

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22120006

研究課題名(和文)環境感覚を支える植物液胞動態とその適応機構

研究課題名(英文)Role of plant vacuoles as environmental perception systems.

研究代表者

三村 徹郎(Mimura, Tetsuro)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20174120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 93,200,000円

研究成果の概要(和文)：温度、必須栄養素のリン酸、病虫害応答において、細胞膜、単膜系オルガネラ、構成タンパク質、代謝物質や無機イオン類が、これらの外部環境の変化に対して変動する分子機構を解析した。1. セントポーリアの葉で温度低下時に生じる柵状細胞の傷害が、機械感受性イオンチャンネルによるCa²⁺の流入と、それによる液胞膜の崩壊が原因であることを明らかにした。2. シロイヌナズナ根の異なるリン濃度での応答過程の解析を行った。ポプラが落葉時に枝にリン回収物質としてフィチン酸を貯めることを明らかにした。3. 病虫害応答に働くミロシン細胞の分化過程と、光や重力応答にアクチン・ミオシン系が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Changes in organelle situation and cellular components under various environmental conditions (Temperature, Nutritional conditions, Pests and disease resistance etc.) were molecular- and cell-biologically investigated. 1. We found that low temperature damage in Saintpaulia leaf palisade cells is caused by degradation of vacuoles induced by the influx of extracellular Ca²⁺ through mechano-sensitive ion channels. 2. Gene expression patterns under various phosphate conditions in Arabidopsis plants were analyzed. We also found that poplar trees stored phosphorus as phytic acid in twigs during winter. 3. Transcriptional factor for differentiation into myrosin cells were found and we also found an involvement of actin-myosin system into photo and gravitropisms.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：液胞 小胞輸送 リン酸 温度障害 セントポーリア シロイヌナズナ ミロシン細胞 ポプラ

1. 研究開始当初の背景

細胞内環境の維持と変動は、無機イオン・代謝物質やタンパク質の濃度・分布として、細胞内で生じるあらゆる生理機能の基盤的要素である。植物は、オルガネラや細胞の機能・形態を様々に分化させることで、外部環境の変化に柔軟に適応しているが、この環境適応能を理解するためには、細胞内環境が外部環境の変化に応じてどのように制御されているかを知ることが必要不可欠である。

外部環境の変化が誘導する遺伝子発現変化については、多彩な研究が進められていた。また、多くの変異体の解析から、外部環境変動に伴い、遺伝子発現を調節する転写因子や、細胞内情報伝達系としてのタンパク質リン酸化過程などが明らかとなりつつある。一方で、それらの遺伝子産物や分子群、あるいはその基質となる低分子が、実際の細胞内でどのように分布し機能しているかという知見については未知の部分が多く、生理機能に応じたダイナミックな変動の解析は始まったばかりであった。

研究代表者の三村は、低分子の細胞内分布を実際に測定する研究を進めることで、細胞内低分子は、これまで信じられてきたように単に細胞内を拡散するだけでなく、細胞内の小胞系に取り込まれることで、ダイナミックな動態変化を起こすことを明らかにしてきた(図1)。さらに、液胞機能の分子の実体を明らかにするために、液胞で働くタンパク質や低分

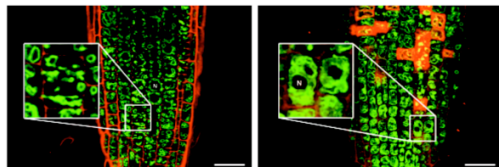


図1. 塩処理時のシロイヌナズナ根細胞内の液胞構造(GFP)のダイナミックな変化。左:コントロール、右:塩処理時

子の網羅的解析を進めている。

連携研究者の西村は、外部環境の変化に基づき新規オルガネラの形成、あるいは既存/新規オルガネラへのタンパク質輸送など、細胞内小胞輸送系が、植物細胞の環境感覚維持に重要であることを分子レベルで明らかにしてきた。

本研究では、細胞内低分子環境の維持に重要なオルガネラのダイナミックな変化が、植物の環境感覚の中でどのように機能しているかを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、温度、塩ストレス時の水・イオン環境、必須栄養素のリン酸への応答、さらに生物環境としての病原体や共生微生物に着目し、細胞膜、および小胞

体から液胞につながる単膜系オルガネラの構成要素である膜構造、構成タンパク質、あるいは低分子量代謝物質や無機イオン類が、遺伝子発現等と共に、これらの外部環境の変化に対してどのように変動するかを明らかにし、その分子機構を解析することを目的とする。実験材料として、特に温度変化に対しては、特殊な生理反応を示すセントポーリアを利用する。またその他の環境応答については、シロイヌナズナ植物体と培養細胞、あるいは樹木のモデル植物として知られるポプラを用い、野生株の他に、これまでに知られている液胞、小胞輸送系変異体と、構成成分分析を組み合わせることで、細胞内環境維持機構の実態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 陸上植物の急激な温度変化に対する単膜系応答機構の解析

セントポーリア (*Saintpaulia sp.*) の葉では、葉温が急激に低下すると柵状細胞が死に至ることが知られている。この温度感知と細胞死の機構について、蛍光顕微鏡観察、細胞単離、薬理学的手法、遺伝子発現を用いて分子過程を解析した。

(2) 植物のリン環境認識機構の解析

栄養塩として植物が利用できるリン酸は、土壤中の濃度が低い。植物が、生育する際に遭遇する様々なリン環境の認知機構を、シロイヌナズナの根系構築や遺伝子応答、またポプラ落葉過程のリン代謝やリン動態から解析した。

(3) 質量顕微鏡を用いた植物細胞代謝物質の二次元分布の解析

ニチニチソウ、シロイヌナズナを用いて生体物質の局在解析を、高橋勝利計画班の質量顕微鏡を用いて行った。

(4) 病虫害および光・重力環境に対する細胞応答の解析(西村グループ)

病虫害応答に関与するミロシン細胞の分化過程に働く遺伝子解析を進めた。また、アクチン・ミオシン XI 細胞骨格系が光や重力に対する器官の屈曲応答においてどのように機能するかを見いだした。

4. 研究成果

(1) 陸上植物の急激な温度変化に対する単膜系応答機構の解析

セントポーリアの葉では、葉温が急激に低下すると柵状組織の液胞膜が崩壊して酸性の液胞内容物が漏出し細胞死に至るという傷害メカニズムを見出し、この現象には機械感受性 Ca^{2+} チャンネルが関与することを、薬理学的解析から明らかにした。植物の持つ機械感受性 Ca^{2+} チャンネルとして MCA チャンネルに着目し、柵状組織でその発現レベルが高いことを見いだした(図2、図3、表1)。

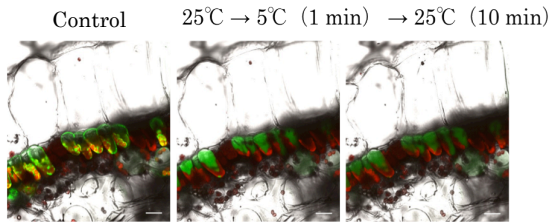


図 2. セントポーリア温度障害による液胞崩壊を、pH 蛍光指示薬 BCECF の分布変化から明らかにする系を開発した。

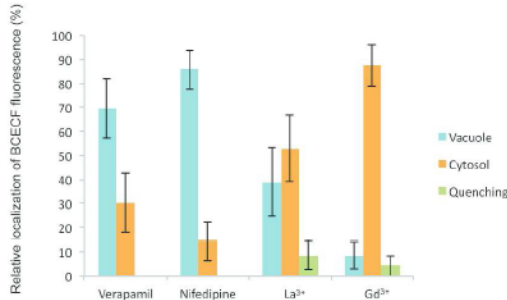


図 3: Ca²⁺チャンネル阻害剤によるセントポーリア温度障害の阻害。La³⁺と Gd³⁺が阻害する。

Tissue	ΔCt MCA-like - Actin	$\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct - \Delta Ct$ Whole tissue	MCA-like expression Relative to Whole tissue
Whole tissue	7.35±1.80	0.00	1.0
Palisade tissue	3.46±1.64	-3.89	14.8
Spongy tissue	7.78±1.71	0.432	0.7

表 1: 各組織における MCA チャンネルの発現量。柵状組織で発現量が高い。

(2) 植物のリン環境認識機構の解析

シロイヌナズナを低リン環境で育て、培地のリン濃度を上昇させた時に、最も早く応答する遺伝子群の解析を行い、その中から BT 遺伝子群を見いだした。この BT 遺伝子群はリンのみならず、窒素、炭素など様々な栄養塩応答のハブ遺伝子として働く可能性が見いだされてきている。

またモデル樹木であるポプラを用いて、落葉時のリン回収とリン蓄積機構を明らかにすることに成功した。回収されたリンは枝の柔細胞液胞内に、イノシトール 6 リン酸として蓄積されることを明らかにした (図 4)。

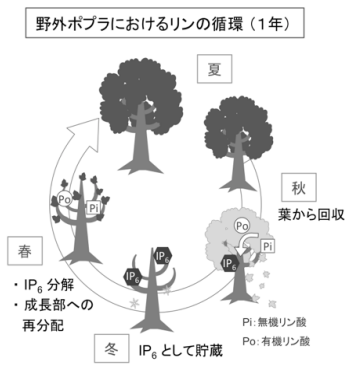


図 4. ポプラで見いだした落葉時のリン回収と冬期の蓄積機構

(3) 質量顕微鏡を用いた植物細胞代謝物質の二次元分布の解析

高橋勝利班の開発した質量顕微鏡と理研升島研究室の開発した単一細胞メタボローム解析手法を用いて、ニチニチソウ茎組織の細胞横断型の二次代謝過程におけるテルペノイドインドールアルカロイドの細胞別分布を明らかにした (図 5)。

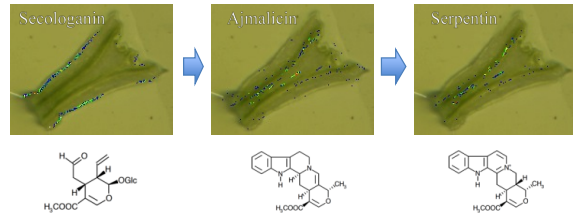


図 5. 質量顕微鏡で明らかにされた、二次代謝物質の細胞間移動。

また、同じ質量顕微鏡を用いてシロイヌナズナ根組織の代謝物質分布を明らかにすることも成功した (図 6)。さらにオーキシンによりこれらの物質分布がどのように変動するかを明らかにした。

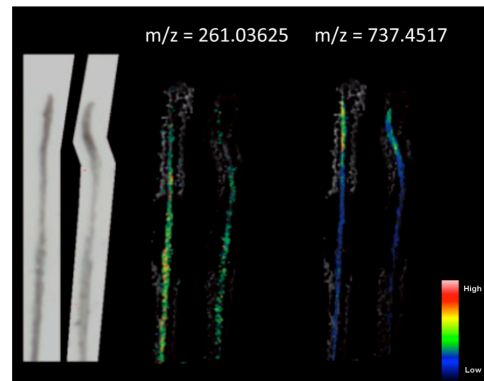


図 6. シロイヌナズナ根組織の質量顕微鏡像。ここでは、Positive mode で測定された m/z = 261.03625 と m/z = 737.4517 の分布状態を示す。

(4) 病虫害および光・重力環境に対する細胞応答の解析 (西村グループ)

病虫害防御に働くと考えられるミロシン細胞の分化に気孔分化に働くことが知られている転写因子 FAMA が働いていることを明らかにした (図 7)。

また、アクチン・ミオシン XI 細胞骨格系が光や重力に対する器官の屈曲応答における

図 7. TGG2 はミロシン細胞マーカー遺伝子。FAMA はミロシン細胞の分化のマスター遺伝子として働く。

る負の制御系として働くことを見いだした(図8)。

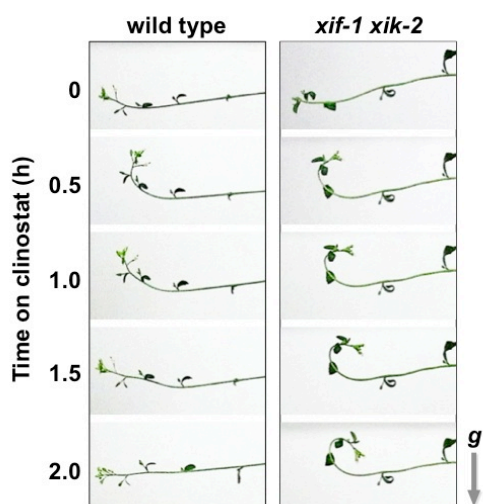


図8: 野生型シロイヌナズナとミオシン変異体。45分間倒して重力刺激を与えた後、暗所でクリノスタット実験に供した。擬似的微重力環境下では、野生型はまっすぐ下に伸びるが、変異体は曲がり続ける。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

ここでは、研究代表者である三村の業績のみを記してある。

[雑誌論文] (計 36 件)

- 1) Yamamoto K, Takahashi K, Mizuno H, Anegawa A, Ishizaki K, Fukaki H, Ohnishi M, Yamazaki M, Masujima T, Mimura T (2016) Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and Single cell MS. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 113(14): 3891-3896.
- 2) Anegawa A, Ohnishi M, Takagi D, Miyake C, Shichijo C, Ishizaki K, Fukaki H, Mimura T (2015) Altered Levels of Primary Metabolites in Response to Exogenous Indole-3-Acetic Acid in Wild Type and Auxin Signaling Mutants of *Arabidopsis thaliana*: A Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Analysis. *Plant Biotechnology* 32:65-79.
- 3) Ohnishi M, Kadohama N, Suzuki Y, Kajiyama T, Ishizaki K, Fukaki H, Iida, H, Kambara H, Mimura T (2015) Involvement of Ca^{2+} in vacuole degradation caused by a rapid temperature decrease in *Saintpaulia* palisade cells: A case of gene expression analysis in a specialized small tissue. *Plant and Cell Physiology* 56(7):1297-1305.
- 4) Takahashi K, *Kozuka T, *Anegawa A, Nagatani A, Mimura T (2015) Development and application of high resolution imaging mass spectrometer for the study of plant tissues. *Plant and Cell Physiology* 56(7):1329-1338.
- 5) Kurita Y, Baba K, Ohnishi M, Anegawa A,

Shichijo C, Kosuge K, Fukaki H, Mimura T (2014) Establishment of a shortened annual cycle system; a tool for the analysis of annual re-translocation of phosphorus in the deciduous woody plant (*Populus alba* L.). *Journal of Plant Research* 127(4):545-551.

- 6) Kosuge K, Iida S, Katou K, Mimura T (2013) Circumnutation on the water surface: female flowers of *Vallisneria*. *Scientific Report*, 3: 1133
- 7) Kadohama N, Goh T, Ohnishi M, Fukaki H, Mimura T, Suzuki Y (2013) Sudden collapse of vacuoles in *Saintpaulia* sp. palisade cells induced by a rapid temperature decrease. *PLoS One* 8(2): e57259.
- 8) Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, Sakaguchi S, Sakamoto W, Shimmen T, Fukaki H, Reid RJ, Furukawa A, Mimura T (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant, Cell & Environment*, 36:1826-1837.
- 9) Yoshida K, Ohnishi M, Fukao Y, Okazaki Y, Fujiwara M, Song C, Nakanishi Y, Saito K, Shimmen T, Suzaki T, Hayashi F, Fukaki H, Maeshima M, Mimura T (2013) Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from *Arabidopsis* suspension-cultured cells: Local distribution of vacuolar membrane proteins. *Plant & Cell Physiology*, 54(10):1571-1584.

[学会発表] (計 156 件 (国内 130 件、国際 26 件))

- 1) Mimura T¹, Kurita Y¹, Kanno S¹, Ohnishi M¹, Anegawa A¹, Okada K¹, Masuda Y¹, Fukaki H¹, Baba K² (¹Kobe University, ²Kyoto University), “Phosphate status in plant life”, SPIRITS Kyoto-Zurich Plant Workshop, “Analyzing Plants in Complex Environments”, December 22-23, 2014, (京都大学 (京都府))
- 2) 三村徹郎¹, 姉川彩¹, 山本浩太郎¹, 大西美輪¹, 深城英弘¹, 山崎真巳², 高橋勝利³ (¹神戸大院・理・生物, ²千葉大院・薬学, ³産総研・計算フロンティア) 「質量顕微鏡による植物代謝産物の分布解析」 ((一社) 日本植物生理学会第55回年会 (富山大学 (富山県)、2014年3月18日-20日) シンポジウム (植物環境感覚研究の新しい地平を切り拓く新技術) 招待講演
- 3) Ohnishi M^{1,2}, Anegawa A^{1,2}, Sasaki R^{2,3}, Sugiyama Y^{2,4}, Yamazaki M^{2,5}, Aoki K^{2,3,6}, Shichijo C^{1,2}, Fukaki H^{1,2}, Mimura T^{1,2} (Kobe University, ²JST・CREST, ³Kazusa DNA Research Institute, ⁴University of Hyogo, ⁵Chiba University, ⁶Osaka Prefecture University) “Post-genome analyses of plant intact vacuoles.” New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences, Sep. 27-28, 2012, (東京大学 (東京都))
- 4) Kadohama N¹, Ohnishi M¹, Goh T¹, Anegawa A¹, Shichijo C¹, Fukaki H¹, Suzuki Y², Mimura

T¹ (1 Kobe University, 2 Kanagawa University)
“Mechanism of cell injury induced by a rapid
temperature decrease in Saintpaulia leaf” The
1st International Symposium on Plant
Environmental Sensing, March 19-21, 2012,
(東大寺総合文化センター (奈良県))

- 5) Mimura T (Kobe University, Graduate School
of Science, JST CREST, Japan), Hirai M
(Riken, Plant Science Center, JST CREST,
Japan), Yanagisawa S (The University of
Tokyo, Graduate School of Agricultural and
Life Sciences, JST, Japan) “Metabolome
researches in plant metabolic regulation” 21st
International Conference on Arabidopsis
Research (June 6 – 10, 2010), (パシフィコ横
浜 (神奈川県)), (Invited Oral)

[図書] (計 1 件)

- 1) 三村徹郎・川井浩史 編著 (2014) 「光合
成生物の進化と生命科学」、培風館、総ペー
ジ数：194
2) Stephen Blackmore (著), 世界で一番美しい植
物細胞図鑑 (Green Universe) 三村徹郎 (監修),
武井摩利 (翻訳) (2015) 256ページ、創元社

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村 徹郎 (Mimura Tetsuro)
神戸大学大学院・理学研究科・教授
研究者番号：20174120

(2) 連携研究者

- ・西村いくこ
京都大学大学院・理学研究科・教授
研究者番号：00241232
- ・深城英弘
神戸大学大学院・理学研究科・教授
研究者番号：80324979
- ・七條千津子
神戸大学大学院・理学研究科・助教
研究者番号：70226132
- ・山崎真巳
千葉大学大学院・薬学研究院・准教授
研究者番号：70222370

研究協力者 (敬称略)

【神戸大学】

大西美輪 (Ohnishi Miwa)
姉川彩 (Anegawa Aya)
吉田勝久 (Yoshida Katsuhisa)
菅野里美 (Kanno Satomi)
石崎公庸 (Ishizaki Kimitsune)
小菅桂子 (Kosuge Keiko)
豊倉浩一 (Toyokura Koichi)

郷達明 (Goh Tatsuaki)
角浜憲明 (Kadohama Noriaki)
栗田悠子 (Kurita Yuko)
岡田和哉 (Okada Kazuya)
山本浩太郎 (Yamamoto Kotaro)
西本朱里 (Nishimoto Akari)
藤原ひとみ (Fujiwara Hitomi)
真鍋瞬 (Manabe Shun)
成田裕貴 (Narita Yuki)
桑原大季 (Kuwahara Daiki)
岩村青子 (Iwamura Shoko)
鈴木太郎 (Suzuki Taro)

【京都大学】

馬場啓一 (Nishiyama Tomoaki)

【東京大学】

中西友子 (Nakanishi Tomoko)
吉田薫 (Yoshida Kaoru)

【神奈川大学】

鈴木祥弘 (Suzuki Yoshihiro)

【山形大学】

及川彰 (Oikawa Akira)

【(独) 産業技術総合研究所】

高橋勝利 (Takahashi Katsutoshi)

【(独) 理化学研究所】

升島努 (Masujima Tsutomu)

【日立製作所】

神原秀樹 (Kambara Hideki)

梶山智晴 (Kajiyama Tomoharu)

【Himachal Pradesh 大学 (インド)】

Shanti S Sharma

【Zurich 大学 (スイス)】

Enrico Martinoia