

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：63904

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：22120007

研究課題名（和文）オルガネラ相互作用による植物環境応答の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism on environmental sensing of plants by organelle interaction

研究代表者

西村 幹夫（NISHIMURA, Mikio）

基礎生物学研究所・研究力強化戦略室・特任教授

研究者番号：80093061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 74,900,000円

研究成果の概要（和文）：光合成組織において、ペルオキシソームは緑葉体ミトコンドリアと共同して、光呼吸代謝を構成している。オルガネラの生体内可視化により、光照射によってペルオキシソームが長細く形態変化するとともに、葉緑体と接着することを明らかにした。フェムト秒レーザー照射によるオルガネラ間接着力を測定することにより、光照射下で、その接着力が増加することを初めて明らかにした。私達は相互作用を欠損するシロイヌナズナの変異株をスクリーニングした。これら変異株の解析から、LON2プロテアーゼとオートファジーによるペルオキシソームの分解が光照射下におけるペルオキシソーム機能転換に働いていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In photosynthetic tissues, peroxisomes participate in photorespiration along with chloroplasts and mitochondria. By visualization of plant organelles, we found that these peroxisomes along chloroplasts change from spherical to elliptical and their physical interaction area increased in light condition. A recent femtosecond laser technology to analyze adhesion between the organelles succeeded in estimating their physical interactions under dark and light conditions. Light increased the strength of the peroxisomes-chloroplast interaction, showing that their light-dependent interactions are quantitatively elucidated by in situ laser analysis.

In order to understand their interactions, we screened a number of mutants which defect in their interaction. It was revealed from the analysis of these mutants that LON2 and autophagy are responsible for the functional transition of peroxisomes in light condition.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：ペルオキシソーム クロロプラスト オルガネラ相互作用 環境応答 ペルオキシソーム機能転換

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の発端は、平成 16-20 年度特定領域研究「植物の環境適応戦略としてのオルガネラ分化」における研究課題「環境適応戦略としてのペルオキシソームの可逆的機能分化」にある。この研究において各種オルガネラを可視化した形質転換体を作製したことで、環境応答によって生じるペルオキシソームを中心としたオルガネラ相互作用を解析する系を確立することに成功した。

### 2. 研究の目的

植物細胞内のオルガネラは環境に応じて形態や動態を大きく変化させる。この過程において、オルガネラ同士は活発に相互作用を行う。植物細胞内のオルガネラ間相互作用の制御機構を理解することは、植物細胞、ひいては植物個体の環境適応を理解する上で重要である。申請者らは、ペルオキシソームが環境条件に応じて葉緑体やミトコンドリア、オイルボディなど異なるオルガネラと接着していることを見いだしてきた。これらオルガネラ間の接着に関わる遺伝子を同定し、植物の環境応答におけるそれら遺伝子産物の役割の解明を通して植物の環境感覚を理解する。本研究ではオルガネラ間相互作用欠損変異体の単離が成功の鍵を握っている。申請者らは、ペルオキシソームをはじめ葉緑体、ミトコンドリア、オイルボディなどのオルガネラを生体観察できる形質転換シロイヌナズナを作製し、こうした形質転換体からオルガネラ関連変異体を単離する方法を確立した。パイロットスクリーニングの結果、すでに4系統のペルオキシソーム-葉緑体接着不全変異体の単離に成功している。変異体の分子遺伝学的解析やトランスクリプトーム、プロテオーム解析などの主要技術はすでに修得済みである。

### 3. 研究の方法

申請者は、GFP や RFP など各種蛍光タンパ

ク質を用いることによってペルオキシソームをはじめ葉緑体、ミトコンドリア、オイルボディなどのオルガネラを生体観察できる形質転換シロイヌナズナを作製している。これらの形質転換体を変異原処理することによってさまざまなオルガネラ関連変異体を単離する方法を確立した。この方法を応用することで、オルガネラ間における相互作用欠損変異体の大規模スクリーニングを実施する。さまざまな環境ストレス条件下で得られた変異体のトランスクリプトーム解析、メタボローム解析などを行い、植物の環境応答におけるオルガネラ相互作用の生理機能を明らかにする。さらに、原因遺伝子の機能を明らかにする。

本研究を推進するためにはオルガネラ間相互作用を生細胞で測定する技術が必要である。そのために、緑色/赤色蛍光を用いて2種類のオルガネラを同時に可視化した各種形質転換シロイヌナズナを使用し、接着したオルガネラの位置をモニターしながらフェムト秒レーザーによる微量微小領域爆発現象を利用してはがす方法を確立する。本法を用いて細胞内における各種オルガネラ間の接着強度測定を行い、植物細胞におけるオルガネラ間相互作用の実体を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1)光合成組織において緑葉ペルオキシソームはミトコンドリア、葉緑体と協調して光合成に付随しておこる光呼吸の代謝を担う。ペルオキシソームと葉緑体との相互作用は光により活性化され、相互に接着することがフェムト秒レーザーによる解析から証明された。さらに、この接着は光合成依存であることが示唆された。

(2)環境感覚としてのオルガネラ相互作用機構を分子レベルで明らかにするために、ペルオキシソームと葉緑体との相互作用に注目し

て大規模な変異体の選抜を行い、70ほどの接着以上変異体を得た。各々の変異体の形質を詳細に観察すると、ペルオキシソームが凝集して葉緑体から乖離する、細胞質中に分散する、ペルオキシソームに光依存的形態化が損なわれ、葉緑体との接着力が低下している、葉緑体の形態が異常となりペルオキシソームが解離する等の表現形質を示した。これら変異体の原因遺伝子は、オルガネラ相互作用を抑制する重要な因子であることが予想された。そこで、次世代シーケンサーを用いて、全ゲノム解析による原因遺伝子の同定を試みた。ペルオキシソームの変異株として、オートファジー関連 2 遺伝子とペルオキシソーム局在型 LON-2 遺伝子が欠損した変異株を同定した。

(3)ペルオキシソームの機能転換は、オルガネラ機能分化の好例として長年、光照射下によるグリオキシソームから緑葉ペルオキシソームの転換に働く調節機能の解明を目指す研究が進められてきた。上記2種のペルオキシソーム変異株の解析により、ペルオキシソームの機能転換に伴うグリオキシソーム酵素の分解には、オートファジーによるペルオキシソーム全体の分解とペルオキシソーム局在型 Lon protease2によるグリオキシソーム酵素の分解がかかわることを明らかにした。更にLon protease2はATP依存性のプロテアーゼとシャペロンという2つのドメインをもっているが、シャペロンドメインはオートファジーに抑制的に働き、プロテアーゼドメインはこのシャペロン機能を阻害するように働くため、Lon2プロテアーゼがオートファジー自体にも影響を及ぼすことが明らかとなった。以上の結果をまとめて論文及び総説として発表した。

##### 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)

[雑誌論文](計 29 件)

Quantification of the adhesion strength

between peroxisomes and chloroplasts by femtosecond laser technology. Hosokawa, Y., M. Nishimura et al. (省略 4 名、6 番目) Bio-protocol in press (2016) 査読有

Measuring the interactions between peroxisomes and chloroplasts by in situ laser analysis. Oikawa, K., M. Nishimura (省略 3 名、5 番目) Bio-protocol in press (2016) 査読有

Dynamics of the light-dependent transition of plant peroxisomes. Goto-Yamada, S., S. Mano, K. Yamada, Y. Hosokawa, I. Hara-Nishimura and M. Nishimura Plant Cell Physiol. 56(7): 1264-1271 (2015) doi: 10.1093/pcp/pcv081 査読有

Physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis. Oikawa K., M. Nishimura et al. (省略 14 名、16 番目) Nature Plants 1: 15035 (2015) doi: 10.1038/nplants 査読有

Measurement of number of peroxisomes. Shibata, M., K. Oikawa, S. Mano and M. Nishimura Bio-protocol 4(21): e1284 <http://www.bio-protocol.org/e1284> (2014) 査読有

Plant autophagy is responsible for peroxisome transition and plays an important role in the maintenance of peroxisomal quality. Shibata, M., M. Nishimura et al. (省略 9 名、11 番目) Autophagy 10(5): 936-937(2014) doi: 10.4161/auto.28529 査読有

Chaperone and protease functions of LON protease 2 modulate the peroxisomal transition and degradation with autophagy. Goto-Yamada, S., M. Nishimura et al. (省略 5 名、7 番目) Plant Cell Physiol. 55(3): 482-496 (2014) doi:

10.1093/pcp/pcu017. 査読有

Organ-specific quality control of plant peroxisomes is mediated by autophagy. Yoshimoto, K., M. Nishimura et al. (省略 7 名、8 番目) J. Cell Sci. 127(Pt 6): 1161-1168 (2014) doi: 10.1242/jcs.139709 査読有

The Plant Organelles Database 3 (PODB3) update 2014: integrating electron micrographs and new options for plant organelle research. Mano, S., M. Nishimura et al. (省略 6 名、8 番目) Plant Cell Physiol, 55(1):e1. doi: 10.1093/pcp/pct140 (2014) 査読有

Proteomic analysis revealed that the Rab GTPase RabE1C is involved in the degradation of the peroxisomal protein receptor PEX7 (peroxin 7). Cui S. K., Y. Fukao, S. Mano, K. Yamada, M. Hayashi and M. Nishimura J. Biol. Chem. 288: 6014-6023 (2013) doi: 10.1074/jbc.M112.438143. 査読有

Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in Arabidopsis thaliana. Shibata, M., M. Nishimura et al. (省略 8 名、10 番目) Plant Cell 25(12): 4967-4983 (2013) doi: 10.1105/tpc.113.116947 査読有

The chloroplastic DEAD-box RNA helicase, HS3, is essential for plastid functions both in seed development and seedling growth. Kanai, M., M. Hayashi, M. Kondo and M. Nishimura Plant Cell Physiol. Sept. 54(9): 1431-1440 (2013) doi: 10.1093/pcp/pct091 査読有

Defects of peroxisomal membrane protein 38 causes enlargement of peroxisomes. Mano, S., C. Nakamori, Y. Fukao, M. Araki, M. Kondo and M. Nishimura Plant Cell Physiol. 52: 2157-2172

(2011) doi: 10.1093/pcp/pcr147. 査読有

Arabidopsis ABERRANT PEROXISOME MORPHOLOGY9 is a peroxin that recruits of the PEX1/PEX6 complex to peroxisomes. Goto, S., S. Mano, C. Nakamori and M. Nishimura Plant Cell 23: 1573-1587 (2011) doi: 10.1105/tpc.110.080770 査読有

The Plant Organelles Database 2 (PODB2) : An update containing movie data of plant organelle dynamics. Mano, S., T. Niwa, S. Nishikawa, T. Mimura and M. Nishimura Plant Cell Physiol. 52: 244-253 (2011) doi: 10.1093/pcp/pcq184 査読有

A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by suppressing polygalacturonase inhibiting proteins under the control of ABI5. Kanai, M., M. Nishimura and M. Hayashi Plant J. 62: 936-947 (2010) doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04205.x 査読有 他 13 件

〔学会発表〕(計 3 件)

Nishimura, M. Dynamics of peroxisomes in Arabidopsis thaliana, PERFUME Kick-off Conference on Peroxisome Formation, Function and Metabolism, 2013 年 12 月 3 日、Groningen (The Netherlands)

他 2 件

〔図書〕(計 3 件)

Goto-Tamada, S., S. Mano and M. Nishimura Springer Japan, Sexual Reproduction in Animals and Plants, 2014, 480(419-429)

Tanaka, Y. M. Nishimura et al. Intech, GENETIC ENGINEERING, 2012, 256(35-58) 他 1 件

〔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

<http://esplant.net/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西村 幹夫 (NISHIMURA, Mikio)

基礎生物学研究所・研究力強化戦略室・特  
任教授

研究者番号：80093061