

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06732

研究課題名(和文)小胞体の形態形成に関わる膜タンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of ER membrane proteins involved in ER morphogenesis in plant cells

研究代表者

上田 晴子 (Ueda, Haruko)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号：90402776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体は生命の根幹を担う多機能なオルガネラであり、袋状の膜構造が複雑な網目を形成して細胞全体に広がっている。この形態は真核生物で広く保存されていることから、小胞体の機能と関連すると考えられるが、どのように維持・管理されているのかは不明な点が多い。本研究では、シロイヌナズナ変異体の解析を通じて、小胞体膜タンパク質LNPが他の膜タンパク質と相互作用しながら小胞体の膜構造の維持に重要な役割をもつことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体は、タンパク質や脂質の合成で中心的な役割を果たす細胞小器官である。その特徴的な網目構造を生み出す遺伝子に異常をもつと、植物や動物に生育不全や疾患をもたらすこともある。本研究から、1種類の膜タンパク質の欠損によって小胞体の膜構造が大きな影響を受けることがわかった。特に植物細胞では小胞体が活発に運動しているため、動物や酵母とは異なる制御システムをもっている可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) is a multifunctional organelle underlying biological activities. The ER cisternae and tubules generate a continuous network distributed throughout the cell. The characteristic morphology of the ER is widely conserved in eukaryotes, but it is unclear how it is maintained. In this study, analysis of the Arabidopsis mutants suggests that the ER membrane proteins play an important role in maintaining the ER membrane structure through interaction with some membrane proteins.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：小胞体 シロイヌナズナ 膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体は細胞小器官（オルガネラ）の一種で、タンパク質・脂質の合成、代謝、およびカルシウム貯蔵など、生命の根幹を担う。「小胞体ネットワーク」とよばれるその形態は特徴的であり、チューブ状構造とシート状構造が複雑に組み合わせられてひと続きの網目構造を形成し、細胞全体に広がっている。小胞体膜は柔軟性に富んでおり、チューブとシートは相互に変換可能である。特に植物細胞の中では、小胞体はアクチン・ミオシン XI に依存して活発に流動しながら、再編成を繰り返して刻々と変化していく。また、シートとチューブの割合は、細胞の種類やサイズによって大きく異なる。

小胞体ネットワークは真核生物の間で広く保存されており、小胞体の形態形成に異常を持つ植物では細胞伸長が阻害され、植物の矮化や稔性の低下を示すものが多い。ヒトでは、小胞体の形態形成に中心的な役割を果たす小胞体膜融合因子 (Atlastin) やチューブ形成促進因子 (Reticulon, Reep) などの変異が、遺伝性痙攣性対麻痺 (HSP) とよばれる神経疾患を引き起こすことが知られている。これらの事実から、小胞体の多機能性は形態と密接に関連していると考えられる。しかし、この形態を維持するために、小胞体膜がどのように維持・管理されているのかは、不明な点が多い。

研究代表者は、これまでに小胞体の形態形成に関わる複数の因子を解析してきた。その中で、Lunapark (LNP) は zinc finger モチーフをもった小胞体膜に局在するタンパク質で、真核生物間で保存されている。シロイヌナズナには、LNP-A と LNP-B がコードされている。この両者を同時に欠損した *lnp* 二重変異体の細胞では、同時期の野生型と比較して小胞体のシート構造が顕著に少なく、ネットワークの網目が粗いことを見出した (Ueda et al., *Plant Cell Physiol.* 2018)。当初は LNP が小胞体のシート構造の形成に関わるのではないかと考えたが、アクチン繊維を破壊することによってチューブ構造の形成を抑制すると *lnp* 二重変異体でもシート構造が形成されたことから、シート構造の減少には別の原因があることが示唆された。一方、*lnp* 二重変異体では野生型には存在しない大きな凝集体が形成され、ここに小胞体マーカーが含まれていた。このことから、*lnp* 二重変異体では小胞体の細胞内分布に異常が起こり、細胞表面付近に局在する小胞体膜の量が減少したためにネットワークの網目が粗くなったと考えられた。小胞体の形態形成への LNP の関わりは、最初に酵母の研究から明らかにされた。しかし興味深いことに、酵母、動物細胞、植物細胞の間で、LNP の変異により引き起こされる小胞体の表現型に一貫性がなかった。これらの背景から、LNP は単純な小胞体形態形成因子ではなく、もっと根本的な小胞体の維持・管理に関わるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、小胞体膜タンパク質 LNP に着目し、LNP がどのように小胞体の形態形成に関わるかを明らかにする。LNP の解析を通じて、小胞体の多機能性を支える小胞体膜の維持・管理機構に迫ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

主にシロイヌナズナを用いて、以下の解析を行った。

### (1) LNP の欠損により形成される凝集体の解析

*lnp* 二重変異体にさまざまなオルガネラマーカーを導入し、LNP の欠損によって形成される凝集体を構成するオルガネラを明らかにする。また、透過型電子顕微鏡によって *lnp* 二重変異体を観察し、凝集体をはじめとした細胞内の微細構造を解析する。また、凝集体を分画する方法を検討し、単離した凝集体に含まれる構成成分を生化学的に明らかにする。

### (2) LNP の相互作用因子の探索

緑色蛍光タンパク質 GFP と LNP の融合タンパク質 (GFP-LNP) を発現する形質転換体の抽出液を用いて、GFP 抗体で共免疫沈降を行う。共沈降物の質量分析から、LNP と物理的に相互作用するタンパク質を探索する。

## 4. 研究成果

### (1) LNP の欠損により形成される凝集体の解析

シロイヌナズナ *lnp* 二重変異体の特徴的な表現型として、細胞内での凝集体の形成が挙げられる。このような表現型が動物や酵母では報告されていないことから、凝集体がどのように形成されたかを知ることは、LNP の機能を探る新たな手がかりとなると考えた。前述の通り、この凝集体から小胞体マーカータンパク質が検出されたことから、ここには少なくとも小胞体成分が含まれると考えられた。一方、直径 10 マイクロメートルを超える巨大な凝集体も頻りに観察されることから、小胞体以外のオルガネラが凝集体に含まれる可能性もあった。そこで、この凝集体が何で構成されているかを明らかにするために、*lnp* 二重変異体にさまざまなオルガネラ蛍光マーカーを導入し、共焦点レーザー顕微鏡で凝集体への局在を解析した。その結果、小胞体マーカー以外にも、いくつかのオルガネラマーカーが凝集体から検出された。次に、透過型電子顕微鏡により *lnp* 二重変異体の細胞内の微細構造を観察した。その結果、凝集体やその周辺に異常な膜構造が認められた。

凝集体に含まれる成分を生化学的に解析するために、分画沈降法と密度勾配遠心法を組み合わせ、細胞破碎液から凝集体を分画する方法を確立した。質量分析によるプロテオーム解析を行い、各画分に含まれるタンパク質を比較することによって、凝集体に濃縮されるタンパク質のプロファイルを得た。このときに検出された一部の膜タンパク質に対する抗体を用いて免疫電子顕微鏡解析を行ったところ、凝集体上で抗体のシグナルが検出された。そこで、凝集体への局在が確認された膜タンパク質を *lnp* 二重変異体に発現させたところ、生育阻害や稔性の低下をはじめとして、親株で観察される植物体レベルの異常な表現型が亢進された。今後、これらの植物において、膜タンパク質の過剰発現が与える影響を、凝集体をはじめとした細胞レベルで調べる必要がある。

## (2) LNP の相互作用因子の探索

LNP の機能を明らかにするためのもうひとつの手がかりとして、LNP がどのようなタンパク質と相互作用するかを知ることが挙げられる。シロイヌナズナでは LNP が Reticulon と相互作用することがわかっていたが、さらなる相互作用因子を探索するために、GFP-LNP を利用した共免疫沈降を行った。また、酵母や動物細胞では zinc finger モチーフが LNP の機能に重要であることが報告されていたため、シロイヌナズナ LNP の zinc finger モチーフに保存されている 4 箇所のシステイン残基に変異を導入した形質転換体を用いた解析も同時に行った。質量分析による共沈降物のプロテオーム解析の結果、Reticulon を含む多数のタンパク質が検出された。この中から小胞体膜に局在することが予測されるタンパク質を抽出し、LNP と相互作用する因子の候補として、引き続き解析を行うことを予定している。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tamura Kentaro, Ueda Haruko, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 12
2. 論文標題 In vitro assembly of nuclear envelope in tobacco cultured cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleus	6. 最初と最後の頁 82 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19491034.2021.1930681	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 Nakaso Yosuke, Arimoto Sayaka, Kawaguchi Ken'ichi, Muto Takara, Ueda Haruko	4. 巻 37
2. 論文標題 Mechanical measurement of gravitropic bending force in pea sprouts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 475 ~ 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.1201b	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 Nakata Miyuki T., Nakao Mao, Denda Asuka, Onoda Yusuke, Ueda Haruko, Demura Taku	4. 巻 37
2. 論文標題 Estimating the flexural rigidity of Arabidopsis inflorescence stems: Free-vibration test vs. three-point bending test	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 471 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.1214a	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 Nagano Minoru, Ueda Haruko, Fukao Yoichiro, Kawai-Yamada Maki, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 15
2. 論文標題 Generation of Arabidopsis lines with a red fluorescent marker for endoplasmic reticulum using a tail-anchored protein cytochrome b5 -B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1790196 ~ 1790196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1790196	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 Shimada Takashi L., Shimada Tomoo, Okazaki Yozo, Higashi Yasuhiro, Saito Kazuki, Kuwata Keiko, Oyama Kaori, Kato Misako, Ueda Haruko, Nakano Akihiko, Ueda Takashi, Takano Yoshitaka, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 5
2. 論文標題 HIGH STEROL ESTER 1 is a key factor in plant sterol homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1154 ~ 1166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0537-2	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 Goto-Yamada Shino, Oikawa Kazusato, Bizan Jakub, Shigenobu Shuji, Yamaguchi Katsushi, Mano Shoji, Hayashi Makoto, Ueda Haruko, Hara-Nishimura Ikuko, Nishimura Mikio, Yamada Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Sucrose Starvation Induces Microautophagy in Plant Root Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01604	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 上田晴子, 西村いくこ
2. 発表標題 Endoplasmic reticulum dynamics and plant development
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅唯月, 八木宏樹, 豊倉浩一, 西村いくこ, 上田晴子
2. 発表標題 植物の姿勢制御に与える変異型ACTIN8の部位特異的発現の影響
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩淵功誠, 八木宏樹, 沖奈那夏, 横畑伶奈, 中田亜紗美, 広本沙耶, 小松愛乃, 酒井友希, 高木慎吾, 西浜竜一, 河内孝之, 渡辺洋平, 上田晴子, 西村いくこ
2. 発表標題 陸上植物における細胞核光定位運動の多様性と共通性
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾亦雄斗, 江面健太郎, 菅野茂夫, 庄司翼, 高野耕司, 岡咲洋三, 斉藤和季, 上田晴子, 西村いくこ, 島田貴士
2. 発表標題 トマトにおけるHISE 1 のステロール代謝制御機構は生存に必須である
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田晴子
2. 発表標題 植物細胞における小胞体の動態と形態形成
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田晴子, 横田悦雄, 西村いくこ
2. 発表標題 小胞体のゾーンからみる形態形成機構
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田晴子
2. 発表標題 植物細胞の小胞体のダイナミックな形態変化
3. 学会等名 奈良先端科学技術大学院大学・異分野融合ワークショップシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田晴子, 西村いくこ
2. 発表標題 小胞体の形態からみる植物の生存戦略
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020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