

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：12611

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2022

課題番号：16KK0159

研究課題名（和文）植物におけるトランスゴルジ網（TGN）が担う高塩ストレス応答機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Molecular mechanism of salt stress response of the trans-Golgi network (TGN) in plants.(Fostering Joint International Research)

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） 11,700,000円

渡航期間： 1ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、塩ストレス応答への関与が報告されているNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>対向輸送体（NHX5, NHX6）の塩ストレス応答時の細胞内局在を解析した。その結果、NHX5は主にMVEに局在し液胞輸送経路で機能していることが示唆された。興味深いことに、塩ストレス処理により、TGNマーカーと共局在するNHX5-GFPの割合が減り、反対に、塩ストレス処理によりMVEマーカーや液胞輸送マーカーと共局在するNHX5の割合が有意に増加した。これらの結果から、TGNやMVE、小胞など、液胞輸送を介して液胞以外の膜構造にNa<sup>+</sup>を貯めることが塩ストレス応答において重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の塩ストレス応答における細胞レベルでの分子メカニズムは不明な点が多く残されていた。本研究では、TGN-MVE-液胞の輸送経路で塩ストレス応答の一部を担うことを明らかにした。塩害土壌で生育する農作物の開発に繋がる基礎的な知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the subcellular localization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-anti-transporters (NHX5 and NHX6) during salt stress response. The results suggest that NHX5 localizes mainly to MVEs, and functions in the vacuolar transport pathway. Interestingly, salt stress treatment decreased the percentage of NHX5-GFP dot-like structures that colocalized with the TGN. Conversely, salt stress treatment significantly increased the percentage of NHX5 dot-like structures that co-localized with MVEs. These results suggest that Na<sup>+</sup> storage in the membrane structures such as TGNs, MVEs, and novel vesicles, is important in the salt stress response.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：塩ストレス応答

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、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、研究者個人に帰属します。

様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

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、外部環境の「受容」や外部環境に対する「応答」を細胞・組織レベルでおこなうことで、植物個体が外部環境に対して頑強であることを維持している。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。我々は、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。一方、高塩ストレスと病原菌感染などの環境ストレス応答において、ポストゴルジ膜交通がどのように関与しているかについては分子レベルでは不明な点が多く残されていた。例えば、我々が単離した TGN 機能が損なわれた変異体 (*syp4* 変異体) は高塩ストレス耐性が低下した変異体であるが、「TGN 機能の欠失によってなぜ高塩ストレス耐性が低下するのか」については不明である。また、我々は高塩ストレス環境において細胞内のオルガネラの動態が大きく変化することをすでに見いだしているが、「オルガネラの動態・pH 変化がどのようにして植物に高塩耐性を付与しているか」についても明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

海外共同研究者の Eduardo Blumwald 博士 (University of California, Davis) の研究グループは、細胞内イオンホメオスタシスの研究をおこなう実験系を構築し、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターである NHX5 および NHX6 が TGN に局在すること、*nhx5nhx6* 二重変異体では高塩ストレス応答が異常になることを発見している。また、この二重変異体ではポストゴルジオルガネラの pH が野生型くらべて高くなっており、酸性化に異常があることも見いだしている。そこで国際共同研究では、(1) 高塩ストレス応答における TGN 酸性化と NHX5/NHX6 輸送機構の解析 (2) *nhx5nhx6* 変異体におけるオルガネラ動態の解析、の研究を行うことで、植物における TGN が担う高塩ストレス応答機構を明らかにすることを旨とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高塩ストレス応答における NHX5 および NHX6 のダイナミクスと局在解析

NHX5/NHX6 プロモーター制御下で NHX5/NHX6-XFP(GFP, YFP, mRFP)を発現する形質転換体を構築し、細胞内局在や塩ストレス応答の解析を行う。また、我々が既に確立している様々なオルガネラマーカーラインとの二色可視化形質転換体を作成し、高塩ストレス環境下で観察することにより高塩ストレスによって NHX5/NHX6 の局在がどのように変化するかを観察する。海外共同研究者のグループが開発した蛍光 pH プロブを用いて高塩ストレス状態での TGN を中心としたオルガネラ内腔の pH を測定することで、オルガネラの酸性化と NHX5/6 の生理機能についても明らかにする。

また、我々が単離した膜交通因子変異体、*syp4* 変異体 (TGN に局在する SNARE 分子の変異体で分泌経路、液胞輸送経路に異常) と *vam3* 変異体 (液胞膜に局在する SNARE 分子の変異体で液胞輸送経路に異常) は、興味深いことに高塩ストレスに対して逆の表現型を示す (高塩ストレスに対して、*syp4* 変異体は過敏応答を示すのに対して、*vam3* 変異体は耐性を示す)。そこで、NHX5/NHX6-XFP (NHX5/NHX6 プロモーターでの制御) を *syp4* 変異体および *vam3* 変異体でそれぞれ発現させて NHX5/NHX6

の細胞内局在および高塩ストレス処理によるダイナミクスを観察する。また、共免疫沈降により NHX5/NHX6 と相互作用する因子を網羅的に単離し、その中から高塩ストレス環境下特異的に相互作用する因子を同定する。

## (2) *nhx5nhx6* 変異体におけるオルガネラ動態の解析

*nhx5nhx6* 二重変異体に様々なオルガネラマーカーを発現させ、高塩ストレス環境下でその動態と pH の変化を観察する。また、Sodium Green で Na<sup>+</sup> を可視化することで、Na<sup>+</sup> が蓄積するオルガネラについても野生型と変異体で解析する。我々のグループはこれまでに超解像ライブイメージングによるオルガネラ動態の観察を進めてきた。長時間のライブイメージングが可能な観察条件を構築することで、高塩ストレスを与えた瞬間からの NHX5/NHX6 の動態を観察する。

## 4. 研究成果

### (1) 高塩ストレス応答における NHX5 および NHX6 のダイナミクスと局在解析

NHX5/NHX6 プロモーター制御下で NHX5/NHX6-XFP(GFP,YFP, mRFP)を発現する形質転換体を構築し、共焦点レーザー顕微鏡細胞内で観察したところ、ドット状のオルガネラに局在していることを確認した。これらドット状のオルガネラの正体を明らかにするために各種オルガネラマーカーとの比較をおこなった。その結果、NHX5/NHX6 は TGN に主に局在すると報告されていたが、TGN よりも MVE に主に局在することが明らかになった。また、NHX5 と液胞輸送マーカーとの共局在の割合は顕著に高く、NHX5 は MVE-液胞輸送経路で機能していることが示唆された。国際共同研究により取得・構築した塩ストレス応答の観察システムを用いて、塩ストレス応答における NHX5 の動態観察もおこなった。その結果、非常に興味深いことに、塩ストレス処理により、TGN マーカーと共局在する NHX5-GFP の割合が減り、逆に、MVE マーカーや液胞輸送マーカーのドットと共局在する NHX5 ドットの割合が有意に増加した。これらの結果から、NHX5/NHX6 は塩ストレス応答に応じてその細胞内局在を変化させ、液胞輸送経路を活性化することで塩ストレスに応答していることが示唆された。

### (2) *nhx5nhx6* 変異体におけるオルガネラ動態の解析

*nhx5/nhx6* 二重変異体に TGN マーカーを発現するラインを構築した。共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、*nhx5/nhx6* 二重変異体では TGN の形態には異常がないことが明らかになった。そこで海外共同研究者と議論し、SNARE 変異体における塩ストレスに対する感受性の変化が、NHX5 の細胞内動態に起因するものかどうかを調べることにした。まず、SNARE 変異体 *syp42syp43*、*syp22* で、NHX5-GFP の局在を確認した。その結果、塩ストレスの有無に関係せず、野生型と SNARE 変異体で NHX5-GFP のドット状の局在に差は見られなかった。そこで、Wortmannin 処理により液胞輸送の一部を止めて観察を行った。SNARE 変異体での観察をおこなう前に、NHX5 に対する Wortmannin の効果を確かめるために NHX5 とオルガネラマーカーを蛍光標識した野生型細胞で観察をおこない、NHX5-GFP は Wortmannin 処理によって MVE 由来のリング状に局在する様子が観察された。MVE マーカーも Wortmannin 処理によってリング状の局在が見られ、そのリング状の構造で NHX5-GFP と共局在していたことから、このリング状の構造は MVE 由来だと考えられた。次に、SNARE 変異体で観察を行うと、塩ストレスの有無に関係せず、*syp42syp43* では野生型と同様に NHX5-GFP のリング状に局在する様子

が見られたが、*syp22* では NHX5 のリング状局在は観察されなかった。これらの結果から、*syp22* では MVE 形成異常が起きていると考えられた。

TGN に局在する SNARE タンパク質の二重変異体 *syp42syp43*、液胞膜に局在のする SNARE タンパク質の単独変異体 *syp22*、この 2 つを交配して新たに作出した三重変異体 *syp42syp43syp22* の表現型を塩ストレス下で観察した。*syp42syp43*、*syp42syp43syp22* は野生型に比べて、塩ストレスへの感受性が高くなった。その一方で、*syp22* は野生型に比べて、塩ストレスに耐性を示した。三重変異体 *syp42syp43syp22* が *syp22* ではなく、*syp42syp43* と同様の塩ストレスへの感受性が見られたことから、液胞膜局在の SYP22 の欠損で生じた高塩耐性付与のメカニズムの上流で、TGN 局在の SYP4 がはたらくと考えられ、塩ストレス応答時における TGN 機能の重要性が示唆された。

塩ストレス応答を可視化するために、CoroNa-Green 染色による Na<sup>+</sup>の観察の観察システムを構築した。*nhx5/nhx6* 二重変異体、SNARE 変異体、野生型で Na<sup>+</sup>蓄積の観察をおこなった。*syp42syp43* は野生型に比べて蛍光が弱く、液胞への Na<sup>+</sup>隔離能力が低下していると考えられた。*syp22* は野生型と同程度の蛍光強度であったが、液胞の他に小さな Na<sup>+</sup>蓄積区画が確認されたため、液胞に加えてこの様な小さい膜構造中にとは別にサイトゾルからの Na<sup>+</sup>を隔離していると考えられた。

長時間のライブイメージングが可能な観察条件（サンプル調整法、レーザーの強度、スキャン速度等）を詳細に検討し、観察しながら培地を交換することで、高塩ストレスを与えた瞬間からの NHX5/NHX6 の動態を観察するシステムの構築もおこなったが、サンプルの厚みの問題が解決しなため、現在も継続中である。

新型コロナウイルスの世界的な感染拡大により現地での共同研究実施が困難となったため、オンラインを活用してディスカッションしながら研究を推進した。

## 論文

1. Ito, E. and **\*Uemura, T.** (2022) RAB GTPases and SNAREs at the trans-Golgi network in plants. *J Plant Res*, 135:389-403  
DOI: 10.1007/s10265-022-01403-x
2. Shimizu, Y. and **\*Uemura, T.** (2022) The sorting of cargo proteins in the plant trans-Golgi network. *Frontiers in Plant Science*, 13:957995.  
DOI: 10.3389/fpls.2022.957995
3. **\*Ito, Y.** and **Uemura, T.** (2022) Super resolution live imaging: The key for unveiling the true dynamics of membrane traffic around the Golgi apparatus in plant cells. *Frontiers in Plant Science*, 13:1100757.  
DOI: 10.3389/fpls.2022.1100757

## 総説

1. **植村知博**、吉田大和 光によって拓く植物細胞内の真の構造機能・はじめに (2022) *Plant Morphology*, 34-1-3. DOI: 10.5685/plmorphol.34.1
2. 清水優太郎、**植村知博** トランスゴルジ網における積荷選別様式を可視化 (2022) *化学と生物*, 60 巻 5 号 215-217. DOI:10.1271/kagakutoseibutsu.60.215

## 学会発表

1. 植村知博（招待講演）”植物 TGN におけるタンパク質輸送選別ゾーンの可視化” 第 23 回オルガネラワークショップ（2021 年 3 月 13 日.オンライン開催）
2. 井上柚紀, 清水優太郎, 伊藤瑛海, 中野明彦, 植村知博 “TGN-液胞間の輸送が制御する塩ストレス応答” 第 62 回日本植物生理学会年会（2021 年 3 月 14-16 日, オンライン開催）
3. 井上 柚紀, 清水優太郎, 伊藤瑛海, 中野明彦, 植村知博 “TGN-液胞間の輸送が制御する塩ストレス応答 “日本植物学会第 85 回大会（2021 年 9 月 16-20 日.オンライン開催）
4. 植村知博（招待講演）“膜交通が制御する物質輸送ダイナミクス” 第 64 回日本植物生理学会年会（2023 年 3 月 10-17 日. 東北大学川内キャンパス）
5. 井上柚紀, 清水優太郎, 伊藤瑛海, 中野明彦, 植村知博 “TGN-液胞間の輸送が制御する塩ストレス応答” JANPER & 細胞骨格研究会合同大会（2022 年 8 月 29-31 日. 島根大学松江キャンパス）
6. 井上柚紀, 清水優太郎, 伊藤瑛海, 中野明彦, 植村知博 “NHX5/6 は MVE に主に局在する” 日本植物学会第 86 回大会（2022 年 9 月. 京都府立大学）
7. 井上柚紀, 清水優太郎, 伊藤瑛海, 中野明彦, 植村知博 “塩ストレス応答における NHX5/6 の局在解析” 第 64 回日本植物生理学会年会（2023 年 3 月 10-17 日. 東北大学川内キャンパス）

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimada Takashi L, Betsuyaku Shigeyuki, Inada Noriko, Ebine Kazuo, Fujimoto Masaru, Uemura Tomohiro, Takano Yoshitaka, Fukuda Hiroo, Nakano Akihiko, Ueda Takashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Enrichment of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in the Extra-Invasive Hyphal Membrane Promotes Colletotrichum Infection of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1514 ~ 1524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz058	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 -
1. 著者名 Ito Emi, Uemura Tomohiro	4. 巻 135
2. 論文標題 Correction to: RAB GTPases and SNAREs at the trans-Golgi network in plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 703 ~ 703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01403-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Yutaro, Uemura Tomohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 The sorting of cargo proteins in the plant trans-Golgi network	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 957995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.957995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Yoko, Uemura Tomohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Super resolution live imaging: The key for unveiling the true dynamics of membrane traffic around the Golgi apparatus in plant cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 957995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.1100757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uemura Tomohiro, Yoshida Yamato	4. 巻 34
2. 論文標題 はじめに	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 1~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.34.1	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 -

1. 著者名 SHIMIZU Yutaro, UEMURA Tomohiro	4. 巻 60
2. 論文標題 最先端イメージングで迫るトランスゴルジ網の積荷選別機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 215~217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.60.215	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上 袖紀, 清水優太郎, 伊藤瑛海, 中野明彦, 植村知博
2. 発表標題 TGN-液胞間の輸送が制御する塩ストレス応答
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村知博
2. 発表標題 植物TGNにおけるタンパク質輸送選別ゾーンの可視化
3. 学会等名 第23回オルガネラワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 柚紀, 清水優太郎, 伊藤瑛海, 中野明彦, 植村知博
2. 発表標題 TGN-液胞間の輸送が制御する塩ストレス応答
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川陽子, 藤巻あかり, 羅永茗, 棕田航生, 新井麻由, 植村知博, Boutt Yohann, 中野明彦, 佐藤長緒, 山口淳二
2. 発表標題 膜局在型ユビキチンリガーゼATL31とSNAREタンパク質SYP61 を介したC/N 栄養応答制御機構の解析
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 井上 柚紀, 清水優太郎, 伊藤瑛海, 中野明彦, 植村知博
2. 発表標題 TGN-液胞間の輸送が制御する塩ストレス応答
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村知博
2. 発表標題 膜交通が制御する物質輸送ダイナミクス
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 井上柚杞、清水優太郎、伊藤瑛海、中野明彦、植村知博
2. 発表標題 TGN-液胞間の輸送が制御する塩ストレス応答
3. 学会等名 JANPER & 細胞骨格研究会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上柚杞、清水優太郎、伊藤瑛海、中野明彦、植村知博
2. 発表標題 NHX5/6はMVEに主に局在する
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上柚杞、清水優太郎、伊藤瑛海、中野明彦、植村知博
2. 発表標題 塩ストレス応答におけるNHX5/6の局在解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	E D U A R D O B l u m w a l d  (Eduardo Blumwald)	カリフォルニア大学デービス校・Professor・Department of Plant Sciences	

	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
その他の研究協力者	E l i a s B a s s i l  (Elias Bassil)	フロリダ大学・Institute of Food and Agricultural Sciences・Assistant Professor	

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			
米国	University of California, Davis校			
米国	University of Florida			