

平成 2 1 年 6 月 2 6 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2005～2008

課題番号：18208002

研究課題名（和文） 植物のプログラム細胞死におけるミトコンドリアの役割

研究課題名（英文） The role of mitochondria in programmed cell death in higher plants

研究代表者

氏名（アルファベット）堤 伸浩（TSUTSUMI NOBUHIRO）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 0 0 2 0 2 1 8 5

研究成果の概要：

植物に特有のミトコンドリア分裂因子 ELM1 を新たに同定した。このタンパク質は、ミトコンドリア分裂時に分裂装置の一つであるダイナミン様タンパク質 DRP3 をミトコンドリアヘリクルートする機能を持っていた。花粉成熟の過程でタペート組織が崩壊する際に、ミトコンドリアが約室内に放出されることを新たに見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2 0 0 6 年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2 0 0 7 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2 0 0 8 年度	16,300,000	4,890,000	21,190,000
年度			
年度			
総計	35,300,000	10,590,000	45,890,000

研究分野：植物分子育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：タペート，ミトコンドリア分裂，ELM1

## 1. 研究開始当初の背景

植物のプログラム細胞死 (programmed cell death; PCD) は、配偶子形成から受精，胚発生，器官分化，植物個体の死に至るすべての

ステージにおいて植物の正常な発生に必須である。たとえば老化葉から新生器官への細胞構成成分の転流も、巨視的に見るとプログラム細胞死の大きな機能のひとつである。こ

のように、植物のプログラム細胞死は農業生産上極めて重要な機構であるにもかかわらず、その詳細はほとんど知られていない。

ミトコンドリアは、細胞内のエネルギー産生以外にさまざまな機能を有することが、動物を用いた研究で明らかになってきた。動物においては、プログラム細胞死の初期の段階でミトコンドリアへの  $Ca^{2+}$  の流入、シトクローム c のミトコンドリアから細胞質への放出など、ミトコンドリアがプログラム細胞死に至る不可逆なプロセスへのスイッチとして重要な役割を持つことが判明している。線虫や哺乳動物では、プログラム細胞死に先立ち、ミトコンドリアの分裂が活性化して断片化すること、ミトコンドリアの分裂を阻害するとプログラム細胞死が起こらないことが示された。

植物の生活環においては、花粉形成時に最もエネルギーを必要とすると考えられ、ミトコンドリアの機能に異常があると、他の生育相では影響を受けないにもかかわらず、正常な花粉が形成されなくなる。これは、雄性不稔あるいは雑種不稔などの現象として顕在化する。ミトコンドリアの機能不全の影響はタペート細胞において最も顕著に現れると考えられている。タペータムは非常に短命な組織であるが、花粉母細胞から花粉形成の期間、花粉が必要とする物質はすべてこの組織を通して行われ、自らも崩壊して栄養となるきわめて重要な器官である。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアのダイナミクス、特に分裂と融合に関する遺伝子を新たに単離するとともに、すでにわれわれが同定したミトコンドリア分裂に関連するタンパク質 (DRP3a, DRP3b, FIS1) を含めて、ミトコンドリア分裂・融合装置を構成するタンパク質相互の関係を明らかにすることで、高等植物のミトコンドリアの分裂融合の仕組みを解明する。さらに、これらの遺伝子を高発現させた形質転換植物体、あるいは遺伝子発現を抑えた形質転換植物体を用いて、個体レベル、細胞レベル、オルガネラレベルでの影響を明らかにする。特にタペート細胞の成熟やプログラム細胞死に与える影響を調べることで、ミトコンドリアの分裂融合と花粉形成時におけるタペート細胞の機能との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (a) ミトコンドリア分裂因子の同定

ミトコンドリアを GFP で可視化したシロイヌナズナに化学変異原で突然変異を誘発し、その後代の植物体でミトコンドリアが長大化する突然変異系統を蛍光顕微鏡観察により選抜した。得られた突然変異の候補原因遺伝子をマッピング

により同定した。同定した野生型の遺伝子を突然変異系統に形質転換して相補することを確認した。

### (b) タペート細胞におけるミトコンドリアのダイナミクス

薬中の細胞でミトコンドリアを容易に観察するために、薬でのみ発現する各種プロモータを付加したミトコンドリア移行型 Kaede (波長変換可能な蛍光タンパク質) 遺伝子を構築した。この遺伝子を導入した形質転換イネおよびシロイヌナズナを利用して、タペートの細胞死過程におけるミトコンドリアの動態を観察した。

## 4. 研究成果

### (a) ミトコンドリア分裂因子の同定と機能

新たにミトコンドリア分裂因子 ELM1 を同定した。この因子は、動物や酵母には存在しない植物特異的な因子である。酵母ツーハイブリッド法、および BiFC 法により、ELM1 タンパク質が DRP3 との相互作用を持つ事が明らかとなった。また、ELM1 が欠損すると、DRP3 タンパク質がミトコンドリアに局在しなくなるのに対し、DRP3 の変異体では ELM1 のミトコンドリア外膜への局在は影響を受けなかった。この事から、ELM1 は DRP3 をミトコンドリアにリクルートする機能があることがわかった。また、DRP3 は、ミトコンドリアとペルオキシソームの分裂装置として機能するが、ELM1 はペルオキシソームの分裂には影響を与えなかったことから、ミトコンドリア特異的な分裂装置であると考えられた。

### (b) タペート細胞におけるミトコンドリアのダイナミクス

薬中の細胞でミトコンドリアを容易に観察するために、薬で発現する各種プロモータを付加したミトコンドリア移行型 Kaede (波長変換可能な蛍光タンパク質) 遺伝子を構築した。この遺伝子をシロイヌナズナ、およびイネに形質転換した。その結果、花粉形成の過程でタペート細胞が崩壊する前後にミトコンドリアが薬室に放出される事がわかった。これまで知られているプログラム細胞死では、細胞の前にオルガネラが崩壊する。今回われわれが観察した結果では、完全な形のミトコンドリアがタペート細胞の外に放出されており、非常にユニークなプログラム細胞死がタペート細胞で起こっていることが示唆された。

## 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 件)

- Arimura, S., Fujimoto, M., Doniwa, Y., Kadoya, N., Nakazono, M., Sakamoto, W., and Tsutsumi, N. (2008). Arabidopsis ELONGATED MITOCHONDRIA1 is required for localization of DYNAMIN-RELATED PROTEIN3A to mitochondrial fission sites. *Plant Cell* 20, 1555-1566.
- Arimura, S.I., Feng, X.G., Sakamoto, W., and Tsutsumi, N. (2006). Isolation of Arabidopsis mutants with defect in mitochondrial morphology. *Genes & Genetic Systems* 81, 451-451.
- Fujimoto, M., Arimura, S.I., Nakazono, M., and Tsutsumi, N. (2008). Arabidopsis dynamin-related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the leading edge of the forming cell plate. *Plant Cell Reports* 27, 1581-1586.
- Fujimoto, M., Arimura, S., Mano, S., Kondo, M., Saito, C., Ueda, T., Nakazono, M., Nakano, A., Nishimura, M., and Tsutsumi, N. (2009). Arabidopsis dynamin-related proteins DRP3A and DRP3B are functionally redundant in mitochondrial fission, but have distinct roles in peroxisomal fission. *Plant Journal* 58, 388-400.
- Hobo, T., Suwabe, K., Aya, K., Suzuki, G., Yano, K., Ishimizu, T., Fujita, M., Kikuchi, S., Hamada, K., Miyano, M., Fujioka, T., Kaneko, F., Kazama, T., Mizuta, Y., Takahashi, H., Shiono, K., Nakazono, M., Tsutsumi, N., Nagamura, Y., Kurata, N., Watanabe, M., and Matsuoka, M. (2008). Various Spatiotemporal Expression Profiles of Anther-Expressed Genes in Rice. *Plant and Cell Physiology* 49, 1417-1428.
- Kubo, N., Arimura, S., Tsutsumi, N., Kadowaki, K., and Hirai, M. (2006). Isolation and characterization of the pea cytochrome c oxidase Vb gene. *Genome* 49, 1481-1489.
- Kubo, N., Fujimoto, M., Arimura, S., Hirai, M., and Tsutsumi, N. (2008). Transfer of rice mitochondrial ribosomal protein L6 gene to the nucleus: acquisition of the 5'-untranslated region via a transposable element. *Bmc Evolutionary Biology* 8.
- Matsushima, R., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Arimura, S., Sodmergen, Tsutsumi, N., and Sakamoto, W. (2008). Mitochondrial dynamics in plant male gametophyte visualized by fluorescent live imaging. *Plant and Cell Physiology* 49, 1074-1083.
- Meguro, N., Tsuji, H., Suzuki, Y., Tsutsumi, N., Hirai, A., and Nakazono, M. (2006). Analysis of expression of genes for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in maize during submergence and following re-aeration. *Breeding Science* 56, 365-370.
- Nagano, M., Ihara-Ohori, Y., Imai, H., Inada, N., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2009). Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b(5). *Plant Journal* 58, 122-134.
- Roy, S., Ueda, M., Murata, J., and Tsutsumi, N. (2008). The intermediate stages of chloroplast rpl32 gene transfer in Malpighiales. *Genes & Genetic Systems* 83, 496-496.
- Saika, H., Matsumura, H., Takano, T., Tsutsumi, N., and Nakazono, M. (2006). A point mutation of Adh1 gene is involved in the repression of coleoptile elongation under submergence in rice. *Breeding Science* 56, 69-74.
- Saika, H., Okamoto, M., Kushiro, T., Shinoda, S., Jikumaru, Y., Fujimoto, M., Miyoshi, K., Arikawa, T., Arimura, S.I., Kamiya, Y., Tsutsumi, N., Nambara, E., and Nakazono, M. (2007a). Ethylene promotes submergence-induced expression of OsABA8ox1, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice, pp. S28-S28.
- Saika, H., Okamoto, M., Miyoshi, K., Kushiro, T., Shinoda, S., Jikumaru, Y., Fujimoto, M., Arikawa, T., Takahashi, H., Ando, M., Arimura, S., Miyao, A., Hirochika, H., Kamiya, Y., Tsutsumi, N., Nambara, E., and Nakazono, M. (2007b). Ethylene promotes submergence-induced expression of OsABA8ox1, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. *Plant and Cell Physiology* 48, 287-298.
- Suwabe, K., Suzuki, G., Takahashi, H., Shiono, K., Endo, M., Yano, K., Fujita, M., Masuko, H., Saito, H., Fujioka, T., Kaneko, F., Kazama, T., Mizuta, Y., Kawagishi-Kobayashi, M., Tsutsumi, N., Kurata, N., Nakazono, M., and Watanabe, M. (2008). Separated Transcriptomes of Male Gametophyte and Tapetum in Rice: Validity of a Laser Microdissection (LM) Microarray. *Plant and Cell Physiology* 49, 1407-1416.
- Suzuki, T., Toriba, T., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Kitano, H., and Hirano, H.Y. (2006). Conservation and diversification of meristem maintenance mechanism in *Oryza sativa*:

- Function of the FLORAL ORGAN NUMBER2 gene. *Plant and Cell Physiology* 47, 1591-1602.
- Takahashi, H., Saika, H., Matsumura, H., Nishizawa, N.K., Tsutsumi, N., and Nakazono, M. (2007). Expression profiling in the coleoptile of rice reduced adh activity (rad) mutant using Laser Microdissection, pp. S190-S190.
- Takanashi, H., Arimura, S.I., and Tsutsumi, N. (2007). The structure of the DNA molecules which constitute mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* L, pp. S204-S204.
- Takanashi, H., Arimura, S., Sakamoto, W., and Tsutsumi, N. (2006). Different amounts of DNA in each mitochondrion in rice root. *Genes & Genetic Systems* 81, 215-218.
- Tani, T., Sobajima, H., Okada, K., Chujo, T., Arimura, S.I., Tsutsumi, N., Nishimura, M., Seto, H., Nojiri, H., and Yamane, H. (2008). Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta* 227, 517-526.
- Tsuji, H., Saika, H., Tsutsumi, N., Hirai, A., and Nakazono, M. (2006). Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice. *Plant and Cell Physiology* 47, 995-1003.
- Ueda, M., Fujimoto, M., Arimura, S., Tsutsumi, N., and Kadowaki, K. (2006a). Evidence for transit peptide acquisition through duplication and subsequent frameshift mutation of a preexisting protein gene in rice. *Molecular Biology and Evolution* 23, 2405-2412.
- Ueda, M., Fujimoto, M., Arimura, S.I., Tsutsumi, N., and Kadowaki, K.I. (2008a). Presence of a latent mitochondrial targeting signal in gene on mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1791-1793.
- Ueda, M., Arimura, S., Yamamoto, M.P., Takaiwa, F., Tsutsumi, N., and Kadowaki, K. (2006b). Promoter shuffling at a nuclear gene for mitochondrial RPL27. Involvement of interchromosome and subsequent intrachromosome recombinations. *Plant Physiology* 141, 702-710.
- Ueda, M., Fujimoto, M., Arimura, S.I., Murata, J., Tsutsumi, N., and Kadowaki, K.I. (2007). Loss of the rp132 gene from the chloroplast genome and subsequent acquisition of a preexisting transit peptide within the nuclear gene in *Populus*. *Gene* 402, 51-56.
- Ueda, M., Nishikawa, T., Fujimoto, M., Takanashi, H., Arimura, S., Tsutsumi, N., and Kadowaki, K. (2008b). Substitution of the gene for chloroplast RPS16 was assisted by generation of a dual targeting signal. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1566-1575.
- Watanabe, W., Shimada, T., Matsunaga, S., Kurihara, D., Fukui, K., Arimura, S., Tsutsumi, N., Isobe, K., and Itoh, K. (2007). Single-organelle tracking by two-photon conversion. *Optics Express* 15, 2490-2498.
- Yan, H., Saika, H., Maekawa, M., Takamura, I., Tsutsumi, N., Kyojuka, J., and Nakazono, M. (2007). Rice tillering dwarf mutant dwarf3 has increased leaf longevity during darkness-induced senescence or hydrogen peroxide-induced cell death. *Genes & Genetic Systems* 82, 361-366.
- Yoshinaga, K., Fujimoto, M., Arimura, S., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2006). The mitochondrial fission regulator DRP3B does not regulate cell death in plants. *Annals of Botany* 97, 1145-1149.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

堤伸浩 ( TSUTSUMI NOBUHIRO )

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 : 00202185

### (2) 研究分担者

中園幹生 ( NAKAZONO MIKIO )

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号 : 70282697

有村慎一 ( ARIMURA SHINICHI )

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号 : 00396938

### (3) 連携研究者