

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05598

研究課題名(和文) 微小管 小胞体相互作用を基盤とするオルガネラ集積領域の役割と構築メカニズムの解明

研究課題名(英文) Roles and formation mechanism of organelles accumulation sites based on microtubule-endoplasmic reticulum interactions

研究代表者

濱田 隆宏 (Hamada, Takahiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：20452534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではオルガネラ集積領域を構成する微小管や小胞体が、アミノ酸代謝やペントースリン酸代謝経路において重要な役割を持つことを明らかにした。さらに本研究ではオルガネラ集積領域を構成する微小管・アクチン繊維がストレス顆粒形成やsmall RNA量の調整に働くことを明らかにした。その結果、オルガネラ集積領域に含まれる微小管・アクチン繊維がRNA代謝においても重要であることを明らかにした。またオルガネラ集積領域の機能と関連すると思われる微小管付随タンパク質MOR1について詳細な解析を行い、新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The study revealed microtubules and endoplasmic reticulum of organelles accumulation sites are important for amino acid metabolism and pentose phosphate metabolism in plants. The study also revealed that microtubules and actin filaments of organelles accumulation sites are important for stress granule formation and accumulation of small RNAs. The study also provided a new insight for the molecular mechanism of a microtubule associated protein, MOR1, in Arabidopsis.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：微小管 小胞体 アクチン繊維 オルガネラ RNA顆粒

## 1. 研究開始当初の背景

植物の微小管は染色体の分配、細胞伸張方向の制御、分裂方向の制御、細胞質分裂など多様な役割を担っている。一方、植物のオルガネラ輸送は主にアクチン繊維-ミオシンによって担われており、植物における微小管のオルガネラ輸送への寄与はあまり明確ではない。本研究課題の申請以前に、私達はイメージング解析により植物細胞の表層において微小管に小胞体が係留され、そこにゴルジ体・ミトコンドリア・ペルオキシソームなどのオルガネラ、mRNA や small RNA を含む RNA 顆粒などが集積することを明らかにしていた(Hamada et al. 2012)。さらに微小管と小胞体の相互作用を解析することにより、植物の微小管が低速のオルガネラ移動に働くことを示していた(Hamada et al. 2014)。また微小管付随タンパク質群 (MAPs) プロテオームにより、微小管には多くの細胞質の一次代謝酵素や RNA 結合タンパク質が結合していることが示唆されていた(Hamada et al. 2013)。また国内外の研究により細胞表層では微小管が細胞膜機能ドメインと協調的に働き、転写因子や small RNA の細胞間移行、環境変化の感受、病害応答など幅広い細胞間コミュニケーションに働いている可能性が示唆されていた。そのため本研究課題ではこの微小管周辺で様々なオルガネラや RNA 顆粒、タンパク質が係留される場所を「オルガネラ集積領域」と呼び、このオルガネラ集積領域に関する研究を行う必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、オルガネラ集積領域において微小管を基盤とした代謝酵素群の集積や相互作用、オルガネラ間相互作用、RNA 顆粒間相互作用などが起きていると予想し、オルガネラ集積領域の役割と構築メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ワイドターゲットメタボローム、及び small RNA シーケンス解析にはタバコ培養細胞 BY-2 及びシロイヌナズナ培養細胞 MM2d を用いた。ストレス顆粒及び MOR1 に関する実験では、連続白色灯下で 5 日間生育させたシロイヌナズナ(Col-0)植物体を用いた。ワイドターゲットメタボローム解析では凍結破砕して抽出した溶液を ACQUITY UPLC HSS T3 Column を搭載した Acquity UPLC-Xevo TQ-S (Waters, MA, USA) により分析した。small RNA シーケンス解析では精製した small RNA 画分を MiSeq (Illumina, CA, USA) により分析した。イメージング解析にはスピニングディスク型コンフォーカル顕微鏡

(Nikon Eclipse Ti microscope-Yokogawa CSU-W1, Andor Zyla 4.2 sCMOS camera)を用いた。ストレス顆粒マーカーとして翻訳開始因子 eIF4A2 及び PABP6 に GFP を融合させ、35S プロモーター下でシロイヌナズナ植物体内で発現させた eIF4A2-GFP 及び、GFP-PABP6 形質転換植物体を用いた。

MOR1 の機能解析には proMOR1::MOR1-GFP、UBQ10pro::mCherry-tub6、35Spro::GFP-tub6 を発現させた形質転換植物体を用いた。

## 4. 研究成果

本研究課題ではオルガネラ集積領域の「役割」と「構築メカニズム」の 2 方向からの解析を行った。各々の研究成果について以下に記載する。

### (1) オルガネラ集積領域の「役割」について

微小管の脱重合によりオルガネラ集積領域を微小管と共に消失させ、どのような代謝異常が生じるかをワイドターゲットメタボロームにより解析した。その結果、微小管の脱重合により、大半のアミノ酸の蓄積量に異常が生じることが明らかとなった。MAPs プロテオームではアミノ酸代謝とアミノ酸代謝の基盤となるペントースリン酸経路の酵素が同定されており、メタボロームの結果と一致する。また他のアミノ酸と独立した経路を持つヒスチジン代謝酵素は MAPs プロテオームでは同定されていないが、この結果と一致するようにメタボローム解析ではヒスチジン蓄積量に変化は生じなかった。同一の代謝経路で働く代謝酵素群が複合体を形成する足場として微小管が働く可能性を確かめるため、MAPs プロテオームで同定した代謝酵素の GFP 融合タンパク質を細胞内で発現させ、代謝酵素が微小管上に局在するかを解析した。その結果、これまでに解析した全ての代謝酵素は主に細胞質全体に局在することが示され、微小管特異的に局在する代謝酵素はイメージング解析では同定できていない。今回の実験では過剰発現プロモーターを使った発現系を用いたため、細胞質での発現量が多すぎて細胞表層に局在する代謝酵素を可視化できなかった可能性もあり、これら実験材料の改良は今後の課題として残った。

MAPs プロテオームで同定したタンパク質の 4 割近くは RNA/DNA 結合タンパク質であり、その多くが細胞質で RNA 顆粒を形成し、オルガネラ同様に微小管上に係留される。そのため、オルガネラ集積領域では RNA 顆粒間の相互作用や RNA 結合タンパク質の RNA 顆粒への積み込みなど、多様なイベントが起きている可能性が考えられる。MAPs プロテオームで同定された RNA 結合タンパク質のうち、本研究

課題では、翻訳抑制に関わるストレス顆粒とオルガネラ集積領域を構成する細胞骨格や小胞体との相互作用について解析を行った。ストレス顆粒は一定のストレス条件下で形成され、例えば蒸散ができない水没条件下では34度がストレス顆粒形成の閾値であることが私達の以前の研究により明らかにされている。ストレス顆粒の形成に微小管が関わることは動物培養細胞で報告され(Ivanov et al. 2003)、また植物でも微小管脱重合剤処理や微小管付随タンパク質変異体においてストレス顆粒数が変化することが報告されている(Gutierrez-Beltran et al. 2015)。まず私達は形成されたストレス顆粒が微小管上に局在するのみならず、アクチン繊維上や小胞体上にも局在することを発見した。そこでこれまでに明らかにされていないアクチン繊維とストレス顆粒の関係について解析した。その結果、ストレス顆粒はアクチン繊維が引き起こす原形質流動により、細胞内を長距離輸送されることを明らかにした。この原形質流動はストレス顆粒形成閾値である34度付近では数時間後も維持されるが、38度付近では30分程度で止まり、40度では5分の処理で止まった。34度では形成されたストレス顆粒は時間経過と共に融合して2時間後には巨大ストレス顆粒を形成したが、38度や40度では巨大ストレス顆粒は形成されなかった。この原因が原形質流動の有無にあると考え、アクチン繊維重合阻害剤(LatB)による巨大ストレス顆粒形成への影響を調べた。その結果、アクチン繊維重合阻害剤(LatB)存在下では、巨大ストレス顆粒は形成されなかった。また微小管阻害剤(oryzalin)存在下でも巨大ストレス顆粒は形成されなかったが、その大きさや数はLatB存在下とは異なった。さらにLatBとoryzalinの両方を用いてアクチン繊維と微小管を破壊した場合、巨大ストレス顆粒は形成されなかったものの、通常ストレス顆粒は形成されることを確認した。この結果よりアクチン繊維や微小管はストレス顆粒形成開始には必要ではなく、ストレス顆粒同士の融合に必要であることが示唆された。

MAPs プロテオームでは microRNA や siRNA などの small RNA の機能発現に必要な AGO タンパク質や、その合成に必要と考えられるタンパク質が多く同定されている。そこでオルガネラ集積領域が small RNA 生合成に与える影響を調べるため、次世代シーケンサーを用いた small RNA シーケンス解析を行った。その結果、微小管の非存在下では特定の small RNA が大幅に減少することを明らかにした。オルガネラ集積領域のみならず、細胞質における small RNA 生合成メカニズムに関しても多くのことが不明であるが、本研究課題で得られた成果は今後の研究の方向性を決める重要な成果である。

## (2) オルガネラ集積領域の「構築メカニズム」について

構築メカニズムに関する本研究課題の当初の研究方策の一つは、オルガネラ集積領域の基盤となる微小管-小胞体相互作用因子の同定と機能解析、さらに微小管-小胞体相互作用を基盤として形成されると予想された小胞体-細胞膜相互作用因子の同定と機能解析であった。私達は研究開始直前に報告があった微小管-小胞体相互作用因子 VAP27、小胞体-細胞膜相互作用因子 SYT1(Wang et al. 2014)について解析を行ったが、本研究課題遂行中に VAP27 や SYT1 に関する論文が出版され、私達が得た成果を上回る報告があった(Levey et al 2015, Pérez-Sancho et al. 2015, Siao et al. 2016, McFarlane et al. 2017)。そのため、VAP27 及び SYT1 を用いた解析では報告すべき新たな成果は得られていない。また本研究課題では独自に同定した新規微小管-小胞体相互作用因子の解析も行ったが、こちらもポジティブな結果は得られていない。

構築メカニズムに関する本研究課題のもう一つの研究方策は、オルガネラ集積領域の構築に関わる可能性がある微小管付随タンパク質群の機能解析である。オルガネラ集積領域の役割は不明な点が多いが、微小管がオルガネラ相互作用を介した代謝や転写因子の細胞間移行に必要であることが報告されている。例えば、微小管の脱重合はペルオキシソーム表在タンパク質 SC03 を介した葉緑体の成熟を阻害する(Albrecht et al. 2010 Plant Cell)。また微小管の異常が small RNA の細胞間輸送の阻害や(Brodersen et al. 2008)、転写因子 SHR の細胞間輸送の阻害を引き起こすことが知られている(Wu et al. 2013)。興味深いことに、これらの異常は微小管の伸縮ダイナミクスを阻害するだけで引き起こされ、微小管の有無とは関係がないと考えられる。

そこで上述した解析でよく使われ、微小管の伸縮ダイナミクスに関わる mor1-1 変異体及び、私達が新規に単離した mor1-g23 変異体の詳細な機能解析を行った。シロイヌナズナ mor1-1 変異体は高温依存的に表現型を示す温度感受性変異体であり、通常の生育温度(19℃)では顕著な表現型を示さないが、31℃の高温では野生型で観察される胚軸や葉柄の徒長を起こすことができない。この表現型は、高温時に mor1 変異体において微小管の伸縮が抑制され、微小管が急速に脱重合するためと説明されてきた(Whittington et al. 2001, Kawamura et al. 2008)。

しかしながら本研究課題において mor1-1 変異体の微小管を詳細に観察すると、これまでの報告に反する結果が得られた。私達の観察結果では、生育温度に関わらず mor1-1 変異体が野生型と比較して 短い微小管が非常に多く、それらが束化していること、 微

小管の重合速度が遅く、伸長と短縮の切り替えが激しいこと、微小管が他の微小管と交差した場合、異常に微小管端が安定化されて離れにくいことを見出した。これらの結果は、以前から報告のある *mor1-1* 変異体のみならず、私達が単離した *mor1-g23* 変異体においても確認された。また *mor1* 変異体の表現型が回復している MOR1 promoter::MOR1-GFP 植物体の解析により、MOR1 は重合している微小管先端で点滅を繰り返す、特に微小管の重合開始時に明るく局在することを見出している。これらの結果は、MOR1 が微小管が安定的に重合することをサポートし、長い微小管を形成するために働くこと、過度に安定化された微小管からの再伸長や脱重合開始に働くことを示唆している。以上の解析のみでは、オルガネラ集積領域の構築メカニズムの全体像の理解には到達しないが、私達は微小管の重合が行われる微小管プラス端が細胞膜や小胞体における機能ドメインと相互作用することが、オルガネラ集積領域の構築の基盤になっているのではないかと考えている。

#### <引用文献>

- Hamada et al. (2012) *Plant Cell Physiol.* 53(4):699-708  
Hamada et al. (2014) *Plant Physiol.* 166(4):1869-76.  
Hamada et al. (2013) *Plant Physiol.* 163(4):1804-1816.  
Ivanov et al. (2003) *Exp. Cell Res.* 290(2): 227-233.  
Gutierrez-Beltran et al. (2015) *Plant Cell* 27(3) 926-43.  
Wang et al. (2014) *Curr Biol.* 24(12) 1397-1405.  
Levey et al. (2015) *Curr Biol.* 25(15):2018-25  
Pérez-Sancho et al. (2015) *Plant Physiol.* 168(1):132-143.  
Siao et al. (2016) *J Exp Bot.* 67(21):6161-6171.  
McFarlane et al. (2017) *Plant Cell Physiol.* 58(3):478-484.  
Albrecht et al. (2010) *Plant Cell* 22:3423-3438  
Brodersen et al. (2008) *Science* 320,1185-1190.  
Wu et al. (2013) *Plant J.* (2013) 74,148-159  
Whittington et al. (2001) *Nature* 411,610-613.  
Kawamura et al. (2008) *J. Cell Sci.* 121, 4114-4123.

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1件)

Takahiro Hamada, Seiji Sonobe (2017) 「Isolation of Microtubules and Microtubule-Associated Proteins.」 *Methods in Molecular Biology*, 1511. 281-289. doi:10.1007/978-1-4939-6533-5\_2 2 査読無

[学会発表](計9件)

Erin C. Kawazu, Tsuyoshi Fujimoto, Kentaro Tamura, Ikuko Hara-Nishimura, Yuichiro Watanabe, Takahiro Hamada 「MOR1, a member of XMAP215/TOG family, modulates unique microtubule dynamics in Arabidopsis.」2018 年生体運動合同班会議 2018 年

濱田隆宏 「温度変化に応答した微小管ダイナミクス」日本植物学会第 81 回大会 2017 年

Erin C. Kawazu, Tsuyoshi Fujimoto, Kentaro Tamura, Ikuko Hara-Nishimura, Yuichiro Watanabe, Takahiro Hamada 「MOR1, a member of XMAP215/TOG family, modulates unique microtubule dynamics in Arabidopsis.」第 6 9 回日本細胞生物学会大会 2017 年

Erin C. Kawazu, Tsuyoshi Fujimoto, Kentaro Tamura, Ikuko Hara-Nishimura, Yuichiro Watanabe, Takahiro Hamada 「MOR1, a member of XMAP215/TOG family, modulates unique microtubule dynamics in Arabidopsis.」Cold Spring Harbor Asia “Plant Cell and Developmental Biology” 2017 年

濱田隆宏、藤本剛史、田村謙太郎、西村いくこ、渡邊雄一郎「シロイヌナズナ微小管付随タンパク質 MOR1 の局在解析」第 5 8 回日本植物生理学会年会 2017 年

濱田隆宏、藤本剛史、田村謙太郎、西村いくこ、渡邊雄一郎「シロイヌナズナ微小管付随タンパク質 MOR1 の局在解析」2017 年生体運動合同班会議 2017 年

濱田隆宏 「オルガネラ集積領域における微小管の役割」第 5 回 植物二次代謝フロンティア研究会 2016 年

Takahiro Hamada 「Microtubules mediate slow and short distance organelle

transport in Arabidopsis」EMBL Symposium:  
Microtubules: From Atoms to Complex  
Systems 2016年

Takahiro Hamada 「Microtubules mediate  
cytoplasmic metabolisms in Arabidopsis.」  
第 57 回 日本植物生理学会年会 2016 年 3  
月

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

濱田 隆宏 (HAMADA, Takahiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号 : 20452534