

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570051

研究課題名(和文)シロイヌナズナの有性生殖過程における小胞体分子シャペロン依存型核膜融合機構の解析

研究課題名(英文)Analyses of ER-resident molecular chaperone-dependent nuclear membrane fusion during fertilization of *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

西川 周一 (NISHIKAWA, Shuh-ichi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10252222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナ雌性配偶体形成時の極核融合において、小胞体の分子シャペロンHsp70であるBiPは、核外膜融合と核内膜融合という異なる膜融合の過程に、制御因子である小胞体Jタンパク質を使い分けることで機能していることを示した。ライブイメージング解析によって、受精後の胚乳核分裂の過程で極核融合の欠損が回復すること、正常な胚乳核の分裂には受精時の精核と極核の融合が必要であることを明らかにした。また、極核融合に必要な新たな因子の検索を行い、極核融合に必要な核膜タンパク質の候補を得た。

研究成果の概要(英文)：We showed that BiP, an Hsp70 molecular chaperone in the endoplasmic reticulum, function in the fusions of the outer and inner nuclear membranes of the polar nuclei with different sets of J-domain containing partner proteins during the female gametogenesis of *A. thaliana*. Live imaging analyses showed that the polar nuclei fusion defect can be recovered during the first endosperm nuclear division after fertilization and that the fusion of sperm nuclei at fertilization is required for proper endosperm proliferation. We also identified candidates of nuclear membrane proteins required for the polar nuclei fusion.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：小胞体 分子シャペロン 核膜融合 有性生殖 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

細胞核の融合は、2 個の核の融合によって 1 個の核が形成する過程であり、様々な生物の有性生殖で必須の役割をはたしている。被子植物の有性生殖の過程では、重複受精における 2 回の核融合と雌性配偶体形成時の極核融合の、合計 3 回の核融合が観察される。研究代表者らは、小胞体内腔の分子シャペロン Hsp70 である BiP が、雌性配偶体形成時の極核融合、その中でも核膜融合過程に必要であることを、BiP に関するシロイヌナズナ欠損株の解析によって明らかにした。BiP は出芽酵母の有性生殖である接合過程の核膜融合にも必要であることから、有性生殖過程における BiP 依存の核膜融合が種を超えて広く存在していることが示唆された。

BiP は単独で機能するのではなく、制御因子である小胞体の J タンパク質 (Hsp40) の機能を必要とする。研究代表者らはシロイヌナズナの J タンパク質を同定するとともに、変異株の解析によって AtERdj3A、AtERdj3B、AtP58^{IPK} といった小胞体 J タンパク質が極核の核膜融合過程に機能していることを示唆する結果を得ている。核膜は小胞体膜の特殊化した領域であり、核膜局在の膜融合タンパク質が小胞体の Hsp70 システムのクライアントとなることで、Hsp70 システムが核膜融合を制御していると考えられる。そこで、小胞体 Hsp70 システムを足がかりにした解析を行うことで、極核融合の分子機構を明らかにできると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナを用いて、分子シャペロン依存型核膜融合の分子機構の解明を目指して以下の研究を行う。

(1) ライブイメージングによる極核融合過程の解析系を構築する。これを用いて、小胞体 Hsp70 システム変異株の示す、極核の核膜融合欠損の詳細を明らかにする。

(2) 小胞体 Hsp70 システムを足がかりとして、極核の核膜融合にあずかるタンパク質のスクリーニングを行い、新規核膜融合タンパク質の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) ライブイメージングによる極核融合過程の解析

Histone H2B と GFP または tdTomato との融合タンパク質を発現する形質転換植物を構築する。融合タンパク質の発現には、雌性配偶体をはじめとする植物体全体での発現が可能な RPS5 プロモーターと、中央細胞特異的な DD65 プロモーターまたは AGL80 プロモーターを用いる、これらの融合遺伝子は、小胞体 Hsp70 システムの変異株へ掛け合わせによって導入する。ライブイメージングによる解析は、雌性配偶体形成時や受精直後の胚珠を雌しべから摘出し、これを培地中で培養しながら共焦点顕微鏡を用いたタイムラプ

ス観察により行う。

(2) 極核融合の分子装置の検索と同定

小胞体 Hsp70 システムの変異株の示す極核融合欠損の表現型を指標として、新規極核融合欠損株のスクリーニングを行う。このため、Histone H2B-GFP によって中央細胞の核を可視化した形質転換植物を変異源処理した後、雌性配偶体致死の表現型を示す変異株の中から極核融合欠損を示す株を選別する。また、小胞体 J タンパク質は小胞体 Hsp70 システムにおいて基質選別の過程で機能することを利用し、小胞体 J タンパク質と相互作用するタンパク質を酵母 2 ハイブリッド法を用いて検索する。さらに、出芽酵母の核膜融合に必要な因子のシロイヌナズナホモログについて、その欠損株における極核融合を解析する。

4. 研究成果

(1) ライブイメージングによる極核融合過程の解析

本研究ではまず、BiP の制御因子である小胞体 J タンパク質の、極核融合における役割について検討した。変異株の解析の結果、小胞体 J タンパク質に関する単独変異株は極核融合欠損を示さなかったが、AtERdj3A と AtP58^{IPK} をともに欠失した (*3a p58*) 雌性配偶体と、AtERdj3B と AtP58^{IPK} をともに欠失した (*3b p58*) 雌性配偶体では極核融合が欠損していた。電子顕微鏡観察の結果、*3a p58* 二重欠損変異をもつ雌性配偶体は極核の外膜融合に欠損を、*3b p58* 二重欠損変異をもつ雌性配偶体は極核の内膜融合に欠損をもつことが示された。以上の結果は、BiP は極核融合において、異なるセットの小胞体 J タンパク質を利用することで核外膜融合と核内膜融合という異なる膜融合の過程を制御していることを示している。

BiP 欠損の雌性配偶体と同様に、*3a p58* 二重欠損変異をもつ雌性配偶体は致死であり、野生株の花粉で受粉しても種子形成が途中で停止した。一方で、*3b p58* 二重欠損変異をもつ雌性配偶体は致死とはならず、受精後の種子形成は正常に進行した。この結果は、極核融合の欠損自体が種子形成の異常を引き起こしたのではないことを示唆している。そこで、*3a p58* 二重欠損の雌性配偶体と *3b p58* 二重欠損の雌性配偶体の受精後の極核融合について、ライブイメージング解析で検討した。この結果、どちらの二重変異雌性配偶体においても、雌性配偶体形成時に融合しなかった極核は、受精後の胚乳における 1 回目の核分裂の際に観察される核膜の崩壊と再形成の過程で融合することが示された。一方で、*3a p58* 二重欠損の雌性配偶体では、受精後の胚乳における精核と極核の融合が起こらず、精核の脱凝縮も観察されなかった。これらの核は、胚乳における 1 回目の核分裂の際に融合した。しかし、精核が脱凝縮しないまま核分裂過程へと入るため、胚乳核の分裂異常と精核由来の遺伝子の発現の顕著な遅延が観

察された。以上の結果は、*3ap58* 二重欠損の雌性配偶体では受精時の中央細胞における精核の融合が阻害されること、受精時の精核の融合は精核の脱凝縮に必須であること、胚乳核分裂開始前の精核の脱凝縮は胚乳核の正常な分裂に必要であることを示している。

(2) 極核融合の分子装置の検索と同定

極核融合に欠損を示す新規変異株のスクリーニング

本研究ではまず、中央細胞特異的な DD65 プロモーターを用いて Histone H2B と GFP の融合タンパク質を発現するシロイヌナズナ株を構築した。蛍光顕微鏡解析の結果、得られた株の胚珠では中央細胞の核が特異的に GFP 蛍光によって観察されることが示された。この株を変異源処理して作製した M2 プールから、極核融合欠損変異株の取得を試みたが、現在までに目的の変異株は得られていない。これは、スクリーニング数の不足も一つの要因であるため、今後は新たな M2 プールの構築も含め、スクリーニングをさらに続けていく。

酵母 2 ハイブリッド法を用いたスクリーニング

小胞体 J タンパク質は、BiP のシャペロン反応の基質と相互作用する。このため、小胞体 J タンパク質と相互作用するタンパク質のスクリーニングによって核膜融合過程において BiP の基質となる膜融合装置が同定できると期待された。研究代表者らは、出芽酵母接合時の核融合に必要な核膜タンパク質 Nep98p/Mps3p が、小胞体 J タンパク質 Jem1p と相互作用することを報告している。そこで、Nep98p のシロイヌナズナホモログである AtSun1 および AtSun2 と AtERdj3A、AtERdj3B または AtP58^{IPK} との相互作用について、酵母 2 ハイブリッド法を用いて検討したが、有意な相互作用は見られなかった。次に、酵母 2 ハイブリッド法を用いて AtP58^{IPK} と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行った。現在、得られたポジティブクローンについて解析を進めている。

核膜融合因子ホモログの解析

出芽酵母で同定された、接合時の核融合に必要なタンパク質のシロイヌナズナホモログに関する欠損変異株を用いて、極核融合におけるこれらホモログの役割を検討した。これまでに、AtSun1 と AtSun2 が極核融合に関与していることを示唆する結果が得られた。AtSun1 と AtSun2 は核膜タンパク質であり、極核融合に関与する核膜タンパク質に関する初めての報告となる。今後は、これらの機能と小胞体 Hsp70 システムとの関連について、さらに検討を進めて行く必要がある。

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 6 件)

- Maruyama, D., Sugiyama, T., Endo, T., and Nishikawa, S. (2014) Multiple BiP genes of *Arabidopsis thaliana* are required for male gametogenesis and pollen competitiveness. *Plant Cell Physiol.* **55**: 801-810、査読有
- Mano, S., Nakamura, T., Kondo, M., Miwa, T., Nishikawa, S., Mimura, T., Nagatani, A., and Nishimura, M. (2014) The Plant Organelles Database 3 (PODB3) update 2014: integrating electron micrographs and new options for plant organelle research. *Plant Cell Physiol.* **55**: e1、査読有
- Shiota, T., Nishikawa, S., and Endo, T.* (2013) Analyses of protein-protein interactions by *in vivo* photocrosslinking in budding yeast. *Meth, Mol. Biol.* **1033**: 207-217、査読有
- Tamura, Y., Harada, Y., Nishikawa, S., Yamano, K., Kamiya, M., Shiota, T., Kuroda, T., Kuge, O., Sesaki, H., Imai, K., Tomii, K., and Endo, T. (2013) Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metab.* **17**: 709-718、査読有
- Izawa, T., Tsuboi, T., Kuroha, K., Inada, T., Nishikawa, S., and Endo, T.* (2012) Roles of Dom34:Hbs1 in non-stop protein clearance from translocators for normal organelle protein influx. *Cell Rep.* **2**: 447-453、査読有
- Izawa, T., Nagai, H., Endo, T. and Nishikawa, S. (2012) Yos9p and Hrd1p mediate ER retention of misfolded proteins for ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* **23**: 1283-1293、査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

杉山智之, 山本雅也, 遠藤斗志也, 西川周一「高温ストレス下での花粉成熟過程における小胞体品質管理の役割」第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 18 日 富山大学, 富山県

Tomoyuki Sugiyama, Masaya

Yamamoto, Toshiya Endo and Shuh-ichi

Nishikawa. “ER quality control plays key

roles in sexual reproduction at an

elevated temperature in *Arabidopsis*

thaliana” The 3rd International Congress

on Natural Sciences 2013 年 10 月 13

日 新潟大学五十嵐キャンパス, 新潟県

西川周一「小胞体における異常タンパク質の処理機構: 分子機構と高次機能」新潟生化学懇話会 2013 年 7 月

13 日 新潟大学脳研究所, 新潟県

丸山大輔, 山本雅也, 東山哲也, 遠藤斗志也, 西川周一「雌性配偶体形成時の極核の核外膜融合は中央細胞における精核の融合と胚乳形成に必要である」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

西川周一「植物の環境ストレス応答における小胞体品質管理の役割」第 12 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「植物の環境感覚をささえる多様な蛋白質機能」

2012 年 6 月 21 日

名古屋国際会議場, 愛知県

西川周一「植物の環境ストレス応答における小胞体品質管理の役割」第 12 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「植物の環境感覚をささえる多様な蛋白質機能」

2012 年 6 月 21 日

名古屋国際会議場, 愛知県

西川周一「植物の環境ストレス応答における小胞体品質管理の役割」第 12 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「植物の環境感覚をささえる多様な蛋白質機能」

2012 年 6 月 21 日

名古屋国際会議場, 愛知県

西川周一「植物の環境ストレス応答における小胞体品質管理の役割」第 12 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「植物の環境感覚をささえる多様な蛋白質機能」

2012 年 6 月 21 日

名古屋国際会議場, 愛知県

西川周一「植物の環境ストレス応答における小胞体品質管理の役割」第 12 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「植物の環境感覚をささえる多様な蛋白質機能」

2012 年 6 月 21 日

名古屋国際会議場, 愛知県

西川周一, 山本雅也, 遠藤斗志也「植物の発生・生育において小胞体品質管

理機構がはたす役割は何か」第 29 回

日本植物細胞分子生物学会大会 シンポジウム「植物のオートファジーと老化プロセス」九州大学 箱崎キャンパス 2011 年 9 月 8 日

Shuh-ichi Nishikawa. “Regulation of

plant growth and development by the

Hsp70 system in the ER.” 「奈良先端未来開拓コロキウム」シンポジウム

Protein and Organelle Dynamics under

Cellular Stress Conditions 2011 年 5 月 30

日～31 日 奈良先端科学技術大学院

大学 バイオサイエンス研究科, 奈良

県

〔図書〕(計 2 件)

Mano, S., Kimori, S., Takeda, T., Miwa,

T., Nishikawa, S., Mimura, T., Nagatani,

A., and Nishimura, M. (2013) Using

image-based resources: Databases for

plant organelle dynamics and

applications based on image information.

Image and Video Processing. iConcept

Press. ISBN: 978-1-477554-80-7

塩田拓也, 西川周一, 遠藤斗志也

(2012) 動的なタンパク質相互作用の

「スナップショット」を撮る～*in vivo*

における部位特異的光架橋法 実験

医学 **30**:1799-1805

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 周一 (NISHIKAWA, Shuh-ichi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号: 10252222