

平成21年 4月30日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2004～2008  
 課題番号：16085202  
 研究課題名（和文） 小胞体品質管理による植物細胞機能分化の制御－有性生殖を中心にして  
 研究課題名（英文） Regulation of plant cell function and development by endoplasmic reticulum quality control  
 研究代表者  
 西川 周一（Shuh-ichi Nishikawa）  
 名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
 研究者番号：10252222

## 研究成果の概要：

小胞体は分泌経路の最初のオルガネラであり、高次構造形成に失敗した異常タンパク質を留め、修復・分解する品質管理機能をもっている。本研究では植物の発生・分化に対する小胞体品質管理の役割の解明を目指し、シロイヌナズナを用いて GFP 融合タンパク質を用いた小胞体品質管理解析系を構築するとともに、小胞体品質管理において中心的な役割をはたしている分子シャペロン Hsp70 システムの変異株の解析を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	21,200,000	0	21,200,000
2005年度	21,200,000	0	21,200,000
2006年度	21,200,000	0	21,200,000
2007年度	17,000,000	0	17,000,000
2008年度	15,300,000	0	15,300,000
総計	95,900,000	0	95,900,000

研究分野：植物分子細胞生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：小胞体、分子シャペロン、品質管理、有性生殖、シロイヌナズナ、小胞体関連分解、核融合

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌経路の最初のオルガネラであり、分泌経路におけるタンパク質合成の場となっている。また、小胞体には合成されたタンパク質の高次構造形成を監視し、高次構造形成に失敗した異常タンパク質を修復・除去する品質管理の機能ももっている。小胞体品質管理の解析は、出芽酵母や動物細胞などを用いて行われ、この過程に関与する分子装置の同定も行われていた。シロイヌナズナでも、ゲノム配列の解析からこのような小胞体品

質管理にあずかる因子のホモログが存在することが示されていた。また、植物細胞において小胞体由来の様々なコンパートメントが同定され、これが様々な機能を持つことが明らかになってきた。小胞体機能の分化は貯蔵タンパク質形成などの環境適応に重要であり、また、小胞体品質管理は植物の発生・分化の正常な進行に必須であることが予想されていた。

## 2. 研究の目的

小胞体の Hsp70 である BiP は、小胞体品質管理において中心的な役割をはたしている分子シャペロンである。本研究では、BiP および BiP とともに小胞体品質管理に機能する因子に関するシロイヌナズナ変異株の解析と、植物細胞における小胞体品質管理解析系の構築によって、小胞体におけるタンパク質の品質管理機構の観点から、小胞体由来コンパートメントの形成や植物の発生・分化の制御機構を明らかにしていくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 植物細胞における小胞体品質管理機構解析の構築：小胞体に蓄積した異常タンパク質は、小胞体関連分解 (ERAD) とよばれる機構で分解される。出芽酵母の代表的な ERAD 基質である CPY\* は、液胞のカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の変異体である。そこで、シロイヌナズナの CPY ホモログ AtCPY を元に、CPY\* と同様の変異を導入したタンパク質 AtCPY\* を構築し、その分解機構の解析を行った。

(2) シロイヌナズナ BiP の機能解析：シロイヌナズナにおける BiP の機能解析を、次の 2 種類のアプローチで行った。

① 花粉特異的プロモーターを用いた BiP 変異体の発現系を構築、花粉の発芽・伸長に対する BiP 変異体の発現の影響を解析する。

② シロイヌナズナは、BiP1、BiP2、BiP3 という 3 種類の BiP 遺伝子を持つ。このうちの BiP1 と BiP2 は、アミノ酸配列で 99% が同一であり、植物体全体で発現している。一方 BiP3 はやや相溶性が低く、小胞体に異常タンパク質が蓄積した小胞体ストレス下でのみ発現が誘導される。これら 3 つの BiP 遺伝子に関する T-DNA 挿入変異体を構築し、その表現型の解析を行う。

(3) シロイヌナズナ小胞体 J タンパク質の同定と機能解析：小胞体の J タンパク質は BiP の制御因子として機能する。シロイヌナズナの J タンパク質を同定するとともに、その T-DNA 挿入変異体を構築と機能解析によって、シロイヌナズナの発生・分化における役割を明らかにする。

(4) オルガネラ可視化植物の構築：植物オルガネラデータベース構築の一環として、植物オルガネラを可視化する形質転換植物を作製する。花粉管を中心として、オルガネラ形態の写真や、オルガネラ動態のムービーを作成する。

## 4. 研究成果

(1) 植物細胞における小胞体品質管理機構

解析系の構築：

シロイヌナズナ培養細胞を用いた一過的発現実験によって AtCPY-GFP が液胞まで輸送されることを示した。次に、CPY\* と同様の変異を AtCPY-GFP に導入して AtCPY\*-GFP を構築し、これをシロイヌナズナ培養細胞で一過的に発現したところ、小胞体に留まることが示された。また、AtCPY\*-GFP はプロテアソームと Cdc48p 依存に ERAD で分解されることが示された。

酵母では、小胞体-ゴルジ体間輸送を阻害すると CPY\* の ERAD が抑制される。一方、AtCPY\*-GFP のシロイヌナズナ培養細胞における ERAD は、小胞体-ゴルジ体間輸送を阻害しても抑制されなかった。これに対して、酵母細胞における AtCPY\*-GFP の ERAD は小胞体-ゴルジ体間輸送の阻害によって抑制されることを見いだした。この結果は、小胞体-ゴルジ体間輸送依存の ERAD は酵母特異的であることを示している。糖タンパク質の ERAD には N 結合型糖鎖が ERAD シグナルとして機能する。しかし、AtCPY\*-GFP は N 結合型糖鎖をひとつ持つが、これは AtCPY\*-GFP の ERAD には必要がないことが示された。

今回構築した AtCPY\*-GFP は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される ERAD 基質として、シロイヌナズナのタンパク質に変異を導入して作製した初めての例である。今後、植物体において AtCPY\*-GFP をすることで、小胞体品質管理にあずかる因子の変異株の解析などが可能となると考えられる。

(2) シロイヌナズナ BiP の機能解析：

① 花粉特異的プロモーターの利用

出芽酵母では、BiP に関する様々な変異体が取得されている。その中には、その発現によって小胞体膜透過が阻害される優性欠損変異体や、温度感受性の変異体が含まれる。これら変異体は、酵母から動植物まで広く保存されている残基の変異なので、同様の変異をシロイヌナズナ BiP 遺伝子に導入可能である。

そこで、酵母変異体の情報を元にして、これに対応する変異を導入したシロイヌナズナ BiP1 変異体を 7 種類作製した。これらを花粉特異的プロモーターであるトマト LAT52 プロモーターを用いて発現する形質転換体を構築した。花粉由来の変異遺伝子伝達効率の測定の結果、酵母 BiP の優性欠損変異体に対応する変異体の発現によって花粉機能が欠損することが示された。また、花粉伸長アッセイの結果、花粉の機能欠損は花粉の発芽・伸長における欠損ではなく、花粉管が雌しべ内を通過する過程の欠損であることが示された。

一方、花粉機能の欠損を引き起こさないことが示された 3 種類の BiP1 変異体について、

BiP1 プロモーターを用いた発現系を構築した。この内のひとつの変異体は、シロイヌナズナ BiP 欠損株の致死性を相補した。しかし、この変異体は 30°C 以上での発芽率の顕著な低下、29°C で栽培した際の不稔といった、温度感受性の欠損を示すことが明らかとなった。本研究によって、BiP に関するシロイヌナズナの温度感受性変異株を初めて作り出すことに成功した。この変異株では小胞体品質管理が特異的に欠損していることが予想される。今後の、植物の発生・分化における小胞体品質管理の役割の解明にとって有用なツールとなることが期待される。

#### ② BiP に関する T-DNA 挿入変異体の解析

まず、3 種類の BiP 遺伝子の単独の欠損株を作製したところ、これらはすべて生育可能であり、発生・生育における欠損は観察されなかった。そこで 2 重変異株を作製したところ、BiP3 と BiP1 または BiP2 との 2 重欠損は目立った欠損を示さなかった。一方、BiP1 と BiP2 をともに欠損する株は得られず、BiP1 と BiP2 はシロイヌナズナの生育において重複した必須の機能をもつことが示された。

詳細な解析の結果、BiP1 と BiP2 をともに欠損した際の致死性は、雌性配偶体致死となるためであることが示された。そして、BiP1 と BiP2 をともに欠損する雌性配偶体の解析によって、BiP1 と BiP2 の機能は雌性配偶体形成時の極核融合の核膜に必要であることが示された。BiP は出芽酵母接合時の核融合に必要であることが報告されており、この結果は核膜融合における BiP の機能が種を超えて保存されていることを示している。

BiP1 と BiP2 を欠損した雌性配偶体は、極核融合のみに特異的な欠損を示すが、雌性配偶体形成の他の過程や受精過程には欠損を示さない。しかし、BiP1 と BiP2 を欠損した雌性配偶体を野生株の花粉で受精して生じる種子中では、胚発生が途中で停止する。解析の結果、これは胚乳中での核分裂の異常によるためであることが明らかとなり、極核融合は胚乳核の分裂制御に必要であることが明らかとなった。この研究によって、植物の生殖における極核融合の意義が初めて明らかとなった。今後は、極核の融合による胚乳核の分裂・増殖の制御機構の解析を行ってきたい。

BiP1 と BiP2 をともに欠損しても、花粉(雌性配偶体)は致死とはならない。そこで、BiP1、BiP2 と BiP3 の 3 重変異体を作製したところ、3 重変異によって花粉形成過程で花粉致死となることが示された。また、GUS 遺伝子をレポーターとして用いた解析によって、BiP3 は花粉で発現していることが示された。以上の結果は、花粉において BiP3 は BiP1 と BiP2 のバックアップとして機能していることを示し、植物体における BiP3 の機能を明らか

にした最初の例であるといえる。

#### (3) シロイヌナズナ小胞体 J タンパク質の同定と機能解析

BiP の制御因子として機能する小胞体の J タンパク質に関しては、出芽酵母では、Sec63p、Jem1p、Scj1p という 3 種類が存在し、Sec63p はタンパク質の小胞体膜透過、Jem1p と Scj1p は小胞体品質管理という、BiP の機能する異なる過程に機能する。また、Jem1p は酵母接合時の核融合においても機能する。これらの酵母小胞体 J タンパク質のシロイヌナズナホモログの検索の結果、2 種類の Sec63p ホモログ (AtERdj2A と AtERdj2B)、2 種類の Scj1p ホモログ (AtERdj3A と AtERdj3B) と、Jem1p ホモログを 1 つ (AtP58<sup>IPK</sup>) 同定し、これらがすべてシロイヌナズナ小胞体に局在することを示した。この結果は、シロイヌナズナには出芽酵母と同様のセットの Hsp70 システムが存在することを示している。

同定したシロイヌナズナ小胞体 J タンパク質に関する変異株を作製したところ、AtERdj2A の欠損は致死となることが示された。そして、AtERdj2A の欠損によって花粉機能(花粉の発芽・花粉管伸長)の異常が生じることが示された。一方、そのほかの小胞体 J タンパク質に関する単独の欠損株は致死とはならなかった。

単独の欠損株の中で致死とはならなかったもののうち、AtERdj3B の変異株では、29°C での稔性の顕著な低下が観察され、温度感受性不稔となることが示された。そして変異株の花器官の解析によって、これは雄しべ柱頭への花粉接着能の低下によることが示された。

小胞体 J タンパク質に関する 2 重変異株の解析によって、極核融合過程において、BiP の制御因子として機能する J タンパク質の同定を試みた。この結果、AtERdj3A と AtP58<sup>IPK</sup> の 2 重欠損株の雌性配偶体は極核融合に欠損を示すことが明らかとなり、これら 2 つの J タンパク質が BiP とともに極核の核膜融合に機能していることが明らかとなった。この結果、植物においても BiP が小胞体 J タンパク質とともに核膜融合に機能していることが初めて明らかとなった。酵母では、BiP は小胞体 J タンパク質を使い分けることで、核外膜と核内膜という異なる膜の融合に機能していることが示されている。今後、他の小胞体 J タンパク質についても極核融合への関与を調べ、極核融合においても BiP が小胞体 J タンパク質を使い分けることで複数の過程に機能しているのかを明らかにしていく。

#### (4) オルガネラ可視化植物の構築 : LAT52 プロモーターによって、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、液胞、ミトコンドリア、葉緑

体の各オルガネラ局在型 GFP を発現する形質転換植物を作製した。これら形質転換植物の花粉を用いて *in vitro* で花粉伸長を行い、各オルガネラの形態の写真を撮影するとともに、タイムラプス観察によってオルガネラの動きをムービーとして作成した。このうちの小胞体、ミトコンドリア、葉緑体の写真とムービーについて、特定領域で作成した Plant Organelles Database に登録した。

#### 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 12 件)

1. Nishikawa, S., Hirata, A., and Endo, T. (2008) Nuclear inner membrane fusion facilitated by yeast Jem1p is required for spindle pole body fusion but not for the first mitotic nuclear division during yeast mating. *Genes Cells* **13**: 1185-1195 査読有
2. Yamamoto, M., Maruyama, D., Endo, T., and Nishikawa, S. (2008) *Arabidopsis thaliana* has a set of J proteins in the endoplasmic reticulum that are conserved from yeast to animals and plants. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1547-1562 査読有
3. Mano, S., Miwa, T., Nishikawa, S., Mimura, T., and Nishimura, M. (2008) The Plant Organelles Database (PODB): a collection of visualized plant organelles and protocols for plant organelle research. *Nucleic Acids Res.* **36**: D929-D937 査読有
4. Nishikawa, S., Brodsky, J. L., and Nakatsukasa, K. (2005) Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J. Biochem.* **137**: 551-555 査読有

[学会発表] (計 25 件)

1. 西川周一 The Hsp70 system in the endoplasmic reticulum is required for female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. BMB2008 平成 20 年 12 月 10 日神戸ポートアイランド
2. Nishikawa, S., “Analyses of the Hsp70 system in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis thaliana*” 「神戸大学フロンティア・テクノロジー・フォーラム 2007」サテライト研究会 “Dynamics of Biological Networks in and around Plant Cells” 平成 19 年 10 月 31 日神戸大学
3. 西川周一 「植物細胞小胞体の Hsp70 システムの解析」分子生物学会 2006

フォーラム「分子生物学の未来」平成 18 年 12 月 6 日名古屋国際会議場

4. Nishikawa, S. “Analyses of the Hsp70 System in the Endoplasmic Reticulum of *Arabidopsis thaliana*.” The 53rd NIBB Conference “Dynamic Organelles in Plants” 平成 18 年 6 月 17 日岡崎コンファレンスセンター

[図書] (計 4 件)

1. 西川周一 (2006) 第 3 章 Short Topics 3: GFP を用いた網羅的な可視化マーカーの構築. in 新版植物の細胞を観る実験プロトコール 顕微鏡観察の基本から最新バイオイメージング技術まで (福田裕穂, 西村幹夫, 中野明彦 監修) pp224-226 秀潤
2. 西川周一, 遠藤斗志也 (2005) 第 11 章(1)タンパク質の膜透過装置 タンパク質科学: 構造, 物性, 機能 (後藤祐児, 桑島邦博, 谷澤克行編) pp485-494 化学同人

[その他]

ホームページ等

The Plant Organelles Database 2  
(<http://podb.nibb.ac.jp/Organelle/>)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

西川 周一 (Shuh-ichi Nishikawa)  
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 10252222

##### (2)研究分担者

遠藤斗志也 (Toshiya Endo)  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 70152014

吉久 徹 (Tohru Yoshihisa)

名古屋大学・物質科学国際研究センター  
・准教授  
研究者番号: 60212312

##### (3)連携研究者

遠藤斗志也 (Toshiya Endo)  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 70152014

吉久 徹 (Tohru Yoshihisa)

名古屋大学・物質科学国際研究センター  
・准教授  
研究者番号: 60212312