

機関番号：12604

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770036

研究課題名 (和文) 補償作用に見られる細胞の大型化におけるプロトンポンプ機能制御の役割

研究課題名 (英文) Role of vacuolar-type proton pump in compensated cell enlargement

研究代表者

フェルジャニ アリ (FERJANI ALI)

東京学芸大学・教育学部・助教

研究者番号：20530380

研究成果の概要 (和文)：葉のサイズ決定機構を明らかにするためには、「補償作用」の理解が鍵である。補償作用とは、ある種の突然変異により、葉の細胞数が減少すると、過剰な細胞伸長が誘導される現象である。補償作用を示す変異体群の中から *fugu5* に着目した。その結果、種子発芽時に過剰蓄積するピロリン酸によるショ糖生合成の阻害が、*fugu5* における細胞増殖の阻害の主要因であることを見いだした。さらに、*fugu5* 変異体に重イオンビームを照射してランダム突然変異を誘発し、表現型が野生型に回復、または *fugu5* に見られる細胞肥大が抑制ないし促進される変異株も複数単離した。また、*fugu2-1* 変異体及び *KRP2* o/e に見られる細胞肥大には V-ATPase が関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：A longstanding question in biology is how organ size is predetermined. Compensation is a key, yet unsolved phenomenon, whereby decreased cell number below some threshold triggers enhanced post-mitotic cell expansion in leaf primordia. Thus providing a model case to investigate leaf-size control. Among the Arabidopsis mutants that exhibit compensation, here I focused on *fugu5* mutant that is defective in vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase). I clearly demonstrated that high accumulation of PPi in the cytosol mediates gluconeogenesis compromise in *fugu5*, providing evidence that PPi hydrolysis is the major role of FUGU5 *in vivo*. Also, I conducted a large-scale screening of enhancers, repressors and suppressors of *fugu5* mutant and identified three mutant lines that affect cell expansion in *fugu5* in different manners. Finally, I found that V-ATPase is implicated in excessive cell enlargement observed in *fugu2-1* and *KRP2* o/e.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物生理・分子生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：葉器官サイズ制御、細胞増殖、細胞伸長、*fugu5* 変異体、補償作用

## 1. 研究開始当初の背景

葉、茎、根は植物の主要器官である。中でも葉は無限増殖を行う茎や根と異なり、有限

増殖を行う器官である。モデル植物であるシロイヌナズナの葉の発生に注目した研究によれば、葉の発生は、茎頂分裂組織周辺に葉原基の始源細胞が決定されことで始まり、ある期間細胞増殖能が維持され、葉身部に特徴的な平面的な構造が作り出される。その後、葉原基の基部から離れた細胞における増殖活性が失われ、細胞は分化に伴う液胞化により急速にそのサイズを肥大させる。

これまで葉の発生過程における細胞周期や細胞伸長関連制御因子が個別に解析されていたため、葉全体における発生プログラムを総合に理解することに到らなかった。そこで、我々はシロイヌナズナを用いて葉の持つ特徴である有限性に着目し、葉のサイズ制御決定機構を明らかにしようと試みた。そこで注目したのは「補償作用」という現象である。補償作用とは、ある種の突然変異により、葉の細胞数が減少することによって、過剰な細胞伸長が誘導される個々の現象である。葉のサイズ決定機構を明らかにするためには、この「補償作用」の理解が鍵である。

本研究では、補償作用を示す変異体群の中から、特に *fugu5* 変異体に注目した。クローニングの結果から、*FUGU5* は液胞膜に局在する H<sup>+</sup>-ピロホスファターゼ (H<sup>+</sup>-PPase) をコードすることを明らかにしてきた。冒頭で述べたように、細胞分化に伴う液胞化により急速な細胞肥大が起るという観点からも *FUGU5* は興味深い遺伝子である。この *FUGU5* タンパク質はピロリン酸 (PPi) を加水分解すると同時に H<sup>+</sup> 輸送による液胞の酸性化という、二つの機能を持つ。そこで本研究では、補償作用に見られる細胞の大型化における H<sup>+</sup>ポンプ機能制御の役割を解明することにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、補償作用に見られる細胞の肥

大化における H<sup>+</sup>ポンプ機能制御の役割、*fugu5* 変異体に見られる細胞増殖能の低下はいかにして引き起こされるのか、また補償作用にみられる細胞伸長の昂進には液胞型 H<sup>+</sup>ポンプ、すなわち H<sup>+</sup>-PPase 及び V-ATPase、が関与するのかを、明らかにしようとした。また、液胞型 H<sup>+</sup>ポンプの機能と補償作用との関係性を通じて、器官サイズ制御全体における液胞の役割を見いだしてゆくことを目標とした。

## 3. 研究の方法

まず *FUGU5* タンパク質の持つ二つの機能のどちらが重要なのか、分割して解析することとした。そのため、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞質局在型である PPi 分解酵素をコードする *IPPI* (*Inorganic Pyrophosphatase1*) 遺伝子を *FUGU5* 遺伝子のプロモーターに連結し、*fugu5* 変異体および野生型に導入した。その上で、得られた *IPPI* 導入系統の表現型の詳細な解析を行った。

また、*fugu5* 変異体の子葉で見られる補償作用が、ショ糖存在下で完全に抑制されることに注目し、ショ糖と *FUGU5* との関係をさらに解析した。貯蔵脂質をもとに生産されるショ糖は、種子発芽後の成長に重要な役割を担っている。そこで、*fugu5* 変異体における  $\beta$ -酸化活性の有無及び、暗所発芽個体における貯蔵脂質量を経時的変化を調べた。さらに、ショ糖非存在下で暗所下における *fugu5* 変異体、野生型および *Pro<sub>FUGU5</sub>::IPPI* 導入株の生育や胚軸伸長を比較し、暗所下でのショ糖存在下における成育の比較も合わせて行った。

一方、補償作用を示すシロイヌナズナの変異体群に見られる細胞肥大と V-ATPase との関係性を調べる目的で、*fugu5-1*、*fugu2-1*、*an3-4* 変異体及び *KRP2* 過剰発現体 (以下、*KRP2 o/e* と略す) と V-ATPase の機能に欠損を持つ *de-etiolated3(det3-1)* 変異体との間で、そ

それぞれ二重変異体を作成し、解析した。

申請者の先行研究で、野生型と *fugu5* 変異体における遺伝子発現の比較をマイクロアレイを用いて調べた結果から、多数の遺伝子の発現量が上下していることが判明している。そこで、これらの遺伝子の発現量を RT-PCR により二つのアレル (*fugu5-1* と *fugu5-2*) で再確認をとり、その数を絞り込んだ。さらに、*fugu5* 変異体において発現量が変動していた 5 遺伝子について、T-DNA 挿入変異系統を取り寄せ、補償作用の有無を調べた。

また、*fugu5* 変異体の抑圧変異体のスクリーニングを行うため、*fugu5* 変異体の乾燥種子に重イオンビーム ( $^{12}\text{C}^{6+}$ , LET 30 keV/ $\mu\text{m}$ , 400 Gy) を照射してランダム突然変異を誘発し、表現型が野生型に回復、または *fugu5* 変異体に見られる細胞肥大が抑制ないし促進される変異体の選抜を行った。

#### 4. 研究成果

(1) *fugu5* 変異体では PPi の異常な蓄積により細胞分裂が抑制されているのか？

本研究で注目している FUGU5 には、基質である PPi を加水分解する機能と、 $\text{H}^+$  を液胞内に輸送する機能との、二つの機能がある。本解析では、*fugu5* における PPi の蓄積の影響を調べるため、FUGU5 の持つ二つの機能を分けて解析を行うことを試みた。そこで、出芽酵母の細胞質局在型  $\text{H}^+$ -PPiase をコードする *IPP1* 遺伝子を *FUGU5* 遺伝子のプロモーターの制御下におき、*fugu5* 変異体に導入した。IPP1 タンパク質は細胞質でしか機能しないので、 $\text{H}^+$  が液胞内に輸送されることはない。興味深いことに、*IPP1* 遺伝子の導入により *fugu5* 表現型が完全に相補された (図 1)。

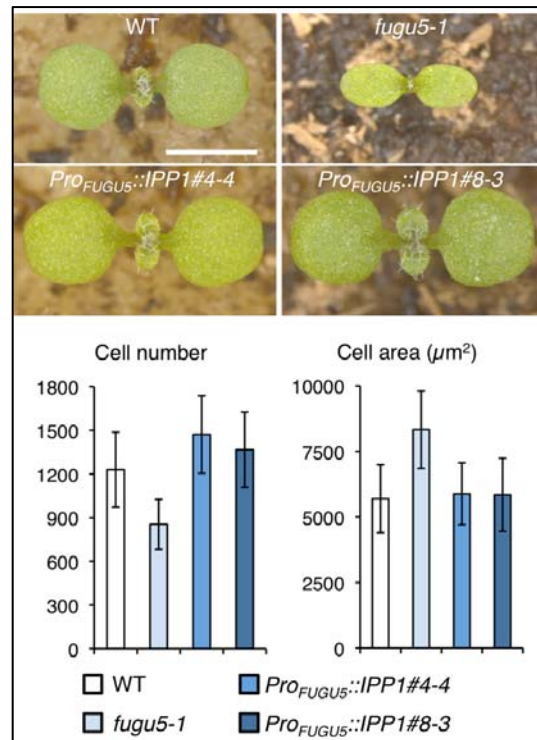


図 1. 野生株、*fugu5-1*、*fugu5* 変異体に *ProFUGU5::IPP1* を導入した 2 系統、#4-4 と #8-4 の発芽後 8 日目の芽生の表現型及び第一葉柵状組織葉肉細胞数、サイズ。

一方、*fugu5* 変異体における  $\beta$ -酸化活性及び、暗所発芽個体における貯蔵脂質の経時変化を調べたところ、*fugu5* はいずれも正常であった。しかしショ糖非存在下で暗所生育した *fugu5* 変異体は、胚軸伸長が著しく阻害されており、これはショ糖投与により回復した。全ての結果を合わせると、種子発芽時に過剰蓄積する PPi によるショ糖合成の阻害が、*fugu5* における細胞増殖の阻害の主要因と考えられる。これはシロイヌナズナを用いて  $\text{H}^+$ -PPase の役割を明らかにした初の知見であり、現在、論文にまとめて投稿中である。

(2) 補償作用で見られる細胞の大型化はどのようにして起こるのか？

本研究の長期的な目標は、器官のサイズ制御の分子基盤を解明することである。そこで、*fugu5* 変異体で見られる補償作用を制御する

遺伝子群の同定が重要となる。そのため、先行研究により補償作用誘導時に野生型と *fugu5* 変異体における遺伝子発現の比較を、マイクロアレイを用いて調べたデータに基づき、発現変動が見られた遺伝子の発現量について RT-PCR により二つのアレル (*fugu5-1* と *fugu5-2*) で再確認をとった結果、その数を 12 遺伝子にまで絞り込むことができた。この 12 遺伝子の内 6 遺伝子の発現量は上昇、6 遺伝子の発現量は減少していた。これら 12 遺伝子のうち 5 遺伝子について、さらに T-DNA 挿入変異系統を取り寄せ、補償作用の有無を調べた。その結果、葉細胞の数やサイズに異常のないことが判明した。今後、T-DNA 挿入変異系統同士及び *fugu5* 変異体と二重変異体を作製し、同様の解析を行う予定である。

### (3) 補償作用によって誘導される過剰な細胞肥大における液胞型 H<sup>+</sup>ポンプの役割

分化の過程を終えた細胞の体積の 90% を液胞が占めることが知られており、また液胞膜に局在する V-ATPase の活性が低下している *det3-1* 変異体では細胞伸長が著しく抑制されることが分かっている。そこで、特に補償作用にみられる過剰な細胞伸長に焦点を当て、そのメカニズムの解明を試みた。具体的には、*det3-1* と補償作用を示す変異体のうち *fugu5*、*fugu2-1* 及び *an3-4* 変異体と *KRP2 o/e* との二重変異体を作成し、それぞれ組織学的に解析した。その結果、*an3-4* 変異体に見られる細胞肥大には V-ATPase は関与しないが、*fugu2-1* 変異体及び *KRP2 o/e* に見られる細胞肥大には V-ATPase が関与することが示唆された(図 2)。一方、*fugu5 det3-1* 二重変異体の解析を試みたが、発芽後発生が停止したため、解析が困難であった。これは、シロイヌナズナが持つ二つの液胞型 H<sup>+</sup>ポンプの同時欠損による著しい発生異常と推察され

た。

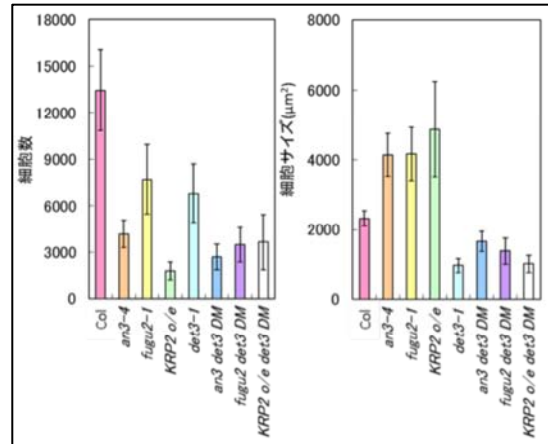


図 2. 野生株、*fugu2-1*、*an3-4*、*KRP2 o/e*、*det3-1* 及び二重変異体の第一葉柵状組織葉肉細胞数、サイズ。

本研究により、補償作用にみられる細胞伸長の昂進には V-ATPase が関与していることが初めて明らかになった。今後、葉のサイズ制御機構と液胞との関係について新たな知見が得られると期待される。

### (4) *fugu5* 変異体の抑圧変異体のスクリーニング及び解析

*fugu5* 変異体の乾燥種子に重イオンビームを照射し、ランダム突然変異を誘発させた。6088 の M0 種子を用いて行ったスクリーニングから得られた計 17 系統について、成熟した子葉及び第一葉の大きさ・細胞数・細胞サイズについて調べた。解析の結果、17 系統の中から *fugu5-1* 変異体の抑圧変異体 (A#8-3)、補償作用による細胞伸長を抑制する変異体 (A#3-1) 及び促進する変異体 (A#9-7) の 3 つの単離に成功し、それぞれについて詳細な組織学的解析を行った(図 3)。A#8-3 の子葉は野生型に比べて細いが、細胞数、細胞サイズともに野生型と同等だった。また、A#3-1 の個体サイズは非常に小さく、子葉の細胞サイズは *fugu5-1* 変異体の約 30% であった。一方、A#9-7 の子葉の細胞数は *fugu5-1* 変異体と同

等であるのに対し、細胞サイズは約 140%であった。今後は、得られた変異体の原因遺伝子の同定や解析により、*fugu5-1* 変異体に見られる細胞肥大のメカニズムが明らかになると期待される。

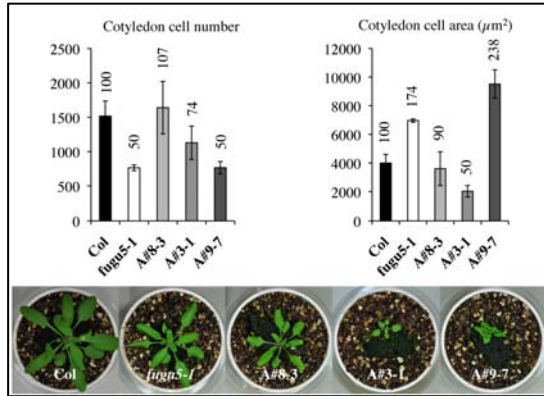


図 3. 野生株、*fugu5*、A#8-3、A#3-1、A#9-7 の柵状組織葉肉細胞数、サイズ及び表現型。グラフ上の数字は野生型に対する相対値を示す。

FUGU5 液胞膜局在型 H<sup>+</sup>-PPase として知られ、液胞膜は膨圧を発生するうえで必要不可欠と考えられているが、今回示した研究成果によれば、PPi の正常な代謝は細胞増殖を始めとした、細胞内機能に必須である。これを踏まえると、FUGU5 は細胞増殖と細胞伸長の調和に中心的な役割を果たす因子である可能性が期待される。

#### 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 3 件)

- ① Fukao Y, Ferjani A, Tomioka R, Nagasaki N, Kurata R, Nishimori Y, Fujiwara M, Maeshima M. (2011) iTRAQ Analysis Reveals Mechanisms of Growth Defects due to Excess Zinc in Arabidopsis. Plant

Physiol. 155, 1893–1907, 査読有

- ② Ferjani A, Horiguchi G, Tsukaya H (2010) Organ size control in Arabidopsis: Insights from compensation studies. Plant Morphology. Vol. 22 pp. 65–71.

- ③ Fukao Y, Ferjani A, Fujiwara M, Nishimori Y, Ohtsu I. (2009) Identification of zinc-responsive proteins in the roots of *Arabidopsis thaliana* using a highly improved method of two-dimensional electrophoresis. Plant Cell Physiol. 50, 2234–2239. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 久永哲也、FERJANI Ali、堀口吾朗、石田喬志、杉本慶子、塚谷裕一 DNA 損傷応答が *fugu2* の補償作用に果たす役割. 第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 21 日、東北大学

- ② Ferjani Ali、武藤由香里、堀口吾朗、前島正義、塚谷裕一 *fugu5* 変異体から明らかになった、ピロリン酸の代謝とショ糖の生合成の初期生育に果たす役割. 日本植物形態学会第 22 回総会・大会、2010 年 9 月 8 日、中部大学

- ③ Fukao Y, Ferjani A, Tomioka R, Nagasaki N, Fujiwara M and Maeshima M. The iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defect due to excess zinc in Arabidopsis Plant Membrane Biology. 15<sup>th</sup> International Workshop, Sep. 19–24, 2010, Adelaide, Australia

- ④ Ferjani Ali, Muto Yukari, Horiguchi Gorou, Maeshima Masayoshi, Tsukaya Hirokazu. Pyrophosphate over-accumulation in *fugu5/avp1* mutant inhibits cell division early after germination and induces compensated cell enlargement. 21st International Conference on Arabidopsis Research, Pacifico Yokohama, YOKOHAMA, JAPAN June 7, 2010
- ⑤ Ferjani Ali, 武藤由香里, 堀口吾朗, 前島正義, 塚谷裕一 *fugu5*変異体におけるピロリン酸の蓄積は貯蔵脂質由来のスクロースの生合成を阻害し補償作用を引き起こす. 日本植物学会第74回大会、2010年9月9日、中部大学
- ⑥ 久永哲也, Ali Ferjani, 堀口吾朗, 藤倉潮, 石川直子, 出村拓, 福田裕穂, 塚谷裕 補償作用を示す *fugu2*変異体において発現変動する遺伝子群の葉の形成における役割. 第51回日本植物生理学会年会、2010年3月20日、熊本大学
- ⑦ 深尾陽一朗, 西森由佳, 長崎菜穂子, 富岡利恵, Ali Ferjani, 藤原正幸, 前島正義 iTRAQ 解析を用いた過剰量亜鉛による成育阻害機構の解明. 第51回日本植物生理学会年会、2010年3月19日、熊本大学
- ⑧ Ferjani Ali, 武藤由香里, 堀口吾朗, 前島正義, 塚谷裕一 *fugu5*変異体におけるピロリン酸の蓄積は細胞増殖を阻害し補償作用を引き起こす. 第51回日本植物生理学会年会、2010年3月19日、熊本大学
- ⑨ Ferjani Ali, 武藤由香里, 堀口吾朗, 前島正義, 塚谷裕一 *fugu5*変異体におけるピロリン酸の蓄積と補償作用との関係. 日本植物学会第73回大会、2009年9月18日、山形大学
- ⑩ Ferjani Ali, 武藤由香里, 堀口吾朗, 前島正義, 塚谷裕一 *fugu5* 変異体に見られる補償作用とピロリン酸の蓄積との関係. 日本植物形態学会第 21 回総会・大会、2009年9月17日、山形大学
- ⑪ Ferjani Ali 補償作用を透して見えてきた葉のサイズ制御の実態とは? 日本植物形態学会第21回総会・大会 (奨励賞受賞記念講演会)、2009年9月17日、山形大学
- ⑫ Ali Ferjani, Yukari Muto, Gorou Horiguchi, Masayoshi Maeshima, Hirokazu Tsukaya FUGU5/AVP1 (H<sup>+</sup>-PPase) activity is essential for proper resumption of postembryonic development and organ-size control in Arabidopsis. JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit. Jul. 22-25, 2009, Morioka, Japan
- [その他]
- ① FERJANI ALI、日本植物形態学会・奨励賞受賞、2009年9月17日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

フェルジャニ アリ (FERJANI ALI)  
東京学芸大学・教育学部・助教  
研究者番号：20530380