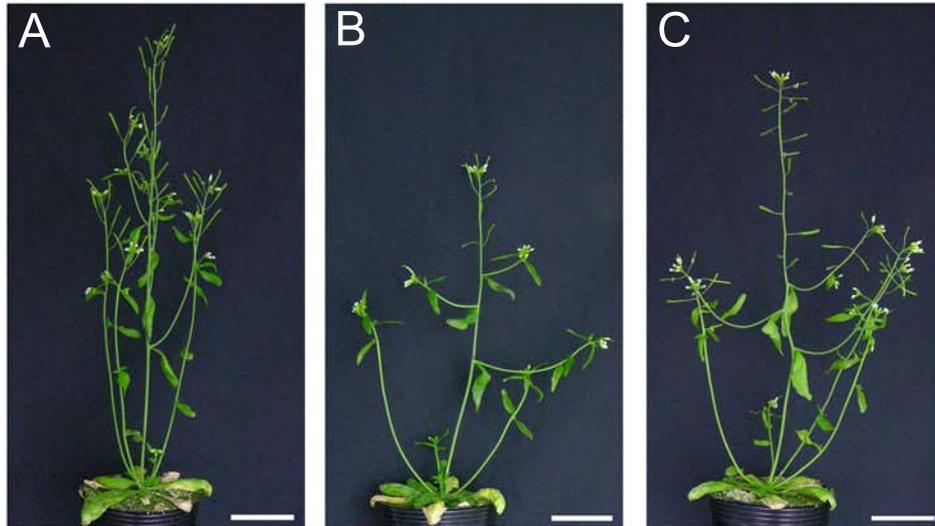


図36. *sgr6-3*, *sgr6-4*アリル (Ler背景) の地上部の形態と重力屈性反応。
 (A-C) 発芽後6週目のLer (A), *sgr6-3* (B), *sgr6-4* (C)の地上部の形態。
 スケールバーは3 cm。
 (D) Ler, *sgr6-3*, *sgr6-4*の重力屈性反応。N = 5~8、エラーバーはSEを示す。

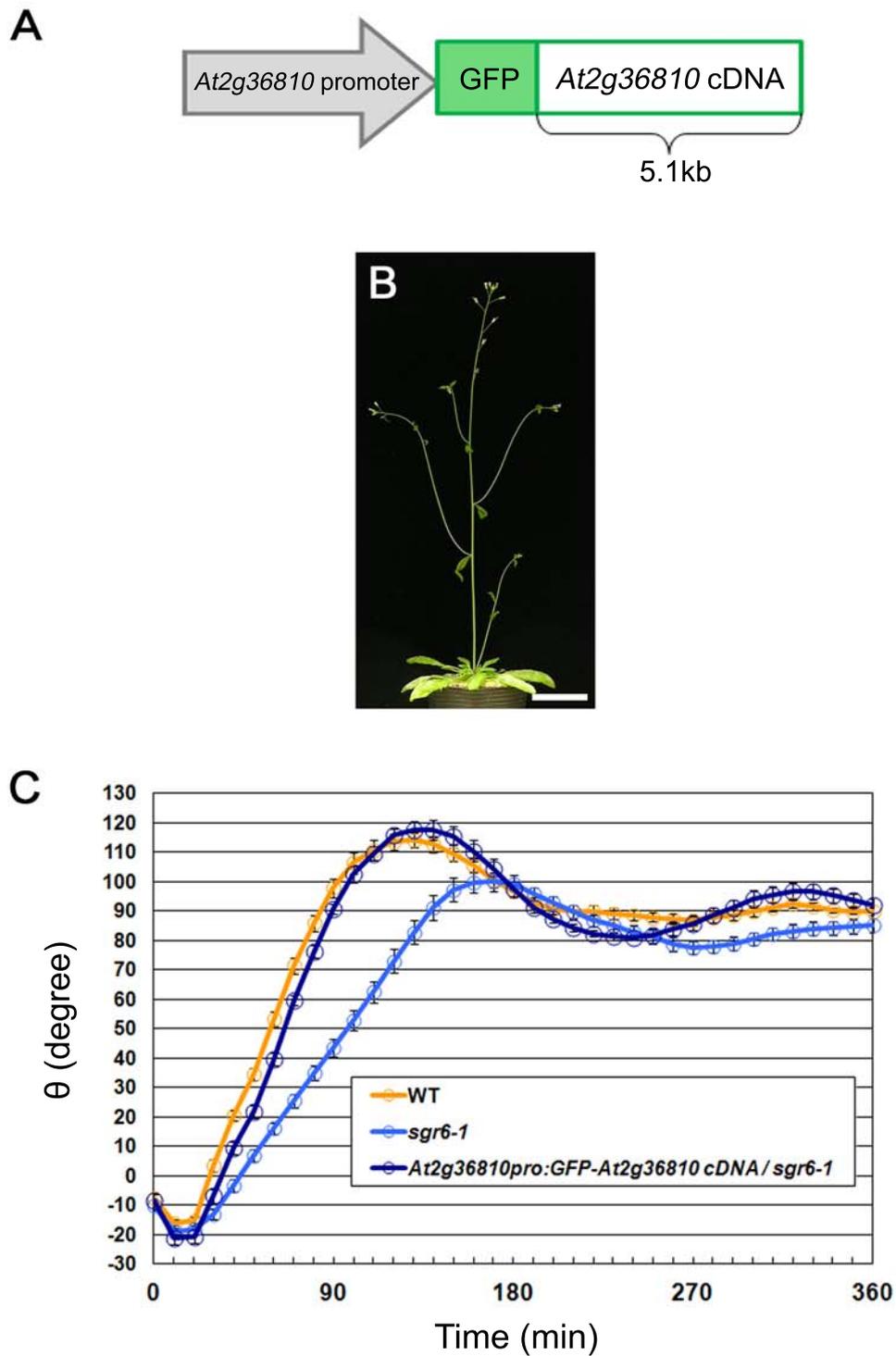


図37. *sgr6-1*の相補性試験。

(A) 相補性試験には、*At2g36810*の予想プロモーターの下流にGFP cDNAと約5.1kbの*At2g36810* cDNAをつないだDNA断片を用いた。

(B) *sgr6-1*に(A)のDNA断片を形質転換した植物体の地上部の形態。スケールバーは3 cm。

(C) *sgr6-1*に(A)のDNA断片を形質転換した植物体の花茎の重力屈性反応。N = 10 (ただし、野生型、*sgr6-1*はN = 20)、エラーバーはSEを示す。

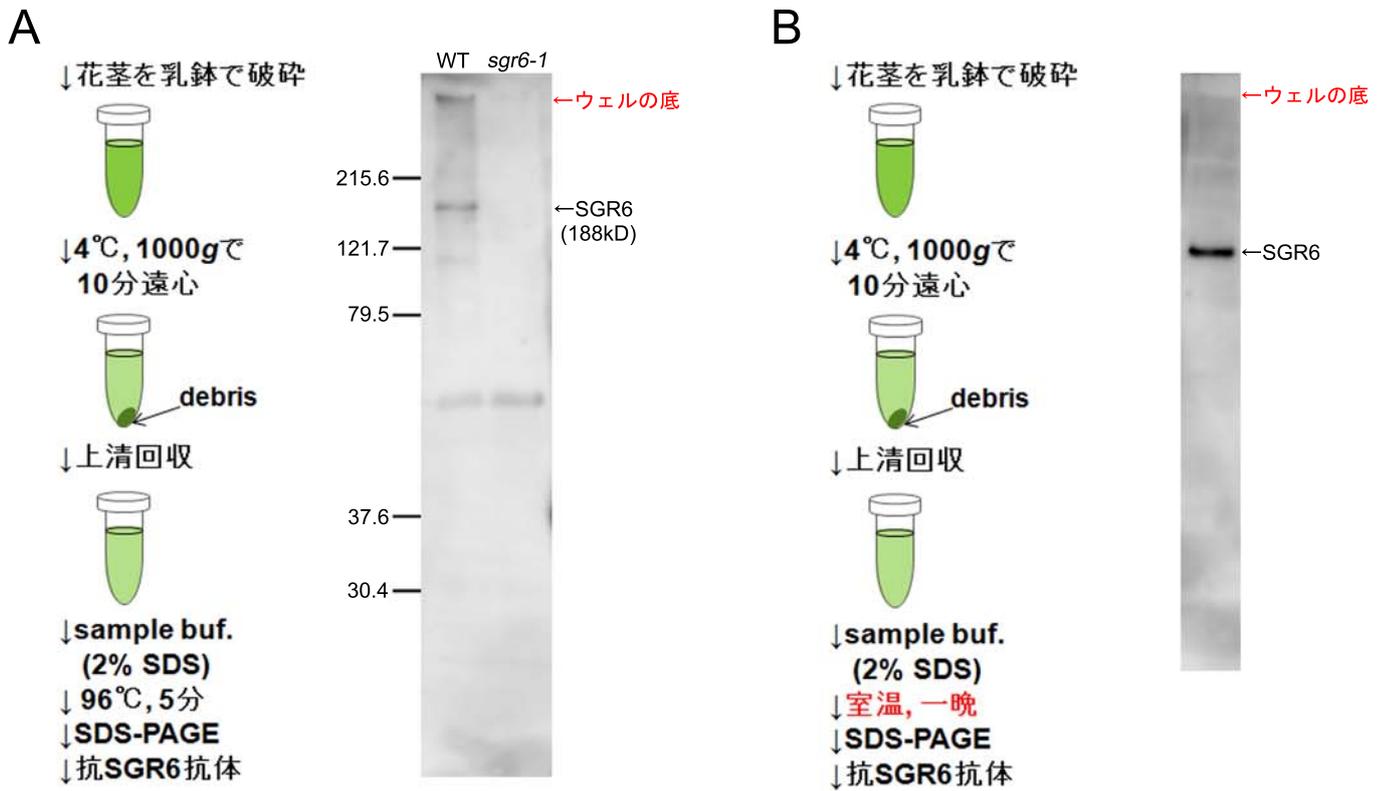


図38. ウェスタンブロット解析によるSGR6タンパク質の確認。
 発芽後6週目の野生型の花茎からタンパク質を抽出し、
 ウェスタンブロット解析を行った。
 (A) 改善前のプロトコルの概略図とイムノブロット結果。
 (B) 改善後のプロトコルの概略図とイムノブロット結果。

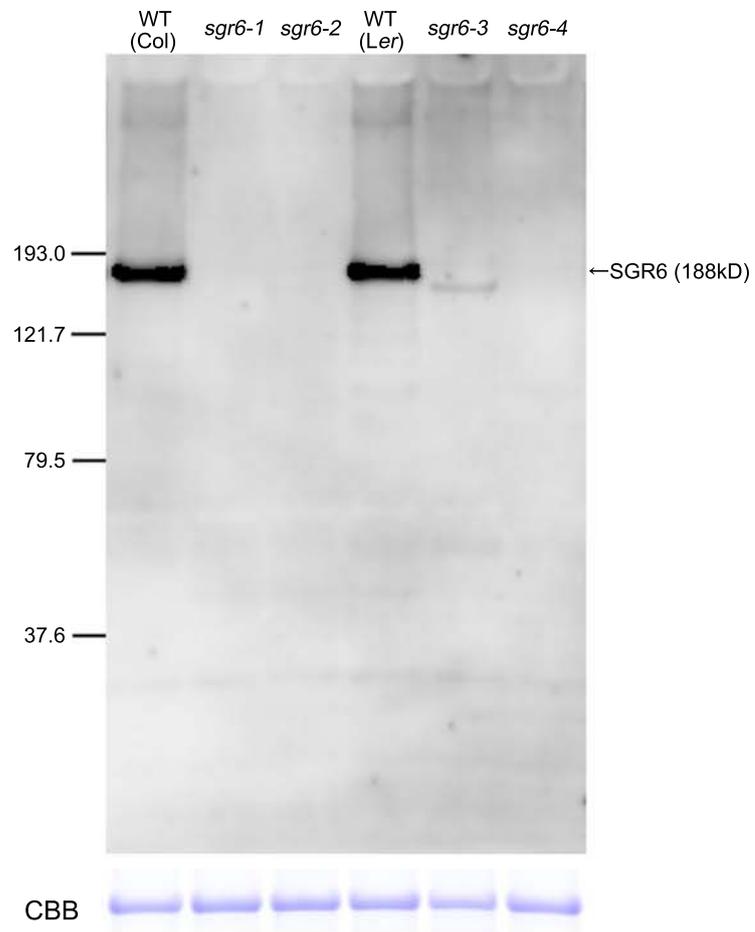


図39. *sgr6*アレルにおけるSGR6タンパク質発現の確認。
 発芽後、6週目の植物体の花茎からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析を行った。CBB染色は各レーンのtotalのタンパク質量が揃っていることを示す。

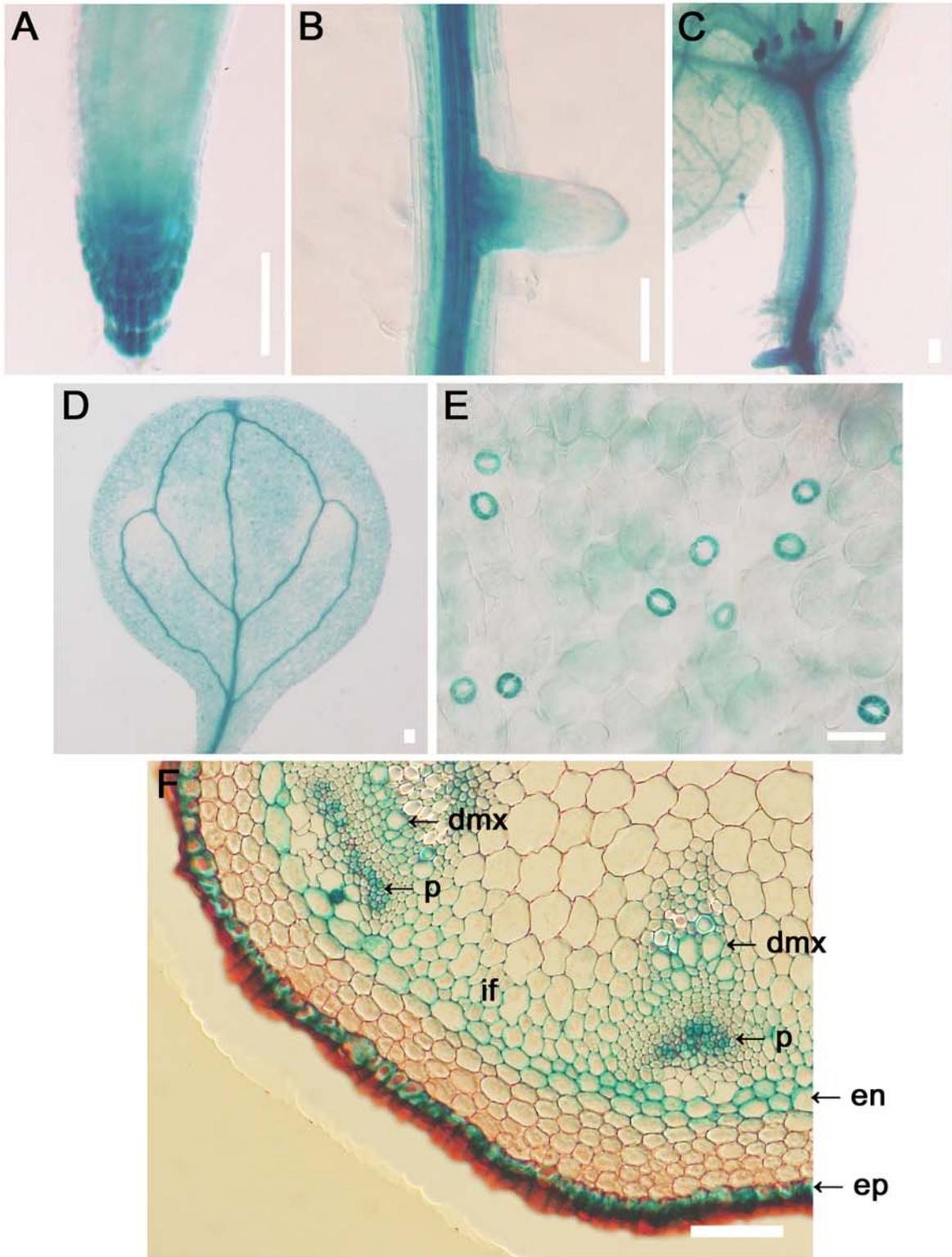


図40. SGR6の発現パターン。

根端(A)および根(B)、胚軸(C)、子葉(D)の維管束、孔辺細胞(E)で強いGUS活性が見られた。花茎(F)においては、表皮(ep)、内皮(en)、維管束のうち特に篩管(p)と発達中の後生木部導管(dmx)、さらに維管束間繊維細胞(if)で強いGUS活性が見られた。(F)はGUS染色後、0.1%のNeutral Redで染色されている。スケールバーはA~Dが縦に100 μ m、E、Fが横に100 μ m。

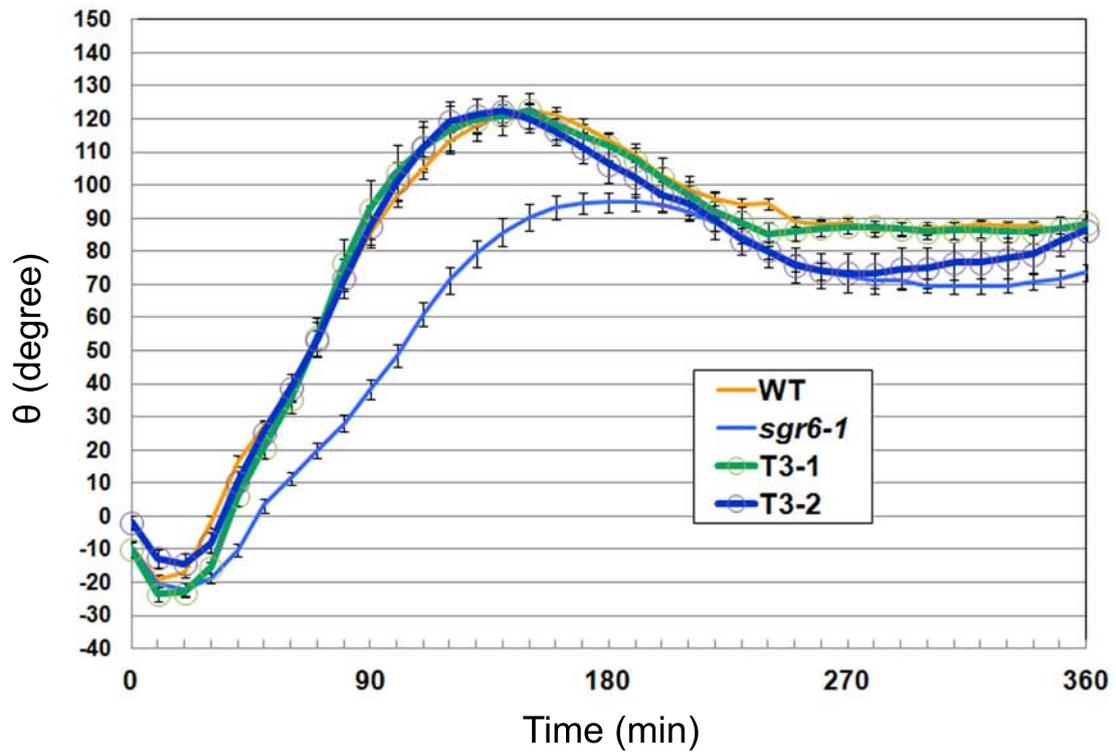


図41. *SCRpro::GFP-SGR6/sgr6-1*形質転換体のT3世代における重力屈性反応。
 形質転換体T3世代の独立2系統について重力屈性測定を行った。
 N = 14~16 (ただし、野生型、*sgr6-1*はN = 20)、エラーバーはSEを示す。

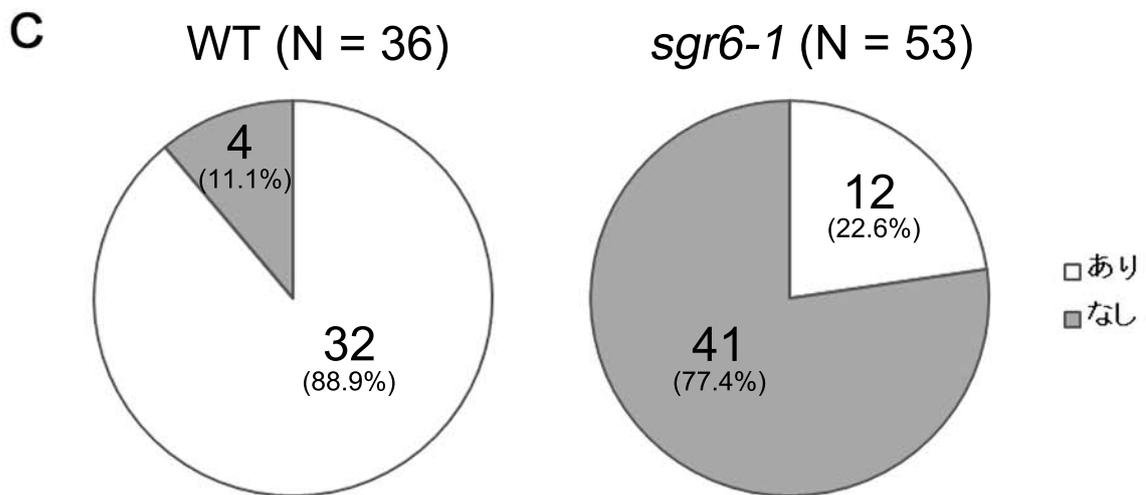
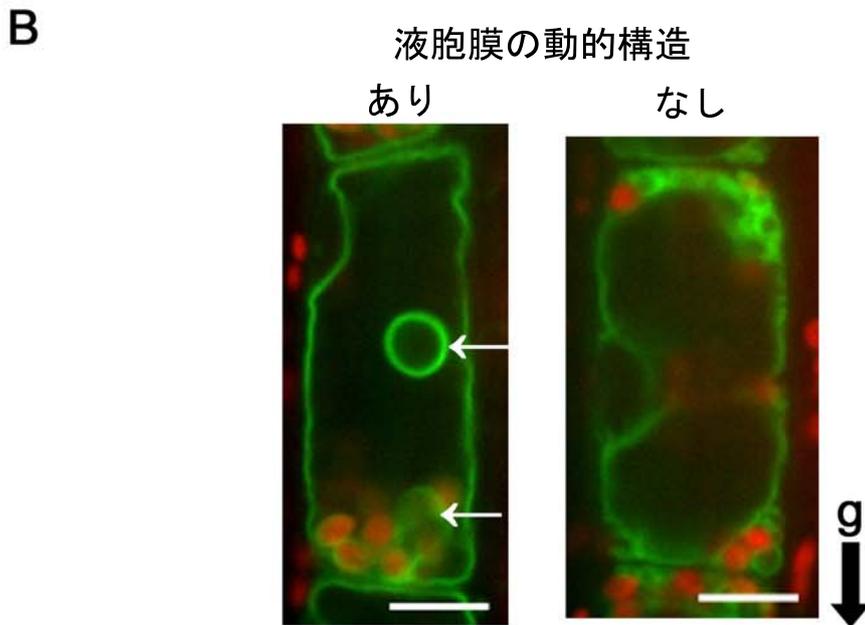
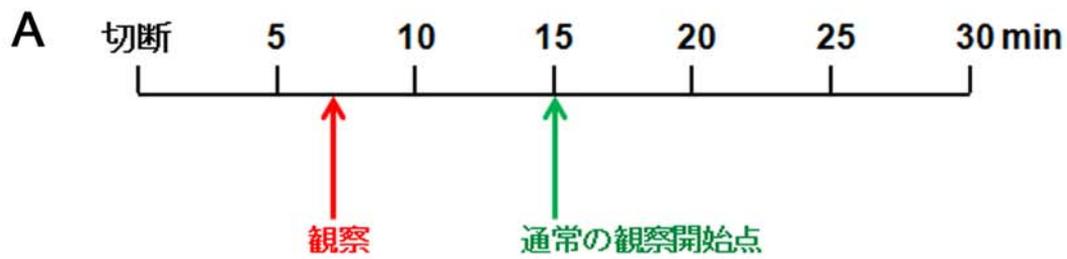


図42. 野生型、*sgr6-1*の内皮細胞の液胞膜構造。

内皮特異的なSCRプロモーターの制御下でGFP融合型 γ -TIPを発現させ液胞膜を可視化した形質転換体の内皮細胞を、横倒し顕微鏡を用いて観察した。

(A) 観察のタイムスケール。

(B) 花茎を切って5~10分の時点で撮影した内皮細胞の写真。

緑のシグナルはGFP蛍光を、赤のシグナルはアミロプラストの自家蛍光を、矢印は液胞膜の動的構造を、gは重力方向を示す。スケールバーは10 μ m。

(C) 花茎を切って5~10分の時点で液胞膜の動的構造を持つ細胞と持たない細胞の数をかぞえ、全個数に対する割合を示した。

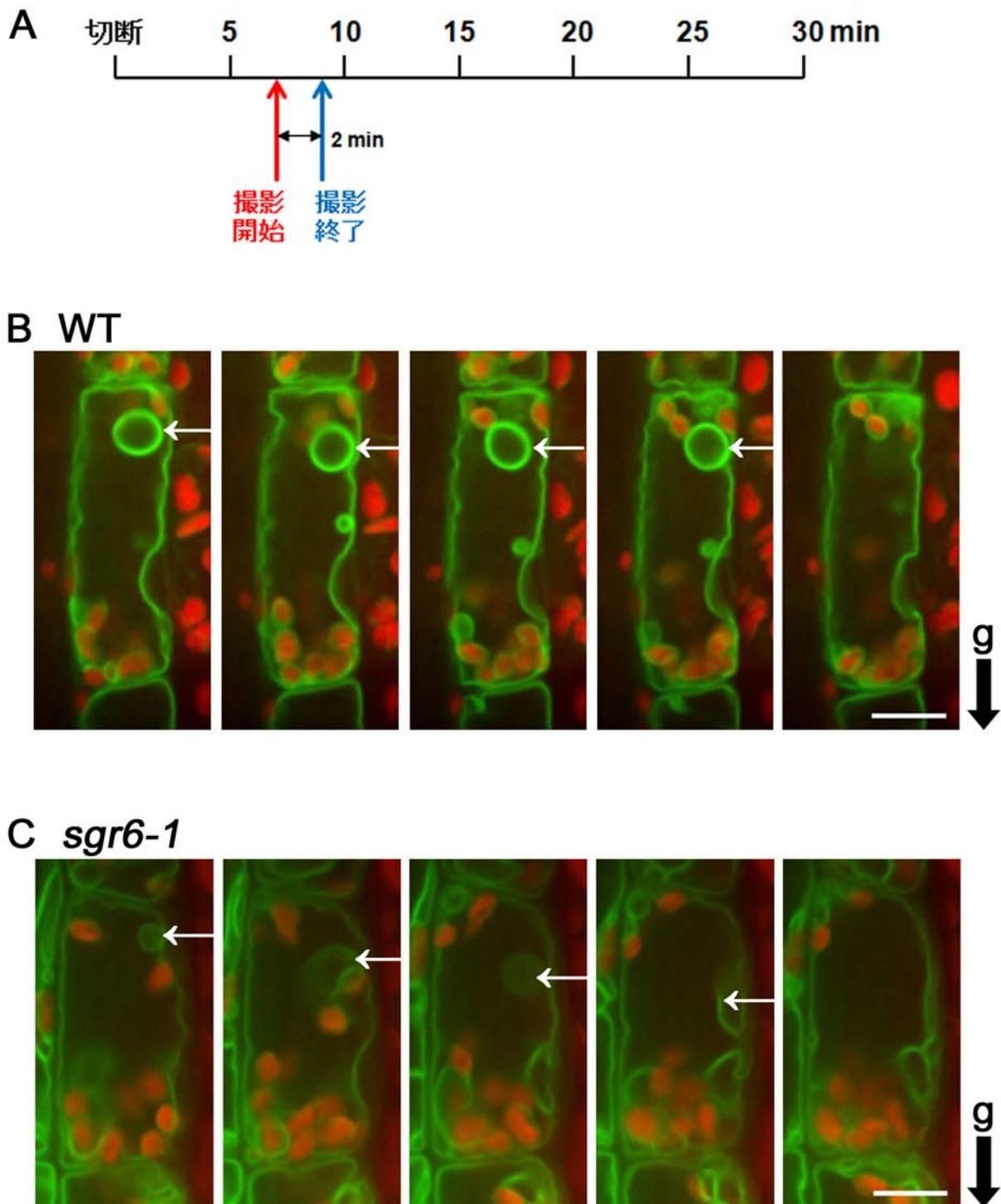


図43. 野生型、*sgr6-1*の内皮細胞の液胞膜構造とアミロプラスト動態。
 内皮特異的なSCRプロモーターの制御下でGFP融合型 γ -TIPを発現させ液胞膜を可視化した形質転換体の内皮細胞を、横倒し顕微鏡を用いて観察した。
 (A) 観察のタイムスケール。
 (B) 花茎を切って5~10分後から2分間、タイムラプス撮影した野生型の内皮細胞の撮影開始から約30秒毎の連続写真。
 (C) 花茎を切って5~10分後から2分間、タイムラプス撮影した*sgr6-1*の内皮細胞の撮影開始から約30秒毎の連続写真。
 緑のシグナルはGFP蛍光を、赤のシグナルはアミロプラストの自家蛍光を示す。さらに、矢印は液胞膜の動的構造を、gは重力方向を示す。スケールバーは10 μ m。

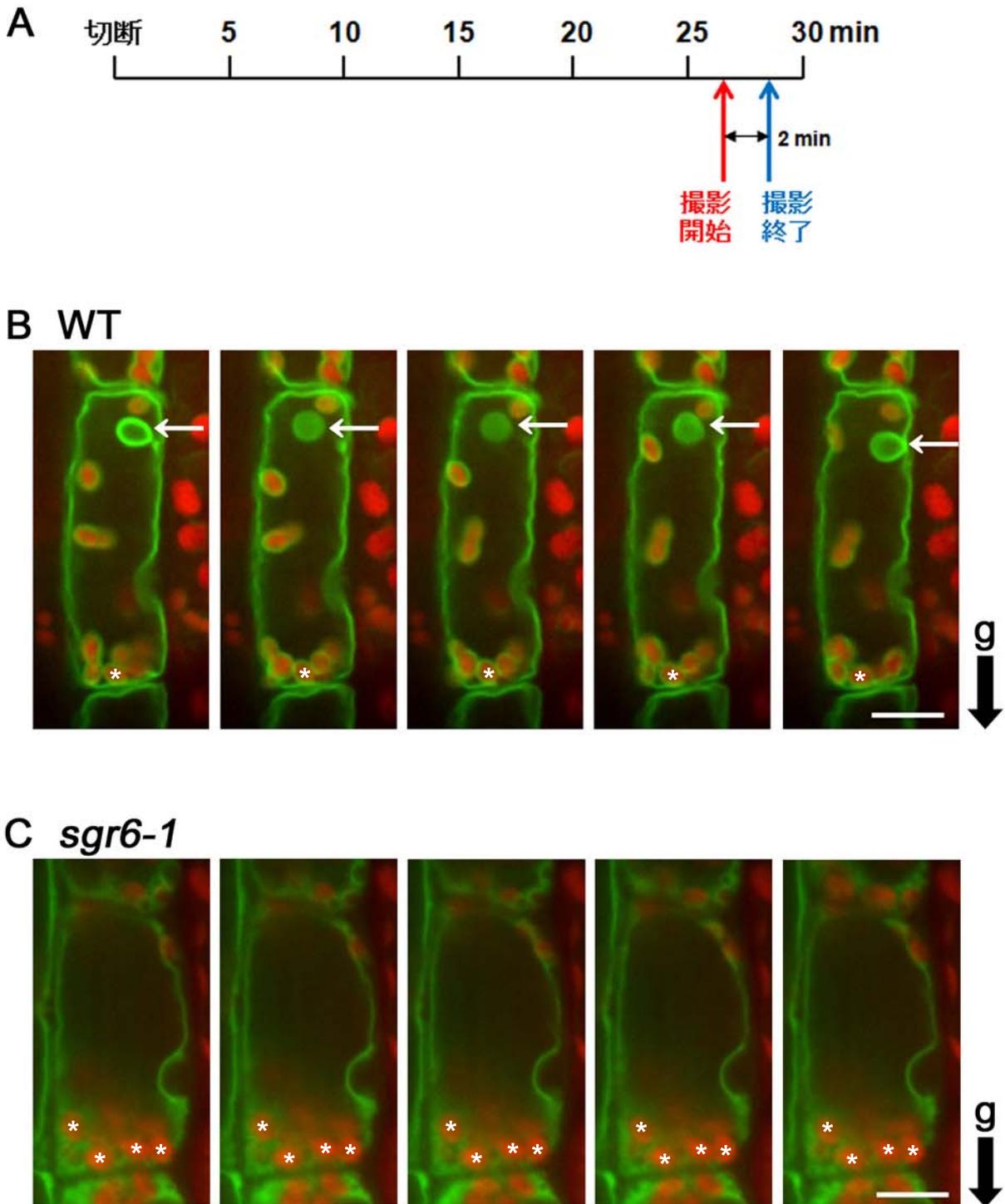


図44. 野生型、*sgr6-1*の内皮細胞の液胞膜構造とアミロプラスト動態。
 内皮特異的なSCRプロモーターの制御下でGFP融合型 γ -TIPを発現させ液胞膜を可視化した形質転換体の内皮細胞を、横倒し顕微鏡を用いて観察した。
 (A) 観察のタイムスケール。
 (B) 花茎を切って25~30分後から2分間、タイムラプス撮影した野生型の内皮細胞の撮影開始から約30秒毎の連続写真。
 (C) 花茎を切って25~30分後から2分間、タイムラプス撮影した*sgr6-1*の内皮細胞の撮影開始から約30秒毎の連続写真。
 緑のシグナルはGFP蛍光を、赤のシグナルはアミロプラストの自家蛍光を示す。
 さらに、矢印は液胞膜の動的構造を、アスタリスクは2分間の観察中、上下左右に動かず、回転もしなかったアミロプラストを、gは重力方向を示す。スケールバーは 10 μ m。

A

		WT (N = 41)		sgr6-1 (N = 36)	
動的構造		あり	なし	あり	なし
花茎切片作成後	5~10min	41		36	
	25~30min	41 (100%)	0 (0%)	15 (41.7%)	21 (58.3%)

B

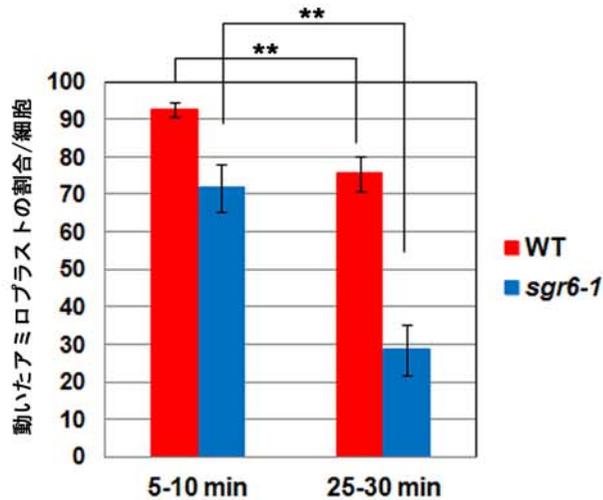


図45. 野生型、sgr6-1の内皮細胞の液胞膜構造とアミロプラスト動態の定量。

内皮細胞を、花茎を切って5~10分後および25~30分後から2分間タイムラプス撮影した。(A) 花茎を切って5~10分の時点で図43B, Cの矢印で示すような液胞膜の動的構造を持つ細胞のうち、25~30分の時点で動的構造を持つ細胞と持たない細胞の数をかぞえた。野生型、N = 41; sgr6-1、N = 36。

(B) 撮影開始時点で見たアミロプラストのうち、図44B, Cのアスタリスクで示すようなアミロプラストを2分間の観察中動かなかったアミロプラストとし、それ以外の動いたアミロプラストの1細胞あたりの割合を示した。野生型、N = 41; sgr6-1、N = 36。有意差はStudent's *t* testを用いて検定された (***P* < 0.01)。エラーバーはSEを示す。

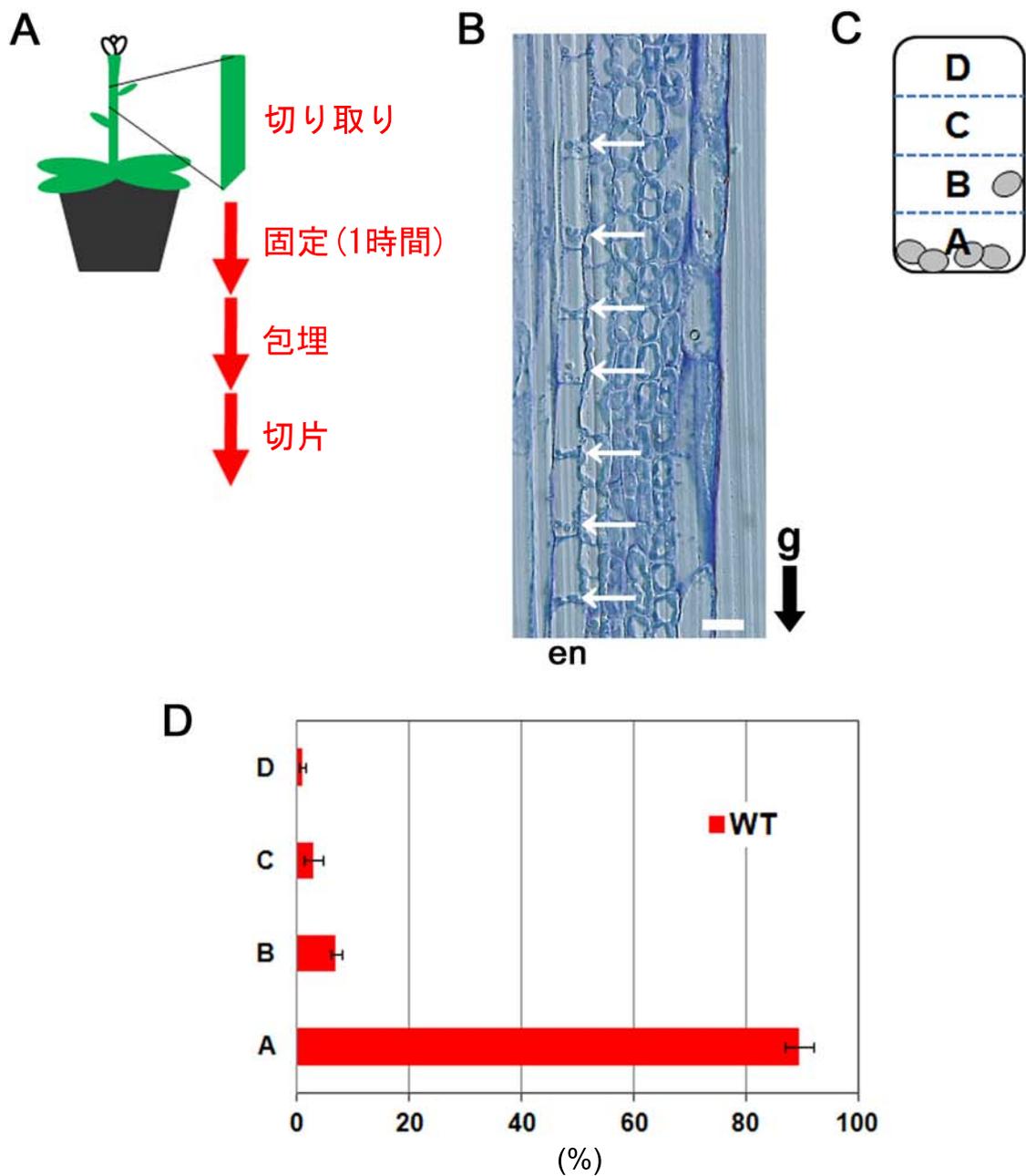


図46. 野生型花茎内皮細胞のアミロプラスト局在。

(A) 花茎固定試料の作成。

(B) 固定試料の縦断切片の顕微鏡写真。矢印はアミロプラストを指し、enは内皮を、gは重力方向を示す。スケールバーは20 μm。

(C) 一つの内皮細胞の模式図。細胞を重力方向に従い4等分し、最下部の区画からA, B, C, Dとした。

(D) 内皮細胞50個について、A, B, C, Dそれぞれの区画におけるアミロプラストの個数を計測し、全個数に対する割合を示した。エラーバーはSDを示す。

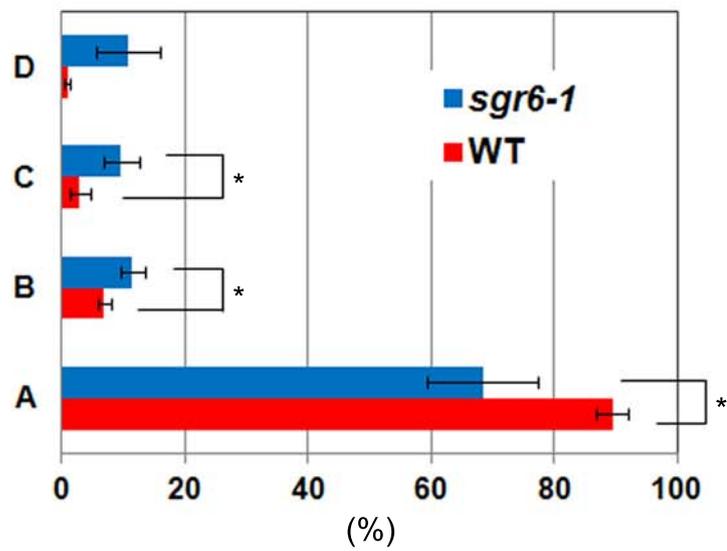


図47. 野生型と *sgr6-1*でのアミロプラスト局在の比較。定量は図46Dと同様にした。有意差はStudent's *t* testを用いて検定された (* $P < 0.05$)。エラーバーはSDを示す。

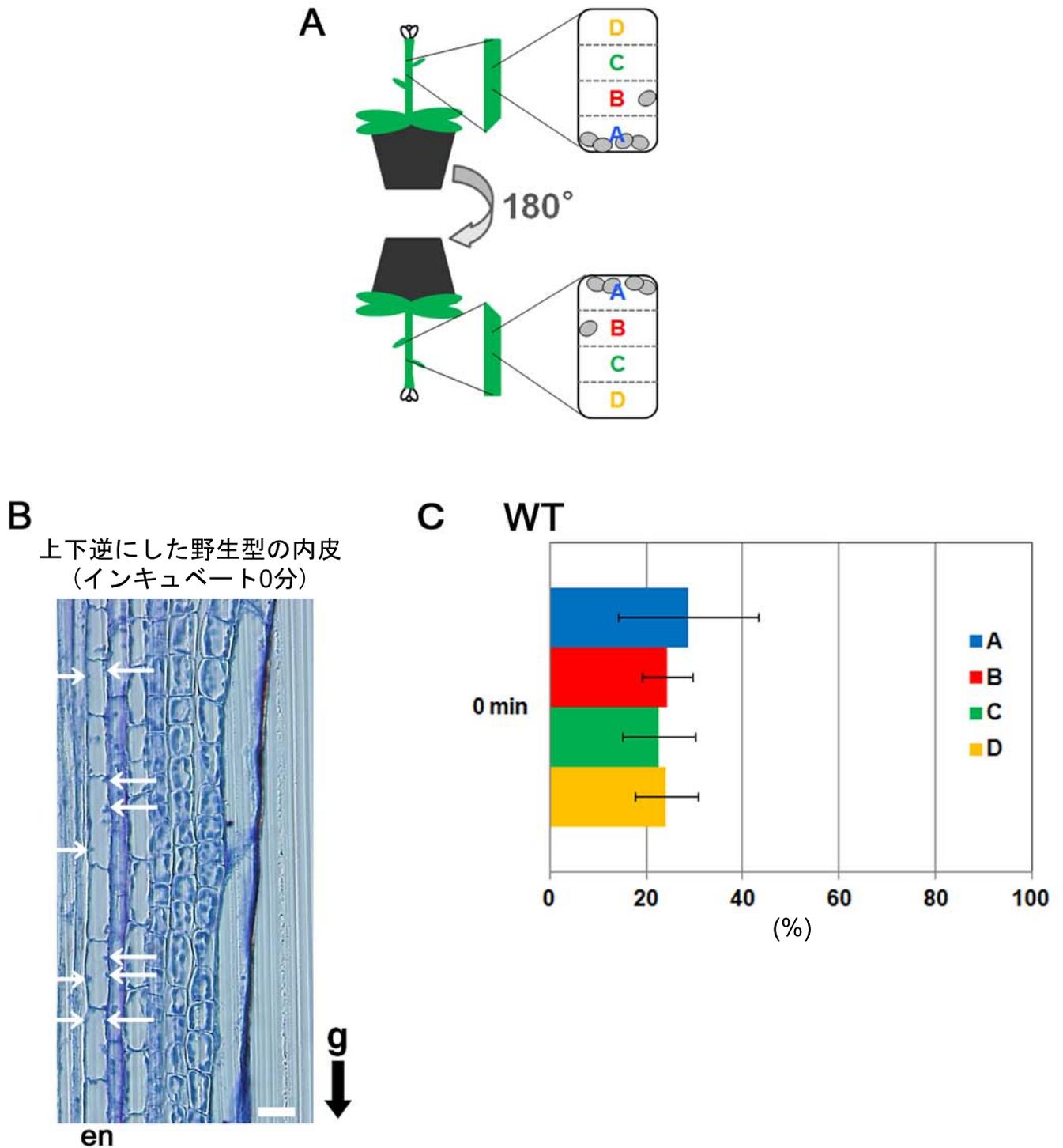
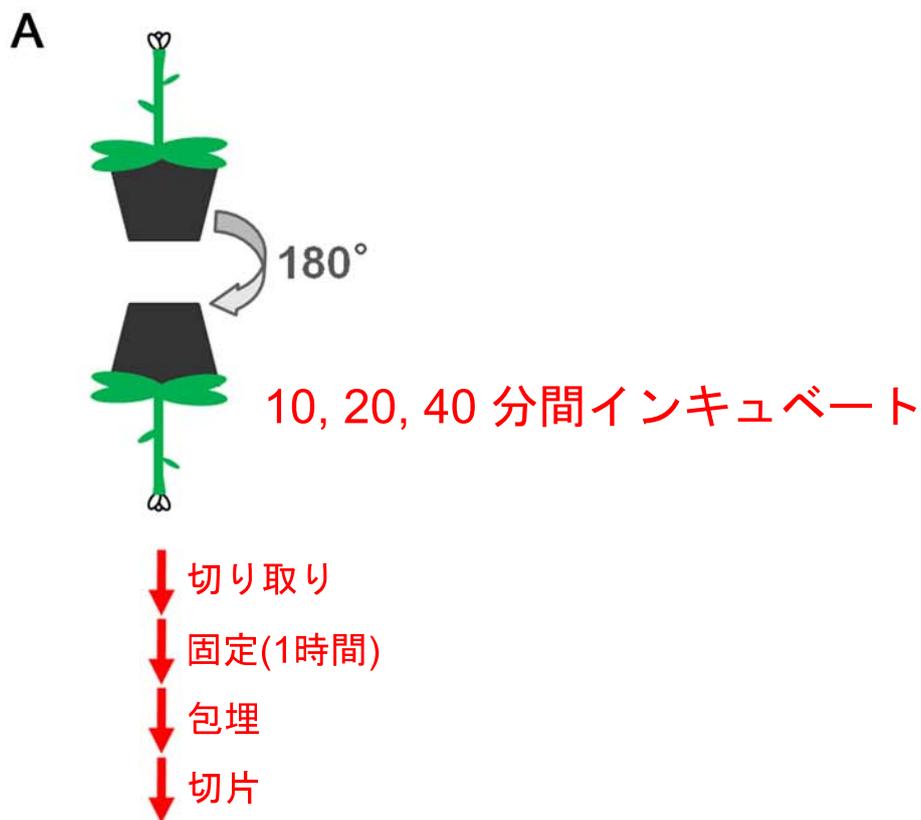


図48. 上下を逆にした野生型内皮細胞のアミロプラスト局在。

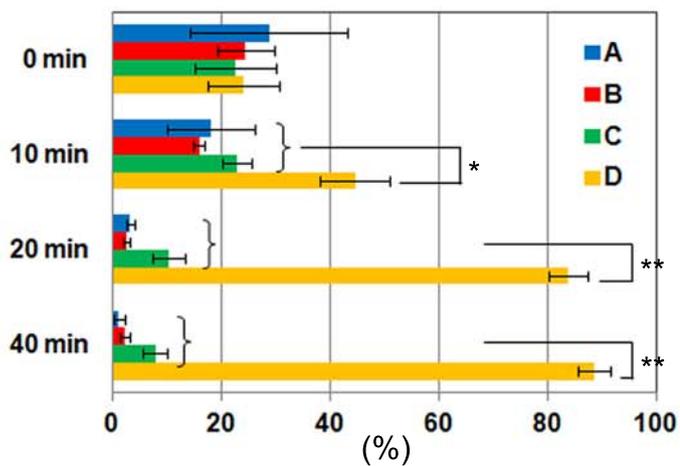
(A) 植物体を上下逆にしたときの内皮細胞の4つの区画。

(B) 固定試料の縦断切片の顕微鏡写真。野生型植物体を上下逆にした後、すぐさま花茎を切り取り(インキュベート0分)、固定した。その後の作成は図13Aと同様にした。矢印はアミロプラストを指し、enは内皮を、gは重力方向を示す。スケールバーは20 μm 。

(C) 上下を逆にした野生型内皮細胞のアミロプラスト局在(インキュベート0分)。定量は図46Dと同様にした。エラーバーはSDを示す。



B WT



C *sgr6-1*

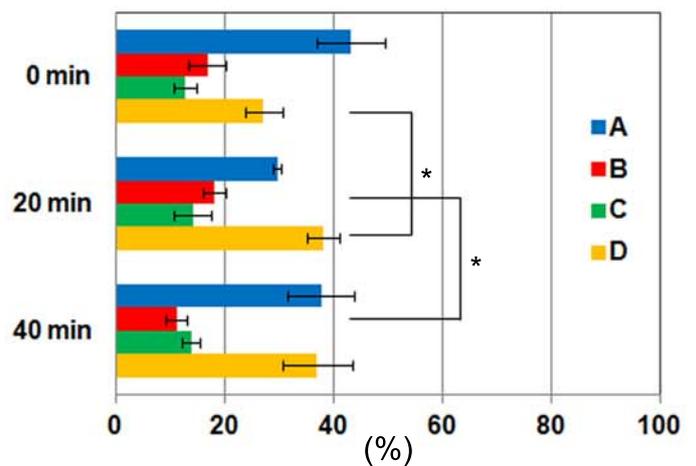


図49. 上下を逆にした内皮細胞におけるアミロプラスト動態。

(A) 花茎固定試料の作成。植物体を上下逆にした後、そのままの状態
10, 20, 40分間インキュベートした。その後の作成は図13Aと同様にした。
(B,C) 各区画のアミロプラスト個数の割合をインキュベート時間ごとに示した。
(B)野生型、(C)*sgr6-1*。定量は図46Dと同様にした。有意差はStudent's *t* testを
用いて検定された (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。エラーバーはSDを示す。

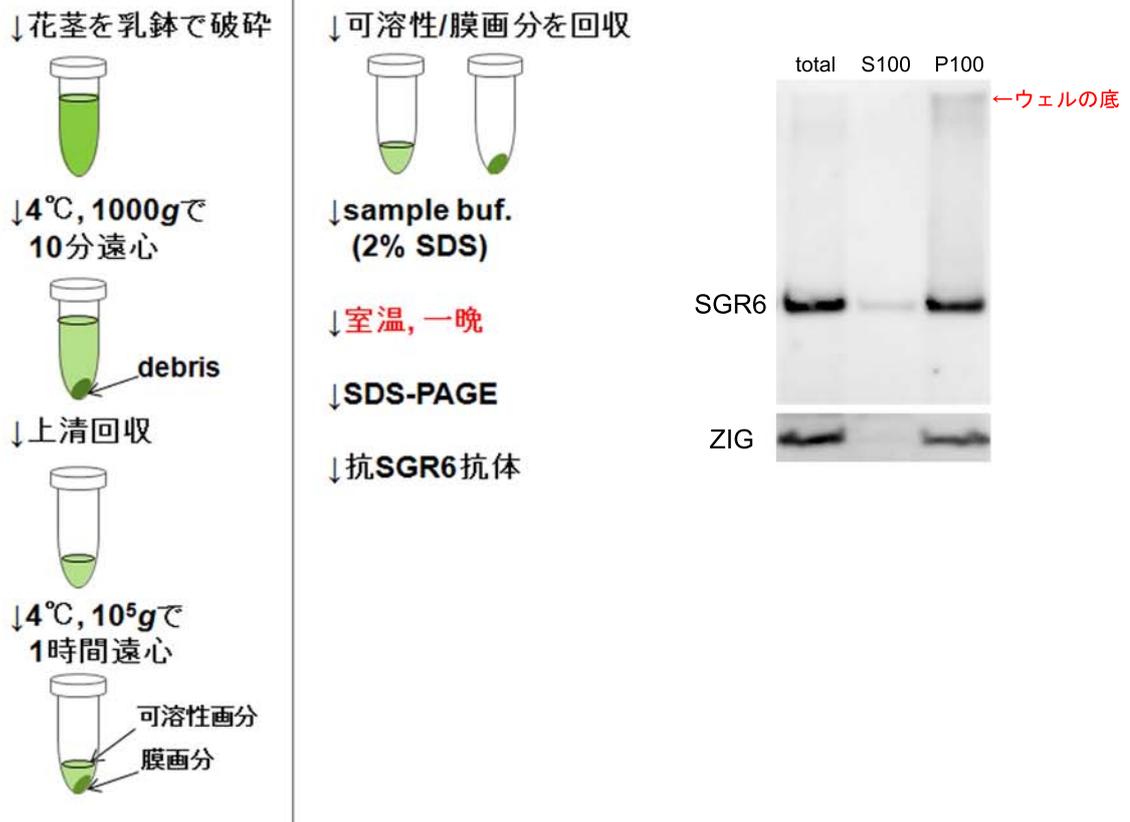


図50. 生化学的手法を用いたSGR6の局在解析。
 発芽後6週目の野生型の花茎由来のタンパク質抽出液から、可溶性画分と膜画分を回収し、ウェスタンブロット解析を行った。膜画分のマーカーとして、膜貫通型タンパク質であるZIGを用いた。

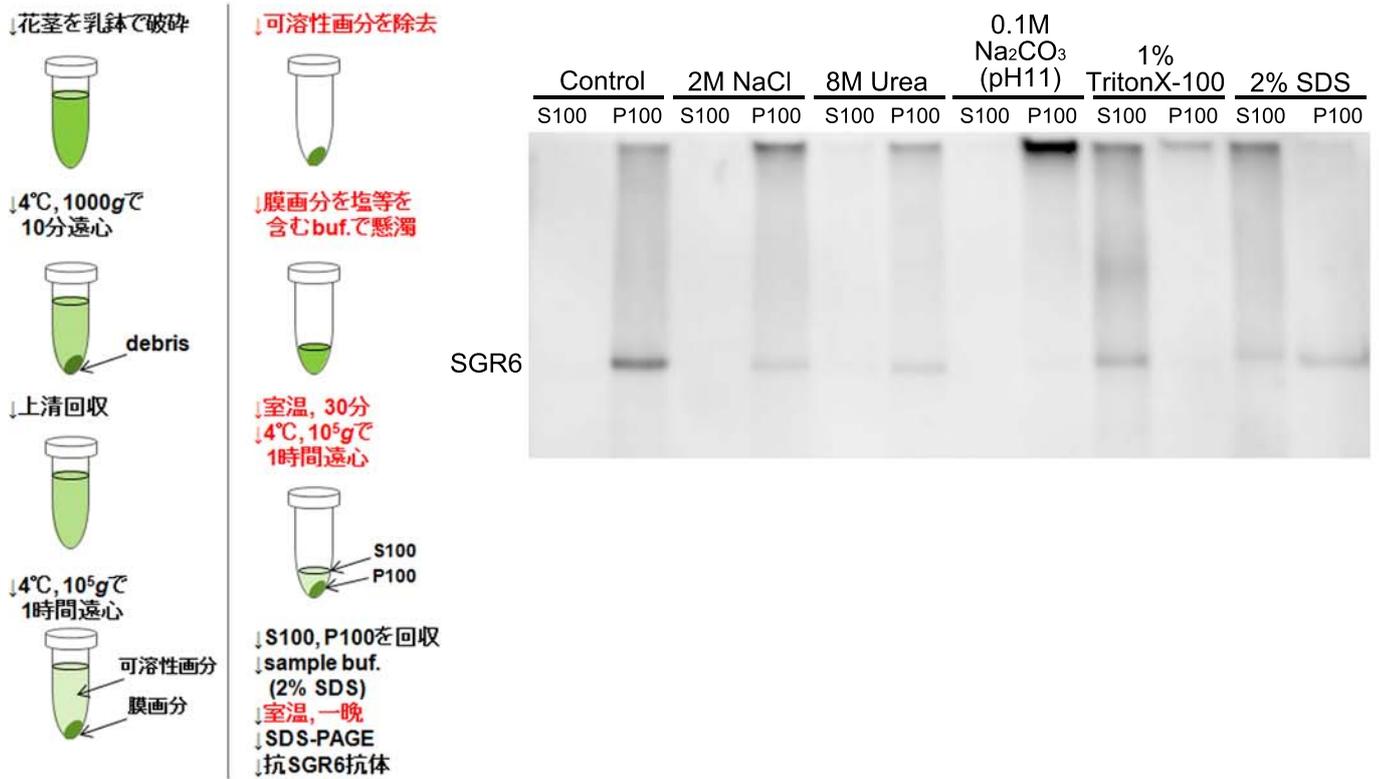


図51. SGR6の膜からの可溶化。

発芽後6週目の野生型の花茎由来のタンパク質抽出液から膜画分を回収し、各種のバッファーを用いてSGR6が膜から可溶化される条件を調べた。

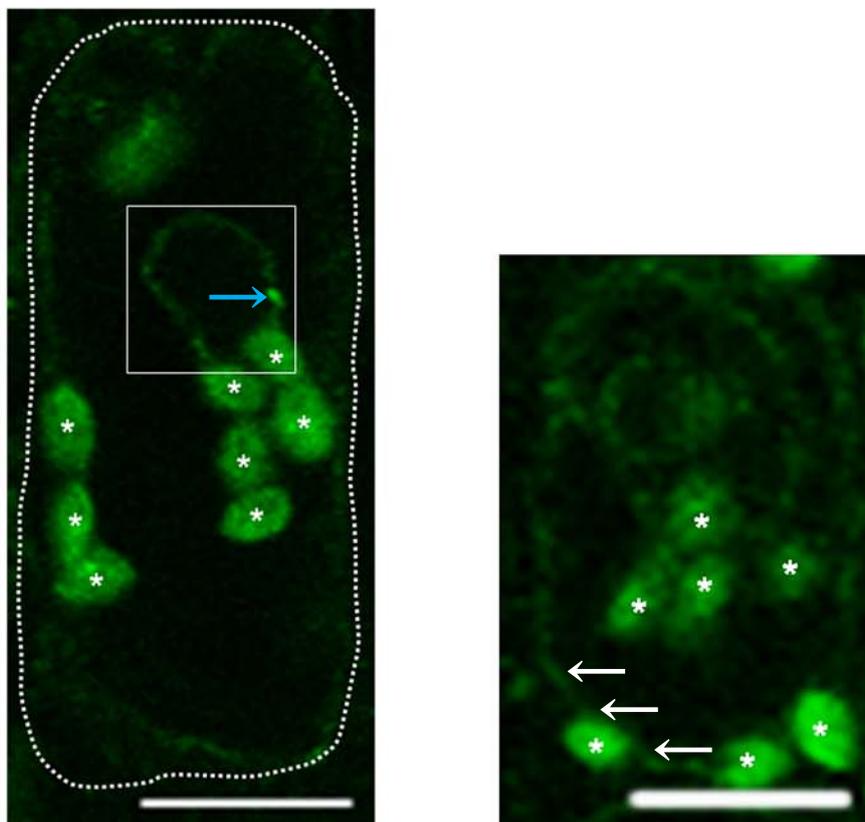


図52. GFP-SGR6の細胞内局在 (1)。

相補性試験に用いた *SGR6pro:GFP-SGR6/sgr6-1* の内皮細胞写真。アスタリスクはアミロプラストの自家蛍光を、点線は細胞周縁を示す。さらに、白の四角は環状のGFPシグナルを、青矢印はドット状のGFPシグナルを、白矢印はアミロプラストより細胞中央に近い側に存在するGFPシグナルを示す。スケールバーは10 μm 。

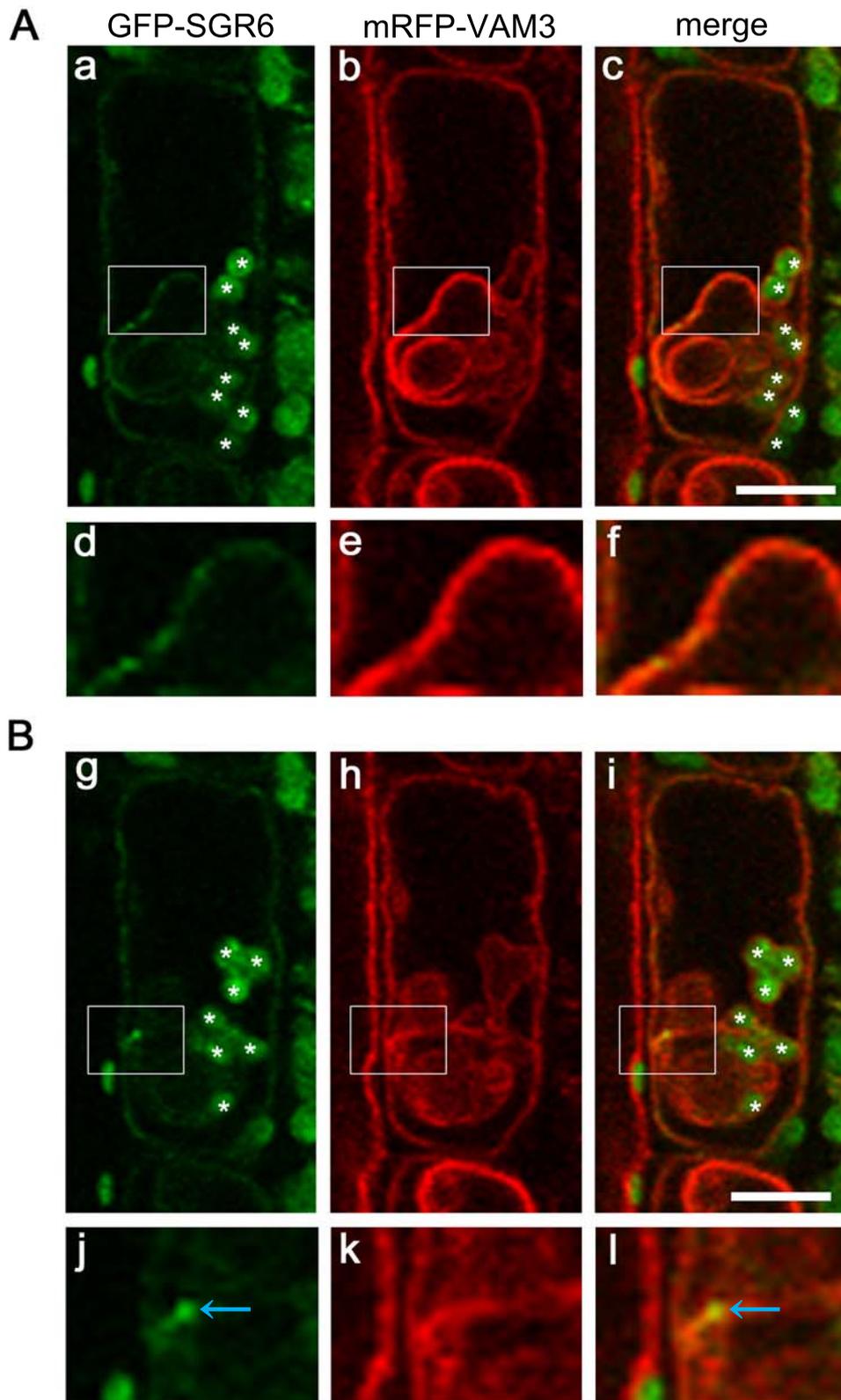


図53. GFP-SGR6の細胞内局在 (2)。

(A) *SGR6pro::GFP-SGR6/sgr6-1*と *VAM3pro::mRFP-VAM3/vam3-1*とを掛け合わせて得られた植物体の内皮細胞写真。

(B) (A)の30秒後の写真。

アスタリスクはアミロプラストの自家蛍光を示す。d, e, f, j, k, lはそれぞれ a, b, c, g, h, iの白の四角で囲まれた領域を拡大したもの。j, lの青矢印はドット状の GFPシグナルを指す。スケールバーは10 μm 。

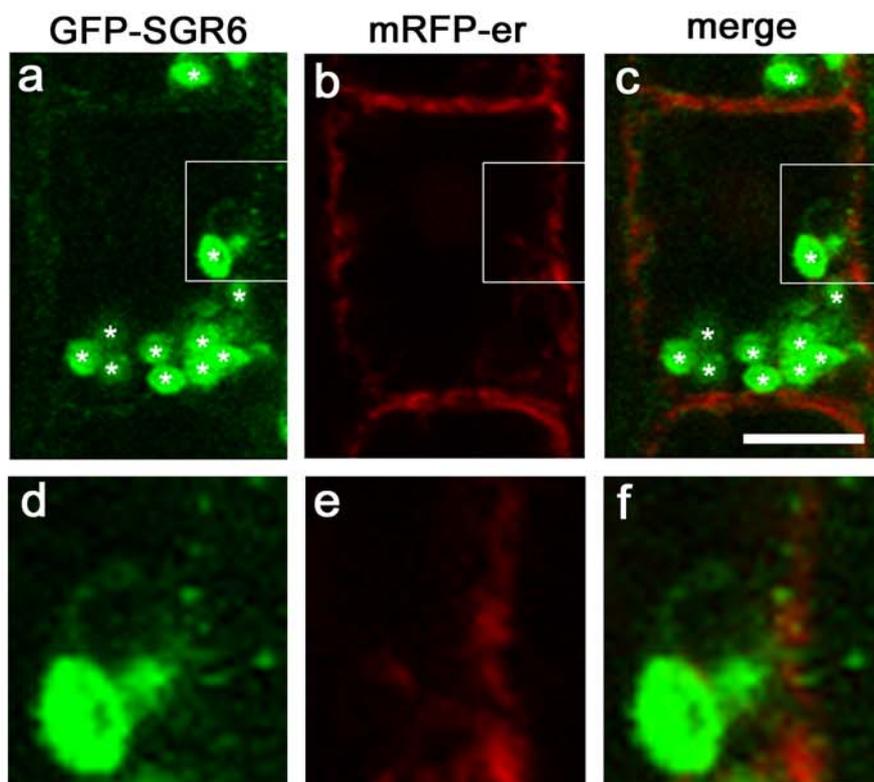


図54. GFP-SGR6の細胞内局在 (3)。
*SGR6pro:GFP-SGR6/sgr6-1*と*SCRpro:mRFP-er/WT*とを掛け合わせて得られた植物体の内皮細胞写真。
 アスタリスクはアミロプラストの自家蛍光を示す。d, e, fはそれぞれa, b, cの白の四角で囲まれた領域を拡大したもの。スケールバーは10 μm 。

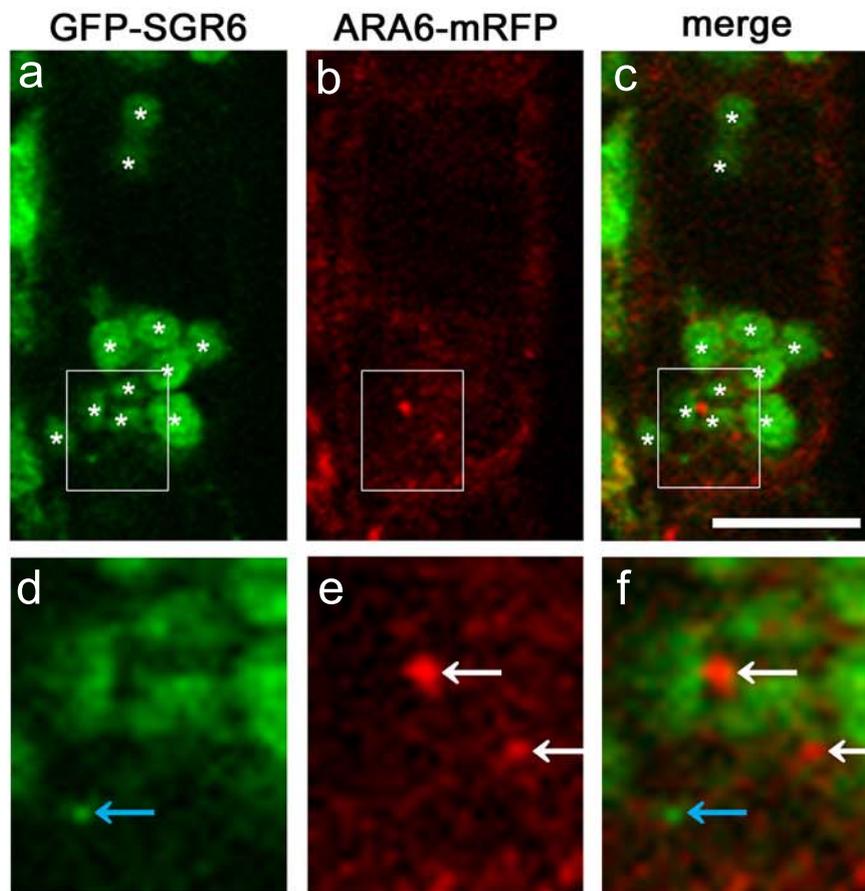


図55. GFP-SGR6の細胞内局在 (4)。

(a-c) *SGR6pro::GFP-SGR6/sgr6-1*と *SCRpro::ARA6-mRFP/NT*とを掛け合わせて得られた植物体の内皮細胞写真。

アスタリスクはアミロプラストの自家蛍光を示す。d, e, fはそれぞれ a, b, cの白の四角で囲まれた領域を拡大したもの。d, fの青矢印はドット状のGFPシグナルを、e, fの白矢印はドット状のRFPシグナルを指す。スケールバーは10 μm 。

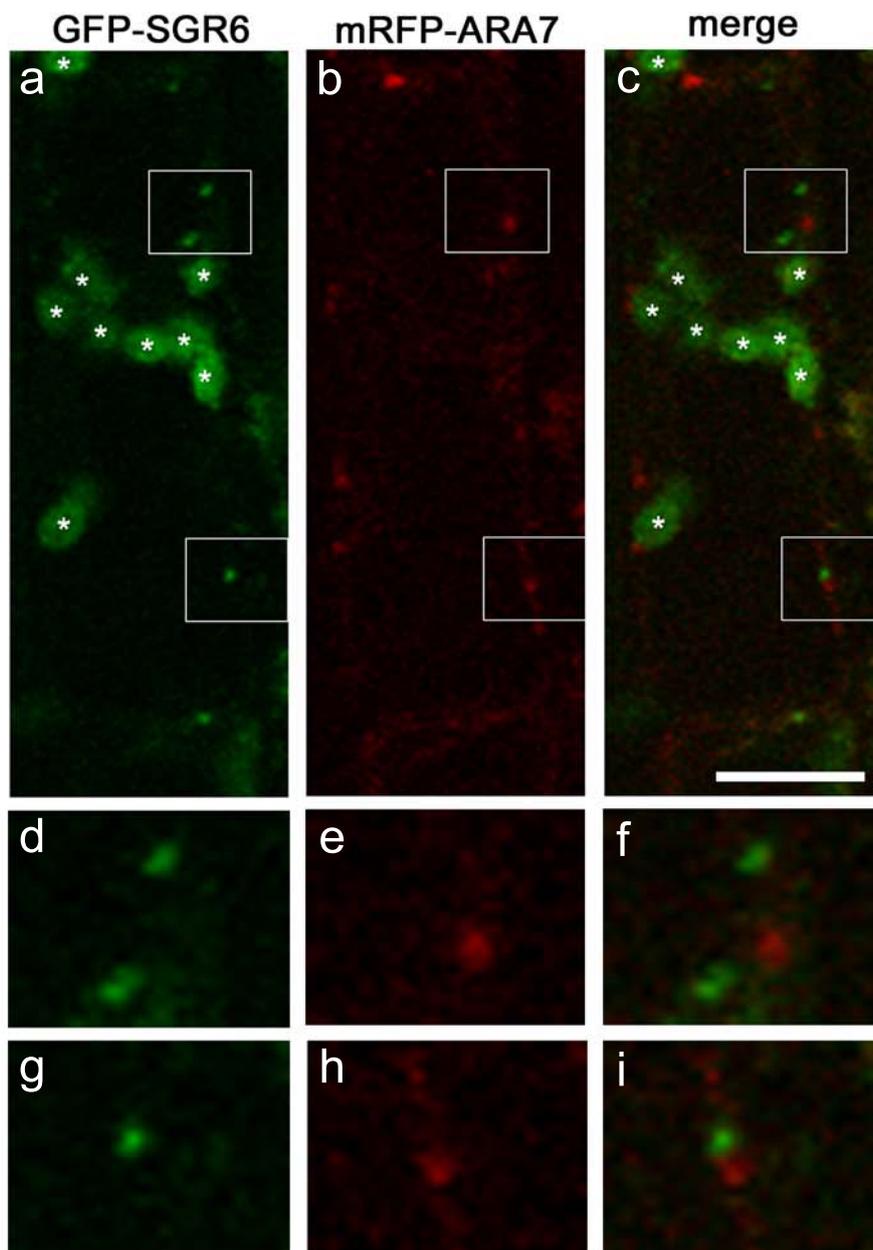


図56. GFP-SGR6の細胞内局在 (5)。

(a-c) *SGR6pro::GFP-SGR6/sgr6-1*と *SCRpro::ARA6-mRFP/MT*とを掛け合わせて得られた植物体の内皮細胞写真。

アスタリスクはアミロプラストの自家蛍光を示す。d, e, f, g, h, iはそれぞれa, b, cの上側あるいは下側の白の四角で囲まれた領域を拡大したもの。

スケールバーは10 μm 。

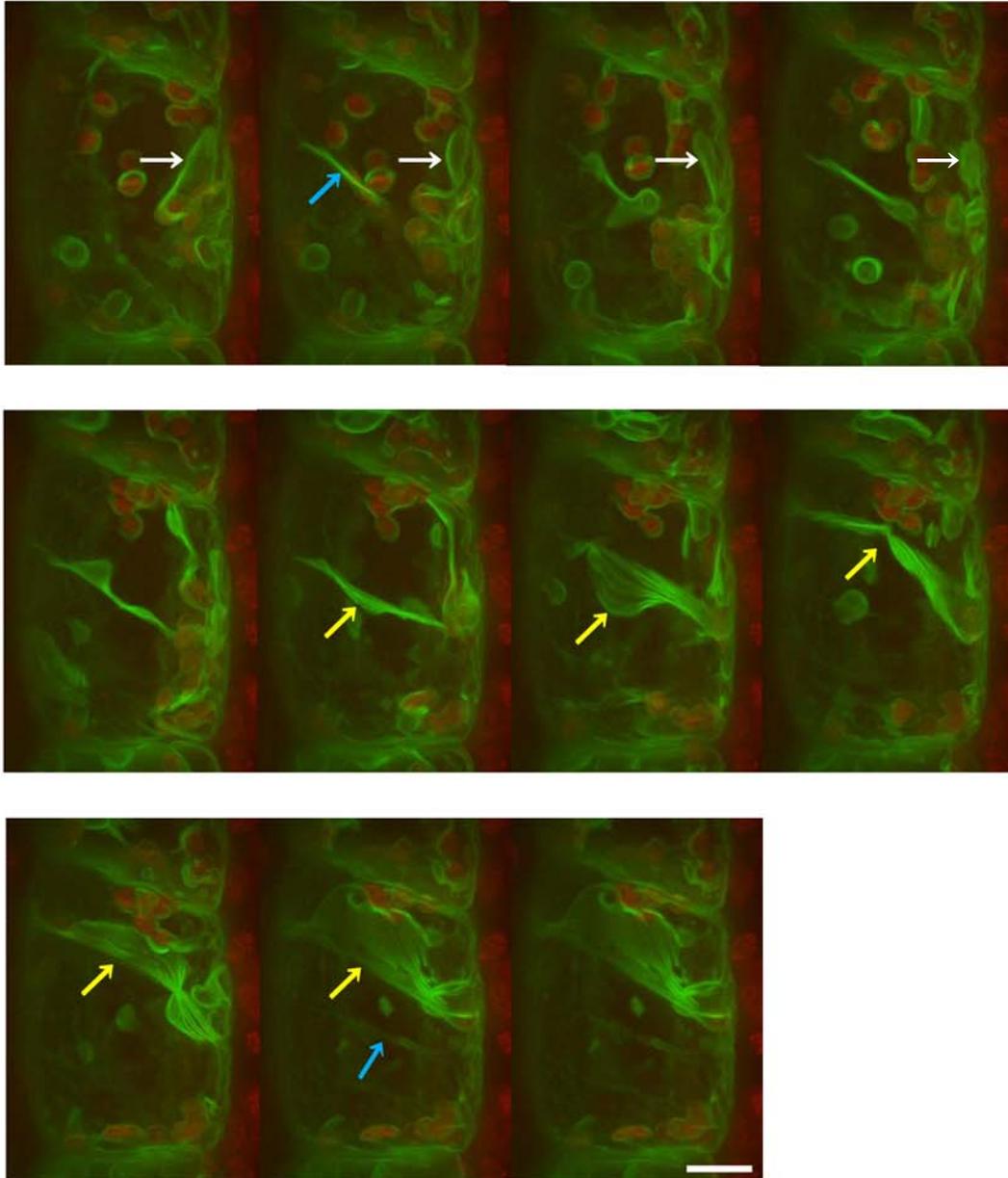
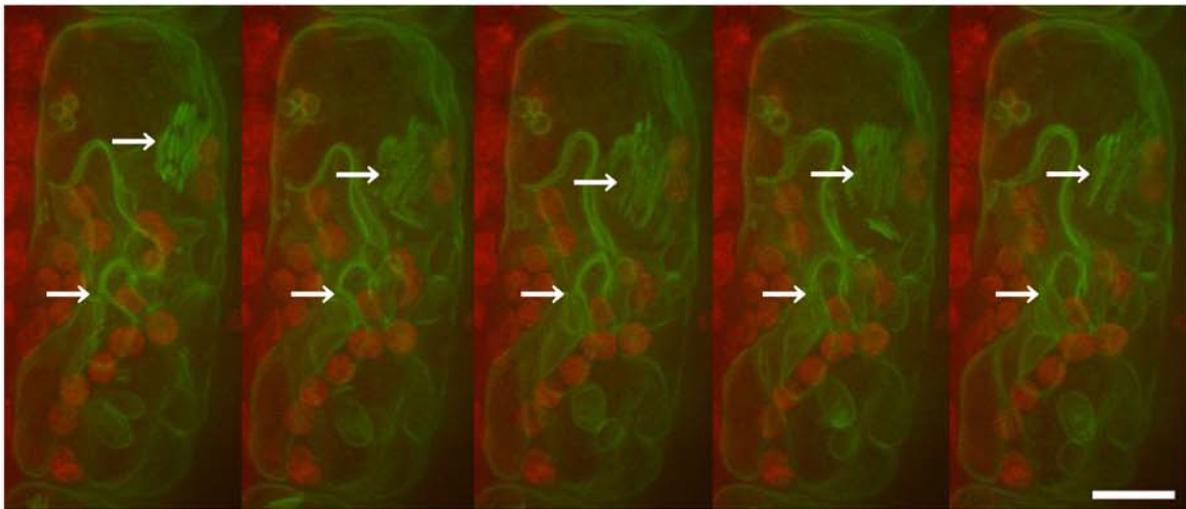
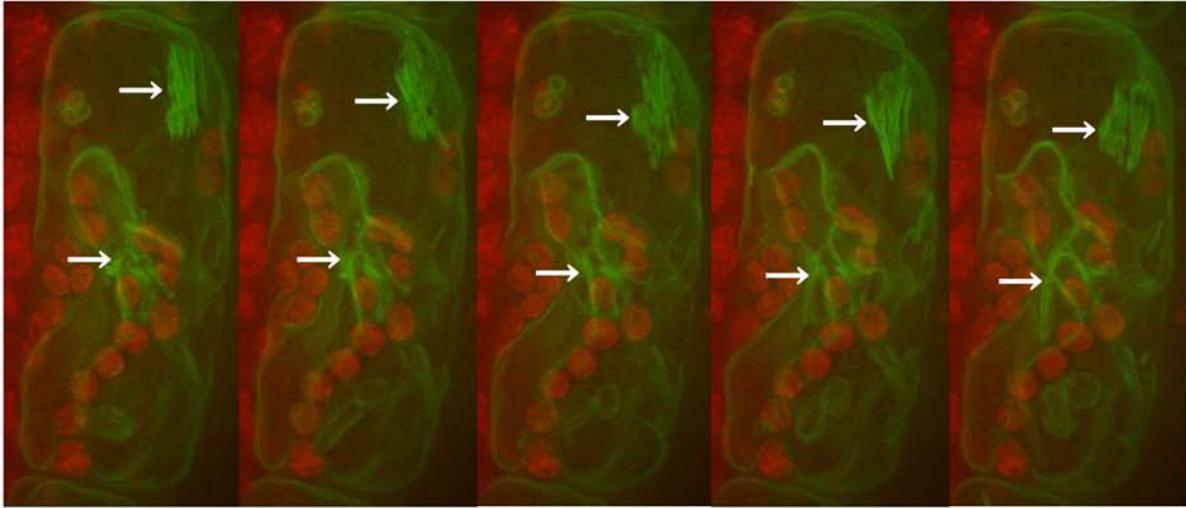


図57. 野生型の内皮細胞の液胞膜構造の変化。

内皮特異的なSCRプロモーターの制御下でGFP融合型 γ -TIPを発現させ液胞膜を可視化した形質転換体の内皮細胞を、CV-1000 (YOKOGAWA)を用いて観察した。花茎を切って10~20分の間に4D撮影した野生型の内皮細胞の20秒毎の連続写真(計200秒)。白矢印は液胞外周部の膜に取り込まれた動的構造を、青矢印は新しく形成された動的構造を、黄矢印は形態が大きく変化した動的構造を指す。緑のシグナルはGFP蛍光を、赤のシグナルはアミロプラストの自家蛍光を示す。スケールバーは10 μ m。

A



B

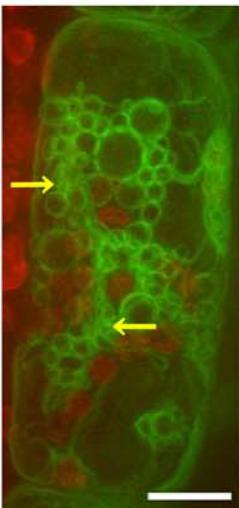


図58. *sgr6-1*の内皮細胞の液胞膜構造の変化。

内皮特異的なSCRプロモーターの制御下でGFP融合型 γ -TIPを発現させ液胞膜を可視化した形質転換体の内皮細胞を、CV-1000 (YOKOGAWA)を用いて観察した。

(A) 花茎を切って10~20分の間に4D撮影した*sgr6-1*の内皮細胞の25秒毎の連続写真(計250秒)。白矢印は折りたたまるようにして蓄積した液胞膜構造を示す。

(B) 花茎を切って30分後の写真。黄矢印は小胞様の液胞膜構造を指す。

緑のシグナルはGFP蛍光を、赤のシグナルはアミロプラストの自家蛍光を示す。スケールバーは10 μ m。