

博士論文番号：0281022

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

新濱 充

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 形質発現植物学講座

(田坂 昌生 教授)

平成 17 年 1 月 6 日提出

## 目次

|       | ページ |
|-------|-----|
| 序論    | 3   |
| 材料と方法 | 8   |
| 結果    | 16  |
| 考察    | 27  |
| 謝辞    | 32  |
| 参考文献  | 33  |
| 表     | 39  |
| 図     | 41  |

## 序論

真核生物の細胞内には多種類のオルガネラが存在し、個体を維持するためにそれぞれが固有の機能を担っている。これらは大きく分けて独自のゲノム DNA を持つ二重膜系オルガネラと、独自ゲノムを持たない単膜系オルガネラに分けられる。どちらのタイプのオルガネラにおいても核内 DNA の情報に沿って産生されたタンパク質が、その機能を果たすためにこれらに正確に輸送される機構が存在する。その輸送機構はそれぞれのオルガネラに固有であり、真核生物の細胞において正確なオルガネラへのタンパク質輸送が行われることで、それぞれのオルガネラは特異的な機能を担える。その中でも小胞体、ゴルジ体、初期エンドソーム、後期エンドソーム/液胞前区画 (prevacuolar compartment; PVC)、リソソーム/液胞、細胞膜などにおいては主に小胞輸送によりオルガネラ間を結ぶタンパク質や膜の輸送が行われる (図 1)。小胞輸送には Rab ファミリーやコートタンパク質などのさまざまな分子が関与している。その中でも輸送小胞膜と標的膜との特異的融合では SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptor) と呼ばれる一群のタンパク質が重要な役割を果たしている (Fukuda et al., 2000; Jahn et al., 2003)。

SNARE は SNARE モチーフと呼ばれる  $\alpha$ -ヘリックス構造を 1 つもしくは 2 つ持ち、近接して膜貫通領域あるいは脂質修飾があり、これを介して膜に結合している。SNARE は SNARE モチーフの構造から R-, Qa-, Qb, Qc のサブクラスに分類される。Q ヘリックスを供する 2 つ、あるいは 3 つの SNARE は標的膜上に、R ヘリックスを供する SNARE は輸送小胞側に存在し、これら 4 分子が SNARE モチーフを介して parallel 4-helical bundle を形成することで膜融合に導くと考えられている (Fasshauer et al., 1998; Bock et al., 2001)。その後、 $\alpha$ -SNAP と NSF の働きにより ATP を利用して SNARE は解離され、R-SNARE は元の供与膜に戻される。

それぞれの SNARE は細胞内で特定のオルガネラ上に存在するという特異的な局在性を有し、これが小胞融合の選択性の一因であると考えられる。その一方で、一種類の SNARE が異なる組み合わせの複数の SNARE 複合体を形成したり、一種類の SNARE が細胞内の複数のコンパートメントにまたがって局在する例も報告されており、SNARE 複合体の選択性のみでは細胞内の小胞融合の選択性のすべてを説明できないと考えられるようになってきている。最近では輸送小胞膜と標的膜との間で SNARE 複合体が形成されて膜が融合に進むことを結合 (docking) と呼び、結合の前に仮に輸送小胞が標的膜に繋ぎとめられる過程を繫留 (tethering) と呼んでいる。繫留は可逆的かつ一時的な過程であり、小胞が繫留されている間に標的膜との間で膜の結合が起こらなければ解消される。すなわち、繫留は膜融合における校正にあたる過程と捉えることもできる (Whyte et al., 2002)。したがって、繫留も小胞融合の選択性の基礎の一つであると考えられるようになってきた。繫留に関与すると考えられているタンパク質複合体については、現在までに出芽酵母で 6 種類、哺乳類で 3 種類が

報告されている。その一つである出芽酵母の HOPS 複合体は Vps11p、Vps16p、Vps18p、Vps33p、Vps39p および Vps41p のサブユニットからなり、その機能の一つとして、液胞膜において輸送小胞の繫留に関与するというモデルが提示されている(Seal et al., 2000; Sato et al., 2000; Wurmser et al., 2000; Price et al., 2000a; Price et al., 2000b; Srivastava et al., 2000)。

真核細胞における細胞内小胞輸送研究の発展には、とりわけ出芽酵母を用いた生化学的および遺伝学的解析による貢献が大きい。出芽酵母では液胞形態の異常(Wada et al., 1997) やカーゴ(積荷)タンパク質の分泌異常を指標に多くの変異体が分離され、遺伝学的な解析により小胞輸送に関する多くの知見が得られてきた。出芽酵母では液胞へ至る小胞輸送経路には少なくとも次の3種類が存在すると考えられている。すなわち、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、ゴルジから PVC を非経由で液胞に至るアルカリフォスファターゼ (ALP) 経路、そして細胞質から液胞に至る Cvt (cytosol-to-vacuole) 経路であり(図2)、それぞれの輸送経路の異常を CPY、ALP、アミノペプチダーゼ I (API) というそれぞれの経路に特異的なカーゴタンパク質をマーカーにすることでパルス-チェイスによりモニターできる。動物、植物を含めた高等真核生物では各器官や組織ごとの機能分化が進んでおり、それを反映して細胞内のポストゴルジ・ネットワークにおける細胞内膜系および輸送経路が複雑化している。高等植物ではシロイヌナズナを中心として、特にポストゴルジの SNARE の生化学的・細胞生物学的解析が進められており、SNARE 複合体を形成する組み合わせが徐々に調べられている(Bassham et al., 2000; Sanderfoot et al., 1999; Sanderfoot et al., 2001; Zheng et al., 1999)。ゲノムプロジェクトのデータに基づくとシロイヌナズナには54個のSNARE遺伝子がある(Sanderfoot et al., 2000)と予測されており、最近、すべてのSNAREの局在解析が培養細胞を用いて行われた(Uemura et al., 2004)。このように生化学的、あるいは細胞生物学的解析を通じて細胞内における小胞輸送機構が明らかになりつつある。

一方、シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析により小胞輸送関連因子が細胞内のイベントのみならず、植物個体の基本的な体制構築、そして、より高次の生命活動にも関与していることが示されつつある。胚発生パターンに異常を示す変異体として単離された *knolle* の原因遺伝子は細胞質分裂に関与する Qa-SNARE KNOLLE/SYP111 であった(Lauber et al., 1997; Lukowitz et al., 1996)。胚発生過程で液胞形成に異常を示す *vacuoleless1* 変異体の原因遺伝子は出芽酵母 Vps16p のシロイヌナズナホモログ AtVPS16 をコードしていた(Rojo et al., 2001)。また、*osmotic stress-sensitive* 変異体の解析により Qc-SNARE SYP6 が浸透圧ストレス耐性に関与していることが示されている(Zhu et al., 2002)。そして、*penetration1* 変異体の解析により Qa-SNARE として機能する SYP121 が病害応答に関与すると報告されている(Assaad et al., 2004)。しかし、高等植物において高次機能と結び付けた小胞輸送関連因子の遺伝学的解析には問題点も存在する。その理由の一つに、高等植物の小胞輸送関連遺伝子の多くでは欠損変異体が胚性あるいは芽生えで致死になったり、逆に機能重複のために単独変異では明

瞭な表現型が出にくいといった点が挙げられる。事実、*knolle* 変異体では芽生えで致死になり、*vacuoleless1* 変異体は胚性致死となるので、生育後期での高次機能解析には適さない。シロイヌナズナではゲノムプロジェクトの進展に伴い、逆遺伝学的に T-DNA やトランスポゾンを用いた遺伝子破壊系統が整備されつつあるが、このような小胞輸送関連遺伝子の性質のため、遺伝子破壊系統のみを用いた逆遺伝学的なアプローチには限界がある。また、カーゴタンパク質や液胞形態を指標にするスクリーニング系は出芽酵母などの単細胞生物ではスクリーニングのための簡便で有効な指標になるが、高等植物のような多細胞系での適用には予め指標とした可視マーカーを導入した形質転換体を用いるなど人工的な系を必要とする。複雑な細胞内膜系を支えるために多様化してきた高等真核生物の小胞輸送を高次機能と結びつけた形で遺伝学的に解析する方策はないだろうか。そこで注目したのが私の属する研究室において重力屈性研究の過程で得られた *zigzag* (*zig*) 変異体である。

*zig* は出芽酵母 *Vti1p* のシロイヌナズナホモログである Qb-SNARE *VTI11* の欠損変異体である。出芽酵母 *Vti1p* (*Vps ten interacting*) はゴルジ体から液胞への輸送 (Fischer von Mollard et al., 1997; Holthuis et al., 1998) やゴルジ体内での逆行輸送 (Fischer von Mollard et al., 1997; Lupashin et al., 1997) など複数の小胞輸送経路に参与する Qb-SNARE である。シロイヌナズナ *VTI11* は出芽酵母温度感受性変異体 *vti1-1* における生育障害および CPY の輸送障害を相補する。T7 タグを融合した *VTI11* (T7-*VTI11*) を形質導入したシロイヌナズナを用いた免疫電子顕微鏡解析によると T7-*VTI11* は TGN と PVC に局在が認められる (Zheng et al., 1999)。また GFP を融合した *VTI11* をシロイヌナズナ培養細胞内で一過的に発現した系では TGN、PVC および液胞膜に局在が観察される (Uemura et al., 2004)。シロイヌナズナを用いたプロテオミクス解析によると、液胞膜画分から *ZIG/VTI11*、*SYP22* および *SYP5* が検出されている (Carter et al., 2004)。さらに共免疫沈降解析によると、*VTI11* との SNARE 複合体として検出されるのは *SYP21*、*SYP22* および *SYP5* である (Zheng et al., 1999; Sanderfoot et al., 1999; Sanderfoot et al., 2001; Yano et al., 2003)。*SYP21*、*SYP22* および *SYP5* は免疫電子顕微鏡解析および GFP を融合したタンパク質による解析から PVC および液胞膜に局在することが示されている (Sato et al., 1997; Sanderfoot et al., 1998; Sanderfoot et al., 1999; Sanderfoot et al., 2001)。これらの結果を踏まえて、*ZIG/VTI11* は TGN から PVC および液胞への順行輸送経路で機能し、PVC や液胞膜で SNARE 複合体を形成すると現在では考えられている (図 3)。

*zig-1/vti11* 変異体は、花茎の重力屈性異常とともに花茎や本葉の形態にも異常を示し (Yamauchi et al., 1997; Kato et al., 2002)、花茎細胞を電子顕微鏡で解析すると内皮および皮層細胞において液胞構造に異常が観察された (Morita et al., 2002)。この変異体において約 30% の割合で胚性致死が生じる (Surpin et al., 2003)。一方、*VTI11* と 60% の相同性をもつホモログの Qb-SNARE である *VTI12* は、出芽酵母温度感受性変異体 *vti1-2* の ALP の輸送障害および *vti1-11* の API の輸送障害を相補した (Zhang et al., 1999)。共免疫沈降解析によると、*VTI12* は *SYP4* および *SYP6* との物理的結合が認められる

(Bassham et al., 2000; Sanderfoot et al., 2001)。免疫電子顕微鏡解析によると SYP4 は TGN (Bassham et al., 2000) に、SYP6 はゴルジ体と TGN (Sanderfoot et al., 2001) に局在が認められる。そして、GFP を融合したタンパク質を用いた解析によると VTI12 は TGN、PVC および細胞膜に、SYP4 と SYP6 は TGN に局在が観察される (Uemura et al., 2004)。これらの結果を併せて、VTI12 は TGN、PVC および細胞膜に局在し、TGN において SYP4 および SYP6 と SNARE 複合体を形成して機能すると考えられている (図 3)。VTI12 の null 変異体は通常の生育条件では目立った表現型は見られないが、出芽酵母の Cvt 経路異常変異株 *vti1-11* の機能を一部相補することから、VTI12 がオートファジーに関与する可能性が示唆されている (Zheng et al., 1999; Surpin et al., 2003)。このように VTI11 と VTI12 の双方がともに存在する野生株の中ではおのおの別の機能を持つと考えられる。しかし、*zig/zig vti12/+* では *zig/zig* よりも、さらに表現型が強まり、*zig vti12* 二重 null 変異体は 100% 胚性致死になる (Surpin et al., 2003)。また *zig-1* や *vti12* といった単一 null 変異体の中ではそれぞれのホモログである他方の SNARE (VTI12 や ZIG) が本来ほとんど相互作用しない SYP21、SYP22 あるいは SYP4、SYP6 複合体中に混じってくる (Surpin et al., 2003)。そして *zig* 変異体バックグラウンドで VTI12 を過剰発現させると、*zig* の表現型をある程度相補した (Surpin et al., 2003)。これらの知見から VTI11 と VTI12 は一部交換可能な分子機能を持ち、胚発生過程においては器官形成といった高次機能も一部重複する可能性が高いことが示唆された (Surpin et al., 2003)。

以上の事実は、ZIG/VTI11 が小胞輸送による液胞形成を介して重力屈性や形態形成といった高次機能に関与していることを示唆する。そして同時に、その変異体を用いることで液胞への小胞輸送を分子遺伝学的に解析することが可能であることを示している。本研究は高等植物のポストゴルジ (図 1) における小胞輸送の分子ネットワークおよび高次機能を遺伝学的に解析することを目的とする。その目的のために *zig-1* のサプレッサー変異体のスクリーニングを行った。アミノ酸置換に由来する弱いアレル変異体を単離することで、これまでの解析では捉えることができなかったネットワークが見えてくる可能性がある。*zig* 変異体のもつ多面的表現型と原因遺伝子がコードする分子を考え合わせると、ZIG/VTI11 のもつ機能に関して以下のようなスキームが考えられる (図 4)。ZIG/VTI11 の関与する小胞輸送が正常な液胞の形成あるいは機能に必要な (①)。そして液胞の機能が重力屈性および形態形成にそれぞれ影響を及ぼす (②; ③)。*zig* 変異体の中で内皮特異的な発現を誘導する *SCARECROW* 遺伝子のプロモーターにより ZIG 遺伝子を誘導すると重力屈性の表現型のみが回復し、形態異常は戻らなかった (Morita et al., 2002) ことから、ZIG の機能を重力屈性と形態形成に遺伝的に分離することが可能であると考えられる。よってスクリーニングによって得られるサプレッサーの表現型により、それぞれの過程により特異的に関与する因子を同定することが期待される。すなわち、*zig-1* の重力屈性異常と形態異常の双方を回復させるものは過程①に、重力屈性を強く回復させるものは過程②に、形態を強く回復させるものは過程③に関与すると考えられる。まず、*zig* のサプレッサー

のスクリーニングによって得られた結果に基づいて考察する。次に、本研究で目的とした、より小胞輸送に強く関与する因子であると期待される重力屈性と形態の双方を回復させた *zig suppressor1* および *zig suppressor2* の解析結果について論じる。

## 材料と方法

### 植物材料および生育条件

#### (1) 植物材料

*zig-1(sgr4-1)*はシロイヌナズナColumbia(Col)野生株を高速中性子線処理した種子群(Lehle Seeds社)から塚谷裕一、柘植友彦両博士により単離された(Yamauchi et al., 1997)。*zig-3(sgr4-3)*はT-DNA導入系統のWassilewskija(Ws)株(Dupon' t社)より単離された(Kato et al., 2002)。*shoot gravitropism 3(sgr3)*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単離された(Fukaki et al., 1996)。*zig-1*、*zig-3*および*sgr3*はそれぞれの野生株によって各々8回、4回および5回戻し交配を行ったものを使用した。

#### (2) 生育条件

5%次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)で10分間滅菌した種子を10%のアガロースを含むMurashige-Skoog培地上に播種し、2週間程度生育させた後、土壌に植え替えた。個体間の生育のばらつきを極力抑えるために、播種の際にはプレートに54粒の種子を播き、植え替えの際には直径7.5cmのビニールポットに4個体ずつ植えた。植え替え後の土壌にはバーミキュライトとメトロミックスを1:1の割合で混合したものを用い、表面にパーライト1型を敷いた。また気温23℃、連続白色光の条件下で育成させ、栄養塩類としてハイポネックス1000倍液を適宜与えた。芽生えを用いた実験では0.5%のゲンランガムを含むMurashige-Skoog培地上に、表面を5%NaClOで10分間滅菌した種子を播いて育てた個体を使用した。

### 突然変異の誘起

*zig-1*変異体の種子約5000粒を0.4% EMSに10時間浸した後、水で1時間毎に計10回洗浄した。洗浄した種子表面を30%NaClOで数分間滅菌し、滅菌水でさらに洗浄してプレートに播種した。変異原処理した約5000個体中、開花して種子が得られた個体(M1世代)は約2000系統だった。

### サプレッサー変異体のスクリーニング

変異原処理したM1の独立12系統から得られたM2種子をひとまとめにして1バッチとした。1バッチにつき192個のM2種子を直播し、形態と重力屈性双方に着目してス



クリーニングを行った。重力屈性に着目したスクリーニングは花茎が4～10cm程度に伸びた時点で暗黒条件下に10～12時間水平方向に倒した後、屈曲を確認した。気温はバイオトロンで23℃に調節した。

## 花茎の重力屈性反応の測定

### (1) 花茎の重力屈性反応の測定

屈性実験にはロゼットから最初に抽苔した花茎を用い、その長さが4～8cmになったものを使用した。植物体は鉢に植わった状態の個体を水平方向に倒して暗黒条件下で静置して花茎の屈曲角度を30分ごとに記録した。屈曲の様子はデジタルカメラ(カシオ社製 QV2800-UX)で撮影し、屈曲角度は分度器で測定した。温度条件はバイオトロンによって23℃に維持した。

### (2) 芽生えにおける重力屈性反応の測定

発芽同調を行うため滅菌済み種子をGMプレートに播種し3日間4℃、暗所で培養してから1時間赤色光を照射して発芽を促した。23℃、暗所でプレートを垂直に立てて72時間培養後に黄化芽生えの胚軸および根の伸長方向をデジタルカメラで記録した。その後プレートを90°回転させて重力刺激の方向を変えて暗黒条件下でさらに12時間培養し、胚軸と根の屈曲を同様に記録した。

## 花茎のアミロプラストの観察

ロゼットから最初に抽苔した花茎を用い、その長さが4～8cmになったものを用いた。観察方法はFukaki et al.の方法に従った。花茎の先端3cm～4cmの部分を試料として使用した。固定にはPFA(4% [v/v] paraformaldehyde)を使用した。試料を重力方向に注意してPFAに浸し、氷冷しながら脱気を1時間行った。その後、エタノールシリーズで脱水してエタノールが100%になった時点でTechnovit樹脂(Heraeus Kulzer., Wehrheim, Germany)に包埋した。切片はマイクロトームで厚さが4  $\mu$ mになるようスライスした後にトルイジンブルーで染色した。その結果を光学顕微鏡で観察して、デジタルカメラで記録した。

## 植物からの DNA 抽出

本葉1枚をマイクロチューブに入れ、乳棒ですりつぶし、200  $\mu$ l の CTAB buffer を加え、65 度で 20 分間インキュベートした。その後、200  $\mu$ l のクロロフォルムを添加し、攪拌後、常温で 5000rpm、5 分間遠心分離を行い、水層を別のチューブに移し

た。2 倍量のエタノールと 0.1 倍の酢酸ナトリウムを添加しエタノール沈殿を行った。沈殿を 100  $\mu$  l の TE buffer に溶かした。この方法で得た DNA は主にシーケンス解析や遺伝子のクローニングに用いた。

また、簡易的な方法として、芽生えの子葉を一枚採り、乳棒ですりつぶし、50  $\mu$  l の抽出 buffer を添加し、さらに 100  $\mu$  l のエタノールを添加して 4°C、14000rpm で 5 分間遠心を行った。沈殿を 50  $\mu$  l の TE buffer に溶かした。この方法で得た DNA は主にマッピング解析に用いた。

#### <CTAB buffer>

3% cetyltrimethylammonium  
1.4M NaCl  
0.2% 2-メルカプトエタノール  
20mM EDTA  
100mM Tris-HCl (pH8.0)

#### <DNA 簡易抽出 buffer>

200mM Tris-HCl (pH7.5)  
25mM EDTA  
0.5% SDS  
250mM NaCl

### シロイヌナズナの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 (Clough et al., 1998) を用いた。使用したベクタープラスミドがカナマイシン耐性であったので、カナマイシン20  $\mu$  g /ml、ゲンタマイシン15  $\mu$  g /mlを加えたLB培地300mlでアグロバクテリウムを約24時間振とう培養した。5500rpm、10分間、23°Cで集菌し、上清のLB培地を捨てて、ペレット化した菌体を以下の組成の感染用培地に懸濁した。

#### <感染用培地組成 300ml あたり>

|             |             |
|-------------|-------------|
| ショ糖         | 15 g        |
| ベンジルアミノプリン  | 3 $\mu$ l   |
| Silwet L-77 | 150 $\mu$ l |
| イオン交換水      |             |

---

300ml

感染用植物体は土壌がこぼれないように予めセロテープで止めておいた。アグリポ

ットに感染用培地を移し、さやを取り除いて蕾のみにした植物体を5分間、緩やかに浸けて軽く揺すった。その後、液体を拭き取らずにサランラップで植物を包み、約24時間後ラップを取り除いた。得られたT1種子は約10 $\mu$ lずつ1.5mlマイクロチューブに分注し、70%エタノールを入れてマイクロチューブミキサーで2分間攪拌することにより表面殺菌した。エタノールを取り除き、5%NaClOを入れてマイクロチューブミキサーで10分間攪拌した。NaClO溶液を取り除き、滅菌済み0.2%アガロースに種子をけん濁し、抗生物質入りプレートに播種した。

## マップベースクローニング法

遺伝子単離のためのマッピングの方法は高田らの方法(参考文献参照)に従った。塩基塩基配列の確認にはABI PRISM 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いた。

### (1) *ZIP1*および*ZIP2*のマッピング

遺伝学的解析により*zip1*は優性変異であると予想されたので、マッピングには*zip1 zig-1*二重変異体に*zig-3*変異体を交配して作成した雑種第二代(F<sub>2</sub>世代)のうち、花茎がジグザグ形態の表現型を示す33個体を用いた。*zig-1*変異体がCol株由来であるのに対し、*zig-3*変異体はWs株由来であるので、マッピングにはColとWsの間で多型が確認できるSSLP(Single Sequence Length Polymorphism)およびCAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)マーカーを使用した。

遺伝学的解析により*zip2*は劣性変異であると予想されたので、ラフマッピングには*zip2 zig-1*二重変異体に*zig-3*変異体を交配して作成したF<sub>2</sub>世代のうち、サプレッサーの表現型を示す17個体を用いた。マッピングにはColとWsの間で多型が確認できるSSLPおよびCAPSマーカーを使用した。さらに詳細なマッピングを行うため、よりマーカー数の充実しているColとLerの間で多型が確認できるSSLPおよびCAPSマーカーを使用した。詳細なマッピングには*zip2 zig-1*二重変異体にNiihama line 4(結果の項を参照)を交配して作成したF<sub>2</sub>世代の270個体を用いた。

### (2) *zip1*の相補性試験

*zip1*の原因遺伝子が*VTI12*であることを確認するために、*zip1*変異型*VTI12*のORFを含むゲノム領域約4.5kbのクローニングを行った。まず、ZIP1 CAPSマーカー(結果の章参照)により*zip1*変異をホモに持つことを確認した*zip1 zig-1*二重変異体からゲノムDNAを抽出し、そのDNAを鋳型としてPCRによってインサート断片を増幅した。PCRにはLA-Taq(TaKaRa)を用いた。調整したインサート断片は制限酵素Xho Iで制限消化した後、プラスミドベクターpBluescript II KS+(TOYOBO)のマルチクローニングサイト

にサブクローニングした。作成したプラスミドを大腸菌のコンピテントセルDH5  $\alpha$  (TOYOBO)にヒートショック法により形質転換して一晚培養してプラスミドを増幅し、翌日菌体を回収してプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドは挿入断片の塩基配列を確認した。増幅ミスが生じていた箇所については適宜正しい配列をPCR増幅 (TaKaRa *pyrobest* DNA Polymeraseを使用) して繋ぎ換えを行うことにより修正した。目的とするゲノム断片の全長について正しい塩基配列であることを確認した上でバイナリーベクターpBIN19に繋ぎ換えを行った。繋ぎ換えを行ったプラスミドを大腸菌に形質転換して一晚培養することによりプラスミドを増幅し、翌日菌体を回収してプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドは制限消化することにより目的とするインサートが挿入されていることを確認した。大腸菌から回収したプラスミドをアグロバクテリウムのコンピテントセルにエレクトロポレーション法を用いて形質転換し、2日後、コロニーPCRにより目的のプラスミドを持つコロニーを選択した。植物体への形質転換にはFloral dip法 (Clough et al., 1998) を用いた。

### (3) *zip2*の相補性試験

*zip2*の原因遺伝子が*AtVPS41*であることを確認するために、*AtVPS41*のORFを含むゲノム領域約9kbのクローニングを行った。まず、*AtVPS41*が座乗しているBAC (Bacterial Artificial Chromosome) T23G18を鋳型としてPCRによってインサート断片を増幅した。PCRには*Pfu Ultra* High-Fidelity DNA Polymerase (STRATAGENE)を用いた。増幅したインサート断片はpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) にサブクローニングした。作成したプラスミドを大腸菌コンピテントセルDH5  $\alpha$  (TOYOBO)にヒートショック法により形質転換して一晚培養することによりプラスミドを増幅し、翌日菌体を回収してプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドは挿入断片の塩基配列を確認した。目的とするゲノム断片の全長について正しい塩基配列であることを確認した上でバイナリーベクターpBIN19に繋ぎ換えを行った。繋ぎ換えを行ったプラスミドを大腸菌に形質転換して一晚培養することによりプラスミドを増幅し、翌日菌体を回収してプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドは塩基配列を確認した。大腸菌から回収したプラスミドをアグロバクテリウムのコンピテントセルにエレクトロポレーション法を用いて形質転換し、2日後、コロニーPCRにより目的のプラスミドを持つコロニーを選択した。植物体への形質転換にはFloral dip法 (Clough et al., 1998) を用いた。

### ZIP2 dCAPSマーカの作成

*zip2*変異は制限酵素認識配列に重なっていなかったため、変異部位を利用してプライマー内に制限酵素認識配列を人工的に組み込むことにより変異を検出するdCAPS法を適用した。dCAPS Finder2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)を利用して制限酵素 MboII 認識配列を人工的に組み込んだプライマー *zip2\_dCAPS-F1* を作

成し、AtVPS41-R13 プライマーと一緒に PCR すると、110bp の断片が増幅される。さらに制限酵素 MboII で制限消化すると、変異型の場合は 72bp と 38bp の断片に切断され、72bp の断片のみが確認される。

wild-type GAGAGCAAGTGTTCCTGGGAAGGATGGGAAATGCAAA

*zip2* GAGAGCAAGTGTTCCTGGGAAGGATGAGAAATGCAAA

dCAPS GAGAGCAAGTGTTCCTGGGAAGGAAGGGAAATGCAAA 切れない

(wt) zip2\_dCAPS-F1 MboII site

dCAPS GAGAGCAAGTGTTCCTGGGAAGGAAGAGAAATGCAAA 切れる

(*zip2*) zip2\_dCAPS-F1 MboII site

## RT-PCR

液体窒素を用いて瞬間凍結した後、乳鉢で粉砕した新鮮な花茎100mgからRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。抽出したトータルRNA 1  $\mu$ gに対しDNase処理をした後、Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応産物を10倍希釈した後、PCRの鋳型として1  $\mu$ l使用した。PCRサイクルは24サイクルで行ない、3回の実験で結果が同一になることを確認した。

## 花茎からのタンパク質抽出法

新鮮な花茎 0.5g を乳鉢(4℃で予冷)に入れ、10ml の IP buffer (10  $\mu$ l のプロテアーゼインヒビターを含む)中で乳棒を用いて氷上で丁寧に破砕し、ミラクロスで濾しながらファルコンに移した。4℃、10000rpm、30 分遠心を行った後、上澄み捨てて、沈殿に 1%TritonX-100 を含む IP buffer を添加(1ml)した。泡立てないようにピペッティングで懸濁し、沈殿が細かく均等に破砕されたら 1ml ずつエッペンに分注して 4℃で 2 時間転倒攪拌した。その後、4℃、10000rpm、10min 遠心して上清を 500  $\mu$ l を回収し、4℃ローターで 5 分間攪拌した。トータルタンパク量は BCA kit (PIERCE 社)を用いて定量した。各系統間でトータルタンパク量を揃えたのち、イムノブロッティングおよび免疫沈降解析に用いた。

### <IP buffer>

50mM HEPES-KOH (pH6.5)

10mM 酢酸カリウム

100mM 塩化ナトリウム

5mM EDTA

0.4M ショ糖

### 免疫沈降法

Yano et al., 2003 の方法に一部改変を行った。まず Protein A Sepharose (Pharmacia) を平衡化するため、50  $\mu$ l の Protein A Sepharose (50%スラリー) をチューブに分注する。これに氷冷した 1ml の免疫沈降用バッファー<sup>2</sup> を添加し、懸濁する。4℃で 5000rpm、1 分間遠心し、上清を捨てる。この操作を再度行い、Protein A Sepharose を平衡化する。次に Protein A Sepharose に 1%TritonX-100 を含む 1ml の IP buffer と 1  $\mu$ l のプロテアーゼインヒビター、免疫沈降に用いる抗体を添加し (抗 SYP22 抗体は 3  $\mu$ l)、良く懸濁する。この混合液を 4℃で 2 時間ローターで攪拌し、Protein A Sepharose に抗体を結合させる。その後 4℃で 5000rpm、1 秒間遠心し、上清を捨てる。これに氷冷した 1ml の 1%TritonX-100 を含む IP buffer を添加し、懸濁する。この操作をさらに 2 回行い、抗体と結合した Protein A Sepharose を洗浄する。洗浄された Protein A Sepharose にトータルのサンプルとして抽出したタンパク質溶液を添加し、攪拌した。この容液を 4℃で 6 時間以上、ローターで攪拌し、Protein A Sepharose に結合した抗体に標的タンパク質を結合させる。その後 4℃で 5000rpm、1 秒間遠心し、上清を別のチューブに移し、Supernatant として用いる。沈殿している Protein A Sepharose に氷冷した 1ml の 1%TritonX-100 を含む IP buffer を添加、懸濁後 4℃で 5000rpm、1 秒間遠心し、上清を捨てる。この操作をさらに 4 回行い、Protein A Sepharose を洗浄する。洗浄された Protein A Sepharose に 50  $\mu$ l の 2 $\times$ SDS sample buffer を添加し、ピペッティングで良く懸濁する。これを 95℃のヒートブロックで 5 分間加熱し、Protein A Sepharose から抗体と標的タンパク質を解離させる。その後常温で 15000rpm、1 分間遠心し、上清を免疫沈降画分として用いた。

### イムノブロット

SDS-PAGE 用アクリルアミドゲルとして e-パジェル (アトー社) の 10%ゲルを使用した。サンプルをアプライし、20mA の定電流で電気泳動をする。泳動を止め、ゲルをトランスファーバッファー (48mM Tris-HCl、39mM Glycine、1.3mM SDS、20ml [v/v] methanol、80ml [v/v] H<sub>2</sub>O) に 30 分間浸し平衡化する。PVDF メンブレン (MILLIPORE) をゲルと同じ大きさに切り、メタノールに 1 分間浸した後、トランスファーバッファ

ーに浸す。ろ紙（6枚）をゲルと同じ大きさに切り、トランスファーバッファーに浸す。SEMI-DRY TRANSFER CELL（BIO-RAD）に下から3枚のろ紙、PVDFメンブレン、ゲル、3枚のろ紙の順に重ね、15Vの定電圧で約30分間トランスファーする。TBS-M（TBS（137mM NaCl、2.68mM KCl、25mM Tris-HCl（pH7.4））に5%になるようにスキムミルクを添加）で、PVDFメンブレンを1時間、常温でブロッキングする。その後、5分、5分、15分、5分、5分のサイクルで、PVDFメンブレンをTBS-T（TBSに0.1%になるようにTween 20を添加）で洗浄する。TBS-Mに適量の一次抗体（dilution factorはそれぞれ抗SYP22抗体：1/10000、抗VTI12抗体：1/2000）を加え、PVDFメンブレンと共にハイブリバックに入れ1時間、常温で抗体反応させる。その後、5分、5分、15分、5分、5分のサイクルで、PVDFメンブレンをTBS-Tで洗浄する。TBS-Mに適量の二次抗体（dilution factorは1/10000）を加え、PVDFメンブレンと共にハイブリバックに入れ30分間、常温で抗体反応させる。その後、5分、5分、15分、5分、5分のサイクルで、PVDFメンブレンをTBS-Tで洗浄する。バンドの検出にはECL+（Amasham Phamacia）を使用した。また可視分子量マーカーとして prestained markar（BIO-RAD）を使用した。抗VTI12ウサギ抗体はUniversity of California, RiversideのNatasha Raikhel博士より、抗SYP22ウサギ抗体は京都大学の佐藤雅彦博士より分与していただいたものを使用した。

## 顕微鏡を用いた観察

p*VTI11::GFP-VTI11* 形質転換体植物の芽生えのGFP蛍光観察には蛍光デジタルマイクロスコープVB-6000（KEYENCE）を、根の細胞内のGFP蛍光観察にはCSU10共焦点スキャナー（Yokogawa Electric）と冷却CCDカメラ（ORCA-ER, Hamamatsu Photonics）を設置したLeica DMRE顕微鏡を用いた。また、形質転換体の花茎細胞内のGFP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。その際、スリット幅を調整して取得する波長を限定することによりGFP蛍光と葉緑体自家蛍光の分離を行った。

## 結果

### 【1】 *zig* のサプレッサーのスクリーニング

*zig-1* 変異体は SNARE モチーフおよび膜貫通領域に大きな欠損をもつ null 変異体である(Kato et al., 2001)。よって、*zig-1* 変異体からは *ZIG* 遺伝子内の二重変異によるサプレッサーは得られず、ほとんどのサプレッサーは異なる遺伝子に変異が入っている可能性が高い。さらに *zig-1* は単独変異で明瞭な表現型を持ち、かつ、稔性は維持されているという特長を持つので遺伝学的な解析に適している。そこで、*zig-1* 変異体の種子約 5000 粒に対してエチルメタンスルホン酸 (EMS) により変異原処理を行った。変異処理を行った M1 個体のうち発芽が認められたのは約 2000 系統だった。この M1 を 16 系統ごとを 1 まとめとして 1 バッチとして 120 バッチを得た。そして重力屈性と形態に着目して M2 世代を対象にスクリーニングを行った。その結果 15 系統のサプレッサー候補株 (Suppressor Candidate; SC lines) (図 5) を得た。さらにこれらの系統を表現型に基づいて分類した (表 1)。*zig* 変異体の持つ重力屈性および形態における異常の双方を回復させる系統を Class I、重力屈性異常を強く回復させる系統を Class II、そして形態異常を強く回復させる系統を Class III とした。M2 世代を *zig-1* と交配した F1 世代の表現型を確認することにより、変異の優性・劣性を推定した。このうち本研究で目的とする小胞輸送により密接に関与すると予想される Class I である *zig suppressor1(zip1)*、*zip2* (SC19-1)、*zip3*(SC5-1)、SC2-1 および SC36-1 の 5 系統に関しては原因遺伝子を同定するためにマッピングを行ったところ、それぞれ独立の遺伝子座にマップされた (図 6)。そして *zip1* と *zip2* に関してはさらに詳細な解析を行った。

### 【2】 *zig suppressors* の解析

#### [1] *zig suppressor1(zip1)* の解析

##### *zip1 zig-1* 二重変異体の表現型

##### (1) 形態的特徴

*zig-1* 変異体では花茎がジグザグに伸長し、側枝が下方方向にカールして伸長する (図7B)。また本葉は野生株 (図7D) に比較して小さく、丸い (図7E)。これに対して *zip1 zig-1* 二重変異体では、野生株 (図7A) と同様に、花茎は真っ直ぐに伸長し、側



枝は上方に伸長していた（図7C）。そして、本葉も野生株（図7D）とほぼ同様の形態を示した（図7F）。

## （2）花茎の重力屈性

*zip1 zig-1*二重変異体、Col野生株、*zig-1*単独変異体の花茎の重力屈性反応を調べた。シロイヌナズナCol野生株では暗黒条件下で水平方向に寝かせると、花茎は約90分後に90°まで屈曲し、さらに屈曲角度を増すことで過屈曲を示すが、その後逆向きに屈曲することで戻り、360分後には90°の定常状態になる（Fukaki et al. 1996a; 図8A, D）。また*zig-1*変異体は同様の条件下では24時間後においても屈性反応がほとんど見られない（Yamauchi et al., 1997; Kato et al., 2001; 図8B, D）。一方、*zip1 zig-1*二重変異体はほぼ野生株と同様の屈性反応を示した（図8C, D）。

## （3）胚軸の重力屈性

*zig-1*変異体は花茎のみならず胚軸の重力屈性反応も異常を示す（Yamauchi et al., 1997）。そこで黄化芽生えを用いて*zip1 zig-1*二重変異体、Col野生株、*zig-1*単独変異体の胚軸の重力屈性反応を調べた。重力刺激後12時間後の野生株では胚軸と根で屈性反応を示す（図9A, D）。*zig-1*変異体では根は屈性反応を示すが、胚軸は正常な反応を示さない（図9B, E）。*zip1 zig-1*二重変異体の胚軸と根はほぼ野生型と変わらない屈性反応を示した（図9）。

## （4）花茎のアミロプラストの観察

高等植物の重力感受にはデンプン粒を蓄積した色素体であるアミロプラストが平衡石として機能すると考えられている（Sack 1991, 1997; Casper and Pickard, 1989; Kiss et al., 1989, 1996, 1997; Weise and Kiss, 1999; Kiss and Sack, 1989, 1990; Fujihira et al., 2000）。シロイヌナズナ野生株の花茎では内皮細胞層が重力感受細胞として機能しており、内皮細胞内には重力方向に沈降するアミロプラストが含まれている（Fukaki et al., 1998; 図10A）。*zig-1*変異体は液胞構造の障害に起因すると考えられる花茎の内皮細胞内のアミロプラストの沈降異常が見られる（Morita et al. 2002; 図10B）。これに対して*zip1 zig-1*二重変異体ではほぼ野生株（図10A）と同様に、アミロプラストが重力方向に正常に沈降していた（図10C）。この結果は*zip1 zig-1*二重変異体では内皮細胞内の液胞構造が回復している可能性を示唆している。

## （5）花茎の内皮細胞における液胞構造の観察

上述した*zip1 zig-1*二重変異体での液胞構造の回復を検証するために、齊藤知恵子

博士と共同研究を行った。透過型顕微鏡でシロイヌナズナの花茎の内皮細胞を観察すると、アミロプラストの沈降が確認できると同時に、アミロプラストが液胞膜に囲まれて浮いたような様子が観察される。そして、アミロプラストと液胞膜との間は薄い細胞質成分で満たされている (Morita et al., 2002; 参照データ 1A)。一方、*zig-1* 変異体の内皮細胞ではアミロプラストが重力方向の他に細胞上部や細胞壁面に押し付けられた状態になり、液胞膜にも取り囲まれていない (Morita et al., 2002; 参照データ 1B)。これに対して *zip1 zig-1* 二重変異体ではほぼ野生株 (参照データ 1A) と同様の細胞内構造が認められた (参照データ 1C)。この結果は組織学的観察で導いた *zip1 zig-1* 二重変異体の花茎内皮細胞内では液胞構造が回復するという考えが正しかったことを示している。

### *zip1* 変異の遺伝学的解析

*zip1 zig-1* 二重変異体は重力屈性のみならず形態の異常も野生株とほぼ同じレベルまで回復する。そこで形態的な特徴を指標として *zip1* と *zig-1* の遺伝学的な関係を調べた。*zip1 zig-1* 二重変異体に *zig-1* 変異体を交配した雑種第一代 (F<sub>1</sub> 世代) はすべての個体がほぼ野生株と変わらない形態的特徴を示した。さらにその F<sub>1</sub> 個体の自殖次世代 (F<sub>2</sub> 世代) は野生株様の形態的特徴を示す個体と *zig-1* 変異体様の形態的特徴を示す個体がほぼ 3 : 1 の割合で分離した (図 11)。この結果は、形態において *zip1* 変異が優性に機能する単一変異である可能性を示している。

### *ZIP1* 遺伝子のマップベースクローニング

#### (1) マッピング

遺伝学的解析により *zip1* は優性変異と推定されたので、*zip1 zig-1* 二重変異体 (Col 株由来) と *zig-3* 変異体 (Ws 株由来) との雑種第二代 (F<sub>2</sub> 個体) のうちジグザグ形態を示した 14 個体を用いて Col と Ws の多型マーカーにより *ZIP1* をマッピングした。その結果、第 1 染色体の 40cM 付近に強い連鎖を確認した。さらに詳細なマッピングを行った結果、BAC (bacterial artificial chorosome) T26F17 と F3H9 との間の約 2.4Mb (29BAC) に染色体候補領域を絞り込んだ (図 12A)。この予想染色体領域には *ZIG/VTII1* と相同性の高い *VTII2* (At1g26670) が存在したので、この遺伝子の塩基配列を確認した。その結果、*VTII2* の第 4 エキソン内にグアニン (G) からアデニン (A) への塩基置換を同定し、*ZIP1* が *VTII2* である可能性が示唆された (図 12A)。この塩基置換により 129 番目のアミノ酸であるグルタミン酸がリジンに変化していた (図 12B)。なお、*VTII2* のプロモーター領域を含むと考えられる開始コドンから上流 3kb についても塩基配列の確認を行ったが、変異は皆無だった。

この変異は制限酵素 BsaJI の認識部位内に位置するので、変異部位を挟む形で PCR プ

ライマー（以後、ZIP1 CAPSマーカークと呼ぶ）を作成した。ZIP1 CAPSマーカークを用いたPCRの増幅産物をBsaJIで制限消化することにより、この変異の遺伝子型を確認することが可能になった（図11）。このZIP1 CAPSマーカークを用いて、戻し交配4回目および5回目のF2世代250個体について原因遺伝子と予想されたVTI12の遺伝子型をPCRで確認することにより連鎖解析を行った。その結果、遺伝子型と葉や花茎の形態が示すzip1のzigに対するサプレッサーとしての個体の表現型は完全に一致していた（図11）。この結果は、ZIP1がVTI12の単独変異であり、しかも優性変異であることを支持する。

次にこのマーカークを用いてzip1 zig-1二重変異体の重力屈性反応について調べた。zig-1変異をホモに持ちつつzip1について遺伝子型がホモであるとPCRで確認した個体、ヘテロであると確認した個体を用いて、重力屈性反応を経時的に記録した（図8D）。その結果、両者とも野生株と同様の屈性反応を示した。この結果は、zip1が単独変異であり、形態のみならず重力屈性も優性に回復させる機能をもつことを示している。

## （2）相補性試験

さらに zip1 の原因遺伝子が VTI12 であることを確認するために、zip1 変異型 VTI12(以後 VTI12<sup>ZIP1</sup> と記す)の ORF(open reading frame)および予想プロモーターとして開始コドンから上流約1.2kbを含む約5kbのゲノム断片を zig-1 変異体に形質導入して重力屈性および形態が回復するかどうか調べた。対照実験として zip1 変異を含まない野生型 VTI12 についても同様に形質導入実験を行った。その結果、VTI12<sup>ZIP1</sup> を導入して得られた形質転換体 T1 世代独立 51 系統すべてで重力屈性および形態の回復が観察された(図 13B; 表 2)。一方、野生型 VTI12 を導入した対照区では、zig-1 型の表現型を示す系統が最も多く得られた(図 13C; 表 2)。なお、すべての T1 個体に対して導入遺伝子が形質転換されていることを PCR により確認した（図 13D）。この結果および上述の結果から zip1 の原因遺伝子が VTI12 であると結論した。

## zip1単独変異体の分離

このサプレッサー株はzig-1とzip1の二重変異体になっている。zip1単独変異の表現型を確認するためzip1 zig-1二重変異体にCol野生株を交配し、そのF2個体に対してZIP1 CAPSマーカークで遺伝子型を確認することによりzip1単独変異体を分離した。その表現型は重力屈性および形態の双方について野生株と全く見分けがつかなかった（図7D）。この結果は野生型のZIG/VTI11が存在する条件下において変異型であるVTI12<sup>ZIP1</sup>が存在しても、それが植物体の生理機能にほとんど影響を及ぼさないことを示唆している。

## *zip1* 変異が VTI12 と SYP22 との相互作用に及ぼす影響

*zip1* 変異はどのようにして *zig* の表現型を抑圧したのであろうか。*zig* 変異体内で VTI12 を過剰発現させると *zig* の表現型をある程度抑圧することがすでに報告されている(Surpin et al., 2003)。この抑圧した理由の一つとして *zip1 zig-1* 二重変異体内で VTI12 タンパク質の蓄積量が増加し、それによって ZIG/VTI11 の機能を補償した可能性が考えられる。この点を確認するために、野生株、*zip1* 単独変異体、*zig-1* 変異体および *zip1 zig-1* 二重変異体の花茎由来のタンパク抽出液を用いて抗 VTI12 抗体を用いたイムノブロットにより VTI12 タンパク質の定量解析を行った。ネガティブコントロールとして VTI12 の null アリルである *vti12* (Surpin et al., 2003) を用いた。その結果、*zig-1* 変異体と *zip1 zig-1* 二重変異体との間で VTI12 タンパク量に有意な差は認められなかった (図 14A レーン 4, 5, 6)。よって、*zip1* 変異による VTI12 タンパク量の増加が *zig* の表現型を抑圧したという可能性は否定された。なお、野生株と *zig-1* との間で VTI12 タンパク質の明確な増加が認められた (図 14A レーン 1, 4)。そこで、この VTI12 タンパク質の蓄積量の増加が VTI12 遺伝子の転写産物に由来するものであるかどうかを確認するために、VTI12 の発現レベルを RT-PCR により確認した。その結果、野生株と *zig-1* との間で VTI12 の発現レベルに有意な差は認められなかった (図 14B)。この結果は、VTI12 タンパク質の蓄積量の増加が発現レベルの上昇に由来するものではないことを示している。

野生株内では VTI12 は SYP4 および SYP6 と SNARE 複合体を形成しているが、SYP22 とは複合体を形成しない。一方、ZIG/VTI11 は SYP21、SYP22 および SYP5 と複合体を形成するが、SYP4 および SYP6 とは複合体を形成しない(Sanderfoot et al., 2001; 図 3)。VTI11 が完全に欠損した *zig-1* 変異体では VTI12 は SYP21 および SYP22 と複合体をわずかに形成する (Surpin et al., 2003)。このことは *zig* 変異体中で野生型の VTI12 は SYP21 あるいは SYP22 と複合体を形成することはできるものの、ZIG/VTI11 の生理機能を代替するには不十分であることを示している。変異型 VTI12<sup>ZIP1</sup> ではどうだろうか。そこで、*zip1 zig-1* 二重変異体において VTI12 のパートナーSNARE が変化しているかどうかを確認するために、抗 SYP22 抗体を用いて共免疫沈降解析を行った。材料は花茎のタンパク質抽出液を用い、野生株、*zip1* 単独変異体、*zig-1* 変異体および *zip1 zig-1* 二重変異体との間で比較した。すでに報告されているとおり (Surpin et al., 2003)、野生株で VTI12 はほとんど SYP22 と共沈しない (図 15A レーン 2)。一方、*zig-1* 変異体では VTI12 は有意に SYP22 と共沈した (図 15A レーン 6)。より重要なのは、*zig-1* 由来の VTI12 よりも *zip1 zig-1* 二重変異体由来の VTI12<sup>ZIP1</sup> のほうが SYP22 と共沈するタンパク質としてさらに増加していたことである (図 15A レーン 8)。*zip1 zig-1* 二重変異体における変異型 VTI12<sup>ZIP1</sup> の SYP22 との共沈量は *zig-1* 変異体における野生型 VTI12 の共沈量と比べると約 4 倍量であった (図 15B)。*zip1 zig-1* 二重変異体と *zig-1* 変異体における変異型 VTI12<sup>ZIP1</sup> と野生型 VTI12 のタンパク質総量に大きな差はないにもかかわらず、SYP22 と共沈するタンパク質の

量に大きな差が生じたのは物理的相互作用が変異型 VTI12<sup>ZIP1</sup> のほうが野生型 VTI12 よりも強まったことを示している。この結果は VTI12<sup>ZIP1</sup> と SYP22 とを含む SNARE 複合体が ZIG/VTI11 と SYP22 からなる複合体の機能を代替することで変異形質が抑圧されたことを示唆する。

この点を確認するために、野生型の ZIG/VTI11 タンパク質が存在する条件下で、野生株と *zip1* 単独変異体との間で抗 SYP22 抗体による野生型 VTI12 と変異型 VTI12<sup>ZIP1</sup> との共免疫沈降実験を行った。その結果、*zip1* 単独変異体における変異型 VTI12<sup>ZIP1</sup> の共沈量は野生株における野生型 VTI12 の共沈量より増加していた（図 15A レーン 2, 4）。この結果は、予想した VTI12 の *zip1* 変異に伴う SYP22 との物理的相互作用の増強という考え方が正しいことを支持する。

### シロイヌナズナ培養細胞内における GFP- VTI12<sup>ZIP1</sup> の細胞内局在

野生株内では、VTI12 は ZIG/VTI11 とは異なる細胞内局在パターンを示す。すなわち、VTI12 は TGN、PVC および細胞膜に局在し (Uemura et al., 2004)、TGN (*trans*-Golgi network) において SYP4 および SYP6 との複合体として検出される (Bassham et al., 2000; Sanderfoot et al., 2001)。一方、ZIG/VTI11 は TGN、PVC および液胞膜に局在し (Sato et al., 1997; Sanderfoot et al., 1999; Bassham et al., 2000; Sanderfoot et al., 2001; Carter et al., 2004)、PVC および液胞膜上において SYP21、SYP22 および SYP5 との複合体として検出できる (Zheng et al., 1999)。しかしながら、*zip1 zip-1* 二重変異体において VTI12<sup>ZIP1</sup> が SYP22 と共沈するという事実は、VTI12<sup>ZIP1</sup> が SYP22 と同一のオルガネラ膜上に共局在する可能性を示唆する。この可能性を検証するために、植村知博博士と共同研究を行った。方法としてシロイヌナズナの培養細胞内で緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein; GFP) を融合させた VTI1 ファミリーの細胞内局在を調べる系を用い、定量的な解析を行った (参照データ 2G)。この系では、本来 GFP-ZIG/VTI11 は主に液胞膜上および TGN あるいは PVC と考えられるドット状のオルガネラにシグナルが観察される (Uemura et al., 2004; 参照データ 2A)。そして、GFP-VTI12 は細胞膜上および TGN あるいは PVC と考えられるドット状のオルガネラにシグナルが観察される (Uemura et al., 2004; 参照データ 2B)。興味深いことに、GFP- VTI12<sup>ZIP1</sup> は細胞膜、ドット状のオルガネラという本来の GFP-VTI12 の局在パターンに加えて、液胞膜上にもシグナルが観察された (参照データ 2 図 C)。このことより、*zip1* 変異によるパートナー SNARE の変化と細胞内局在の変化との間には矛盾のない相関が得られたといえる。GFP-VTI12<sup>ZIP1</sup> が GFP-VTI12 の細胞内局在パターンに加えて GFP-ZIG/VTI11 の細胞内局在パターンをも示したことは、VTI12<sup>ZIP1</sup> が野生型 VTI12 の分子機能に加えて ZIG/VTI11 の分子機能をも獲得したことを示唆している。

## 植物体内における GFP-VTI1 ファミリータンパク質の細胞内局在解析

上記の GFP 融合 VTI1 タンパク質の細胞内局在解析はプロトプラストを材料に過剰発現系を用いて行われた。GFP を融合した VTI1 タンパク質が植物体内で正しい機能を持つかどうかを確かめるために自身のプロモーターの下流に *GFP-VTI1* を繋いだプラスミドを構築し、アグロバクテリウムを介して植物体内に形質導入し表現型を相補するかどうかを調べた。

*GFP-ZIG/VTI11* は *VTI11* のプロモーター (*pVTI11*) より誘導し、*zig-1* 変異体に導入した (*pVTI11::GFP-ZIG/VTI11*)。導入により得られた T1 植物体では胚軸および根の組織で GFP 蛍光が確認され (図 16B)、*zig-1* 変異体の重力屈性および形態の異常が相補された (図 16A)。この結果は *GFP-ZIG/VTI11* が植物体内においても正しい機能を持つことを示している。この形質転換植物体における *GFP-ZIG/VTI11* の細胞内局在をさらに詳しく観察してみると、根の細胞表面では PVC と考えられるドット状のオルガネラにシグナルが検出された (図 16C)。焦点深度をさらに深くしてみると液胞膜上に蛍光シグナルが確認できた (図 16D)。また、この形質転換植物体の花茎の細胞内を観察してみると、液胞膜上に蛍光シグナルが確認できた (図 17A, B)。これらの結果はプロトプラストを用いた細胞内局在解析の結果 (参照データ 2A) とよく一致している。さらに、この植物体の内皮を観察すると、アミロプラストを取り囲む液胞膜においても GFP 蛍光が観察できた。この結果は電子顕微鏡解析における内皮細胞の観察結果と一致している。

また花茎の細胞内で *GFP-ZIG* の蛍光シグナルが検出できたことの意義は大きい。すなわち、生体内で機能的な *ZIG/VTI11* タンパク質を任意の植物体組織と生育時期で観察する系が確立できたことを意味する。この系を使って *ZIG/VTI11* が局在する液胞膜の動態をモニターすることにより、重力屈性のみならず、*zig* 変異体の花茎がなぜジグザグになるのか、あるいは、ロゼット葉がなぜ小さく丸くなるのかといった形態形成に及ぼす *ZIG/VTI11* の機能に対する解析が可能になる。さらに、この形質転換系統と他の小胞輸送関連変異体との多重変異体を作成することで、それぞれの変異体バックグラウンドにおける *GFP-ZIG* の局在パターンの変化を地上部の生細胞において解析することが可能になる。

次に、*GFP-VTI12* および *GFP-VTI12<sup>ZIP1</sup>* を *zip1* の相補性試験で用いた *VTI12* の 5' 上流プロモーター領域 (*pVTI12*) により誘導した。*zig-1* とは異なり、*vti12* は null 変異体でも通常の生育条件では明瞭な表現型が見られない。その一方で、*zig-1 vti12* 二重変異体では胚性致死になる。よって、*zig-1 vti12* 二重変異体バックグラウンドで *pVTI12::GFP-VTI12* を発現させた場合、*GFP-VTI12* が正しい機能を持てば胚発生以降も正常に生育を続けると期待できる。そこで、*zig* 変異がヘテロで、かつ *vti12* 変異をホモにもつ植物体 (*zig/+ vti12/vti12*) に *pVTI12::GFP-VTI12* をアグロバクテリウムを用いて形質導入し、得られた T1 植物体の *zig* の遺伝子型を PCR で確認することで *zig-1 vti12* 二重ホモの遺伝子型を持つ個体の分離を試みた。しかしながら、*GFP-VTI12* お

よび GFP-VTI12<sup>ZIP1</sup> を形質導入し正常に生育する各々で独立した 192 系統の T1 植物体を得て、それらの遺伝子型を確認したところ、*zig-1 vti12* 二重ホモの遺伝子型を持つ個体はどちらの場合も全く得られなかった。さらに T1 世代で *zig* 変異をヘテロにもつ個体の自殖次世代 (T2 世代) の遺伝子型を確認したが、やはり *zig* 変異をホモにもつ個体は全く得られなかった。この結果はこの実験で構築されたプラスミドにより導入された GFP-VTI12 および GFP-VTI12<sup>ZIP1</sup> が、少なくとも胚発生過程において植物体内で正しい機能を持つのに不十分であることを強く示唆している。

今回の実験において *pVTI12::GFP-VTI12* が植物体内でうまく機能しなかった原因として以下のような可能性が考えられる。まず、VTI12 の N 末側に GFP を付加したことが VTI12 の機能を阻害してしまったという可能性である。ホモログである ZIG/VTI11 ではうまく機能しているが、VTI12 の場合には N 末側で ZIG/VTI11 とは異なる制御を受けているのかもしれない。あるいは、別の可能性として、VTI12 の 3' 側下流領域あるいはイントロンが VTI12 の正しい発現のために必須なのかもしれない。今回のコンストラクションでは GFP の下流に VTI12 の cDNA を用い、かつ Nos-terminator を用いた。一方、相補性試験においてはイントロンおよび自身のターミネーターを含むと考えられる終止コドンの 3' 側下流約 1.7kb を用いて正しい機能を持つことを確認した。これらの可能性を検証するためには、イントロンおよび終止コドン下流約 1.7kb を含む VTI12 のゲノム領域に GFP を融合させたコンストラクションを構築して形質転換植物を作成する必要がある。

### *zip1* と *sgr3* との遺伝学的な関係

我々が単離した *sgr3* は花茎の重力屈性反応が野生株に比較して遅れる変異体である。また野生株に比較して花茎の側枝が水平方向に伸長するが、その他の形態は野生株と大きな差は見られない (Fukaki et al., 1996b; Yano et al., 2003)。*sgr3* の原因遺伝子は Qa-SNARE SYP22 をコードし、このタンパク質は PVC および液胞膜上において Qb-SNARE ZIG/VTI11 と Qc-SNARE SYP5 とともに SNARE 複合体を形成して機能する (Sanderfoot et al., 1999; Sanderfoot et al., 2001; Carter et al., 2004; Yano et al., 2003)。事実、*sgr3* 変異体の花茎の内皮細胞および皮層細胞では液胞構造に異常が観察され、*sgr3* 変異型 SYP22 (以後 SYP22<sup>SGR3</sup> と記す) は ZIG/VTI11 および SYP5 との物理的相互作用能が低下していた (Yano et al., 2003)。

VTI12 の機能獲得変異である *zip1* と SYP22 の機能欠損変異である *sgr3* との遺伝学的な関係を調べるために、*zip1 sgr3* 二重変異体および *zip1 sgr3 zig-1* 三重変異体を作成した。*zip1 sgr3* 二重変異体は *sgr3* 単独変異体とほぼ変わらない表現型を示した (図 18A)。これは *zip1/+ sgr3/sgr3* でも同じである (図 18B)。一方、*zip1 sgr3 zig-1* 三重変異体は *sgr3* 単独変異体とは異なり、側枝が水平方向に伸長するという *sgr3* の表現型を抑圧した (図 18C)。*zip1/+ sgr3/sgr3 zig-1/zig-1* でも同様の表現型の抑圧を示した (図 18D)。*sgr3 zig-1* 二重変異体は *zig-1* 単独変異体とほぼ変わらない表現型を示し

た (図 18E)。

## [ 2 ] *zig suppressor2(zip2)*の解析

*zig-1* のサプレッサーのスクリーニングにより得た SC19-1 系統のサプレッサー変異は遺伝解析により単一の劣性変異であると推定された。またこの系統の *VTI12* の塩基配列を調べたところ変異は皆無であったので *zip1* のアレルである可能性は否定された。よって、このサプレッサー変異を *zip2* と命名した。

### *zip2 zig-1* 二重変異体の表現型

*zip2 zig-1* 二重変異体は *zig-1* 変異体 (図 19B) に比べて花茎のジグザグ形態はかなり抑えられており、側枝は上方向に伸長するが、側枝の先端がカールする *zig-1* の表現型は残っている (図 19C)。そしてロゼット葉は野生株とほぼ変わらない表現型の回復を示した (図 19G)。*zip2* 変異をヘテロにもち、かつ *zig* 変異をホモに持つ個体は *zig-1* 単独変異体とほぼ変わらない表現型を示した (図 19D)。これは *zip2* が劣性変異であることを示す。

暗黒条件下で植物体を水平方向に寝かせることで重力刺激を与えて経時的に花茎の屈曲角度を記録した結果、120 分後には約 90° の屈曲反応を示した (図 20)。これらの結果は *zip2* が *zig* 変異による重力屈性異常と形態異常の双方をかなりの部分で回復させる劣性変異であることを示す。

### *ZIP2* 遺伝子のマップベースドクローニング

#### (1) マッピング

*zip1* と同様の方法で遺伝解析を行った結果、*zip2* は単一遺伝子の劣性変異と予想された。すなわち、*zip2 zig-1* 二重変異体に *zig-1* 変異体を交配した F1 世代では全個体が重力屈性および形態の双方で *zig* 型の表現型を示し、その F2 世代ではサプレッサー型の表現型を示す個体と *zig* 型の表現型を示す個体が約 1 : 3 の割合で分離した。そこで次に、*zip2 zig-1* 二重変異体 (Col 株由来) と *zig-3* (Ws 株由来) との F2 個体のうちサプレッサー型の表現型を示した 17 個体を用いて Col と Ws の多型マーカーにより *ZIP2* のマッピングを行った。その結果、第 1 染色体の北側 10cM 付近に存在することが明らかになった。さらに詳細なマッピングを行うため、よりマーカー数の充実している Col と Ler の間で多型が確認できる SSLP および CAPS マーカーを使用した。このマッピングには *zip2 zig-1* 二重変異体に Ler を交配して作成した F2 世代のうち *zig* 変異をホモに持ち (PCR で確認)、かつサプレッサーの表現型を示す個体を用いた。しかし、マッピングに矛盾



が生じた。これはLerに内在する*zig*変異に対する抑圧因子(平成14年3月 新濱充 修士論文参照)のために、F2における屈性回復の表現型がEMSによる変異の結果なのか、それともLerの内在因子のためなのかの判別ができなかったためであると考えられる(図21A)。

これに対し、以下のような工夫を行った(図21B)。Lerに内在する*zig*変異に対する抑圧因子は一遺伝子座のみによってコードされているものではなく、複数の遺伝子座による量的遺伝形質と推定されている(平成14年3月 新濱充 修士論文参照)。そして、*zig*変異をホモにもちながら、重力屈性の回復を示したLerとの雑種系統にColで戻し交配を行うことで染色体の置換を行うと、2回程度の戻し交配後には重力屈性の回復を示す個体はほとんどみられなくなる。すなわち、ラフマッピングによって挟んだ部分のみがLerで、他の染色体領域を極力Col由来の染色体領域に置き換えた系統があれば、Lerに内在する抑圧因子の次世代への持ち込み頻度が通常のLerを用いる場合よりも軽減されることになり、表現型に及ぼす影響を抑えることができる。そこで*zig-1*変異体にLerを交配したF2世代のうちラフマッピングにより*zip2*の原因遺伝子が存在すると推定された領域がLer由来の染色体をホモで持ち、かつ重力屈性を回復しない雑種系統(以後、Niihama line 4と呼ぶ)を選抜した(図22)。そして、このNiihama line 4に対し、改めて*zip2 zig-1*二重変異体を交配し、そのF2世代を用いて詳細なマッピングを行った。その際にはFIRE法およびNARAMAPS (NAIST *Arabidopsis* Mapping System)を用いた。この方法によりマッピング上の矛盾は解消し、ZIP2の候補領域を約700kbに絞り込むことに成功した。そして、この領域内に存在する小胞輸送に関連する可能性が高い*AtVPS41* (At1g08190)のORF(open reading frame)を含む約7kbの塩基配列を調べた結果、*zip2 zig-1*二重変異体において第15エキソン内にグアニン(G)からアデニン(A)への塩基置換が認められた(図23A)。この塩基置換によりこのタンパク質の717番目のグリシンがアルギニンに変化する(図23B)。

以後の解析で予想*zip2*変異を確認するために変異部位を挟む形でPCRプライマー(以後、ZIP2 dCAPS マーカーと呼ぶ)を設計した(詳細は材料と方法の項参照)。このZIP2 dCAPS マーカーを用いてPCRを行い、増幅産物を制限酵素MboIIで消化すると*zip2*変異の遺伝子型を確認することが可能になる。ZIP2 dCAPS マーカーを用いて戻し交配3回目のF2世代144個体について原因遺伝子と予想されたAt1g08190の遺伝子型をPCRで調べて、各個体の遺伝子型と表現型の間の連鎖解析を行った結果、遺伝子型と個体の表現型は完全に一致していた。この結果は*zip2*の原因遺伝子が*AtVPS41*であることを強く示唆する。

## (2) 相補性試験

*zip2*の原因遺伝子が*AtVPS41*であることをさらに確認するために、*AtVPS41*のORFおよび予想プロモーターとして開始コドンから上流約2.5kbを含む約9kbのゲノム断片をクローニングし、*zip2 zig-1*変異体に形質導入した。形質導入植物の表現型に関し

て現在実験を進行中である。

### T-DNA 挿入系統の確認

マッピングおよび塩基配列の確認により *zip2* の原因遺伝子が *AtVPS41* (At1g08190) である可能性が示唆された。そこで Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/>) から T-DNA 挿入系統 SALK\_076372 および SALK\_150724 の 2 系統を取り寄せた。SALK\_076372 は *AtVPS41* の第 13 エキソンに、SALK\_150724 は第 17 エキソンに T-DNA が挿入されていることを T-DNA の left border および *AtVPS41* のコード領域にプライマーを設定して PCR を行うことにより確認した (図 23A)。T-DNA に関して遺伝子型がヘテロであった個体の自殖次世代 108 個体の遺伝子型をそれぞれの系統で確認したが、ともにホモの遺伝子型を持つ個体は全く得られなかった。この結果は *AtVPS41* が植物体の中で完全欠損してしまうと胚性致死になる可能性を示唆している。出芽酵母の知見から AtVPS41 と複合体を形成する可能性が示唆されている AtVPS16 および AtVPS33 についても同様に T-DNA 挿入系統を各々 1 系統ずつ調べてみたが、遺伝子型がホモである個体は得られなかった。

## 考察

### スクリーニングから得られた考察

本研究で目的とした *zig* の表現型を回復させるサプレッサー変異体が多数得られたことにより、このスクリーニングは成功したと評価できる。そして、序論で述べた 3 つの素過程のうち、①の過程に関与すると予想される Class I に属するサプレッサー変異体が最も多く得られたという事実は ZIG/VTI11 が機能する素過程のうち小胞輸送から液胞形成へ至る過程 (①) に関与する因子が最も多く存在することを示唆している。また、マッピングを行った Class I に属する 5 系統の原因遺伝子がすべて異なる遺伝子座にマップされたという事実は、この *zig* 変異のサプレッサーに対するスクリーニングが未だ飽和しておらず、同様のスクリーニングを行うことでさらに新規の関連因子を単離できる可能性を期待させる。

本スクリーニングでは素過程①に関わると思われる Class I の他に重力屈性異常、あるいは形態異常を強く回復させる Class II、III に属する系統も得られた。Class II と Class III の原因遺伝子はそれぞれ素過程②および③に関与することが予想される。この結果は当初想定した ZIG/VTI11 の機能が遺伝学的に分離可能であるという考えを支持する。そして、Class II、III に属する系統に関しては ZIG/VTI11 の持つ、より特異的な生理機能に対する解析に有用であると考えられる。

### *zip1* の解析から得られた考察

*VTI12* は単独変異では完全欠損した null 変異体の場合でも、通常の生育条件では明瞭な表現型を示さない。しかし、*VTI11* の完全欠損変異体である *zig-1* に *vti12* 変異がヘテロで入った *zig-1/zip1 vti12/+* の遺伝子型を持つ植物体では、*zig-1* 単独変異体の場合よりも、さらに成長が遅れ、個体が全体的に矮小化し、稔性も低下するといったように表現型が強まる (Surpin et al., 2003; 図 24C)。*zig-1/+ vti12/vti12* の遺伝子型を持つ植物体では、*zig-1* 単独ホモほど明瞭な表現型は見られないが、野生株に比較すると、やや成長が遅れる (図 24A, B)。そして、*zig-1* と *vti12* の二重ホモ変異が入ると胚性致死になる (Surpin et al., 2003)。これに対し、*zip1* 変異は花茎・胚軸の重力屈性および花茎やロゼット葉の形態異常、そして細胞内のアミロプラストの沈降異常といった ZIG/VTI11 の欠損により生じる生理機能障害を全般に渡ってほぼ野生株レベルまで回復させる。よって *zip1* 変異は *VTI12* が欠損した場合とは異なるユニークな機能獲得型優性変異であると言える。

抗 VTI12 抗体を用いたイムノブロット解析および抗 SYP22 抗体を用いた共免疫沈降解析の結果から、*zip1* 変異が *zig* 変異を抑圧したのは VTI12 タンパク質の蓄積量の上昇ではなく、細胞内局在および相互作用する相手が変化したことにより VTI12 が

ZIG/VTI11 の機能を代替できるようになったためであると考えられる (図 25)。1 アミノ酸置換が SNARE 分子の相互作用と局在性の双方を変化させ、機能的な複合体を形成し、さらにそれが多細胞真核生物の個体レベルの生理機能まで獲得したというこの現象は他に類例を見ない知見であり、非常に興味深い。

*zip1* 変異に伴う相互作用の変化と局在性の変化は、どちらが原因でどちらが結果であるのか現時点では判断できない。しかし、*zip1* 変異の存在は *zip1* 変異以外にも VTI12 の分子の機能を ZIG/VTI11 型に変換しうる VTI12 上の 1 アミノ酸置換が存在することを予感させる。今後は *zip1* と同様の VTI12 の相互作用や局在性を変化させるような変異をスクリーニングすることで VTI1 ファミリーの特異性を規定する機能ドメインの詳細が明らかになると期待される。

シロイヌナズナのゲノム上には *VTI1* から *14* までの 4 つの *VTI* ファミリーが存在する (図 12C)。*VTI3* は *VTI1* や *VTI2* よりも低いレベルで芽生えで発現が確認されている (Surpin et al., 2003; Uemura et al., 2004)。一方、*VTI4* は培養細胞でのみ発現が確認されている (Uemura et al., 2004)。*VTI4* に関しては植物体での発現が確認されていないので、生理機能への関与はほとんどないと考えられる。*VTI3* に関しては SALK と Garlic から T-DNA 挿入系統が 1 ラインずつ得られ、通常の生育条件では野生株と変わらない表現型を示した (データは示さず)。T-DNA 挿入系統の表現型と *VTI3* の発現が ZIG/VTI11 や *VTI2* に比較して低いことから、野生株における生理機能への寄与は少ないと考えられるが、ホモログ遺伝子との機能重複に関しては今後遺伝学的解析などを通じて検証する必要がある。

ZIG/VTI11 と VTI12 は異なる機能を持つが、これらの変異体の表現型解析から植物体内では ZIG/VTI11 が主要な機能を果たしていると考えられる (Surpin et al., 2003)。*vti11 vti12* 二重 null 変異体は胚性致死になるので、ZIG/VTI11 と VTI12 は少なくとも胚発生期においては機能的に重複していると考えられる。*zip1* 変異体において SYP21/22 と VTI12 との間に物理的相互作用が認められること、および *vti12* 変異体において SYP4 と VTI11 との間に物理的相互作用が認められるので、VTI11 と VTI12 の分子機能はある程度交換可能であると言える (Surpin et al., 2003)。本研究においても ZIG/VTI11 が欠損するとホモログである VTI12 タンパク質の蓄積量が増加するという興味深い現象を発見した。そして、これは *VTI12* 遺伝子の転写量の増加を伴わないものであることを示した (図 14A, B)。この結果は ZIG/VTI11 の欠損により VTI12 のパートナーとなりうるフリーのパートナー SNARE が増えたために受動的に VTI12 が液胞側に流れ込んで SYP22 と結合することで VTI12 の安定性が強まり、単位時間あたりの VTI12 の量が増加したと解釈できるが、ZIG/VTI11 の欠損に対する VTI12 の補償作用と捉えることもできる。マウスにおいても *VTI* 遺伝子はゲノム上に *Vt1a* と *Vt1b* が存在し、ある程度の機能重複を伴いながらも異なる機能を持つことが示唆されている (Kreykenbohm et al., 2002; Atlashkin et al., 2003)。さらに、マウスの *Vt1a* の splicing variant である *Vt1a-β* は SNARE モチーフの N 末側隣接部位に 7 アミノ酸残基の挿入を持ち、その結果、本来の *Vt1a* とは異なる細胞内局在を示すことが知ら

れている (Antonin et al., 2000)。高等真核生物の環境への適応戦略の一つとして、ポストゴルジ・ネットワークにおける内膜系あるいは輸送系の複雑化を位置づけることができる。VTI1 ファミリーは、高等真核多細胞生物における複雑化したポスト・ゴルジの細胞内輸送系を支えるために、いくぶんかの機能重複は残しつつも、その機能を進化の過程において多様化させてきたのだろう。そして、このような VTI1 ファミリーのもつ柔軟性が、*zip1* や Vti1a- $\beta$  のようなわずかな分子の変化を伴った新たな、あるいは重複した機能の獲得を導いているのかもしれない。

*zip1 sgr3* 二重変異体では *sgr3* 単独変異体とほぼ変わらない表現型を示す (図 18A)。一方、*zip1 sgr3 zig-1* 三重変異体では *sgr3* 単独変異体の持つ表現型が抑圧され、重力屈性能が回復しているように見える (図 18C)。この結果は ZIG/VTI11 が存在する条件下では *sgr3* 型の表現型が強く出るが、ZIG/VTI11 が存在しない条件下では *zip1* の表現型が強く出ることを示している。このことは *sgr3* 独特の表現型が ZIG/VTI11-SYP22<sup>SGR3</sup> 複合体依存的であり、この条件下でさらに VTI12<sup>ZIP1</sup> が存在しても、VTI12<sup>ZIP1</sup> より ZIG/VTI11 の機能的影響のほうが優越することを示唆している。一方、*zip1 sgr3 zig-1* 三重変異体バックグラウンド、すなわち ZIG/VTI11 が存在せず、VTI12<sup>ZIP1</sup> と SYP22<sup>SGR3</sup> が共存する条件下では、*zig-1* 型や *sgr3* 型の表現型が抑えられることから、ある程度機能的な SNARE 複合体が植物体内で形成されていると考えられる。*zip1 sgr3 zig-1* 三重変異体内で機能している VTI12<sup>ZIP1</sup> を含む SNARE 複合体としてはいくつかの可能性を想定できる。まず、VTI12<sup>ZIP1</sup> と SYP22<sup>SGR3</sup> で機能的な複合体を形成している可能性である。VTI12<sup>ZIP1</sup> よりも SYP22<sup>SGR3</sup> との親和性が高いと予想される ZIG/VTI11 でさえ機能面では不完全な複合体しか形成できないにもかかわらず、より親和性の低い VTI12<sup>ZIP1</sup> のほうが SYP22<sup>SGR3</sup> とより機能の完全な複合体を形成できるという仮説は一見矛盾するようであるが、以下のような可能性も考えられる。すなわち、複合体の形成のしやすさと、その複合体が機能的であるかどうかは別問題であるという考え方である。ZIG/VTI11、SYP22<sup>SGR3</sup> および VTI12<sup>ZIP1</sup> の 3 者が並存する条件下では、物理的結合という点においては SYP22<sup>SGR3</sup> は VTI12<sup>ZIP1</sup> よりもより ZIG/VTI11 と結合しやすい。しかし、その結果、形成された SYP22<sup>SGR3</sup>-ZIG/VTI11 複合体は機能的に不十分なものであり、*sgr3* 型の表現型を呈する結果となる。一方、ZIG/VTI11 が存在せず、SYP22<sup>SGR3</sup> および VTI12<sup>ZIP1</sup> の 2 者が並存する条件下では、本来 SYP22<sup>SGR3</sup> と優先的に結合する ZIG/VTI11 がいないために、SYP22<sup>SGR3</sup>-VTI12<sup>ZIP1</sup> 複合体がより効率よく形成される。この複合体は機能という点では SYP22<sup>SGR3</sup>-ZIG/VTI11 複合体よりもより完全であるため、重力屈性および形態が回復するのではないだろうか。あるいは別の可能性として、SYP22<sup>SGR3</sup> はもはや VTI12<sup>ZIP1</sup> とほとんど複合体を形成できず、その代わりに VTI12<sup>ZIP1</sup> は SYP22 のホモログである SYP21 とより機能的な複合体を形成することで重力屈性や形態の回復を導いているのかもしれない。*zip1* 変異を加えることで、これまで隠れていた SYP22<sup>SGR3</sup> の特殊性が見えてきた。今後はこれらの SNARE 遺伝子の遺伝子破壊システムも加えた多重変異体の作成と、それぞれの遺伝的バックグラウンドにおける SNARE 分子の振る舞いを生化学的、細胞生物学的に

解析することで VTI1 ファミリーと SYP2 ファミリーの関係に関する興味深い知見が得られると期待される。

### *zip2* の解析から得られた考察

*AtVPS41* は出芽酵母 *VPS41* のホモログとして同定されていた。出芽酵母 Vps41p は 992 アミノ酸残基からなり、真核生物の間で保存された 2 つのドメインを持つタンパク質である。N 末側にドメイン I を、C 末側にクラスリン重鎖リピート (C-terminal clathrin heavy-chain repeat; CHCR) ドメインを持つ (Nakamura et al., 1997; Darsow et al., 2001)。出芽酵母 Vps41p の機能に関しては現在 2 つのモデルが提示されている。(1) ゴルジ体において ALP 経路 (ゴルジから PVC を非経由で液胞に至る経路) の輸送小胞形成の初期段階で働く。ALP 経路のアダプタータンパク AP-3 のサブユニットとドメイン I を介して結合することで AP-3 の安定化に寄与しているのではないかと考えられている。また、CHCR を介して自己重合することで輸送小胞形成を促進しているのではないかと考えられている (Rehling et al., 1999; Darsow et al., 2001)。

(2) C-Vps (HOPS) 複合体の構成要素の 1 つとして液胞における繫留および融合に関与する (Price et al., 2000a; Price et al., 2000b; Sato et al., 2000)。

出芽酵母の HOPS 複合体サブユニットのシロイヌナズナホモログとして *AtVPS11*、16、18、33、39 および 41 がそれぞれ同定されている。これらのサブユニットをコードする遺伝子はすべてシロイヌナズナゲノム上にホモログを持たない single copy gene である (Rojo et al., 2003)。*AtVPS16* の欠損変異体 *vacuoleless1* の解析 (Rojo et al., 2001) および本研究における *AtVPS16*、33 および 41 の T-DNA 挿入系統の確認から HOPS 複合体サブユニットをコードする遺伝子が一つでも欠けると胚性致死に至ることが示唆される。*AtVPS11*、16 および 33 に関しては生化学的解析により、互いに結合能を持ち、液胞膜に局在することが報告されている。また液胞膜に局在する Qa-SNARE SYP22 との結合も報告されている (Rojo et al., 2003)。これらの知見を踏まえると、*AtVPS41* を含むシロイヌナズナの HOPS 複合体も液胞形成において繫留の校正に機能する可能性がある。シロイヌナズナ *AtVPS41* においてもドメイン I および CHCR ドメインは保存されており、*zip2* の予想変異点は CHCR ドメイン内の保存されているアミノ酸残基である (図 23B, C)。このアミノ酸残基は *AtVPS41* の機能に重要であり、このアミノ酸残基が置換することで *AtVPS41* の機能に影響を与え、*zig-1* 変異の障害を相補するという結果を引き起こしたのかもしれない。可能性の一つとして、液胞における膜融合の校正機能が *zip2* 変異によって影響を受けたために、本来は正しい校正機能によって解消されてしまうはずの VTI12 と SYP22 との結合が進み、ある程度機能的な SNARE 複合体を形成して *zig* 変異の表現型を部分的に回復したのではないかという仮説が考えられる。今後、この変異体を用いた生化学的および細胞生物学的解析により *zip2* による *zig* 変異の抑圧メカニズムを解いていく必要がある。

## SNARE 欠損株のサプレッサーのスクリーニング系を用いた遺伝学の有用性

VTI12 は、単独変異では完全欠損しても明瞭な表現型を持たず、ホモログである ZIG/VTI11 との二重変異にすると胚性致死になる。よって、序論で述べたような遺伝子破壊株のみでは遺伝学的解析が難しい小胞輸送関連因子に該当する。これに対して、VTI12 の機能獲得変異である *zip1* は *zig* 変異の遺伝的バックグラウンドで明瞭な表現型を持ち、胚発生以降も正常に発生を行うので生育後期における高次機能と結びつけた VTI12 の解析も可能である。また AtVPS41 の完全欠損株は単独変異で胚性致死になることが示唆された。こちらも遺伝子破壊株のみでは遺伝学的解析が難しく、生育後期の生理解析も容易ではない小胞輸送関連因子である。よって、*zig* 変異の遺伝的バックグラウンドで明瞭な表現型を持ちつつ胚発生以降も正常に生育を行う *zip2* の存在意義は大きい。そして、これらの事実は、単独変異では明瞭な表現型を持たなかったり、完全欠損すると胚性致死になるような小胞輸送関連因子でもサプレッサー変異体としてならば分離できるはずであるという本研究におけるスクリーニングの狙いが正しかったことを示している。

本研究において、私は *zig* 変異体を足がかりにすることで ZIG/VTI11 と遺伝学的に相互作用する因子が分離可能であることを見出した。また、*zig suppressor1* の解析を糸口に、SNARE の一塩基置換バージョン分子が局在とパートナーを変えることによってホモログ分子の欠損を個体レベルまで回復するに至ったことを発見した (図 27A)。また、*zip2* の存在は液胞融合の解析に対してこれまでとは異なる新たなアプローチが可能であることを予感させる (図 27B)。本研究室の高橋徹也氏の解析から *zip3* の原因遺伝子のコードするタンパク質が PVC あるいは液胞からの逆行輸送に関与するレトロマーのサブユニットである可能性が示唆されている (平成 16 年 3 月 高橋哲也氏 修士論文; 図 27C)。そして現在マッピング中である SC2-1 と SC36-1 は HOPS 複合体やレトロマーのサブユニットホモログをコードすると考えられる遺伝子座のいずれとも異なる位置にマップされており (図 26)、その原因遺伝子がこれまで同定した ZIP 遺伝子とは異なるイベントに関与することが期待される。*zig* のサプレッサー変異体を中心とした分子遺伝学は、植物体の重力屈性や形態上の表現型を指標として用いることで、細胞内部の液胞周辺のポストゴルジ・ネットワークの輸送系を間接的にモニターできる優れた系である。この系は高等植物多細胞系における細胞内小胞輸送の分子ネットワークや個体レベルの生理的意義を解析するための極めて有力なツールとなりうるだろう。

## 謝辞

本研究を行うにあたり田坂昌生教授ならびに森田（寺尾）美代博士には絶えず熱心なご指導と適切な助言をいただきました。心より感謝いたします。東京大学理学研究科の中野明彦教授からは *zig suppressor1* の研究をまとめる上で有益な助言をいただきました。京都大学総合人間学部の佐藤雅彦博士には抗 SYP22 抗体を分与いただくとともに、*zig suppressor1* の研究を遂行する上で有益な助言をいただきました。京都大学生命科学研究科の植村知博博士には培養細胞を用いた細胞内局在の解析を行っていただきました。理化学研究所の齊藤知恵子博士には電子顕微鏡解析を行っていただきました。University of California, Riverside の Natasha Raikhel 博士には抗 VTI12 抗体を分与していただきました。深城英弘博士ならびに加藤壮英博士には実験手技等の面で懇切丁寧なご指導と助言をいただきました。変異体のスクリーニングでは形質発現植物学講座の石原聖子さんに大変お世話になりました。食品総合研究所の鈴木聡さんにはプラスミド構築およびタンパク質実験の面で重要な情報をいただきました。京都大学医学研究科の中山幸代さんにはタンパク質実験における有益な助言をいただきました。以上の方々に厚く御礼申し上げます。さまざまな知見や助言をいただくとともに5年間の研究生生活を精神面からも支えていただいた形質発現植物学講座のみなさまに深く感謝いたします。



## 参考文献

- Assaad, F. F., Qiu, J., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., Wanner, G., Peck, S. C., Edwards, H., Ramone, K., Somerville, C. R., and Thordal-Christensen, H. (2004). The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell*. **15**, 5118-5129.
- Antonin, W., Riedel, D. and Fischer von Mollard G. (2000). The SNARE Vtila- $\beta$  is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex *J. Neurosci*. **20**, 5724-5732.
- Atlashkin, V., Kreykenbohm, V., Eskelinen, E., Wenzel, D., Fayyazi, A., and Fischer von Mollard, G. (2003). Deletion of the SNARE vtilb in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol. Cell. Biol*. **23**, 5198-5207.
- Bassham, D. C., Sanderfoot, A. A., Kovaleva, V., Zheng, H. and Raikhel, N. V. (2000). AtVPS45 complex formation at the trans-Golgi network. *Mol. Biol. 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.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T., and Raikhel, N. V. (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveal predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16**, 3285-3303.
- Caspar, T. and Pickard, B.G. (1989). Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*. Implications for the starch-statolith theory of gravity sensing. *Planta* **177**, 185-197.
- Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **16**, 735-743.
- Darsow, T., Katzmann, D. J., Cowles, C. R., and Emr, S. D. (2001). Vps41p function

in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains. *Mol Biol Cell*. **12**, 37-51.

Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T. and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 15781-15786.

Fischer von Mollard, G., 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. *J. Cell Biol.* **137**, 1511-1524.

Fischer von Mollard, G. and Stevens, T. H. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Mol Biol Cell* **10**, 1719-1732.

Fujihiro, K., Kurata, T., Watahiki, M. K., Karahara, I., and Yamamoto, K. T. (2000). An agravitropic mutant of *Arabidopsis*, *endodermal-amyloplast less 1*, that lacks amyloplasts in hypocotyl endodermal cell layer. **41**, 1193-1199.

Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M. (1996a). Gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **110**, 933-943.

Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M. (1996b). *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.

Fukuda, R., McNew, J. A., Weber, T., Parlati, F., Engel, T., Nickel, W., Rothman, J. E. and Sollner, T. H. (2000). Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Nature* **407**, 198-202.

Holthuis, J. C., Nichols, B. J., Dhruvakumar, S., and Pelham, H. R. (1998). Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *EMBO J.* **17**, 113-126.

Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T. C. (2003). Membrane Fusion. *Cell* **112**, 519-533.

- Kato, T., Morita, M. T., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama, M., 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.
- Kiss, J. Z., Hertel, R. and Sack, F. D. (1989). Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **177**, 198-206.
- Kiss, J. Z. and Sack, F. D. (1989). Reduced gravitropic sensitivity in roots of a starch-deficient mutant of *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **180**, 123-130.
- Kiss, J. Z. and Sack, F. D. (1990). Severely reduced gravitropism in dark-grown hypocotyls of a starch-deficient mutant of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol.* **94**, 1867-1873.
- Kiss, J. Z., Wright, J. B., and Sack, F. D. (1996). Gravitropism in root of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **97**, 237-244.
- Kiss, J. Z., Guisinger, M. M., Miller, A. J., and Stackhouse, K. S. (1997). Reduced gravitropism in hypocotyls of starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **38**, 518-525.
- Kreykenbohm, V., Wenzel, D., Antonin, W., Atlachkine and Fischer von Mollard, G. (2002). The SNAREs vtila and vtilb have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 273-280.
- Lauber, M. H., Waizenegger, I., Steinmann, T., Schwarz, H., Mayer, U., Hwang, I., Lukowitz, W., and Jurgens, G. (1997). The *Arabidopsis* KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J Cell Biol.* **139**, 1485-1493.
- Lukowitz, W., Mayer, U., and Jurgens, G. (1996). Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell.* **84**, 61-71.
- Lupashin, V. V., Pokrovskaya, I. D., McNew, J. A., and Waters, M. G. (1997). Characterization of a novel yeast SNARE protein implicated in Golgi retrograde traffic. *Mol Biol Cell* **8**, 2659-2676.

- 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.
- Nakamura, N., Hirata, A., Ohsumi, Y., and Wada, Y. (1997). Vam2/Vps41 and Vam6/Vps39 are components of a protein complex on the vacuolar membrane and involved in the vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **272**, 11344–11349.
- Price, A., Wickner, W., and Ungermann, C. (2000a). Protein needs for vesicle budding from the Golgi complex are also required for docking step of homotypic vacuole fusion. *J Cell Biol*. **148**, 1223–1229.
- Price, A., Seals, D., Wickner, W., and Ungermann, C. (2000b). The docking stage of yeast vacuole fusion requires the transfer of protein from a cis-SNARE complex to a Rab/Ypt protein. *J Cell Biol*. **148**, 1231–1238.
- Rehling, P., Darsow, T., Katzmann, D. J., and Emr, S. D. (1999). Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function. *Nat Cell Biol*. **1**, 346–353.
- Rojo, E., Gillmor, C. S., Kovaleva, V., Somerville, C. R., Raikhel, N. V. (2001). *VACUOLELESS1* is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **1**, 303–310.
- Rojo, E., Zouhar, J., Kovaleva, V., Hong, S., Raikhel, N. V. (2003). The AtC-VPS protein complex is localized to the tonoplast and the prevacuolar compartment in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell* **14**, 361–369.
- Sack, F. D. (1991). Plant gravity sensing. *Int. Rev. Cytol.* (Academic Press), **127**, pp.193–252.
- Sack, F. D. (1997). Plastids and gravitropic sensing. *Planta* **203**, S63–S68.
- Sanderfoot, A. A., Kovaleva, V., Zheng, H., and Raikhel, N. V. (1999). The t-SNARE AtVAM3p resides on the prevacuolar compartment in *Arabidopsis* root cells. *Plant Physiol* **121**, 929–938.
- Sanderfoot, A. A., Assaad, F. F., and Raikhel, N. V. (2000). The *Arabidopsis*

genome. An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiol* **124**, 1558-1569.

Sanderfoot, A. A., Kovaleva, V., Bassham, D. C., and Raikehel, N. V. (2001). Interaction between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the *Arabidopsis* cell. *Mol Biol 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*. *J. Biol. Chem.* **272**, 24530-24535.

Sato, T. K., Rehling, P., Peterson, M. R., and Emr, S. D. (2000). Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion. *Mol Cell.* **6**, 661-671.

Srivastava, A., Woolford, C. A., and Jones, E. W. (2000). Pep3/Pep5 complex: A putative docking factor at multiple steps of vesicular transport to the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **156**. 105-122.

Surpin, M., Zheng, H., 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.

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 Struct Funct* **29**, 49-65.

Wada, Y., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. (1992). Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **267**, 18665-18670.

Whyte, J. R. C., and Munro, S. (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci.* **115**, 2627-2637.

Wurmser, A. E., Sato, T. K., Emr, S.D. (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol.* **151**, 551-562.

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.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 8589-8594.

Zheng, H., 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. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2251-2264.

Zhua, J., Gongb, Z., Zhangb, C., Songb, C., Damsza, B., Inana, G., Koiwac, H., Zhub, J. K., Hasegawaa, P. M., and Bressan, R. A. (2002). OSM1/SYP61: A syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell.* **14**, 3009-3028.

高田忍、加藤壮英、田坂昌生(2001). シロイヌナズナのマップベースクローニング法、植物細胞工学シリーズ14「植物ゲノム研究プロトコール」(秀潤社) pp. 95-103.

表 1. スクリーニングにより分離したサプレッサー変異株

|           | 管理系<br>統番号 | 変異名                    |        | 遺伝子座        | 原因遺伝子                    |
|-----------|------------|------------------------|--------|-------------|--------------------------|
| Class I   | -          | <i>zig suppressor1</i> | 優<br>性 | 1 番染色体 40cM | <i>VTI12</i> (At1g26670) |
|           | SC19-1     | <i>zig suppressor2</i> | 劣<br>性 | 1 番染色体 10cM | <i>AtVPS41*</i>          |
|           | SC5-1      | <i>zig suppressor3</i> |        | 2 番染色体 33cM | <i>AtVPV35b*</i>         |
|           | SC86-1     |                        |        |             | <i>AtVPV35b*</i>         |
|           | SC2-1      |                        |        | 1 番染色体 80cM |                          |
|           | SC4-1      |                        |        |             |                          |
|           | SC22-1     |                        |        |             |                          |
|           | SC36-1     |                        |        | 2 番染色体 40cM |                          |
|           | SC83-1     |                        |        |             |                          |
|           | SC108-1    |                        |        |             |                          |
| Class II  | SC1-1      |                        | 優<br>性 |             |                          |
|           | SC28-1     |                        | 劣<br>性 |             |                          |
|           | SC53-3     |                        |        |             |                          |
|           | SC97-1     |                        |        |             |                          |
| Class III | SC118-1    |                        |        |             |                          |

Class I; 重力屈性と形態の双方の異常を回復させる系統

Class II; 重力屈性の異常を強く回復させる系統

Class III; 形態の異常を強く回復させる系統

\* 変異点を同定したのみで相補性試験は未検定

表 2. *zig-1* の表現型に及ぼす導入遺伝子 (*VTH12<sup>zip1</sup>* および wt-*VTH12*) の影響

| transgene                   | n  | inflorescence stems    |                               | rosette leaves |                  | gravitropism |    |
|-----------------------------|----|------------------------|-------------------------------|----------------|------------------|--------------|----|
|                             |    | wild-type <sup>a</sup> | <i>zig</i> -type <sup>b</sup> | wild type      | <i>zig</i> -type | +            | -  |
| <i>VTH12<sup>zip1</sup></i> | 51 | 51                     | 0                             | 51             | 0                | 51           | 0  |
| wild-type <i>VTH12</i>      | 34 | 0                      | 34                            | 1              | 33               | 6            | 28 |

T1 個体の形態および重力屈性について観察した。

<sup>a</sup> 図 9B で示した表現型。

<sup>b</sup> 図 9C で示した表現型。



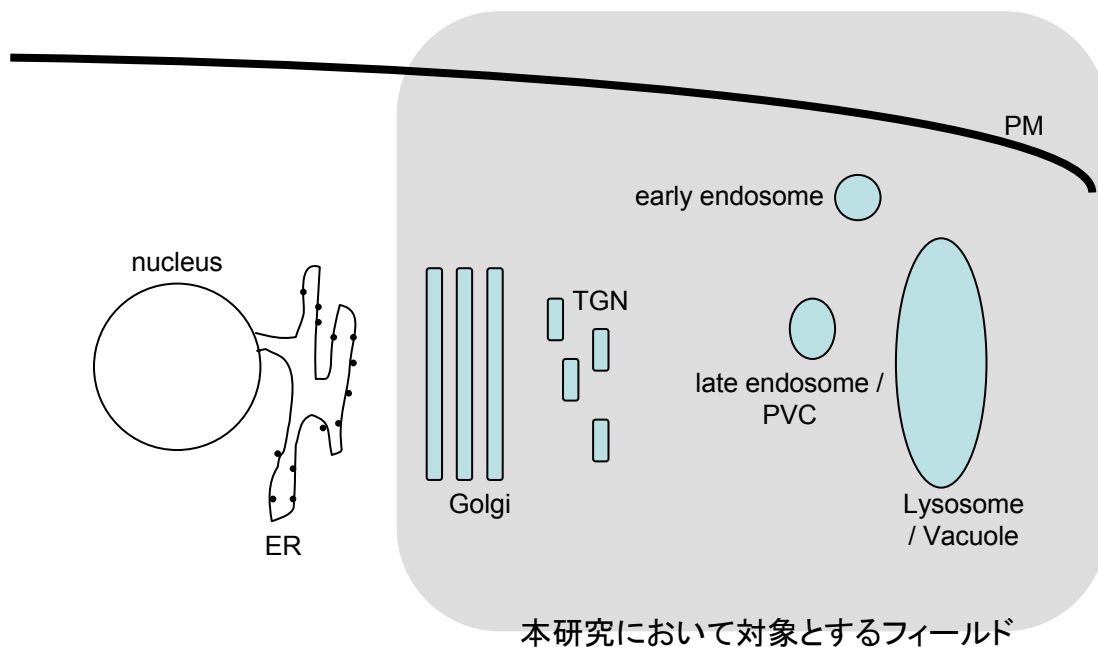


図1．真核細胞における細胞内オルガネラの模式図

各オルガネラは細胞内輸送経路によって連絡されている。本研究では灰色で示したポストゴルジ・ネットワークを対象とする。

Golgi; ゴルジ体、TGN; トランスゴルジ網、PVC; 液胞前区画、early endosome; 初期エンドソーム、late endosome; 後期エンドソーム、lysosome; リソソーム、vacuole; 液胞、PM; 細胞膜、nucleus; 核、ER; 小胞体

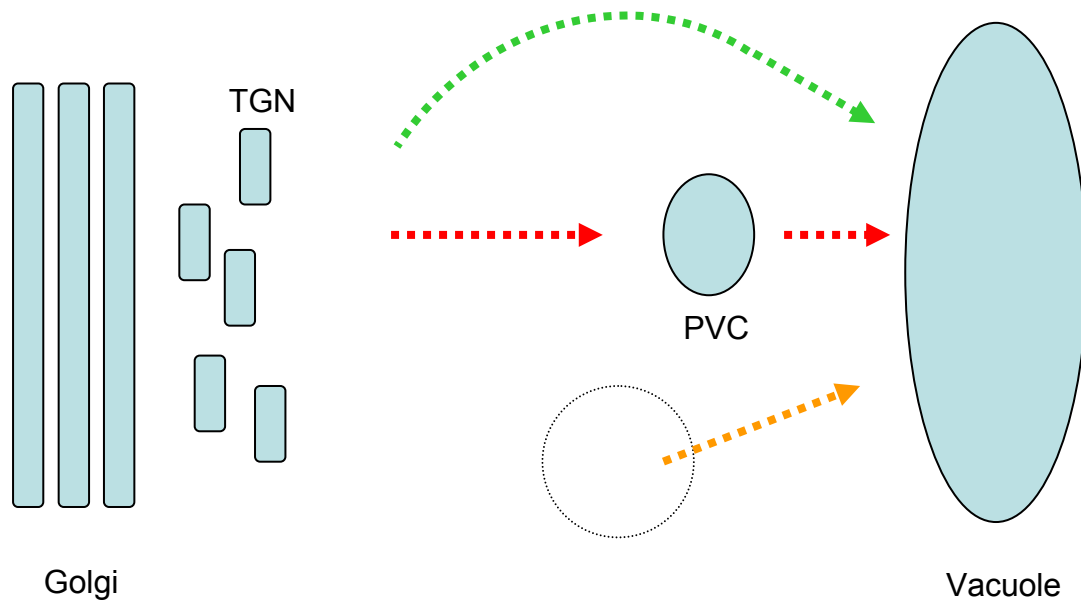


図2. 出芽酵母における液胞へ至る3つの小胞輸送経路

赤；ゴルジ体からPVCを経由して液胞へ至る経路（CPY経路）

緑；ゴルジ体からPVC非経由で液胞へ至る経路（ALP経路）

橙；細胞質から直接液胞へ至る経路（Cvt経路）

Golgi；ゴルジ体、TGN；トランスゴルジ網、PVC；液胞前区画、vacuole；液胞

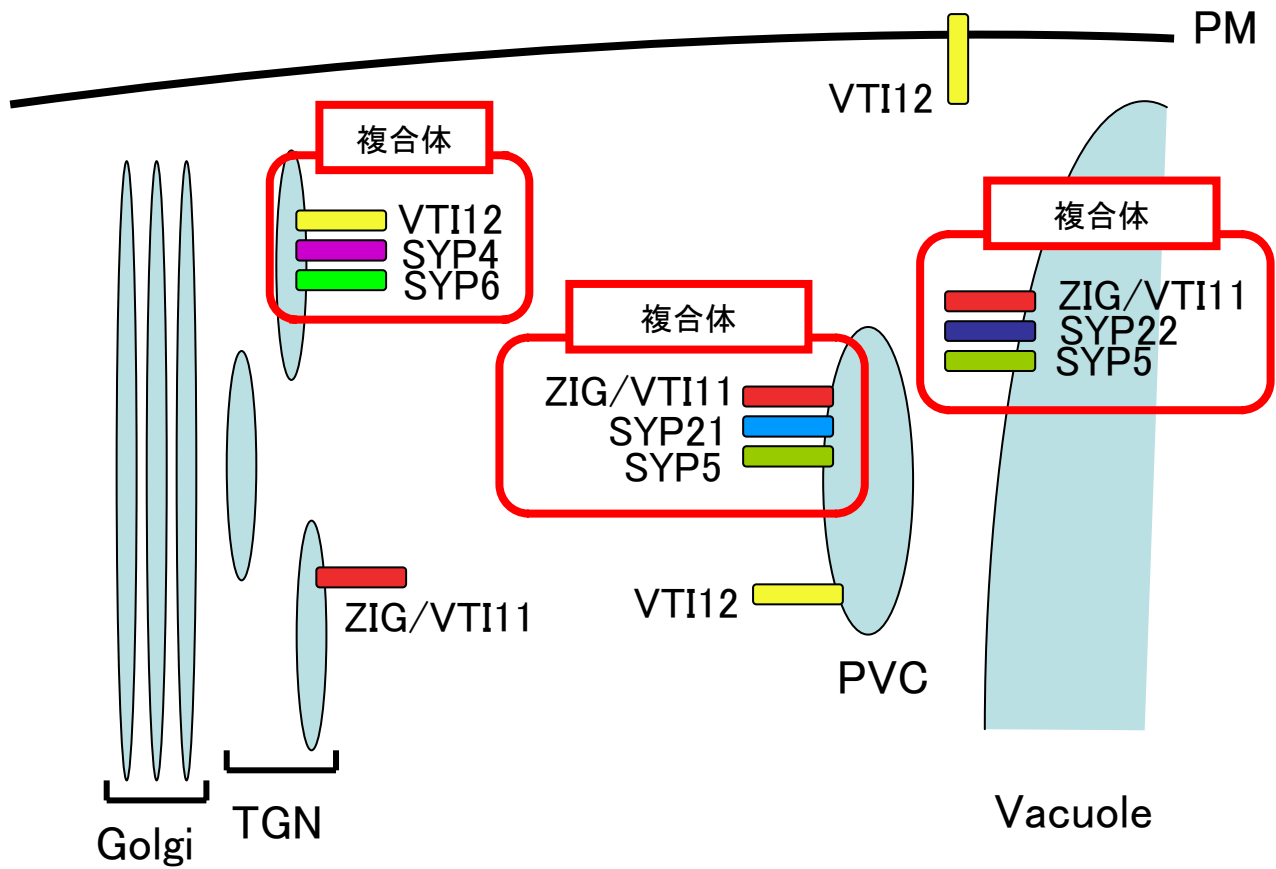


図3. シロイヌナズナZIG/VTI11とVTI12の細胞内局在モデル

ZIG/VTI11はPVCにおいてSYP21およびSYP5と、液胞膜においてSYP22およびSYP5との複合体として検出され、TGNにも局在が見られる。一方、VTI12はTGNにおいてSYP41、SYP6と複合体として検出され、PVCや細胞膜にも局在が見られる。

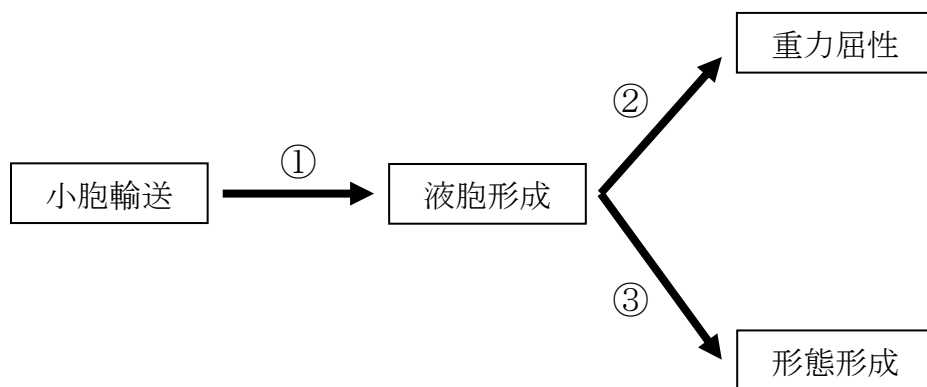


図4. ZIG/VTI11の機能に関する概念図

ZIG/VTI11が関与する小胞輸送は液胞形成を介して重力屈性や形態形成に機能している。

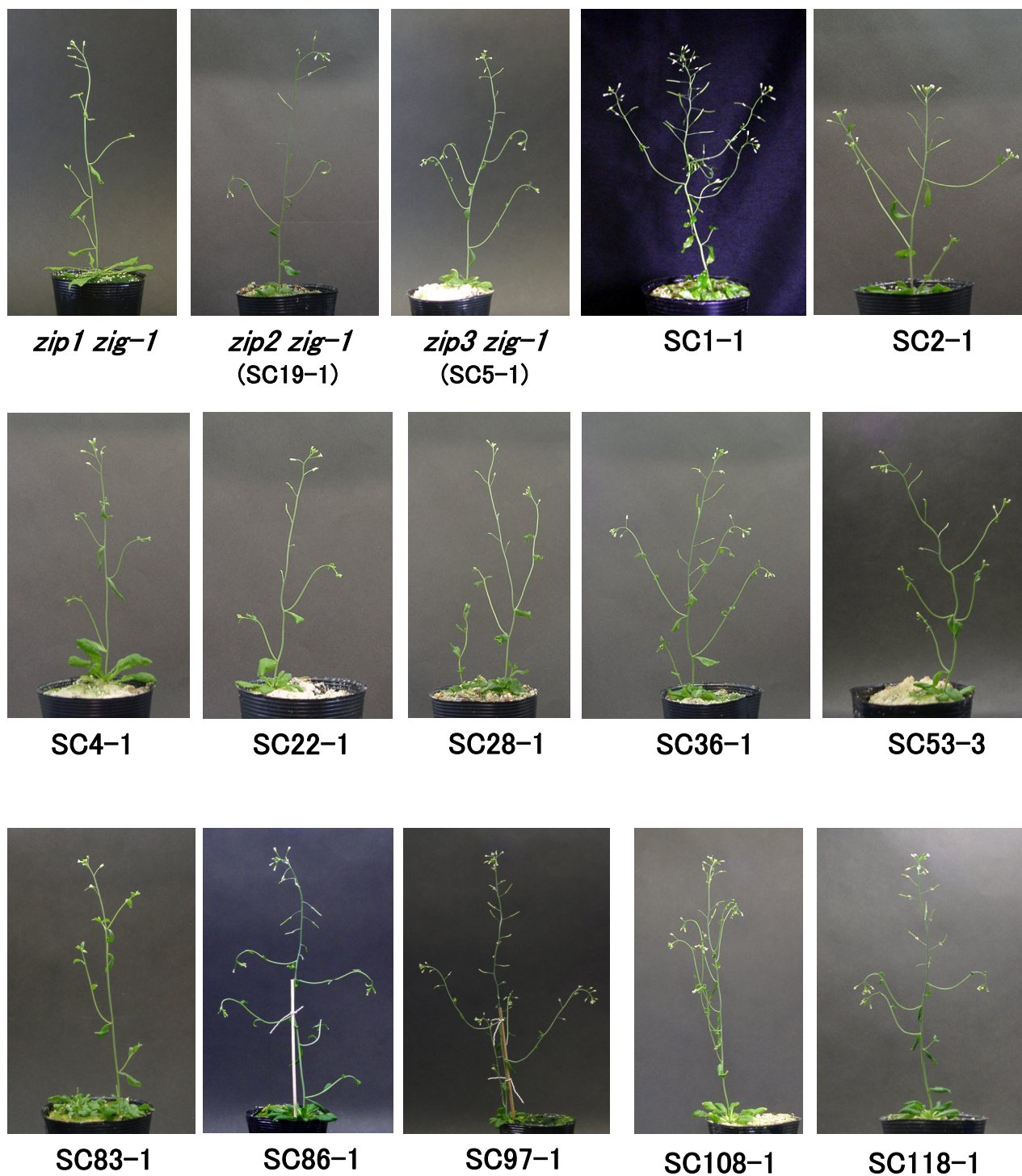


図5. スクリーニングにより分離したサプレッサー変異株  
それぞれの系統は発芽後 6 週間目の地上部を示している。

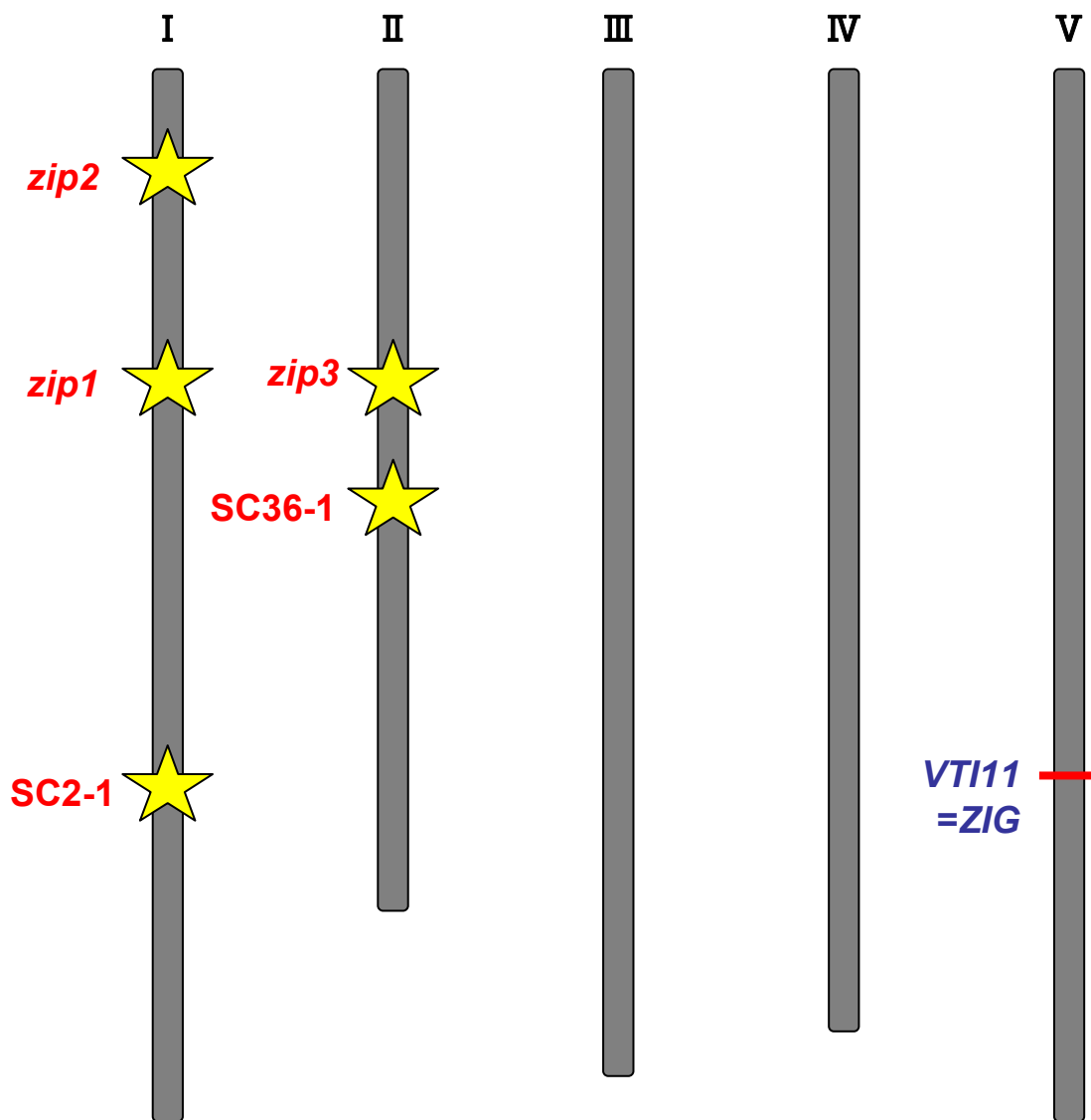


図6. *zip*変異のマップポジション

I-Vはそれぞれシロイヌナズナの染色体を示している。上記の5つのサブレッサー変異については互いに独立の遺伝子座であることを確認した。

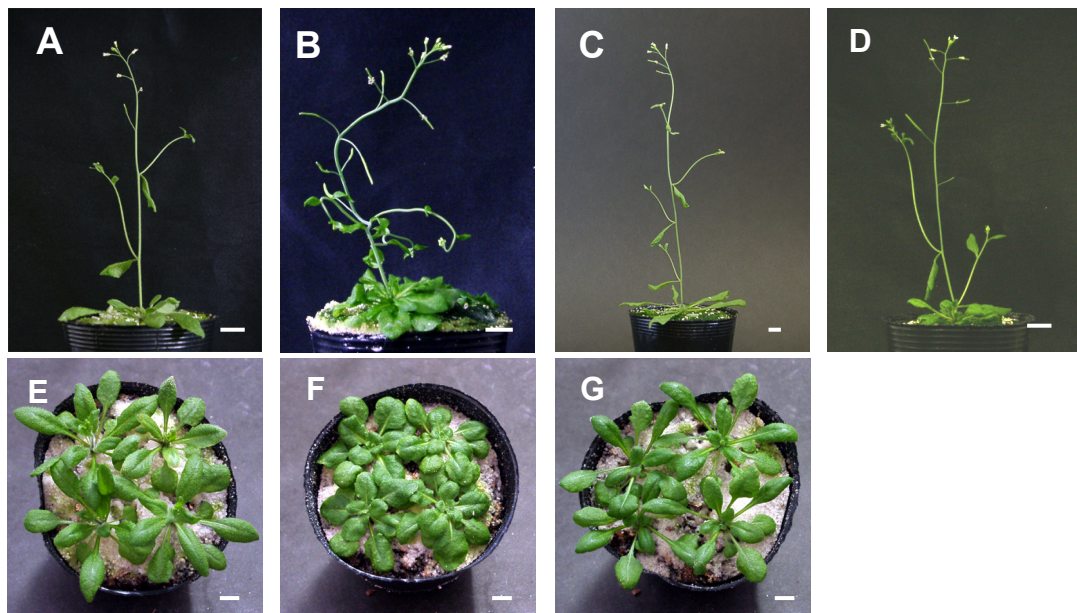


図7. *zip1 zig-1*二重変異体の地上部

(A) (E) Col野生株、(B) (F) *zig-1*変異体、(C) (G) *zip1 zig-1*二重変異体。(D) *zip1*単独変異体。A, B, Cは発芽後6週間目、D, E, Fは発芽後3週間目のロゼット葉。スケールバーは1cm。



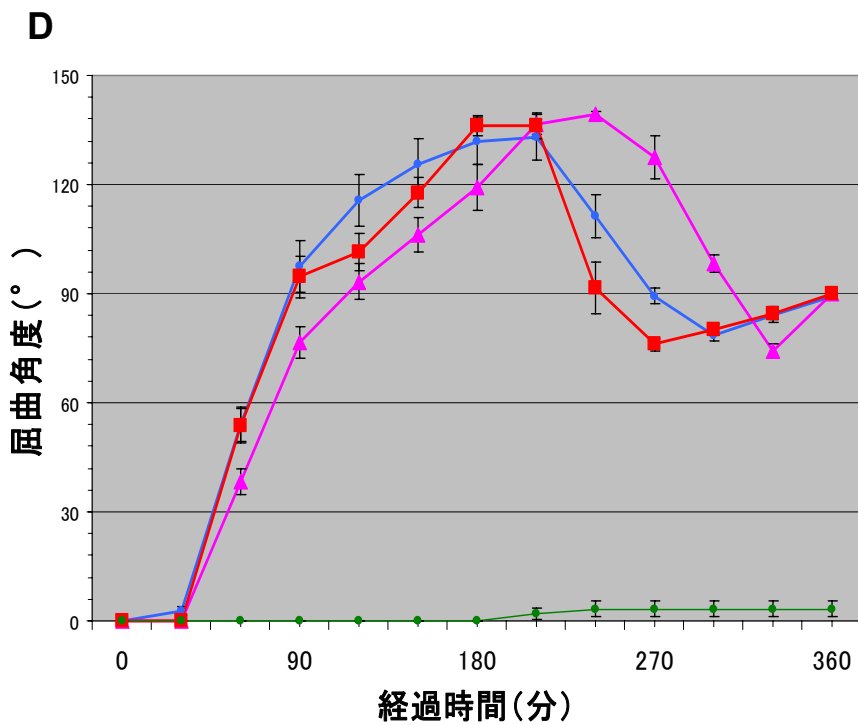
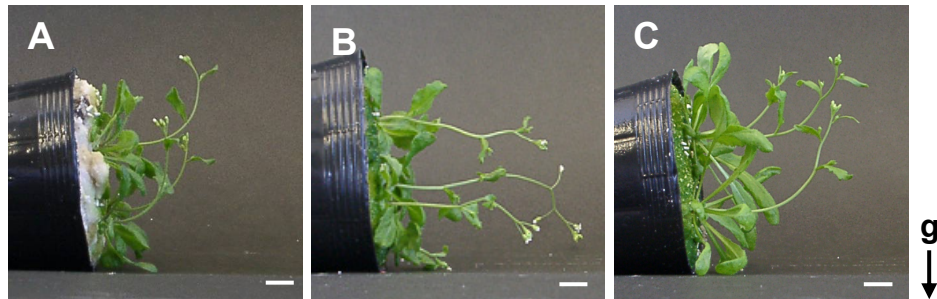


図8. *zip1 zig-1*二重変異体の花茎重力屈性反応

(A) Col野生株、(B) *zig-1*変異体、(C) *zip1 zig-1*二重変異体。発芽後4週間目。重力刺激を与え始めてから90分後の状態を示している。スケールバーは1cm。(D)花茎の屈曲角度の経時的変化。鉢に植わった状態で暗黒条件下に水平方向に倒して30分おきに屈曲角度を測定した。各系統18個体供試し、屈曲角度の値は平均値で示している。エラーバーは標準誤差を示す。赤; *zip1/zip1 zig-1/zig-1*、桃; *zip1/+ zig-1/zig-1*、青; Col野生株。緑; *zig-1*。



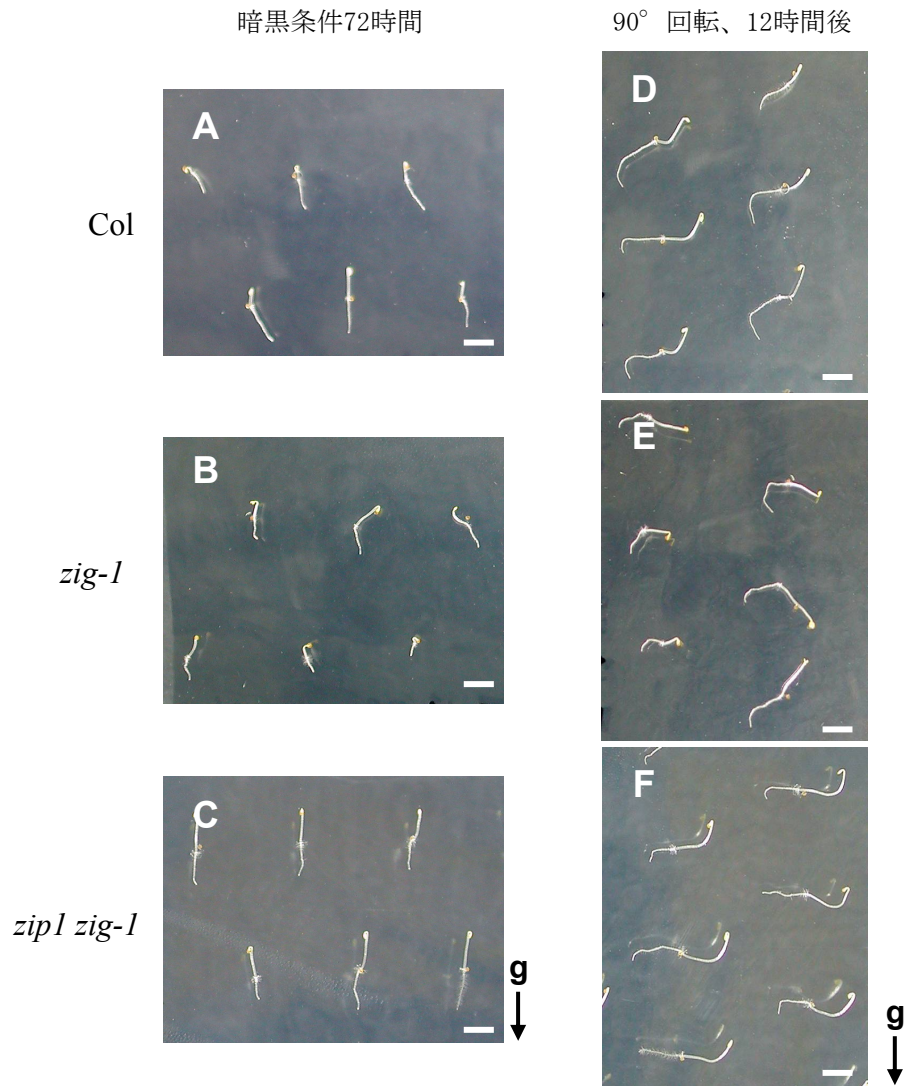


図9. 黄化芽生えを用いた胚軸および根の重力屈性反応

上段より、Col野生株、*zig-1*変異体、*zip1 zig-1*二重変異体。左の列は播種後72時間暗黒条件下で発芽させた黄化芽生え。右の列は90°回転させることにより重力方向を変えてから12時間後の様子。スケールバーは5mm、矢印は重力方向。

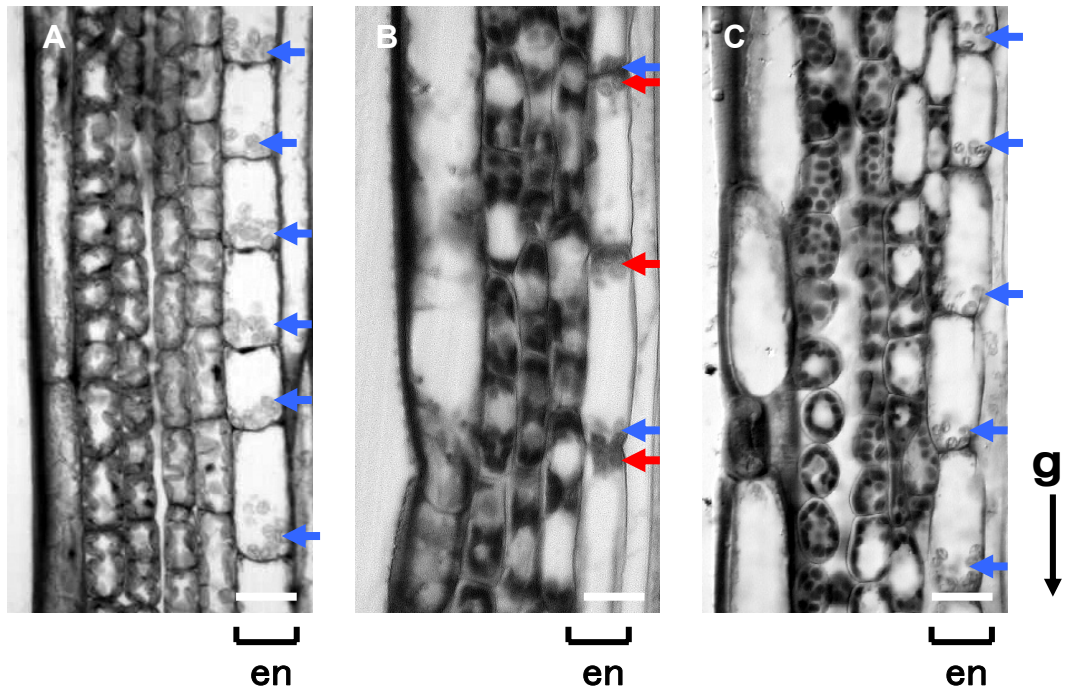
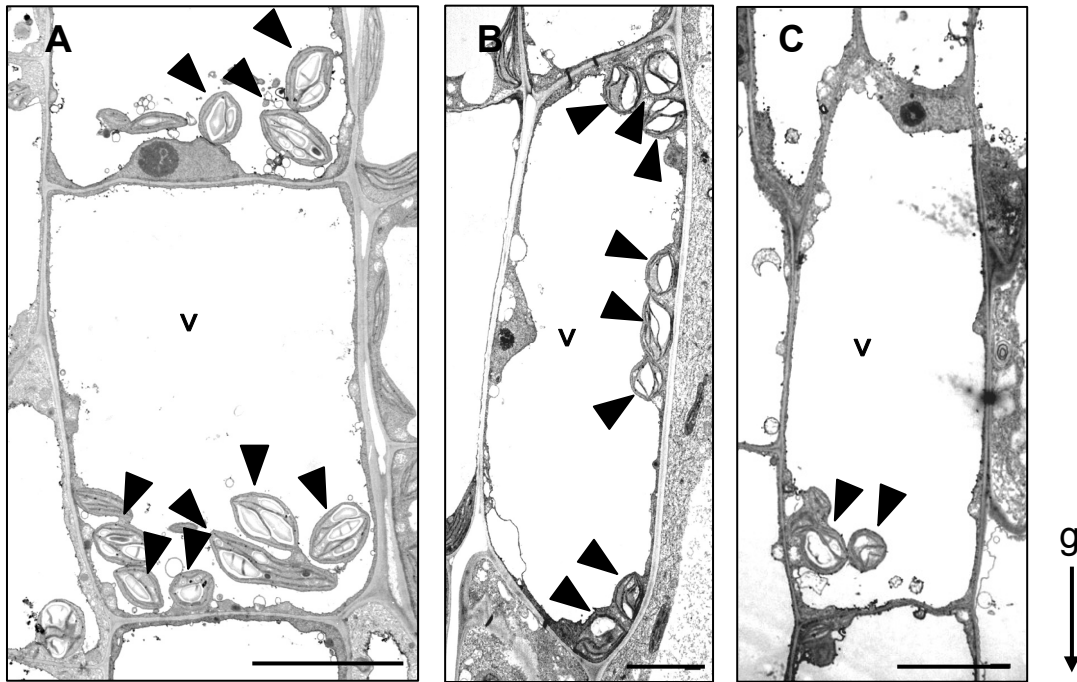


図10. *zip1 zig-1*二重変異体の花茎の縦断切片

(A) Col野生株、(B) *zig-1*変異体、(C) *zip1 zig-1*二重変異体。*zig-1*では内皮細胞のアミロプラストに沈降異常が見られるが、*zip1 zig-1*二重変異体では野生株同様、アミロプラストが正常に重力方向に沈降している。en; 内皮細胞層。スケールバーは20  $\mu$ m、白色の矢印は重力方向に沈降しているアミロプラスト、赤い矢印は沈降していないアミロプラストを指している。黒の矢印は重力方向。



参照データ 1. *zip1 zig-1*二重変異体の花茎細胞内の電子顕微鏡解析  
(齊藤知恵子博士による)

(A) Col野生株、(B) *zig-1*変異体、(C) *zip1 zig-1*二重変異体。矢じりはアミロプラストを示す。v：液胞。矢印は重力方向を示す。スケールバーは1  $\mu\text{m}$ 。

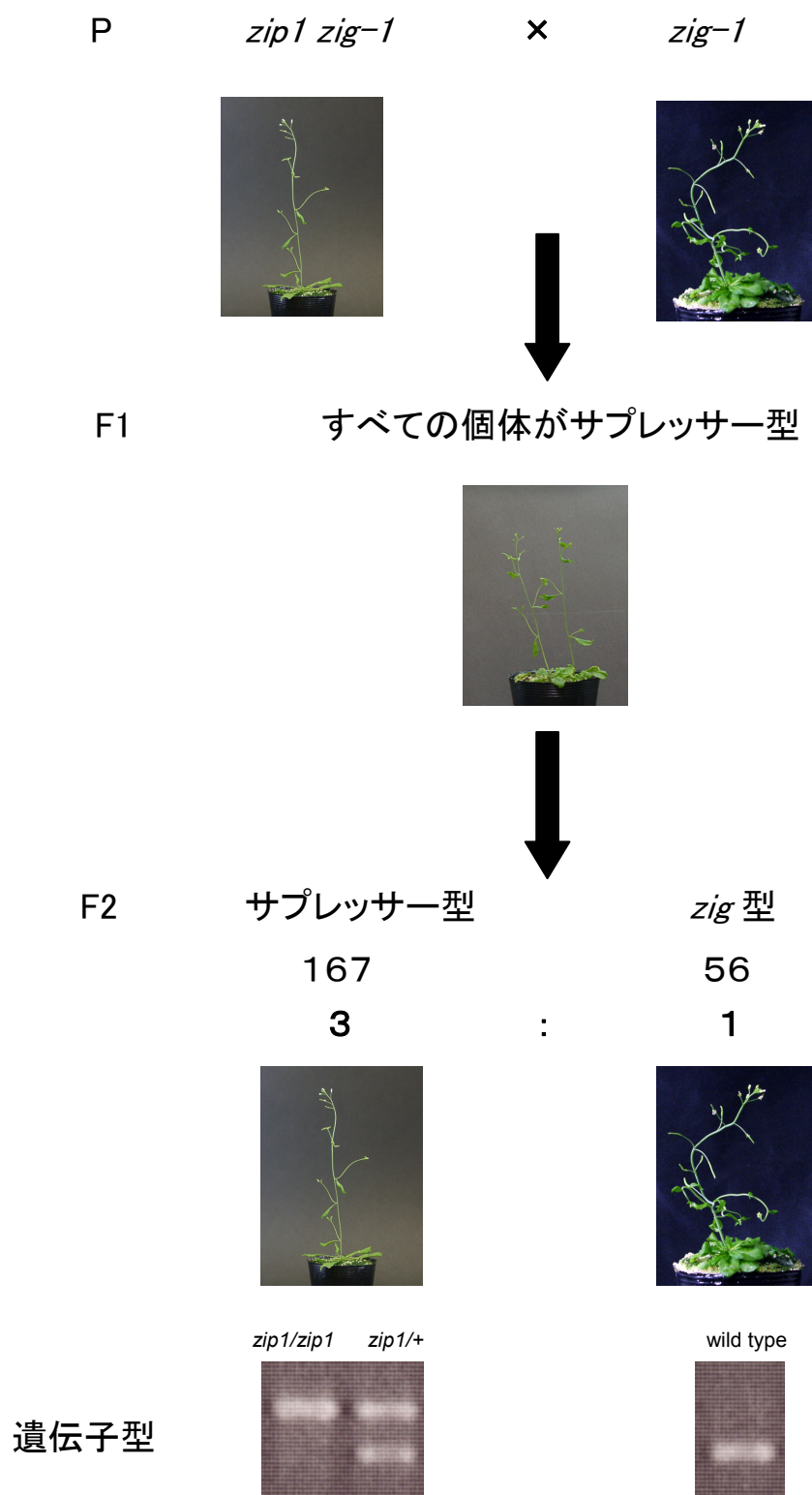


図11. *zip1*変異の遺伝解析

表現型と遺伝子型の連鎖解析を行った。遺伝子型はZIP1\_CAPSマーカールによるPCRで確認した。

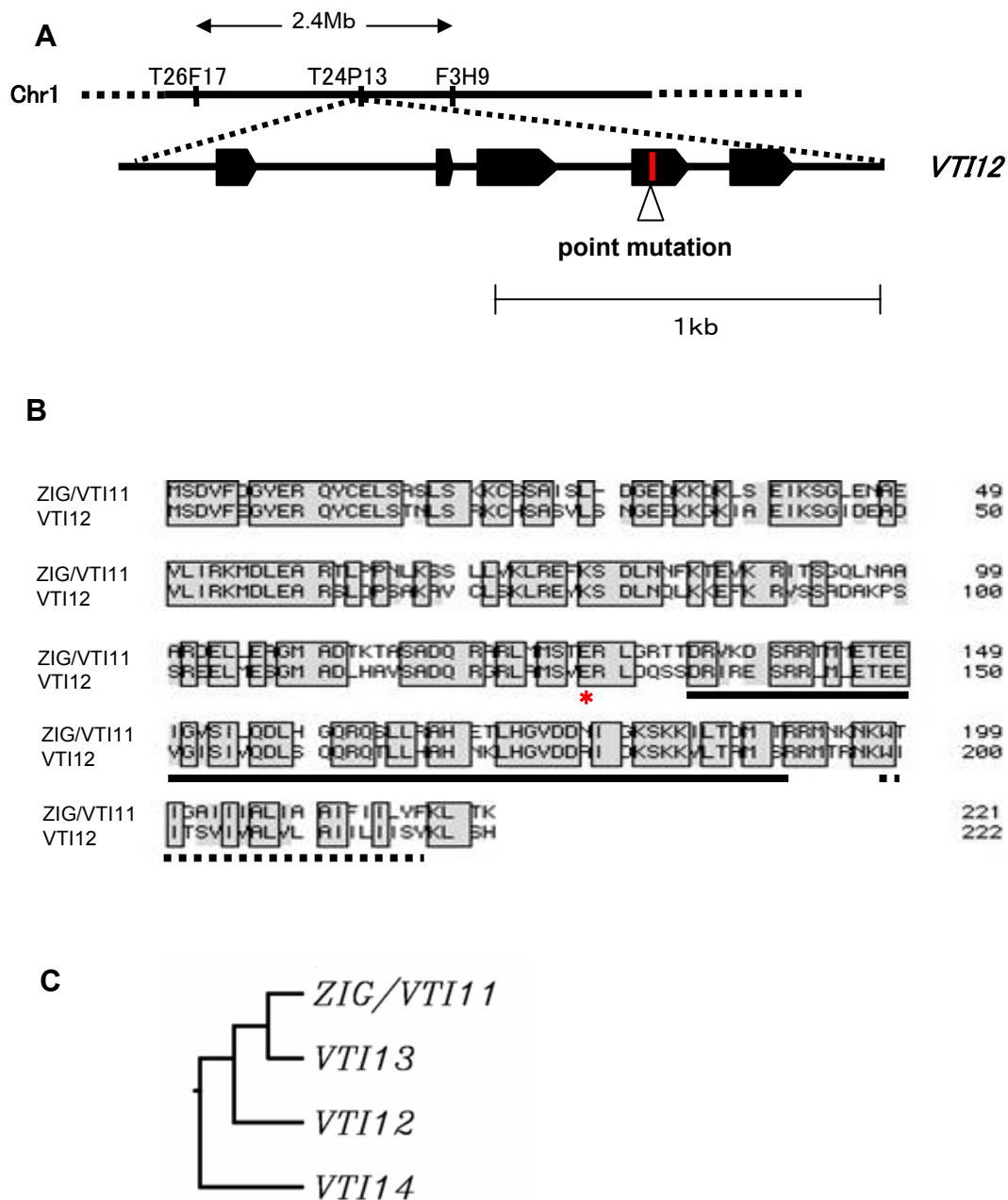


図12. *ZIP1*のマッピングとクローニング

(A) *ZIP1*のマッピング。赤く印をした部分が塩基置換が生じていた箇所。(B) ZIG/VTI11およびVTI12のアミノ酸配列。星印は*zip1*変異により置換するアミノ酸残基を示す。アンダーライン部は実線がSNAREモチーフ、破線が膜貫通領域。(C) シロイヌナズナVTI1ファミリーの分子系統樹

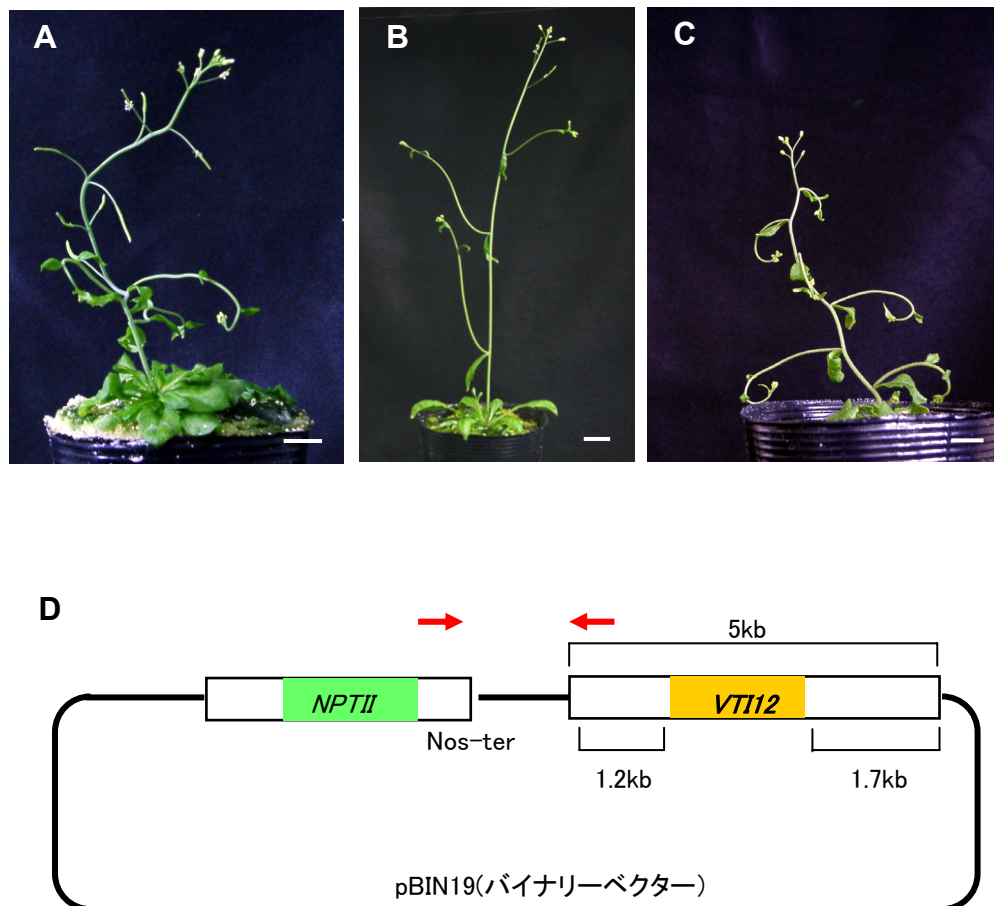


図13. *ZIP1*の相補性試験

(A) *zig-1* 変異体。(B) *VTI12<sup>zip1</sup>* ゲノム断片を形質導入した*zig-1* 変異体T1世代。(C) 野生型 *VTI12*ゲノム断片を形質導入した*zig-1* 変異体T1世代。スケールバーは 1cm。(D) 相補性試験のために構築したプラスミド。T1の全個体を用いて導入遺伝子がゲノム上に挿入されていることを赤い矢印の部分にプライマーを設定してPCRすることにより確認した。*NPTII*はカナマイシン耐性遺伝子、Nos-terは Nos-terminatorを表す。



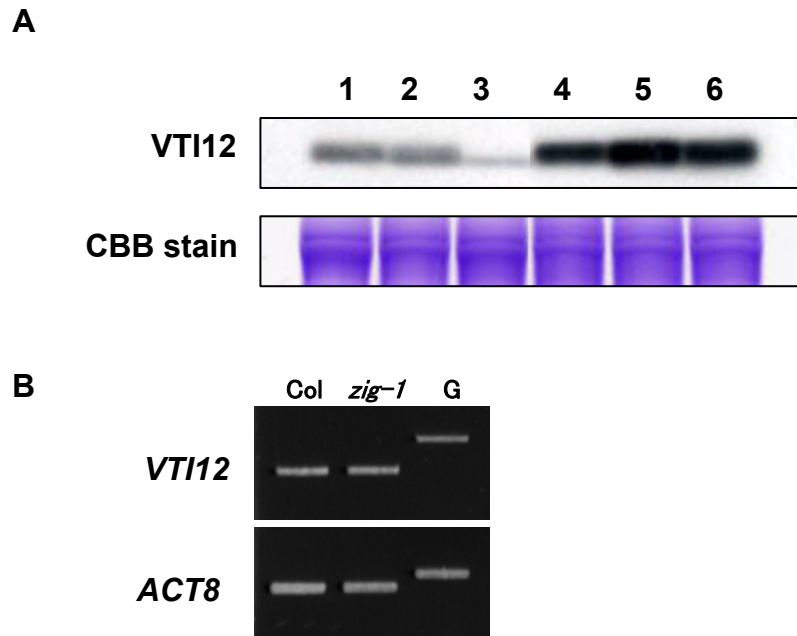


図14. VTI12<sup>ZIP1</sup>タンパク質の解析

(A) 抗VTI12抗体を用いたイムノブロット解析。レーン1; Col野生株、レーン2; *zip1*単独変異体、レーン3; *vti12* null変異体、レーン4; *zig-1* 変異体、レーン5; *zip1/+ zig-1/zig-1*、レーン6; *zip1/zip1 zig-1/zig-1*。CBB stainは各系統のトータルタンパク質の量が揃っていることを示す。

(B) RT-PCRによるCol野生株と*zig-1* 変異体との間の*VTI12*遺伝子の発現量の比較。コントロールとして*ACT8*遺伝子を用いた。

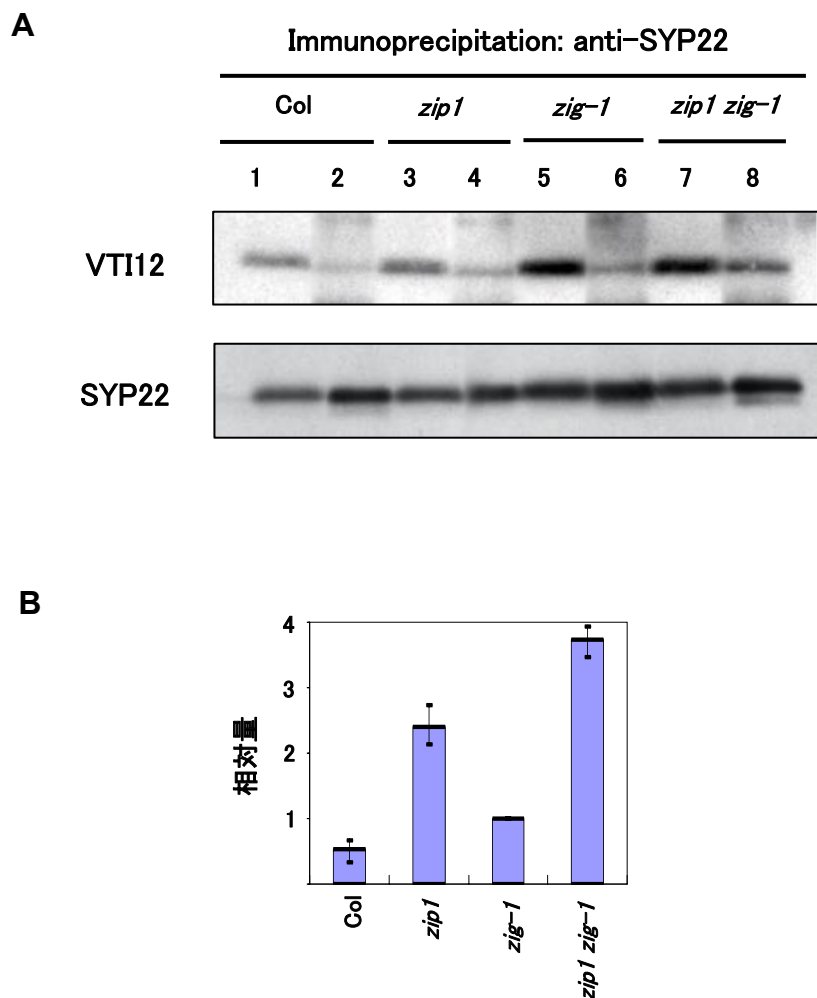
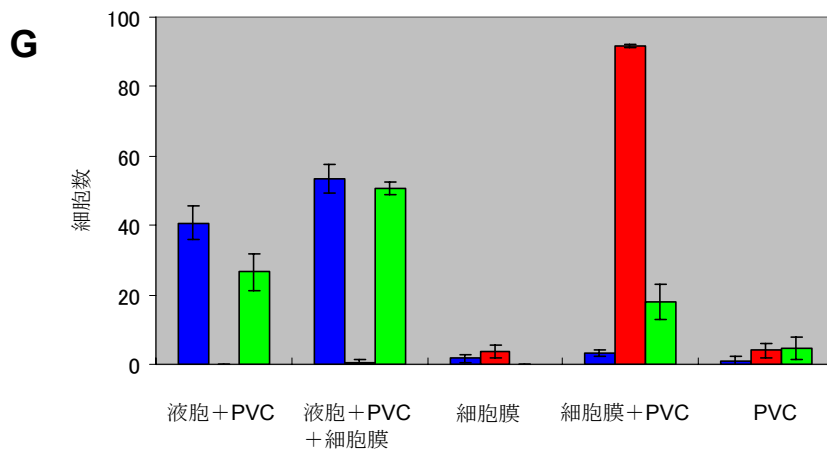
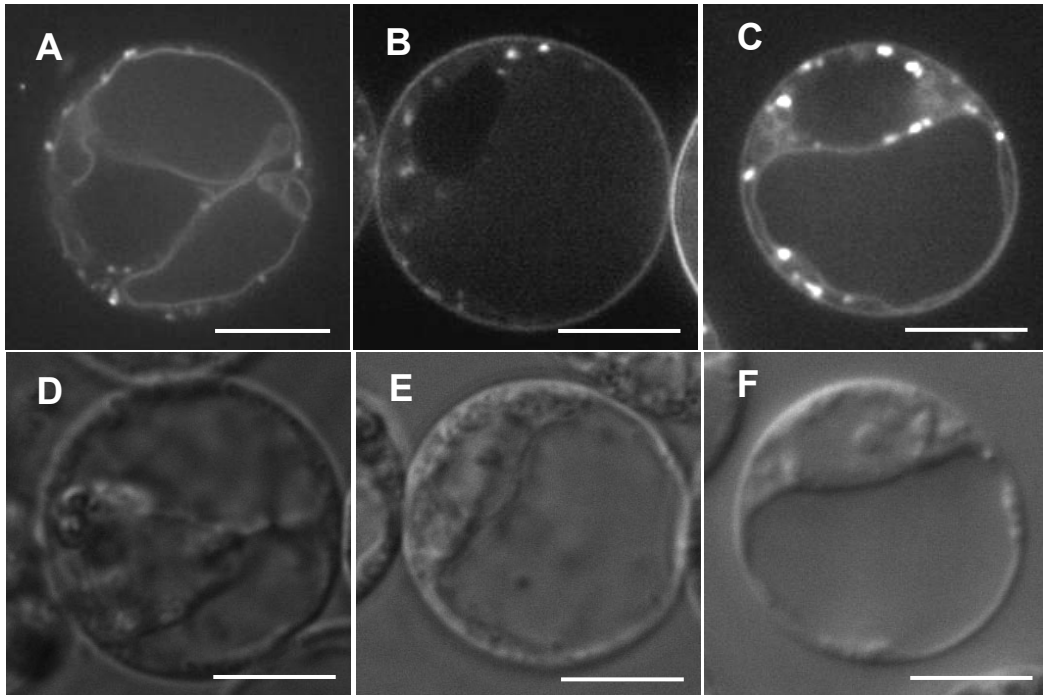


図15. 抗SYP22抗体を用いた共免疫沈降解析

(A) 抗SYP22抗体を用いた共免疫沈降解析。レーンの奇数番号 (1, 3, 5, 7) はトータルタンパク質、偶数番号 (2, 4, 6, 8) は免疫沈降画分を示す。各系統のタンパク質は抗VTI12抗体および抗SYP22抗体を用いたイムノブロットによって検出した。

(B) SYP22と共沈したVTI12タンパク質の量。それぞれの値はAで示した免疫沈降画分に含まれるVTI12をトータルタンパク質に含まれるVTI12で割った値である。*zig-1*における値を1とした相対値で示した。





参照データ 2. 培養細胞内におけるGFP-VTI12<sup>ZIP1</sup>タンパク質の細胞内局在解析（植村知博博士による）

(A) (D) GFP-ZIG/VTI11、(B) (E) GFP-VTI12、(C) (F) GFP-VTI12<sup>ZIP1</sup>。  
 (A)–(C) 共焦点レーザー走査顕微鏡像。(D)–(F) ノマルスキー微分干渉顕微鏡像。スケールバーは10 μm。

(G) 細胞内局在パターンの定量解析。青がGFP-ZIG/VTI11、赤がGFP-VTI12、緑がGFP-VTI12<sup>ZIP1</sup>を表す。GFP-ZIG/VTI11とGFP-VTI12<sup>ZIP1</sup>の局在パターンが類似している。エラーバーは標準誤差を示す。

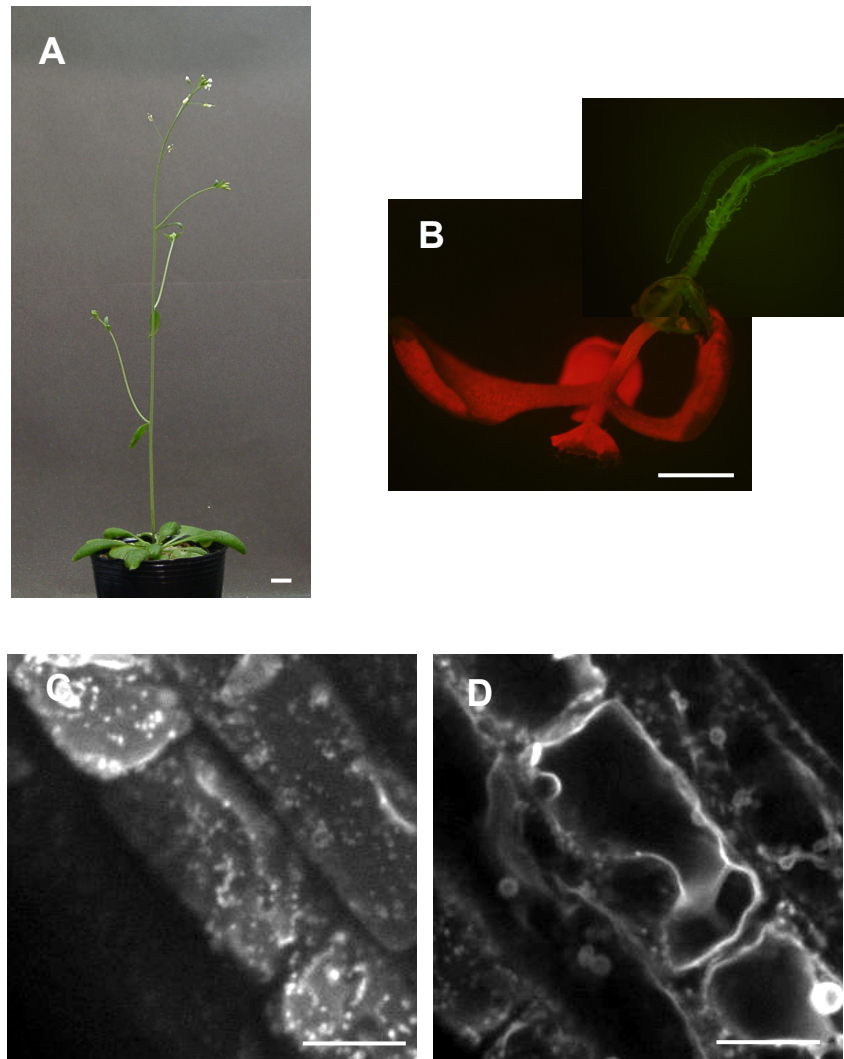


図16. 植物体内におけるGFP-ZIG/VTI11タンパク質の細胞内局在解析(1)

(A) *zig-1* 変異体にpVTI11::GFP-ZIG/VTI11を導入した形質転換植物体T2世代。スケールバーは1cm。 (B) *zig-1* 変異体にpVTI11::GFP-ZIG/VTI11を導入した形質転換植物体T1世代。胚軸と根においてGFPの蛍光シグナルが観察できた。子葉および本葉で赤く見えるのは葉緑体の自家蛍光である。スケールバーは5mm。 (C) (D) *zig-1* 変異体にpVTI11::GFP-ZIG/VTI11を導入した形質転換植物体T2世代の根の細胞におけるGFP-ZIGの共焦点レーザー走査顕微鏡像。(C) 焦点深度を浅く取った像。(D) 焦点深度を深く取った像。スケールバーは20  $\mu$ m。

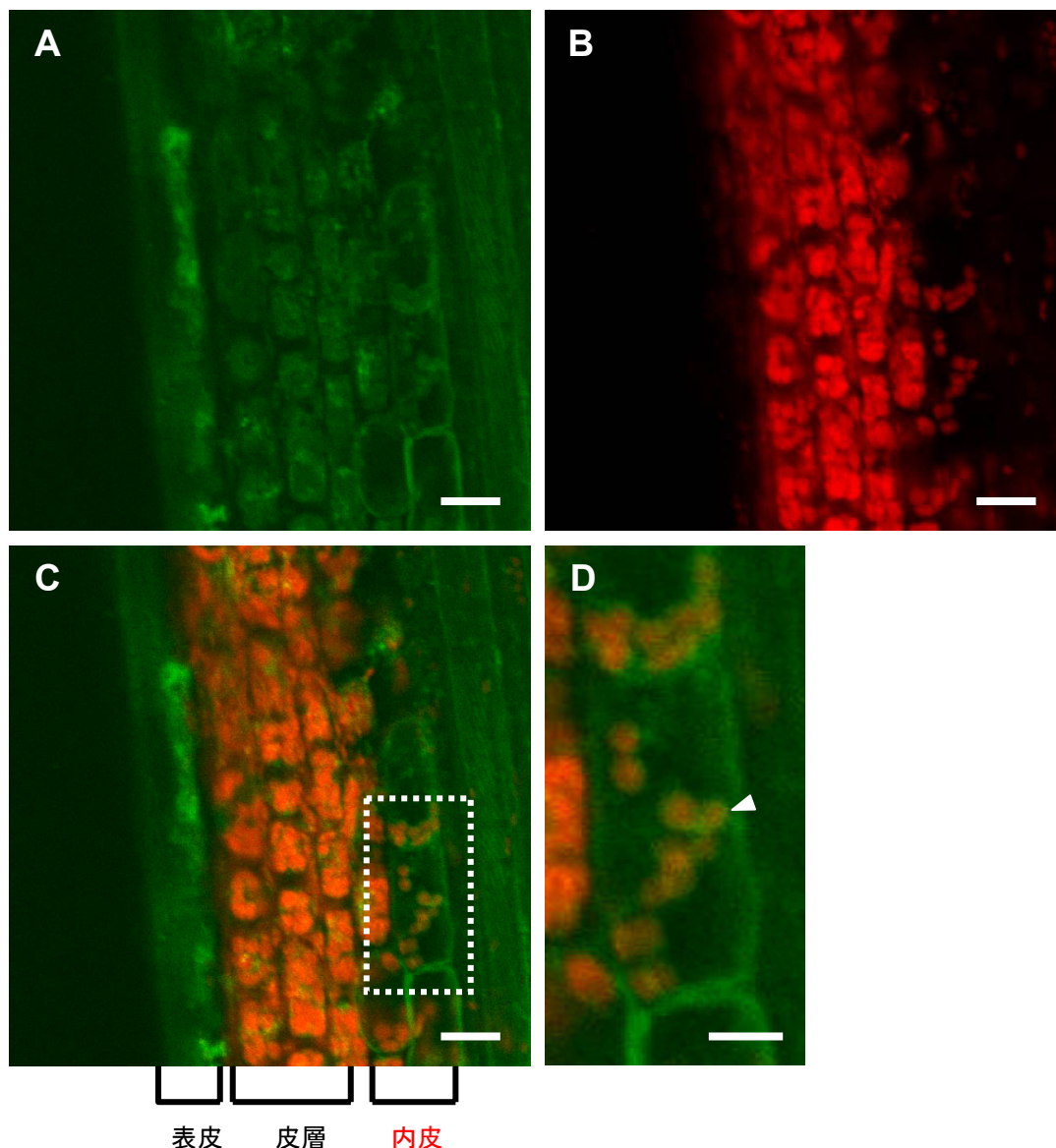


図17. 植物体内におけるGFP-ZIG/VTI11タンパク質の細胞内局在解析(2)

*zig-1* 変異体に  $pVTI11::GFP-ZIG/VTI11$  を導入した形質転換植物体T2世代の花茎縦断切片。(A) GFP-ZIGの蛍光シグナル。内皮細胞および表皮細胞の液胞膜にGFPの蛍光シグナルが確認できる。(B) 赤く見えるのは葉緑体の自家蛍光である。(C) (A)と(B)を重ね合わせた。(D) (C)の点線枠で囲った内皮細胞の拡大写真。デンプンを蓄積したアミロプラスト(赤く見える色素体。矢じりは1個のアミロプラストを示す)の周囲を液胞膜(緑)が取り囲んでいる様子がわかる。スケールバーは(A) - (C)が  $20\mu m$ 、(D)が  $10\mu m$ 。GFPの蛍光と葉緑体の自家蛍光はフォトマルチスキャナーを用いて分光した。



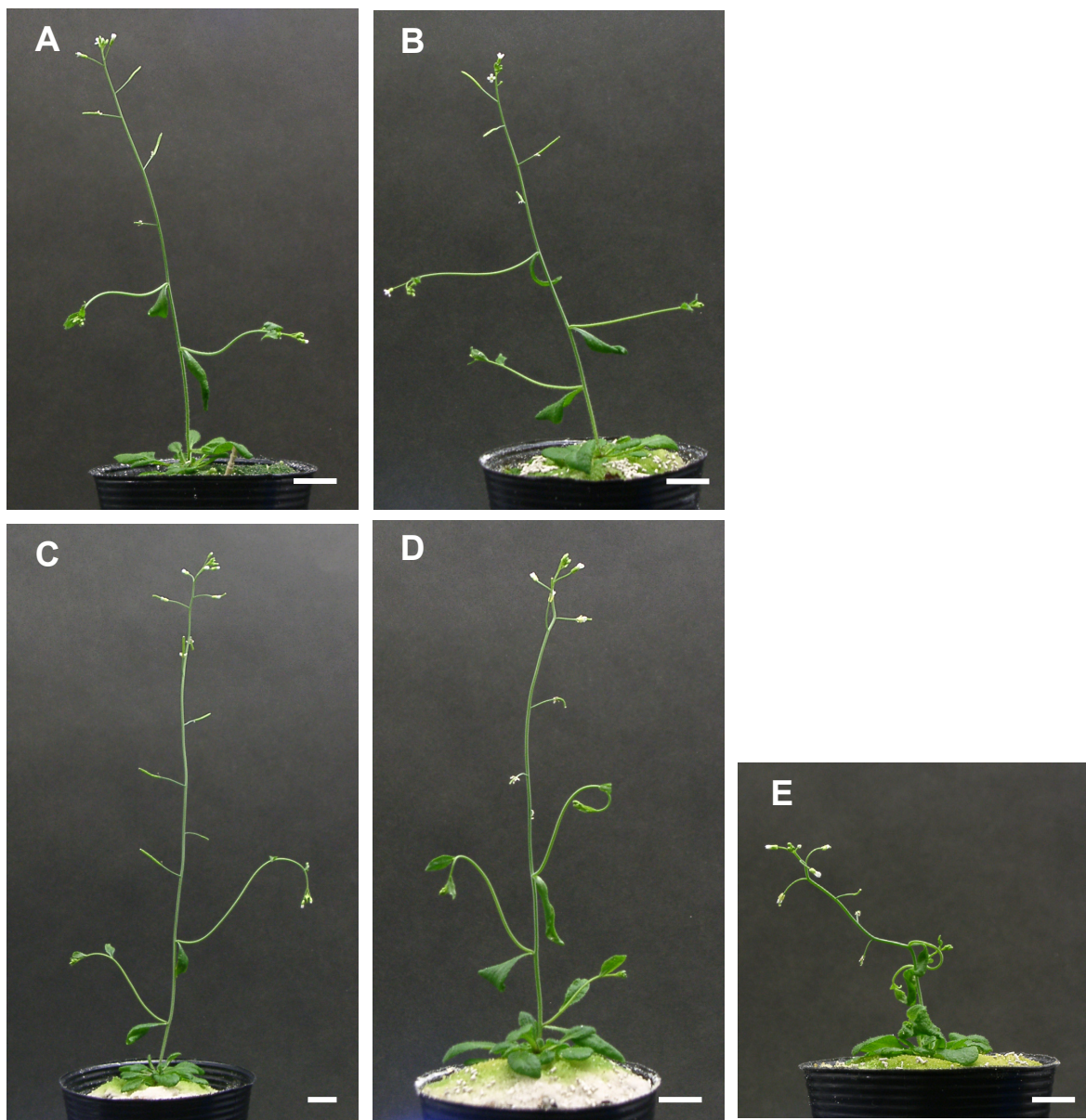


図18. *zip1 sgr3*二重変異体および*zip1 sgr3 zig-1*三重変異体

(A) *zip1/zip1 sgr3/sgr3*

(B) *zip1/+ sgr3/sgr3*

(C) *zip1/zip1 sgr3/sgr3 zig-1/zig-1*

(D) *zip1/+ sgr3/sgr3 zig-1/zig-1*

(E) *sgr3/sgr3 zig-1/zig-1*

発芽後6週間目。スケールバーは1cm。

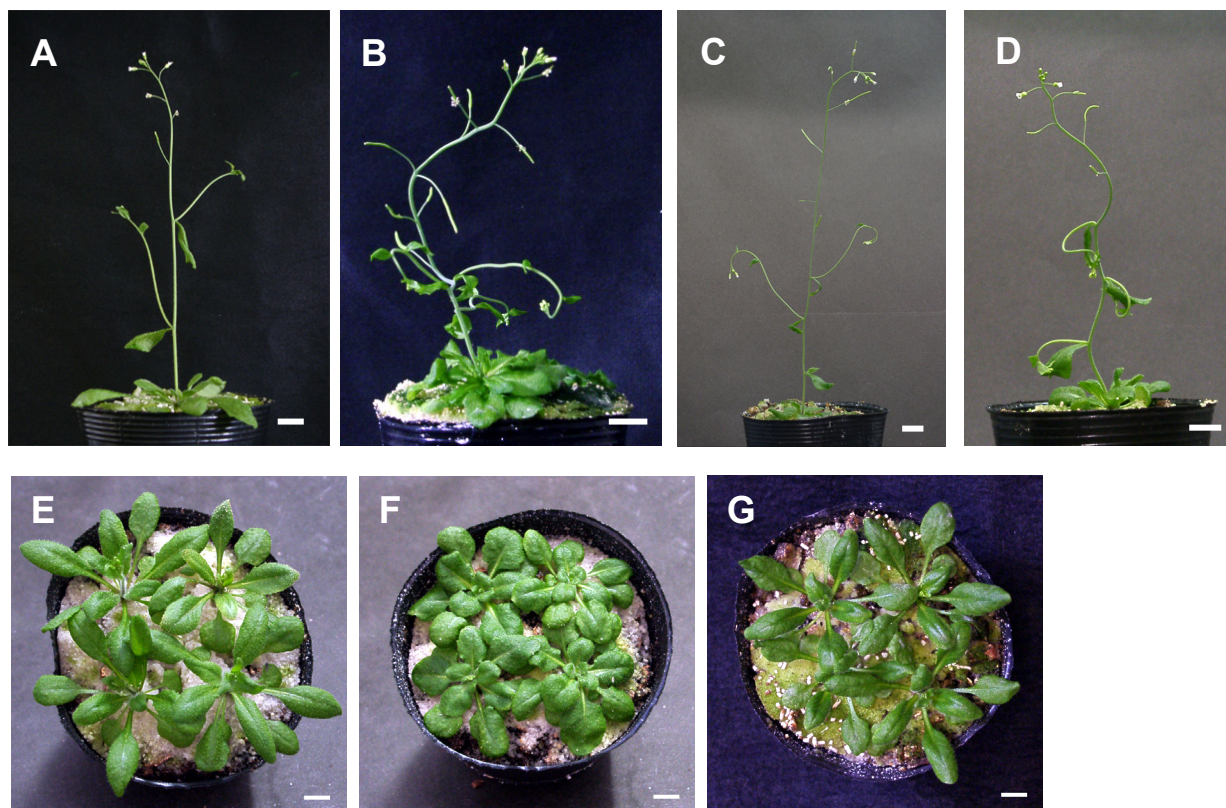


図19. *zip2 zig-1*二重変異体の地上部

(A) (E) Col野生株

(B) (F) *zig-1*変異体

(C) (G) *zip2/zip2 zig-1/zig-1*

(D) *zip2/+ zig-1/zig-1*

(A)–(D)は発芽後6週間目、(E)–(G)は発芽後3週間目のロゼット葉。スケールバーは1cm。

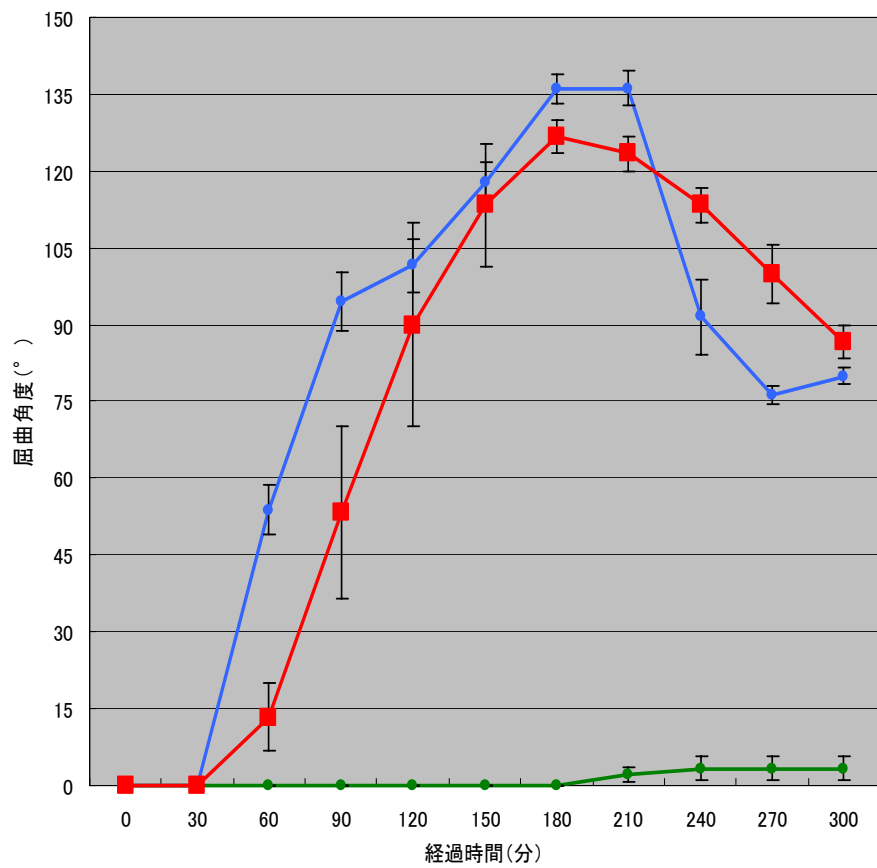
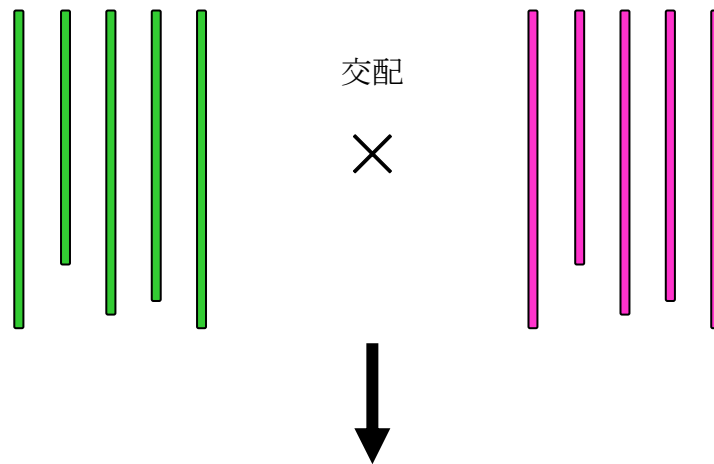


図20. *zip2 zig-1*二重変異体の花茎重力屈性反応

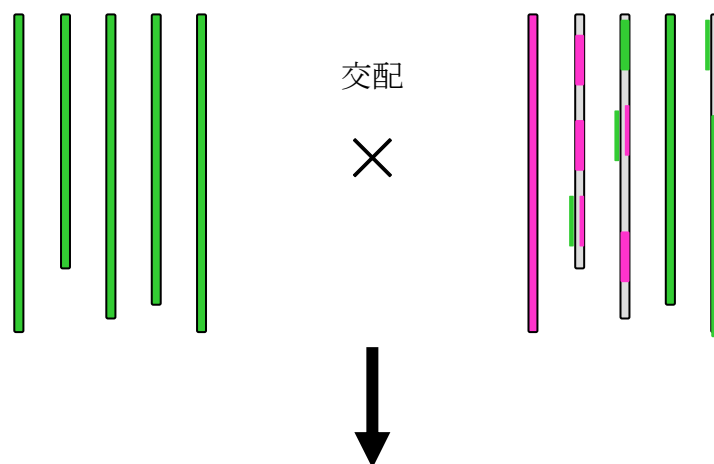
花茎の屈曲角度の経時的変化。鉢に植わった状態で暗黒条件下に水平方向に倒して30分おきに屈曲角度を測定した。各系統16個体供試し、屈曲角度の値は平均値で示している。エラーバーは標準誤差を示す。  
赤 ; *zip2 zig-1*、青 ; *Col*、緑 ; *zig-1*。

### A 通常のマッピング法



次世代に約50%の確率でCol由来とLer由来の染色体が持ち込まれるので、Ler内在性重力屈性回復因子の持込頻度も大きくなる。

### B 本研究で用いたマッピング上の工夫



交配に使用する個体にすでにCol由来の染色体が約50%含まれているので、この交配により得られる次世代にはCol由来とLer由来の染色体がそれぞれ約75%と25%になる。Ler由来の染色体の割合が減った分、重力屈性回復因子の持込頻度も小さくなると期待される。

図21. ZIP2遺伝子のマッピング法

緑；Col株に由来する染色体領域。桃；Ler株に由来する染色体領域。

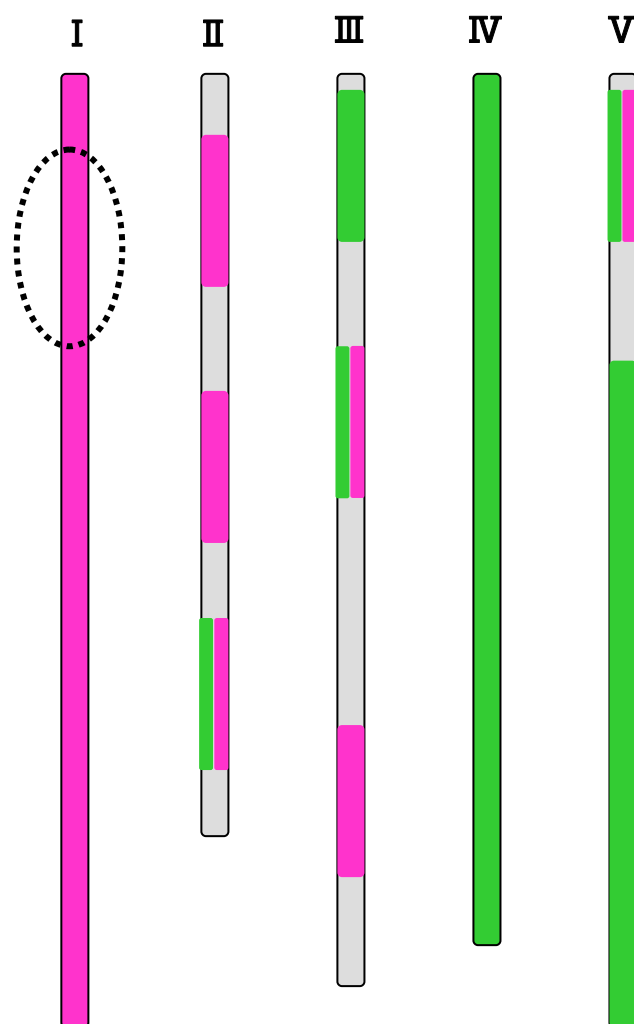


図22. *ZIP2*遺伝子のマッピングに使用したNiihama line 4

緑；Col株に由来する染色体領域。桃；*Ler*株に由来する染色体領域。  
ラフマッピングにより挟んだ1番染色体北（点線で囲った部分）は*Ler*  
ホモになっている。この系統は*zig-1*と*Ler*株を交配して得られたF2集  
団から多型マーカーを用いてここに示すような染色体構成を持つ系統  
を選抜した。



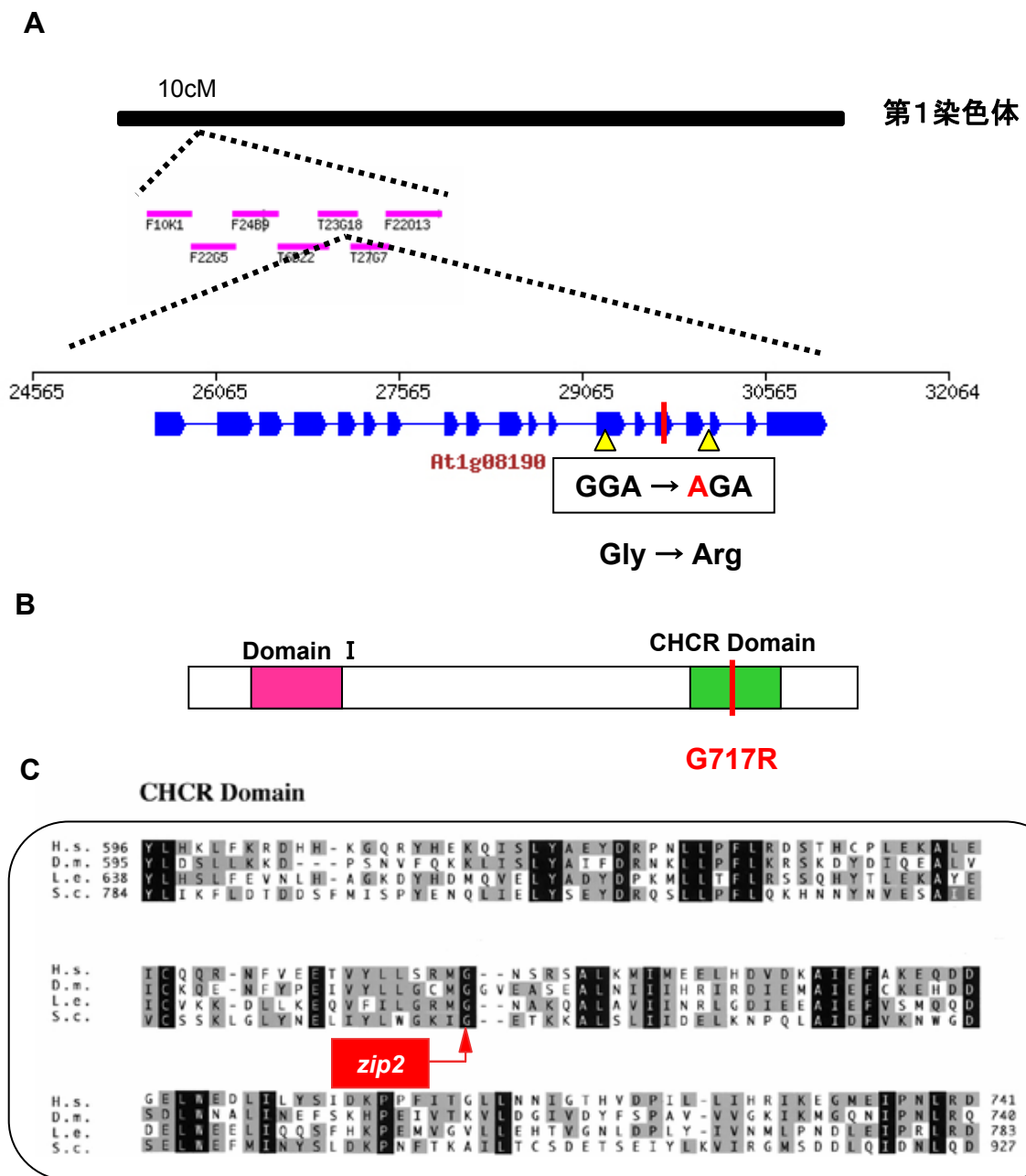


図23. ZIP2のマップベースドクローニング

(A) ZIP2のマッピング。赤い線はzip2変異により塩基置換が生じたと考えられる箇所。黄色い三角はSALK T-DNA挿入系統においてT-DNAが挿入されている箇所。(B) AtVPS41タンパク質の模式図。N末側に真核生物間で保存されたドメインIを、C末側にクラスリン重鎖リピート

(CHCR) ドメインを持つ。zip2変異によりCHCRドメイン内の717番目のグリシンがアルギニンに変化する。(C) AtVPS41ホモログのクラスリン重鎖リピート (CHCR) ドメインのアライメント。H. s. ; ヒト、D. s. ; キイロショウジョウバエ、L. e. ; トマト、S. c. ; 出芽酵母。変異が見出されたアミノ酸に印を入れている。

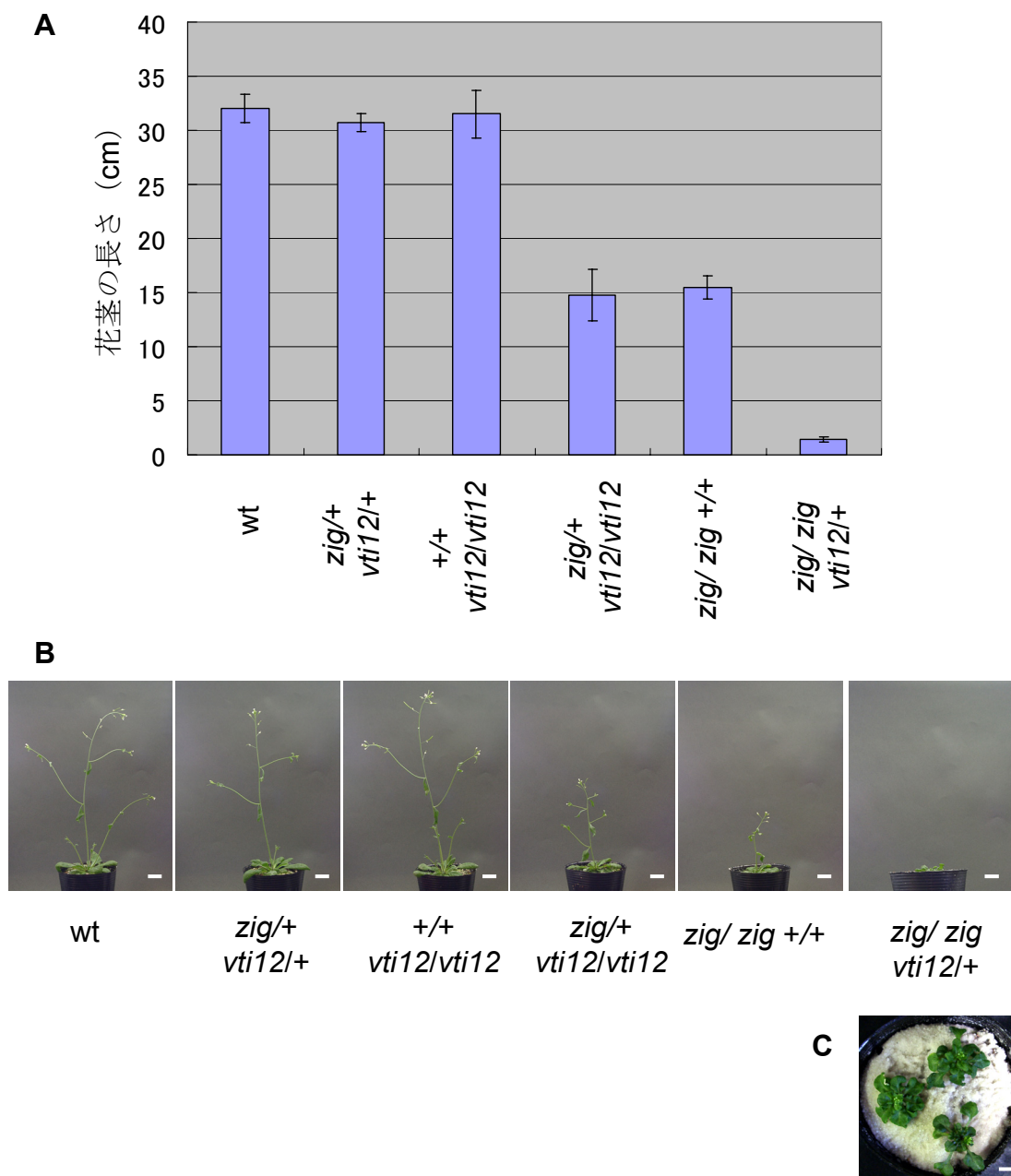


図24. ZIG/VTI11とVTI12の欠損が生育力に及ぼす影響

(A) 交配により作成した各遺伝子型を持つ植物体の播種後5週間における第一花茎の長さを記録した。花茎の長さは平均値で示し、エラーバーは標準誤差を示す。(B) (A)の時期の植物体の様子。スケールバーは3cm。(C) *zig/ zig vti12/+*の遺伝子型を持つ植物体を上方向から見た様子。スケールバーは1cm。

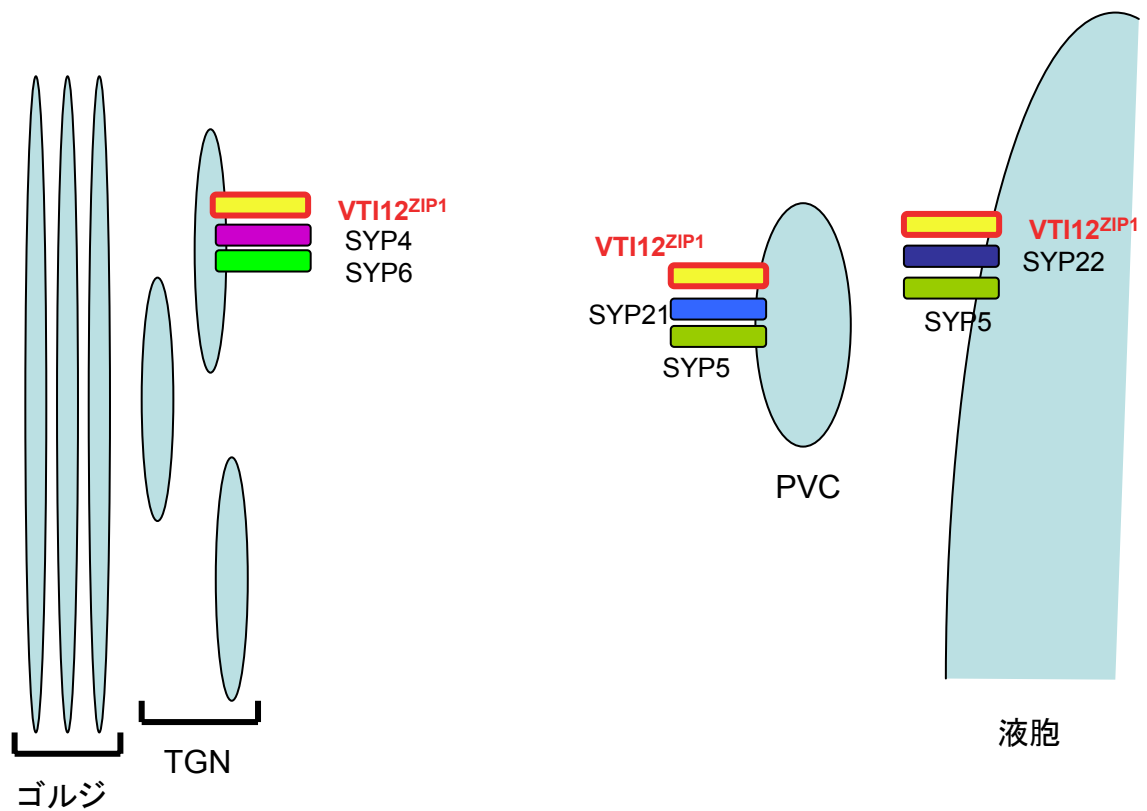


図25. *zip1*が*zig-1*の表現型を抑圧するメカニズムのモデル

ZIG/VTI11の欠損に由来する液胞への小胞輸送障害を、VTI12<sup>ZIP1</sup>がPVCや液胞でSYP22と機能的な複合体を形成することにより液胞の機能が回復して*zig-1*変異体が持つ重力屈性および形態の異常を相補したと考えられる。

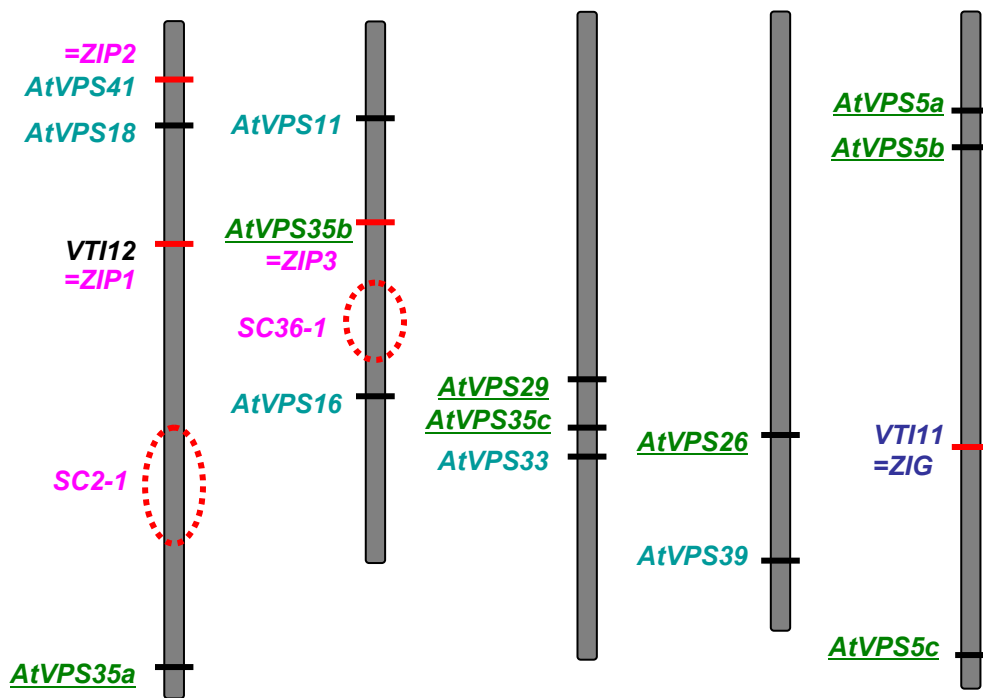


図26. シロイヌナズナゲノム上における*AtC-VPS*遺伝子とレトロマー遺伝子の位置

水色は*AtC-VPS*遺伝子、緑色はレトロマー遺伝子を示す。

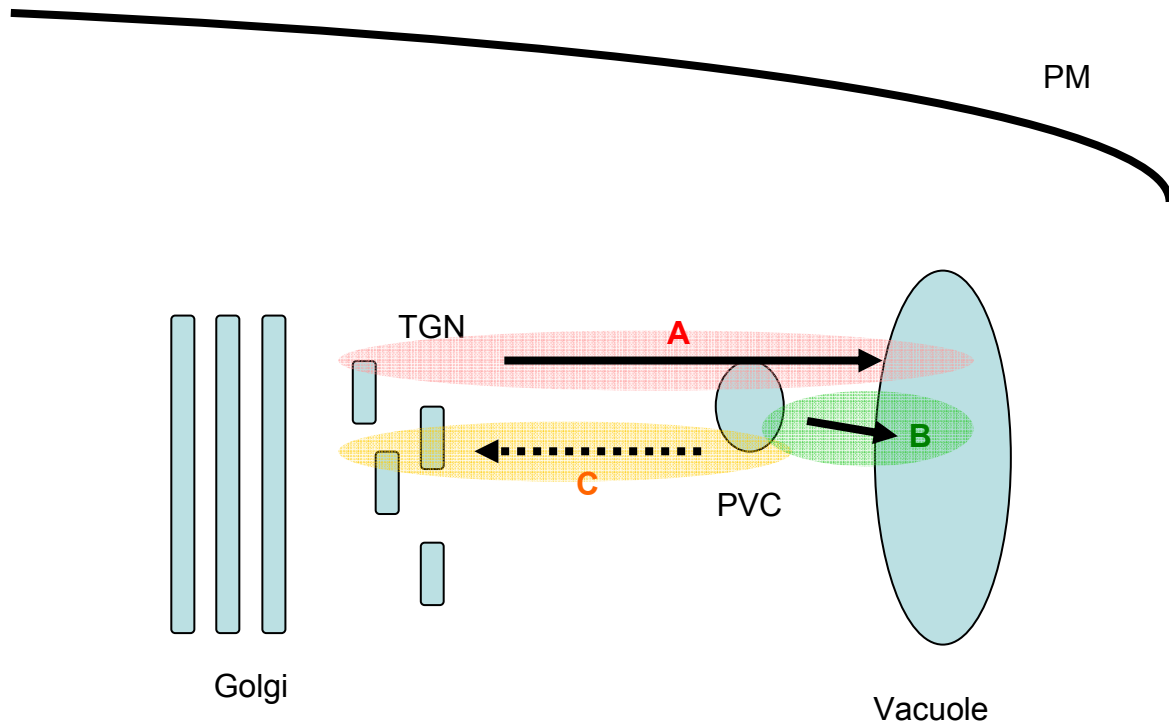


図27. *zig*のサプレッサー解析により今後解析が進むと期待されるポストゴルジ・ネットワーク

(A) VTI1ファミリーとSYP2ファミリーを中心としたゴルジから液胞への順行輸送経路。(B) HOPS複合体を中心とした液胞への繫留機構。

(C) レトロマー複合体を中心とした液胞からゴルジへの逆行輸送。

Golgi; ゴルジ体、TGN; トランスゴルジ網、PVC; 液胞前区画、vacuole; 液胞、PM; 細胞膜。