

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H04806

研究課題名(和文)植物のクチクラ形成の空間的制御機構の研究

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms underlying formation of the plant cuticle

研究代表者

田中 博和 (Tanaka, Hirokazu)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：10589922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物のクチクラ形成の制御の仕組みを理解するために、クチクラ成分の分泌に関わるABC輸送体であるABCG11の局在制御因子の探索を進めた。GFP-ABCG11を細胞内に蓄積する変異体として同定したW2243系統について、異常の原因となる変異を同定した。また、逆遺伝学的に制御因子の解析により、クラスリンアダプターや、低分子Gタンパク質 ARF1のABCG11の局在制御における役割を解析した。さらに、ABCG11の細胞膜局在に必要なアミノ酸配列についての知見を得るために、ABCG11に変異を導入し、複数の領域がABCG11が適切に細胞膜に局在するために必要であるという知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロイヌナズナのABCG11は、地上部の器官のクチクラ形成において、クチクラの主な構成要素であるクチンとワックスの両方の輸送に関わると考えられている極めて重要な輸送体である。ABCG11は細胞膜に局在することが適切に機能するために必要であると考えられるが、細胞膜にABCG11を分布されるためのしくみは十分に理解されていなかった。本研究ではABCG11の細胞膜局在に関与しうる制御因子の候補や、ABCG11の細胞膜局在に必要なアミノ酸配列を同定した。本研究で得られた変異型ABCG11や、制御因子などの研究材料を活用した研究を継続することで、ABCG11の局在制御機構の理解が深まると期待される。

研究成果の概要(英文)：The plant cuticle covers aerial organs such as leaves, stem and floral organs, and plays essential roles in water retention, defense against pathogen, and prevention of organ fusion during their development. In the present research, we have utilized an Arabidopsis ABC transporter ABCG11, which is mainly expressed in epidermis and promote cuticle formation. According to the previous studies, ABCG11 localizes at the plasma membrane of the epidermal cells and export cuticle precursor. Therefore, it is plausible to speculate that localization of ABCG11 at the plasma membrane is a prerequisite for its functionality. In order to understand the mechanisms involved in intracellular trafficking of ABCG11, we have carried out screening for the sequence-based determinant for ABCG11 localization, and genetic screen for regulatory components involved in ABCG11 localization.

研究分野：植物発生学

キーワード：クチクラ ABCトランスポーター 細胞膜 輸送体 膜交通 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

陸上植物の地上部の器官は疎水性の保護膜であるクチクラに覆われている。クチクラは、水分の蒸散や外敵の侵入を制限するバリアとしての機能や、葉の発生時に器官の独立性を保つ働きを持ち、植物の陸上環境への適応と、葉面積の拡大に大きく貢献したと考えられている。クチクラの主成分であるワックスやクチンの前駆体は細胞内で合成され、ABCG11などのABCトランスポーターにより細胞外に排出されると考えられている。ABCG11を欠くシロイヌナズナ変異体では、クチクラの減少に伴い、葉が互いに接着するという、典型的なクチクラ不全の表現型がみられる。また、*abcg11*変異体ではクチクラ関連脂質が細胞内に蓄積することが報告されている。ABCG11は主に表皮細胞で発現し、細胞膜に局在することは明らかになっていたが、その分布がどのようなしくみで制御されているかについてはほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

ABCG11の機能欠損変異体はクチクラ形成に強い異常を生じ、本来は細胞外に蓄積するようなクチクラ関連物質を細胞内に蓄積する。また、*abcg11*変異体はクチクラの異常に伴い器官の合着や稔性の低下などの表現型を示す。興味深いことに、ABCG11は細胞膜において外界面に偏って分布しており、その偏りはクチクラを外界側に形成することに貢献している可能性がある。このことから、ABCG11を適切に細胞膜に分布させるしくみは植物のクチクラ形成の空間的制御を理解する上で重要であると考えられる。そこで、本研究では(1) ABCG11のアミノ酸配列に含まれる局在化シグナルや、(2) ABCG11を細胞膜に局在させるために働く細胞内輸送の制御因子を同定することを試みた。

3. 研究の方法

(1) ABCG11の細胞膜局在に関わるアミノ酸配列の同定

ABCG11はN末端側にヌクレオチド結合ドメイン(NBD)、C末端側に膜貫通ドメイン(TMD)を持つ、ハーフトランスポーター型のタンパク質であると予想されている。本研究では、細胞質に露出すると考えられるN末端側のNBD領域に注目し、膜交通制御に関わるチロシンモチーフ様のアミノ酸配列と、ジロイシンモチーフ様のアミノ酸配列に注目し、チロシンとロイシンをアラニンに置換する様な変異を導入し、野生型ABCG11と変異型ABCG11をYFP融合タンパク質としてベンサミアナタバコとシロイヌナズナに発現させて、局在様式の変化を解析した。また、ABCG11のN末端側からの欠失変異体を作成し、配列と蛍光パターンとの対応関係の解析を行った。

(2) ABCG11の細胞内輸送に関わる因子の順遺伝学的解析

GFP-ABCG11を発現する形質転換シロイヌナズナの種子をエチルメタンスルホン酸(EMS)により変異原処理し、M2世代でGFPの蛍光パターンに異常を示す変異体を蛍光顕微鏡で観察することにより、変異体の候補を探索した。その結果、緑色の蛍光を細胞膜だけでなく細胞膜からも発する変異体を同定した。このうち、細胞内にGFPの蛍光が見られた変異体W2243とW2290について、変異の表現型に関わる遺伝子の染色体上の位置を決定し、さらにオルガネラマーカーを導入することで細胞内の異常の特徴を解析した。

(3) ABCG11の細胞内輸送に関わる因子の逆遺伝学的解析

順遺伝学的スクリーニングを補完するために、既知の膜交通因子としてクラスリンアダプター、ARF活性化因子BEN1、SNARE制御因子BEN2に変異を持つシロイヌナズナ変異体にGFP-ABCG11を導入し、GFPの蛍光パターンの解析を行った。また、膜交通因子の機能的冗長性により変異体での異常が見られない問題を部分的に回避するために、低分子Gタンパク質ARF1のGDP固定型変異体を作成し、一過的発現実験によりGFP-ABCG11の局在に対する効果を解析した。

4. 研究成果

(1) ABCG11 の細胞膜局在に関わるアミノ酸配列の同定

アミノ酸配列の解析の結果、ABCG11 の NBD 内には、チロシンモチーフ様のアミノ酸配列が3箇所、ジロイシンモチーフ様の配列が1箇所認められた。これらのモチーフに変異を導入した変異型 ABCG11 を YFP 融合タンパク質としてベンサミアナタバコの表皮細胞に発現させたところ、野生型配列の ABCG11 は細胞膜に主に蓄積したのに対して、変異型 ABCG11 は細胞内に蓄積した (図1)。さらに、ABCG11 の N 末端側を削った ABCG11 Δ N を YFP 融合タンパク質として同様に発現させたところ、細胞内に蓄積した。これらの結果から、ABCG11 の複数の領域が適切な構造を取ることが細胞膜への輸送に必要であることが示唆された。

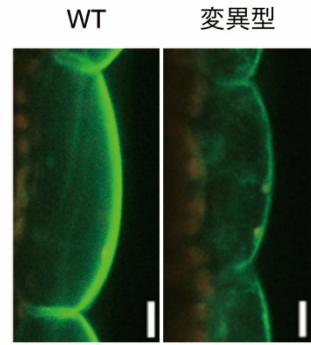


図1. 野生型と変異型の局在

(2) ABCG11 の細胞内輸送に関わる因子の順遺伝学的解析

W2243 系統は GFP-ABCG11 を細胞内に蓄積する表現型を示すだけでなく、個体が矮小化し、致死となる表現型を示した。変異の原因遺伝子を同定するために、Col 背景で得られた変異体を Ler 系統の野生型植物と交配し、F2 世代で幼植物が矮小化する個体を収集してマッピング解析を行った。解析の結果、W2243 系統の矮小化を引き起こす原因遺伝子は第3染色体上腕に位置しており、変異体では SNARE タンパク質をコードする遺伝子に変異が見つかった。SNARE タンパク質は小胞輸送の過程の膜融合を担う因子であることから、ABCG11 の輸送に関わる可能性が考えられた。W2243 系統を GFP-ABCG11 に戻し交配を行なった場合にも、この変異と GFP-ABCG11 の局在異常の表現型が連鎖していた。さらに、候補遺伝子を変異体に導入することで GFP-ABCG11 の局在が回復した (図1)。これらの結果から、W2243 変異体では SNARE 遺伝子の変異により ABCG11 が細胞内に異常に蓄積したと考えられた。W2243

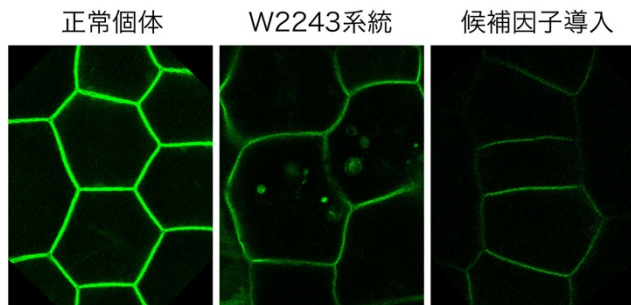


図2. W2243変異体におけるGFPの細胞内蓄積

と W2290 変異体にトランスゴルジ網の分子マーカー (BEN3-RFP) を導入し、共焦点顕微鏡により解析したところ、どちらの変異体でも GFP と RFP の分布が部分的に一致していたことから、変異体では ABCG11 がトランスゴルジ網の性質を持つ区画に蓄積していると考えられた。

(3) ABCG11 の細胞内輸送に関わる因子の逆遺伝学的解析

膜交通因子の変異体における ABCG11 の局在様式を解析するために、交配により GFP-ABCG11 を クラスリンアダプター AP1M2、ARF 活性化因子 BEN1/BIG5、SNARE 制御因子 BEN2/VPS45 の変異体に導入した。変異体における GFP-ABCG11 の局在を解析したところ、これらの変異体のうち、AP1M2 の変異体においては細胞内に GFP-ABCG11 が異常に蓄積していた。変異体に、さらにトランスゴルジ網に局在する分子マーカー (BEN3-RFP) とゴルジ体に局在する分子マーカー (Golgi-RFP) を導入し GFP と RFP の局在部位を共焦点顕微鏡により解析したところ、変異体において GFP-ABCG11 が細胞内に異常に蓄積している部位は、トランスゴルジ網に関連した区画であることが示唆された。ベンサミアナタバコを用いた一過的発現系により GFP-ABCG11 を葉の表皮細胞に発現させたところ、シロイヌナズナの場合と同様に細胞膜に主に局在することがわかった。GFP-ABCG11 と同時に小胞輸送因子 ARF1 の野生型遺伝子を発現させた場合には、GFP-ABCG11 の細胞膜局在は影響を受けなかったが、ARF1 の GDP 固定型変異体 (T31N) を発現させた場合には、GFP シグナルが細胞内から検出され、細胞膜局在が強く阻害された。この結果から、ARF1 依存的な膜交通系が ABCG11 の細胞内輸送に関わることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitakura Saeko, Adamowski Maciek, Matsuura Yuki, Santuari Luca, Kouno Hiroataka, Arima Kohei, Hardtke Christian S, Friml Jiri, Kakimoto Tatsu, Tanaka Hirokazu	4. 巻 58
2. 論文標題 BEN3/BIG2 ARF GEF is Involved in Brefeldin A-Sensitive Trafficking at the trans-Golgi Network/Early Endosome in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant & Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1801 ~ 1811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcx118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田愛子、河野啓貴、柿本辰男、田中博和
2. 発表標題 表皮分化に関わるALE2ホモログの機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中博和、田井聡美、橋口雄樹、柿本辰男
2. 発表標題 植物のクチクラ形成に関するABC輸送体の細胞膜局在に関わる局在化配列の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中博和、田井聡美、橋口雄樹、江口めぐみ、三谷啓太、柿本辰男
2. 発表標題 植物のクチクラ形成に関するABC輸送体の局在制御機構の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 博和, 田井 聡美, 橋口 雄樹, 鎌田 和, 柿本 辰男
2. 発表標題 植物のクチクラ形成に関する新規制御因子の探索
3. 学会等名 日本植物学会 第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋口 雄樹, 田井 聡美, 田中 左恵子, 柿本 辰男, 田中 博和
2. 発表標題 ABCG11の細胞膜への局在制御メカニズムの研究
3. 学会等名 日本植物学会 第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野 啓貴, 柿本 辰男, 田中博和
2. 発表標題 シロイヌナズナの表皮において細胞極性制御に関わる受容体型プロテインキナーゼの解析
3. 学会等名 日本植物学会 第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中博和, 田井聡美, 橋口雄樹, 鎌田和, 柿本辰男
2. 発表標題 植物のクチクラ形成に関するABC輸送体の局在制御因子の探索
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田井聡美、柿本辰男、田中博和
2. 発表標題 シロイヌナズナのPEL1/ABCG11タンパク質の細胞膜局在に関わる新規因子の探索
3. 学会等名 第11回トランスポーター研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田井聡美、柿本辰男、田中博和
2. 発表標題 植物のクチクラ形成関連輸送体 ABCG11 の局在制御に関わる因子の探索
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田井聡美、柿本辰男、田中博和
2. 発表標題 PEL1/ABCG11 タンパク質の細胞膜局在に関わる新規因子の探索
3. 学会等名 第58回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中博和
2. 発表標題 Genetic screen to identify endosomal trafficking components involved in localization of plasma membrane proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i>
3. 学会等名 第58回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------