

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2004～2008  
 課題番号：16085209  
 研究課題名（和文） 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  
 研究課題名（英文） Organelle Differentiation as the Strategy for Environmental Adaptation in Plants

研究代表者 西村 幹夫（NISHIMURA MIKIO）  
 基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・教授

研究者番号：80093061

研究成果の概要：光照射や老化など環境適応反応においてペルオキシソームの柔軟な機能分化が重要な役割を担っている。本研究では、ペルオキシソームに焦点を絞ったトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析や、ペルオキシソーム異常突然変異体を用いた解析、および光照射や老化などに対するペルオキシソームの応答を網羅的に解析することによって、植物細胞の環境戦略を支えるペルオキシソーム機能分化に関わる因子を同定し、その機能解析からペルオキシソーム機能分化の全体像を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	33,800,000	0	33,800,000
2005年度	33,800,000	0	33,800,000
2006年度	43,800,000	0	43,800,000
2007年度	31,100,000	0	31,100,000
2008年度	31,100,000	0	31,100,000
総計	173,600,000	0	173,600,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境 細胞・組織 植物 バイオテクノロジー オルガネラ

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪性種子の子葉組織の緑化過程で観察されるペルオキシソームの変換現象は、明確な機能的変化を伴う現象として注目され、世界中の多くの研究者が解析を加えてきた。長年論争的であったグリオキシソームから緑葉ペルオキシソームへの変換が直接的か否かという設問に対し、申請者らは直接的変換を支持する実験結果を提示し、最終的結論

を与えることが出来た。さらにセネッセンス時において逆のペルオキシソーム機能変換が生じ、この変換も直接的であることを初めて明らかにし、研究はこのオルガネラ分化における調節機構の解明に移っている。

## 2. 研究の目的

脂肪性種子の子葉組織では、光照射によりペルオキシソームの機能変換現象が観察さ

れる。申請者は、光照射により子葉が緑化するに伴い、糖新生に関与するグリオキシソームから光合成に関与する緑葉ペルオキシソームへとペルオキシソームの機能的変換が生じ、緑化子葉がセネッセンスしていくときには、逆に緑葉ペルオキシソームからグリオキシソームへの変換がおきていることを示し、ペルオキシソームが可逆的に機能変換することを証明した。この現象は、動・植物を通じ、同一細胞内において、ペルオキシソームの機能的変換が生じる唯一の現象として極めて注目すべきものである。また、近年分子遺伝学的手法によりペルオキシソームが光形態形成に関与している可能性が示唆されている。このように、光照射や老化など環境適応反応においてペルオキシソームの柔軟な機能分化が重要な役割を担っていることが明らかになってきている。本研究では、ペルオキシソームに焦点を絞ったトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析や、ペルオキシソーム異常突然変異体を用いた解析および、光照射や老化などさまざまな環境変化に対するペルオキシソームの応答を網羅的に解析することによって、植物細胞の適応戦略を支えるペルオキシソーム機能分化の全体像を明らかにすることをめざす。

### 3. 研究の方法

#### (1) ペルオキシソームのトランスクリプトーム解析

ペルオキシソームへの移行配列をもとに、シロイヌナズナの全 ORF のうち約 300 個がペルオキシソームタンパク質をコードすることが判明した。そこでこれら遺伝子を網羅したマイクロアレイを作製する。さらに、既製のシロイヌナズナマイクロアレイも適時使用し、光照射や老化

などの条件下でトランスクリプトーム解析を行い、光照射や老化など環境適応下におけるペルオキシソームの機能分化を特徴づけるペルオキシソーム遺伝子を網羅的に同定する。

#### (2) ペルオキシソームの内在タンパク質および膜タンパク質のプロテオーム解析

各種条件下でペルオキシソームを単離し、内在タンパク質および膜タンパク質に対してペプチドマスフィンガープリント法によるプロテオーム解析を行う。トランスクリプトーム解析と統合しながら、光照射や老化など環境適応下におけるペルオキシソームの機能分化を特徴づけるペルオキシソームタンパク質を同定する。

#### (3) ペルオキシソーム異常変異株の確立とその機能解析

ペルオキシソーム異常変異株をシロイヌナズナを材料としてスクリーニングする。グリオキシソームの機能としてはβ酸化系、緑葉ペルオキシソームの機能としては光呼吸をとりあげ、これらの機能を欠損する変異株をスクリーニングする。さらに、ペルオキシソームを GFP で可視化させた形質転換シロイヌナズナを材料として、ペルオキシソームの形態が変化した変異株をスクリーニングする。また、ペルオキシソーム形成に必須であると考えられる *PEX* 遺伝子群については T-DNA 挿入変異株や RNAi による遺伝子発現抑制株を確立する。得られた変異株の機能解析により、ペルオキシソーム機能分化の分子機構を解明する。

#### (4) プロテオームおよびトランスクリプトーム解析拠点の形成

プロテオーム解析（西村）およびトランスクリプトーム解析（林）拠点を確立し、本特定領域研究共通設備として運用、

共同研究を積極的に推進する。

#### 4. 研究成果

##### (1) PEX 遺伝子群の機能解析

PEX 遺伝子は、さまざまな生物で単離されたペルオキシソーム制御遺伝子の総称である。シロイヌナズナゲノムには少なくとも 22 個の PEX 遺伝子が存在する。フォワード・リバーシ遺伝学を利用することで、全 PEX 遺伝子の変異株を確立した。これら変異体の表現型解析から、PEX 遺伝子をペルオキシソームのタンパク質の輸送に関与するもの、形態維持に関与するもの、分裂に関与するものに分類した。これらの結果からタンパク質輸送機構のモデルを提唱し、BiFC 法を用いてモデルの検証を行っている。また、植物の PEX10 遺伝子が小胞体の制御を通してクチクラワックスの生合成に関与するという他の生物には見られない植物独自の機能を持っていることを示した。

##### (2) ペルオキシソーム形成不全変異体

GFP 蛍光によって可視化されたペルオキシソームの形態を指標に単離した *apm* 変異体のうち、*apm 1* 変異体はダイナミン DRP3A 遺伝子に変異があり、ペルオキシソームの分裂異常が認められること、*apm2*、*apm4* 突然変異体はそれぞれ PEX13 と PEX12 遺伝子に変異があることを明らかにしてきた。新たに *apm5* と *amp9* 変異体について原因遺伝子の特定を行い、その機能解析を行っている。

##### (3) ペルオキシソームのトランスクリプトーム/プロテオーム解析

トランスクリプトームおよびプロテオーム解析の両方からペルオキシソームタンパク質の網羅的な同定を行った。こうした解析を通して、根のペルオキシソームがポリアミンの代謝を担っていることを明らかにした。

また、Adenine nucleotide carrier 1 (PNC1) などの新規ペルオキシソーム膜タンパク質を同定することに成功した。

##### (4) 小胞体の機能分化

小胞体はペルオキシソームと同様に単膜系のオルガネラであり、ER ボディ、液胞のみならずペルオキシソーム、オイルボディなど様々なオルガネラの形成に深く関わる。ER ボディ形成に関わる因子を同定するために、小胞体を GFP で標識した GFP 株を親株として変異株をスクリーニングした。その結果、ER ボディが形成されない *nai2* 変異体の単離および原因遺伝子の特定に成功した。

##### (5) 分子シャペロン HSP90 の機能分化

分子シャペロン HSP90 が植物の高次機能発現に関与する仕組みに注目して解析を加えた。その結果、熱ショック応答における HSP90 の役割を見いだした。一過的な HSP90 阻害剤処理により熱応答遺伝子の誘導とともに高温耐性が獲得され、熱ショックにより HSP90 の活性は低下した。HSP90 は熱応答遺伝子の発現に関わる熱ショック転写制御因子 (HSF) と結合した。これらのことから、HSP90 は HSF の活性を負に制御し、熱ショックによる HSP90 の活性低下が HSF を活性化し、熱応答遺伝子を発現させることを示した。

#### 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 63 件)

- ① Mano, S., T. Niwa, S. Nishikawa, T. Mimura and M. Nishimura The plant organelles database (PODB): a collection of visualized plant organelles and protocols for plant organelle research. **Nucleic Acid Res.** 36: D929-937 (2008) 査読有り
- ② Yamada, K., A. J. Nagano, M. Nishina, I. Hara-Nishimura and M. Nishimura NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that

- enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 20: 2529-2540 (2008) 査読有り
- ③ Kunieda T., N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi, S. Takeda, M. Aida, M. Tasaka, M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura NAC family proteins NARS1 and NARS2 in the outer integument regulate embryogenesis in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 20: 2631-2642 (2008) 査読あり
- ④ Arai, Y., M. Hayashi and M. Nishimura Proteomic identification and characterization of a novel peroxisomal adenine nucleotide transporter supplying ATP for fatty acid  $\beta$ -oxidation in soybean and *Arabidopsis*. **Plant Cell** 20: 3227-3240 (2008) 査読有り
- ⑤ Yamada, K., M. Fukazawa, M. Hayashi, I. Suzuki and M. Nishimura Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **J. Biol. Chem.** 282: 37794-37804 (2007) 査読有り
- ⑥ Nito, K., A. Kamigaki, M. Kondo, M. Yagi, M. Hayashi and M. Nishimura Functional classification of *Arabidopsis* peroxisome biogenesis factors proposed from analyses of knockdown mutants. **Plant Cell Physiol.** 48: 763-774 (2007) 査読有り
- ⑦ Mano, S., C. Nakamori, K. Nito, M. Kondo and M. Nishimura The *Arabidopsis pex12* and *pex13* mutants are defective in both PTS1- and PTS2- dependent protein transport to peroxisomes. **Plant J.** 47: 604-618 (2006) 査読有り
- ⑧ Hayashi, M and M. Nishimura *Arabidopsis thaliana*-A model organism to study plant peroxisomes **Biophys. Biochim. Acta** 1763: 1382-1391 (2006) 査読有り
- ⑨ Hayashi, M., K. Nito, M. Yagi, T. Kamada and M. Nishimura Differential contribution of two peroxisomal protein receptors to the maintenance of peroxisomal functions in *Arabidopsis*. **J. Biol. Chem.** 280: 14829-14835 (2005) 査読有り
- ⑩ Mano, S. and M. Nishimura Plant peroxisomes Vitamin and Hormones **Elsevier Sci. Press** 72: 111-154 (2005) 査読有り
- ⑪ Mano, S., C. Nakamori, M. Kondo, M. Hayashi and M. Nishimura An *Arabidopsis* dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division. **Plant J.** 38: 487-498 (2004) 査読有り
- ⑫ Hara-Nishimura, I., R. Matsushima, T. Shimada and M. Nishimura Diversity and formation of endoplasmic reticulum-derived compartments in plants. Are these compartments specific to plant cells? **Plant Physiol.** 136: 3435-3439 (2004) 査読有り
- 他 51 件
- [学会発表] (計 112 件)
- ① Mano, S., Miwa, T., Nishikawa, S., Mimura, T. and Nishimura M. The Plant Organelles Database Version 2: The Databases for Plant Organelle Dynamics and Methods for Functional Analysis. **The 55<sup>th</sup> NIBB conference, Arabidopsis Workshop 2008 "Frontiers of Plant Science in the 21st Century"** (Okazaki, Japan) September 14, 2008
- ② Yamada, K., Fukao, Y., Hayashi, M., Fukazawa, M., Suzuki, i. and Nishimura, M. HSP90 regulates heat shock response that is responsible for heat adaptation. **18th International Conference on Arabidopsis Research** (Beijing, China) June 20-23, 2007
- ③ Mano, S., Miwa, T., Nishikawa, S., Mimura, T. and Nishimura, M. Construction of plant organelles database. **20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB congress** (Kyoto, Japan) June 18-23, 2006
- ④ Yamada, K., Fukao, Yoichiro, Suzuki, I. and Nishimura, M. HSP90 regulates stress response to adapt a high temperature in *Arabidopsis*. **Plant Biology 2006 (ASPP 2006 Annual Meeting)** (Boston, MA, USA) August 5-9, 2006
- ⑤ Nishimura, M., Hayashi, M., Mano, S., Nito, K., Kamada-Nobusada, T., Kondo, M., Arai, Y., Kamigaki A. and Oikawa, K. Biogenesis and differentiation of plant peroxisomes. **53rd**

**NIBB conference -Dynamic organelles in plants** (Okazaki, Japan) June 15-17, 2006

⑥ Hayashi, M., Kamigaki, A. and Nishimura, M.

Establishment of peroxisomal functions by peroxisomal biogenesis factors. **VIII Spanish Congress on Plant Molecular Biology** (Pamplona, Spain) June 28-July 1, 2006

⑦ Kamada-Nobusada, T., Fukao, Y., Hayashi, M.

and Nishimura, M. Plant peroxisomal differentiation revealed by transcriptomic and proteomic analyses. **KEYSTONE SYMPOSIA, Plant Cell Signaling: in vivo and omics Approaches** (Santa Fe, NM, USA) Feb. 2005

⑧ Hayashi, M., Yagi, M. and Nishimura, M.

Differential contribution of Pex5p and Pex7p to the maintenance of peroxisomal functions in Arabidopsis. **Plant Biology 2005** (Seattle, WA, USA) July, 2005

⑨ Hayashi, M., Yagi, M., Nito, K., Kamada, T.

and Nishimura, M. Contribution of Pex5p and Pex7p in the maintenance of peroxisomal functions in plants. **International meeting on the topogenesis of organelar proteins** (Bochum, Germany) October, 2004

他 103 件

[図書] (計 1 件)

Arai, Y., Y. Fukao, M. Hayashi and M. Nishimura **Peroxisome Plant Proteomics: Technologies, Strategies and Applications, John Wiley & Sons, 377-389 (2008)** 査読有り

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称：植物の発芽を抑制する方法、及び発芽が抑制された形質転換体

発明者：林誠、西村幹夫、八木美奈

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：特許権

番号：2004-112911

出願年月日：平成 16 年 4 月 7 日

国内外の別：国内

名称：種皮特異的誘導性プロモーター

発明者：西村いくこ、西村幹夫、山田健志、中畦悟

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：特許権

番号：2004-346925

出願年月日：平成 16 年 11 月 30 日

国内外の別：国内

名称：フザリウム毒抵抗性形質転換植物

発明者：西村いくこ、黒柳美和、西村幹夫、山田健志

権利者：国立大学法人京都大学、大学共同利用機関法人自然科学研究機構

種類：特許権

番号：2004-381952, PCT 国際出願番号：2005-023928

出願年月日：平成 16 年 12 月 28 日

国内外の別：国内、国外

[その他]

ホームページ等：

<http://podb.nibb.ac.jp/Organelleme/>

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・高次細胞機構研究部門・教授

研究者番号：80093061

(2) 研究分担者

林 誠 (HAYASHI MAKOTO)

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・准教授

研究者番号：50212155

(H20：連携研究者)