

機関番号：63904

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370024

研究課題名 (和文) 植物ペルオキシソーム新規機能の網羅的解析

研究課題名 (英文) Comprehensive analyses on novel functions of plant peroxisomes

研究代表者

西村 幹夫 (NISHIMURA MIKIO)

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・教授

研究者番号：80093061

研究成果の概要 (和文)：植物におけるペルオキシソームの新規機能を明らかにするため、ペルオキシソームタンパク質のトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を行った。その結果、根の組織ではペルオキシソームがポリアミンの異化に関与していることが判明した。また、葉、茎の上皮細胞におけるペルオキシソームはワックス合成に関与することが明らかとなった。ペルオキシソーム形成因子の抑制変異株の解析から、ペルオキシソームが植物の生殖過程に重要な機能を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：To clarify the novel functions of peroxisomes in higher plants, transcriptome and proteome analyses were carried out. As a result, it is found that root peroxisomes engage in polyamine catabolism and peroxisomes in epidermal cells of leaves and stems are involved in wax production. The analysis of dsRNAi knock-down mutants of peroxin provides an evidence that peroxisomes are essential for fertilization in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：ペルオキシソーム トランスクリプトーム解析 ポリアミン プロテオーム ワックス合成 ペルオキシソーム形成因子 植物生殖過程

1. 研究開始当初の背景

脂肪性種子の子葉組織では、光照射によりペルオキシソームの機能変換現象が観察される。申請者は、光照射により子葉が緑化するに伴い、糖新生に関与するグリオキシソームから光合成に関与する緑葉ペルオキシソームへとペルオキシソームの機能的変換が生じ、緑化子葉がセネッセンスしていくときには、逆に緑葉ペルオキシソームからグリオ

キシソームへの変換がおきていることを示し、ペルオキシソームが可逆的に機能変換することを証明した。この現象は、動・植物を通じ、同一細胞内において、ペルオキシソームの機能的変換が生じる唯一の現象として極めて注目すべきものである。また、近年分子遺伝学的手法によりペルオキシソームが光形態形成に関与している可能性が示唆されている。このように、光照射や老化など環境

適応反応においてペルオキシソームの柔軟な機能分化が重要な役割を担っていることが明らかになってきている。本研究では、ペルオキシソームに焦点を絞ったトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析や、ペルオキシソーム異常突然変異体を用いた解析および、光照射や老化などさまざまな環境変化に対するペルオキシソームの応答を網羅的に解析することによって、ペルオキシソームの新規機能を明らかにすることより、ペルオキシソーム機能分化の全体像を理解することを目指す。

2. 研究の目的

本研究は植物ペルオキシソームの新規機能を網羅的に解析することにより、植物の特徴である柔軟なオルガネラ分化をもたらす分子機構の全体像を明らかにすることを目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 新規ペルオキシソーム機能解明に向けてのトランスクリプトーム及びプロテオーム解析

①トランスクリプトーム解析

①-1.ペルオキシソーム局在タンパク質遺伝子のトランスクリプトーム解析

①-2.植物各組織におけるペルオキシソーム局在タンパク質遺伝子の解析

①-3.ペルオキシソーム局在タンパク質遺伝子の機能解析

②プロテオーム解析

②-1.シロイヌナズナから高純度ペルオキシソームの単離法の確立

②-2.各組織におけるペルオキシソームタンパク質校正の網羅的解析とそのカタログ化

②-3.ダイズから高純度ペルオキシソームの単離法の確立

②-4.ペルオキシソーム膜タンパク質の網羅的解析

②-5.ペルオキシソーム局在タンパク質遺伝子の機能解析

②-6.遺伝子破壊株及び過剰発現株によ

る解析

(2) 組織特異的ペルオキシソーム機能欠損変異株の選抜と解析

①組織特異的ペルオキシソーム機能欠損変異株の選抜と解析

②ペルオキシソーム機能欠損変異株の機能解析

③機能欠損変異株の形態解析

④ペルオキシソーム機能欠損変異株の原因遺伝子の同定

4. 研究成果

(1) 植物ペルオキシソームの新規機能を明らかにするため、植物各組織で発現するペルオキシソームタンパク質遺伝子のトランスクリプトーム解析を行い、ポリアミンオキシターゼ遺伝子AtPA04がペルオキシソーム酵素遺伝子として根組織で特異的に発現している事を明らかにした。大腸菌で発現させたAtPA04タンパク質はスペルミンからスペルミジンへの変換を触媒することが明らかになった。AtPA04遺伝子破壊株や抑制株において、スペルミジンの含量が減少しているのに対し、スペルミンの含量が増大していた。このことからAtPA04は根組織のペルオキシソーム酵素としてポリアミンの異化に関わっている事が示唆された。また、AtPA04欠損株のトランスクリプトーム解析から、ポリアミン異化が乾燥ストレスやフラビンの合成に関与していることが明らかとなった。

(2) 機能未知のペルオキシソームタンパク質を網羅的に同定することを目指し、発芽大豆芽ばえ種子から高純度のペルオキシソーム単離法を確立した。この方法はPercoll及びiodixanolの密度勾配遠心を利用するもので、単離したペルオキシソーム画分には、各オルガネラ指標タンパク質が検出されないことから、他オルガネラの混入は検出限界以下であった。単離したペルオキシソーム画分を2次元のポリアクリルミドアミド電気泳動によって分離し単離したタンパク質のペプチドマスフィンガープリントを行い、ペプチドの質量分析により92個のタンパク質を同定し、更なる解析により30個のペルオキシソ

ムタンパク質を同定した。これらのペルオキシソームタンパク質には脂肪酸 β -酸化系、光呼吸、ストレス耐性、トランスポーター等とともに、機能未知のタンパク質が含まれていた。

(3) ペルオキシソーム形態不全変異株の解析からペルオキシソームのタンパク質輸送に関与する新たなペルオキシソーム形成因子 *apm9* を同定した。APM9はペルオキシソーム膜に局在し、他のペルオキシソーム形成因子の Pex6 と結合することにより、Pex1-Pex6複合体をペルオキシソームにつなぎとめる役割を果たしていることが判明した。この遺伝子の欠損は致死となり、植物の生育に必須な機能を担っている。*Apm9*は同様な働きをするタンパク質である動物の Pex26や酵母の Pex15pとはアミノ酸配列における相同性が低く、植物特異的なペルオキシソーム形成因子であることが判明した。この *apm9* の抑制変異株の解析から、*apm9* 遺伝子は植物の生殖過程に大きな影響を与えることが判明し、植物生殖過程におけるペルオキシソームの新たな役割が類推されている。現在、その機能解析研究に従事している。

ペルオキシソーム形態不全変異株の中からペルオキシソームが巨大化する *apm3* の解析を行い、その原因遺伝子はペルオキシソーム膜タンパク質38であることを明らかにした。私達は既にペルオキシソームの分裂欠損変異株 *apm1* を同定しており、変異株のペルオキシソームは分裂できず細長い管状の形態を示す。今回得られた *apm3* と *apm1* とかけあわせした *apm1, 3* 二重変異株は、ほとんどのペルオキシソームが巨大化して *apm3* の表現型を示したことから、APM3はペルオキシソームの分裂に先立つ過程で機能していることが推測された。*apm3* はミトコンドリアキャリアファミリーのタンパク質に属しており、代謝物の輸送に関与している可能性があるが、ATP,ADP等ではその輸送活性は証明されなかった。*apm3* 及び *apm1,3* 二重変異株の表現型の詳細を解析しており、ペルオキシソームの増殖と表現型の関連を調べている。

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 36 件)

- ①Mano, S., C. Nakamori, Y. Fukao, M. Araki, A. Matsuda, M. Kondo and M. Nishimura Defects of peroxisomal membrane protein 38 causes enlargement of peroxisomes. **Plant Cell Physiol.** 52: 2157-2172 (2011) 査読あり
- ②Goto, S., S. Mano, C. Nakamori and M. Nishimura Arabidopsis ABERRANT PEROXISOME MORPHOLOGY9 is a peroxin that recruits of the PEX1/PEX6 complex to peroxisomes. **Plant Cell** 23: 1573-1587 (2011) 査読あり
- ③Kanai, M., M. Nishimura and M. Hayashi A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by suppressing polygalacturonase inhibiting proteins under the control of *ABI5*. **Plant J.** 62: 936-947 (2010) 査読あり
- ④Kamigaki, A., M. Kondo, S. Mano, M. Hayashi and M. Nishimura Suppression of peroxisome biogenesis factor 10 reduced cuticular wax accumulation by disrupting the ER network in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.** 50: 2034-2046 (2009) 査読あり
- ⑤Singh, T., M. Hayashi, S. Mano, Y. Arai, S. Goto and M. Nishimura Molecular components required for the targeting of PEX7 to peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 60: 488-498 (2009) 査読あり
- ⑥Fujimoto, M., S. Arimura, S. Mano, M. Kondo, C. Saito, T. Ueda, M. Nakazono, A. Nakano, M. Nishimura and N. Tsutsumi Arabidopsis dynamin-related proteins DRP3A and DRP3B are functionally redundant in mitochondrial fission, but have distinct roles in peroxisomal fission. **Plant J.** 58: 388-400 (2009) 査読あり
- ⑦Hayashi, M. and M. Nishimura Frontiers of research on organelle differentiation. **Plant Cell Physiol.** 50: 1995-1999 (2009) 査読あり
- ⑧Arai, Y., M. Hayashi and M. Nishimura Proteomic identification and characterization of a novel peroxisomal adenine nucleotide transporter supplying ATP for fatty acid β -oxidation in soybean and *Arabidopsis*. **Plant**

Cell 20: 3227-3240 (2008)査読あり

⑨Hashimoto, K., H. Igarashi, S. Mano, C. Takenaka, T. Shiina, M. Yamaguchi, T. Demura, M. Nishimura, T. Shimmen, E. Yokota An isoform of *Arabidopsis* myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region. **J. Exp. Bot.** 59: 3523-3531 (2009) 査読あり

⑩Arai, Y., M. Hayashi and M. Nishimura Proteomic analysis of highly purified peroxisomes from etiolated soybean cotyledons. **Plant Cell Physiol.** 49: 526-539 (2008)査読あり

⑪Kamada-Nobusada, T., M. Hayashi, M. Fukazawa H. Sakakibara and M. Nishimura A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.** 49: 1272-1282(2008)査読あり

⑫Oshima, Y., A. Kamigaki, C. Nakamori, S. Mano, M. Hayashi, M. Nishimura and M. Esaka Plant catalase is imported into peroxisomes by Pex5p but is distinct from typical PTS1 import. **Plant J.** 49: 671-677 (2008)査読あり

〔図書〕 (計 2 件)

①Tanaka, Y., T. Kimura, K. Hikino, S. Goto and M. Nishimura **InTech** Genetic Engineering-Basics, New Applications and Responsibilities (2011) p35-68

②Arai, Y., Y. Fukao, M. Hayashi and M. Nishimura **Jhon Wiley & Sons** Plant Proteomics: Technologies, Strategies and Applications. P377-389 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 幹夫 (NISHIMURA MIKIO)
基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・教授
研究者番号：80093061