

令和元年6月17日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04627

研究課題名(和文)植物におけるポストゴルジオルガネラが担う環境ストレス応答機構の包括的解明

研究課題名(英文) Analysis of physiological roles of the Plant post-Golgi organelle in stress response.

研究代表者

植村 知博 (Uemura, Tomohiro)

お茶の水女子大学・理系女性教育開発共同機構・准教授

研究者番号：90415092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物のトランスゴルジ網が担う病原菌応答の研究をおこない、シロイヌナズナに対する非宿主うどんこ病菌によってGI-TGNを介して分泌経路が活性化することを発見した。また、細胞壁修飾関連酵素がこの経路によって分泌されることを明らかにした。塩ストレス応答におけるTGN動態の観察をおこない、塩ストレス応答によってTGNが小さくなっていることを発見した。この過程を詳細に観察するために、共焦点レーザー顕微鏡による塩処理開始から6時間の長時間観察システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスゴルジ網は細胞内タンパク質輸送の中心に位置する分岐点となる重要な区画であり、その機能がなくなると植物が病原菌に感染しやすくなることを発見した。トランスゴルジ網の機能を制御することで、病気に強い植物の作出や、農薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on our observation, we found that the GA-TGN gradually matures into the GI-TGN by acquiring components of the secretory pathway, and GI-TGN is required for pathogen-inducible protein secretion. In addition, quantitative proteomic approach demonstrated that the SYP4-VAMP721 secretory pathway mediates secretion of cell wall modification enzymes and is important for plant growth and extracellular defense against powdery mildew pathogens. Furthermore, we established long-time observation system under salt stress response.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：植物 トランスゴルジ網 うどんこ病 塩ストレス ライブイメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内で合成された多種多様なタンパク質は、状況に応じてその局在場所を変化させつつ、それぞれの機能を果たしている。このようなタンパク質の挙動は、オルガネラ間を膜小胞や細管を介してダイナミックに結ぶ「膜交通(メンブレントラフィック)」により厳密に制御されている。植物は、様々な外部環境の変化に対し、“動いてその場から逃れる”という手段が使えないため、各々の細胞レベルで環境に柔軟に対応する仕組みを発達させており、膜交通はその仕組みを支える基盤として機能している。例えば外部環境とのインターフェイスに位置する細胞膜の機能は、エキソサイトーシスとエンドサイトーシスによる膜循環のダイナミックな調節により発現されている。また、近年エンドソームの機能が環境応答に深く関わることも明らかにされつつある。これらの機能の多くは、植物がポストゴルジ膜交通網やオルガネラ機能を独自に発達させることにより、動物や酵母とは独立に獲得したものである。しかしながらポストゴルジ膜交通網が植物の環境応答にどのように関与しているかについては不明であった。

### 2. 研究の目的

トランスゴルジ網(TGN)は、ゴルジ体のトランス槽の外側に存在する網目状の構造体で、積荷タンパク質の選別を行う、ポストゴルジ膜交通の玄関にあたるオルガネラである。研究代表者は、植物のTGN(またはTGNを中心とした膜交通経路)の機能が、環境ストレスに対する応答に必須であることを見出している。本研究では、高塩ストレスと病原菌感染を環境ストレスのモデルとして用い、環境ストレスに対するポストゴルジオルガネラの応答・動態を長時間高解像ライブイメージングにより解明し、生化学的・分子遺伝学的手法によりTGNが関与する環境ストレスに対する「受容」や「応答」する因子を単離し、それらの詳細な機能解析を行う。これらの解析により、環境ストレス応答におけるポストゴルジ膜交通の分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

研究目的である“環境ストレスの受容と応答におけるポストゴルジ膜交通の分子メカニズムを明らかにする”ことを達成するため以下の具体的な研究をおこなう。塩ストレスを与えた瞬間からのオルガネラ動態を超解像ライブセルイメージング観察することによる、高塩ストレス応答におけるポストゴルジオルガネラ動態の解明。TGNが関与する高塩ストレスの「受容」と「応答」を単離することによる、高塩ストレス応答の分子メカニズムの解明。

病原菌抵抗性におけるTGNのダイナミクスと生理機能の解明。TGNが担う環境ストレス下での葉緑体の機能発現機構の解明。これらの研究結果を統合することで、環境ストレス応答とオルガネラの関係を分子から個体レベルで理解するとともに、知見を応用することで環境ストレスに強い植物の開発を目指す。

### 4. 研究成果

・塩ストレス応答におけるオルガネラ動態の解明: 各ポストゴルジオルガネラの塩ストレス応答時の挙動を観察した。その結果TGNが小さくなっていることが確認された。超解像ライブイメージング顕微鏡を用いて長時間の塩ストレス応答の観察システムの構築をすることはできなかったが、共焦点レーザー顕微鏡による塩処理開始から6時間は観察する実験システムを構築した。

・ TGN が関与する高塩ストレスの「受容」と「応答」を単離することによる、高塩ストレス応答の分子メカニズムの解明：TGN に局在する Na/H アンチポーターの局在を観察するため NHX5/NHX6 に GFP, YFP, mRFP を融合させたタンパク質を発現する形質転換体を作成し、TGN 機能が損なわれた変異体 *syp4* に NHX5-GFP, NHX6-GFP を発現する形質転換体も作成した。塩ストレス処理後の挙動について解析を行い、野生型では NHX5/6 が塩処理後に液胞膜に局在を変えるが、変異体ではその局在変化が起こらないことを発見した。

・ 病原菌抵抗性における TGN のダイナミクスと生理機能の解明：シロイヌナズナに感染することが出来ないうどんこ病菌 (*Blumeria graminis*) を用いて、*syp4* 変異体でのうどんこ病菌に対する応答を詳細に解析した。その結果、ゴルジ体から独立した TGN が分泌経路で機能することを見出した。また、病原菌侵入時の分泌タンパク質を同定するために、細胞間隙のタンパク質を単離しプロテオミクス実験を行い、バイオインフォマティク解析により数種類の候補分泌タンパク質を同定した。

・ TGN が担う環境ストレス下での葉緑体の機能発現機構の解明：*syp4* 変異体の葉の黄化・白化の表現形が抑圧される変異体について、次世代シーケンシングにより原因遺伝子を同定する準備実験をおこなった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. \*Uemura, T., Nakano, RT., Takagi, J., Wang, Y., Kramer, K., Finkemeier, I., Nakagami, H., Tsuda, K., Ueda, T., \*Schulze-Lefert, P. and Nakano, A. (2019) A Golgi-released subpopulation of the trans-Golgi network mediates protein secretion in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 179:519-532.
2. Ito, E., Ebine, K., Choi, S., Ichinose, S., Uemura, T., Nakano, A. and \*Ueda, T. (2018) Integration of Two RAB5 Groups during Endosomal Transport in Plants. *eLife*, pii: e34064. doi: 10.7554/eLife.34064.
3. Takagi, J and \*Uemura, T. (2018) Use of brefeldin A and wortmannin to dissect post-Golgi organelles related to vacuolar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Molecular Biology*, 1789:155-165.
4. Tanabashi, S., Shoda, K., Saito, C., Sakamoto, T., Kurata, T., Uemura, T., \*Nakano, A. (2018) A Missense Mutation in the NSF Gene Causes Abnormal Golgi Morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Struct Funct*, 43:41-51. doi: 10.1247/csf.17026.
5. \*Ito, Y., Uemura, T. and Nakano, A. (2018) Golgi Entry Core Compartment functions as the COPII-independent scaffold for ER-Golgi transport in plant cells. *J. Cell Sci.* 131. pii: jcs203893. doi: 10.1242/jcs.203893.
6. Yamagami, A., Saito, C., Nakazawa, M., Fujioka, S., Uemura, T., Matsui, M., Sakuta, M., Shinozaki, K., Osada, H., Nakano, A., Asami, T. and \*Nakano, T. (2017) Evolutionarily conserved BIL4 suppresses the degradation of brassinosteroid receptor BRI1 that regulates cell elongation. *Sci. Rep.* 7:6650.
7. Ito, Y., Toyooka, K., Fujimoto, M., Ueda, T., \*Uemura, T. and Nakano, A. (2017) The trans-Golgi network and the Golgi stacks behave independently during regeneration after Brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.*, 58:811-821. doi:

10.1093/pcp/pcx028.

8. Sharma, SS., Yamamoto, K., Hamaji, K., Ohnishi, M., Anegawa, A., Sharma, S., Thakur, S., Kumar, V., Uemura, T., Nakano, A., \*Mimura, T. (2017) Cadmium-induced changes in vacuolar aspects of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.*, 114:29-37. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.02.017
9. Ito, E., Uemura, T. Ueda, T. and Nakano, A. (2016) Distribution of RAB5-positive multivesicular endosomes and the trans-Golgi network in root meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology*, 33:281-286.
10. Kanazawa, T., Era, A., Minamino, N., Shikano, Y., Fujimoto, M., Uemura, T., Nishihama, R., Yamato, KT., Ishizaki, K., Nishiyama, T., Kohchi, T., Nakano, A., Ueda, T. (2016) SNARE Molecules in *Marchantia polymorpha*: Unique and Conserved Features of the Membrane Fusion Machinery. *Plant Cell Physiol.*, 57:307-24. doi: 10.1093/pcp/pcv076

〔学会発表〕(計6件)

1. Yutaro Shimizu, Yamato Komatsu, Yoko Ito, Junpei Takagi J, Kazuo Ebine, Takashi Ueda, Kazuo Kurokawa, **Tomohiro Uemura**, Akihiko Nakano. Functional zones and dynamics of trans-Golgi network in *Arabidopsis*. 20th European Network for Plant Endomembrane Research meeting (Sept 12 – 15, 2017, Prague, Czech Republic. )
2. 植村知博 “超解像ライブイメージング観察による植物オルガネの動態と構造”異分野融合ワークショップ『細胞外から受ける情報のイメージングとそれを支える解析技術の最前線』(2017年3月28日, 生駒)
3. **Tomohiro Uemura** (invited speaker) (2016). The dynamics and physiological roles of the TGN in plants. Progress100: Second international symposium: Protein Trafficking and Intracellular Signaling of Plant and Fungal Cells (Feb 8 – 9, 2016, Hakata, Japan)
4. 植村知博(ワークショップオーガナイザー) “植物におけるトランスゴルジネットワーク(TGN)の動態と生理機能” 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会(2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(神戸・兵庫))
5. **Tomohiro Uemura**, Takashi Ueda, and Akihiko Nakano. The dynamics of trans-Golgi network (TGN) in plants. 26th International Conference on Arabidopsis Research (July 5 – 9, 2015, Paris, France)
6. 植村知博(selected speaker)、中野明彦 “植物における TGN の動態と生理機能” 第67回日本細胞生物学会大会(2015年6月30日, タワーホール堀船(江戸川区・東京))

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

該当せず

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中野 亮平

ローマ字氏名：Nakano, Ryohei Thomas

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。