

機関番号：63904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570045

研究課題名（和文）高等植物のペルオキシソーム形成因子群の機能解析

研究課題名（英文）Analysis on peroxisome biogenesis factors in higher plants

研究代表者

真野 昌二 (MANO SHOJI)

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・助教

研究者番号：20321606

研究成果の概要（和文）：植物ペルオキシソーム形成機構を明らかにするために、ペルオキシソームの数が減少するシロイヌナズナの *apem1*、*apem3* 変異体の機能解析を中心に研究を進めた。ペルオキシソーム形成過程において APEM3 は APEM1 よりも早い段階で機能すること、*APEM3* は様々な部位で発現していることが明らかとなった。また、*apem9* の解析より植物特異的な APEM9 の機能を明らかにするとともに、*apem5*、*apem6* についても解析を進めた。

研究成果の概要（英文）：We have studied the molecular mechanism of peroxisome biogenesis in plants using Arabidopsis *apem* mutants, especially, *apem1* and *apem3*. From our analyses, it is revealed that APEM3 acts earlier than APEM1 in the process of peroxisome biogenesis, and that *APEM3* expresses in various tissues. In addition, we identified the function of APEM9 that is a plant-specific factor, and examined *apem5* and *apem6*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：オルガネラ・細胞壁

1. 研究開始当初の背景

高等植物におけるペルオキシソームの機能や形成の研究では、 β -酸化系や光呼吸といったペルオキシソーム機能に基づいたスクリーニングにより単離された変異体を用いるか、酵母や動物のペルオキシソーム遺伝子の情報を元にした逆遺伝学的なアプローチが行われていた。我々は、ペルオキシソームが GFP で可視化された形質転換シロイヌナズナ (GFP-PTS1) を親株として変異処理を行い、GFP の蛍光を指標にペルオキシソームの

形態、大きさ、数、細胞内分布、タンパク質輸送の異常を示すペルオキシソーム形成変異体 (*apem* : aberrant peroxisome morphology) を多数単離して解析を進め、*APEM1*、*APEM2*、*APEM4* 遺伝子の機能について明らかにしていた。

ペルオキシソーム形成遺伝子の T-DNA 挿入株の多くは胚発生致死あるいは表現型が出ない状況にあった。また、RNAi による解析も行われていたが、これも動物細胞や酵母からの情報を基に相同性のある遺伝子を解析し

ている状況にあった。本研究では、可視化したペルオキシソーム変異体から解析を加えるという点で、これまでとはスクリーニング法も解析方法も性質を異にしており、ゲノム情報からは推測できない因子も同定できると期待できた。

2. 研究の目的

本研究は、種々の *apem* 変異体の解析からペルオキシソーム形成に関わる因子群を同定し、それらの調節機構を明らかにすることにより、分子レベルにおけるペルオキシソーム形成の制御機構を明らかにすることを目的とした。単離した *apem* 変異体のうち、ペルオキシソームが長くなる *apem1*、ペルオキシソームが巨大化する *apem3* と *apem6*、細胞内のペルオキシソーム分布が異常になる *apem5* 変異体を主な材料として、ペルオキシソーム形成の中でも分裂、増殖に焦点を絞って研究を進めると共に、他の *apem* 変異体に関して原因遺伝子の同定を行う計画をたてた。

また、異なる蛍光タンパク質を用いた複数のオルガネラの同時多重染色、Bimolecular complementation による *in vivo* でのペルオキシソームタンパク質群の相互作用の検出など、イメージング技術の応用も図る予定であった。

3. 研究の方法

(1) *apem* 変異体におけるオルガネラの超微細構造を明らかにするために、電子顕微鏡観察やオルガネラ特異色素を用いた染色、各オルガネラが可視化された形質転換シロイヌナズナと掛け合わせを行った。

(2) *apem1apem6*、*apem3apem6* 二重変異体を作製するとともに、先行して作製した *apem1apem3* 二重変異体の解析を行った。

(3) *APEM3* プロモーターの下流に *GUS* 遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いて、*APEM3* 遺伝子発現の解析を行った。

(4) ヌクレオチド輸送体と相同性がある *APEM3* の輸送活性測定のため、大腸菌 C43 株を用いて細胞膜に *APEM3* タンパク質を局在化させ、放射性標識したヌクレオチドの取り込み実験を行った。また、*APEM3* と相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子を欠損させた酵母における相補性実験を行った。

(5) *APEM5*、*APEM6* と *GFP* との融合遺伝子を植物細胞で発現させ、各 *APEM* タンパク質の細胞内局在性を検討した。

(6) *apem6* 変異体は優性変異を示す。*APEM6* タンパク質が欠損した場合の影響を検討するために、*APEM6* 遺伝子に T-DNA が挿入されたシロイヌナズナにおけるペルオキシソームの可視化を試みた。

(7) *apem5* 変異の結果、他のどのような遺伝子発現に影響を与えるか、マイクロアレイ解析を行った。

(8) 他の *apem* 変異体同士を掛け合わせて *allelism* 解析を行い、異なる *apem* 変異体に関して原因遺伝子の同定を進めた。

4. 研究成果

(1) *APEM3* 遺伝子はペルオキシソーム膜に局在する PMP38 をコードしている。*PMP38* プロモーターと *GUS* との融合遺伝子を発現させた形質転換シロイヌナズナの解析から、*PMP38* 遺伝子は様々な組織やステージで発現しており、特に花器官で顕著であることを明らかにした。この *PMP38* 遺伝子の発現時期や発現部位は、*apem3* 変異体で巨大なペルオキシソームが観察される時期や部位と一致しており、緑葉では表皮細胞では顕著であるが葉肉細胞では表現型を示さないこと、電子顕微鏡観察から巨大化したペルオキシソームの電子密度は野生型に比べ低くなっていることが明らかとなった。

(2) PMP38 はミトコンドリアキャリアファミリー (MCF) のサブグループである ATP/ADP 輸送体であると考えられたため、PMP38 と相同性を示す酵母の *ScAnt1p* 欠損株における相補性実験を行ったところ、*ScAnt1p* 欠損を相補できなかった。また、大腸菌の原形質膜に PMP38 を発現させ、ATP、ADP、GTP の取り込み実験を行ったが、これら 3 種類のヌクレオチドの輸送活性を検出することはできなかった。本研究部門において、プロテオーム解析から MCF に属する別のペルオキシソーム局在型 ATP/ADP 輸送体遺伝子が 2 種類同定された (*PNC1*、*PNC2*)。それらは ATP/ADP 輸送活性を示し、また、それらの欠損変異体は *apem3* 変異体と異なり著しい成長抑制を示す。このことから *APEM3*/*PMP38* は、*PNC1*、*PNC2* とは異なる機能をもつことが予想された。

(3) *apem1* および *apem3* 変異体は、共にペルオキシソームの数が減少するものの形態は異なっており、*apem1* のペルオキシソームは長いが *apem3* では球状となる。*apem1apem3* 二重変異体では、*apem3* 変異体で見られる球状のペルオキシソームが優先的に観察されるものの、根の differential zone では *apem1* 様の長いペルオキシソームが観察された。これらの結果は、細胞のステージや組織に応じたペルオキシソームの分裂機構が存在することを示している。また、*apem1apem6*、*apem3apem6* 二重変異体も単離することに成功したが、それらの解析は本研究期間内に行うことはできなかった。

(4) BiFC 法による APEM1、APEM38 のタンパク質の相互作用について検討したところ、APEM1、APEM3 共にホモオリゴマーを形成するものの、お互いは相互作用しないことが明らかとなった。

(5) 他のペルオキシソーム形成因子である FIS1A の T-DNA 挿入株と *apem1* および *apem3* 変異体と掛け合わせを行い、二重変異体の作出を行った。また、*apem3* 変異体の巨大なペルオキシソームには DRP3A が相互作用できるか検討するために、DRP3A-GFP を DRP3A プロモーター下で制御した形質転換体と掛け合わせを行ったところ、ドット状の GFP 蛍光が巨大化したペルオキシソーム上で観察されたことから、APEM1/DRP3A は巨大化したペルオキシソームに導入されること、および、APEM3/PMP38 とは異なる段階で機能することが明らかとなった。

(6) *APEM5* プロモーター下で *APEM5* と *GFP* との融合遺伝子を発現する形質転換植物を作製した。*GFP* の蛍光観察を行ったところ、繊維状の構造が観察された。

(7) *APEM6* 遺伝子に T-DNA が挿入された植物体におけるペルオキシソームの動態を観察したが、野生型と顕著な違いを観察できなかった。*APEM6* と類似の機能をもつホモログが他にもあることから、今後はそれらも同時に欠損させた植物体を用いて解析していく必要がある。

(8) *apem5* 変異体における遺伝子発現パターンを網羅的に調べるため、マイクロアレイ解析を行った。

(9) 別の変異体である *apem9* について解析を

進めた。*APEM9* がこれまでに報告されている PEROXIN (PEX) とはほとんどアミノ酸配列の相同性をもたない植物特異的な PEROXIN であること、その機能は PEX1-PEX6 複合体をペルオキシソーム膜に繋ぎ止めることを明らかにした。また、*APEM9* の欠損は生殖機構にも影響を与えることが分かった。

以上のように、当初計画していた *apem* 変異体のうち、特に *apem1*、*apem3* 変異体について研究成果を出すことができた。*apem5*、*apem6* 変異体については、今後、分子レベルでの解析を進めて行く予定である。

APEM9 という動物や酵母の分子とは全く相同性のない植物特異的な因子の同定と機能を明らかにすることができ、ペルオキシソームを可視化させた変異体を扱うという本研究の特色を発揮できた。他にもまだ未同定な *apem* 変異体があるため、順次、原因遺伝子を明らかにしていきたい。

また、*APEM3* 遺伝子発現が花器官で高いことから、*APEM9* 欠損が生殖機構に影響を与えることから、生殖過程におけるペルオキシソーム機能や形成の重要性が示唆され、これまで重点的に研究されてきた発芽時や緑葉におけるペルオキシソーム機能に加え、配偶子形成や受精時における認識機構におけるペルオキシソームの関与など新たな展開へ繋がることを期待される。

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 11 件)

- ① Goto, S., Mano, S., Nakamori C., and Nishimura, M. (2011) *Arabidopsis* ABERRANT PEROXISOME MORPHOLOGY 9 is a peroxin that recruits the PEX1-PEX6 complex to peroxisomes. Plant Cell In press. 査読有
- ② Mano, S., Miwa, T., Nishikawa, S., Mimura, T., and Nishimura, M. (2011) The Plant Organelles Database 2 (PODB2): An updated resource containing movie data of plant organelle dynamics. Plant Cell Physiol. 52, 244-253. 査読有
- ③ Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., Sato, Y., and Ishiguro, S. (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, *bar*, as a

- selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *74*, 1315-1319. 査読有
- ④ Kamigaki, A., Kondo, M., Mano, S., Hayashi, M., and Nishimura, M. (2009) Suppression of peroxisome biogenesis factor 10 reduces cuticular wax accumulation by disrupting the ER network in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *50*, 2034-2046. 査読有
- ⑤ Corpas, J.F., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, M., and Barroso, B.J. (2009) Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide (NO) accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* *151*, 2083-2094. 査読有
- ⑥ Mano, S., Miwa, T., Nishikawa, S., Mimura, T., and Nishimura, M. (2009) Seeing is believing: On the use of image databases for visually exploring plant organelle dynamics. *Plant Cell Physiol.* *50*, 2000-2014. 査読有
- ⑦ Singh, T., Hayashi, M., Mano, S., Arai, Y., Goto, S., and Nishimura, M. (2009) Molecular components required for the targeting of PEX7 to peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *60*, 488-498. 査読有
- ⑧ Momonoi, K., Yoshida, K., Mano, S., Takahashi, H., Nakamori, C., Shoji, K., Nitta, A., and Nishimura, M. (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, *TgVit1*, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J.* *59*, 437-447. 査読有
- ⑨ 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 J.* *58*, 388-400. 査読有
- ⑩ Hashimoto, K., Igarashi, H., Mano, S., Takenaka, C., Shiina, T., Yamaguchi, M., Demura, T., Nishimura, M., Shimmen, T., and Yokota, E. (2008) An isoform of *Arabidopsis* myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region. *J. Exp. Bot.* *59*, 3523-3531. 査

読有

- ⑪ Oshima, Y., Kamigaki A., Nakamori, C., Mano, S., Hayashi, M., Nishimura, M., and Esaka, M. (2008) Plant catalase is imported into peroxisome by Pex5p but distinct from typical PTS1 import. *Plant Cell Physiol.* *49*, 671-677. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① 及川和聡、ペルオキシソーム局在変異体 *peup2* と *peup4* の解析、第 52 回日本植物生理学会年会 (東北大学) 2011 年 3 月 22 日
- ② 真野昌二、ペルオキシソームタンパク質輸送に関わるユビキチンシステムの解析、第 52 回日本植物生理学会年会 (東北大学) 2011 年 3 月 21 日
- ③ 後藤志野、ペルオキシソームタンパク質輸送における *apm10* 変異体の解析、第 52 回日本植物生理学会年会 (東北大学) 2011 年 3 月 21 日
- ④ 柴田美智太郎、緑葉ペルオキシソームの機能維持に対するオートファジーの機能解析、第 52 回日本植物生理学会年会 (東北大学) 2011 年 3 月 21 日
- ⑤ 真野昌二、ペルオキシソームが巨大化するシロイヌナズナ形成変異体 *apm3* の解析、BMB2010 (ポートアイランド) 2010 年 12 月 8 日
- ⑥ 後藤志野、ペルオキシソームタンパク質輸送に関与する植物特異的 APM9 タンパク質の解析、BMB2010 (ポートアイランド) 2010 年 12 月 8 日
- ⑦ Shoji Mano, Identification and characterization of *Arabidopsis aberrant peroxisome morphology* mutants exhibiting defects in peroxisome biogenesis, National Institute for Basic Biology, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, The 2nd Joint Symposium "Plant Science Communication 2010" (Okazaki Conference Center) 2010 年 11 月 16 日
- ⑧ Shino Goto, Plant-specific APM9 is essential for peroxisome biogenesis in *Arabidopsis*, National Institute for Basic Biology, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, The 2nd Joint Symposium "Plant Science Communication 2010" (Okazaki Conference Center) 2010 年 11 月 16 日
- ⑨ Michitaro Shibata, A defect of autophagy causes the accumulation of catalases with low-activity in peroxisomes in

Arabidopsis thaliana, National Institute for Basic Biology, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, The 2nd Joint Symposium "Plant Science Communication 2010" (Okazaki Conference Center) 2010年11月16日

- ⑩ Kazusato Oikawa, Light-dependent interaction among peroxisomes, mitochondria, and chloroplasts in photosynthetic tissue of *Arabidopsis*, National Institute for Basic Biology, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, The 2nd Joint Symposium "Plant Science Communication 2010" (Okazaki Conference Center) 2010年11月16日
- ⑪ Shoji Mano, Isolation and Characterization of *Arabidopsis apm* mutants that are defective in peroxisome biogenesis" International Meeting on Peroxisome Research (Institute for Systems Biology, Seattle) 2009年11月19日
- ⑫ 後藤志野、ペルオキシソームタンパク質輸送に関するシロイヌナズナ *APM9* 遺伝子の解析、第51回日本植物生理学会年会(熊本大学) 2010年3月20日~21日
- ⑬ 及川和聡、光に依存したペルオキシソームとミトコンドリア、葉緑体との接着機構は光合成により制御される、第51回日本植物生理学会年会(熊本大学) 2010年3月21日
- ⑭ 真野昌二、シロイヌナズナペルオキシソーム形成変異体 *apm3* はペルオキシソームの分裂が抑制されている、第50回日本植物生理学会年会(名古屋大学) 2009年3月21日
- ⑮ 後藤志野、ペルオキシソームタンパク質輸送に関するシロイヌナズナ *APM9* 遺伝子の解析、第50回日本植物生理学会年会(名古屋大学) 2009年3月21日
- ⑯ 及川和聡、ペルオキシソーム局在異常変異体の成長解析、第50回日本植物生理学会年会(名古屋大学) 2009年3月21日
- ⑰ Shino Goto, Analysis of *Arabidopsis* mutants showing aberrant peroxisome morphology. The 55th NIBB conference "Frontiers of Plant Science in the 21st Century" (Okazaki Conference Center) 2008年9月14日

[図書] (計1件)

- ① 真野昌二、他、化学同人、Photobook 植物細胞の知られざる世界、2010、監修

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真野 昌二 (MANO SYOJI)
基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・助教
研究者番号：20321606

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

近藤 真紀 (KONDO MAKI)
基礎生物学研究所・技術課・技術職員

後藤 志野 (GOTO SHINO)
総合研究大学院大学・生命科学研究所・大学院生

中森 ちひろ (NAKAMORI CHIHIRO)
基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・技術支援員

荒木 雅美 (ARAKI MASAMI)
基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・技術支援員

曳野 和美 (HIKINO KAZUMI)
基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・技術支援員

松田 梓 (MATSUDA AZUSA)
基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・技術支援員