

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19770052
 研究課題名（和文） 植物細胞における液胞形成機構の細胞生物学的解析
 研究課題名（英文） Cell biological analysis of vacuole formation machinery in plant cells
 研究代表者
 豊岡 公德 (TOYOOKA KIMINORI)
 独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・研究員
 研究者番号：10360596

研究成果の概要：

高圧凍結技法と免疫電顕法を組み合わせ、液胞の由来やその形成機構を明らかにすることを目的とした。液胞膜タンパク質 PPase は分化している細胞内で、ゴルジ体由来の小胞、その小胞のクラスター、リング状の構造体、液胞膜に局在することが明らかとなり、分化の終わった細胞ではゴルジ体と液胞膜のみに存在することがわかった。さらに、PPase 変異体、オートファジー機能欠損株を用いた電顕解析により、PPase が存在するリング構造は形態形成に必須あることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000円
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：液胞、電子顕微鏡、膜タンパク質、高圧凍結技法、シロイヌナズナ、根、

1. 研究開始当初の背景

液胞は、植物細胞の体積の90%を占め、タンパク質の貯蔵や分解だけでなく、細胞の伸長などの形態形成に重要な働きを担っている。電子顕微鏡による形態観察により、液胞は、ゴルジ体や小胞体の

一部が分化して形成されると言われているが、その形成機構は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

高圧凍結技法と免疫電顕法を組み合わせる

ことで、この新奇リング状構造体の解析を通して、液胞の由来やその形成機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

シロイヌナズナまたはタバコ培養細胞を材料として、高圧凍結技法によりサンプルを調製し、Vacuolar H⁺-PPaseや各オルガネラに対する抗体を用いて、ImmunoGold法により液胞の存在しない細胞から存在する細胞への形態的变化を詳細に追った。さらに、GFP等の蛍光タンパク質を結合させた液胞膜タンパク質や膜系オルガネラタンパク質の蛍光を時系的に追うことにより液胞の由来およびその形成機構を解析した。また液胞膜に存在する既知のタンパク質またはオートファジー関連タンパク質の遺伝子欠損株を用いて解析を行った。

4. 研究成果

液胞形成過程を詳細に追うためには、膜構造が保存され、かつ、高い抗原性を残して固定・包埋することが重要である。そこで、高圧凍結装置および凍結置換装置を用いてシロイヌナズナ根端を固定・置換する際、オスミウムやグルタルアルデヒド等の固定液の濃度および固定時間等の条件を検討し、良好な条件を決定した。さらに、液胞が存在しない細胞から存在する細胞へ分化している細胞の位置を決定し、抗Vacuolar H⁺-PPaseウサギ抗体による免疫電顕により、分化している細胞中のリング状の構造体、その前駆体、液胞の形を把握した。免疫2重染色を行うために、Vacuolar H⁺-PPaseの合成ペプチドを用いて、ラットおよびマウス抗体を作製した。抗Vacuolar H⁺-PPase (以下、PPase)ウサギ抗体による免疫電顕により、PPaseは分化している細胞内で、ゴルジ体由来の小胞、その小胞

のクラスター、リング状の構造体、そして、液胞膜に局在することが明らかとなり、分化の終わった細胞ではゴルジ体と液胞膜のみに存在することがわかった。また、PPaseラット抗体を用いて、他の液胞膜タンパク質と免疫2重染色を行なった結果、それぞれ異なる小さな液胞に局在する場合があることがわかった。さらに、PPase変異体の電顕観察を行い、リング構造がないことを確認し、オートファジー機能欠損株を用いた免疫電顕解析により、PPaseが存在するリング構造はオートファジー機構とは独立した分解機構であることを明らかにした。以上、PPaseの細胞内局在を明らかにし、PPaseが存在するリング構造が液胞形成に重要な働きを担っていることを明らかにした。本研究結果は、第50回日本植物生理学会および第65回日本顕微鏡学会で発表した。

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10件)

1. Ukitsu, H., Kuromori, T., Toyooka K., Goto, Y., Matsuoka, K., Sakuradani, E., Shimizu, S., Kamiya, A., Imura, Y., Yuguchi, M., Wada, T., Hirayama, T., Shinozaki, K. (2007) Cytological and Biochemical Analysis of COF1, an Arabidopsis Mutant of an ABC Transporter Gene. *Plant Cell Physiol.* 48:1524-1533 (査読有)
2. Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T. (2007) Development of the

- series of gateway binary vectors, pGWB, realize efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 34-41 (査読有)
3. Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Goto E, Aoki M, Mito-Yoshida M, Uematsu M, Hasegawa, T, Koseki H, Ohara O, Nakayama M, Toyooka K, Matsuoka K, Hotta H, Yamamoto A and Ishido S. (2007) Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J.* 26: 846-854. (査読有)
 4. Takano K, Toyooka K and Suetsugu S (2008) EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* 27, 2817-2828. (査読有)
 5. Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., Yazaki, K., Goto, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K. and Hashimoto, T. (2009) Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiol.*, 149: 708-718 (査読有)
 6. Okazaki, Y., Shimojima, M., Sawada, Y., Toyooka, K., Narisawa, T., Mochida, K., Tanaka, H., Matsuda, F., Hirai, A., Yokota Hirai, M., Ohta, H., and Saito, K. (2009) A Chloroplastic UDP-glucose pyrophosphorylase from Arabidopsis: A committing enzyme for the first step of sulfolipid biosynthesis. *Plant Cell.* in press (査読有)
 7. Tsunekawa K, Shijuku T, Hayashimoto M, Kojima Y, Onai K, Morishita M, Ishiura M, Kuroda T, Nakamura T, Kobayashi H, Sato M, Toyooka K, Matsuoka K, Omata T, Uozumi N. (2009) Identification and characterization of the NA⁺/H⁺ antiporter NHAS3 from the thylakoid membrane of synechocystis SP. PCC 6803., *J Biol Chem.* in press (査読有)
 8. Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T. and Matsuoka, K. (2009) A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to plant cell exterior. *Plant Cell.* in press. (査読有)
 9. Sugita M, Nakano K, Sato M, Toyooka K, Numata O. (2009) The roles of actin cytoskeleton and microtubules for membrane recycling of a food vacuole in Tetrahymena thermophila., *Cell Motil Cytoskeleton.* in press. (査読有)
 10. Endo, S., Pesquet, E., Yamaguchi, M., Tashiro, G., Sato, M., Toyooka, K., Nishikubo, N., Utagawa-Motose, M., Kubo, M., Fukuda, H. and Demura, T. (2009) Identifying new components participating in the secondary cell wall formation of vessel elements in Zinnia and Arabidopsis. *Plant Cell.* in press. (査読有)
- [学会発表] (計 5 件)
1. 豊岡公德、後藤友美、佐藤繭子、松岡健

「Secretory vesicle clusterを介した分泌機構の解析」第49回日本植物生理学会年会、2008年3月、札幌

2. 佐藤繭子、後藤友美、松岡健、篠崎一雄、豊岡公德「植物組織凍結超薄ライブラリーの作製とその免疫電子顕微鏡観察法の検討」第49回日本植物生理学会年会、2008年3月、札幌

3. 豊岡公德、後藤友美、佐藤繭子、河合たか子「高圧凍結技法による植物試料の微細構造観察法および免疫電顕法の検討」第24回医学生物電子顕微鏡技術学会学術講演会、2008年5月、逗子

4. 豊岡公德、後藤友美、佐藤繭子、黒森崇、吉本光希、前島正義、松岡健「高圧凍結技法による液胞形成過程の免疫組織化学的解析」第50回日本植物生理学会年会、2009年3月、名古屋

5. 後藤友美、佐藤繭子、若崎真由美、河合たか子、松岡健、豊岡公德「高圧凍結技法による植物液胞形成過程の微細構造解析」第65回日本顕微鏡学会、2009年5月、仙台

[その他]

http://labs.psc.riken.jp/gdrg/Japanese/Publications_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊岡 公德 (TOYOOKA KIMINORI)

独立行政法人理科学研究所・機能開発研究グループ・研究員

研究者番号：10360596