

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22570039

研究課題名（和文）

植物の発生・分化に関与する色素体包膜タンパク質の解析

研究課題名（英文）

An analysis of an envelope membrane protein that is involved in plant morphogenesis

研究代表者

吉岡 泰 (YOSHIOKA YASUSHI)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60202397

研究成果の概要（和文）：

CRLタンパク質は色素体へのタンパク質輸送やストレス応答などに関与するタンパク質と相互作用し、これらを介して植物の形態形成に関与する可能性が示唆された。*crl*変異体では色素体分裂に必要なタンパク質量の減少によって色素体分裂が阻害されていることが示唆された。CRLが局在する小胞は色素体外包膜を含む一重膜構造体である事が示唆され、小胞への局在にはアミノ末端領域が必要であった。また、CRLはミトコンドリアにも局在した。

研究成果の概要（英文）：

CRL protein interacts with a protein involved in plastid-protein import and also with one involved in stress response. This suggests that CRL could be involved in plant morphogenesis through functions of these proteins. CRL containing vesicle is suggested to be a single membrane structure containing outer envelope of plastids. The amino terminal portion of CRL is required for vesicle localization of CRL. Beside vesicles and plastids, CRL localizes in mitochondria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物分子遺伝学

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：シロイヌナズナ、葉緑体、色素体分裂、形態形成

## 1. 研究開始当初の背景

色素体は植物の生存を支える様々な物質合成に重要なオルガネラである。しかし近年、色素体は、物質合成以外の様々な局面において重要な働きをして

いることが明らかとなってきた。たとえば、色素体は植物の形態形成に関与し、葉緑体シグナルとよばれる仮想的なシグナル分子を介して、核ゲノムの遺伝子発現調節を行う。さらに、色素体への

タンパク質輸送に関しても新たな知見が得られてきている。すなわち、色素体を囲む膜（包膜）に存在するタンパク質輸送装置（Toc, Tic 複合体）を経由する経路以外に、ゴルジ体を経由した小胞輸送による、色素体へタンパク質輸送系が存在することが報告されている。しかし、植物形態形成における色素体の役割や、葉緑体シグナル、色素体への小胞輸送に関しては未解明な点が多い。

我々が解析を行っているシロイヌナズナの *CRUMPLED LEAF (CRL)* は、コケ・シダを含む多細胞高等植物に保存されており、主に色素体外包膜に局在する新規タンパク質をコードする核ゲノム遺伝子である。これまでの解析から、*CRL* 遺伝子は色素体分裂、植物の全器官の形態形成に関与することが明らかとなっており、さらに、われわれの最近の研究から、色素体と核との間の小胞輸送に関与する可能性が示唆されている。また、シロイヌナズナにおいては、細胞あたりの葉緑体数によらず細胞に占める葉緑体の割合（葉緑体/細胞比）はほぼ一定に保たれている。このことから細胞の中に葉緑体が占める割合を検知し、葉緑体の割合を調節する機構が存在する事が示唆されている。我々は *CRL* 遺伝子がこの現象にも関与していることを明らかとした。さらに、*CRL* 遺伝子はある種の活性酸素によって発生する葉緑体シグナルの伝達に関与することが示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究は *CRL* 遺伝子の解析を通じて、以下の点を解明することを主たる目的として行われた。

- (1) 色素体は如何にして植物の形態形成に関与するのか？
- (2) 色素体/細胞体積比は如何にして一定に保たれるのか？
- (3) 色素体と他のオルガネラとの間に小胞を介した物質輸送系が存在するのか？

あわせて、(4) *CRL* 遺伝子は如何にして色

素体分裂に関与するのかを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) Yeast two-hybrid スクリーニング (Y2H) 法および、二次元電気泳動と質量分析を用いて CRL と相互作用するタンパク質 (CRL Interacting Proteins, CRIPs) をシロイヌナズナ cDNA ライブラリー、植物体よりそれぞれ単離、同定する。得られた CRIPs について、*in vitro*, *in vivo* での CRL との相互作用を調べる。さらに、CRIPs の発現組織、細胞内局在、遺伝子変異体の表現型解析を行う。

(2) 変異体のサプレッサー、エンハンサー変異体のスクリーニングは、*crl* 変異体を変異原処理し、葉の形態を指標として行う。

(3) GFP 融合 CRL タンパク質発現植物体を用いて、CRL の細胞内局在のライブイメージを解析する。

(4) Y2H 法などを用いて、CRL タンパク質と既知の色素体分裂制御タンパク質との相互作用を調べる。CRL と相互作用するタンパク質があれば、*in vitro*, *in vivo* での CRL との相互作用を調べる。

## 4. 研究成果

*crl* 変異を相補することができる、CRL-GFP タンパク質をゲノム上にもつ、形質転換シロイヌナズナから、不溶性タンパク質を調製し、抗 GFP 抗体を用いて CRL タンパク質と相互作用するタンパク質を精製した。その結果、色素体へのタンパク質輸送に関与する色素体外包膜タンパク質 Toc75-III、ストレス応答などに関与する Prohibitin (PHB) タンパク質などが、CRL と相互作用するタンパク質候補として得られた。*crl* 変異体では、色素体へのタンパク質輸送に一部欠損が見られ、さらに、*phb* 遺伝子変異体と類似した表現型が観察された。これらの事から、Toc75-III と PHB タンパク質が実際に CRL と相互作用している可能性が高いと考えられた。今後、*PHB* 遺伝子、*Toc75* 遺伝子との相互作用を通じて、CRL が植物の形態形成に関与する可能性を検討する必要がある。

*cr1*変異体においては、葉緑体分裂面にリング状に局在する、FtsZタンパク質の局在が変化し、葉緑体内部に多重リングを形成したり、ドット状の局在を示したりしていた。さらに、*cr1*変異体ではFtsZ1-1, FtsZ2-1タンパク質量が野生型の7割に減少していた。これから、*cr1*変異体ではFtsZタンパク質量の減少によって、葉量体分裂が阻害されている可能性が考えられた。また、名古屋大学遺伝子実験施設との共同研究によって、ヒメツリガネゴケのCRL相同遺伝子*PpCRL1*, *PpCRL2*の2重破壊株を解析し、CRL遺伝子の機能がコケ植物である、ヒメツリガネゴケにおいても部分的に保存されていることを明らかとした。

シロイヌナズナCRL遺伝子プロモーターで転写されるCRL-YFP遺伝子(*P<sub>CRL</sub>-CRL-YFP*)発現植物を作製し、CRL-YFPが葉緑体包膜以外にも、核周縁部、細胞質内の小胞、小さなドットの構造体に存在する事を確認した。さらに、色素体外包膜タンパク質であるToc75に対する抗体、および、色素体内包膜タンパク質であるTic110に対する抗体を用いて、*in situ*免疫染色をおこない、CRLが局在する核周縁部の構造体、細胞質内の小胞にはToc75は存在するが、Tic110は存在しないことを明らかとした。この結果から、CRLを含む核周縁部の構造と小胞は一重膜構造を持つことが示唆された。

色素体と他のオルガネラとの間に膜輸送系が存在するかに関しては、明確な結論を得るに至らなかったが、CRLタンパク質の細胞内局在に関して以下の結果を得た。

CRL-YFP融合タンパク質と、各種オルガネラ局在蛍光タンパク質との細胞内共局在を解析した結果、CRLタンパク質が局在する、細胞質の小さなドット状の構造体がミトコンドリアであることが明らかとなった。さらに、様々な領域を欠失したCRLと、GFPあるいはYFPとの融合タンパク質遺伝子を作製し、植物細胞内で発現して、CRLタンパク質の細胞内局在に必要な領域を解析した。その結果、CRLタンパク質が、葉緑体包膜および、小胞、ドット状の構造

体に局在するためには、アミノ末端側の133アミノ酸残基が必要である事が明らかとなった。さらに、ミトコンドリアと色素体への局在シグナルが、CRLタンパク質のN末端よりにある短い疎水性領域であることを明らかにした。この疎水性領域内のグリシン残基のアスパラギン酸への置換によって、色素体へのタンパク質輸送のみが阻害されたことから、疎水性領域内にあるグリシン残基が、タンパク質の色素体輸送には重要であるが、ミトコンドリアへのタンパク質輸送には関与しない可能性が示唆された。ミトコンドリア局在蛍光タンパク質を発現している植物体を用いて、野生型と*cr1*変異体とで、ミトコンドリアの数と形態を観察したが、両者の間に顕著な差はなかった。

CRLタンパク質はオルガネラ膜にタンパク質の一部が埋め込まれた、膜アンカー型タンパク質の1つである。オルガネラ膜アンカー型タンパク質の輸送にはankyrin repeat-containing protein 2A, 2B (AKR2A, 2B)が関与することがすでに報告されている。酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって、CRLと相互作用するタンパク質として、これらAKR2A, AKR2Bが得られた。これらのタンパク質とGFPとを融合して、植物細胞内で一過的に発現させたところ、AKR2Aタンパク質は細胞質に共在した。さらに、ツーハイブリッド系を用いた解析から、AKR2Aタンパク質がCRLの色素体とミトコンドリア輸送シグナルである短い疎水性領域に結合することが明らかとなった。これらの結果から、AKR2タンパク質によってCRLタンパク質は色素体とミトコンドリアへ輸送されることが示唆された。

自家受粉可能な*cr1*変異体の弱い対立遺伝子をホモにもつ系統の種子をEMS処理し、*cr1*変異体の表現型が亢進された、*cr1*変異のenhancer候補を多数単離した。

## 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5件)

① Iwata, E., Ikeda S., Mtsunaga, S.,

Kurata, M., Yoshioka, Y., Criqui, M.-C., Genschik, P., Ito, M.  
Role of GIG1 and UVI4 genome duplication in *Arabidopsis thaliana*.  
Plant Signaling Behavior vol.7 (9), 2012, p.1079-1081. 査読有  
DOI:10.4161/psb.21133

② Sugita, C., Kato, Y., Yoshioka, Y., Tsurumi, N., Iida, Y., Machida, Y., Sugita, M.

*CRUMPLED LEAF (CRL)* Homologs of *Physcomitrella patens* are Involved in the Complete Separation of Dividing Plastids. *Plant Cell Physiol.* vol. 53 (6), 2012, p.1124-1133. 査読有  
DOI:10.1093/pcp/pcs058

③ Fujiwara, M.T., Yoshioka, Y., Hirano, T., Kazama, Y., Abe, T., Hayashi, K., Itoh, R.D.

Visualization of plastid movement in the pollen tube of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling Behavior.* vol. 7 (1), 2012, p.34-37. 査読有  
DOI: 10.4161/psb.7.1.18484

④ Iwata, E., Ikeda S., Mtsunaga, S., Kurata, M., Yoshioka, Y., Criqui, M.-C., Genschik, P., Ito, M.

*GIGAS CELL1*, a novel negative regulator of the anaphase-promoting complex/cyclosome, is required for proper mitotic progression and cell fate determination in *Arabidopsis thaliana*.

*The Plant Cell* vol. 23 (12), 2011, p.4382-4393. 査読有  
DOI: 10.1105/tpc.111.092049

⑤ Fujiwara, M.T., Hashimoto, H., Kazama, Y., Hirano, T., Yoshioka, Y., Aoki, S., Sato, N., Itoh, R.D., Abe, T.

Dynamic morphologies of pollen plastids visualised by vegetative-specific FtsZ1-GFP in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, vol. 242 (1-4), 2010, p.19-33. 査読有

DOI: 10.4161/psb.7.1.18484

〔学会発表〕(計13件)

① 吉岡泰

シロイヌナズナ *CRUMPLED LEAF* タンパク質のオルカネラ局在に必要な領域の解析  
第54回日本植物生理学会年会  
2013年3月22日、岡山大学(岡山県)

② 村田綾

シロイヌナズナ *CRUMPLED LEAF* タンパク質と相互作用するタンパク質の同定  
第54回日本植物生理学会年会  
2013年3月21日、岡山大学(岡山県)

③ 吉岡泰

シロイヌナズナ *CRL* タンパク質のオルガネラ局在解析  
第53回日本植物生理学会年会  
2012年3月18日、京都産業大学(京都府)

④ 杉田千恵子

ヒメツリガネゴケ *CRL* は葉緑体分裂の完了に機能する  
第53回日本植物生理学会年会  
2012年3月18日、京都産業大学(京都府)

⑤ 吉岡泰

シロイヌナズナ *CRL* タンパク質の色素体包膜局在に必要な領域の解析  
日本植物学会第75回大会  
2011年9月17日、東京大学(東京都)

⑥ 伊藤正樹

体細胞の染色体数が倍化するシロイヌナズナ *gigas cell1* 変異体の解析  
日本植物学会第75回大会  
2011年9月17日、東京大学(東京都)

⑦ 吉岡泰

シロイヌナズナ *CRL* タンパク質細胞内局在の解析  
第52回日本植物生理学会年会  
2011年3月11日、要旨集

⑧ 杉田千恵子

ヒメツリガネゴケ *CRUMPLED LEAF* 相同遺伝子の機能解析  
第52回日本植物生理学会年会  
2011年3月11日、要旨集

⑨ 岩田恵里子

体細胞の染色体数が倍化するシロイヌナズナ *gigas cell1* 変異体の解析  
第52回日本植物生理学会年会  
2011年3月11日、要旨集

⑩ 吉岡泰

ヒメツリガネゴケ *CRUMPLED LEAF* 相同遺伝子破壊株の解析  
植物学会第74回大会  
2010年9月9日、中部大学(愛知県)

⑪ 伊藤正樹

*gigas cell1* 変異体に生じるエンドマイトコンドリアによる核内倍化  
植物学会第74回大会

2010年9月9日、中部大学（愛知県）

⑫ 岩田恵理子

巨大な孔辺細胞が生じるシロイヌナズナ  
*gig1* 変異体の解析

植物学会第74回大会

2010年9月11日、中部大学（愛知県）

⑬ 吉岡泰

An analysis of *CRUMPLED LEAF* homologous  
genes of *Physcomitrella patens* by gene  
disruption

MOSS2010（国際ヒメツリガネゴケ学会

2010年7月24日、北海道大学（北海道）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 泰 (YOSHIOKA YAUSHI)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60202397

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし