

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370016

研究課題名（和文） 植物の小胞輸送～機能と分子機構の普遍性と独自性の解明～

研究課題名（英文） Plant membrane traffic -generality and uniqueness of functions and molecular mechanisms-

研究代表者

上田 貴志（TAKASHI UEDA）

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：10311333

研究成果の概要（和文）：植物の小胞輸送の分子機構と高次生命現象における役割を解明すべく研究を行った。その結果、植物が進化の過程で獲得した植物特異的なエンドソーム輸送経路を発見するとともに、そこで ARA6 と VAMP727 という植物特異的な膜交通制御因子が機能していることを明らかにした。また、植物の小胞輸送がいかに進化してきたのかについての知見を得るため、ゼニゴケを用いた研究も展開した。

研究成果の概要（英文）：We carried out studies on molecular mechanisms and physiological functions of plant membrane trafficking. Supported by this research grant, we succeeded in identification of a plant-unique endosomal trafficking pathway, which involves two plant-unique molecules, ARA6 and VAMP727. We further performed the research using the liverwort, *Marchantia polymorpha*, for information on a diversity and evolution of the plant membrane trafficking system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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：オルガネラ・細胞壁

## 1. 研究開始当初の背景

小胞輸送は、原始真核生物から人間や植物を含む現存の生物に至るまで保存された、真核細胞に普遍的な生命活動である。同時に、多様な体制や生命現象に応じ、その分子機構や生理的機能は進化し、洗練されてきたと考えられる。我々は、植物の高次機能において小胞輸送（特にポストゴルジ輸送網）が果たす役割を明らかにするとともに、植物が進化の過程で獲得した独自の小胞輸送制御機構

の解明を目標とし研究を行ってきた。本研究課題開始時までの研究において我々は、i) 植物独自のエンドサイトーシス制御機構の発見、ii) 植物細胞におけるエンドソームの多様性の証明、iii) オーキシンの極性輸送とエンドサイトーシスの関連の解明、iv) 植物 RAB5 の機能分化の証明、等の成果を挙げた。しかしながら、植物特異的な膜交通経路の詳細な分子機構とその生理的役割についての知見は、極めて限定的であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題においては、上述した従来の研究を発展させ、植物が進化の過程で新たに獲得したオルガネラ間輸送の分子機構とその生理的意義、さらにはそのルーツに迫ることを目的とした。具体的には、植物特異的な Rab5 ホモログである ARA6、及び植物特異的な SNARE 分子である VAMP727 の機能を明らかにするとともに、ゼニゴケを用いたオルガネラ研究の実験基盤を整備し、膜交通の多様性と進化の研究を進めることを目指した。

## 3. 研究の方法

以下の3つの研究を行った。

- 1) 植物特異的小胞輸送制御因子 (ARA6, VAMP727) の詳細な機能解析. 変異体を用いた遺伝学的解析を始めとし、全反射顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いたイメージング解析、生化学的解析により、これらの因子の機能解析を行った。
- 2) シロイヌナズナを用いた新規の植物特異的膜交通関連分子の同定. 活性型 ARA6 と相互作用する因子の探索と候補分子の機能解析を行った。
- 3) 基部分類群 (コケ植物) における小胞輸送の分子機構と機能の解析. 主にゼニゴケを用い、オルガネラや細胞骨格可視化ラインの作成、細胞骨格動態の解析、ARA6 ホモログの機能解析を行った。

## 4. 研究成果

ARA6 の機能を詳細に調べた結果、ARA6 が定常状態ではエンドソームに局在しているものの、活性化した状態では細胞膜に局在し、エンドソームと細胞膜との融合を制御していることが明らかとなった。さらに、ARA6 の下流で、VAMP727 と細胞膜上の SNARE 分子である SYP121 との複合体形成が制御されていることも突き止めた。これにより、植物特異的な膜交通制御因子である ARA6 と VAMP727 が、ともに エンドソームと細胞膜との融合を制御する因子であることが示された。また、この輸送経路が塩ストレスに対する耐性に関与していることも見いだした。

ARA6 の相互作用因子についても、複数の候補分子 (PUF タンパク質) の単離に成功した。中でも PUF2 は、活性型の ARA6 のみでなく、活性化因子である VPS9a にも相互作用することが明らかとなった。さらに、*puf2* 変異体を用いた遺伝学的解析の結果、PUF2 が ARA6 の相互作用因子として単離されたにもかかわらず、保存型 RAB5 である ARA7 や RHA1 と同じ輸送経路を制御していることも示された。これらの結果から、PUF2 が、植物特異的 RAB5 と保存型 RAB5 のはたらきを統御する分子であることが示された。

ゼニゴケにおけるオルガネラ・細胞骨格可視化ラインの作成を進め、アクチン繊維、エンドソーム、葉緑体外包膜、液胞、ゴルジ体、トランスゴルジネットワークなどの可視化ラインを確立した。これらの観察を行い、オルガネラ動態を観察したとともに、ゼニゴケにおいてアクチン繊維が活発に滑り運動していることを見いだした。この滑り運動は、微小管により負に制御されていることも明らかにした。また、ゼニゴケにおける ARA6 ホモログの解析も進め、シロイヌナズナとゼニゴケで ARA6 の機能が多様化している可能性を示した。

## 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 24 件)

- 1) Higaki, T., Kutsuna, N., Hosokawa, Y., Akita, K., Ebine, K., Ueda, T., Kondo, N., and Hasezawa, S. (2012) Statistical organelle dissection of Arabidopsis guard cells using image database LIPS. *Sci. Rep.*, in press, 査読有, DOI:10.1038/srep00405
- 2) Era, A., Kutsuna, N., Higaki, T., Hasezawa S., Nakano, A., and Ueda, T. (2012) Microtubule stability affects the unique motility of F-actin in *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.*, in press, 査読有
- 3) Uemura, T., Kim, H., Saito, C., Ebine, K., Ueda, T., Schulze-Lefert, P., and Nakano, A. (2012) Qa-SNAREs localised to the *trans*-Golgi network regulate multiple transport pathways and extracellular disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 109: 1784-1789, 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1115146109
- 4) Ebine, K., Miyakawa, N., Fujimoto, M., Uemura, T., Nakano, A., and Ueda, T. (2012) An endosomal trafficking pathway regulated by the plant-unique RAB5, ARA6. *Small GTPases*, 3: 1-5, 査読有

- <http://www.landesbioscience.com/journals/smallgtpases/article/18299/>
- 5) Ito, E., Fujimoto, M., Ebine, K., Uemura, T., Ueda, T. (corresponding author) and Nakano A. (2012) Dynamic behavior of clathrin in *Arabidopsis thaliana* unveiled by live imaging. *Plant J.*, 69: 204-216, 査読有  
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04782.x
  - 6) 藤本優, 上田貴志 (2012) 細胞壁資材の細胞内輸送-植物の膜交通と細胞壁-遺伝. Vol.66: 47-52, エヌ・ティー・エス, 査読無
  - 7) Minamisawa, N., Sato, M., Cho, KH., Ueno, H., Takechi, K., Kajikawa, M., Yamato, KT., Ohyama, K., Toyooka, K., Kim, GT., Horiguchi, G., Takano, H., Ueda, T., and Tsukaya, H. (2011) ANGUSTIFOLIA, a plant homolog of CtBP/BARS, functions outside the nucleus. *Plant J.*, 68: 788-799, 査読有  
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04731.x
  - 8) Saito, C., Uemura, T., Awai, C., Ueda, T., Abe, H. and Nakano, A. (2011) Qualitative difference between "bulb" membranes and other vacuolar membranes. *Plant signaling & behavior*, 6: 1914-1917, 査読有  
DOI: 10.4161/psb.6.12.18061
  - 9) Saito, C., Uemura, T., Awai, C., Tominaga, M., Ebine, K., Ito, J., Ueda, T., Abe, H., Morita, MT., Tasaka, M. and Nakano, A. (2011) The occurrence of bulbs, a complex configuration of the vacuolar membrane, is affected by mutations of vacuolar SNARE and phospholipase in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 68: 67-73, 査読有  
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04665.x
  - 10) Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, MH., Thordal-Christensen, H., Tsutsumi, N., Nakano, A., and Ueda, T. (2011) A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol.*, 13: 853-860, 査読有  
DOI: 10.1038/ncb2270
  - 11) 海老根一生, 上田貴志 (2011) 陸上植物固有の膜交通制御因子が植物の新たな細胞内輸送経路を開拓した. ライフサイエンス新着論文レビュー. ライフサイエンス統合データベースセンター. <http://first.lifesciencedb.jp/archives/3119>, 査読無
  - 12) Naramoto, S., Kleine-Vehna, J., Robert, S., Fujimoto, M., Dainobu, T., Paciorek, T., Ueda, T., Nakano, A., Van Montagu, M.C.E., Fukuda, H., and Friml, J. (2010) ADP-ribosylation factor (ARF), guanine nucleotide exchange factor (GEF), and GTPase-activating protein (GAP) function in endocytosis of plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107: 21890-21895, 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1016260107
  - 13) Uemura, T., Morita, TM., Ebine, K., Okatani, Y., Yano, D., Saito, C., Ueda, T., and Nakano, A. (2010) Vacuolar/prevacuolar compartment Qa-SNAREs, VAM3/SYP22 and PEP12/SYP21 have interchangeable functions in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 64: 864-873, 査読有  
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04372.x
  - 14) Uejima, T., Ihara, K., Goh, T., Ito, E., Sunada, M., Ueda, T., Nakano, A., and Wakatsuki, S. (2010) GDP-Bound and

- Nucleotide-Free Intermediates of the Guanine Nucleotide Exchange in the Rab5/Vps9 system. *J. Biol. Chem.*, 285: 36689-36697, 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M110.152132
- 15) Fujimoto, M., Arimura, S., Ueda, T., Takanashi, H., Hayashi, Y., Nakano, A. and Tsutsumi, N. (2010) Arabidopsis dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107: 6094-6099, 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.0913562107
- 16) Chen, L., Hamada, S., Fujiwara, M., Zhu, T., Thao, NP., Wong, HL., Krishna, P., Ueda, T., Kaku, H., Shibuya, N., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2010) The Hop/Sti1-Hsp90 Chaperone Complex Facilitates the Maturation and Transport of a PAMP Receptor in Rice Innate Immunity. *Cell Host Microbe*, 7: 185-196, 査読有  
DOI: 10.1016/j.chom.2010.02.008
- 17) Boutté, Y., Rosa, MSF., Men, S., Chow, C., Ebine, K., Gustavsson, A., Johansson, L., Ueda, T., Moore, I., Jürgens, G., Grebe, M. (2010) Endocytosis Restricts Arabidopsis KNOLLE Syntaxin To The Cell Division Plane During Late Cytokinesis. *EMBO J.*, 29: 546-558, 査読有  
DOI: 10.1038/emboj.2009.363
- 18) 上田貴志 (2010) 植物の SNARE 複合体と膜融合. 生体の科学. Vol. 61: 269-275 (財) 金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院, 査読無
- 19) Era, A., Tominaga, M., Ebine, K., Awai, C., Saito, C., Ishizaki, K., Yamato, TK., Kohchi, T., Nakano, A., and Ueda, T. (2009) Application of Lifeact Reveals F-Actin Dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the Liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.*, 50: 1041-1048, 査読有  
DOI: 10.1093/pcp/pcp055
- 20) Sano-Maeda, K., Sato, S., Ueda, T., Yui, R., Itho, K., Hata, M., Nakano, A., Kita, K., Murakami-Murofushi, K. and Sasaki, N. (2009) Visualization of mitochondrial and apicoplast nucleoids in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by SYBR Green I and PicoGreen staining. *Cytologia*, 74: 449-455, 査読有  
DOI: 10.1508/cytologia.74.449
- 21) Naramoto, S., Sawa, S., Koizumi, K., Uemura, T., Ueda, T., Friml, J., Nakano, A. and Fukuda, H. (2009) Phosphoinositide-dependent regulation of VAN3 ARF-GAP localization and activity essential for vascular tissue continuity in plants. *Development*, 136: 1529-1538, 査読有  
DOI: 10.1242/dev.030098
- 22) 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  
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03786.x
- 23) Saito, C. and Ueda, T. (2009) Function of RAB and SNARE members in plant life. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 274: 183-233, 査読有

DOI: 10.1016/S1937-6448(08)02004-2

- 24) Ebine, K. and Ueda T. (2009) Unique mechanism of plant endocytic/vacuolar transport pathways. *J. Plant Res.*, 122: 21-30, 査読有

DOI: 10.1007/s10265-008-0200-x

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 上田貴志 (招待講演) How plants acquired novel membrane trafficking pathways. 第 84 回生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 京都
- 2) 上田貴志 (招待講演) 植物はいかに独自の膜交通システムを構築したか. 日本植物学会第 75 回大会, 2011 年 9 月 18 日, 東京
- 3) Takashi Ueda (Invited speaker) (2011) Diversification of post-Golgi trafficking pathways among land plants. XVIII International Botanical Congress. 25 July. Melbourne, Australia.
- 4) Takashi Ueda (Invited speaker) (2010) How plants have acquired unique endosomal trafficking pathways. Biochemistry and Molecular Biology 2010. 9 December. Kobe, Japan.
- 5) 上田貴志 (招待講演) 可視化で探る植物膜交通経路の多様性. 視る生物学 5—植物を視る光の新技术—, 2010 年 11 月 25 日, 奈良
- 6) Takashi Ueda (Invited speaker) (2010) Plant-unique endosomal trafficking pathways regulated by ARA6. Plant Science Communications 2010, The 2<sup>nd</sup> NIBB-MPI joint symposium. 16 November. Okazaki, Japan.
- 7) 上田貴志 (招待講演) ゼニゴケで植物膜交通研究の新地平を拓けるか. 日本植物学会第 74 回大会, 2010 年 9 月 10 日,

愛知

- 8) 上田貴志 (招待講演) 植物に学ぶ細胞内膜交通網の多様性獲得機構. 第 62 回日本細胞生物学会大会, 2010 年 5 月 20 日, 大阪
- 9) 上田貴志 (受賞講演) 植物の膜交通—分子機構と高次機能発現における役割の研究—. 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 19 日, 熊本
- 10) 上田貴志 (招待講演) 植物に学ぶ膜交通多様化機構—その普遍性と独自性に迫る—. 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 植物特異的膜交通経路の活性化による環境ストレス耐性植物の開発  
発明者: 上田貴志, 稲田のりこ  
権利者: 東京大学, 奈良先端科学技術大学院大学  
番号: 61/558632  
出願年月日: 2011 年 11 月 11 日  
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 貴志 (TAKASHI UEDA)  
東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
研究者番号: 10311333