

平成23年 6月 2日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21770060

研究課題名(和文)

植物の液胞上に生じるサブ領域様構造 bulb の研究

研究課題名(英文) Study of "bulb, subregion-like structure on the vacuolar membrane with a complex configuration"

研究代表者

齊藤 知恵子 (SAITO CHIEKO)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・専任研究員

研究者番号： 10321762

研究成果の概要(和文)：

液胞膜上のサブ領域様構造 bulb について、その分子的基盤や機能の解明を目指し、遺伝学的な解析を中心に研究を行った。逆遺伝学的な解析で、bulb が減る表現型を示す変異体を探索し、自食(オートファジー)の変異体で bulb が漸減していることを明らかにした。順遺伝学的に、顕微鏡スクリーニングにより bulb の数が減る変異体の単離を試みた。Bulb の形成と維持にはオートファジーが一部関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

I have previously identified and reported a "bulb", a complex and mobile structure on the continuous vacuolar membrane at 2002. To get a clue its biological significance and function, I searched mutants that show abnormalities in bulbs. By a reverse genetical approach, I found that the frequency of the appearance of bulbs were reduced in autophagy mutants. I further tried to isolate mutants that have abnormal bulbs by forward genetical approach.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：液胞, SNARE, phospholipase, ブラシノステロイド

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、液胞膜上で複雑に折り畳まれた球状の構造 bulb を見出し2002年に報告した。Bulb ではタンパク質の選択的濃縮や排除が起こっている可能性も示唆された。その後の研究で、bulb は、他のマーカーでも可視

化できること、急激に成長しつつある様々な組織で広く存在することがわかり (Saito et al. in press), bulb の存在の一般性が確認されつつある。本研究開始当初までに、bulb の出現頻度が著しく低下している2つの変異体を見出していた (Saito et al. in press). Bulb の機能の手がかりを得るた

めには、さらなる遺伝学的なアプローチによって、bulbの数や形態に異常をきたす変異体を多数取得し、それらを解析することが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

そこで、以下のことを具体的な目標にして研究を行った。逆遺伝学、順遺伝学のアプローチにより、bulbの数や形態に異常を生じる変異体を得る。その原因遺伝子やbulb以外の表現型から、これまで知られていなかったbulbの新たな機能を探る。また、これまで得られてきた変異体と野生型での表現型を詳細に比較することによって、bulbの形成過程を類推する。

3. 研究の方法

様々な組織・器官でbulbを可視化することができる *ProVAM3::GFP::VAM3 / vam3-1* のラインを標準ラインに用い、①EMS処理で得た変異体プールから、順遺伝学的に顕微鏡スクリーニングにより、bulbに異常をきたす変異体の単離を試みた。②既知の変異体と掛け合わせて、逆遺伝学的にbulbの数が減るものを探した。③bulbが激減する2つの変異体で、細胞のサイズを測定し野生型と比較した。

4. 研究成果

①順遺伝学：

発芽後3日目の芽生え合計2200個体以上を観察し、bulbや液胞の形態に異常がある候補株を200個体選抜した。そのうち、120個体については次世代種子を回収できた。特に注目した候補株#64は、矮性で、葉身、葉柄、花器官、花柄など多くの組織で組織の伸長異常が見られた。不稔なのでヘテロ接合体で維持する必要があった。Bulbは完全になくなるわけではないが、異常な形態を示し、数も減っているようだった。既知のブラシノステロイド関連の変異体に形態が似ていることから、リアルタイムPCRによりブラシノステロイドの情報伝達系の遺伝子の発現量を調べたところ、複数のマーカー遺伝子の発現が低下していた。

②逆遺伝学：

bulbの三次元的な形態を考察すると、ミクロオートファジーの結果生じる可能性が考えられた。そこで、自食の変異体(*atg* mutant)内でbulbがどうなるかを調べた。その結果、複数の自食の変異体 *atg2*, *atg5*, *vti12* において、bulbは観察された。しかしながら定量的な解析を行ったところ、およそ半減していることが明らかとなった。このことは、オートファジーは、bulbの形成に必ずしも必須な経路ではないが、一部関与していることが示唆された (Saito et al. 投稿論文準備中)。

また、これまで見つけていたbulbが激減する2つの変異体 (*zig-1/sgr4-1*, *sgr2-1*) で

は、前者は原形質系 (transvacuolar strand) がほとんど形成されず、後者は形成されていることから、bulbの形成過程には、原形質系の形成とオーバーラップする過程と、独立の過程があることが示唆された (Saito et al. 論文改訂中)。

③その他：bulbの機能の手がかりを得るため、bulbが激減する2つの変異体で、細胞のサイズを測定し野生型と比較した。*zig-1/sgr4-1*, *sgr2-1* ではコントロールの標準株に比べ、細胞の大きさがおよそ20%減少していた。このことは、bulbが細胞伸張に何らかの寄与をすることを示唆している (Saito et al. 論文改訂中)。

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7件) 全て査読あり

①Saito, C., Uemura, T., Awai, C., Tominaga, M., Ebine, K., Ito, J., Ueda, T., Abe, H., Morita, T.M., 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* (in press)

②Hamamura, Y., Saito, C., Awai, C., Kurihara, D., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Kanaoka, M.M., Sasaki, N., Nakano, A., Berger, F., and Higashiyama, T. (2011). Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* 21, 497-502.

③Hashiguchi, Y., Niihama, M., Takahashi, T., Saito, C., Nakano, A., Tasaka, M., and Morita, M.T. (2010). Loss-of-function mutations of retromer large subunit genes suppress the phenotype of an Arabidopsis *zig* mutant that lacks Qb-SNARE VTI11. *Plant Cell* 22, 159-172.

④Komatsu, T., Kawaide, H., Saito, C., Yamagami, A., Shimada, S., Nakazawa, M., Matsui, M., Nakano, A., Tsujimoto, M., Natsume, M., Abe, H., Asami, T., and Nakano, T. (2010). The chloroplast protein BPG2 functions in brassinosteroid-mediated post-transcriptional accumulation of chloroplast rRNA. *Plant J* 61, 409-422.

⑤Uemura, T., Morita, M.T., Ebine, K., Okatani, Y., Yano, D., Saito, C., Ueda, T., and Nakano, A. (2010). Vacuolar/pre-vacuolar compartment Qa-SNAREs VAM3/SYP22 and PEP12/SYP21 have interchangeable functions in Arabidopsis. *Plant J* 64, 864-873.

⑥Era, A., Tominaga, M., Ebine, K., Awai, C.,

Saito, C., Ishizaki, K., Yamato, K.T., 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.

⑦Kadota, A., Yamada, N., Suetsugu, N., Hirose, M., Saito, C., Shoda, K., Ichikawa, S., Kagawa, T., Nakano, A., and Wada, M. (2009). Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13106-13111.

〔学会発表〕(計 15 件)

①齊藤 知恵子, 栗井 千絵, 木内 玲子, 植村 知博, 富永 基樹, 安部 弘, 吉本 光希, 森田 (寺尾) 美代, 上田 貴志, 中野 明彦 液胞上に生じる複雑な膜構造 bulb に生じる変異体の探索 日本植物生理学会第 52 回大会 2011 年 3 月 20 日 東北大学 (仙台)

②浜村 有希, 齊藤 知恵子, 金岡 雅浩, 佐々木 成江, 中野 明彦, 東山 哲也 ライブイメージングで明らかにした重複受精における配偶体細胞のダイナミクス 日本植物生理学会第 52 回大会 2011 年 3 月 20 日 東北大学 (仙台)

③山上 あゆみ, 齊藤 知恵子, 中澤 美紀, 松井 南, 作田 正明, 中野 明彦, 藤岡 昭三, 辻本 雅文, 浅見 忠男, 中野 雄司 ブラシノステロイド情報伝達因子 BIL4 の細胞内における機能解析 日本植物生理学会第 52 回大会 2011 年 3 月 20 日 東北大学 (仙台)

④植村 知博, 齊藤 知恵子, 庄田 恵子, 海老根 一生, 上田 貴志, Schultz-Lefert Paul, 中野 明彦 TGNに局在するSYP4(Qa-SNAREグループ)が関与する高次機能の解析 日本植物生理学会第52回大会 2011年3月20日 東北大学 (仙台)

⑤山上 あゆみ, 齊藤 知恵子, 中澤 美紀, 松井 南, 作田 正明, 中野 明彦, 藤岡 昭三, 辻本 雅文, 浅見 忠男, 中野 雄司 ブラシノステロイド情報伝達突然変異体 *bil4* の原因遺伝子の細胞伸張における機能解析 植物化学調節学会 第 45 回大会 2010 年 11 月 2 日 神戸

⑥齊藤 知恵子 ライブイメージングと電子顕微鏡の両方を用いて明らかにした液胞膜の機能 日本植物学会第 74 回大会 2010 年 9 月 10 日 中部大学 (春日井)

⑦浜村 有希, 齊藤 知恵子, 宮脇 敦史, 中川 強, 佐々木 成江, 中野 明彦, 東山 哲也 光変換タンパク質 KikGR variant を用いた重複受精機構のライブイメージング解析 日本植物学会第 74 回大会 2010 年 9 月 9 日 中部大学 (春日井)

⑧ Chieko Saito, Tomohiro Uemura, Motoki Tominaga, Kohki Yoshimoto, Kazuo Ebine, Jun Ito, Takashi Ueda, Hiroshi Abe, Miyo Terao Morita, Masao Tasaka, and Akihiko Nakano Quest for the Biological Significance of “Bulbs”, Complex Configuration in Vacuolar Membrane ICAR2010 2010 年 6 月 8 日 パシフィコ横浜

⑨山上 あゆみ, 齊藤 知恵子, 中澤 美紀, 松井 南, 作田 正明, 中野 明彦, 藤岡 昭三, 辻本 雅文, 浅見 忠男, 中野 雄司 植物ステロイドホルモン生合成阻害剤を用いた植物ケミカルバイオロジー—ブラシノステロイド情報伝達突然変異体 *bil4* の原因遺伝子の探索と機能解析— 日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会 2010年5月18日 慶応大学 (東京)

⑩富永基樹, 安部弘, 齊藤知恵子, 江波和彦, 庄田恵子, 栗井千絵, 植村知博, 上田貴志, 中野明彦 植物特異的膜交通におけるミオシンモーターの機能解析 日本植物生理学会 2010年3月21日 熊本

⑪富永基樹, 安部弘, 齊藤知恵子, 江波和彦, 庄田恵子, 栗井千絵, 植村知博, 上田貴志, 中野明彦 植物特異的膜交通におけるミオシンモーターの機能解析 生体運動研究合同班会議 2010年1月11日 神戸

⑫山上あゆみ, 齊藤知恵子, 中澤美紀, 松井南, 作田正明, 中野明彦, 藤岡昭三, 辻本雅文, 浅見忠男, 中野雄司 ブラシノステロイド情報伝達突然変異体 *bil4* の原因遺伝子の機能解析 植物科学調節学会第 44 回大会 2009 年 10 月 30 日 仙台

⑬富永基樹, 江波和彦, 安部弘, 齊藤知恵子, 庄田恵子, 栗井千絵, 植村知博, 上田貴志, 中野明彦 植物特異的膜交通におけるミオシンモーターの機能 日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸

⑭Chieko Saito, Chie Awai, Motoki Tominaga, Tomohiro Uemura, Jun Ito, Hiroshi Abe, Takashi Ueda, Miyo T. Morita, and Akihiko Nakano Bright “bulb” s lighted up on the continuous vacuolar membrane

- seeking for its characteristics and biological significance- Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists 2009年7月20日 Honolulu

⑮富永基樹, 安部弘, 齊藤知恵子, 庄田恵子, 栗井千絵, 植村知博, 上田貴志, 中野明彦 ライブ

イメージングによって明らかとなった植物
ミオシンメンバーの局在やダイナミクスの
多様性 日本細胞生物学会大会 2009年6月2
日名古屋

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 知恵子 (SAITO CHIEKO)
独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究
室・専任研究員
10321762

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者