

平成24年 6月 4日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770057

研究課題名(和文) ERボディ形成に伴う小胞体の機能分化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of Functional Differentiation in the Endoplasmic Reticulum during the ER Body Formation

研究代表者

山田 健志 (YAMADA KENJI)

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：00360339

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの実生に小胞体由来の細長い構造物が出来ることを発見し、ERボディと名付けた。傷害によりERボディが誘導されることから、ERボディは虫害や病害に対する防御のためのオルガネラであると考えられた。NAI2とPYK10はERボディに局在するタンパク質で、ERボディの形成に関わることが示唆されていた。そこで、本研究では新しいERボディの成分を見つけるとともに、これらのタンパク質のERボディ形成における役割を調べた。その結果、ERボディには、膜タンパク質としてMEB1、MEB2が蓄積していること、NAI2とPYK10はERボディの形成に必要かつ十分であることがわかり、植物におけるERボディ形成の巧妙な仕組みが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) body is an ER derived structure that is found in the epidermal cells of Arabidopsis seedlings. ER body is involved in plant defense system against insect and pathogen attack, since wound treatment induced ER bodies. Two ER body proteins, NAI2 and PYK10 are involved in ER body formation, but its function was obscure. To understand the ER body formation in detail, I analyzed ER body proteins in Arabidopsis. I found that two ER body proteins, MEB1 and MEB2 are localized specifically in ER body membrane. Furthermore, I found that NAI2 and PYK10 are necessary and sufficient for the ER body formation. These findings unveiled unique mechanisms for ER body formation in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 植物生理・分子

キーワード：小胞体, ERボディ, シロイヌナズナ,  $\beta$ グルコシダーゼ, 傷害, 膜タンパク質, オルガネラ, 防御機構

## 1. 研究開始当初の背景

ER ボディは幼植物体の表皮細胞に見られる細長い形をした小胞体由来のオルガネラである。成長した植物のロゼット葉では、ER ボディは見られなくなるが、傷害により誘導される。研究代表者らのグループは、ER ボディには $\beta$  グルコシダーゼ、PYK10 が大量に蓄積すること、bHLH 型転写制御因子、NAI1 が *PYK10* 遺伝子の発現と ER ボディの形成に必要であること、ER ボディの成分、NAI2 が ER ボディ形成と PYK10 の大量蓄積に必須であることを明らかにした。忌避物質の生産に働くと考えられる $\beta$  グルコシダーゼが大量に蓄積することから、ER ボディは病虫害に対する抵抗性を獲得するためのオルガネラであると考えられた。ER ボディはアブラナ目に特徴的なオルガネラであり、これらの植物が他の植物や動物とは異なる独自の病虫害抵抗性、環境適応戦略を発達させたことを示唆している。これらの研究は、植物が、分泌タンパク質の合成の場としてとらえられてきた小胞体から、全く新しい機能、すなわち生体防御としてのタンパク質の大量蓄積機構を誘導するという驚くべき発見であった。どのようにして小胞体の機能分化が発達したかを解明するために、ER ボディ形成の詳細な分子機構の解明が期待されていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ER ボディ形成に関わる因子の相互作用を明らかにし、ER ボディ形成の鍵となる現象を追求した上で、ER ボディを利用した病虫害抵抗性の発達過程を調べることである。研究代表者は、ER ボディ形成に必要な *NAI2* 遺伝子を発見した。さらに、シロイヌナズナのマイクロアレイ解析やプロテオーム解析のデータベースを利用して、ER ボディ形成に関わると考えられる膜因子、MEMBRANE OF ER BODY 1 (MEB1) と MEB2 を見いだした。一般に小胞体で凝集したタンパク質は ER associated protein degradation (ERAD) と呼ばれるタンパク質分解機構により分解される。ところが、ER ボディは PYK10 を凝集し大量蓄積するために発達した。そこで、NAI2、MEB1 や MEB2 などの ER ボディ因子がどのように、タンパク質分解機構を抑え、PYK10 の大量蓄積を実現しているかを、ER ボディ関連遺伝子の過剰発現株やノックアウト株を用いた解析により調べる。これらの因子の分子間相互作用を調べ、ER ボディ形成に関わる巧妙な仕組みを明らかにする。ER ボディが病虫害に関与することを直接示すために ER ボディ欠損変異体の病虫害に対する抵抗性を調べる。ER ボデ

ィの形成機構、および機能の解明から ER ボディを利用した小胞体の機能分化と生体防御機構の発達過程を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

(1) ER ボディ膜タンパク質に注目した ER ボディ形成機構の解明

### ① MEB1、MEB2 の発現調節機構の解析

データベースの解析より、MEB1、MEB2 が、ER ボディの膜タンパク質である可能性が考えられた。さらに MEB1、MEB2 のホモログとして INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN 2 (IMP2) が見つかった。そこで、これらの遺伝子が ER ボディ形成に関わる NAI1 によって制御されているかを調べる。

### ② MEB1、MEB2 タンパク質の局在解析

MEB1、MEB2 タンパク質に対する抗体を作成し、細胞分画法を用いて局在を調べる。これらのタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を作成し、シロイヌナズナに発現させ、局在を調べる。

### ③ MEB1、MEB2 タンパク質の機能解析

MEB1、MEB2、IMP2 タンパク質の機能を調べるため、これらの遺伝子の単独及び、二重、三重ノックアウト株を作成し、ER ボディの形態変化を観察する。MEB1 と IMP2 は隣同士の遺伝子であるために、遺伝子特異的な artificial micro RNA (amiRNA) を用いたノックダウン株の作成を行う。MEB1、MEB2 と NAI2 との結合を免疫沈降などの方法により調べ ER ボディ膜形成の仕組みを明らかにする。

(2) NAI2、PYK10 の ER ボディ形成における機能解析

NAI2 と PYK10 の変異により ER ボディ形成が異常になることから、これらの遺伝子が ER ボディ形成に関わることが示唆された。そこで、*NAI2* 遺伝子を *PYK10*、*MEB1*、*MEB2* 遺伝子とともに ER ボディを持たないタマネギ表皮細胞やタバコ培養細胞に導入し、ER ボディ形成を調べる。NAI2 と MEB1、MEB2、PYK10 の結合を免疫沈降で調べる。

(3) ER ボディ欠損変異体の病虫害抵抗性の解析

ER ボディの機能を調べるために、植物病理学を専門とする研究者の協力を得つつ病原菌や虫害に対する ER ボディ欠損変異体の応答を調べる。さらに、ER ボディ欠損変異体のメタボローム解析を行い PYK10 により生成される代謝産物を調べる。

#### 4. 研究成果

##### (1)ERボディ膜タンパク質に注目したERボディ形成機構の解明

ER ボディ関連遺伝子の共発現解析より、*MEB1*、*MEB2* 遺伝子がシロイヌナズナにおける新しい ER ボディの膜タンパク質をコードする遺伝子の候補として見つかった。*MEB1*、*MEB2* 遺伝子のホモログとして、*IMP2* 遺伝子を見つけた。そこで、これらの遺伝子の発現を ER ボディ形成に関わる転写制御因子、*NAI1* が欠損した *nai1* 変異体で調べたところ、*MEB1*、*MEB2* 遺伝子の発現は野生株と比較して *nai1* 変異体で減少していることが明らかとなった。このことから、*MEB1*、*MEB2* は ER ボディの形成や機能に関わる遺伝子であることが示唆された。一方 *IMP2* 遺伝子の発現は *nai1* 変異によって減少しなかった。

*MEB1*、*MEB2* タンパク質の局在を調べるために、*MEB1*、*MEB2* と蛍光タンパク質、tdTOMATO の融合タンパク質、tdTom-MEB1、tdTom-MEB2 をシロイヌナズナに発現させたところ、これらのタンパク質は ER ボディの膜に局在し、小胞体には局在しなかった。*MEB1*、*MEB2* は膜貫通ドメインをもつ。そこで、*MEB1*、*MEB2* 特異的な抗体を作成し、精製した膜画分を用いて *MEB1*、*MEB2* の可溶性を調べたところ、これらのタンパク質は、塩処理やアルカリ処理では可溶化されず、界面活性剤処理でのみ可溶化され、膜貫通タンパク質であることが明らかとなった。これらの結果から、*MEB1*、*MEB2* は ER ボディ特異的な膜タンパク質であることがわかった。*NAI2* 抗体を用いた免疫沈降により *MEB1*、*MEB2* は *NAI2* と結合することがわかった。また、*nai2* 変異体では *MEB1*、*MEB2* は小胞体に分散した。このことから、*NAI2* によって、*MEB1*、*MEB2* の ER ボディ局在が制御されていることが明らかとなった。

*MEB1*、*MEB2* の機能を調べるために、それぞれの遺伝子に T-DNA が挿入された *meb1*、*meb2* 変異体を単離し、二重変異体株、*meb1 meb2* を作成した。これらの変異体の ER ボディ形成と *PYK10* の蓄積を調べたところ、変異体と野生株ではほとんど差が見られなかった。*meb1 meb2* 二重変異体において *IMP2* 遺伝子が冗長的に働き、表現型が現れない可能性があった。そこで、*IMP2* 遺伝子の発現を抑える *amiR* を *meb1 meb2* 二重変異体に導入し、*meb1 meb2 imp2* 三重変異体を作成した。*meb1 meb2 imp2* 三重変異体の ER ボディ形成と *PYK10* の蓄積を調べたところ、三重変異体と野生株ではほとんど変わらなかった。これらのことから、*MEB1*、*MEB2* の欠損による ER ボディ膜の成分変化は ER ボディの形態にはほとんど影響しないことが明らかとなった。

##### (2) *NAI2*、*PYK10* の ER ボディ形成における機能解析

ER ボディが形成されない *nai2* 変異体を単離した(図 1)。*NAI2* 遺伝子は、ER ボディに局在する新規タンパク質をコードしていた。このことから、*NAI2* は ER ボディ形成の実行因子として働くことが示唆された。*nai2* 変異体において、*PYK10* は小胞体全体に分散し、蓄積量が減少した。このことから、*NAI2* は *PYK10* の ER ボディへの集積と大量蓄積に関わると考えられた。*NAI2*、*PYK10* 遺伝子を、ER ボディが形成されないタバコ表皮細胞に導入した。*PYK10*、*NAI2* 単独では ER ボディが形成されなかったが、*PYK10* と *NAI2* を同時に導入したところ、ER ボディが形成された。タバコ培養細胞を用いた実験でも同様に、*NAI2* と *PYK10* 遺伝子を導入することで ER ボディが形成された。このことから、*NAI2* と *PYK10* は ER ボディの形成に必要なかつ十分である因子であることがわかった。

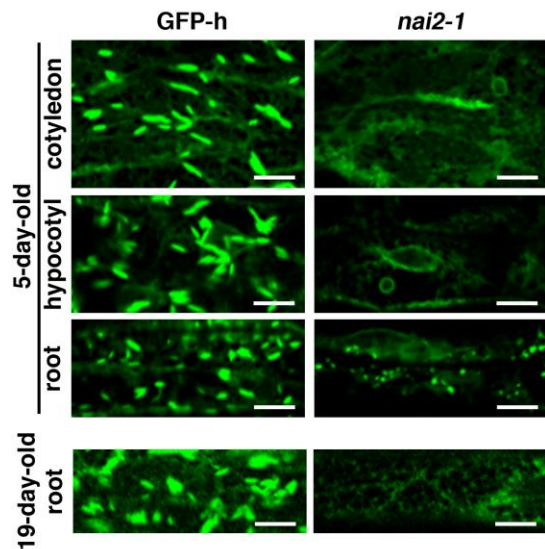


図 1. *nai2* 変異体では ER ボディが欠損する。小胞体と ER ボディを緑色蛍光タンパク質 (GFP) で可視化した野生株 (GFP-h) と *nai2-1* 変異体の共焦点蛍光顕微鏡写真。スケールバーは 10 $\mu$ m。

##### (3) ER ボディ欠損変異体の病虫害抵抗性の解析

ER ボディの機能を調べるために、ER ボディ欠損変異体における病原菌の感染効率を調べた。シュードモナス、フザリウム病原菌、ピシウム病原菌の感染効率を調べたが、野生株と変異体において大きな差は見られず、これらの病原菌に対する抵抗性には ER ボディが関わらないと思われた。

#### 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 3 件)

① K. Yamada, I. Hara-Nishimura, M.

Nishimura

Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants.

*Plant Cell Physiol.* (2011) 52(12): 2039-2049. (査読有)

② K. Yamada, A. J. Nagano, K. Ogasawara, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura  
The ER body, a new organelle in *Arabidopsis thaliana*, requires NAI2 for its formation and accumulates specific  $\beta$ -glucosidases.  
*Plant Signal. Behav.* (2009) 4(9): 849-852.  
(査読無)

③ K. Ogasawara, K. Yamada, J. T. Christeller, M. Kondo, N. Hatsugai, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura  
Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct  $\beta$ -glucosidases.  
*Plant Cell Physiol.* (2009) 50(3): 480-488.  
(査読有)

[学会発表] (計8件)

① 山田健志, 永野惇, 仁科桃子, 西村いくこ, 西村幹夫  
NAI2によるERボディ成分の集積はERボディ形成に必要なかつ十分である  
第52回日本植物生理学会年会, 東北大学, 仙台, 2011年3月20-22日

② K. Yamada  
Mechanisms of ER body formation and its possible function in *Arabidopsis thaliana*  
The 2nd NIBB-MPIZ Joint Symposium, Plant Science Communications 2010, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan, November 16-18, 2010

③ K. Yamada, A. J. Nagano, M. Nishina, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura  
Expression of NAI2 and PYK10 is sufficient for the endoplasmic reticulum (ER) body formation in *Arabidopsis*  
21st International Conference on Arabidopsis Research, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, June 6-10, 2010

④ K. Yamada  
Molecular mechanisms of endoplasmic reticulum body formation in *Arabidopsis*  
JSPS Invitational Training Program for Advanced Japanese Research Institutes, Perspective of Plant Science, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan, March 27, 2010

⑤ 山田健志, 永野惇, 仁科桃子, 西村いくこ, 西村幹夫

NAI2とPYK10はERボディの形成とERボディ膜タンパク質の局在を制御する  
第51回日本植物生理学会年会, 熊本大学, 熊本, 2010年3月18-21日

⑥ K. Yamada

Mechanisms underlying endoplasmic reticulum body formation in *Arabidopsis*  
The 1st NIBB-MPIZ Joint Symposium, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany, October 25-26, 2009

⑦ 山田健志, 永野惇, 西村いくこ, 西村幹夫  
シロイヌナズナにおける小胞体由来のオルガネラERボディの形成機構  
第82回日本生化学会大会(シンポジウム)変貌するオルガネラ像—ダイナミクスと高次機能—, 神戸ポートアイランド, 神戸, 2009年10月21-24日

⑧ 山田健志

シロイヌナズナの小胞体由来オルガネラ“ERボディ”の形成に関する解析  
第4回NIBBバイオイメージングフォーラム, 基礎生物学研究所, 岡崎, 2009年10月1-2日

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

① 名称: Gene Capable of Forming ER body, and Use Thereof.

発明者: K. Yamada, I. Nishimura, M. Nishimura

権利者: National Institute for Basic Biology, Kyoto University

種類: 発明特許

番号: PCT/JP2005/065711

出願年月日: 2010年9月13日

国内外の別: 国外

② 名称: ERボディ形成能を有する遺伝子およびその利用

発明者: 山田健志, 西村いくこ, 西村幹夫

権利者: 基礎生物学研究所, 京都大学

種類: 発明特許

番号: 特願2010-68055

出願年月日: 2010年3月24日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/celmech/jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健志 (YAMADA KENJI)

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: 00360339