

Study on a novel *trans*-Golgi/TGN-localized protein family in *Arabidopsis thaliana*

トランス・ゴルジ/TGN に局在するシロイヌナズナの新規タンパク質ファミリーに関する研究

RZEPECKA Natalia Julia

本論文では、シロイヌナズナにおける機能未解明の新規タンパク質 AtGTLP1 (*Arabidopsis thaliana* GlycosylTransferase-Like Protein 1)、及び AtGTLP1 に高いアミノ酸配列類似性を示すシロイヌナズナの 4 種類のタンパク質を「AtGTLP ファミリー」という新規タンパク質ファミリーとして分析し、その機能解析と細胞内局在を解明することを主要な目的とした。

真核生物では、小胞体で合成されたタンパク質はゴルジ体へ運ばれ、糖鎖修飾を受けた後、ゴルジ体に近接する網目状のオルガネラである TGN (*trans*-Golgi network) で選別され、細胞外への分泌や、液胞やリソソームといった最終目的地に向けて輸送される。そのため、TGN は細胞内のタンパク質輸送において重要な分岐点であると考えられている。積み荷タンパク質を輸送する小胞が目的地であるオルガネラに到着し、両者の膜が融合することにより、初めて積み荷タンパク質の目的オルガネラへの受け渡しが可能になるため、細胞内の膜交通において輸送小胞と標的オルガネラ膜の融合が必須であり、そのプロセスが SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptors) タンパク質ファミリーのメンバーによって制御されている。シロイヌナズナの SNARE を用いた網羅的なインタラクトームの研究 (Fujiwara et al. 2014) から、TGN に局在する SNARE タンパク質、SYP43 (SYntaxin of Plants 43) には、At2g04280 新規タンパク質が相互作用する可能性があることが明らかになったが、本研究では、At2g04280 に注目し、その機能の解明を試みた。

AtGTLP1 に類似しているタンパク質を探し、シロイヌナズナのゲノムの調査を行った結果、4 種類のタンパク質 (AtGTLP2-5) が AtGTLP1 に非常に高いアミノ酸配列類似性を示すことが判明した。AlphaFold2 を用いて予測した AtGTLP ファミリーの立体構造を二つの分岐群からなる AtGTLP ファミリーの系統樹に照らし合わせた結果、分岐群①と分岐群②に属するタンパク質は立体構造が異なることが判明し、AtGTLP ファミリーが性質の異なる 2 つのサブファミリーに分けられると考えられる。その一方で、Phyre² や DeepTMHMM 等を用いて *in silico* で AtGTLP ファミリーのメンバーのアミノ酸配列解析を行ったが、全てのメンバーには立体構造の共通点が見られ、各メンバーのアミノ酸配列の N 末端領域には膜貫通ヘリックスが存在し、C 末端領域には酵素活性を持つと推定されるドメインが存在することが明らかになった。また、その C 末端のドメインの立体構造は、タンパク質の糖鎖修飾を行う α -フコシルトランスフェラーゼ酵素ファミリーのドメインとよく似ている「 α -FuT-like」ドメインであることから、AtGTLP ファミリーはシロイヌナズナにおける新規フコシルトランスフェラーゼファミリーであると予測される。

AtGTLP ファミリーの細胞内局在の観察を行うため、各メンバーの C-末端に GFP、または RFP 蛍光タンパク質を融合したコンストラクトを作製し、細胞内局在観察用の形質転換システムを作出した後、オルガネラマーカーシステムとの人工交配を行った。F1 世代で得られた 2 重可視化システムの共焦点レーザー顕微鏡による観察を行い、得られたデータから AtGTLP ファミリーのメンバーは *trans*-Golgi のマーカーである ST とよく共局在すると同時に TGN のマーカーである SYP61、VHAa1、SYP43 とも部分的に共局在すると考えられている。その一方で、AtGTLP ファミリーの可視化システムの人工交配を行った結果、AtGTLP 同士の共局在がほとんど見られなかったため、AtGTLP ファミリーの各メンバーが *trans*-Golgi/TGN 内の特異的な領

域に局在すると思われる。

また、通常条件下で生育させた *atgtlp1*、*atgtlp2*、*atgtlp3*、*atgtlp5* の機能喪失単独変異体及び、*atgtlp1atgtlp2atgtlp3atgtlp5* の 4 重機能喪失変異体系統の表現型は、野生型の表現型との著しい差が見られなかったが、野生型の雌しべに *AtGTLP4*(+/-)ヘテロ接合体の花粉を受粉させ、得られた F1 世代で *atgtlp(-)* 変異を受け継いだ個体は見つからなかったことから、*AtGTLP4* タンパク質が機能しない *atgtlp(-)* 雄性配偶体は機能不全であることが判明した。*In vitro* で *atgtlp4(-)* の変異体花粉の表現型観察を行ったが、発芽直後の破裂や花粉管の変形などの異常が見られ、その結果によって *AtGTLP4* タンパク質が機能しない花粉管は正常に伸長できないことが示唆された。また、*AtGTLP4-GFP* の人工遺伝子が導入された *atgtlp4(-/-);AtGTLP4-GFP* 系統では、変異体花粉管の表現型が回復することも示された。以上の実験結果を踏まえ、*AtGTLP4* が「**POTI (POLLEN TUBE INTEGRITY/花粉管の完全性)**」と改名された。

POTI 遺伝子内における変異に引き起こされた花粉管の機能不全にかかわらず、スクリーニングされた個体数を増やした結果、*poti(-/-)* 変異体のホモ接合体の存在が確認され、*POTI* 遺伝子内における変異は完全には致死的ではなくことが判明した。*POTI*(+/-)の自家受粉の場合、*poti(-/-)* 個体の出現率がわずか 0.26%であるが、*poti(-/-)* の個体が成長せず、数週間で死んでしまうことから、*POTI* タンパク質は花粉管のみならず、他の組織でも重要な役割を果たしていると考えられる。