

令和元年5月27日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19412

研究課題名(和文)オルガネラ創造の基盤構築を目指したゼニゴケ油体形成機構の研究

研究課題名(英文)Studies on mechanisms of Oil body biogenesis in Marchantia polymorpha

研究代表者

上田 貴志(Ueda, Takashi)

基礎生物学研究所・細胞動態研究部門・教授

研究者番号：10311333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゼニゴケを含む苔類は、進化の過程で油体という独自のオルガネラを獲得し、そこに様々な生理活性物質を蓄積している。本研究では、この油体がどのように形成されるのかを明らかにするとともに、その分子装置が植物の進化の過程でどのように獲得されたのか、もしくはどのような機能的多様化の結果新たなオルガネラを構築する機能が備わったのかを明らかにすることを目指した。その結果、油体が細胞板と非常に似た仕組みでつくられ、そこに細胞骨格が深く関与すること、および単一の転写因子の過剰発現が油体形成を誘導できることを明らかにした。さらに、その転写因子の下流で機能する遺伝子群を網羅的に同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

油体のような真核生物のある系統が特異的に獲得したオルガネラの生成機構を明らかにすることで、真核生物におけるオルガネラの進化の道筋を再構成することが可能となると期待される。さらに、オルガネラ新生の分子機構の知見は、新たなオルガネラを創り出すための基盤技術の開発に繋がる可能性もある。また、ゼニゴケの油体には抗真菌活性や抗がん活性、抗ウイルス活性を呈すると報告されている化合物が含まれており、油体形成ではたらく遺伝子群の網羅的な同定が、これらの物質の合成機序の解明につながることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Liverworts including *Marchantia polymorpha* possess a liverwort-unique organelle, which is referred to as the oil body. The oil body has been known to contain various bioactive compounds including Marchantin, however, molecular mechanisms of oil body biogenesis remains totally unknown. In this study, aimed to unravel molecular mechanisms of oil body formation, we found that formation of the oil body and the cell plate share many machineries including SNARE proteins and microtubules. We also discovered the master regulator of oil body biogenesis, whose overexpression results in ectopic oil body formation. Furthermore, we systematically identified genes acting under the regulation of the master transcription factor for oil body formation.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：苔類 油体 進化 分泌経路 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の単膜系オルガネラ機能の研究は、種子や塊根における貯蔵タンパク質の栄養源としての重要性に注目した研究に端を発し、その後オルガネラ機能の発現機構、オルガネラ間の物質輸送を支える膜交通の分子機構、環境応答やボディプランの決定などの高次機能発現における各オルガネラの役割へとその研究対象が拡大してきた。その結果、植物のオルガネラの機能や形態、膜交通の制御機構が、いずれも動物や菌類とは大きく異なることが明らかとなっており、他生物とのアナロジーのみでは植物のオルガネラ機能がいかに獲得されてきたのかを理解することが不可能であることが認識されている。また、動物、微生物、原虫などにおいても、それぞれに高度に多様化・特殊化した膜交通の仕組みが存在することが示されているが、膜交通の多様化と進化に介在した分子メカニズムの実証的な解明はいずれの生物においてもほとんど行われていない。植物がいかにして独自のオルガネラを獲得してきたのかを解明するとともに、その知見をもとに新たなオルガネラを創造し植物細胞に新規の形質を付与するためには、植物のオルガネラがいかにして構築され、どのような分子基盤の上にその機能を発現しているのかの解明が求められる。

2. 研究の目的

本研究の究極的な目的は、生物、特に植物におけるオルガネラ進化の歴史を再構成するとともに、その知見を応用し、植物細胞における新規オルガネラを創造することである。この目的達成のための端緒として、本研究提案では、ゼニゴケを含む苔類が進化の過程で特異的に獲得した“油体”をモデルとして採り上げ、その形成機構を解明するため、油体に局在するタンパク質を網羅的に同定することを目指した。

3. 研究の方法

当初は、ゼニゴケの葉状体をプロトプラスト化して油体細胞を単離し、そこから油体を単離した後にプロテオーム解析を行い、油体タンパク質を網羅的に同定することを目指していた。一方で、順遺伝学的なアプローチにより油体の分布パターンが異常となる変異体の探索を並行して行った。プロトプラスト化の条件検討を進めていた際に、順遺伝学的解析により、油体形成のマスター転写因子を単離することに成功し、油体の形成を制御することが可能になった。そこで、このマスター転写因子により転写が誘導される遺伝子群を過剰発現体と機能欠失変異体の RNA-seq 解析により網羅的に同定した。続いて、得られた候補遺伝子群の中から膜タンパク質と予測されたものについて細胞内局在解析を行い、油体膜への局在を確認した。

4. 研究成果

これまでに確立している他の植物のプロトプラスト化法ではゼニゴケ葉状体のプロトプラスト化がうまく行えなかったことから、プロトプラスト化の条件検討を進めた。ゼニゴケを栄養源として培養したカビやキノコの培養液から酵素画分を分取し、プロトプラスト化を試みたところ、有望な結果が得られたため、この方法をさらに洗練させるべく条件検討を行う過程で、順遺伝学的な解析において著しい進展が得られた。

ゼニゴケの無性芽において油体の分布パターンが異常となる変異体をスクリーニングする過程で、油体の数が極端に増加する変異体を得られた。この変異体の責任遺伝子を同定し、変異の影響を解析したところ、ある転写因子(ここでは TF1 と呼ぶ)が過剰に発現していることが明らかとなった。そこで、TF1 の遺伝子破壊株をゲノム編集により作成しその影響を調べたところ、変異体では油体が全く形成されなかった。これらの結果から、TF1 が油体形成のマスター制御転写因子であると結論づけた。この転写因子の発見により、葉状体において油体形成を自在に誘導できるようになったため、TF1 により発現が誘導される遺伝子を同定することで油体で機能するタンパク質を網羅的に単離することにした。

TF1 により発現が誘導される遺伝子を網羅的に同定するため、野生型、TF1 過剰発現株、TF1 ノックアウト株のトランスクリプトームを RNA-seq 解析により調べ、3 者の間で比較した。その結果、TF1 により発現が制御されている遺伝子群の候補を得た。発現量に有意な変動が見られた遺伝子群の中から、TF1 過剰発現株で野生型と比較し発現が上昇し、ノックアウト株で発現が検出されなくなるものを抽出し、TF1 で発現が誘導される遺伝子群の候補リストを得た(図 1)。それらの中から、特に膜に局在すると予測されるタンパク質について、蛍光タンパク質を融合したキメラ遺伝子を導入し、細胞内局在を調べた。その結果、図 2 に例を示すように油体膜に局在するタンパク質を多数単離することに成功した。現在これらのタンパク質の機能を欠失した変異体をゲノム編集により作成することで、油体形成に及ぼす影響を調べるべく実験を継続している。



図 1 TF1 の下流で機能する遺伝子群の網羅的同定

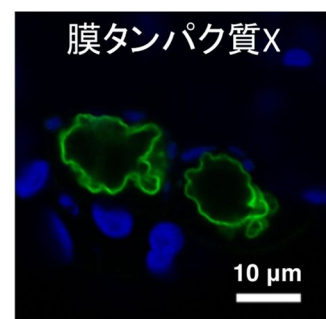


図 2 単離された油体膜タンパク質の一例

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件) 全て査読有

- 1) Uemura, T., Nakano, T.R., Takagi, J., Wang, Y., Kramere, K., Finkemeier, I., Nakagami, H., Tsuda, K., Ueda, T., Schulze-Lefert, P. and Nakano, A. (2019) A Golgi-released subpopulation of the trans-Golgi network mediates constitutive and pathogen-inducible protein secretion in Arabidopsis. *Plant Phys.*, 179, 519-532, doi: <https://doi.org/10.1104/pp.18.01228>
- 2) Cui, Y., Cao, W., He, Y., Zhao, Q., Wakazaki, M., Zhuang, X., Gao, J., Zeng, Y., Gao, C., Ding, Y., Wong, H.Y., Wong, W.S., Lam, H.K., Wang, P., Ueda, T., Rojas-Pierce, M., Toyooka, K., Kang B.H. and Jiang L. (2019) A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in Arabidopsis root cells. *Nature Plants*, 5, 95-105, doi: <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0328-1>
- 3) Muro, K., Matsuura-Tokita, K., Tsukamoto, R., Kanaoka, M.M., Ebine, K., Higashiyama, T., Nakano, A. and Ueda, T. (2018) ANTH domain-containing proteins are required for the pollen tube plasma membrane integrity via recycling ANXUR kinases. *Commun. Biol.*, 1, 152, doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0158-8>
- 4) Fujimoto, M., Sazuka, T., Oda, Y., Kawahigashi, H., Wu, J., Takanashi, H., Ohnishi, T., Yoneda, J., Ishimori, M., Kajiya-Kanegae, H., Hibara, K., Ishizuna, F., Ebine, K., Ueda, T., Tokunaga, T., Iwata, H., Matsumoto, T., Kasuga, S., Yonemaru, J., and Tsutsumi, N. (2018) Transcriptional switch for programmed cell death in pith parenchyma of sorghum stems. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 115, E8783-E8792, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1807501115>
- 5) Takamitsu Kurusu, T., Mitsuka, D., Yagi, C., Kitahata, N., Tsutsui, T., Ueda, T., Yamamoto, Y., Negi, J., Iba, K., Betsuyaku, S., Kuchitsu, K. (2018) Involvement of S-type anion channels in disease resistance against an oomycete pathogen in Arabidopsis seedling. *Commun. Integr. Biol.*, 11, 1-6, doi: <https://doi.org/10.1080/19420889.2018.149500>
- 6) Ito, E., Ebine, K., Choi, S., Uemura, T., Nakano, A. and Ueda, T. (2018) Integration of two RAB5 groups during endosomal transport in plants. *eLife*, 7: e34064, doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.3406>
- 7) Takemoto, K., Ebine, K., Askani, J.C., Krüger, F., Ito, E., Goh, T., Schumacher, K., Nakano, A. and Ueda, T. (2018) Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 115: E2457-E2466, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1717839115>
- 8) Minamino, N., Kanazawa, T., Era, A., Ebine, K., Nakano, A. and Ueda, T. (2018) RAB GTPases in the basal land plant *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Phys.*, 59, 850-861, doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy027>
- 9) Sánchez-Rodríguez, C., Yanyun Shi, Y., Kesten, C., Zhang, D., Sancho-Andrés, G., Ivakov, A., Lampugnani, E.R., Sklodowski, K., Fujimoto, M., Nakano, A., Bacic, A., Wallace, I.S., Ueda, T., van Damme, D., Zhou, Y. and Persson, S. (2017) The cellulose synthases are cargo of the TPLATE adaptor complex. *Mol. Plant*, 11, 346-349, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.012>
- 10) Bowman, J.L. *et al.*, ... Ueda, T., (113人中104番目) ... (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*, 171, 287-304, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030>

- 11) Matsui, H., Nomura, Y., Egusa, M., Hamada, T., Hyon, G.S., Kaminaka, H., Watanabe, Y., Ueda, T., Trujillo, M., Shirasu, K., and Nakagami, H. (2017) The GYF domain protein PSIG1 dampens the induction of cell death during plant-pathogen interactions. *PLOS Genet.*, 13, e1007037, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007037>
- 12) Ung, H., Karia, P., Ebine, K., Ueda, T., Yoshioka, K., and Moeder, W. (2017) Triphosphate Tunnel Metalloenzyme Function in Senescence Highlights a Biological Diversification of This Protein Superfamily. *Plant Phys.*, 175, 473-485, doi: 10.1104/pp.17.00700
- 13) Inada, N., Ebine, K., Ito, E., Nakano, A. and Ueda, T. (2017) Constitutive activation of plant-specific RAB5 GTPase confers increased resistance against adapted powdery mildew fungus. *Plant Biotech.*, 34, 89-95, doi: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.0501a>
- 14) Ito, Y., Toyooka, K., Fujimoto, M., Ueda, T., Uemura, T. and Nakano, A. (2017) The *trans*-Golgi network and the Golgi stacks behave independently during regeneration after Brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Phys.*, 58, 811-821, doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx028>
- 15) Minamino, N., Kanazawa, T., Nishihama, R., Yamato, T.K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Nakano, A. and Ueda, T. (2017) Dynamic reorganization of the endomembrane system during spermatogenesis in *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* 130: 433-441, doi: 10.1007/s10265-017-0909-5
- 16) Kanazawa, T. and Ueda, T. (2017) Exocytic trafficking pathways in plants: why and how they are redirected. *New Phytol.*, 215: 952-957, doi: 10.1111/nph.14613

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) Takashi Ueda (invited speaker) Roles and regulation of membrane traffic in spermatogenesis of *Marchantia polymorpha*. EMBO workshop “New shores in land plant evolution” 2018
- 2) Takashi Ueda (co-organizer and invited speaker) Adaptor proteins involved in clathrin-mediated endocytosis in plant cells. CoB workshop “Cellular gateways: expanding the role of endocytosis in plant development” 2018
- 3) Takashi Ueda (invited speaker) Diversification of membrane trafficking pathways during land plant evolution unraveled with *Marchantia polymorpha*. The 65th NIBB conference Renaissance of *Marchantia polymorpha* –the genome and beyond–, 2017
- 4) Takashi Ueda (invited speaker) Evolution of plant membrane trafficking system driven by diversification of RAB and SNARE proteins. 4th AoE Symposium on Organelle Biogenesis and Function, 2017
- 5) Takashi Ueda (invited speaker) Diversification of membrane trafficking pathways during land plant evolution. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017
- 6) Takashi Ueda (invited speaker) Diversification of membrane trafficking pathways during land plant evolution. SEB Gothenburg 2017, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/cellular/>

<http://www.nibb.ac.jp/cellular/en/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：金澤 建彦

ローマ字氏名：Kanazawa Takehiko

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、研究者個人に帰属されます。